Real-time PCR定量に用いるスタンダードDNAの評価

青木 仁孝^{*,†}
珠坪 一晃^{**}

荒木 信夫^{*}
山口 隆司^{***}

Evaluation of Standard DNAs for Real-time PCR Quantification

Masataka AOKI^{*,†}, Nobuo ARAKI^{*},
Kazuaki SYUTSUBO^{**} and Takashi YAMAGUCHI^{***}

* Department of Civil Engineering, Nagaoka National College of Technology, 888 Nishikatagai, Nagaoka, Niigata 940-8532, Japan

** Water and Soil Environment Division, National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan

*** Department of Environmental Systems Engineering, Nagaoka University of Technology, Kamitomioka 1603-1, Nagaoka, Niigata 940-2188, Japan

Abstract

Adaptability of polymerase chain reaction (PCR) products to standard DNAs for real-time PCR quantification was evaluated by those standard curves. The threshold cycles (Ct values) of the same number of gene copies differed at -0.7–5.6 cycles between the genomic DNAs and the PCR products amplified from 16S rRNA genes of methanogens. This result indicates that the quantitative error occurs when PCR products are used as standard DNAs. Besides, the PCR efficiency (E) based on the slope of the standard curves was insufficient to evaluate the adaptability of PCR products as standard DNAs for real-time PCR quantification.

Keywords: Real-time PCR; Standard DNA; PCR efficiency

1. はじめに

Real-time PCR (polymerase chain reaction) 法の普及により、遺伝子に着目した微生物菌数挙動の把握^{1,2)}、遺伝子の転写物である mRNA の定量による活性の評価³⁾などが容易に行えるようになった。ただし、Real-time PCR 法で絶対定量を行う場合には、スタンダード DNA としてゲノム DNA や PCR 増幅産物などが必要である。純粋菌株の得られていない環境クローンを定量する場合には、スタンダード DNA として PCR 増幅産物を用いることが一般的である。しかし、スタンダード DNA 中の遺伝子とサンプルから回収した DNA 中の遺伝子の PCR 増幅の効率が異なる場合には、定量結果に誤差が発生することになる。本研究は、Real-time PCR に用いるスタンダード DNA の違いが定量値に与える影響をゲノム DNA、PCR 増幅産物中の遺伝子について検討を行った。また、PCR 増幅効率の評価方法についての妥当性の検討も行った。

2. 方法

2.1 評価対象 DNA サンプルの調整

本研究は、メタン生成古細菌の 16S rRNA 遺伝子に対

象とした。スタンダード DNA を評価するにあたり、ゲノム DNA および PCR 増幅産物のスタンダード DNA の作成方法を以下に示す。

2.1.1 ゲノム DNA

ゲノム DNA は、*Methanospirillum hungatei* (DSM864), *Methanosaeta thermophila* (DSM6194), *Methanosarcina barkeri* (DSM800), *Methanospaera stadtmannae* (DSM3091) の純粋菌株を 1.5 mL マイクロチューブに回収し、リン酸バッファー (phosphate-buffered saline; 137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 8.0) で洗浄した後、滅菌水 60 µL を添加して凍結融解 (-80°C 3 min, 60°C 1 min) を繰り返し行った。その後、30 µL の Proteinase K (20 mg·mL⁻¹) と 70 µL の反応バッファー (40 mM Tris, 1% Tween 20, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, pH 8.0) の添加および攪拌、60°C 30 min 保温での溶菌、99°C 25 min 保温での Proteinase K の失活を行った。最後に 1,600 rpm, 10 min の遠心分離を行って上清中の DNA を回収し、10 倍希釈系列を TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) によって段階的に希釈することにより作成し、これを評価対象 DNA とした。

2.1.2 PCR 増幅産物

PCR 増幅産物は、実際の Real-time PCR で増幅を行

* 長岡工業高等専門学校環境都市工学専攻 〒940-8532 新潟県長岡市西片貝町 888 番地

** 独国立環境研究所水士圏環境研究領域 〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2

*** 長岡技術科学大学環境システム工学系 〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1

† 連絡先: ac21824e@st.nagaoka-ct.ac.jp

Table 1 PCR primers used in this study.

