

## ISOSPIN Fecal DNA 鶏糞からのDNA抽出検討

### [目的]

ISOSPIN Fecal DNAを用いて、鶏糞からのDNA抽出が可能かを検討する。

### [対象試料]

- ・国内の農場よりご提供いただいた587日齢の採卵鶏の糞便プール
  - ・白色部位を極力含まない鶏糞試料 (以下、白少試料；下図赤丸部) および、白色部位を多く含むよう分取した鶏糞試料 (以下、白多試料；下図青丸部) をそれぞれ採取した。
- ※いずれも表面を目視により選別した。



### [プロトコール]

ISOSPIN Fecal DNAのキットマニュアルに従って実施した (以下、一部変更あり)。

- ・試料量を0.2 gから0.1 gに変更した。
- ・Beads Beatingの処理時間を45秒から23秒×2セットに変更した。

### [解析方法]

- ① 吸光度測定
- ② PCR / アガロースゲル電気泳動
- ③ アンブリコンシークエンス解析

### 【結果：①吸光度測定】

白少試料および白多試料から、それぞれDNAを抽出し吸光度測定を行った。

サンプル	Beads Beat条件	核酸(ng/μL)	A260/A280	A260/A230
<u>白少試料</u>	45秒	568.7	1.63	1.91
<u>白少試料</u>	23秒×2セット*	455.6	1.81	2.23
<u>白多試料</u>	45秒	38.5	1.12	2.20
<u>白多試料</u>	23秒×2セット*	32.6	1.04	3.00

\*サンプル温度の上昇の影響を検証するため、Beads Beat条件を23秒×2セット (1セット終了毎に冷却) の場合と、キットプロトコール準拠の45秒で比較した。

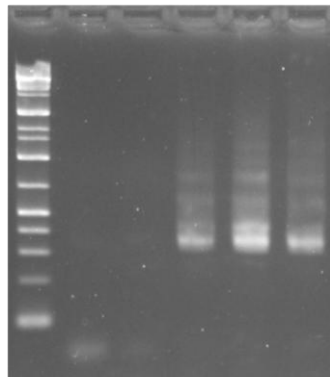
## 【結果：②-1 PCR/ 電気泳動（16s rRNA）】

白少試料から「Beads Beatingの処理時間を23秒×2セットの条件」で抽出したDNAを鋳型として、16S rRNA (V1/V2領域)<sup>※1</sup>を対象にPCRを行い、PCR産物のアガロースゲル電気泳動を行った。

### 【PCR反応溶液の組成：16S rRNA】

Gene Taq FP	0.5 $\mu$ L
10 $\times$ Gene Taq Universal Buffer	5 $\mu$ L
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 $\mu$ L
10 uM 27Fmod Primer	0.6 $\mu$ L
10 uM 338R Primer	0.6 $\mu$ L
Template	1 $\mu$ L
Milli-Q水	up to 50 $\mu$ L

2% Agarose 21



レーン	鋳型DNA量
M	Gene Ladder Wide 1
1	NTC
2	10 pg
3	100 pg
4	1 ng
5	10 ng

### 【PCR条件】

94°C, 3 min.
(94°C, 20 sec. $\rightarrow$ 55°C, 20 sec. $\rightarrow$ 72°C, 20 sec.) * 35 cycles
72°C, 7 min.

