

PCR-PIRA 法による点突然変異の新しい検出法

川崎医科大学・生化学2*, 川崎医療短期大学・医用デザイン科**

日高和夫*・山崎壽子*, 井内岩夫**

(平成8年10月11日受理)

A new detection method of point mutation by using PCR-primer
introduced restriction analysis(PCR-PIRA)

Kazuo HIDAKA* Toshiko YAMASAKA* and Iwao IUCHI**

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School,

577 Matsushima, Kurashiki 701-01, Japan,*

Department of Medical Illustration and Designing,

Kawasaki College of Allied Health Professions,

*577 Matsushima, Kurashiki, 701-01, Japan***

(Received on October 11, 1996)

概 要

制限酵素認識部位の有無に関係しない3種類の点突然変異遺伝子に対し、簡単にしかも迅速にこれらの変異部位を検出可能とするために mismatch プライマーを用いた PCR-primer introduced restriction analysis(PCR-PIRA)法による解析を試みた。その結果、BChE Y128C は新しく Tsp45I 制限酵素部位が形成され、BChE A199V は Pst I 制限酵素部位が形成され、また LDH(H) R171P では NruI 制限酵素部位が形成された。

これらの制限酵素による加水分解によって得られた分解物は4%アガロースゲル電気泳動によって分離分析し得た。

Abstract

A new detection method of PCR-primer introduced restriction analysis (PCR-PIRA) using a specific mismatched primer was introduced to detect simply and rapidly three instances of point mutations. The first case(BCHE Y128C) introduced a new Tsp45I site into the PCR product from the aberrant BChE gene. The second case(BCHE A199V) created a new PstI site in the PCR product from the normal subject and the third mutation(LDH(H)R171P) produced a new NruI site in the PCR product from the normal subject. The digests obtained by treatment of these three enzymes were separated electrophoretically on 4% agarose gel.

はじめに

通常、遺伝子変異として一塩基による置換、挿入及び欠損が起こった場合、これらの変異により制限酵素切断部位の消失または形成があればその酵素による restriction endonuclease

analysisを行うことが出来, 家系分析や頻度が高い変異型のスクリーニングが可能である。

しかしながら, 通常多くの遺伝子異常においてそれらの変異部位での制限酵素部位の消失や形成が見られないことが多い。

そこで今回我々は最近報告されている3'末端付近に mismatch による塩基置換を有する primer を用いて PCR 法を行い, 新たに制限酵素切断部位を形成する PCR-PIRA (polymerase chain reaction-primer induced restriction analysis) を実施し家系分析に有用であったので報告する³⁻⁵⁾。

方法と材料

1) DNA の精製¹⁾

DNA は Maniatis らの方法に準じて白血球より分離精製した。

2) 家系分析のための PCR-PIRA 法

遺伝子増幅は McGuire らの方法に準じて行った²⁾。即ち, PCR 反応は 1 ~ 2 μ g の DNA を 50 μ l の反応液 (10mM Tris-HCl, pH8.3, 10mMKCl, 1.5mMMgCl₂, 0.01%ゼラチン, 3 mMdTTP, 4 種の dNTP250 μ M, 2 種の特異的プライマー 1 μ g, 耐熱性 DNA ポリメラーゼとして AmpliTaqDNA polymerase 5 unit) に加え, 94°C, 1.5min, 50°C, 1.5min, 72°C, 3 min を 1 サイクルとして, 35 サイクルの増幅を行った。2 種類の特異的プライマーは表 1 に従って合成したものをを用いた。

ミスマッチプライマーを用いて増幅された DNA は変異の型により制限酵素 (Tsp45 I, Pst I, Nru I) の種類を変え, 酵素水解後は 4 % アガロースゲル電気泳動を行い, 泳動縞のパターンにより変異を判定した。

