

16S rDNA-500(考察付)報告書

シリアル番号 XXXXXxx
管理番号 SIID 00000
作業完了日 202x 年 xx 月 xx 日
発行日 202x 年 xx 月 xx 日

極秘資料

本報告書の使用にあたっての確認事項

1. 本報告書は株式会社テクノスルガ・ラボ 技術責任者による承認済みです。
2. 研究発表(論文投稿)や特許明細書への転用を除き、本報告書の一部または全部をそのままあるいは改変して第三者へ転用などされた場合には、株式会社テクノスルガ・ラボは一切の責任を負いかねます。
3. 当社受託サービス等は、試験・研究用途を目的として販売しております。当社受託サービスを医療や臨床診断などの試験・研究目的以外へご使用される場合、これに起因する損失・損害等については、当社では一切の責任を負いかねます。

技術責任者

印

株式会社テクノスルガ・ラボ 研究センター 技術部

〒424-0065 静岡県静岡市清水区長崎 388 番地の 1

TEL : 054-349-6211 FAX : 054-349-6121

Mail : tsl-contact@tecsrg.co.jp

目的

16S rDNA (16S rRNA 遺伝子) の塩基配列解析の結果から、検体の帰属分類群を推定します。

方法

1. 培養条件

- ・ 培地 SCD 寒天 (Becton Dickinson, USA)
- ・ 培養温度 30°C
- ・ 培養時間 24 時間
- ・ その他条件 好気培養

2. 16S rDNA 塩基配列解析

- ・ DNA 抽出 アクロモペプチダーゼ (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Japan)
- ・ PCR 増幅 PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara Bio, Japan)
- ・ サイクルシーケンス BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)
- ・ 使用プライマー¹⁾ PCR 増幅: 9F, 1406R
シーケンス (約 500 bp): 9F, 536R
- ・ シーケンス ABI PRISM 3500xL Genetic Analyzer System (Applied Biosystems)
- ・ 塩基配列決定 ChromasPro 2.1 (Technelysium, AUS)
- ・ BLAST 相同性検索²⁾ 解析ソフトウェア: ENKI v3.2 (TechnoSuruga Laboratory, Japan)
データベース
DB-BA16.0 (TechnoSuruga Laboratory)
国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA/EMBL)/GenBank
検索日: 202x 年 xx 月 xx 日
- ・ 簡易分子系統解析 系統樹の推定: 近隣結合法³⁾
塩基置換モデル: Kimura-2-parameter⁴⁾
樹形の信頼性評価: ブートストラップ法⁵⁾ (1,000 反復)

* 塩基配列は、シーケンサーからの生データ (エレクトロフェログラム) を当社技術者が目視により確認し、修正を行った後に決定しています。

* 会社名、製品名は一般に各社の日本および各国での商標または登録商標です。

結果・考察

1. SIID00000

表 1-1. SIID00000 の DB-BA に対する BLAST 検索結果
 相同性スコアで上位 30 に検索された 16S rDNA 塩基配列データ

登録名	株名	Accession No.	相同率	BSL
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC14990	D83363	517/517 (100.0%)	1*
<i>Staphylococcus caprae</i>	ATCC35538	AB009935	512/517 (99.0%)	1*
<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>	ATCC49326	AB009937	512/517 (99.0%)	1*
<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	JCM2420	AB626127	510/515 (99.0%)	1*
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	ATCC14953	L37602	508/517 (98.3%)	1*
<i>Staphylococcus schweitzeri</i>	FSA084	CCEL01000025	505/517 (97.7%)	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	ATCC12600	D83357	505/517 (97.7%)	2
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	ATCC35844	D83355	505/517 (97.7%)	2
<i>Staphylococcus argenteus</i>	MSHR1132	FR821777	505/517 (97.7%)	
<i>Staphylococcus simiae</i>	CCM7213	AY727530	504/516 (97.7%)	1*
<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC27836	L37603	503/515 (97.7%)	1*
<i>Staphylococcus devriesei</i>	KS-SP 60	FJ389206	504/517 (97.5%)	
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	ATCC51129	AB009944	503/517 (97.3%)	
<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	DSM20328	X66101	503/517 (97.3%)	1*
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	ATCC29970	D83367	503/517 (97.3%)	1*
<i>Staphylococcus petrasii</i> subsp. <i>petrasii</i>	CCM8418	JX139845	502/516 (97.3%)	
<i>Staphylococcus petrasii</i> subsp. <i>jettensis</i>	SEQ110	JN092118	502/517 (97.1%)	
<i>Staphylococcus petrasii</i> subsp. <i>croceilyticus</i>	MCC10046	AY953148	502/517 (97.1%)	
<i>Staphylococcus microti</i>	CCM4903	EU888120	501/516 (97.1%)	
<i>Staphylococcus rostri</i>	ARI262	FM242137	501/517 (96.9%)	
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	ATCC43809	AB009941	501/517 (96.9%)	1*
<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	ATCC29974	D83361	499/517 (96.5%)	1*
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	ATCC15305	AP008934	498/517 (96.3%)	1*
<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	ATCC49330	AB009936	498/517 (96.3%)	
<i>Staphylococcus piscifermentans</i>	SK03	Y15754	497/517 (96.1%)	
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	B3117	AF322002	497/517 (96.1%)	
<i>Staphylococcus edaphicus</i>	CCM8730	KY315825	497/517 (96.1%)	
<i>Staphylococcus caeli</i>	82B	MH431939	497/517 (96.1%)	
<i>Staphylococcus xylosum</i>	ATCC29971	D83374	496/517 (95.9%)	1*
<i>Staphylococcus simulans</i>	ATCC27848	D83373	496/517 (95.9%)	1*

