

製品名 **DNA-Mock-001**ロット番号 **BK1903D01**

1. 仕様

- ・ 内容量 20 μ l
- ・ 濃度 58.1 ng/ μ l
- ・ 保存溶媒 10 mM Tris-HCl (pH8.5)
- ・ 保存形態 -80°C
- ・ 構成 本製品は、NBRCが保有する微生物株のうち、15株のゲノムDNAを使用し、それぞれのゲノムDNAのコピー数を等量となるように混合したものです。

表1 DNA-Mock-001の作製に使用した微生物株^{※1}の情報

| 学名 | NBRC 番号 | グラム 染色 | ゲノム サイズ (Mbp) | GC含量 (%) | 16S rRNA コピー数 | バイオ セーフティ レベル |
|--|---------------------|-----------|---------------------|-------------|------------------|---------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> | 13719 ^T | 陽性 | 4.3 | 43.3 | 10 | 1 |
| <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> | 113353 | 陽性 | 2.3 | 56.4 | 5 | 1 |
| <i>Clostridium butyricum</i> | 13949 ^T | 陽性 | 4.7 | 28.8 | 11 | 1 |
| <i>Corynebacterium striatum</i> | 15291 ^T | 陽性 | 3.1 | 59.1 | 4 | 1* |
| <i>Cutibacterium acnes</i> subsp. <i>acnes</i> | 107605 ^T | 陽性 | 2.5 | 60.0 | 3 | 1* |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> | 3202 ^T | 陽性 | 1.9 | 50.1 | 8 | 1 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 100911 ^T | 陽性 | 2.4 | 32.3 | 6 | 1* |
| <i>Streptococcus mutans</i> | 13955 ^T | 陽性 | 2.0 | 36.9 | 5 | 1* |
| <i>Acinetobacter radioresistens</i> | 102413 ^T | 陰性 | 3.4 | 41.4 | 6 | 1* |
| <i>Bacteroides uniformis</i> | 113350 | 陰性 | 5.0 | 46.2 | 4 | 1* |
| <i>Enterocloster clostridioformis</i> | 113352 | 陰性 | 5.7 | 48.9 | 5 | 1* |
| <i>Comamonas terrigena</i> | 13299 ^T | 陰性 | 4.7 | 65.0 | 7 | 1* |
| <i>Escherichia coli</i> (K-12株) | 3301 | 陰性 | 4.8 | 50.7 | 7 | 1 |
| <i>Parabacteroides distasonis</i> | 113806 | 陰性 | 5.2 | 45.0 | 7 | 1* |
| <i>Pseudomonas putida</i> | 14164 ^T | 陰性 | 6.2 | 62.3 | 7 | 1* |

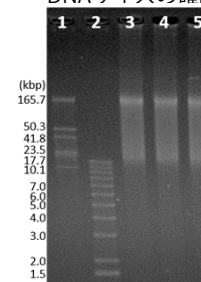
※1：本製品に使用した微生物はNBRCにおいて品質確認されたもので、個別に購入できます。

2. 検証結果 (ロット番号 BK1903D01)

2-1. 電気泳動によるDNAサイズの確認

製造したDNA Cocktailのうち、3本を1%アガロース電気泳動に供しました。

図1 アガロース電気泳動によるDNAサイズの確認



Lane 1; marker 1, Lane 2; marker 2, Lane 3; BK1903D01-1,
Lane 4; BK1903D01-2, Lane 5; BK1903D01-3

表2 DNAの精製度

| | ng/ μ l | 260/280 | 260/230 |
|-------------|-------------|---------|---------|
| BK1903D01-1 | 61.1 | 1.89 | 1.82 |
| BK1903D01-2 | 57.0 | 1.90 | 1.86 |
| BK1903D01-3 | 56.2 | 1.90 | 1.88 |

2-2. 各株の検出割合

各株においてシングルコピーの遺伝子にプライマー/プローブセットをそれぞれ設計し、QX200™ Droplet Digital™ PCRシステム (ddPCR, Bio-Rad社) を用いてDNA Cocktail中のコピー数を測定しました。本測定は、本ロットからランダムに3本抽出して行いました。

