

B-26 Real-time PCRを用いた遺伝子および mRNA の定量における外部標準の選定

○青木 仁孝¹・古川 卓²・珠坪 一晃³・荒木 信夫^{2*}

¹長岡工業高等専門学校 環境都市工学科 (〒940-8532 新潟県長岡市西片貝町888番地)

²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)

³(独) 国立環境研究所 水圏環境研究領域 (〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2)

* E-mail: araki@nagaoka-ct.ac.jp

1. はじめに

Real-time PCR 法が普及するにつれ、遺伝子またはその転写物である mRNA の定量が比較的行えるようになった。この遺伝子定量法では、ゲノム DNA や PCR 増幅産物などの外部標準が用いられる。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、外部標準として PCR 増幅産物を用いるのが一般的である。しかし、外部標準として用いる PCR 増幅産物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と定量結果に大きな誤差を発生することになる。そこで本研究は、Real-time PCR の外部標準の違いが定量値に与える影響をゲノム DNA、PCR 増幅産物、組み換えプラスミド中の遺伝子について検討を行った。また、PCR カクテル内へのタンパク質（アルブミン）と目的遺伝子を含まない DNA の添加が Real-time PCR の増幅効率に与える影響を評価した。

Cycler System II (Cepheid, TaKaRa Biomedicals) を用いて遺伝子増幅を行った。DNA 濃度測定には、BIO RAD VersaFluor™ Fluorometer System を用い、蛍光色素には Pico Green を用いた。外部標準の作成は、以下の a) ~c) の方法により作成した。なお、本研究における Real-time PCR および PCR 増幅産物作成に用いたプライマーを表-1 に、Real-time PCR 反応条件を表-2 に示した。

表-2 Real-time PCR 反応条件

Primer Set	Step	Temp. (°C)	Time (sec)	Cycles
Msp485F/Msp496R-m	1	95	20	45
		95	10	
	2	59	15	
		72	10	
		87	6	
S-F-Msae-0573-A-a-17G /MS827R	1	95	20	45
		95	10	
	2	62	15	
		72	10	
		86	6	
S-F-Mbac-0398-S-a-20 /Mbac-0526R	1	95	20	45
		95	10	
	2	64	15	
		72	10	
		86.5	6	

2. 研究方法

(1) 検量線法による Real-time PCR の外部標準の評価

Real-time PCR 法の検出には、SYBR Green I によるインターカラー法を採用した。PCR 反応器には Smart

a) ゲノム DNA

本研究では、*Methanospirillum hungatei*, *Methanosaeta thermophila*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanobacterium bryantii* の 4 種の純粋菌株のゲノム DNA を用いた。DNA 抽出は、ProteinaseK を用いて行った。

表-1 本研究に使用したプライマー

Target group	Primer Name	Orientation	Primer Sequence(5'-3')
<i>Methanospirillum spp.</i>	Msp485F	F	CTGGTGAAGAAAGGCCGG
	Msp496R-m	R	CAGTWTCCCCTGAACGCC
<i>Methanosaeta spp.</i>	S-F-Msae-0573-A-a-17 G	F	AGGGTCTGTAGCCGGCC
	MS827R	R	ACCGTGGCCGACACCTA
<i>Methanobacterium spp.</i>	S-F-Mbac-0398-S-a-20	F	CCCAAGTGCCACTCTTAACG
	Mbac-0526R	R	AAYGGCCACCAGTTGAGCTG
<i>Archaea</i>	A109f-m	F	AMDGCTCAGTAACACGT
<i>Universal</i>	UNIV907	R	CCGTCAATTCCTTTAAGTTT

b) PCR 増幅産物の作成

PCR 増幅産物は、実際の Real-time PCR 定量で増幅を行う遺伝子断片部位そのものを増幅した PCR 増幅産物と、その断片を含む少しだけ長い断片を、純粋菌株の 4 種に対して、計 8 個作成した。長い断片の作成には古細菌の 16S rRNA 遺伝子がターゲットとなるように、A109f-m, UNIV907 のプライマーセットを用いた。作成した PCR 増幅産物を表-3 に示す。表-3 では、増幅を行う断片そのものを増幅した PCR 増幅産物を PCR product S, 増幅を行う断片を内部含む少し長い PCR 増幅産物を PCR product L と表記した。

