

16S rRNA 遺伝子の核酸標準を使用したマイクロバイオーム研究における細菌存在量の正確な定量分析の実現



Improved Accurate Quantitative Analysis of Microbiome Using DNA Standard for 16S rRNA NGS analysis

Honami Miyakura, Yasunobu Terabayashi, Yuto Kitajima, Tomoya Uchiyama, Yoshitaka Kimura
TAKARA BIO INC.

Summary

High-throughput 16S rRNA gene amplicon analysis (16S rRNA microbiota analysis) is widely used for microbiota profiling. However, previous studies have been limited to relative quantification due to the lack of reliable internal standards, which are indispensable for absolute quantification of each species in the microbiota.

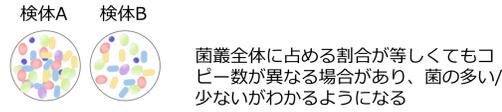
In this study, to construct widely applicable NGS-based absolute quantitative 16S rRNA microbiota analysis protocol, availability of the synthetic 16S rDNA set as internal standard was evaluated, in conjunction with a data analysis workflow. This set consists of 12 known artificial DNA sequences in different known proportions, and each standard possesses a unique artificial sequence not found in nature in the variable region (V1-V9) of 16S rDNA^[1]. To employ this set as a spike-in control, five required characteristics were evaluated: reliability, robustness with various regions, consistency, reproducibility, and versatility.

As a result, a widely applicable absolute quantitative NGS-based microbiota analysis protocol was established with using synthetic 16S rDNA standard set as spike-in control.

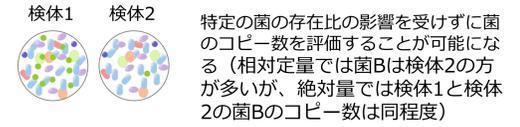
従来の相対定量16S rRNA菌叢解析と絶対定量16S rRNA菌叢解析の違い

従来の16S rRNA菌叢解析は、相対的な存在比を算出しているが、標準物質をスパイクインすることで、試料中の菌のコピー数を絶対定量することが可能となる。標準物質を用いた絶対定量16S rRNA菌叢解析を実施することで、相対比とは異なる考察が可能となる。

例1



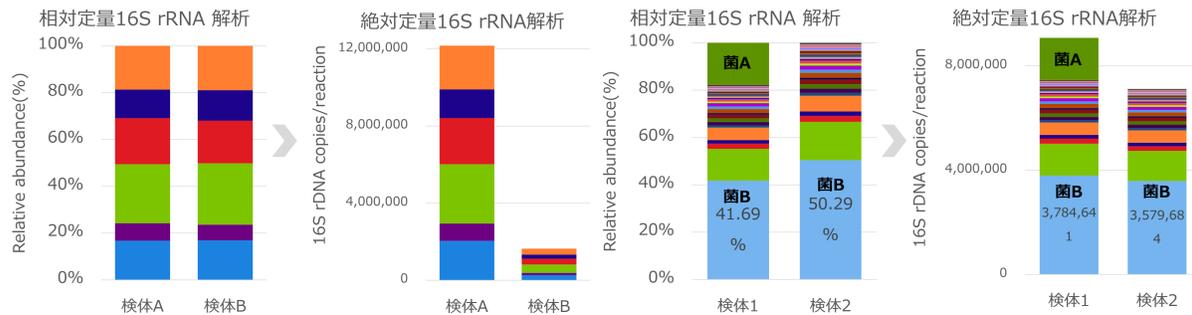
例2



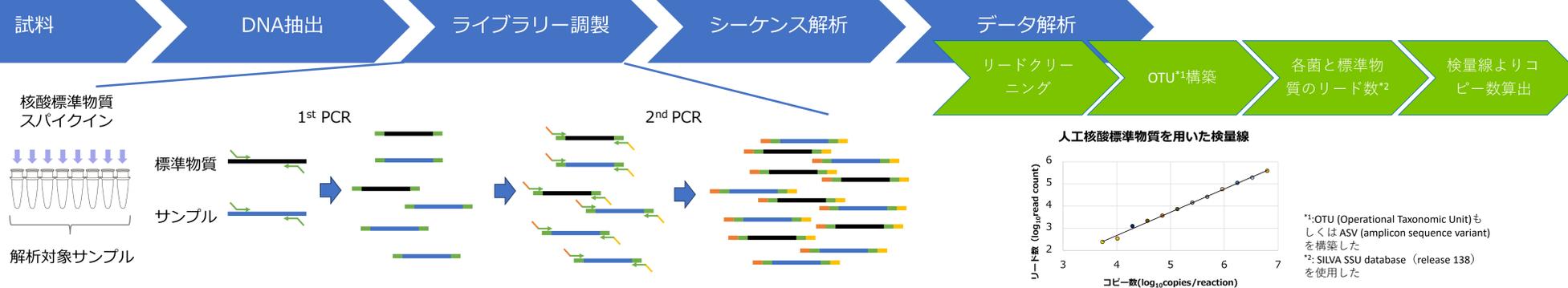
Conventional 16S rRNA microbiota analysis: relative abundance of each bacterial species.

