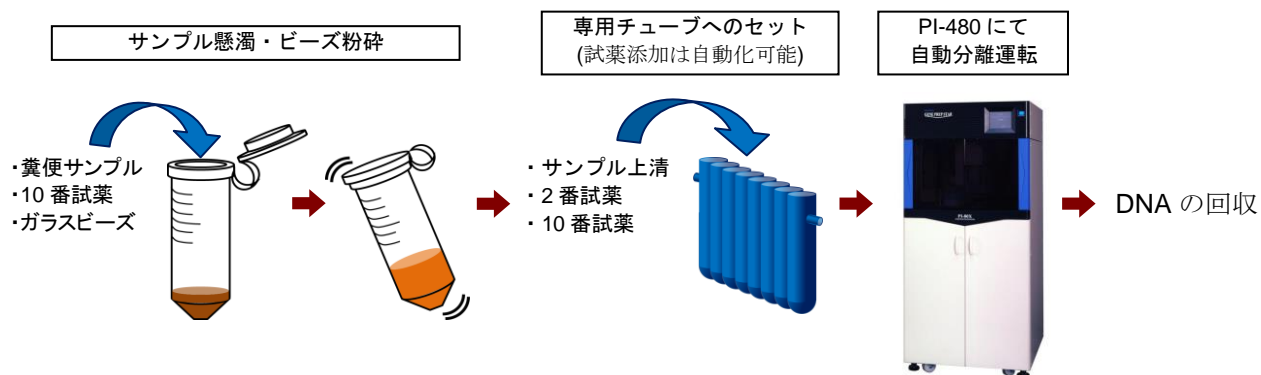


PI-480 組織 DNA プロトコール

糞便からの DNA 分離精製 / 16S rDNA メタゲノム解析

~ Automated DNA extraction from Stool / 16S-rDNA metagenomic analysis ~

本データでは、糞便サンプルからの DNA 分離精製実績を示します。



実 験

サンプル	糞便 (採便キットにて採取・保存)
サンプル量	40 mg / 200 µl (採便キット保存液に懸濁)
採便キット	株式会社 テクノスルガ・ラボ 採便キット (保存液あり)
サンプルセット数	最大 48 サンプル / 1 回
分離システム	DNA 自動分離装置 GENE PREP STAR PI-480 組織 DNA 分離プロトコール
試薬キット と消耗品	組織 DNA キット (NR-201) サンプルチューブ (PT-8000)、DNA 回収チューブ (NT-8000)
分離精製原理	サンプル溶解 : ビーズ粉碎及び Proteinase K による消化 精 製 : フェノール系試薬による蛋白変性 D N A 回 収 : アルコール (エタノール) による DNA 沈澱

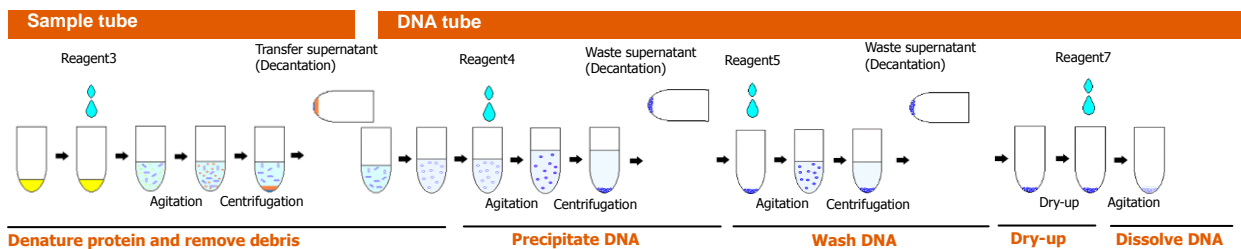
分離操作

- (1) 糞便懸濁液 200 μ l に 0.1 mm ガラスビーズ 0.5 g、及び 10 番試薬 (NR-10025) 300 μ l を添加する。
- (2) ビーズ粉砕機にて粉砕する (4800 rpm, 50 秒間)。
- (3) 遠心 (12000 rpm, 5 分間)
- (4) サンプル上清 (約 200 μ l) を 8 連サンプルチューブ (PT-8000) に移液する。
- (5) (4) のチューブに 2 番試薬 (NR-2025, +Proteinase K 0.4 mg/ml) 150 μ l、及び 10 番試薬 (NR-10025) 150 μ l を添加する。
- (6) サンプルチューブ及び回収用の DNA チューブを PI-480 装置にセットして分離運転を開始する。
 ※以降、PI-480 標準の動物 DNA プロトコールに準じて処理を実施。
- (7) 分離後、DNA 溶液を保存チューブに移し、遠心 (12000 rpm, 5 分間, 4°C) する。
- (8) 上清のみを冷凍保存 (-30°C)、または解析に使用する。

PI-480 による自動分離運転工程

- Step 1. 蛋白変性と不純物除去
- Step 2. DNA 沈澱
- Step 3. DNA 洗浄
- Step 4. 乾燥
- Step 5. DNA 溶解試薬による DNA の溶解
 溶解液量 100 μ l

組織 DNA プロトコールのワークフロー



分析方法

- 収量と純度** : 分光光度計により各々の DNA 溶液の 260 nm の吸光度を測定。
 ・ DNA 収量は「A260 x 50 x 希釈率 x 最終溶解量」にて算出。
 ・ DNA 純度は A260 / A280 の値より確認。
- 電気泳動** : 各 5 μ l の DNA 溶液を 1.5 % agarose gel にて電気泳動。
- PCR** : 16S 遺伝子の V3-V4 領域を増幅するプライマーを用いて検出。
 Forward; 5' - TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGCGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG - 3'
 Reverse; 5' - GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC - 3'
- 16S rDNA メタゲノム解析**
 : シークエンスは Illumina 社の Miseq、データ解析は同社のクラウドサービス (Basespace) を使用。

