

細菌 Standard-500 報告書(考察付)

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。当社受託サービス等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 : 054-349-6155 FAX : 054-349-6121

Mail : tsl-contact@tecsrg.co.jp



検体情報

[illegible]

--

目的

形態観察および 16S rDNA (16S rRNA 遺伝子) の塩基配列解析の結果から、検体の帰属分類群を推定します。

方法

1. 培養条件

- ・ 培地 アキュディア トリプトソーヤ寒天培地 顆粒 (Shimadzu Diagnostics Corporation, Japan)
- ・ 培養温度 30°C
- ・ 培養確認時間 24 時間
- ・ その他条件 好気培養

2. 形態観察

- ・ グラム染色 フェイバーG「ニッスイ」(Nissui Pharmaceutical, Japan)
- ・ 光学顕微鏡 BX50F4 (Olympus, Japan)
- ・ 実体顕微鏡 SMZ800N (Nikon, Japan)

3. 16S rDNA 塩基配列解析

- ・ DNA 抽出 シカジーニアス DNA 抽出試薬 ST (Kanto Chemical, Japan)
- ・ PCR 増幅 Tks Gflex DNA Polymerase (Takara Bio, Japan)
- ・ サイクルシーケンス BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)
- ・ 使用プライマー¹⁾ PCR 増幅: 9F, 1406R
シーケンス (約 500 bp): 9F, 536R
- ・ シーケンス ABI PRISM 3500xL Genetic Analyzer System (Applied Biosystems)
- ・ 塩基配列決定 ChromasPro 2.1 (Technelysium, AUS)
- ・ BLAST 相同性検索²⁾ 解析ソフトウェア: ENKI v3.3 (TechnoSuruga Laboratory, Japan)
データベース
DB-BA18.0 (TechnoSuruga Laboratory)
国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA/GenBank)
検索日: 202x 年 xx 月 xx 日
- ・ 簡易分子系統解析 系統樹の推定: 近隣結合法³⁾
塩基置換モデル: Kimura-2-parameter⁴⁾
樹形の信頼性評価: ブートストラップ法⁵⁾ (1,000 反復)

* 塩基配列は、シーケンサーからの生データ (エレクトロフェログラム) を当社技術者が目視により確認し、修正を行った後に決定しています。

* 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・考察

1. SIID00000

表 1-1. 形態観察結果：SIID00000

細胞形態	桿菌 ($0.8 \times 1.0\text{-}3.0\ \mu\text{m}$)
グラム染色性	+
芽胞形成	+
コロニー色調	淡黄色
培養条件	培地：アキュディア トリプトソーヤ寒天培地 顆粒 (Shimadzu Diagnostics Corporation, Japan) 30°C、24 時間、好気培養