表 1. Oligonucleotides used for amplification

| Oligonucleotide Number | Sequence(5'-3') ^{a,b} | product size (bp) | position of product(nt) | position of mutation(codon) |
|------------------------|---|-------------------|-------------------------|-----------------------------|
| 1 | 5'-GACCAAGTGGTCTGATATTT-3'(+) * | 267 | 147-413 | 128 |
| 2 | 5'-CTTTCAACCCGACCCAGAACTTGCCGTCA-3'(-) * | | | |
| 3 | 5'-CCTAAAAGTGTAACTCTCTTTGGAGAACTG-3'(+) * | 278 | 565-842 | 199 |
| 4 | 5'-GGGACAACAAATGCTTCATTTCAGAAGAATTTCTTGGGGA-3'(-) | | | |
| 5 | 5'-AGTGGACATTCTTACGTATG-3'(+) * | 126 | 420-545 | 171 |
| 6 | 5'-TGAATGCCAAGTTTTTCAGCCATAAGGTGC-3'(-) * | | | |

^a Asterisk denotes mismatched nucleotide

^b Indicated as sense (+) or antisense (-)

結果と考察

一塩基置換により制限酵素切断部位が消失するか、逆に新たに形成された場合、この制限酵素切断部位の塩基特異配列を利用した restriction endonuclease analysis (REA) により家系分析やスクリーニングが可能であるが、一塩基置換によって、制限酵素切断部位の消失も形成も起こらない様な塩基変異が多い。この様な場合 mismatch primer を用いた PCR-PIRA 法を行うことによりその変異の保因者の検出が可能であった。

すなわち、3'末端に mismatch な一塩基を導入したプライマーをもちいて PCR 反応を行い、ワイルド型または変異型に制限酵素切断部位を形成させ、この制限酵素を用いて点突然変異の有無を調べる。Haliassos, A³⁾ および Jacobson, DR ら⁴⁾ は oncogene の点突然変異の検出に、Nishiwaki, Y ら⁵⁾ はアルツハイマー病の APP 遺伝子のスクリーニングに、また Shibuta, K ら⁶⁾ は BChE の K variant の検出にこの PCR-PIRA 法を実施した。我々は下記の3家系の検索に PCR-PIRA 法を実施した。

第 I 家系：BChE (128 TAT → TGT, Tyr → Cys)

3'末端から四番目の塩基 A を G に置換した antisense primer を用いて silent 型変異 BChE のゲノム DNA に PCR を行った。

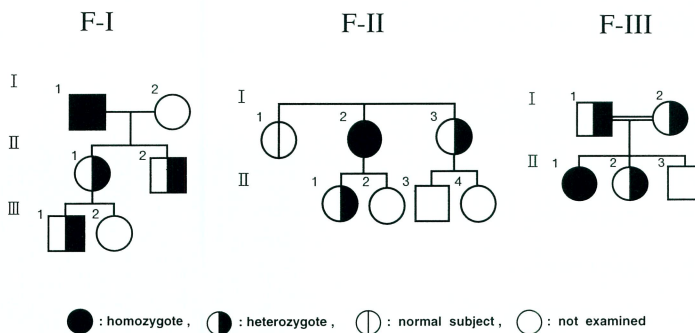


Figure 1. Family trees. F-I : family I. F-II : family II, F-III : family III.

個体 F-I-I-1, F-I-II-1 および正常対照者の3名からの DNA を増幅し、298塩基対 (bp) の PCR 生成物を得た (図1)。

この PCR 生成物に制限酵素 Tsp45I を作用させ、4%アガロースゲル電気泳動を行った (図2)。

その結果、F-I-I-1 は 267bp と 31bp の2個の分画に分離し、アガロースゲル泳動では 267bp のみの泳動縞が見られ、I-II-1 は 267bp と 298bp の泳動縞、正常対照者は制限酵素の作用を受けない 298bp の泳動縞のみが見られた。