Target	Primer	^a Sequence(5' - 3')	^b position
Universal	UNIV907R	CCG TCA ATT CCT TTA AGT TT	907-926
Archaea	A109f-m	AMD GCT CAG TAA CAC GT	109-125
	ARC787F	ATT AGA TAC CCS BGT AGT CC	787-806
	ARC1059R	GCC ATG CAC CWC CTC T	1044-1059
	A1391R	GAC GGG CGG TGT GTR CA	1375-1391
<i>Methanospirillum</i> spp.	Msp488F	CTG GTG AAG AAA GGG CCG G	488-506
	Msp629R	CAG TWT CCC CTG AAC GCC	629-646
<i>Methanosaeta</i> spp.	S-F-Msae-0573-A-a-17G	GGC CGG CTA CAG ACC CT	573-589
	MS827r	ACC GTG GCC GAC ACC TA	827-843

^a B: not A, D: not C, K: G or T, M: A or C, R: A or G, S: C or G, W: A or T, Y: C or T^b Position in the 16S rRNA gene of *E.coli*

増幅領域部位そのものを増幅した PCR 増幅産物（以後、PCR product S と表記）と、増幅領域を内部に含む少しだけ長い 700 bp～1,300 bp 程度の断片（以後、PCR product L と表記）を作成した。PCR 反応は、1 × PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂), 0.2 mM each dNTP mix, 0.025 U·μL⁻¹ Ampli Taq Gold (Applied Biosystems), 0.5 μM の各プライマーに適量の抽出したゲノム DNA を加えた PCR 反応液を用いた。本研究で用いたプライマーを **Table 1** に示した。PCR product S の作成は、*M.hungatei* では、Msp488F⁴⁾ と Msp629R⁴⁾、*M.thermophila* では、S-F-Msae-0573-A-a-17G (S-F-Msae-0573-A-a-17 プライマー配列を一部変更)⁵⁾ と MS827r (MS827f プライマーに相補的な配列)⁶⁾を用いた。PCR product L の作成は、*M.hungatei*、*M.thermophila* では、A109f-m (A109f プライマー配列を一部変更)⁷⁾ と UNIV907R⁸⁾、*M.barkeri* および *M.stadtmanae* では、A109f-m と A1391R⁶⁾ のプライマーセットを用いた。PCR 反応器には iCycler (BIO-RAD) を用い、PCR 条件は、初期変性 95°C (15 min) を行い、続いて Msp488F と Msp629R のプライマーセットでは、95°C (45 sec), 58°C (45 sec), 72°C (1 min 30 sec), S-F-Msae-0573-A-a-17G と MS827r のプライマーセットでは、95°C (45 sec), 60°C (45 sec), 72°C (1 min 30 sec), A109f-m と UNIV907R のプライマーセットでは、95°C (45 sec), 60°C (45 sec), 72°C (1 min 30 sec) の PCR 反応を 40 サイクル、A109f-m と A1391R のプライマーセットでは、95°C (45 sec), 60°C (45 sec), 72°C (2 min) の PCR 反応を 35 サイクルとし、最後に伸長反応 72°C (5 min) とした。PCR 増幅産物は、2% アガロースゲル電気泳動後にエチジウムブロマイド染色を行い、増幅産物の確認を行った。また、PCR 増幅産物は、GENECLEAN Turbo (Q-Biogene) による精製を行った。精製後に 10 倍希釈系列を TE buffer によって段階的に希釈することにより作成し、これを評価対象 DNA とした。

2.2 16S rRNA gene コピー数の算定

ゲノム DNA と PCR 増幅産物中の 16S rRNA gene コピー数算定のための DNA 濃度の測定には、Quant-iT Pico Green ds DNA Assay Kit (Invitrogen) を用いた (Pico Green 法)。蛍光強度の測定には、Versa Fluor Fluorometer System (BIO-RAD) を用いた。濃度の測定はそれぞれのサンプルで 2 回ずつ行い、平均値を 16S

Table 2 Real-time PCR conditions.

Primer set : Msp488F/Msp629R			
Step	Temp.[°C]	Time[sec]	Cycle
Denaturation	95	20	1
Denaturation	95	10	45
Annealing	59	15	
Extension	72	10	
Fluorescence detection	87	6	
Primer set : S-F-Msae-0573-A-a-17G/MS827r			
Step	Temp.[°C]	Time[sec]	Cycle
Denaturation	95	20	1
Denaturation	95	10	45
Annealing	62	15	
Extension	72	10	
Fluorescence detection	86	6	
Primer set : ARC787F/ARC1059R			
Step	Temp.[°C]	Time[sec]	Cycle
Denaturation	95	20	1
Denaturation	95	10	45
Annealing	55	20	
Extension	72	15	
Fluorescence detection	85	6	

rRNA gene コピー数算定に使用した。なお、コピー数は以下の式(1)により算定した。また、全ゲノム解析より、*M.spirillum* (Accession No. NC_007796), *M.thermophila* (Accession No. NC_008553), *M.barkeri* (Accession No. NC_007355) および *M.stadtmanae* (Accession No. NC_007681) には 2～4 の 16S rRNA gene が存在する。このため、ゲノム DNA の場合においては、これを考慮し、式(1)の分母をゲノム DNA 上の 16S rRNA gene コピー数で除した。

