



Application

FastGene Gel/PCR エクストラクションキットを利用したマウス糞便中の腸内細菌解析

製品名

FastGene Gel/PCR エクストラクションキット
(Cat.No.FG-94602、FG-91202、FG-91302)

メーカー名

FastGene™



以下のデータは、岐阜大学大学院 自然科学技術研究科 溝口 桃加様、竹森 洋様のご厚意により掲載させていただきました。

概要

糞便サンプルからDNA抽出を行う場合、糞便に含まれる様々な菌からDNAを回収できることが重要です。特に細胞壁を有する微生物には、菌体を破碎する方法が非常に重要であるため、各社至適化された専用の試薬キットやガラスビーズ等を用いて処理が行われます。本アプリケーションノートでは、専用の試薬キットとは異なるFastGeneエクストラクションキットを用いることで、WTマウス (C57BL/6J) と炎症性腸疾患マウス (C57BL/6J *Ru2/Ru2* 下痢発症)¹ の糞便から、安価で簡便にDNAを精製することができた事例となります。精製できたDNAを用いて、腸内細菌に含まれるFirmicutesの量について検証を行いました。

方法

① DNA精製

サンプル

WT : ワイルドタイプマウス C57BL/6J (日本エスエルシー株式会社)

diarrhea : 炎症性腸疾患マウス C57BL/6J *Ru2/Ru2* (岐阜大学)

上記2種のマウスの新鮮便 (Fresh) と、回収して1時間後の糞便 (Not Fresh) の2種類を用いた

試薬 : FastGene Gel/PCR エクストラクションキット (FastGene)



**② PCR：腸内細菌 Firmicutes ファミリーのリボゾーム RNA 遺伝子を増幅**

試薬： Expand High Fidelity PCR System (Roche, Cat.No.11732641001/11732650001/11759078001)

● 反応液組成

Template DNA (30 ng/μL)	1.0 μL
Expand High Fidelity Enzyme mix	0.2 μL
Expand High Fidelity Buffer (10×) with 15 mM MgCl ₂	2.5 μL
Primer-F (10 pmol/μL)	0.5 μL
Primer-R (10 pmol/μL)	0.5 μL
dNTP mix (2 mM)	2.5 μL
DW	17.8 μL
Total	25.0 μL

● PCR条件

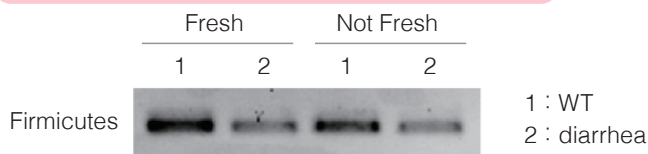
Step1	94°C	3 min	} ×25 cycles
Step2	94°C	20 sec	
	55°C	20 sec	
	72°C	20 sec	
Step3	75°C	10 min	

● 使用プライマー²

増幅サイズ：126 bp
 Primer-F：(Firm934F), GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA
 Primer-R：(Firm1060R), AGCTGACGACAACCATGCAC

結果**① 各サンプルのDNA収量と精製度**

	使用糞便量	DNA収量	A260値	A280値	A260/A280
Fresh (WT)	約 100 mg	8.509 μg	1.702	1.146	1.48
Fresh (diarrhea)	約 100 mg	2.886 μg	0.577	0.406	1.42
Not Fresh (WT)	約 50 mg	14.330 μg	2.866	2.059	1.39
Not Fresh (diarrhea)	約 50 mg	7.016 μg	1.403	0.977	1.44

② 等量の精製したDNA中に含まれる Firmicutes の量**● まとめ**

- Gel/PCR エクストラクションキットを用いて、糞便からDNA精製を行い、腸内細菌に含まれるFirmicutesの量について検証することができた。
- 炎症性腸疾患マウスでは、細菌叢の変化により、Firmicutesの割合が低いことが示唆された。
- 新鮮便と一定時間が経過した糞便では、新鮮便の方がPCRの増幅効率が高いため、新鮮便を用いて実験するのが望ましい。

参考文献

- 1: Simple chronic colitis model using hypopigmented mice with a Hermansky-Pudlak syndrome 5 gene mutation. Itoh Y, Nagaoka Y, Katakura Y, Kawahara H, Takemori H. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2016, 29: 578-582
- 2: Mouse Model of Metformin-Induced Diarrhea. Takemori H, Hamamoto A, Isogawa K Ito M, Takagi M, Morino H, Mlura T, Oshida K, Shibata T *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2020, 8:1

**お客様のコメント**

最初の変性剤 (GP1) がグアニジンであり、大腸菌DNAを問題なく抽出できることを確認していたため、今回のキットを用いて、糞便からのDNA抽出を行いました。安くて簡単で、わざわざ専用キットを使わなくて済むので、在庫維持に気を遣う必要がありません。

NGCからのコメント

本製品は、アガロースゲルからのDNA抽出およびPCR産物の精製を目的として開発されております。糞便からのDNA精製に関しては、弊社ではサポートさせていただくことはできませんが、お客様の使用事例として、ご紹介いたします。