

DS3000 Compact CE Sequencerにおける微生物同定の実例

概要

微生物の進化の歴史はリボソームRNA(rRNA)に記録されており、この記録をもとに系統発生的に区分する手法が採用されています。第18改正日本薬局方では、キャピラリーシーケンサーを用いた微生物同定解析手法が示されています。その手法は、細菌については16S rRNAの高度可変領域の一部、真菌については18S rRNAと5.8S rRNA間のスペーサー領域(ITS1)の遺伝子配列を自動解析し、データベースと照合することによって微生物を同定又は推定する方法です。ここではDS3000 Compact CE Sequencer(以下、DS3000と表記します)を用いて、身近に存在する微生物を対象とした同定の実例を2つ紹介します。1つは、卵黄加マンニット食塩培地を用いた、ヒトの皮膚に常在する細菌由来コロニーからの微生物同定、もう1つは、みかん表皮上に繁殖する真菌からの微生物同定です。DS3000を用いて解析し、前者は *Staphylococcus* 属に分類されると推定され、黄色ブドウ球菌の可能性が示唆されました。後者は *Penicillium* 属に分類されると推定されました。



DS3000
Compact CE Sequencer

結果

手軽に手指の常在菌を検査できる、ハンドペタンチェックⅡ卵黄加マンニット食塩培地(栄研化学株式会社[®])を用いて、培地に手を押し当ててコロニーを形成しました。コロニーから抽出したDNAをBacterial 16S rDNA PCR Kit Fast (800)(タカラバイオ株式会社)にてPCR増幅し、BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)にてサイクルシーケンシング反応を実施しました。得られたサンプルをDS3000で電気泳動しました。Forward (F)とReverse (R)の16S rDNA配列を、DNA配列解析ソフトウェアSEQUENCHERを用いて編集、アセンブル(図1、2)したのち、NCBI BLAST[®]の配列データベースにて検索しました。検索結果の上位は *Staphylococcus* 属であり、コロニーが *Staphylococcus* 属、つまりブドウ球菌属に分類されると推定されました(図3)。また卵黄加マンニット食塩培地で黄変が観察されたことから、今回得られたコロニーは黄色ブドウ球菌の存在が示唆されました。よって、配列データベースでの検索結果および卵黄加マンニット食塩培地の黄変の両方で、黄色ブドウ球菌の可能性が示されました。

また、みかん表皮上のカビ(真菌)から、ポテトデキストロース寒天培地を用いてコロニーを単離し、抽出したDNAをFungal rDNA(ITS1) PCR Kit FastおよびFungal rDNA(D1/D2) PCR Kit Fast(タカラバイオ株式会社)にてPCR増幅し、上記と同様にサイクルシーケンシング反応を実施しました。得られたサンプルをDS3000で電気泳動しました。FとRのITS1領域およびD1/D2領域配列を、DNA配列解析ソフトウェアSEQUENCHERを用いて編集、アセンブル(図4)したのちNCBI BLAST[®]の配列データベースにて検索しました。両領域ともに上位の検索結果は *Penicillium* 属であり、コロニーが *Penicillium* 属であると推定されました(図5、6)。

卵黄加マンニット食塩培地から推定された黄色ブドウ菌は、健康成人の鼻腔に約20%程度常在していると言われ(参考文献1)、今回手指から検出された結果として妥当と考えられます。また、みかん表皮上のカビが *Penicillium* 属と推定されたことも、結果として妥当と考えられます。

結論

日本薬局方で示す微生物同定解析手法を参考にして、DS3000が細菌および真菌の推定に利用可能であることを確認しました。DS3000を用いることで、細菌や真菌の遺伝子配列も確認することができます。

