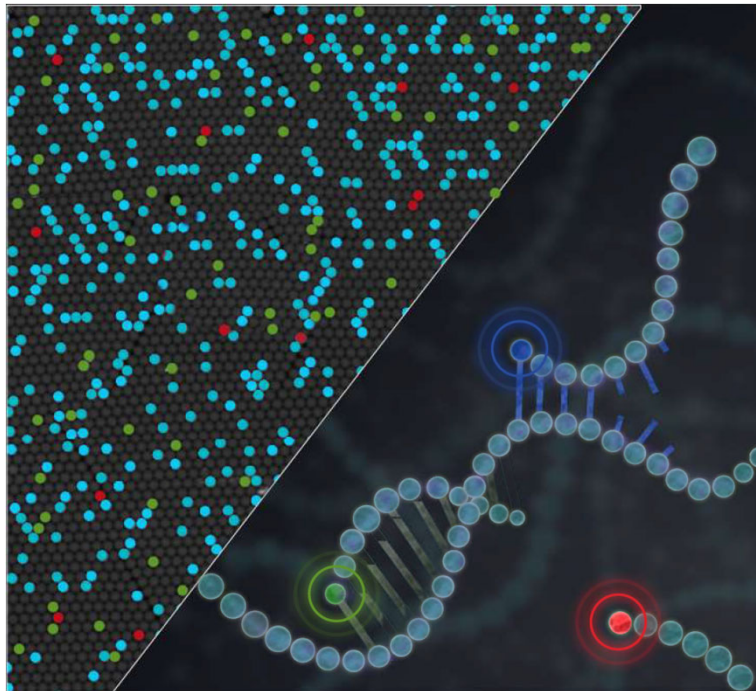




# Drop-off Crystal Digital PCR™

## *NRAS, KRAS, EGFR* 変異の検出



富士フイルム 和光純薬株式会社

## Drop-off アッセイの設計方法と定量化方法

Drop-off デジタルPCRの主な利点は、短いゲノム領域内で複数の近位の遺伝子病変(欠失、挿入、置換を含む)をシングルアッセイで検出できることです。Drop-off アッセイの最もシンプルなもの、同じアンプリコンに2つのTaqMan™ プローブが含まれるものです。Drop-off プローブは変異ホットスポットにかかり、野生型配列にのみ相補的です。リファレンスプローブは変異部位に隣接してハイブリダイズし、変異体と野生型の両方の対立遺伝子配列に相補的です(図1A)。野生型対立遺伝子では、drop-off プローブとリファレンスプローブの両方がターゲットとハイブリダイズし、ダブルポジティブシグナルが発生します(図1B、水色の集団)。対照的に、変異型対立遺伝子では、一塩基変異でもdrop-off プローブのハイブリダイゼーションを不安定にするのに十分なので、リファレンスプローブのみがターゲットにアニーリングしてシングルポジティブシグナルを導きます(図1B、緑色の集団)。