Absolute quantification of 16S rRNA microbiota analysis with synthetic 16S rDNA standards enables:

- ✓ To observe the copy numbers of each bacterial 16S rRNA.
- ✓ To compare bacterial abundance among different experiment lots.
- ✓ To define detection limits based on copy numbers.
- ✓ To control the quality of analysis process.

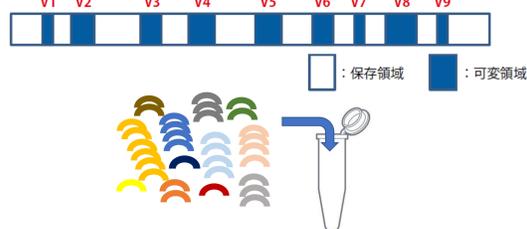


絶対定量16S rRNA菌叢解析ワークフロー



実験1：人工核酸標準物質を用いた絶対定量の評価

人工核酸標準物質

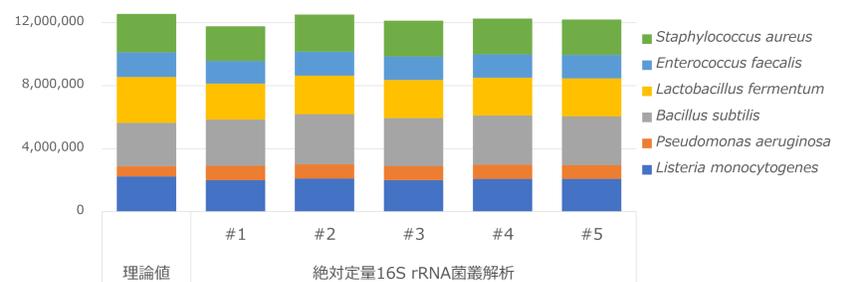


標準物質の組成

GenBank accession number	16S rDNA (copies/μl)	16S rDNA copies (%)
LC140931	6.31X10 ⁷	47.39
LC140932	3.32X10 ⁷	24.93
LC140933	1.75X10 ⁷	13.14
LC140934	9.20X10 ⁶	6.91
LC140935	4.84X10 ⁶	3.63
LC140936	2.55X10 ⁶	1.91
LC140937	1.34X10 ⁶	1.01
LC140938	7.06X10 ⁵	0.53
LC140939	3.72X10 ⁵	0.28
LC140940	1.96X10 ⁵	0.15
LC140941	1.03X10 ⁵	0.08
LC140942	5.42X10 ⁴	0.04

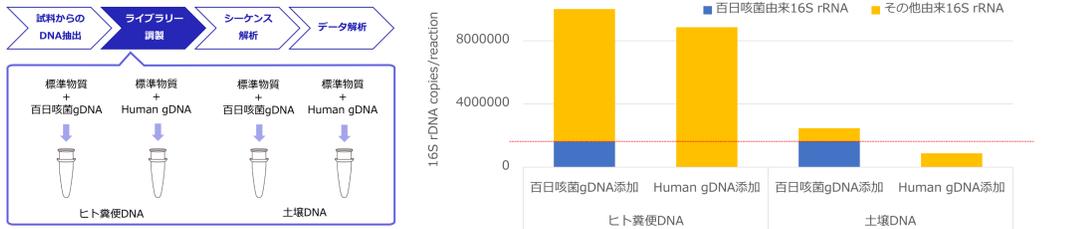
- 人工核酸標準物質の特徴
- ・12種類の配列既知の核酸が異なる存在比で混合された標準物質
 - ・可変領域 (V1~V9) は自然界に存在しない人工DNA配列
 - ・V1-V2、V3-V4といったどの可変領域についても定量解析可能
 - ・解析サンプルの菌叢解析結果に影響を与えない
 - ・あらゆる生体サンプルにスパイクイン可能な普遍的な標準品

(d) 絶対定量16S rRNA菌叢解析による各菌のコピー数の算出の再現性



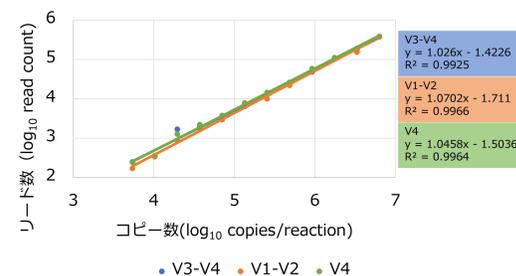
10 ngの微生物由来DNA混合物に標準物質をスパイクインしたサンプルを鋳型に、ライブラリーを調製しシーケンスを行った。得られた標準物質のリードより検量線を作成し、各サンプルの16S rRNA遺伝子のコピー数を計算した。理論値との比較して、絶対定量16S rRNA菌叢解析により得られたコピー数を定量することが出来た。また、N=5で実験を行ったが、サンプル間のコピー数の差は少なく高い再現性を示した(d)。