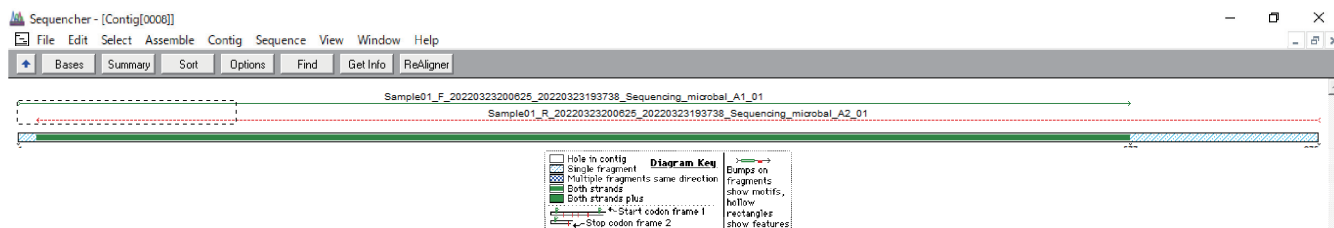


図1: SEQUENCHERを用いた実験1のアセンブル概要図



図2: SEQUENCHERを用いた実験1のアセンブルとシーケンス波形(330 bp付近)

Subject accession	Discription	e-value	bitscore	Percentage of identical matches	Alignment length
NR_113345.1	Staphylococcus haemolyticus strain JCM 2416 16S ribosomal RNA	0	1243	99.852	675
NR_036955.1	Staphylococcus haemolyticus strain SM 131 16S ribosomal RNA	0	1238	99.704	675
NR_116627.1	Staphylococcus devriesei strain KS-SP 60 16S ribosomal RNA	0	1227	99.407	675
NR_036956.1	Staphylococcus hominis strain DM 122 16S ribosomal RNA	0	1216	99.111	675
NR_136463.1	Staphylococcus petrasii subsp. pragensis strain CCM 8529 16S ribosomal RNA	0	1206	98.815	675
NR_118248.1	Staphylococcus petrasii subsp. jettensis strain SEQ110 16S ribosomal RNA	0	1206	98.815	675
NR_118450.1	Staphylococcus petrasii strain CCM 8418 16S ribosomal RNA	0	1205	98.815	675
NR_041323.1	Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus strain GTC 1228 16S ribosomal RNA	0	1205	98.815	675
NR_132590.1	Staphylococcus petrasii subsp. croceilyticus strain MCC10046 16S ribosomal RNA	0	1201	98.667	675