表3 ddPCRを用いた15株の検出割合

| 学名 | NBRC 番号 | 理想値 (%) | 各株の検出割合 (%) ^{※2} | 同一ロット内での 均質性 (%) ^{※3} |
|--|---------------------|------------|------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> | 13719 ^T | 6.7 | 6.2 \pm 0.0 | 0.1 |
| <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> | 113353 | 6.7 | 8.7 \pm 0.2 | 0.4 |
| <i>Clostridium butyricum</i> | 13949 ^T | 6.7 | 6.1 \pm 0.2 | 0.4 |
| <i>Corynebacterium striatum</i> | 15291 ^T | 6.7 | 5.4 \pm 0.1 | 0.3 |
| <i>Cutibacterium acnes</i> subsp. <i>acnes</i> | 107605 ^T | 6.7 | 6.4 \pm 0.2 | 0.4 |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> | 3202 ^T | 6.7 | 7.9 \pm 0.5 | 0.9 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 100911 ^T | 6.7 | 7.0 \pm 0.0 | 0.1 |
| <i>Streptococcus mutans</i> | 13955 ^T | 6.7 | 6.3 \pm 0.2 | 0.4 |
| <i>Acinetobacter radioresistens</i> | 102413 ^T | 6.7 | 5.5 \pm 0.2 | 0.5 |
| <i>Bacteroides uniformis</i> | 113350 | 6.7 | 7.2 \pm 0.2 | 0.4 |
| <i>Enterocloster clostridioformis</i> | 113352 | 6.7 | 5.3 \pm 0.1 | 0.2 |
| <i>Comamonas terrigena</i> | 13299 ^T | 6.7 | 6.8 \pm 0.2 | 0.4 |
| <i>Escherichia coli</i> (K-12株) | 3301 | 6.7 | 7.5 \pm 0.1 | 0.2 |
| <i>Parabacteroides distasonis</i> | 113806 | 6.7 | 6.7 \pm 0.1 | 0.3 |
| <i>Pseudomonas putida</i> | 14164 ^T | 6.7 | 7.1 \pm 0.3 | 0.6 |

※2：本値は、ddPCRを用いて測定した各株の検出割合の平均と標準偏差を表したものの。

※3：各株の均質性を、その株の検出割合 (%) の最大値と最小値の差 (変動幅) で示したものの。

3. 使用例

16S rRNA遺伝子の可変領域であるV1V2領域とV3V4領域を対象にして、MiSeqシステム (Illumina社) を用いてメタ16S解析を実施しました。

表4 16S rRNA遺伝子を対象にしたメタ16S解析

| 学名 | NBRC 番号 | 理想値 (%) | BK1903D01 V1V2領域 (%)* | BK1903D01 V3V4領域 (%)* |
|--|---------------------|------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> | 13719 ^T | 10.5 | 9.6±0.5 | 9.2±0.4 |
| <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> | 113353 | 5.3 | 5.4±0.8 | 6.2±0.4 |
| <i>Clostridium butyricum</i> | 13949 ^T | 11.6 | 13.4±0.5 | 16.2±1.5 |
| <i>Corynebacterium striatum</i> | 15291 ^T | 4.2 | 3.3±0.1 | 3.5±0.1 |
| <i>Cutibacterium acnes</i> subsp. <i>acnes</i> | 107605 ^T | 3.2 | 2.9±0.1 | 0.1±0.0 |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> | 3202 ^T | 8.4 | 7.5±0.4 | 9.1±0.3 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 100911 ^T | 6.3 | 6.6±0.4 | 6.1±0.2 |
| <i>Streptococcus mutans</i> | 13955 ^T | 5.3 | 6.6±0.4 | 4.5±0.3 |
| <i>Acinetobacter radioresistens</i> | 102413 ^T | 6.3 | 6.4±0.4 | 6.8±0.0 |
| <i>Bacterioides uniformis</i> | 113350 | 4.2 | 6.3±0.3 | 6.7±0.2 |
| <i>Enterocloster clostridioformis</i> | 113352 | 5.3 | 2.7±0.1 | 6.5±0.3 |
| <i>Comamonas terrigena</i> | 13299 ^T | 7.4 | 6.8±0.7 | 3.9±0.1 |
| <i>Escherichia coli</i> (K-12株) | 3301 | 7.4 | 6.8±0.3 | 7.3±0.1 |
| <i>Parabacteroides distasonis</i> | 113806 | 7.4 | 6.8±0.4 | 6.9±0.1 |
| <i>Pseudomonas putida</i> | 14164 ^T | 7.4 | 9.1±0.4 | 6.9±0.2 |