16S rRNA gene [copies/μL]

$$= \frac{\text{DNA concentration [ng/μL]} \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}}{\text{base length [bp]} \times 660 \text{ [g/bp]}}$$

..... (1)

2.3 Real-time PCR 法による検量線の作成

本研究ではランニングコストが安く、広く用いられている SYBR Green I によるインターカラー法により

検量線を作成した。PCR 反応器には, Smart Cycler System (Cepheid, TaKaRa Biochemicals) を用いた。PCR 反応は, 1×SYBR Premix EX Taq (TaKaRa Biochemicals), 0.2 μM の各プライマーに 2 μL の設定したテンプレート DNA を加えた, 全量 25 μL の PCR 反応液を用いた。検量線作成に用いたプライマーセットは, *M.hungatei* では, Msp488F と Msp629R, *M.thermophila* では, S-F-Msae-0573-A-a-17G と MS827r, *M.barkeri* および *M.stadtmanae* では, ARC787F⁹⁾ と ARC1059R⁹⁾ とした。Real-time PCR 反応条件は Table 2 に示したとおりである。PCR 反応後には融解曲線を確認し, プライマーダイマー等の非特異的な蛍光を検出していないことを確認した。検量線は, 縦軸を Real-time PCR 法により得られる指数関数的増幅領域に設定された Threshold Cycle (Ct 値), 横軸を 16S rRNA gene コピー数 [copies·μL⁻¹] として作成した。増幅効率の評価は, 同じ 16S rRNA gene コピー数におけるゲノム DNA に関する検量線を基準とし, Ct 値の差を基に評価した。なお, 測定は各希釈段階にて 2 回ずつ行った。

3. 結果および考察

3.1 スタンダード DNA の評価

本研究で選定した 4 種のスタンダード DNA に対して

作成した検量線を Fig. 1 に示した。すべての検量線で, 相関係数 $R^2=0.986$ 以上の値を示し, Real-time PCR 反応は良好に行われていると判断した。Table 3 は, 16S rRNA gene コピー数が 10^4 [copies·μL⁻¹] におけるゲノム DNA と PCR 増幅産物の Ct 値の差を示したものであり, PCR 増幅産物とゲノム DNA のそれぞれを用いて作成した検量線では, Ct 値で -0.7~5.6 サイクルの差が生じた。これは環境サンプル中の未培養微生物の遺伝子を定量する場合, 抽出したゲノム DNA とそれを定量するために用意した PCR 増幅産物スタンダードでは, Ct 値の違いにより Real-time PCR 定量の結果に 1 オーダー以上の誤差を含む可能性があることを示している。なお, スタンダードで用いる増幅産物の長さ (PCR product S と PCR product L) で生じる Ct 値の差は, ゲノム DNA と PCR 増幅産物の間に生じる Ct 値の差に比較して大きくないため, PCR 増幅産物の断片長の違いによる影響は小さいと判断した。

次に, 同じ Real-time PCR 条件 (ARC787F と ARC1059R) で検量線を作成した *M.barkeri* (◆) と *M.stadtmanae* (■) の検量線の比較を行った (Fig. 2)。*M.barkeri* と *M.stadtmanae* のゲノム DNA に関する検量線は, 同程度のテンプレート量と同じ Real-time PCR 条件で作成したにも関わらず, Ct 値の差が大きく現れた。PCR 増

Fig. 1 Comparison of standard curves by each standard DNA. ■ : Genomic DNA, ▲ : PCR product S, ● : PCR product L.

Table 3 Difference of Ct values between the genomic DNAs and the PCR products at 10^4 copies·μL⁻¹.

species	Ct _S -Ct _G	Ct _L -Ct _G
<i>M.hungatei</i>	4.9	3.6
<i>M.thermophila</i>	1.4	1.7
<i>M.barkeri</i>	—	5.6
<i>M.stadtmanae</i>	—	-0.7

— : Not determined

Ct_G: Ct values of genomic DNAs at 10^4 copies·μL⁻¹

Ct_S: Ct values of PCR product S at 10^4 copies·μL⁻¹

Ct_L: Ct values of PCR product L at 10^4 copies·μL⁻¹

Fig. 2 Standard curves with the ARC787F/ARC1059R.