注 1) BSL (バイオセーフティレベル) はレベル 1* (日和見病原体) 以上を表記し、空欄はレベル 1 を意味します (参照 補足 7)。

注 2) 株名中の “_ (アンダーバー)” は、スペースを意味します。

注 3) 網掛けは、簡易分子系統解析に供した配列データを示します。

表 1-2. SIID00000 の国際塩基配列データベースに対する BLAST 検索結果
相同性スコアで上位 30 に検索された 16S rDNA 塩基配列データ

登録名	株名	Accession No.	相同率
Staphylococcus epidermidis	CEMTC_3589	MZ047209	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	CEMTC_3351	MZ040916	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	CEMTC_3331	MZ040909	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	CEMTC_3594	MZ027366	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	CEMTC_3803/3804	MZ027361	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	CEMTC_3602	MZ027360	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	CEMTC_3323	MZ027356	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	CEMTC_3472	MZ027353	517/517 (100.0%)
Staphylococcus sp.	B0021-03	MW866508	517/517 (100.0%)
Staphylococcus sp.	L0021-06	MW866498	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	HD21N4	CP060157	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	FDAARGOS_1361	CP070057	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	FDAARGOS_1363	CP069951	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	FDAARGOS_1364	CP069954	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	SCF93	MW595969	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	FDAARGOS_1243	CP069473	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	HD104-2	CP053007	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	HD27N1	CP052975	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	HD33-1	CP052971	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	SCF48	MW560209	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	HD66-8	CP060250	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	HD104-6	CP053005	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	HD15-1	CP053002	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	HD17-1	CP053000	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	HD26-1	CP052998	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	HD59-1	CP052997	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	HD21-2	CP052994	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	HD27-3	CP052991	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	HD12-1	CP052990	517/517 (100.0%)
Staphylococcus epidermidis	HD05-1	CP052984	517/517 (100.0%)

| 0.01 |

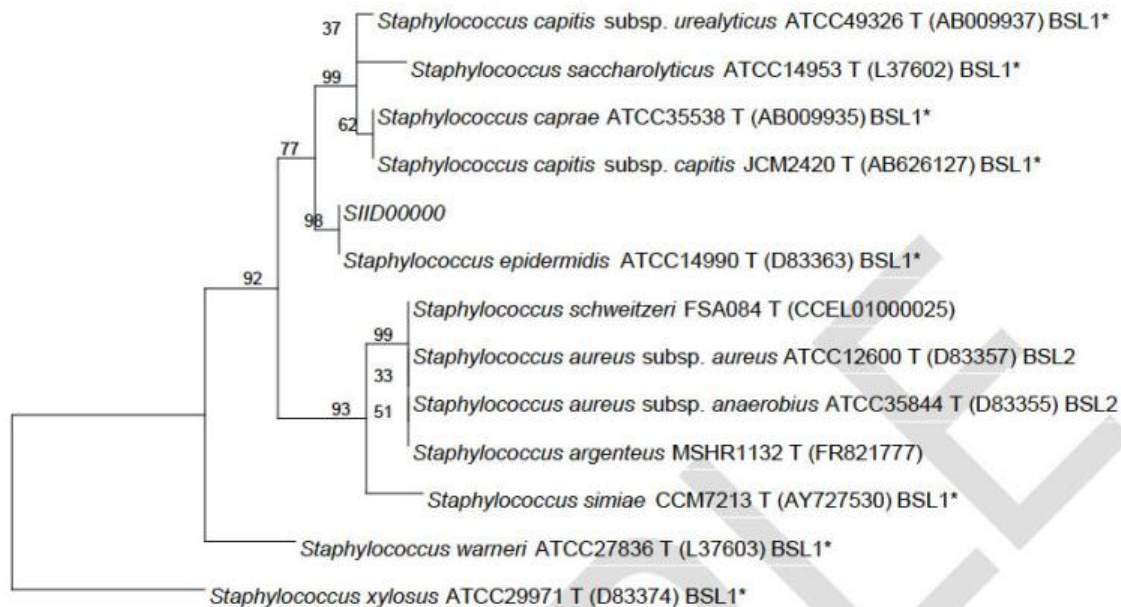


図 1-1. SIID00000 の 16S rDNA 塩基配列に基づく簡易分子系統樹

左上の線はスケールバー、系統枝の分岐に位置する数字はブートストラップ値、
 株名の末尾の T はその種の基準株 (Type strain)、BSL はバイオセーフティレベル
 (BSL1*(日見病原体) 以上を表記) を示します。

