

異なる DNA 精製法が定量 PCR による *Edwardsiella tarda* の計数に与える影響

朝重 紅音, 菅 向志郎, 金井 欣也

Effect of different DNA purification kits on counting the cell number of *Edwardsiella tarda* using quantitative PCR

Akane TOMOSHIGE, Koushirou SUGA and Kinya KANAI

## Abstract

Quantitative PCR (qPCR) quantifies the template DNA from the number of threshold cycles (Ct value), but the probability of quantitative errors occurs due to the differences in recovery rates during DNA purification. In order to investigate the effect of different DNA purification kits in counting *Edwardsiella tarda* cells using qPCR, we compared two methods; the bacterial culture dilution method, in which the DNA is purified after 5 steps of a ten-fold serial dilution of *E. tarda* culture, and the DNA dilution method, which the DNA is diluted after purification with the optimum cell number of *E. tarda*. In both methods, we used three types of DNA purification kit: Chelex resin, Non-Silica membrane and Silica membrane. Our results showed the lowest Ct value and high DNA recovery rate were obtained using Chelex resin. Non-Silica membrane and Silica membrane Ct values in DNA dilution method were higher than that of Chelex resin. With the use of Non-Silica membrane, the calculated DNA using bacterial culture dilution method decreased by 67-87% compared to DNA dilution method at  $1.0 \times 10^4$  cells/ $\mu$ L of *E. tarda*.

**Key words** : *Edwardsiella tarda*, 定量 PCR quantitative PCR, 細菌計数 bacterial count, DNA 精製 DNA purification

養殖魚における *Edwardsiella tarda* を原因菌とした疾病は、アメリカナマズ<sup>1)</sup> およびウナギ<sup>2)</sup> について1973年に初めて報告された。海産養殖魚の疾病として最初の記載は、1974年三重県の養殖チダイの斃死であり、<sup>3)</sup> その後、長崎県の養殖場でマダイ、チダイ、ブリ、ヒラメから分離され病原性を有した *E. tarda* の性状に関して報告された。<sup>4)</sup> 近年も養殖場におけるヒラメ、マダイ、ウナギ等に本菌によるエドワジエラ症が発症しており、特にヒラメでは高水温期に全国的に発生し、ヒラメの疾病の中では最も被害の大きいものになっている。<sup>5)</sup> 本症に限らず、罹患魚の病症から細菌感染症が疑われる場合、投薬などによる治療方針を決める上で、原因細菌の分離と同定およびその感染強度を推定することが重要である。

本症の罹患魚や飼育水からの *E. tarda* の分離には、SS 寒天培地への塗沫培養法<sup>6)</sup> やチオグリコレート液体培地の前培

養を経て BHI 寒天培地に塗沫培養する方法<sup>7)</sup> などの選択鑑別培地が用いられている。塗沫培養法よりも迅速に *E. tarda* の有無を診断する方法として、本菌の haemolysin 遺伝子を検出する LAMP 法<sup>8)</sup> や16S rDNA の PCR-RFLP 法によるヒラメ由来の定型株およびマダイ由来の非定型株の *E. tarda* の遺伝子型で分けて検出する方法<sup>9)</sup> が開発されている。また、定量 PCR による *E. tarda* の細菌数を定量する方法が報告されており、<sup>10)</sup> 本菌の迅速かつ簡便な検出と計数が可能となっている。しかし、定量 PCR で細菌数を計測する際には、標的遺伝子を組み込んだプラスミド DNA を検量線として使用することが多く、<sup>11, 12)</sup> 定量する試料から DNA を精製する際の回収率により定量誤差が生じる可能性が考えられる。本研究では、*E. tarda* を計数する試料として想定し、菌培養液を5段階希釈後に DNA を精製した“菌液希釈”、および検量線として想定し、最適菌量で精製後に希釈した“DNA

希釈の各 DNA 溶液で定量 PCR を行い、3 種類の DNA 精製法（キレックス樹脂、非シリカ膜、シリカ膜）が定量 PCR による *E. tarda* の計数に与える影響を調べることを目的とした。

### 【材料と方法】

#### *Edwardsiella tarda* 定型菌における標的遺伝子の選定と塩基配列解析

供試菌株には、1986年1月に長崎県戸石で分離されたヒラメ腸由来の強毒株である *E. tarda* NUF251を用いた。Heart Infusion (BD 製、以下 HI) 寒天培地を用いて、27°Cで2日間静置培養した後に、生じたコロニーを本実験に供した。定量 PCR に用いる標的遺伝子は、*E. ictaluri* および *E. tarda* の線毛遺伝子群スペーサー領域に存在する DNA 配列（全 848 bp）<sup>13)</sup> を選定した。*E. tarda* NUF251のゲノム DNA を Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega 製、以下非シリカ膜) で精製し、本領域を標的とするプライマー ED-F、ED-R<sup>13)</sup> を用いて PCR を行い、本領域を増幅した。増幅 DNA 断片は、ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 製) を用いて塩基配列を解析した。

