

資料

腸内細菌叢解析のための糞便サンプルからのDNA抽出法の比較

加藤 孝太郎^{1,2} 宮島 一将² 戸内 愛希子³ 大坪 誠治⁴
園田 純子⁵ 園田 俊郎⁶ 牧 美輝⁴

抄録

ヒトの腸内細菌叢解析を行うにあたり、糞便サンプルからの腸内細菌ゲノムDNAの抽出について3つの方法（K1；市販キット1、K2；市販キット2、BPH；Beads-Proteinase-Heating法）を比較した。5人の被験者の糞便サンプルから抽出されたDNA濃度は、K1法とBPH法は同等であったが、K2法では著しく低かった。全細菌および門特異的な16S rRNA遺伝子のプライマー対を用いたリアルタイムPCRによる相対定量では、K1法とBPH法では全細菌に対する門ごとの割合は類似していたが、K2法ではFirmicutesとActinobacteriaの割合が低かった。これらの結果から、K1法とBPH法は糞便サンプルからの腸内細菌ゲノムDNAの抽出は同等であったが、K2法ではFirmicutesとActinobacteriaからの抽出が充分でなかったことが示された。

キーワード

腸内細菌、DNA抽出、市販キット、リアルタイムPCR、相対定量

1. 緒言

ヒトの大腸内に生息する細菌の数はおよそ100兆個で、その種類は数百から1000以上におよぶことが知られている¹⁾。これらの腸内細菌は、ヒトが摂取した食事の未消化成分を資化して様々な代謝産物を産生するとともに、それらの代謝産物はヒトの健康に多くの

影響を及ぼしている。食物繊維などの難消化性糖質は、腸内細菌の代謝により、酪酸、プロピオン酸、酢酸などの短鎖脂肪酸に変換された後に腸管から吸収され、腸管粘膜の上皮細胞のエネルギー源になったり、血中に移行したものは肝臓や筋肉などで利用されたりする。また、これらの短鎖脂肪酸は、人体の様々な生理作用に影響している。とくに酪酸は、大腸粘膜の上皮細胞のエネルギー源になる²⁾だけでなく、ヒストン脱アセチル化酵素を阻害³⁾して大腸がん細胞の増殖を抑制するとともにアポトーシスを誘導⁴⁾したり、炎症やアレルギー反応を抑制する獲得免疫細胞の成熟を促したり⁵⁾、マクロファージの炎症性サイトカインの産生を抑制すること⁶⁾などが知られている。腸内の酪酸濃度を高めるためには、腸内の酪酸産生菌の代謝を活性化させることが有効だが、ヒトが摂取する糖質の種類や腸内細菌叢の構成の個人差によってその効果が変化することから、腸内に生息する細菌の種類や数に関する知見を深めることの意義は大きい。

腸内細菌の多くは嫌気性細菌であることから、人工培地による培養には多くの労力と時間を要する上、検出されない細菌も一定数存在していることが知られて

¹一般財団法人MOA健康科学センター
〒108-0074 東京都港区高輪4-8-10 東京療院本館2F

²公益財団法人農業・環境・健康研究所
〒410-2311 静岡県伊豆の国市浮橋1606-2

³社会福祉法人青鳥会
〒892-0871 鹿児島県鹿児島市吉野町10791-18

⁴医療法人財団光輪会光輪会鹿児島クリニック
〒891-0115 鹿児島県鹿児島市東開町5-28

⁵株式会社Satsuma Green Tea
〒890-0075 鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘8-23-7

⁶社会医療法人聖医会サザン・リージョン病院
〒898-0011 鹿児島県枕崎市緑町220

連絡先：

加藤孝太郎, TEL: 0558-79-1114, FAX: 0558-79-0398,
E-mail: kotaro@izu.biz

受付日：2024年10月11日, 受理日：2024年10月13日.