この事は個体 F-I-I-1 はコドン128での A → G 変異のホモ接合体、個体 F-I-II-1 はヘテロ接合体であることを示唆した。

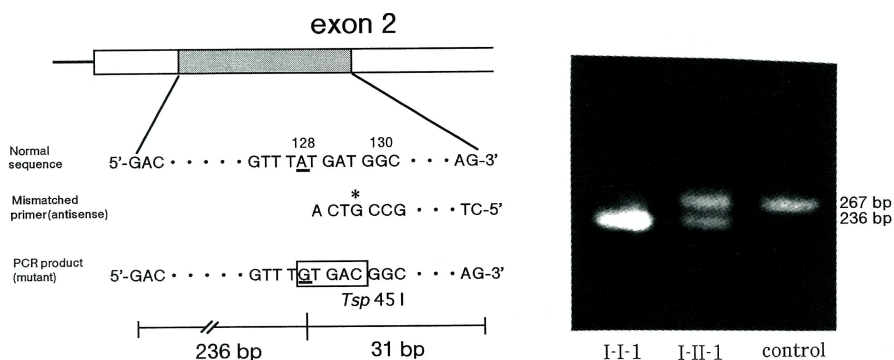


Figure 2. Scheme for detection of Tyr¹²⁸→Cys mutation of BChE variant. The specific primer is composed of 20 mer and contains a mismatched single base (A → G) at the fourth position from the 3' end(asterisk). The PCR product of 267bp derived from the mutant with A → G restriction has a new Tsp45I recognition site(square box) at codon 128(under bar) and is digested into two fragments of 31 and 236bp.

Right: separation of Tsp45I restriction fragments of two members(F-I-I-1, F-I-II-1) of family I and a normal subject on 4% agarose gel.

第II家系: BChE (199 GCA → GTA, Ala → Val)

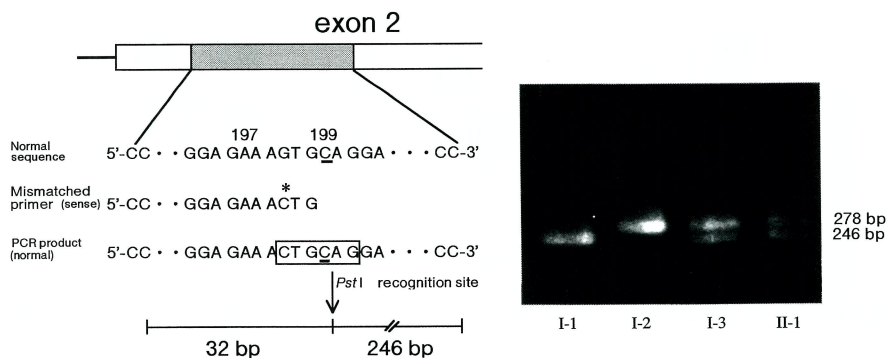


Figure 3. Scheme for detection of Ala¹⁹⁹→Val mutation of BChE variant. The specific primer is composed of 31 mer and contains a mismatched single base(G → C)at the third position from the 3'end(asterisk). The PCR product of 278bp derived from the normal subject has a new PstI restriction site(square box) at codon 199(under bar) and is digested into two fragments of 32 and 246bp. Right: separation of the PstI restriction fragments of four members(F-II-I-1, F-II-I-2, F-II-I-3 and F-II-II-2) of family II on 4% agarose gel.

3'末端から3番目のGをCに置換した sense primer を用いて silent 型変異 BChE のゲノム

DNA に PCR を行った。

個体 F-II-I-2, F-II-I-3 および F-II-I-1 の 3 名からの DNA を増幅し, 278 bp の DNA を得た(図 1)。この PCR 生成物に制限酵素 PstI を作用させ, 4 % アガロースゲル電気泳動を行った(図 3)。その結果, 個体 F-II-I-1 の PCR 生成物は置換部位を含めて CTG → CAG の Pst I 切断部位を形成し, その作用を受け 32bp と 246bp の断片を生じた。また個体 F-II-I-3 は 246 bp と 278 bp の 2 個の泳動縞を生じ, 個体 F-II-I-2 は PstI の作用を受けず, 278bp の泳動縞のみが見られた。従って, ワイルド型がミスマッチプライマーによる PstI 切断部位を形成することが明らかになった。この事は個体 F-II-I-2 はこの変異のホモ接合体, 個体 F-II-I-3 はヘテロ接合体であり, 個体 F-II-I-1 は正常である事を示唆した。

第Ⅲ家系：LDH(H) (171 CGC → CCC, Arg → Pro)

