

製品名 Cell-Mock-001

ロット番号 BK1912001

1. 仕様

- ・ 内容量 100 μL ※1 × 5本
- ・ 細胞数 1.1×10^9 cells/100 μL (フローサイトメーターによる測定)※2
- ・ 保存溶媒 15% glycerol in PBS (pH7.4)
- ・ 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株を使用し、それぞれの細胞数が等量となるよう混合したものです。

表1 Cell-Mock-001の作製に使用した微生物株※3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>Clostridium clostridioforme</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：容器には110 μL 程度入っています。※2：HPLCによる細胞数測定方法 (Tourlousse, D.M. et al. Microbiology Spectrum, 10(2): e01915-21.) では、 2.9×10^9 cells/100 μL となります。

※3：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 BK1912001)

2-1. DNA抽出結果

- ・ ビーズ法 (ISOSPIN Fecal DNA (ニッポンジーン社)) を用いて同一ロット内の18サンプルからDNA抽出を実施しました。破碎はFastPrep24 (MP-Bio社) を用い、6.0 m/s、60秒を3セットで行いました。
- ・ Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific社) を用いて抽出DNAの濃度を測定しました。

表2 BK1912001のDNA抽出量

DNA抽出量	
理論DNA量	ビーズ法※4
6.1 μg	$2.4 \pm 0.1 \mu\text{g}$

※4：記号±の数値は、DNA抽出量の実験標準偏差 (n=18) を表す。

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2-1.で抽出したDNA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18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	理論値 (%)	各株の検出割合 (%) ※5	同一ロット内での 均質性 (%) ※6
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	13719 ^T	6.7	6.8 ± 0.2	1.0
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	113353	6.7	9.3 ± 0.5	1.8
<i>Clostridium butyricum</i>	13949 ^T	6.7	7.7 ± 0.2	0.9
<i>Corynebacterium striatum</i>	15291 ^T	6.7	7.3 ± 0.3	1.0
<i>Cutibacterium acnes</i> subsp. <i>acnes</i>	107605 ^T	6.7	14.2 ± 0.4	1.3
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	3202 ^T	6.7	10.3 ± 0.5	1.9
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100911 ^T	6.7	5.4 ± 0.2	0.9
<i>Streptococcus mutans</i>	13955 ^T	6.7	6.7 ± 0.2	0.9
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	102413 ^T	6.7	6.5 ± 0.2	0.7
<i>Bacteroides uniformis</i>	113350	6.7	3.6 ± 0.1	0.5
<i>Clostridium clostridioforme</i>	113352	6.7	3.6 ± 0.1	0.4
<i>Comamonas terrigena</i>	13299 ^T	6.7	5.8 ± 0.4	1.6
<i>Escherichia coli</i> (K-12株)	3301	6.7	3.5 ± 0.1	0.5
<i>Parabacteroides distasonis</i>	113806	6.7	5.2 ± 0.3	1.2
<i>Pseudomonas putida</i>	14164 ^T	6.7	4.2 ± 0.1	0.5

※5：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。

※6：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	理論値 (%)	BK1912001 V1V2領域 (%) *7	BK1912001 V3V4領域 (%) *7
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	13719 ^T	10.5	12.1 ± 0.7	11.5 ± 0.6
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	113353	5.3	5.0 ± 0.6	7.0 ± 0.6
<i>Clostridium butyricum</i>	13949 ^T	11.6	16.7 ± 0.5	19.7 ± 1.7
<i>Corynebacterium striatum</i>	15291 ^T	4.2	4.9 ± 0.2	4.7 ± 0.4
<i>Cutibacterium acnes</i> subsp. <i>acnes</i>	107605 ^T	3.2	4.8 ± 0.3	0.2 ± 0.0
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	3202 ^T	8.4	9.0 ± 0.4	8.2 ± 0.9
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100911 ^T	6.3	5.7 ± 0.2	5.5 ± 0.3
<i>Streptococcus mutans</i>	13955 ^T	5.3	6.9 ± 0.5	6.6 ± 0.7
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	102413 ^T	6.3	7.0 ± 0.3	8.3 ± 0.6
<i>Bacteroides uniformis</i>	113350	4.2	2.8 ± 0.2	3.2 ± 0.2
<i>Enterocloster clostridioforme</i>	113352	5.3	2.8 ± 0.2	4.2 ± 0.4
<i>Comamonas terrigena</i>	13299 ^T	7.4	8.6 ± 0.5	5.3 ± 0.4
<i>Escherichia coli</i> (K-12株)	3301	7.4	3.3 ± 0.2	4.8 ± 0.3
<i>Parabacteroides distasonis</i>	113806	7.4	4.9 ± 0.2	5.3 ± 0.4
<i>Pseudomonas putida</i>	14164 ^T	7.4	5.5 ± 0.3	5.4 ± 0.3

理論値は16S rRNA遺伝子のコピー数の割合を表す。

*7 : 記号±の数値は、各領域におけるメタ16S解析で測定した検出割合の実験標準偏差 (n = 18) 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')

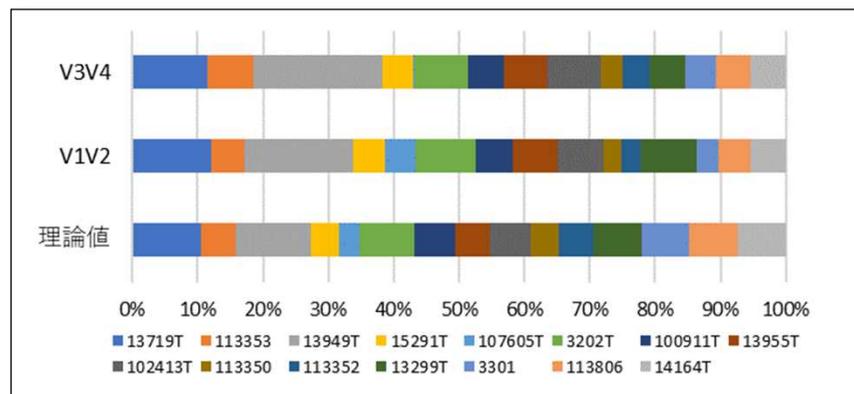
(Kim SW *et al.*, DNA Res., (2013) 20:241-253)

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 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