データシート

NBRCヒト常在菌DNAカクテル（ NBRC Human Microbial DNA Cocktail）

製 品 名 **DNA-Mock-003**

ロット番号 **260501ND**

1. 仕様

・内容量　30 µL /本
・濃度　55.5 ng/µL
・保存溶媒　10 mM Tris-HCl (pH8.5)
・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、20株のゲノムDNAを使用し、それぞれのゲノムDNAのコピー数を等量となるように混合したものです。

表1　DNA-Mock-003の作製に使用した微生物株※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
Anaerostipes caccae	NBRC 114412	陽性	3.3	44.5	4	1
Bifidobacterium longum	NBRC 114370	陽性	2.6	60.1	5	1
Bifidobacterium longum subsp. *longum*	NBRC 114494	陽性	2.5	60.1	4	1
Blautia parvula	NBRC 113351^{T}	陽性	6.2	46.7	5	1*
Collinsella aerofaciens	NBRC 114504	陽性	2.3	60.3	5	1*
Enterocloster clostridioformis	NBRC 113352	陽性	5.7	48.9	5	1*
Flavonifractor plautii	NBRC 113805	陽性	4.3	60.3	3	1
Lactobacillus delbrueckii	NBRC 3202	陽性	1.9	50.1	8	1
Mediterraneibacter gnavus	NBRC 114413	陽性	3.8	42.5	5	1
Akkermansia muciniphila	NBRC 114322	陰性	2.8	55.7	3	1
Bacteroides uniformis	NBRC 113350	陰性	5.0	46.2	4	1*
Escherichia coli	NBRC 3301	陰性	4.8	50.8	7	1
Megamonas funiformis	NBRC 114415	陰性	2.5	31.4	6	1
Megasphaera massiliensis	NBRC 114414	陰性	2.6	50.6	7	1
Parabacteroides distasonis	NBRC 113806	陰性	5.2	45.0	7	1*
Streptococcus mutans	NBRC 13955^{T}	陽性	2.0	36.9	5	1*
Cutibacterium acnes subsp.*acnes*	NBRC 113869	陽性	2.6	60.0	3	1*
Staphylococcus epidermidis	NBRC 113846	陽性	2.5	32.1	6	1*
Bacillus subtilis	NBRC 13719^{T}	陽性	4.3	43.3	10	1
Pseudomonas putida	NBRC 14164^{T}	陰性	6.2	62.3	7	1*

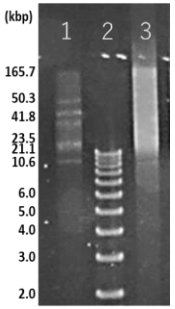
※：本製品に使用した微生物はNBRCにおいて品質確認されたもので、個別に購入できます。

2. 検証結果（ロット番号 260501ND）

2-1. DNAサイズと濃度、精製度の確認

本ロットのDNAカクテルをアガロース電気泳動およびDNA濃度と精製度の測定に用いました。

図1　1%アガロース電気泳動



Lane 1; marker 1
Lane 2; marker 2
Lane 3; 260501ND

表2　DNAの濃度・精製度

	260501ND
ng/µL	55.5 ± 1.7
260/280	1.86 ± 0.0
260/230	2.15 ± 0.1

2-2. 各株の検出割合

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に従い、SMARTer ThruPLEX DNA-Seq Kit（タカラバイオ社）を用いてライブラリー調製を行い、 MiSeqシステム（Illumina社）を用いてショットガンシーケンスを行いました。本測定は、本ロットからランダムに3本抽出して行いました。

表3　ショットガンシーケンスを用いた20株の検出割合

学名	NBRC 番号	理論値 (%)	各株の検出割合 (%) ※
Anaerostipes caccae	NBRC 114412	5.0	5.9 ± 0.2
Bifidobacterium longum	NBRC 114370	5.0	6.1 ± 0.1
Bifidobacterium longum subsp. *longum*	NBRC 114494	5.0	4.5 ± 0.0
Blautia parvula	NBRC 113351^{T}	5.0	5.2 ± 0.0
Collinsella aerofaciens	NBRC 114504	5.0	4.0 ± 0.1
Enterocloster clostridioformis	NBRC 113352	5.0	4.9 ± 0.1
Flavonifractor plautii	NBRC 113805	5.0	4.6 ± 0.1
Lactobacillus delbrueckii	NBRC 3202	5.0	5.0 ± 0.0
Mediterraneibacter gnavus	NBRC 114413	5.0	5.2 ± 0.1
Akkermansia muciniphila	NBRC 114322	5.0	5.1 ± 0.1
Bacteroides uniformis	NBRC 113350	5.0	5.0 ± 0.0
Escherichia coli	NBRC 3301	5.0	4.2 ± 0.1
Megamonas funiformis	NBRC 114415	5.0	4.4 ± 0.1
Megasphaera massiliensis	NBRC 114414	5.0	4.4 ± 0.0
Parabacteroides distasonis	NBRC 113806	5.0	4.7 ± 0.0
Streptococcus mutans	NBRC 13955^{T}	5.0	8.8 ± 0.4
Cutibacterium acnes subsp. *acnes*	NBRC 113869	5.0	4.4 ± 0.1
Staphylococcus epidermidis	NBRC 113846	5.0	4.4 ± 0.0
Bacillus subtilis	NBRC 13719^{T}	5.0	5.2 ± 0.0
Pseudomonas putida	NBRC 14164^{T}	5.0	4.0 ± 0.1