図3: 実験1のNCBI BLAST® 検索結果一覧

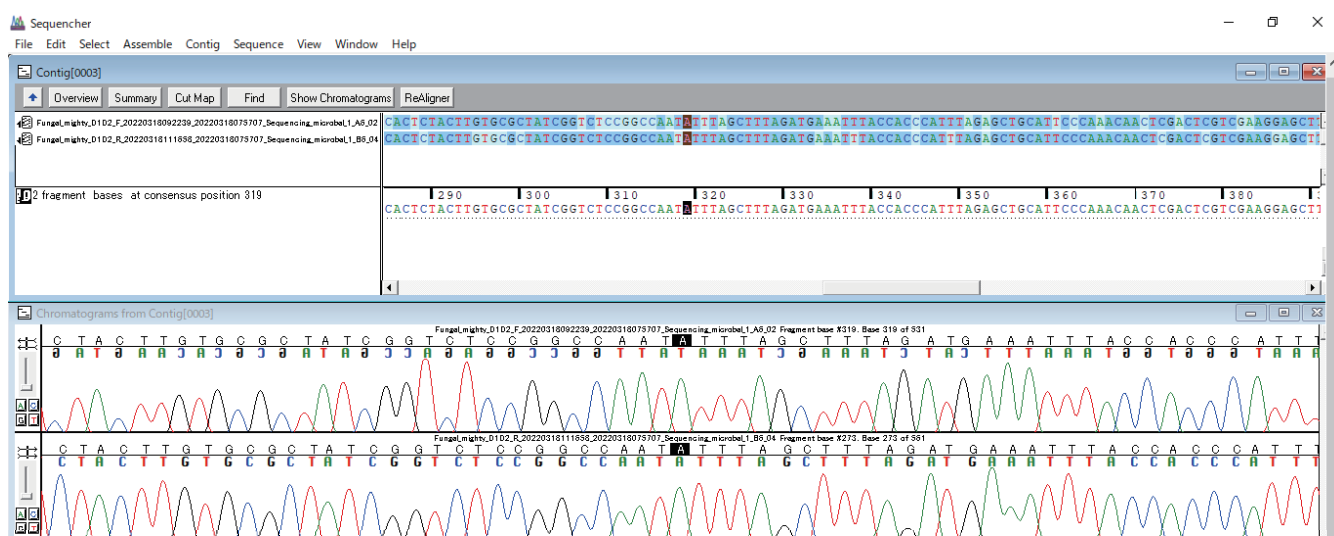


図4: SEQUENCHERを用いた実験2のアセンブルとシーケンス波形(D1/D2, 320 bp付近)

Subject accession	Discription	e-value	bitscore	Percentage of identical matches	Alignment length
NR_171619.1	Penicillium hordei CBS 701.68 ITS region; from TYPE material	3.43E-125	444	97.328	262
NR_163669.1	Penicillium fuscoglaucum CBS 261.29 ITS region; from TYPE material	1.6E-123	438	96.947	262
NR_163549.1	Penicillium neoechinulatum CBS 169.87 ITS region; from TYPE material	1.6E-123	438	96.947	262
NR_163544.1	Penicillium hirsutum CBS 135.41 ITS region; from TYPE material	1.6E-123	438	96.947	262
NR_163541.1	Penicillium lanosoceruleum CBS 215.30 ITS region; from TYPE material	1.6E-123	438	96.947	262
NR_172035.1	Penicillium speluncae DAOMC 251701 ITS region; from TYPE material	1.6E-123	438	96.947	262
NR_138261.1	Penicillium molle CBS 456.72 ITS region; from TYPE material	1.6E-123	438	96.947	262
NR_163685.1	Penicillium caseifulvum CBS 101134 ITS region; from TYPE material	5.74E-123	436	96.935	261
NR_163684.1	Penicillium cavernicola CBS 100540 ITS region; from TYPE material	2.06E-122	435	96.923	260

図5: 実験2(ITS1)のNCBI BLAST® 検索結果一覧

Subject accession	Discription	e-value	bitscore	Percentage of identical matches	Alignment length
NG_069698.1	Penicillium kewense CBS 344.61 28S rRNA gene	0	1110	99.671	607
NG_069786.1	Penicillium sinaicum CBS 279.82 28S rRNA gene	0	1109	99.67	606
NG_068959.1	Penicillium molle CBS 456.72 28S rRNA gene	0	1109	99.67	606
NG_069811.1	Penicillium neoechinulatum CBS 169.87 28S rRNA gene	0	1105	99.506	607
NG_069644.1	Penicillium cyclopium CBS 144.45 28S rRNA gene	0	1105	99.506	607
NG_069854.1	Penicillium sclerotigenum CBS 101033 28S rRNA gene	0	1103	99.505	606
NG_069803.1	Penicillium freii CBS 476.84 28S rRNA gene	0	1103	99.505	606
NG_069626.1	Penicillium egyptiacum CBS 244.32 28S rRNA gene	0	1101	99.504	605
NG_069855.1	Penicillium caseifulvum CBS 101134 28S rRNA gene	0	1099	99.341	607

図6: 実験2(D1/D2)のNCBI BLAST® 検索結果一覧

実験1: ヒトの皮膚に常在する細菌由来コロニーからの微生物同定

1. 培養

環境微生物検査用培地ハンドペタンチェックII 卵黄加マンニット食塩培地(栄研化学株式会社®)を使用しました(図7)。卵黄加マンニット食塩培地は、卵黄反応とマンニット分解性を同時に検出できるブドウ球菌の選択分離培地です。高濃度の食塩が添加されていることにより黄色ブドウ球菌以外の細菌の発育が阻害されています。黄色ブドウ球菌が存在しマンニットを分解すると、培地が酸性となり、指示薬であるフェノールレッドが黄色に変色します。一方分解しない場合は、培地はアルカリ性となり、無変色かピンク色を呈します。更に卵黄液添加によりレシトビテリン反応を見ることができます。レシトビテリン反応陽性の菌は、コロニーの周囲に淡黄乳白色の不透明帯を生じます。