M 1 2 3 4 5

※1. 16S rRNA (V1/V2 領域) に対する PCR プライマー配列 (1st\_PCR\_27Fmod\_MIX および 1st\_PCR\_338R\_MIX) は、株式会社生物技研のウェブサイトに掲載された情報を参照した。

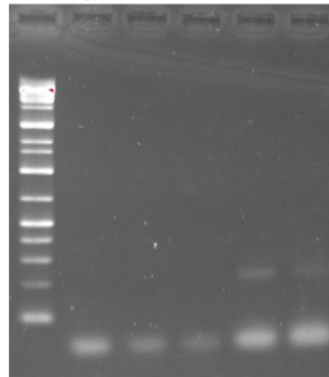
## 【結果：②-2 PCR/ 電気泳動（18s rRNA）】

同様に、18S rRNA (1422f-1642r領域)<sup>※2</sup>を対象にPCRおよびPCR産物のアガロースゲル電気泳動を行った。

### 【PCR反応溶液の組成：18S rRNA】

Gene Taq FP	0.5 $\mu$ L
10 $\times$ Gene Taq Universal Buffer	5 $\mu$ L
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 $\mu$ L
10 uM 1422F Primer	0.6 $\mu$ L
10 uM 1642R Primer	0.6 $\mu$ L
Template	1 $\mu$ L
Milli-Q水	up to 50 $\mu$ L

2% Agarose 21



レーン	鋳型DNA量
M	Gene Ladder Wide 1
1	NTC
2	10 pg
3	100 pg
4	1 ng
5	10 ng

M 1 2 3 4 5

※2. 18S rRNA (1422f-1642r領域) に対する PCR プライマー配列 (1422f および 1642r) は、株式会社生物技研のウェブサイトに掲載された情報を参照した。

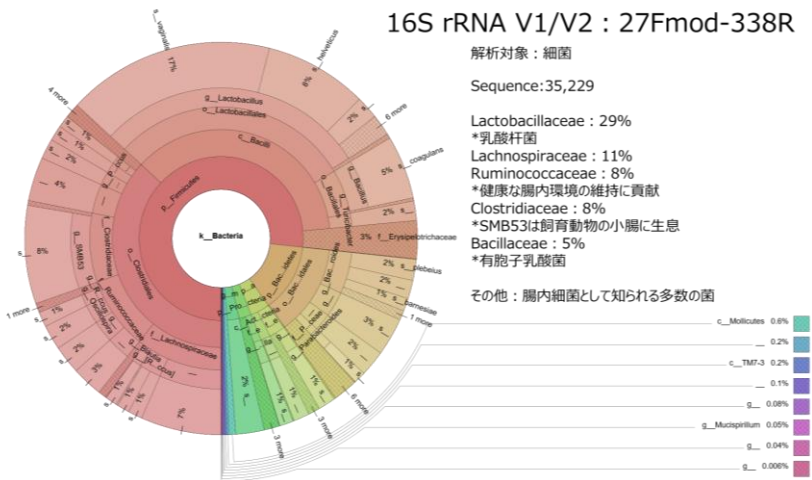
## 【結果まとめ (① 吸光度測定、② PCR/電気泳動)】

ISOSPIN Fecal DNAを用いて、白色部位を極力含まないように採取した鶏糞試料からDNAを抽出することができた。Beads Beatingの処理時間については、キットの標準条件である45秒および、23秒×2セットの条件のいずれにおいてもDNA抽出ができたが、本検討では吸光度測定においてより高い純度を示した、23秒×2セットの条件を採用し、PCRやアンプリコンシーケンス解析に用いた。

一方、白色部位を多く含むよう分取した鶏糞試料からは、収量および純度の良好なDNAを得ることができなかった。本資料にはデータ掲載していないが、カラムにアプライする上清量を増やす、糞便試料の事前洗浄などによる改善を試みた。しかし、いずれの方法においても顕著な改善は認められず、プロトコルの確立には至らなかった。