SIID00000

BLAST 検索により最も高い相同性を示した基準株: 表 1-1, 1-2			相同率 (%)
登録名	株名	Accession No.	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 14990	D83363	100
考 察			
SIID00000 は <i>Staphylococcus</i> 属が構成するクラスター内に含まれ、 <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990 ^T (D83363) と同一の分子系統学的位置を示しました (図 1-1)。 よって、今回の解析結果からは、検体は <i>S. epidermidis</i> に帰属すると考えます。			
同定結果			
<i>Staphylococcus epidermidis</i>			



まとめ

検体名	SIID	帰属分類群	バイオセーフティレベル
SAMPLE	00000	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	レベル 1 (日和見病原体)

バイオセーフティレベルについて(日本細菌学会バイオセーフティ指針より)

レベル	内容
1	ヒトに疾病を起こし、或いは動物に獣医学的に重要な疾患を起こす可能性のないもの (日和見感染を含む)
2	ヒト或いは動物に病原性を有するが、実験室職員、地域社会、家畜、環境等に対し、重大な災害とならないもの、実験室内で曝露されると重篤な感染を起こす可能性はあるが、有効な治療法、予防法があり、伝播の可能性は低いもの。
3	ヒトに感染すると重篤な疾病を起こすが、他の個体への伝播の可能性は低いもの。



検体の近縁となった既知種の分離源情報

SIID00000

近縁菌種	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
分離源	環境（外気、室内）、体表、ヒト皮膚粘膜など自然界に広く分布
引用文献	カラーアトラス 環境微生物, 山崎省二編, 2002.
BSL	レベル1 (日和見病原体)
備考	

SAMPLE

本報告書に付随する電子データ一覧

データ内容	形式
塩基配列テキストファイル	txt
エレクトロフェログラム	ab1

補足

1. 本報告書で示す検体の同定結果は、16S rDNA 部分塩基配列解析に基づき推定された帰属分類群です。分類学に基づく同定（最終的な種の異同の決定）には、形態観察や生理・生化学性状試験、DNA 塩基配列に基づく分子系統解析、化学的性状試験、DNA-DNA ハイブリッド形成試験などの試験結果から総合的に判断することが重要です。
2. 細菌の同定では、分類の基準となる基準株（種・亜種の命名基準）と比較することが重要とされています。本報告書では、各菌種・亜種の基準株の 16S rDNA 塩基配列との比較および解析の結果から、検体の帰属分類群を推定しています。
3. 本報告書で示す学名（菌種）に関する情報は、以下のウェブサイトにてご確認ください。
LPSN-List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (<http://www.bacterio.net/>)
4. DB-BA は、弊社と国立遺伝学研究所との共同開発品です。分類学的に細菌の同定を行う際は基準株との比較を行うことが重要であることから、当データベースは基準株に由来する 16S rDNA 塩基配列データのみを収録しています 2020 年 12 月時点 (DB-BA16.0) の収録数は 3,082 属、15,835 種、415 亜種です。
5. 国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA(EMBL)/GenBank) に対する相同性検索の結果は、検索を実施した時点の情報です。国際塩基配列データベースの登録情報は常に更新されており、論文などを投稿する前には、再度相同性検索することをお勧めします。
6. 簡易分子系統解析は、論文などの投稿を前提としたアライメント結果の編集および系統樹の作成は行っておりません。
7. 本報告書で示すバイオセーフティレベル (BSL) は、日本細菌学会バイオセーフティ指針「病原細菌の BSL レベル」に従います。BSL はレベル 1 が最も低いものの、レベル 1 であっても日和見感染が報告されている種があり、その安全性を保障するものではありません。また、検体の帰属種または近縁種の BSL がレベル 2 以上である場合には、検体は同等の取扱いをされることをお勧めします。なお、本報告書では、日和見病原体については「BSL1*」と表記しています。
8. 本報告書に関するご質問等につきましては、株式会社テクノスルガ・ラボ 技術部までお問い合わせください。



引用文献

- 1) 中川恭好, 川崎浩子. 遺伝子解析法 16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定法. 日本放線菌学会編集. 放線菌の分類と同定. 東京: 日本学会事務センター; 2001. pp. 88–117.
- 2) Altschul SE, Madden TF, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389–3402.
- 3) Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406–425.
- 4) Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;16:111–120.
- 5) Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;39:783–791.

SAMPLE