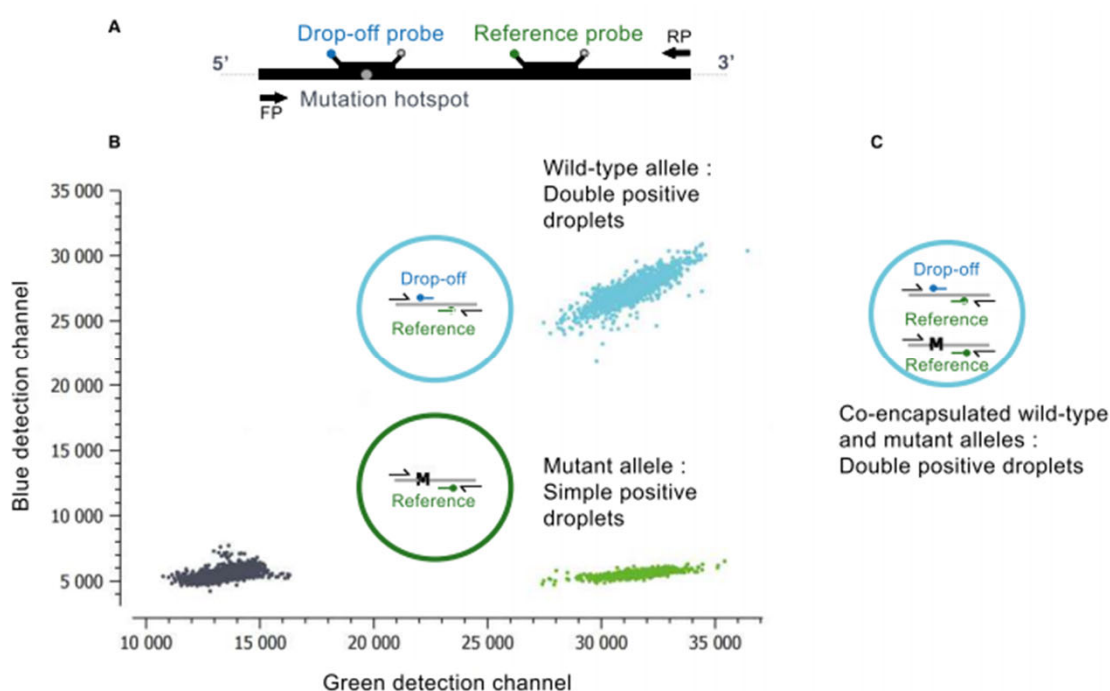


図1: A. 増幅ターゲット上のdrop-off プローブとリファレンスプローブ、およびプライマーペア(矢印)のハイブリダイゼーション位置の概略図(FP:フォワードプライマー、RP:リバースプライマー)。B. Drop-off アッセイのダブルポジティブの野生型対立遺伝子(水色)とシングルポジティブ変異(M)対立遺伝子(緑色)の蛍光液滴集団の表示。ダブルネガティブの液滴は黒色で示されています。C. 液滴の生成中に、変異対立遺伝子と野生型対立遺伝子の断片が同じ液滴内にランダムに包まれると、液滴がダブルポジティブの野生型と変異型(水色)になることに注意が必要です。野生型の濃度は、(3番目の色成分が陽性が陰性かに関係なく)ダブルポジティブの液滴の比率から直接導き出すことができます。変異型の濃度は、変異対立遺伝子を含む液滴の割合から求めることができます(3番目の色成分が陽性が陰性かに関係なく)。この割合は、ダブルポジティブの液滴を破棄することによってのみ決定できます。実際、ダブルポジティブの液滴が変異型ネガティブの液滴として数えられると、変異型対立遺伝子の頻度が過小評価されます。Drop-off アッセイを定量化する方法の詳細については、[www.stillatechnologies.com/technical-notes/](http://www.stillatechnologies.com/technical-notes/) のdrop-off 定量化に関するテクニカルノートと、Whale, AS, et al., *Biomol Detect Quantif.* 2016 27; 10: 15-23. を参照してください。

## Drop-off アッセイはKRAS, NRAS, EGFR ホットスポット変異を検出します

臨床では治療効果を追跡するために一連の予測遺伝子マーカーが定期的にモニターされます。例えば、非小細胞肺癌では、上皮成長因子受容体(EGFR)エクソン19に欠失が存在すると、第一世代のチロシンキナーゼ阻害剤への感受性が示されます。さらに、結腸直腸癌では、KRAS およびNRAS 癌原遺伝子変異は抗EGFR 抗体に対する耐性の強力な指標です。Drop-off アッセイとNaicaの3カラーマルチプレックス検出を使用し、最も一般的なKRAS エクソン12、NRAS エクソン3およびEGFR エクソン19の配列変化を検出する内部標準用アッセイを設計しました(図2および3)。内部コントロール(IC)を追加すると、アッセイの堅牢性を簡単に評価でき、サンプルの不純物に起因するかもしれないPCR阻害を特定できます。