#### 定量 PCR に用いるプライマーとプローブの設計

Universal ProbeLibrary (Roche 製、以下 UPL) の UPL Assay Design Center より、サイクルシーケンスで確認した *E. tarda* 定型菌に特有の塩基配列（全 268 bp）を標的とするプライマーとして *E. tarda*-fimb-left、*E. tarda*-fimb-right を設計し、プローブとして #122 を選定した (Table 1)。定量 PCR で増幅する DNA 配列は、GenBank に登録されている *E. ictaluri*、*E. tarda* および NUF251由来の線毛遺伝子群スペーサー領域に存在する標的 DNA 配列 (*E. ictaluri*, AY626368 ; *E. tarda* KG8401, AB100170) を DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の多重整列プログラム Clustal W で比較した。

#### 3 種類の DNA 精製試薬による *E. tarda* ゲノム DNA の抽出および定量 PCR

HI 寒天培地を用いて 27°C で 2~3 日間静置培養した後に、HI 液体培地を用いて 27°C で 1 晩振盪培養した *E. tarda* 培養液を用いた。DEN - 1B McFarland Densitometer (和研薬製) を用いて菌濃度を算出した。

HI 液体培地を用いて、菌培養液の 10 倍希釈系列を作り、4 段階の濃度 (10~10<sup>4</sup> 倍) に調製した。原液 (1.5 mL チュ

ーブ 2 本分)、10~10<sup>3</sup> 倍希釈液それぞれ 900 μL、10<sup>4</sup> 倍希釈液 1000 μL を InstaGene™ Matrix (BioRad 製、以下キレックス樹脂)、非シリカ膜、および Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega 製、以下シリカ膜) を用いて、それぞれ DNA を精製した。キレックス樹脂は、細菌用精製手順に従って DNA を精製した。非シリカ膜は、組織培養細胞および動物組織用精製手順に従って DNA を精製した。シリカ膜は、グラム陰性菌用精製手順に従って DNA を精製した。精製はそれぞれの試薬において 3 回ずつ行った。精製後は滅菌超純水を用いて、原液 (チューブ 1 本分) の 10 倍希釈系列を作り、4 段階の濃度 (10~10<sup>4</sup> 倍) に調製した。

HI 液体培地を用いて菌培養液を希釈後に精製した DNA (原液、10~10<sup>4</sup> 倍希釈) と精製後に滅菌超純水を用いて希釈した DNA (原液、10~10<sup>4</sup> 倍希釈) を鋳型として、FastStart Essential DNA Probes Master (Roche 製) を用いて定量 PCR を行った。ネガティブコントロールとして水 (FastStart Essential DNA Probes Master H<sub>2</sub>O, PCR grade) を用いた。プライマーは *E. tarda*-fimb-left、*E. tarda*-fimb-right がそれぞれ終濃度 5 μM になるように調製した *E. tarda*-fimb-Mix を用いた。反応溶液の組成は、FastStart Essential DNA Probes Master 2x conc. 10 μL、FastStart Essential DNA Probes Master H<sub>2</sub>O, PCR grade 5.6 μL、*E. tarda*-fimb-Mix (5 μM) 2 μL、#122 probe 0.4 μL、鋳型 DNA 2 μL の計 20 μL とした。PCR 反応条件は、LightCycler® Nano (Roche 製) を用いて 2-Step Amplification で行った。95°C で 10 分間反応させた後、熱変性を 95°C で 10 秒間、アニーリングおよび伸長反応を 60°C で 30 秒間、この 2 つを 1 サイクルとして 50 回繰り返した。全てのサンプルについて 3 回の定量 PCR を行った。