表-3 作成した PCR 増幅産物

PCR product Name	Used Primer set	Amplified Fragment Length
<i>M.hungatei</i> PCR product L	A109f-m/UNIV907	818bp
<i>M.hungatei</i> PCR product S	Msp 485F/Msp496R-m	161bp
<i>M.thermophila</i> PCR product L	A109f-m/UNIV907	818bp
<i>M.thermophila</i> PCR product S	S-F-Msae-0573-A-a-17 G /MS827R	268bp
<i>M.formicicum</i> PCR product L	A109f-m/UNIV907	818bp
<i>M.formicicum</i> PCR product S	S-F-Mbac-0398-S-a-20 /Mbac-0526R	161bp
<i>M.bryantii</i> PCR product L	A108f-m/UNIV907	818bp
<i>M.bryantii</i> PCR product S	S-F-Mbac-0398-S-a-20 /Mbac-0526R	161bp

c) 組み換えプラスミドの作成

A109f-m, UNIV907 のプライマーセットで得た PCR 増幅産物 (*M.hungatei* PCR product L, *M.thermophila* PCR product L, *M.formicicum* PCR product L) を TOPO TA cloning kit(Invitrogen)と NovaBlue(DE3)competent cells を用いて、遺伝子組み換え大腸菌を作成した。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit(QIAGEN)を用いて遺伝子組み換えプラスミドの抽出・精製を行った。

(2) アルブミン添加による Real-time PCR への影響評価

タンパク質には牛血清由来アルブミンを選定し、TE buffer に溶かしたものをを用いて、1.25mg/mL, 0.125mg/mL, 0.0125mg/mL の 3 つ濃度を設定した。この異なる濃度のアルブミンを、増幅を行う断片を内部に含む、少しだけ長い PCR 増幅産物 (本研究では、*M.hungatei* PCR product L) にそれぞれ 2 μ L ずつ添加し、表-2 に示した Real-time PCR 反応条件の Msp485F/Msp496R-m のプライマーセットの PCR 条件で Real-time PCR を行った。

(3) 目的遺伝子を含まない DNA 添加による Real-time PCR の影響評価

目的遺伝子を含む PCR 増幅産物 (*M.hungatei* PCR product L) に目的遺伝子を含まないゲノム DNA (*M.thermophila*) を 2 μ L ずつ添加した外部標準を、目的遺伝子を含まないゲノム DNA 濃度を変化させることに

より、計 6 パターン作成した。反応条件は、表-2 に示した Msp485F/Msp496R-m のプライマーセットの Real-time PCR 反応条件に従った。実験から得られた増幅曲線より、目的遺伝子を含まない DNA の存在が Real-time PCR 反応に及ぼす影響を評価した。

3. 結果

Real-time PCR 法では、検量線を得る外部標準とサンプル DNA 中の遺伝子の PCR 増幅効率の異なると定量に誤差が発生することになる。図-1 に、4 種の菌の 16S rRNA 遺伝子定量に対し、外部標準をゲノム DNA, PCR 増幅産物と組み換えプラスミドに用いて作成した検量線を示す。PCR 増幅産物を外部標準とした場合、*M.hungatei* と *M.bryantii* の検量線において DNA 濃度がゲノム DNA と同程度であっても、ある輝度に達するまでに要するサイクル数 (Cycle threshold : C_t) が最大で 6 サイクル程度、ゲノム DNA を外部標準とした場合に対して増加した。塩基長の異なる PCR 増幅産物を外部標準として作成した検量線は、4 つの純粋菌株それぞれにおいて塩基長の長さに関係なく、ほぼ同じ検量線が得られた。したがって、PCR 増幅産物が外部標準の場合、増幅効率が悪くなる場合が存在し、塩基長の違いが増幅効率に与える影響は小さいことが示唆された。

組み換えプラスミドを外部標準とした場合、*M.hungatei* と *M.thermophila* の検量線において C_t 値が最大で 10 サイクル程度増加した。したがって、外部標準が組み換えプラスミドの場合、大幅に増幅効率が悪くなる可能性が示唆された。また、PCR 増幅産物および組み換えプラスミドを外部標準とした場合、ゲノム DNA に対し増幅効率が大幅に良くなる結果は、本研究では得られなかった。したがって、外部標準が PCR 増幅産物および組み換えプラスミドのそれぞれの場合で検量線を作成し、最も増幅効率の良い外部標準を選ぶことにより、相対的に誤差を減らすことが可能であると考えられる。

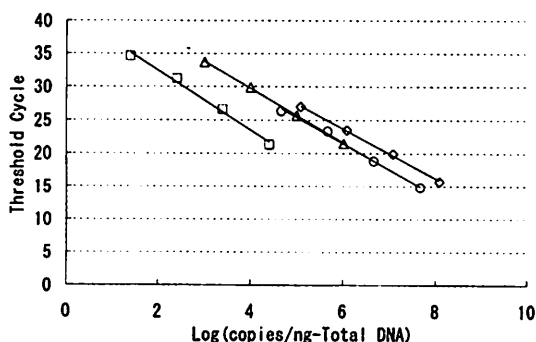
また、PCR 産物を外部標準とする場合、ゲノム DNA を外部標準とした場合に比較して増幅効率が悪くなる原因として、PCR 増幅産物の PCR チューブ壁への付着が反応を阻害していることが考えられる。この要因の検討のため、タンパク質および目的遺伝子を含まない DNA を添加した場合の Real-time PCR への影響評価を行った。図-2 にアルブミンを添加した場合の増幅曲線を、図-3 に目的遺伝子を含まない DNA を添加した場合の増幅曲線を示す。どちらを添加した場合でも、増幅曲線の C_t 値がほぼ変化していないことがわかる。したがって、アルブミンおよび目的遺伝子を含まない DNA の添加による、増幅効率の改善効果は無いことがわかった。

