

リアルタイム PCR 解析報告書

シリアル番号 XXXXXxx
管理番号 SIID 00000
作業完了日 202x 年 xx 月 xx 日
発行日 202x 年 xx 月 xx 日

極秘資料

本報告書の使用にあたっての確認事項

1. 本報告書は株式会社テクノスルガ・ラボ 技術責任者による承認済みです。
2. 研究発表（論文投稿）や特許明細書への転用を除き、本報告書の一部または全部をそのままあるいは改変して第三者へ転用などされた場合には、株式会社テクノスルガ・ラボは一切の責任を負いかねます。
3. 当社受託サービス等は、試験・研究用途を目的として販売しております。当社受託サービスを医療や臨床診断などの試験・研究目的以外へご使用される場合、これに起因する損失・損害等については、当社では一切の責任を負いかねます。

技術責任者

印

株式会社テクノスルガ・ラボ 研究センター 技術部

〒424-0065 静岡県静岡市清水区長崎 388 番地の 1

TEL : 054-349-6211 FAX : 054-349-6121

Mail : tsl-contact@tecsrg.co.jp

検体情報

[illegible]

備考

目的

リアルタイム PCR 法をもちいて、検体に含まれる標的遺伝子のコピー数を推定します。

方法

1. DNA 抽出

- 抽出方法 Takahashi et al.¹⁾
精製:PI-480 および NR-201 (Kurabo Industries, Japan)
細胞破碎装置: Precellys Evolution (Bertin Instruments, FRA)
- 吸光度測定^{補足 1)} NanoDrop ND8000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
DNA 濃度 (ng/μL)、DNA 純度 (A260/A280)

2. PCR 条件

- プライマー 341f - 534r (全真正細菌 16S rDNA)²⁾
Bif LM 26F - Bif 228R (*Bifidobacterium* 属 16S rDNA)³⁾
Cperf 165F - Cperf 269R (*Clostridium perfringens* 16S rDNA)⁴⁾
- スタンダード¹⁾ *Escherichia coli* JCM 1649^T
(全真正細菌 16S rDNA コピー数測定用)
B. longum subsp. *longum* JCM 1217^T
(*Bifidobacterium* 属 16S rDNA コピー数測定用)
C. perfringens JCM 1290^T
(*C. perfringens* 16S rDNA コピー数測定用)
- キット Clostridium cluster IV Detection Kit (TechnoSuruga Laboratory, Japan)
Bacteroides Detection Kit (TechnoSuruga Laboratory, Japan)

3. リアルタイム PCR

- 試薬 TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)(Takara Bio, Japan)
- 装置 Rotor-Gene Q (QIAGEN, DEU)

* 会社名、製品名は一般に各社の日本および各国での商標または登録商標です

結果

検体に含まれる標的遺伝子のコピー数を表 1 に、各検体の定量下限値を表 2 に示しました。

表 1. 検体 1 g あたりの標的遺伝子のコピー数

	全真正細菌 16S rRNA	<i>Bifidobacterium</i> 属 16S rRNA	<i>Bacteroides</i> 属 16S rRNA
SIID00000-01	2.05×10^{12}	4.38×10^{11}	1.54×10^{11}
SIID00000-02	7.71×10^{11}	7.37×10^{10}	1.12×10^{11}

	<i>Clostridium</i> cluster IV 16S rRNA	<i>C. perfringens</i> 16S rRNA
SIID00000-01	3.38×10^{11}	4.38×10^6
SIID00000-02	1.59×10^{11}	定量下限値以下

反復数 : duplicate、ばらつき : $\sigma < 0.5^5$

スタンダードの相関係数 : $R^2 \geq 0.990$

表 2. 検体の定量下限値 (copies/g)

SIID	定量下限値
SIID00000-01	1.25×10^6
SIID00000-02	2.50×10^6

定量下限値は使用した検体量、抽出 DNA 量、DNA 希釈倍率から算出されるため、検体により異なります。

本報告書に付随する電子データ一覧

データ内容	形式
リアルタイム PCR 結果表	Excel
抽出 DNA の濃度、純度 ^{補足 1)}	Excel

補足

1. 吸光測定により得られる DNA 濃度および純度は、夾雑物による影響があることから、付随する電子データにて報告する値はおおまかな指標になります。
2. リアルタイム PCR 法は対象を限定した菌叢解析においては、感度、精度、信頼性ともに他の解析法より優れた手法であるといわれています⁹⁾。一方、各遺伝子は、細菌種により保有している量 (コピー数) が異なるため、各遺伝子のコピー数の割合が実際の細菌数の割合と等しいわけではない点を考慮すべきであると考えられています⁶⁻⁸⁾。現在までにゲノム解析が終了している解析対象菌群の標的遺伝子のコピー数を補足表に示します⁹⁻¹³⁾。
3. 本報告書に関するご質問等につきましては、株式会社テクノスルガ・ラボ 技術部までお問い合わせください。

補足表.

標的菌群	標的遺伝子	コピー数
全細菌	16S rRNA	1-17
<i>Bifidobacterium</i> 属	16S rRNA	2-5
<i>Bacteroides</i> 属	16S rRNA	3-7
<i>Clostridium</i> cluster IV	16S rRNA	2-4
<i>C. perfringens</i>	16S rRNA	8-10

引用文献

- 1) **Takahashi S, Tomita J, Nishioka K, Hisada T, Nishijima M.** Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of *Bacteria* and *Archaea* using next-generation sequencing. *PLoS One* 2014;9:e105592.
- 2) **Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG.** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:695–700.
- 3) **Gueimonde M, Tolkko S, Korpimäki T, Salminen S.** New real-time quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in human fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:4165–4169.
- 4) **Takahashi S, Yoshida Y, Nakanishi N, Tsukahara T, Ushida K.** Quantitative real-time PCR monitoring of *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* with oral administration of *Lactobacillus plantarum* strain Lq80 to weaning piglets. *Anim Sci J* 2008;79:737–744.
- 5) **Nolan T, Hands RE, Bustin SA.** Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 2006;1:1559–1582.
- 6) **Nakayama J, Tanaka S, Songjinda P, Tateyama A, Tsubouchi M et al.** Analysis of infant intestinal microbiota by various kinds of molecular approaches -Toward large scale epidemiological investigations correlating allergy development with intestinal microbiota-. *J Intestinal Microbiol* 2007;21:129–142.
- 7) **Farrelly V, Rainey FA, Stackebrandt E.** Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:2798–2801.
- 8) **Fogel G, Collins C, Li J, Brunk C.** Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microb Ecol* 1999;38:93–113.
- 9) **Klappenbach JA, Dunbar JM, Schmidt TM.** rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:1328–1333.
- 10) **Case RJ, Boucher Y, Dahllof I, Holmstrom C, Doolittle WF et al.** Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:278–288.
- 11) **Lee ZM, Bussema C, 3rd, Schmidt TM.** *rrnDB*: documenting the number of rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Res* 2009;37:D489–493.
- 12) **KEGG Organisms: Complete Genomes:** http://www.genome.jp/kegg/catalog/org_list.html
- 13) ***rrnDB*:** <http://rrndb.umms.med.umich.edu/>