いる⁷⁾。そのため近年では、細菌の培養に依存することなく、糞便中から細菌ゲノムを抽出し、細菌の16S rRNA遺伝子を増幅して細菌叢を調査する分子生物学的手法が用いられる頻度が高くなっている^{1, 8, 9)}。また最近では、溶液中に採取した糞便に含まれる腸内細菌およびそのDNAを、常温で比較的長時間、安定して保存できる採便キット¹⁰⁾も市販されている。これにより、遠距離からの糞便サンプル輸送も容易となり、広域での腸内細菌叢の調査研究が可能になってきた。

細菌の形態学的な違いを検出する手法のひとつにグラム染色法¹¹⁾があり、染色される細菌はグラム陽性細菌、染色されない細菌はグラム陰性細菌と分類される。グラム陽性細菌は外膜がなく、細胞壁に厚いペプチドグリカン層があるが、この層がゲノムDNAを抽出する際の阻害要因となる。多くのグラム陰性細菌は、界面活性剤への曝露で細胞壁が破壊されるが、グラム陽性細菌の場合はそれだけでは充分でなく、アクロモペプチダーゼによる溶菌¹²⁾や、ガラスやセラミック製のビーズによる物理的破碎^{8, 13)}が採用されることが多い。近年、糞便をはじめ環境サンプルから微生物由来のDNAを抽出する市販のキットでは、ビーズを用いた破碎法が広く用いられている。

一般財団法人MOA健康科学センターは、公益財団法人農業・環境・健康研究所と協力して、自然農法や有機農業の農産物の摂取がヒトの腸内細菌叢に与える影響に関する調査を行っている。それらの農産物によって腸内細菌叢の組成や働きに変化が生じ、さらにヒトの健康の維持や改善との関連を見出すことができれば、自然農法や有機農業をベースにした農医連携の取り組みの意義を深めることにつながると考えている。一連の調査を行うにあたり、糞便サンプルから腸内細菌由来のDNAを効率的かつ安定的に得るためのDNAの抽出法について比較を行ったので、その結果について報告する。

2. 方法

2-1 糞便サンプル

日本国内に在住の30代～40代の成人男性5人の被

験者(A～E)から提供された糞便サンプルを用いた。被験者は、一般財団法人MOA健康科学センターの倫理審査委員会の承認を受けた研究(承認番号8; 2017年3月2日、承認番号9; 2017年4月11日)への参加者であり、研究参加の前に十分な説明を受け、書面により研究参加への同意を示している。

糞便の採取は、市販の採便採取キット(スプーン型+保存液あり、株式会社テクノスルガ・ラボ、静岡)を用い、製造元が示したプロトコルにしたがって、被験者自身が実施した。糞便を懸濁した溶液は、宅配便の冷蔵配送で送付してもらった。到着後、糞便溶液を2mLのスクリーバイアルに分注し、-25℃で保存した。

2-2 DNA抽出

糞便サンプルからのDNA抽出は、2つの市販キットと、過去に市販キットを使用せずに検討してきたDNA抽出の中で抽出効果の高かった工程を組み合わせ開発した方法の3種類を供試した。市販キットは、各メーカーがその抽出効果を保証した手法であるため、新たに開発した方法の抽出効果を客観的に評価することができる。なお、新たに開発した方法は、物理的処理の強度を高めに設定したことと、タンパク質等の夾雑物の除去能を高めたことに特徴がある。

(1) 市販キット1 (K1法)

抽出方法は製造元のプロトコルにしたがった。手順の概略は以下の通りである。糞便サンプル中の細菌菌体に、ガラスビーズおよび加熱(95℃)による物理的および界面活性剤等の化学的処理を行い、夾雑物を除去した後、シリカメンブレンを用いた精製法にてDNA溶液を得た。

(2) 市販キット2 (K2法)