### 【結果】

#### *Edwardsiella tarda* NUF251 の線毛遺伝子群スペーサー領域および定量 PCR の標的配列

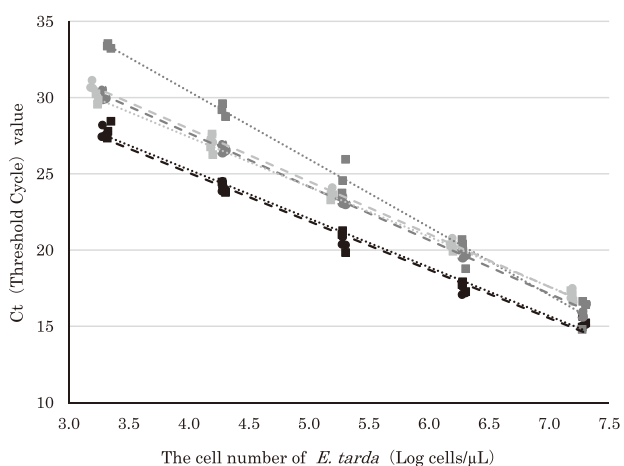
*E. tarda* NUF251 由来の線毛遺伝子群スペーサー領域の塩基配列は、GenBank に登録されている *E. tarda* と一致していた。本領域内の定量 PCR 標的 DNA 配列を *E. ictaluri*、*E. tarda* の塩基配列と Clustal W で比較した結果、*E. tarda* 定型菌に特有の塩基配列であることを確認した (データは示さず)。

Table 1 Primers, probe sequence, and amplicon length used in this study

Target gene	Primer		Probe		Amplicon length (bp)
	Name	Sequence (5'-3')	Name	Sequence (5'-3')	
Fimbrial genes cluster	<i>E. tarda</i> -fimb-left	CCTTGCTGTAATATCAGTGAGTGG	#122	TGCCCTGA	106
spacer region	<i>E. tarda</i> -fimb-right	TTAAAATAGCAAAAATTGGCACTG			

**Table 2** Standard curve and amplification efficiency of *E. tarda* cells using different DNA purification kits

Type		Standard curve	Amplification efficiency
Chelex resin	Bacteria culture dilution	$y = -3.199x + 38.075$ $r^2 = 0.985, p < 0.01$	2.054
	DNA dilution	$y = -3.178x + 37.781$ $r^2 = 0.986, p < 0.01$	2.064
Non - Silica membrane	Bacteria culture dilution	$y = -4.450x + 48.211$ $r^2 = 0.987, p < 0.01$	1.678
	DNA dilution	$y = -3.508x + 41.704$ $r^2 = 0.997, p < 0.01$	1.928
Silica membrane	Bacteria culture dilution	$y = -3.272x + 40.512$ $r^2 = 0.995, p < 0.01$	2.021
	DNA dilution	$y = -3.456x + 41.791$ $r^2 = 0.997, p < 0.01$	1.947



**Fig. 1** Standard curves of *E. tarda* cells quantified by quantitative PCR. Each sample was repeated 3 times as replicates. ■, bacteria culture dilution method; ●, DNA dilution method. Black line, Chelex resin; Dark gray line, Non - Silica membrane; gray line, Silica membrane.

**Table 3** The amount of *E. tarda* genomic DNA in bacteria culture dilution method in comparison with DNA dilution method using different purification kits

Type	Ct (Threshold Cycle) value		
	20	25	30
Chelex resin	- 12%	- 14%	- 16%
Non - Silica membrane	- 30%	- 65%	- 82%
Silica membrane	+ 9%	+ 31%	+ 58%

**Table 4** The rate of decrease in *E. tarda* genomic DNA in bacteria culture dilution method using Chelex resin in comparison with Non-Silica and Silica membrane purification kits

Type	Ct (Threshold Cycle) value		
	20	25	30
Non - Silica membrane	80%	93%	97%
Silica membrane	76%	78%	80%

### 3種類のDNA精製試薬で精製した*E. tarda*ゲノムDNAの定量PCR

3種類のDNA精製試薬において、“菌液希釈”と“DNA希釈”を鋳型として定量PCRを行った結果、検量線をFig. 1に、その式および増幅効率をTable 2に示した。キレックス樹脂を用いて精製したDNAでは、“菌液希釈”のDNA量は、同じ菌濃度換算の“DNA希釈”と比較して約10%減少していたが(Table 3)、3種類のDNA精製試薬の中では最もCt (Threshold Cycle) 値が低く、DNAの回収率が高いことが分かった(Fig. 1)。非シリカ膜およびシリカ膜では、キレックス樹脂と比較して“DNA希釈”のCt値が高く、DNAの回収率が低かった(Fig. 1)。また、どちらも同じ菌濃度換算の“DNA希釈”と比較した時の“菌液希釈”のDNA量の差は、Ct値が高くなるにつれて大きくなっていった(Table 3)。非シリカ膜では、菌濃度約 $1.0 \times 10^4$  cells/ $\mu$ Lの時、同じ菌濃度換算の“DNA希釈”と比べてCt値は2~3上昇、すなわちDNA量が67~87%に減少した(Fig. 1)。キレックス樹脂の検量線を用いて、非シリカ膜とシリカ膜のDNA量の減少率を比較すると(Table 4, 5)、“菌液希釈”と“DNA希釈”では、どちらもCt値が高くなるにつれて差が大きくなり、“菌液希釈”において、非シリカ膜では80~97%およびシリカ膜では76~80%、“DNA希釈”において、非シリカ膜では74~87%およびシリカ膜では80~89%のDNA量が減少して算出された。