＋：陽性、－：陰性

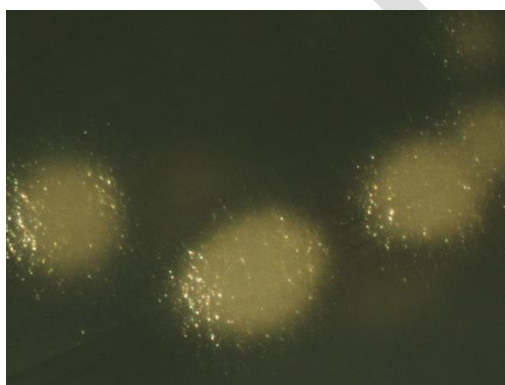


図 1-1. SIID00000 のコロニー像

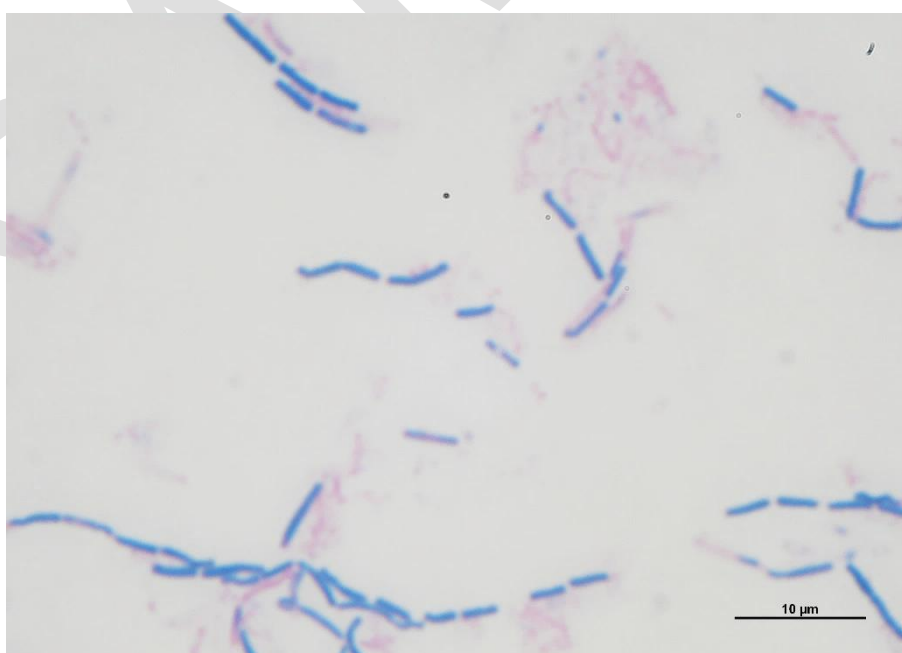


図 1-2. SIID00000 のグラム染色像

表 1-2. SIID00000 の DB-BA に対する BLAST 検索結果
相同性スコアで上位 30 に検索された 16S rDNA 塩基配列データ

	登録名	株名	Accession No.	相同率	BSL
1	<i>Bacillus licheniformis</i>	DSM13	AE017333	443/443 (100.0%)	
2	<i>Bacillus haynesii</i>	NRRLB-41327	MRBL01000076	436/440 (99.1%)	
3	<i>Bacillus aerius</i>	24K	AJ831843	429/431 (99.5%)	
4	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	KJ-16	KY694465	432/440 (98.2%)	
5	<i>Bacillus szezeyi</i>	CCUG70177	MRBK01000096	428/440 (97.3%)	
6	<i>Bacillus sonorensis</i>	BCRC17416	EF433411	414/418 (99.0%)	
7	<i>Bacillus nakamurai</i>	CCUG68786	KU836854	428/440 (97.3%)	
8	<i>Bacillus cabrialesii</i>	TE3	MK462260	429/442 (97.1%)	
9	<i>Bacillus stercoris</i>	D7XPN1	MN536904	427/440 (97.0%)	
10	<i>Bacillus inaquosorum</i>	DSM22148	AMXN01000021	427/440 (97.0%)	
11	<i>Bacillus spizizenii</i>	DSM15029	MN536905	426/440 (96.8%)	
12	<i>Bacillus siamensis</i>	PD-A10	GQ281299	425/439 (96.8%)	
13	<i>Bacillus halotolerans</i>	DSM8802	AM747812	423/437 (96.8%)	
14	<i>Bacillus vallismortis</i>	DSM11031	AB021198	421/435 (96.8%)	
15	<i>Bacillus mojaviensis</i>	IFO15718	AB021191	418/431 (97.0%)	
16	<i>Bacillus subtilis</i>	DSM10	AJ276351	416/430 (96.7%)	
17	<i>Bacillus atrophaeus</i>	JCM9070	AB021181	407/420 (96.9%)	
18	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NBRC15535	AB255669	407/420 (96.9%)	
19	<i>Bacillus tequilensis</i>	10b	HQ223107	410/426 (96.2%)	
20	<i>Bacillus xiamenensis</i>	MCCC1A00008	JX680066	417/440 (94.8%)	
21	<i>Bacillus stratosphericus</i>	41KF2a	AJ831841	416/439 (94.8%)	
22	<i>Bacillus aerophilus</i>	28K	AJ831844	416/439 (94.8%)	
23	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	MCCC1A08372	JX680133	415/440 (94.3%)	
24	<i>Bacillus australimaris</i>	MCCC1A05787	JX680098	415/440 (94.3%)	
25	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	AY603658	398/413 (96.4%)	
26	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	AJ831842	403/426 (94.6%)	
27	<i>Bacillus acidicola</i>	105-2	AF547209	415/445 (93.3%)	
28	<i>Bacillus capparidis</i>	EGI6500252	KY003162	412/442 (93.2%)	
29	<i>Bacillus aquimaris</i>	TF-12	AF483625	396/420 (94.3%)	
30	<i>Cytobacillus firmus</i>	NCIMB9366	X60616	409/442 (92.5%)	