抽出方法は製造元のプロトコルにしたがった。手順の概略は、基本的にはK1と概ね同様であるが、K1とはメーカーが異なっており、使用する試薬等の消耗品も異なっていた。

表1 リアルタイムPCRに用いたプライマー

標的とする門	プライマー名	塩基配列 ¹⁾ (5'-3')	引用文献
Firmicutes	928IF-Firm	TGAAACTIAAAGGAATTGACG	本研究 14)
	1040FirmR	ACCATGCACCACCTGTC	
Actinobacteria	Act920F3	TACGGCCGCAAGGCTA	14)
	Act1200IR	TCITCCCCACCTTCTCCG	本研究
Bacteroidetes	798cfbIF	CIAACAGGATTAGATACCCT	本研究 15)
	CFB968r	GGTAAGGTTCTCGCGTA	
Universal	926IF	AAACTCAAIGAATTGACGG	本研究
	1062IR	CTCACIICACGAGCTGAC	本研究

¹⁾A; アデニン、T; チアミン、G; グアニン、C; シトシン、I; イノシン。

(3) BPH法

2mLのスクリーバイアルチューブに、0.1~0.2mLの糞便サンプル、0.1~0.2mLの100-40 TE緩衝液(100mM Tris、40mM EDTA、pH9.0)、0.3mLのDNA抽出緩衝液(250mM Tris (pH9.0)、50mM EDTA、50mM NaCl、1% SDS)を加え、総量を0.5mLとした。これに、0.5gのガラスビーズ(直径0.1mm)と0.3gのジルコニアビーズ(直径1mm)を入れ、ビーズ破碎機(ビーズクラッシャー μT-12、タイテック株式会社、埼玉)による物理的処理(3200rpm、2分間)を行った。その後、16μLのプロテイナーゼK溶液(20mg/mL)、0.45mLのTES緩衝液(250mM Tris (pH9.0)、50mM EDTA、50mM NaCl、1% SDS)を加え、最初に55℃、30分間、続いて95℃、5分間加熱した。放冷後、13000rpm、5分間の遠心分離(CFM-1300、IWAKI ASAHI TECHNO GLASS、千葉)を行い、上澄0.75mLを別のチューブに移した。等量のPCI溶液(フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール=25:24:1)を加えて攪拌後、13000rpm、5分間の遠心分離を行い、上澄を別のチューブに移した。等量のCI溶液(クロロホルム:イソアミルアルコール=24:1)を加えて攪拌後、13000rpm、5分間の遠心分離を行い、上澄を別のチューブに移した。10分の1量の3M 酢酸ナトリウム溶液(pH5.2)と等量のイソプロパノールを加えて攪拌し、30分間静置した後、13000rpm、10分

間の遠心分離を行ってDNAの沈殿を得た。沈殿を0.9mLの70%エタノール溶液で洗浄し、45℃、10分間乾燥させた。95μLのTE緩衝液(10mM Tris (pH8.0)、1mM EDTA)と5μLのRNase溶液(10mg/mL)を加え、室温で30分間静置した後、市販のキット(FavorPrep Genomic DNA Clean-UP Kit, FAVORGEN, Taiwan)で精製してDNA溶液を得た。

2-3 DNAの定量

K1法、K2法、BPH法で抽出した溶液中のDNA濃度は、Nucleic Acid Analyzer Nano-200 (Medclub Scientific Co.Ltd., Taoyuan, Taiwan)を用い、光学的に定量した。

2-4 リアルタイムPCR

各被験者の腸内細菌の割合について、生物の分類階級における門レベルで比較するために、回収したDNA溶液を鋳型とし、門レベルの細菌群の16S rRNA遺伝子部分配列を特異的に増幅するプライマーセットを用いてリアルタイムPCRを行った¹⁴⁾。標的とした門は、Firmicutes、Actinobacteria、Bacteroidetesの3つで、さらに全細菌(Universal)を標的とするプライマーも用いた。供試したプライマーセットの情報は、表1に示した。引用したプライマーが縮重プライマーの場合、縮重塩基はすべてイノシンで置換した。リアルタイムPCRの試薬には、KAPA SYBR