4. まとめ

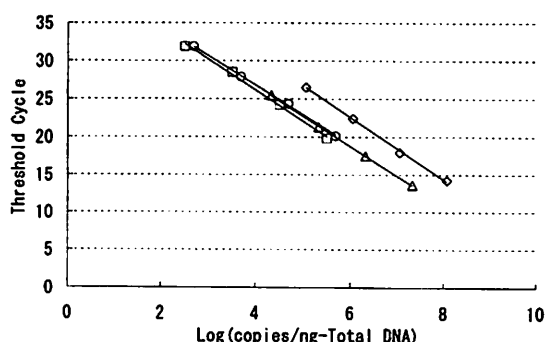
- (1) 外部標準が PCR 増幅産物の場合、塩基長が異なる場合でも作成した検量線はほぼ一致した。
- (2) 遺伝子組み換えプラスミドは、外部標準として不適切であった。
- (3) タンパク質の添加および目的遺伝子を含まない DNA の添加による増幅効率の改善効果はなかった。

5. 参考文献

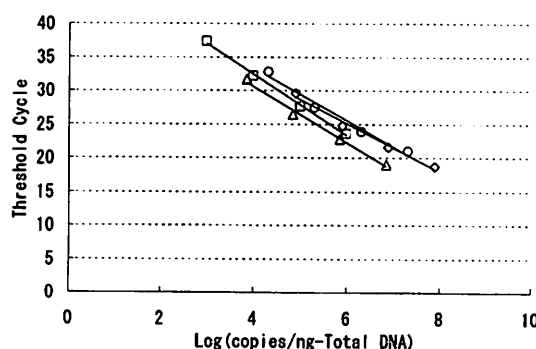
- (1) 古川卓 他, 低濃度排水の無加温嫌気性処理におけるメタン生成古細菌の動態解析, 第 42 回日本水環境学会年会講演集, p479, 2008.



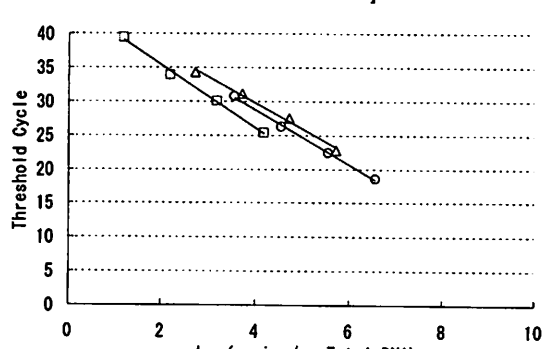
(1) *Methanospirillum hungatei*



(2) *Methanosaeta thermophila*



(3) *Methanobacterium formicicum*



(4) *Methanobacterium bryantii*

□ genome ○ PCR product S △ PCR product L ◇ PCR product L insert Plasmid

図-1 検量線

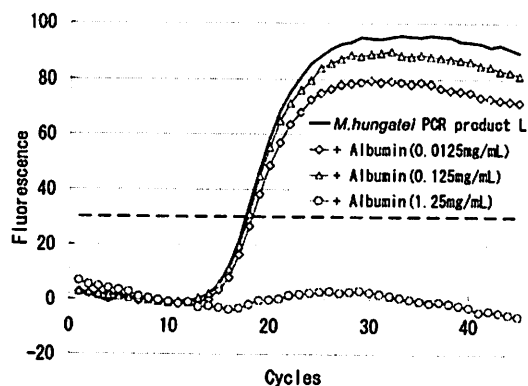


図-2 アルブミン添加による増幅曲線の変化

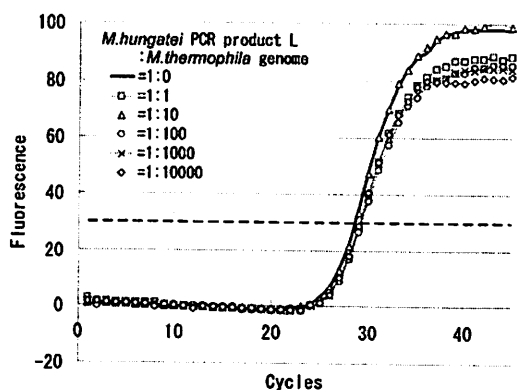


図-3 目的遺伝子を含まない DNA 添加による増幅曲線の変化