理想値は16S rRNA遺伝子のコピー数の割合を表す。

※：記号上に続く数は、各領域におけるメタ16S解析で解析した検出割合の標本標準偏差 (n=3) を表す。

V1V2領域の解析に使用したプライマー：27Fmod (5'- AGRGTTTGATYMTGGCTCAG -3'),

338R (5'- TGCTGCCTCCCGTAGGAGT -3')

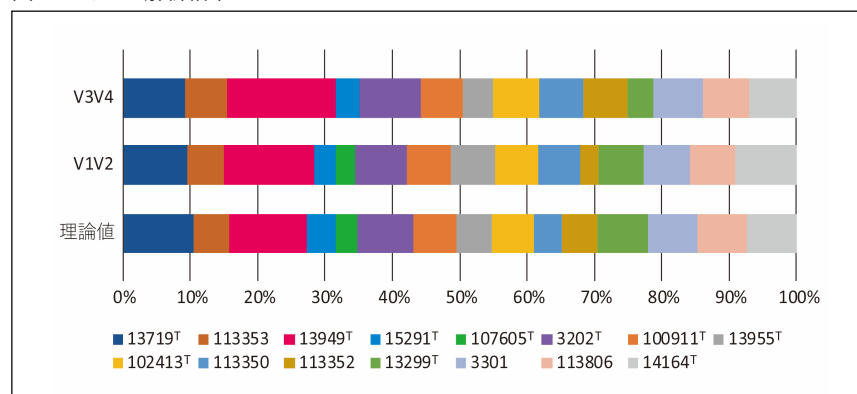
(Kim SW et al., DNA Res., (2013) 20:241-253)

V3V4領域の解析に使用したプライマー：Bakt_341F (5'- CCTACGGGNGGCWGCAG -3'),

Bakt_805R (5'- GACTACHVGGGTATCTAATCC -3')

(Herlemann DPR et al., ISME J., (2011) 5:1571-1579)

図2 メタ16S解析結果



4. 取り扱いの注意事項

- 別紙の、NBRC微生物カクテルの提供と使用に関する同意書 (以下同意書) を必ず一読し、同意書に定める利用条件に従い本製品をご使用ください。
- 利用者は、本製品をヒト (治療、診断、飲食物、その他) に直接使用しないでください。
- 本製品は、生物又は生体物質であり性質が変化すること、欠陥を持つ可能性や潜在的な危険性があることを認識し、適切な設備のもと知識および技術のある方がお取り扱いください。
- 本製品から、複製物の作製をしないでください。
- 本製品を、有償で第三者に提供又は分与をしないでください。また、同意書の利用条件に違反しない限り、本製品を第三者にご利用いただくことができます。この場合、利用者は第三者に同意書の内容を厳守してもらい、責任は利用者にかかります。
- 利用者は、本製品の利用により得られた成果を公表する場合には、NBRCから本製品の提供を受けた旨を公表データに記載し、公表後にNBRCにその情報をお知らせください。
- 本製品を同意書等に基づいて、商業的に利用した場合は、実施後NBRCにその情報をお知らせください。(事前にNBRCが認めた場合は除く。)
- 提供した本製品が雑菌混入などNBRCの責任による不具合の場合は、原則として発送後60日以内に連絡をいただければ、同一NBRC微生物カクテル又はそれに相当するNBRC微生物カクテルを1回に限り無償で利用者へ送付いたします。
- 再凍結をすると菌株が劣化します。その場合の品質の保証はいたしかねます。

お問い合わせ先

独立行政法人 製品評価技術基盤機構 (NITE)
 バイオテクノロジーセンター (NBRC) 生物資源利用促進課 (NBRC微生物カクテル担当)
 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足 2-5-8
 TEL.0438-20-5763 FAX.0438-52-2329 ✉ mock@nite.go.jp