培地表面上に手を押し当て(図7)、28℃で3日間培養しました。結果、複数の細菌コロニーが形成され、コロニー周辺の寒天培地が黄色に変色しました(図8)。

2. DNA抽出

寒天培地に形成されたコロニーから7個を選び(図8)、MightyPrep reagent for DNA(タカラバイオ株式会社)(参考文献2:以降試薬の参考文献はメーカー提供のプロトコルを示します)を用いて細菌のDNAを抽出しました。まず、寒天培地上のコロニーから滅菌済みの爪楊枝で菌体を取り、MightyPrep reagent for DNA 100 µlに懸濁しました。次にヒートブロックを用いて、95℃で10分加熱しました。最後に12,000～15,000 rpmで2分間遠心しました。この上清をPCRの鋳型として使用しました。

3. DNA増幅および精製

2で得られたDNAを、Bacterial 16S rDNA PCR Kit Fast(800)(タカラバイオ株式会社)(参考文献3)を用いて、細菌の16S rDNA領域内の特定領域を表1、表2に従いPCR増幅しました。得られたPCR増幅産物を、NucleoSpin®-Gel-and-PCR-Clean-UP(MACHERY-NAGEL®)(参考文献4)を用いて精製しました。カラムからのDNA溶出は、溶出Buffer 20 µlを用いて行いました。

4. サイクルシーケンス反応および精製

BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Thermo Fisher Scientific)(参考文献5)を用いて、表3、表4に従いサイクルシーケンス反応を実施しました。その後、BigDye XTerminator™ Purification Kit(Thermo Fisher Scientific)(参考文献6)を用いて表5に従い調製し、2,000 rpm以上、振れ幅4 mm以上の条件で、20分撹拌し、精製しました。

5. キャピラリー電気泳動

表6に従い、BigDye XTerminator™ Purification Kit用のモジュールを使用して電気泳動しました。

6. 解析

FとRのシーケンスから作成したコンティグを用いてblastn検索を行いました。配列データベースは、NCBI 16S ribosomal RNA (Bacteria and Archaea type strains) [ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/16S_ribosomal_RNA.tar.gz]最新版(2022年3月時点)を使用しました。



図7:環境微生物検査用培地ハンドぺたんチェックⅡ
卵黄加マンニット食塩培地(栄研化学株式会社®)

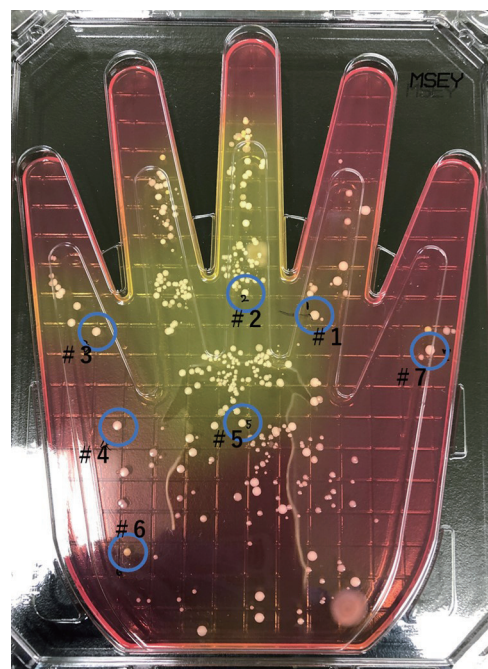


図8:卵黄加マンニット食塩培地に手を
押し当てた後、3日間培養(28℃)した結果
数字は今回の解析に用いたコロニーを示す。

表1:Bacterial 16S rDNA PCR Kit Fast (800)のPCR増幅プロトコル

試薬	液量(μL)
TaKaRa Taq HS Fast Detect Premix (2×)	12.5
16S rDNA Primer Mix(bacteria) (10×)	2.5
MightyPrep reagent for DNA抽出液	2.5
Nuclease Free Water	7.5
Total reaction volume	25