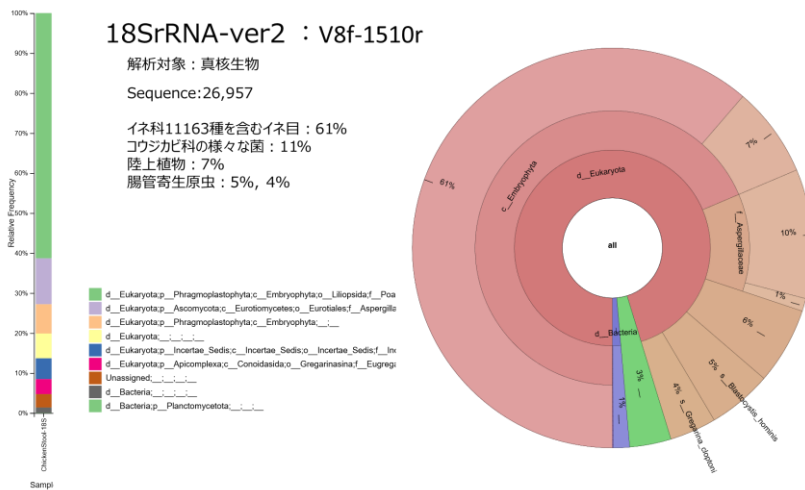
白少試料から抽出したDNAを受託解析企業に委託し、次世代シーケンサーによるアンプリコンシーケンス解析を実施した。

【結果：③-1 アンプリコンシーケンス解析 (16S rRNA)】



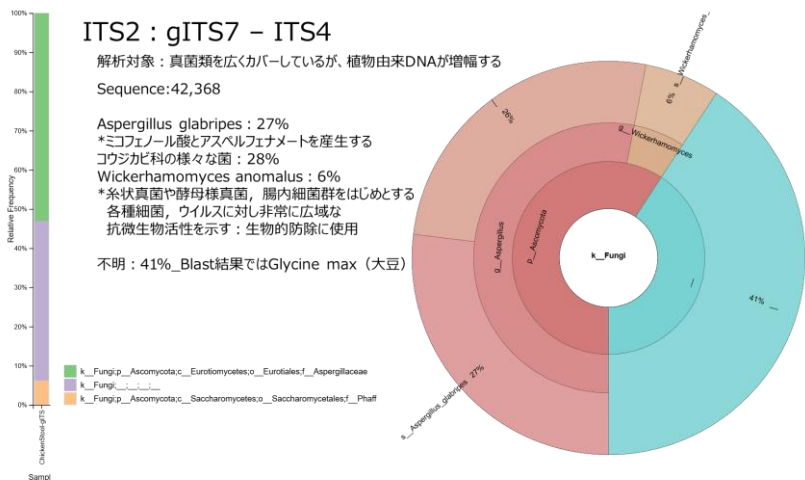
16S rRNA (V1/V2領域) を対象とした解析の結果、35,229個の配列データが得られた。検出された主要な菌種の構成比は、*Lactobacillaceae*が29%、*Lachnospiraceae*が11%、*Ruminococcaceae*が8%、*Clostridiaceae*が8%、*Bacillaceae*が5%であった。有孢子乳酸菌やピフィズス菌、放線菌といった強固な細胞壁を有する微生物も一定割合で検出されていることから、DNAは十分に抽出できているものと考えられる。

【結果：③-2 アンプリコンシーケンス解析 (18S rRNA)】



18S rRNA (V8f-1510r) を対象とした解析の結果、26,957個の配列データが得られた。得られた配列を既知の生物種の遺伝子情報と照会したところ、トモロコシや小麦を含むイネ科11,163種からなるイネ目に共通する配列が、全体の61%を占めたことが分かった。これは飼料由来のDNAであると推測される。また、それ以外にもコウジカビ科の菌類や原虫などの配列が主に検出された。

【結果：③-3 アンプリコンシーケンス解析 (ITS2)】



ITS2 (gITS7-ITS4) を対象とした解析の結果、42,368個の配列データが得られた。得られた配列のうち41%が不明配列と分類されていたが、データベースとの再照会により、大豆に由来する配列であることが分かった。18S rRNAの解析結果と同様に、コウジカビなどの真菌が多く検出された一方で、穀物飼料などに由来する酵母である *Wickerhamomyces anomalus* が、6%を占めていた。