**Table 5** The rate of decrease in *E. tarda* genomic DNA in DNA dilution method using Chelex resin in comparison with Non-Silica and Silica membrane purifications kits

Type	Ct (Threshold Cycle) value		
	20	25	30
Non - Silica membrane	74%	82%	87%
Silica membrane	80%	85%	89%

## 【考察】

PCR および定量 PCR を用いた細菌の検出には、標的となる遺伝子配列の特異性および、設計したプライマーの増幅効率が重要である。本研究で選定した *E. tarda* 定型菌の線毛遺伝子群スペーサー領域は、BLAST 検索において高い相同性を有する配列は存在せず、<sup>13)</sup> 定量 PCR の増幅効率は PCR の理論値である2.0に近い値を示しており (Table 2)、本菌の検出および計数に適していることが明らかとなった。*E. tarda* は VBNC (viable but non-culturable) 状態になることが報告されており、<sup>14)</sup> 寒天鑑別培地を用いたコロニー計数法で検出できない VBNC 状態の生菌を定量 PCR では計数可能である。また、通常の定量 PCR では死菌も計数するが、選択的膜透過性色素である ethidium monoazide (以下 EMA) を用いることで死菌の DNA を修飾し、PCR で増幅出来ない鋳型にすることで生菌由来の DNA を選択的に増幅することが可能である。<sup>15)</sup> この EMA で処理した後に DNA を精製し、本研究で設計したプライマーとプローブを用いることで、VBNC 状態を含む生菌 *E. tarda* のみを計数可能である。

市販されているキレックス樹脂、非シリカ膜およびシリカ膜を用いた DNA 精製キットは、それぞれ異なる原理で DNA を抽出もしくは精製する。これらを用いて、定量する試料を想定した“菌液希釈”、定量 PCR の検量線に用いる精製 DNA を想定した“DNA 希釈”を鋳型として DNA を精製し、定量 PCR を行った結果、キレックス樹脂では“菌液希釈”は“DNA 希釈”の DNA より減少し、非シリカ膜では高い菌数の試料を除いて同様に“菌液希釈”は“DNA 希釈”の DNA より大きく減少した。シリカ膜では、これらとは逆に“菌液希釈”は“DNA 希釈”の DNA より増加していた。本 DNA 精製キットでは、DNA をシリカ膜から抽出する際に使用する滅菌水が遠心分離の際に蒸発することで、菌濃度が薄くなるにつれて、Ct 値が高くなることが考えられた。キレックス樹脂は1本の1.5mL チューブだけで不要物の除去をせずに DNA を精製できるが、他2種類の DNA 精製キットは2本以上のチューブを用いてタンパク質など不純物の除去を行い、DNA を精製する。この不純物除去の工程で生じる DNA の回収率の低下が、キレックス樹脂と他2種類の DNA 精製キットとの比較で Ct 値が上昇した要因であると推定した。本研究で使用した DNA 精製キットでは、キレックス樹脂が最も DNA の回収率が高く、菌濃度が薄い時の定量誤差も少ないことが分かった。このことから、正確な *E. tarda* 菌数算出を行うための DNA 精製キットとして、キレックス樹脂が適していると考えられた。しかし、本キットは、熱処理だけで試料に含まれる細胞から DNA を溶出させ、PCR の阻害物質を樹脂に吸着させる PCR 用の鋳型調製試薬である。このため、熱処理で十分に細胞が破碎され、樹脂の阻害物質吸着能を超えない試料でなければ、定量 PCR の鋳型として使用することが出来ない。

本研究の条件で作成したキレックス樹脂の検量線は、“菌液希釈”および“DNA 希釈”ともに高い精度であった。この各

検量線に対する、非シリカ膜とシリカ膜の DNA 量の減少率を比較すると、“菌液希釈”と“DNA 希釈”では Ct 値が高くなるにつれて差が大きくなり、7割以上の DNA 量が減少した。すなわち、細菌数に換算すると約1桁低く細菌数が算出されることになる。一般的に、定量 PCR を行う際の検量線に使用する DNA は、対象とする増幅領域が導入されたプラスミド DNA が用いられている。この精製 DNA は、吸光度法や蛍光法による濃度測定を行った後、分子量を算出して検量線が作製されている。<sup>11, 12)</sup> 本研究の結果より、精製プラスミド DNA の分子量をもとにした検量線を用いて、細菌を定量した場合、約1桁の定量誤差が生じる可能性が高いため、DNA 精製時の回収率を加味した係数を乗じて算出する、もしくは、試料と同じ方法で既知の細菌数から精製した鋳型 DNA で検量線を作成する必要があることが明らかとなった。