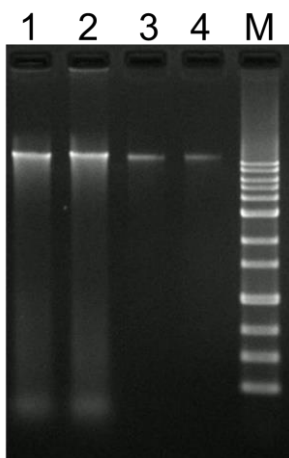
結果

収量と純度

条件	No.	A260/A280	DNA 濃度 (ng/ μ l)
KURABO PI-480	1	1.84	50.6
	2	1.82	52.0
A 社 糞便 DNA 抽出キット	3	1.58	10.0
	4	1.93	9.9

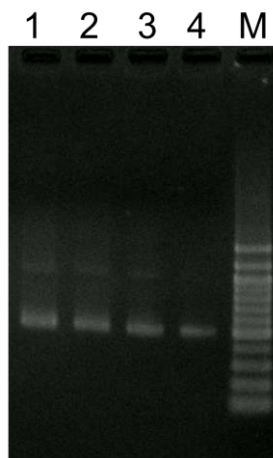
※同一の採便キットで採取・保存した糞便を用い、手作業で DNA を分離。

電気泳動



M: 1 kb DNA Ladder One (ナカライテスク)

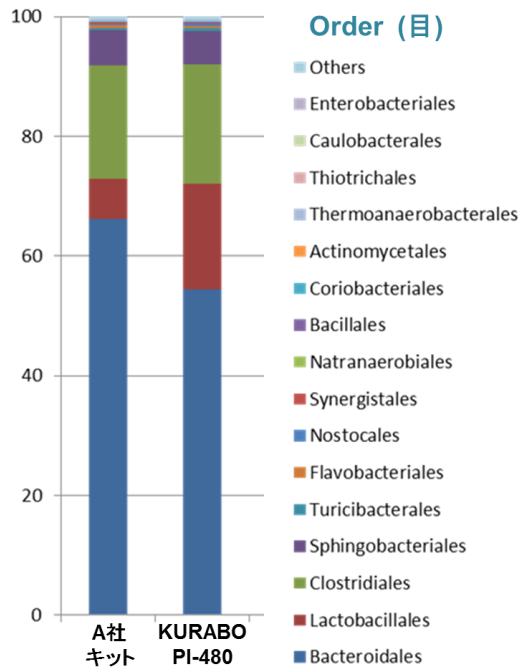
PCR 結果



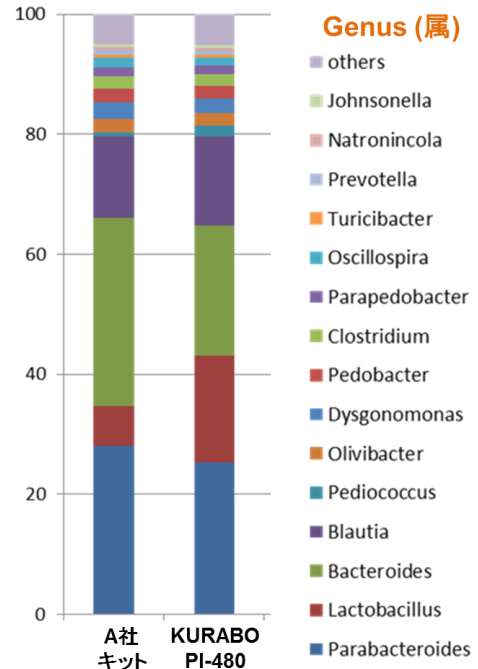
M: 100 bp DNA Ladder One (ナカライテスク)

16S rDNA メタゲノム解析

目レベルでの解析



属レベルでの解析



多様性指標の比較

	Shannon species diversity	菌種数
KURABO PI-480	2.130	266
A社キット	1.973	214

考察

分光光度測定、及び電気泳動の結果より、PI-480 を用いて糞便サンプルから高分子の DNA を分離精製することができました。また、分離された DNA は PCR 及び 16S rDNA メタゲノム解析に使用できる品質でした。糞便 DNA 抽出専用の他社製品と比較しても、PI-480 で分離した DNA は高収量で、菌叢の多様性の指標となる Shannon species diversity が高く、多くの菌種を同定できるという結果でした。

※実際に使用されるサンプルの状態や分離条件によっては、同様の結果を得られない可能性があります。

データ協力

本データは、

国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 ワクチンマテリアルプロジェクト

プロジェクトリーダー 國澤純 様

特任研究員 細見晃司 様

のご厚意によりご提供いただきました。ここに深く感謝申し上げます。

製品情報

DNA 分離システム： DNA 自動分離装置 GENE PREP STAR PI-480、組織 DNA プロトコール

試薬キット： 組織 DNA 試薬キット NR-201

試薬名称	試薬番号	コード番号	内容量
プロティナーゼ溶解試薬	2	NR-2025	1
フェノール試薬	3	NR-3025	1
沈澱試薬	4	NR-4050	1
洗浄試薬	5	NR-5050	3
DNA 溶解試薬	7	NR-7025	1
組織用懸濁試薬	10	NR-10025	1

本資料に記載されている商品名は、各社の商標または登録商標です。

倉敷紡績株式会社

環境メカトロニクス事業部

バイオメディカル部

〒572-0823

大阪府寝屋川市下木田町 14-5

電話: 072-820-3079

Fax: 072-820-3095

bio@ad.kurabo.co.jp