

## 当社での糞便からの DNA 抽出方法

腸内フローラ解析において DNA 抽出法の選択は、結果に重要な影響を及ぼします。DNA 抽出方法は、大きく溶菌と精製の工程があり、溶菌工程では化学処理と組み合わせたビーズ破砕法を代表とする物理処理または酵素処理が用いられており、精製工程では磁気ビーズ法、スピニング法またはフェノールクロロホルム法が用いられています。当社では凍結糞便や保存液に懸濁した糞便からの DNA 抽出法にグアニジン溶液の使用とビーズ破砕法を採用することにより、溶菌効率の低い *Bifidobacterium* 属や *Clostridium* 属を代表とするグラム陽性細菌の検出率を高めた方法となっています（図 1）。

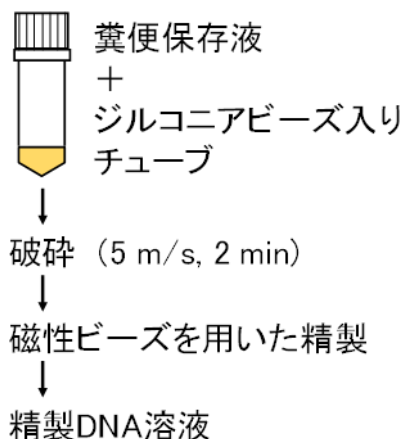


図 1. 当社で実施している DNA 抽出・精製法

当社保存液入りの採便キットを使用した検体からの DNA 抽出は、保存液に含まれるグアニジン塩などの作用により採便後の保存時においても酵素の不活化と溶菌が進行することから、室温で保管しても糞便採取時の菌叢維持の一助になっています。得られた抽出 DNA は、T-RFLP 法や次世代シーケンサーを用いたアンプリコン解析に広く使用可能です。またショットガンメタゲノム解析でも使用例があります。

当社保存液入りの採便容器からの DNA 抽出の注意点として、当社推奨とは異なる抽出方法や試薬などを採用した場合、例えば抽出作業の初期に遠心により糞便と上清を分離し、上清を除くという作業をした場合には、グアニジン溶液の作用により保存液中に溶菌した微生物由来の DNA が沈降せずに除かれることに留意する必要があります（Hosomi et al., *Scientific Reports* 2017）。また、その他酵素や試薬との相性などがあることも解っています。当社では、以下の表 1 に示すキットで、遠心をせずに保存液に懸濁した糞便から PCR 増幅可能な DNA が抽出できることを確認しております。各キットを使用することで得られる微生物の存在割合が微妙に異なるため、同じ試験系では同一のキットを使用することをお勧めします。

保存液入り採便容器の使用上の注意点として、保存液に対して便の量が多すぎた場合、一部の菌の増殖を抑えきれない可能性があることから（Hosomi et al., *Scientific Reports* 2017）、スプーンタイプの採便容器では 0.1 g 以下の便を採取して頂くこと、採取後室温で 1 週間以内に冷蔵保管して頂くことを当社では推奨します。

表 1. 保存液入り採便容器から遠心せずに DNA 抽出が行えることを確認した DNA 抽出キット

キット名	メーカー
MORA-EXTRACT	Kyokuto Pharmaceutical, Tokyo, Japan
ISOSPIN Fecal DNA	Nippon Gene, Toyama, Japan
ISOIL for Beads Beating	Nippon Gene, Toyama, Japan
NucleoSpin DNA Stool	MACHERY-NAGEL, France
PowerFecal DNA Isolation Kit	MO BIO Laboratories, USA
PowerSoil DNA Isolation Kit	MO BIO Laboratories, USA

・ 保存液入り糞便検体からの DNA 抽出時、遠心後に上清除去をすると菌叢が変化するため、糞便懸濁液からの抽出を推奨しています。