◆ : Genomic DNA of *M.barkeri*, ● : PCR product L of *M.barkeri*, ■ : Genomic DNA of *M.stadtmanae*, ▲ : PCR product L of *M.stadtmanae*.

Table 4 Ct values of the PCR product L at the same number of gene copies.

species	Ct value at 10^4 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$
<i>M.hungatei</i>	29.7
<i>M.thermophila</i>	27.3
<i>M.barkeri</i>	31.2
<i>M.stadtmanae</i>	30.4
Average	29.7 (1.7) ^a

^a Figure in parenthesis is standard deviation

幅領域の GC 含量が高い場合、相補鎖結合が DNA ポリメラーゼの DNA 合成阻害を引き起こす可能性があるが、ARC787F と ARC1059R プライマーセット増幅領域の GC 含量は、*M.barkeri* の場合が約 58%、*M.stadtmanae* の場合が約 53% であり、増幅領域の GC 含量が Ct 値の差に影響を与えたことは考えにくい。また、本研究では混合塩基プライマーを用いているが、プライマー結合配列は 2 つのサンプルで同じである。したがって、ゲノム DNA 特有の複雑な構造が、プライマーのターゲット配列への交雑効率に大きく影響を与えたものと考えられる。一方で、*M.barkeri*(●) と *M.stadtmanae*(▲) の PCR 増幅産物に関する検量線の Ct 値は、ほぼ同じであった。また、Real-time PCR 条件に関わらず、PCR product L の Ct 値が比較的に一致することが認められた (Table 4)。これは、PCR 増幅産物の場合、ゲノム DNA がスタンダードの場合に生じるプライマーの交雑効率などの Ct 値への影響が反映され難かったと推察される。この原因としては、PCR 増幅産物がスタンダードの場合、Real-time PCR 反応初期にテンプレート同士によるハイブリット形成^{10,11)}の生じる可能性がゲノム DNA に比較して高く、このハイブリットの形成の影響が Ct 値に強く影響したのと考えられる。なお、ハイブリット形成に影響する要因としては、PCR 反応器の温度低下速度が挙げられる。Kurata 氏¹²⁾は、PCR 反応器の温度の低下が遅い場合 ($1^\circ\text{C} \cdot \text{sec}^{-1}$) には、温度の降下中に PCR 増幅産物の相補鎖同士の結合が発生しやすく、温度低下が速い場合 ($20^\circ\text{C} \cdot \text{sec}^{-1}$) には、温度低下の途中での相補鎖同士の結合が少なくなると推論している。本研究で用いた Smart Cycler System の温度低下速度は $2.5^\circ\text{C} \cdot \text{sec}^{-1}$ であるため、Real-time PCR 条件によらず PCR 反応器が共通の原因となり、本報告のようなゲノム DNA と PCR 増幅産物の間に Ct 値の差を生じさせたものと考えられる。

3.2 検量線の傾きに基づく増幅効率 (E) 評価方法の妥当性

一般に PCR 増幅効率 (E)¹³⁾ は、10 倍希釈系列の検量線の傾きを Slope とすると以下の式(2)で定義される。

$$\text{PCR efficiency (E)} = 10^{-1/\text{slope}} \dots\dots\dots (2)$$

PCR 反応によって標的配列が指数関数的に増幅すると E は 2.0 となる。本研究で算定した PCR 増幅効率 (E) を Table 5 に示す。各モデル微生物のゲノム DNA とその PCR 増幅産物の増幅効率 (E) はそれらの Ct 値の差に比較すると小さいものであった。これは、PCR 増幅

Table 5 PCR efficiency (E) for each standard DNA.

species	PCR efficiency (E)		
	Genomic DNA	PCR product S	PCR product L
<i>M.hungatei</i>	1.74	1.65	1.76
<i>M.thermophila</i>	1.76	1.78	1.80
<i>M.barkeri</i>	1.66	—	1.70
<i>M.stadtmanae</i>	1.61	—	1.80

—: Not determined

効率 (E) では、十分に増幅が確認された (SYBR Green I の蛍光が検出限界に達した後) 状態から増幅効率を評価しているのに対し、Ct 値を基に評価した場合には、PCR 反応の初期段階のプライマーのターゲット配列への交雑効率を評価しているためである。したがって、PCR 増幅効率 (E) が環境サンプルとスタンダード DNA で一致している場合においても、Ct 値には大きな差が生じている可能性があり、PCR 増幅効率 (E) は Real-time PCR 法において、遺伝子配列の増幅効率を評価するには不十分であると考えられる。