(e) 異なるサンプルにスパイクインした際の安定性

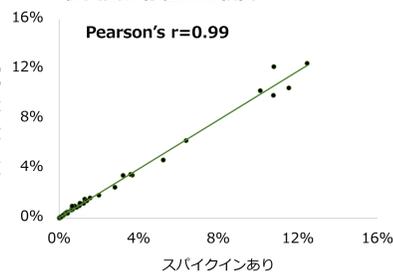


由来の異なるサンプルに等量の百日咳菌gDNAまたはNegative ControlとしてHuman gDNAを添加したサンプルを鋳型にし、絶対定量16S rRNA菌叢解析を行った。得られた標準物質のリードより検量線を作成し、百日咳菌の16S rRNA遺伝子のコピー数を計算し、サンプルごとに比較を行ったところ、由来の異なるDNAでも百日咳菌由来の16Sコピー数が同等に算出された(e)。

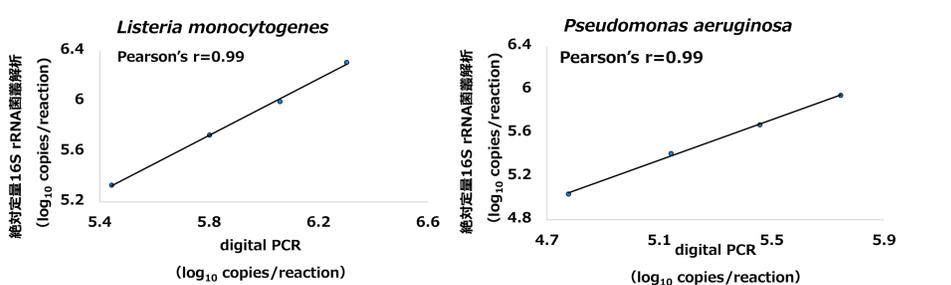
(a) 様々な可変領域 (V3-V4、V1-V2、V4) で定量可能



(b) 標準物質スパイクインの有無による検出菌の存在比の相関



(c) 絶対定量16S rRNA菌叢解析とデジタルPCRによる定量値の相関



標準物質の16S rRNA遺伝子V3-V4、V1-V2、V4領域をターゲットとしてライブラリーを調製し、NextSeq 2000を用いてシーケンスを行った。標準物質の検量線を作成したところ、いずれのターゲットにおいて直線性の高い検量線を作成できることを確認した(a)。ヒト糞便由来DNAと本製品のスパイクインしたDNAを鋳型に、16S (V3-V4) Metagenomic Library Construction Kit for NGS (Takara code:R161A) を用いてライブラリーを作製し、NextSeq 2000を用いてシーケンスを行い、スパイクインの有無による検出される菌種への影響を確認した。ピアソン相関係数は(r)=0.99となり、標準物質のスパイクインによるサンプルへの影響は無いことを確認した(b)。10 ng、5 ng、2.5、1 ngの微生物由来DNA混合物*に含まれる*L. monocytogenes*と*P. aeruginosa*を絶対定量16S rRNA菌叢解析とデジタルPCRで定量した結果、絶対定量16S rRNA菌叢解析とデジタルPCRの結果に相関を認めた(c)。

*: ZymoBIOMICS : Microbial Community DNA Standard

Conclusion

Five characteristics of "Synthetic 16S rDNA standards set" required for spike-in control were evaluated.

1. Correlation of quantitative results with other techniques (ddPCR)
2. Reproducibility of quantification results from various regions (V1-V2, V3-V4, and V4)
3. Consistency of results of 16S rRNA microbiota analysis with and without standards
4. Reproducibility of results in repeated experiments
5. Versatility of spike-in for various samples

The result indicated broad availability of synthetic 16S rDNA standard set as spike-in controls for NGS-based 16S rRNA absolute quantitative microbiota analysis protocol. Absolute quantification with this protocol will lead to additional interpretations and insights to microbiota profiling.

Reference

1. Tourlousse D, et al. Synthetic spike-in standards for high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing. *Nucleic Acids Res* . 2017 Feb 28; 45(4): e23.
2. Klindworth A, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* .2013 Jan 7, 41(1): e1.
3. Caporaso JG, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* . 2012 Aug, 6(8): 1621-1624.