表2:Bacterial 16S rDNA PCR Kit Fast (800)のPCR条件

温度(℃)	時間(秒)	サイクル
92	60	×1
92	5	×25
50	1	
68	8	
72	60	×1
4	hold	

表3: BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitのサイクルシーケンス反応プロトコル

試薬	液量(μL)
BigDye™ Terminator Ver3.1	1
Template (カラム精製後PCR産物)*	X
Primer (1 pmol/μl)	1
BigDye™ v3.1 Cycle Sequencing Kit 5×Sequencing Buffer	1.75
Deionized Water	up to total Volume
Total reaction volume	26

* Qubit™ 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) を用いてサンプル中のDNA量を測定し、最終10～40 ngとなるようにサンプル調製した。

表4: BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitのサイクルシーケンス条件

温度(℃)	時間(秒)	サイクル
96	60	×1
96	10	×25
50	5	
60	240	
4	hold	

表5: BigDye XTerminator™ Purification Kitの精製プロトコル

試薬	液量(μL)
サイクルシーケンス反応済みサンプル	10
SAM™ Solution	45
BigDye XTerminator™ Solution	10
Total reaction volume	65

表6: 電気泳動条件

Polymer	Polymer7
Dye Set	AB 4-dye sequencing
Matrix Standard	31xx Matrix Standards Kit, BigDye™ Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific)
Assay	AB_XSeq_36_Fast
Injection Voltage/Time	1.2 kV / 4秒
Run Voltage	14 kV
Run Time	900秒

実験2: みかん表皮上に繁殖する真菌からの微生物同定

18S rRNAと5.8S rRNA間のスペーサー領域(ITS1) (150~500 bp)に加えて、28S rDNA領域内のD1/D2領域(約0.6 kb)も対象としました。

1. 培養

みかん表皮上に繁殖するカビ(真菌)(図9)から、ポテトデキストロース寒天培地(PDA)を用いてコロニーを単離しました。

2. DNA抽出

寒天培地に形成されたコロニー(図10)から、MightyPrep reagent for DNA(タカラバイオ株式会社)を用いて、真菌のDNAを抽出しました。MightyPrep reagent for DNAの手順は実験1と同様です。

3. DNA増幅および精製

2で得られたDNAを、Fungal rDNA(ITS1) PCR Kit Fast(RR183A)(タカラバイオ株式会社)(参考文献7)を用いて、表7、表8に従いITS1領域をPCR増幅しました。また、Fungal rDNA(D1/D2) PCR Kit Fast(RR184A)(タカラバイオ株式会社)(参考文献8)を用いて、表9、表10に従いD1/D2領域をPCR増幅しました。得られたPCR増幅産物を、NucleoSpin®-Gel-and-PCR-Clean-UP(MACHEREY-NAGEL®)を用いて精製しました。カラムからのDNA溶出は、溶出Buffer 20 μ lを用いて行いました。

なお、ゲル電気泳動した結果を図11に示します。

4. サイクルシーケンス反応および精製

実験1と同様に、BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Thermo Fisher Scientific)を用いて、表3、表4に従いサイクルシーケンス反応を実施しました。その後、BigDye XTerminator™ Purification Kit(Thermo Fisher Scientific)を用いて表5に従い調製し、2,000 rpm 以上、振れ幅4 mm 以上の条件で、20分攪拌し、精製しました。

5. キャピラリー電気泳動

表6に従い、BigDye XTerminator™ Purification Kit 用のモジュールを使用して電気泳動しました。

6. 解析

FとRのシーケンスから作成したコンティグを用いてblastn検索を行いました。ITS1領域を対象とした配列データベースは、NCBI Internal transcribed spacer region (ITS) from Fungi type and reference material [ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/ITS_RefSeq_Fungi.tar.gz]を用い、D1/D2領域を対象とした配列データベースはNCBI 28S ribosomal RNA sequences (LSU) from Fungi type and reference material [ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/28S_fungal_sequences.tar.gz]を使用しました。



図9: みかん表皮上に繁殖したカビ(真菌類)



