

製品名 Cell-Mock-002

ロット番号 210701KC

1. 仕様

- ・ 内容量 100 μ L \times 5本
- ・ 細胞数 3.7×10^9 cells/100 μ L
- ・ 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-002の作製に使用した微生物株^{※1}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>	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	28.7	11	1
<i>Corynebacterium striatum</i>	15291 ^T	陽性	3.1	59.1	4	1*
<i>Cutibacterium acnes</i> subsp. <i>acnes</i>	113869	陽性	2.6	60.0	3	1*
<i>Enterocloster clostridioformis</i>	113352	陽性	5.7	48.9	5	1*
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	3202	陽性	1.9	50.1	8	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	113846	陽性	2.5	32.1	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>Comamonas terrigena</i>	13299 ^T	陰性	4.7	65.0	7	1*
<i>Escherichia coli</i>	3301	陰性	4.8	50.8	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：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：210701KC)

2-1. DNA抽出結果

- ・ 日本マイクロバイオームコンソーシアム (JMBC) から公開されているSOP^{※2}に従い、本ロット内の6サンプルからビーズ法 (ISOSPIN Fecal DNA (ニッポンジーン社)) によるDNA抽出を行いました。
- ・ Quant-iTTM PicoGreenTM dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific社) を用いて濃度を測定しました。

表2 210701KCのDNA抽出量

DNA抽出量	
理論DNA量 ^{※3}	ビーズ法 ^{※4}
16.0 μ g	4.98 \pm 0.13 μ g

※2：<https://jmbc.life/news/images/2021.06.30.pdf>

※3：チューブ1本 (3.7×10^9 cells/100 μ L) に含まれるDNA量の理論値。

※4：ビーズ法にて抽出されたDNA濃度の平均と標準偏差 (n=6)。

2-2. 各株の検出割合

2-1.で抽出したDNA溶液を用いて、JMBCのSOPに従いシーケンスライブラリー調製を行い、MiSeqシステム (Illumina社) によるショットガンシーケンス解析を行いました。

表3 ショットガンシーケンス解析による15株の検出割合

学名	NBRC番号	理論値 (%)	各株の検出割合(%) ^{※5}
<i>Bacillus subtilis</i>	13719 ^T	6.7	7.6 \pm 0.0
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	113353	6.7	4.3 \pm 0.1
<i>Clostridium butyricum</i>	13949 ^T	6.7	7.5 \pm 0.1
<i>Corynebacterium striatum</i>	15291 ^T	6.7	7.6 \pm 0.1
<i>Cutibacterium acnes</i> subsp. <i>acnes</i>	113869	6.7	8.1 \pm 0.0
<i>Enterocloster clostridioformis</i>	113352	6.7	8.5 \pm 0.0
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	3202	6.7	6.5 \pm 0.2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	113846	6.7	5.1 \pm 0.0
<i>Streptococcus mutans</i>	13955 ^T	6.7	6.2 \pm 0.0
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	102413 ^T	6.7	6.6 \pm 0.0
<i>Bacteroides uniformis</i>	113350	6.7	6.3 \pm 0.1
<i>Comamonas terrigena</i>	13299 ^T	6.7	6.2 \pm 0.1
<i>Escherichia coli</i>	3301	6.7	7.0 \pm 0.0
<i>Parabacteroides distasonis</i>	113806	6.7	6.3 \pm 0.0
<i>Pseudomonas putida</i>	14164 ^T	6.7	6.2 \pm 0.0

※5：ショットガンシーケンス解析による各株の検出割合の平均と標準偏差 (n=3)。

3. 使用例

16S rRNA遺伝子の可変領域であるV1V2領域^{※6}とV4領域^{※7}を対象に、2-1.で抽出したDNA溶液を用いてMiSeqシステムによるメタ16S解析を行いました。

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 (%) ^{※8}	V1V2領域 (%) ^{※9}	V4領域 (%) ^{※9}
<i>Bacillus subtilis</i>	13719 ^T	10.5	9.2 ± 0.5	12.8 ± 0.8
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	113353	5.3	2.8 ± 0.3	3.9 ± 0.1
<i>Clostridium butyricum</i>	13949 ^T	11.6	16.2 ± 0.2	18.2 ± 0.5
<i>Corynebacterium striatum</i>	15291 ^T	4.2	5.0 ± 0.1	4.0 ± 0.3
<i>Cutibacterium acnes</i> subsp. <i>acnes</i>	113869	3.2	4.2 ± 0.3	0.7 ± 0.1
<i>Enterocloster clostridioformis</i>	113352	5.3	6.1 ± 0.1	6.9 ± 0.8
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	3202	8.4	4.6 ± 0.1	4.6 ± 0.3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	113846	6.3	3.9 ± 0.1	4.8 ± 0.2
<i>Streptococcus mutans</i>	13955 ^T	5.3	4.1 ± 0.1	4.9 ± 0.2
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	102413 ^T	6.3	5.8 ± 0.1	5.8 ± 0.2
<i>Bacteroides uniformis</i>	113350	4.2	4.7 ± 0.1	4.5 ± 0.2
<i>Comamonas terrigena</i>	13299 ^T	7.4	10.7 ± 0.6	8.3 ± 0.1
<i>Escherichia coli</i>	3301	7.4	7.1 ± 0.3	8.8 ± 0.5
<i>Parabacteroides distasonis</i>	113806	7.4	7.8 ± 0.1	2.9 ± 0.2
<i>Pseudomonas putida</i>	14164 ^T	7.4	7.8 ± 0.6	8.8 ± 0.5

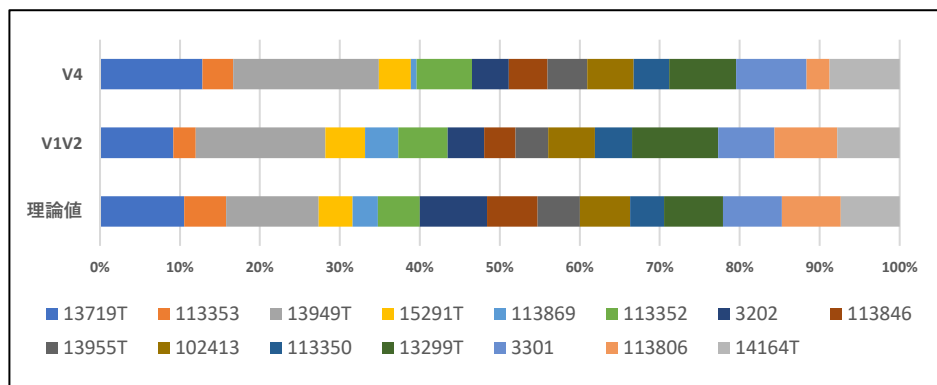
※6：V1V2領域のプライマー：27Fmod (5'- AGRGTTTGATYMTGGCTCAG -3'), 338R (5'- TGCTGCCTCCGTAGGAGT -3)
(Kim SW *et al.*, DNA Res., (2013) 20:241-253)

※7：V4領域のプライマー：515Fmod (5'- GTGYCAGCMGCGCGGTAA -3'), 806Rmod (5'- GGACTACNVGGGTWTCTAAT -3')
(Parada AE *et al.*, Environ. Microbiol., (2016) 18:1403-1414)
(Apprill A *et al.*, Aquat. Microb. Ecol., (2015) 75:129-137)

※8：16S rRNA遺伝子のコピー数の割合。

※9：メタ16S解析による各株の検出割合の平均と標準偏差 (n=6)。

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、生物又は生物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