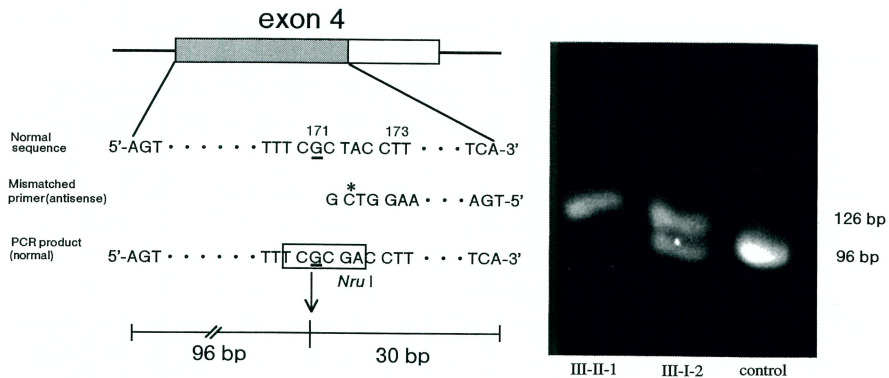


Figure 4. Scheme for detection of Arg¹⁷¹→Pro mutation of LDH(H) variant. The specific primer is composed of 30 mer and contains a mismatched single base(A → C)at the second position from the 3'end(asterisk). The PCR product of 126bp derived from the normal subject has a new NruI restriction site(square box) at codon 171(under bar) and is digested into two fragments of 30 and 96bp. Right: separation of the NruI restriction fragments of two members(F-III-II-1 and F-III-I-2) of family III on 4% agarose gel.

3'末端から 2 番目の A を C に置換した antisense primer を用いて silent 型変異 LDH(H) のゲノム DNA に PCR を実施した。

個体 F-III-II-1, F-III-I-2 及び正常対照者の DNA の PCR 生成物 (126bp) に制限酵素 NruI を作用させ, 4 % アガロースゲル電気泳動を行った(図 1, 図 4)。その結果, 正常対照者は 30bp と 96bp の 2 個の分画を生じ, また個体 F-III-I-2 は 96bp と 126bp の泳動縞を, 個体 F-III-II-1 は NruI に抵抗性を示し, もとの 126bp の泳動縞のみが見られた。

よって, 個体 F-III-II-1 はこの変異のホモ接合体, 個体 F-III-I-2 はヘテロ接合体であった。

この様に PCR-PIRA 法は制限酵素認識を伴わない点突然変異による多くの変異遺伝子の解

析に非常に有用であることが示された。

この研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費(井内7-105, 日高8-103)により行った。

文 献

- 1) Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1st ed, New York: Cold Spring Harbor, 1982, p122, 280, 281.
- 2) McGuire MC, Nogueira CP, Lightstone H, Hajra A, Van Der Spek AFL, Lockrige O, La Du BN: Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant(atypical) variant form of human serum cholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 953-957, 1989
- 3) 日高和夫, 井内岩夫: 無コリンエステラーゼ血症の遺伝子診断とその疫学 *臨床病理* 43(8): 786-791, 1995
- 4) Halissos A, Chomel JC, Grandjouan S, Kruh J, Kaplan JC, Kitzis A: Detection of minority point mutations by modified PCR technique: a new approach for a sensitive diagnosis of tumor-progression markers. *Nucleic Acids Res* 17(20): 8093-8099, 1989
- 5) Javobson DR, Moskovits T,: Rapid, nonradioactive screening for activating ras oncogene mutations using PCR-primer introduced restriction analysis(PCR-PIRA). *PCR Methods Appl* 1: 146-148, 1991
- 6) Nishiki Y, Kamino K, Yoshiiwa A, Nagao K, Takeda M, Tanobe H, Nishimura T, Kobayashi T, Yamamoto H, Nonomura Y, Yoneda H, Sakai T, Imagawa M, Miki T, Ogihara T: Mutational screening of APP gene in patients with early-onset Alzheimer disease utilizing mismatched PCR-RFLP. *Clin Genet* 49: 119-123, 1996
- 7) Shibuta K, Abe M, Suzuku T: A new detection method for the K variant of butyrylcholinesterase based on PCR primer introduced restriction analysis (PCR-PIRA) . *J Med Genet* 31: 576-579, 1994