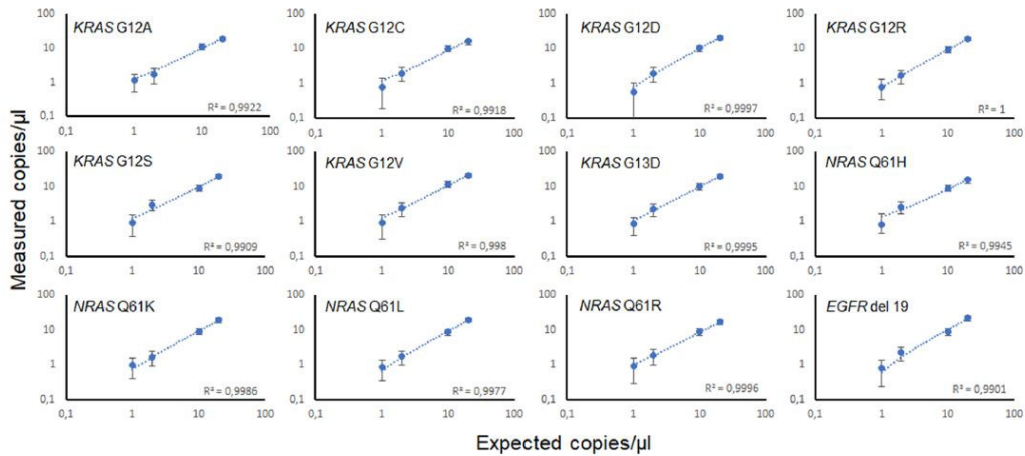


図2: 最も一般的な7つのKRAS エクソン12/13、4つのNRAS エクソン3変異、およびEGFR エクソン19欠失検出のためのdrop-off アッセイの信頼性。変異は、変異DNA率 5% ~ 0.25% の連続希釈系列で測定し、25  $\mu$ LのPCR溶液で最終濃度 1 copy/ $\mu$ L まで、95% の信頼水準で検出されました。すべてのアッセイは、 $10^4$ コピーの野生型DNAと400コピーの内部陽性コントロールDNA( $\Phi$ X174バクテリオファージ)のバックグラウンド下で実行されました。各希釈ポイントでN=3で測定しています。表示される信頼区間は、95% 信頼水準でのサンプリングとパーティションの誤差を考慮した理論的な信頼区間の平均です。

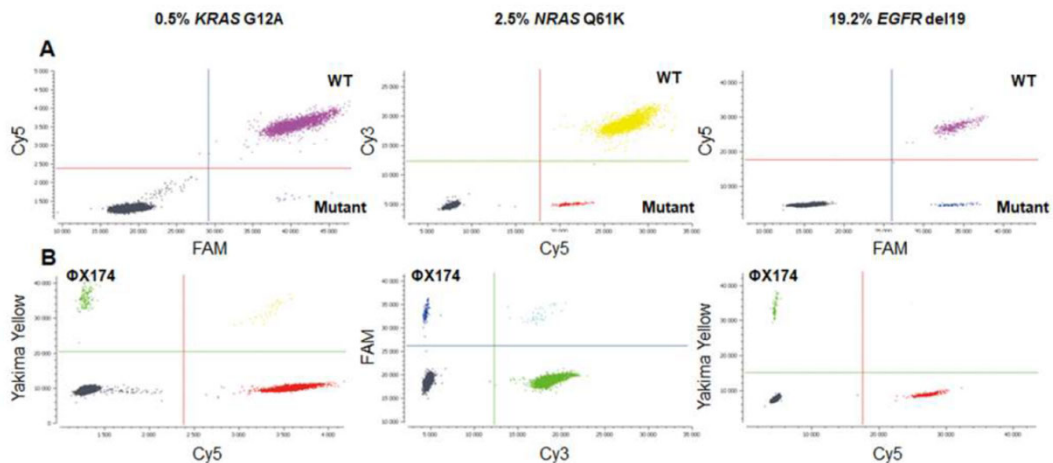





図3: A. 3重試験におけるKRAS、NRAS、およびEGFR drop-off デジタルPCRアッセイの2Dドットプロット。市販のDNA (KRAS およびNRAS)、および凍結腫瘍サンプル(EGFR)に由来するDNAを使用しました。WT:野生型。  
B.  $\Phi$ X174DNA 内部陽性コントロールを検出する3番目の色成分で得られたシグナルを表示するドットプロット。