## 【要約】

定量 PCR は増幅サイクル数から鋳型 DNA を定量するが、DNA 精製時の回収率の違いにより定量誤差が生じる可能性がある。本研究では、3種類の DNA 精製試薬 (キレックス樹脂、非シリカ膜、シリカ膜) で、*Edwardsiella tarda* の培養液を5段階希釈後に DNA を精製した“菌液希釈”および、最適菌量で精製後に希釈した“DNA 希釈”の各 DNA 溶液で定量 PCR を行い、各 DNA 精製法が定量 PCR に与える影響を調べた。キレックス樹脂を用いて精製した DNA では、3種類の DNA 精製試薬の中で最も Ct (Threshold Cycle) 値が低く、DNA の回収率が高いことが分かった。非シリカ膜とシリカ膜では、キレックス樹脂と比べて“DNA 希釈”の Ct 値が高くなった。また、非シリカ膜では、菌濃度が薄くなるにつれて“菌液希釈”の Ct 値は高くなり、菌濃度約  $1.0 \times 10^4$  cells/ $\mu$ L の時、同じ菌濃度換算の“DNA 希釈”と比べて DNA 量が67~87%減少した。

## 【謝辞】

本研究は、日本学術振興会科学研究費基盤研究 (C) No.15K07552により実施した。

## 【参考文献】

- 1) Meyer FP, Bullock GL. *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Appl. Microbiol.* 1973; **25**: 155-156.
- 2) Wakabayashi H, Egusa S. *Edwardsiella tarda* (*Paracolobactrum anguillimortiferum*) associated with pond-cultured eel disease. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 1973; **39**: 931-936.
- 3) 楠田理一, 伊丹利明, 宗清正広, 中島博司. 養殖チダイから分離された病原性 *Edwardsiella* の性状について. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 1977; **43**: 129-134.

- 4) 安永統男, 小川七朗, 畑井喜司雄. 数種の高産養殖魚から分離された病原性 *Edwardsiella* の性状について. 長崎県水産試験場研究報告 1982; **8**: 57-65.
- 5) 室賀清邦, 江草周三. 「魚病学概論」恒星社厚生閣, 東京. 2007.
- 6) Wyatt LE, Nickelson RIL, Vanderzant C. *Edwardsiella tarda* in freshwater catfish and their environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 1979; **38**: 710-714.
- 7) Amandi A, Hiu SF, Rohovec JS, Fryer JL. Isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Appl. Environ. Microbiol.* 1982; **43**: 1380-1384.
- 8) Savan R, Igarashi A, Matsuoka S, Sakai M. Sensitive and rapid detection of Edwardsiellosis in fish by a loop-mediated isothermal amplification method. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; **70**: 621-624.
- 9) Yamada Y, Wakabayashi H. Enzyme electrophoresis, catalase test and PCR-RFLP analysis for the typing of *Edwardsiella tarda*. *Fish pathol.* 1998; **33**: 1-5.
- 10) Reichley SR, Ware C, Greenway TE, Wise DJ, Griffin MJ. Real-time polymerase chain reaction assays for the detection and quantification of *Edwardsiella tarda*, *Edwardsiella piscicida*, and *Edwardsiella piscicida*-like species in catfish tissues and pond water. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2015; **27**: 130-139.
- 11) 小島夫美子, 岩谷良則, 藤本秀士. リアルタイム PCR — その原理と特徴 —. 九州大学医学部保健学科紀要 2003; **2**: 95-102.
- 12) 久保田 寛顕, 奥野 ルミ, 畠山 薫, 貞升 健志, 甲斐 明美. レンサ球菌を対象としたリアルタイム PCR 検出系の確立. 東京都健康安全研究センター研究年報 2012; **63**: 91-95.
- 13) Sakai T, Yuasa K, Sano M, Iida T. Identification of *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda* by species-specific polymerase chain reaction targeted to the upstream region of the fimbrial gene. *J. Aquat. Anim. Health* 2009; **21**: 124-132.
- 14) Sakai M, Atsuta S, Kobayashi M. Survival of fish pathogen *Edwardsiella tarda* in sea water and fresh water. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 1994; **14**: 188-191.
- 15) Nogva HK, Drømtorp SM, Nissen H, Rudi K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *BioTechniques* 2003; **34**: 804-813.