注 1) BSL (バイオセーフティレベル) はレベル 1* (日和見病原体) 以上を表記し、空欄はレベル 1 を意味します (参照 補足 7)。

注 2) 株名中の “_ (アンダーバー)” は、スペースを意味します。

注 3) 網掛けは、簡易分子系統解析に供した配列データを示します。

表 1-3. SIID00000 の国際塩基配列データベースに対する BLAST 検索結果
相同性スコアで上位 30 に検索された 16S rDNA 塩基配列データ

登録名	株名	Accession No.	相同率
Bacillus licheniformis	P8_B2	CP045814	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	ATCC 14580	CP034569	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	PB3	CP025226	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	MT-B06	CP032538	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	TAB7	CP027789	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	SRCM103583	CP035404	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	SRCM103608	CP035405	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	SRCM103529	CP035228	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	NCTC10341	LR134392	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	0DA23-1	CP031126	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	-	LR698983	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	14ADL4	CP026673	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	ATCC 9789	CP023729	443/443 (100.0%)
Bacillus sp.	1s-1	CP022874	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	BL-010	CP022477	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	SRCM100027	CP021677	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	SRCM100141	CP021669	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	SCCB 37	CP014794	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	SCDB 34	CP014793	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	SCDB 14	CP014842	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	SCK B11	CP014795	443/443 (100.0%)
Bacillus sp.	H15-1	CP018249	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	CP6	CP049330	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	LBMAE-JZ-B3	MK373278	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	H2	CP065943	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	FDAARGOS_923	CP065647	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	LCDD6	CP065029	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	OK12	CP060498	443/443 (100.0%)
Bacillus licheniformis	KS28	CP043490	443/443 (100.0%)
Bacillus sp.	PAMC28748	CP060192	443/443 (100.0%)

| 0.01 |

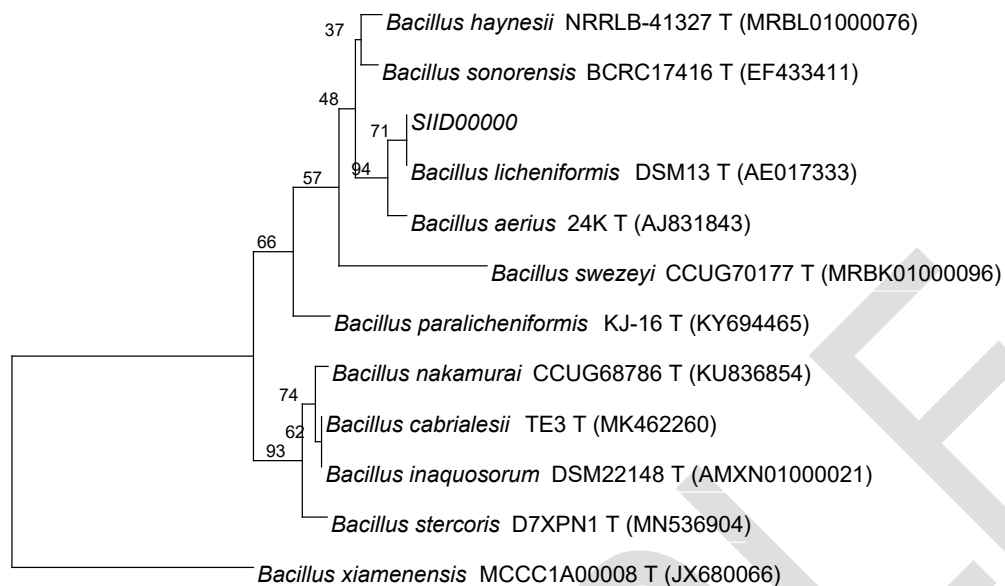


図 1-3. SIID00000 の 16S rDNA 塩基配列に基づく簡易分子系統樹
 左上の線はスケールバー、系統枝の分岐に位置する数字はブートストラップ値、
 株名の末尾の T はその種の基準株 (Type strain)、BSL はバイオセーフティレベル (BSL1*(日和見
 病原体) 以上を表記) を示します。