複数の変異がKRAS およびNRAS ホットスポットで発生することが知られており、また、さまざまな長さのいくつかの欠失/挿入がEGFR エクソン19で報告されています。Drop-off アッセイを使用すると、限られた数のプローブを使用して様々な臨床に関連する遺伝子変異を、迅速でコスト効率の高い同時スクリーニングが可能となります。いったんdrop-off アッセイでサンプルが変異型であると識別されたら、必要に応じ、塩基配列特異的なプローブを使用する後続のアッセイを行いDNAサンプル内に存在する正確な変異型対立遺伝子を決定できます。

## アプリケーションノートハイライト

-  Drop-off デジタルPCRアッセイにより、ゲノムホットスポットで発生する複数の変異を同時に検出できます。
-  Drop-off アッセイは、限られた数のプローブを使用して、多様な遺伝的変化を迅速かつコスト効率よくスクリーニングできます。
-  臨床診療で一般的にモニターされている7つのKRAS 変異、4つのNRAS 変異、様々なEGFR エクソン19欠失/挿入を検出するための3つの内部標準コントロールアッセイをCrystal digital PCR™ を使用して設計および検証しました。

Primer and probe sequences for the three KRAS, NRAS and EGFR Drop-off assays

Primers/Probes	5' Fluorophore	Sequence	3' modification
KRAS-Forward	-	TGAAAATGACTGAATATAAACTTGTG	-
KRAS-Reverse	-	CTCTATTGTTGGATCATATTCGTC	-
KRAS Ref Probe	FAM	AGTGCCTTGACGATACAG	MGB-NFQ
KRAS Drop-off	Cy5	CCTACGCCACCAGCTC	MGB-NFQ
NRAS-Forward	-	CAAGTGGTTATAGATGGTGAAAC	-
NRAS-Reverse	-	CCTTCGCCTGTCCTCAT	-
NRAS-Ref Probe	Cy5	TTTGTGGACATACTGGATA	MGB-NFQ
NRAS-Drop-off	Cy3	AG{C}TG{G}ACAA{G}AAGAGTA	BHQ-2
EGFR Del19-Forward	-	GTGAGAAAGTTAAATTCCTCG	-
EGFR Del19-Reverse	-	CACACAGCAAAGCAGAAAC	-
EGFR Del19 Ref Probe	FAM	CACATCGAGGATTTCTTGTGGC	BHQ-1
EGFR Del19 Drop-off	Cy5	AGGAATTA{A}GA{G}AAG{C}AACATC	BHQ-3

Bases between {} are Locked Nucleic Acid (LNA) bases



デジタルPCRの詳細については、StillaのデジタルPCRラーニングセンターを参照ください。  
[www.gene-pi.com](http://www.gene-pi.com)

## 富士フイルム 和光純薬株式会社

本社 〒540-8605 大阪府中央区道修町三丁目1番2号  
TEL: 06-6203-2759 (機器システム部)  
東京本店 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号  
TEL: 03-3270-8124 (機器システム部)

●九州営業所 TEL: 092-622-1005 (代) ●中国営業所 TEL: 082-569-8095 (代)  
●東海営業所 TEL: 052-772-0788 (代) ●筑波営業所 TEL: 029-858-2278 (代)  
●東北営業所 TEL: 022-222-3072 (代) ●北海道営業所 TEL: 011-271-0285 (代)  
●横浜営業所 TEL: 045-225-8041 (代)

URL : <http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/kiki/index.htm>