※：本値は、ショットガンシーケンスにより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。

3. 使用例

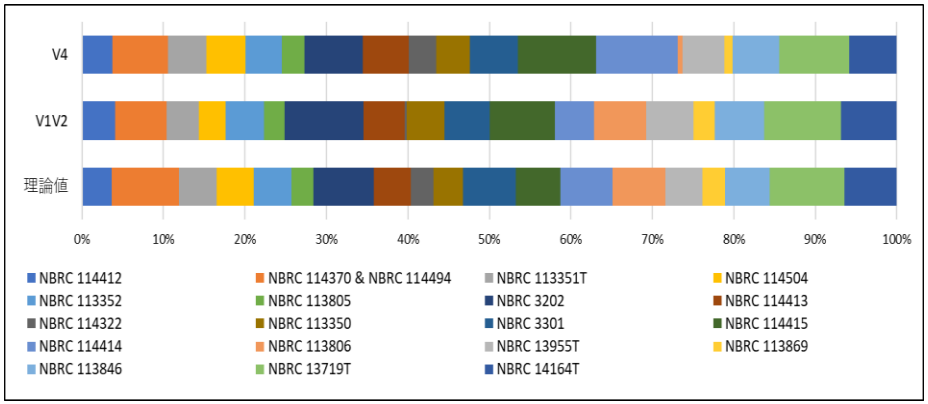
16S rRNA遺伝子の可変領域であるV1V2領域とV4領域を対象にして、MiSeqシステムを用いてメタ16S解析を実施しました。

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 (%)	V1V2領域 (%) ※1	V4領域 (%) ※1
Anaerostipes caccae	NBRC 114412	3.7	4.0±0.1	3.8±0.1
Bifidobacterium longum	NBRC 114370	8.3※2	6.4±0.3	6.8±0.4
Bifidobacterium longum subsp. *longum*	NBRC 114494			
Blautia parvula	NBRC 113351^{T}	4.6	3.9±0.1	4.7±0.6
Collinsella aerofaciens	NBRC 114504	4.6	3.3±0.2	4.8±0.1
Enterocloster clostridioformis	NBRC 113352	4.6	4.8±0.1	4.5±0.8
Flavonifractor plautii	NBRC 113805	2.8	2.5±0.1	2.8±0.0
Lactobacillus delbrueckii	NBRC 3202	7.3	9.7±0.2	7.2±0.2
Mediterraneibacter gnavus	NBRC 114413	4.6	5.1±0.2	5.6±0.4
Akkermansia muciniphila	NBRC 114322	2.8	0.3±0.0	3.3±0.1
Bacteroides uniformis	NBRC 113350	3.7	4.6±0.2	4.1±0.1
Escherichia coli	NBRC 3301	6.4	5.6±0.4	5.9±0.4
Megamonas funiformis	NBRC 114415	5.5	8.0±0.1	9.6±0.1
Megasphaera massiliensis	NBRC 114414	6.4	4.8±0.2	10.0±0.2
Parabacteroides distasonis	NBRC 113806	6.4	6.4±0.3	0.6±0.0
Streptococcus mutans	NBRC 13955^{T}	4.6	5.8±0.1	5.2±0.4
Cutibacterium acnes subsp. *acnes*	NBRC 113869	2.8	2.6±0.1	1.0±0.1
Staphylococcus epidermidis	NBRC 113846	5.5	6.1±0.1	5.7±0.1
Bacillus subtilis	NBRC 13719^{T}	9.2	9.4±0.7	8.6±0.9
Pseudomonas putida	NBRC 14164^{T}	6.4	6.8±0.1	5.8±0.1

理論値は16S rRNA遺伝子のコピー数の割合を表す。
※1 ：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＝3）を表す。
※2 ：*Bifidobacterium*は本メタ16S解析では区別できないため、合算した数値とした。
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)
V4領域の解析に使用したプライマー　：515Fmod (5'- GTGYCAGCMGCCGCGGTAA -3'),
806Rmod (5'- GGACTACNVGGGTWTCTAAT -3')
(Parada AE *et al.*, Environ. Microbiol., (2016) 18:1403-1414)
(Apprill A *et al.*, Aquat. Microb. Ecol., 75:129-137)

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に送付いたします。
- 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。
- 本製品を利用した成果を公表する場合は、以下の論文を引用してください。

Tourlousse, D.M., Narita, K., Miura, T. et al. Characterization and demonstration of mock communities as control reagents for accurate human microbiome community measurements. *Microbiology Spectrum*, 10(2): e01915-21.

国立研究開発法人
新エネルギー・産業技術総合開発機構

「NBRCヒト常在菌DNAカクテルは、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（ＮＥＤＯ）の委託業務の成果を（一部）活用しています。」

お問い合せ先
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

ver. 20260612