図10: ポテトデキストロース寒天培地(PDA)に単離されたミカン表皮由来の真菌コロニー

表7: Fungal rDNA(ITS1) PCR Kit FastのPCR増幅プロトコル

試薬	液量(μ L)
TaKaRa Taq HS Fast Detect Premix (2 $\times$)	12.5
rDNA ITS1 Primer Mix (10 $\times$)	2.5
MightyPrep reagent for DNA抽出液	2.5
Nuclease Free Water	7.5
Total reaction volume	25

表8: Fungal rDNA(ITS1) PCR Kit FastのPCR条件

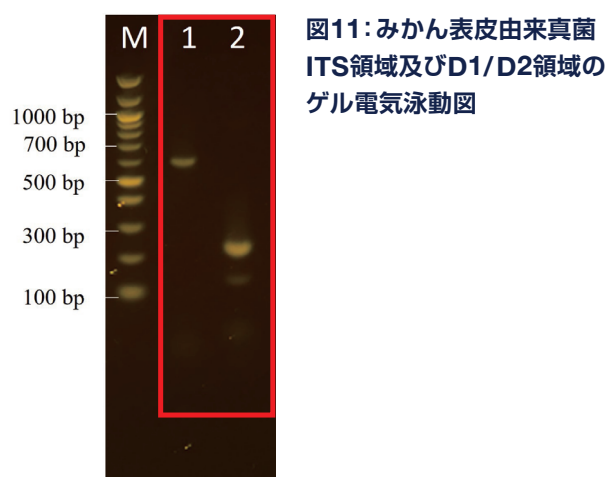
温度(℃)	時間(秒)	サイクル
92	60	×1
92	5	×30
50	1	
68	6	
68	60	×1
4	hold	

表9: Fungal rDNA(D1/D2) PCR Kit FastのPCR増幅プロトコル

試薬	液量(μL)
TaKaRa Taq HS Fast Detect Premix (2×)	12.5
rDNA D1/D2 Primer Mix (10×)	2.5
MightyPrep reagent for DNA抽出液	2.5
Nuclease Free Water	7.5
Total reaction volume	25

表10: Fungal rDNA(D1/D2) PCR Kit FastのPCR条件

温度(℃)	時間(秒)	サイクル
92	60	×1
92	5	×30
55	1	
68	6	
68	60	×1
4	hold	



図中記号	ゲル電気泳動サンプル
M	100 bp Ladder (Marker)
1	D1/D2
2	ITS1

参考文献

- (1) 日本細菌学会 黄色ブドウ菌 <https://jsbac.org/youkoso/staphylococcus.html>
 (2) MightyPrep reagent for DNA説明書 v201509Da
 (3) Bacterial 16S rDNA PCR Kit Fast(800)説明書 v202203Da
 (4) NucleoSpin®-Gel-and-PCR-Clean-UP User manual March 2023/Rev.08
 (5) BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit USER GUIDE 4337035 Rev.D
 (6) BigDye XTerminator™ Purification Kit USER GUIDE 4374408 Rev.D
 (7) Fungal rDNA(ITS1) PCR Kit Fast説明書 v202203Da
 (8) Fungal rDNA(D1/D2) PCR Kit Fast説明書 v201802Da

DS3000の主な仕様

■ 本体仕様

項目	内容
キャピラリー数	4 本
キャピラリー長	36 cm
サンプルトレイ	8連チューブ×4
装置制御	タッチパネルPC
同時検出	6 色
アプリケーション	シーケンシング解析/フラグメント解析
サイズ	400 (W)×600 (D)×600 (H) mm
重量	45 kg
性能保証温度	15 – 30 °C
性能保証湿度	20 – 80% RH(結露しないこと)
電源	100 – 240 ±10% VAC, 50/60 Hz
定格電力	260 VA
対応二次解析ソフトウェア	・Mutation Surveyor (SoftGenetics社製 別売り) ・GeneMarker (SoftGenetics社製 別売り) ・GeneMarker HID (SoftGenetics社製 別売り)