SIID00000

形態観察の結果: 表 1-1, 図 1-1, 1-2			
気相条件・グラム染色性・細胞形態			コロニー色調
好気条件下で生育を示すグラム陽性桿菌			淡黄色
BLAST 検索により最も高い相同性を示した基準株の相同率: 表 1-2, 1-3			相同率 (%)
登録名	株名	Accession No.	
<i>Bacillus licheniformis</i>	DSM 13	AE017333	100
考 察			
DB-BA に対する相同性検索で得られた塩基配列を基に解析した分子系統樹において、SIID00000 は <i>Bacillus</i> 属が構成するクラスター内に含まれ <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13^T (AE017333) と同一の分子系統学的位置を示しました (図 1)。 よって、今回の解析結果からは、検体は <i>B. licheniformis</i> に帰属すると考えます。 また、簡易形態観察の結果と 16S rDNA 塩基配列解析の結果は、一致していると考えられます。			
同定結果			
<i>Bacillus licheniformis</i>			

まとめ

検体名	SIID	帰属分類群	バイオセーフティ レベル
SAMPLE	00000	<i>Bacillus licheniformis</i>	レベル 1

バイオセーフティレベルについて（日本細菌学会バイオセーフティ指針より）

レベル	内容
1	ヒトに疾病を起こし、或いは動物に獣医学的に重要な疾患を起こす可能性のないもの (日和見感染を含む)
2	ヒト或いは動物に病原性を有するが、実験室職員、地域社会、家畜、環境等に対し、重大な災害とならないもの、実験室内で曝露されると重篤な感染を起こす可能性はあるが、有効な治療法、予防法があり、伝播の可能性は低いもの。
3	ヒトに感染すると重篤な疾病を起こすが、他の個体への伝播の可能性は低いもの。

検体の近縁となった既知種の分離源情報

SIID00000

近縁菌種	<i>Bacillus licheniformis</i>
分離源	土壌、海水、食品、香辛料、コンポスト、羊のルーメン など
引用文献	Colin R. Harwood (1989). Isolation and identification of aerobic endospore-forming bacteria. In <i>Bacillus / Biotechnology Handbooks</i> , Volume 2, pp27-56, Plenum Press, New York.
BSL	レベル 1
備考	

本報告書に付随する電子データ一覧

データ内容	形式
塩基配列テキストファイル	txt
エレクトロフェログラム	ab1
写真	JPG

補足

1. 本報告書で示す検体の同定結果は、16S rDNA 塩基配列解析に基づき推定された帰属分類群です。分類学に基づく同定（最終的な種の異同の決定）には、形態観察や生理・生化学性状試験、DNA 塩基配列に基づく分子系統解析、化学的性状試験、DNA-DNA ハイブリッド形成試験などの試験結果から総合的に判断することが重要です。
2. 細菌の同定では、分類の基準となる基準株（種・亜種の命名基準）と比較することが重要とされています。本報告書では、各菌種・亜種の基準株の 16S rDNA 塩基配列との比較および解析の結果から、検体の帰属分類群を推定しています。
3. 本報告書で示す学名（菌種）に関する情報は、以下のウェブサイトにてご確認ください。
LPSN-List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (<http://www.bacterio.net/>)
4. DB-BA は、弊社と国立遺伝学研究所との共同開発品です。分類学的に細菌の同定を行う際は基準株との比較を行うことが重要であることから、当データベースは基準株に由来する 16S rDNA 塩基配列データのみを収録しています。
5. 国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA/GenBank) に対する相同性検索の結果は、検索を実施した時点の情報です。国際塩基配列データベースの登録情報は常に更新されており、論文などを投稿する前には、再度相同性検索することをお勧めします。
6. 簡易分子系統解析は、論文などの投稿を前提としたアライメント結果の編集および系統樹の作成は行っておりません。
7. 本報告書で示すバイオセーフティレベル (BSL) は、日本細菌学会バイオセーフティ指針「病原細菌の BSL レベル」に従います。BSL はレベル 1 が最も低いものの、レベル 1 であっても日和見感染が報告されている種があり、その安全性を保障するものではありません。また、検体の帰属種または近縁種の BSL がレベル 2 以上である場合には、検体は同等の取扱いをされることをお勧めします。なお、本報告書では、日和見病原体については「BSL1*」と表記しています。
8. 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。

引用文献

- 1) 中川恭好, 川崎浩子. 遺伝子解析法 16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定法. 日本放線菌学会編集. 放線菌の分類と同定. 東京: 日本学会事務センター; 2001. pp. 88–117.
- 2) Altschul SF, Madden TF, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389–3402.
- 3) Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406–425.
- 4) Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;16:111–120.
- 5) Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;39:783–791.