4. まとめ

本研究では、PCR 増幅産物を Real-time PCR 定量においてスタンダード DNA として利用しゲノム DNA と PCR 増幅産物の PCR 増幅効率の違いにより、1 オーダー以上の誤差が定量値に含まれる可能性を示した。この結果は、環境中微生物の実際のポピュレーションを無視した定量結果が生じるのに十分な問題として考慮する必要がある。したがって、絶対定量と呼ばれる PCR 増幅産物をスタンダード DNA として用いた Real-time PCR 定量値の場合も、その定量結果は相対定量の場合 (例えば、環境サンプル中の定量対象遺伝子の相対的な経時変化の把握) と等しく扱うべきものとする。また、検量線の傾きに基づいた PCR 増幅効率 (E) は、遺伝子配列の増幅効率を評価するには不十分であることが示された。今後、PCR 反応の初期段階のプライマーのターゲット配列への交雑効率の影響を考慮した PCR 増幅効率の評価モデルが提案されることが望まれる。

(原稿受付 2010 年 7 月 2 日)

(原稿受理 2010 年 12 月 1 日)

参 考 文 献

- 1) Harms, G., Layton, A. C., Dionisi, H. M., Gregory, I. R., Garrett, V. M., Hawkins, S. A., Robinson, K. G. and Sayler, G. S. (2003) Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant, *Environ. Sci. Technol.*, **37** (2), 343-351.
- 2) Hermansson, A. and Lindgren, P. E. (2001) Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67** (2), 972-976.
- 3) 押木守, 荒木信夫, 山口隆司, 山崎慎一, 原田秀樹 (2003) *amoA* mRNA の転写量に基づいた in-situ におけるアンモニア酸化活性の評価, 環境工学研究論文集, **40**, 63-70.
- 4) 古川卓, 荒木信夫, 青木仁孝, 對馬育夫, 珠坪一晃, Wilasinee Yoochatchaval, 房月芹, 山口隆司 (2009) 低水温嫌気性処理槽内に生息するメタン生成古細菌群の動態解析, 環境工学研究論文集, **46**, 703-709.
- 5) Sawayama, S., Tsukahara, K. and Yagishita, T. (2006) Phylogenetic description of immobilized methanogenic community using real-time

- PCR in a fixed-bed anaerobic digester, *Bioresour. Technol.*, **97** (1), 69-76.
- 6) Watanabe, K., Kodama, Y., Hamamura, N. and Kaku, N. (2002) Diversity, abundance, and activity of archaeal populations in oil-contaminated groundwater accumulated at the bottom of an underground crude oil storage cavity, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68** (8), 3899-3907.
- 7) Großkopf, R., Janssen, P. H. and Liesack, W. (1998) Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64** (3), 960-969.
- 8) Lane, D. J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. in "Nucleic acid techniques in bacterial systematics" (Ed. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M.), 115-175. John Wiley and Sons, New York.
- 9) Yu, Y., Lee, C., Kim, J. and Hwang, S. (2005) Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction, *Biotechnol. Bioeng.*, **89** (6), 670-679.
- 10) Suzuki, M. T. and Giovannoni, S. J. (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** (2), 625-630.
- 11) Ruano, G., Brash, D. E. and Kidd, K. K. (1991) PCR: the first few cycles, *Amplifications*, **7**, 1-4.
- 12) Kurata, S., Kanagawa, T., Magariyama, Y., Takatsu, K., Yamada, K., Yokomaku, T. and Kamagata, Y. (2004) Reevaluation and reduction of a PCR bias caused by reannealing of templates, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70** (12), 7545-7549.
- 13) Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. and Dempfle, L. (2002) Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, *Nucleic. Acids. Res.*, **30** (9), 36-46.

〔論文要旨〕

Real-time PCR (polymerase chain reaction) 定量でスタンダードDNAとして用いるPCR増幅産物の適合性を、Real-time PCR法により作成した検量線により評価した。同じ遺伝子コピー数におけるThreshold cycle (Ct値) は、メタン生成古細菌のゲノムDNAとその16S rRNA遺伝子を増幅したPCR増幅産物で-0.7~5.6サイクル異なった。この結果は、スタンダードDNAにPCR増幅産物を用いる場合、定量誤差が発生することを示すものである。また、検量線の傾きに基づいたPCR増幅効率 (E) は、PCR増幅産物のReal-time PCR定量におけるスタンダードDNAとしての適合性を評価するには不十分であった。

キーワード : Real-time PCR ; スタンダードDNA ; PCR増幅効率