■ ランモジュール仕様

ランモジュール	アプリケーション	ポリマータイプ	読取塩基長 ^{※1} (QV20 CRL)	平均ランタイム (分)
Fast_Sequence36_Polymer7	シーケンシング解析	Polymer7	≥600	≤32
Standard_Sequence36_Polymer7	シーケンシング解析	Polymer7	≥700	≤60
BDx_Fast_Sequence36_Polymer7	BDx シーケンシング解析 ^{※2}	Polymer7	≥600	≤32
BDx_Standard_Sequence36_Polymer7	BDx シーケンシング解析 ^{※2}	Polymer7	≥700	≤60
ランモジュール	アプリケーション	ポリマータイプ	平均ランタイム (分)	サイジング精度 ^{※3} (50 – 400 bp)
Fragment_Analysis36_Polymer7	フラグメント解析	Polymer7	≤35	NA
Fragment_Analysis36_Polymer4	フラグメント解析	Polymer4	≤44	<0.16

※1. 読取塩基長(QV20 CRL)はApplied Biosystems™ BigDye™ Terminator v3.1 Sequencing Standard Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製:別売り)を用いて検証されています。

※2. BDxシーケンシング解析はサーモフィッシャーサイエンティフィック社のApplied Biosystems™ BigDye XTerminator™ Purification Kitを用いて精製したサンプルの解析モジュールです。

※3. サイジング精度(50 – 400 bp)はPowerPlex™ ES117 Fast Allelic Ladder MixとWEN ILS 500 ESS (Promega社製:別売り)を用いて検証されています。

■ 消耗品仕様

品名	パーツ ナンバー	内容	使用上限回数	備考
Capillary Cartridge 36 cm	613-0330	1個	300インジェクション/個	保管温度:15 – 30 °C
Buffer	613-0252	Anode Buffer Cartridge×2個 Cathode Buffer Cartridge×2個	80インジェクション/個	保管温度: 2 – 10 °C
Polymer7	613-0251	Cartridge×4個	16インジェクション/個	保管温度: 2 – 10 °C
	613-0291	Cartridge×4個	24インジェクション/個	保管温度: 2 – 10 °C
Polymer4	613-0250	Cartridge×4個	16インジェクション/個	保管温度: 2 – 10 °C
	613-0290	Cartridge×4個	24インジェクション/個	保管温度: 2 – 10 °C
Septa for Cathode Buffer Cartridge	613-7231	10個	都度交換	
Retainer for Cathode Buffer Cartridge	613-7233	4個	–	
Septa for 8 well tubes	613-7230	24個	都度交換	
Base and Retainer for 8 well tubes	613-7232	4個	–	
Anode Electrode Assembly	613-7263	1個	–	

・本カタログに記載のデータは測定例を示すもので、数値の保証をするものではありません。

・本カタログの画面は、はめ込みです。

・本製品は研究用であり、薬機法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。診断目的およびその手続き上での使用はできません。

・本カタログ中の会社名、商品名は各社の商標および登録商標です。

・Applied Biosystems™、BigDye™、BigDye XTerminator™はサーモフィッシャーサイエンティフィックの商標です。

・Promega®はPromega Corporationの登録商標であり、PowerPlex™はPromega Corporationの商標です。

株式会社 日立ハイテック

本社 〒105-6409 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門ヒルズ ビジネスタワー
TEL: (03)3504-5768

E-mail: hhtgene.aj@hitachi-hightech.com

URL www.hitachi-hightech.com/jp/science/

分析機器に関する
各種お問い合わせは...

お客様サポートセンタ (03)3504-7211

受付時間 9:00 ~ 11:50 12:45 ~ 17:30 (土・日・祝日および弊社休日を除く)

株式会社 日立ハイテックサイエンス

本社 〒105-6411 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門ヒルズ ビジネスタワー
TEL: (080)1172-7021

URL www.hitachi-hightech.com/hhs/



⚠ 安全に関するご注意

●ご使用の前に「取扱説明書」をよくお読みのうえ正しくご使用ください。

お問い合わせは——

●このカタログに掲載した製品は、改善のため外観または仕様の一部を予告なく変更することがあります。
●Copyright(C) Hitachi High-Tech Corporation 2024 All rights reserved.

HTB-DS-J016

2024.1