Fast qPCR Kit (KAPA Biosystems, London, UK) を用い、インターカレーター法によって増副産物を検出した。鋳型DNA量は20ng、プライマーの終濃度は0.3 μ M、PCR溶液の総量は20 μ Lとした。PCR条件は、95 $^{\circ}$ C、3分間の変性段階の後、95 $^{\circ}$ C、15秒間、60 $^{\circ}$ C、15秒間、72 $^{\circ}$ C、20秒間の3ステップを40回繰り返し、最終的に72 $^{\circ}$ Cから95 $^{\circ}$ Cまで0.3 $^{\circ}$ C/秒の速度で昇温してプライマーダイマー形成の有無を確認した。リアルタイムPCRの機器には、Mic Real Time PCR Cycler (Bio Molecular Systems, Potts Point, NSW, Australia) を用いた。

2-5 プライマーの増幅効率

PCRの原理では、増幅効率が100%の場合、増幅対象のDNAは2倍になることから、最初の鋳型DNA量を $[DNA]_0$ 、増幅効率(100%が1)を e 、増幅サイクル数を C 、とすると、増幅されるDNA量($[DNA]$)は、 $[DNA] = [DNA]_0 (1+e)^C$ 、で表される¹⁶⁾。各プライマーの増幅効率は、Bacchetti De Gregorisらの論文¹⁴⁾に従って算出した。すなわち、被験者の糞便サンプルから抽出したDNA溶液を全て混合し、それをDNA溶液の溶媒で、4倍、16倍、64倍、256倍に希釈したものを鋳型とし、表1のプライマーセットごとに3反復でリアルタイムPCRを行ってCq値を得た。Cq値とは、PCR産物が一定量(しきい値)に達したときのサイクル数を指す。得られたCq値をもとに、リアルタイムPCR機器に付属の解析プログラム(micPCR, Verson 2.12.7, Bio Molecular Systems, Potts Point, NSW, Australia)を用いて、標準直線と増幅効率(e_{spec} ; Universalでは e_{univ} 、Firmicutesでは e_{firm} 、Actinobacteriaでは e_{act} 、Bacteroidetesでは e_{bac})を得た。

2-6 門レベルでの細菌群の相対割合

Bacchetti De Gregorisらの論文¹⁴⁾に準じて行った。すなわち、全細菌および各門の増幅率を $Eff. univ (1+e_{univ}/100)$ および $Eff. spec (1+e_{spec}/100)$ 、全細菌および各門のCq値をそれぞれ $Cq \cdot univ$ および $Cq \cdot spec$ とすると、全細菌の16S rRNA遺伝子のコピー数に対する各門の細菌の16S rRNA遺伝子のコピー数の百分

率(X)は、以下の式で求められる。

$$X = \frac{(Eff. univ)^{Cq \cdot univ}}{(Eff. spec)^{Cq \cdot spec}} \times 100$$

なお、 $Cq \cdot univ$ および $Cq \cdot spec$ は、全細菌および各門に特異的なプライマーセットを用いて2反復でリアルタイムPCRを行って得たCq値の平均値である。

3. 結果と考察

3-1 DNAの定量

異なる3種の方法を用いて糞便サンプルからDNAを抽出した結果を図1に示した。採取時に糞便の重量を測定できないため、単位は各被験者の糞便溶液量あたりのDNA濃度($ng/\mu L$ -糞便溶液)とした。全ての被験者において、K1法およびBPH法で多くのDNAが抽出され、両者はほぼ同等の濃度であった。一方、K2法によって抽出されたDNAの濃度は、他の2法と比べて著しく低かった。すべての手法においてビーズによる物理的破碎処理が行われたが、K2法では他の2法と比べて破碎時間が短いこと、工程の中に95 $^{\circ}$ Cの加熱処理がないこと、抽出過程における夾雑物の混入を避けるために溶液を移し替える際のサンプルロス量が他の方法より多いこと、などの違いがあった。グラム陽性細菌や古細菌では、菌体からDNAを抽出する際には酵素等により化学的に溶菌することは困難な場合があるのでガラスビーズなどを用いた物理的な破碎を行うことが多い¹⁷⁾。またK1法のプロトコルでは、グラム陽性細菌からDNAを抽出する際には95 $^{\circ}$ Cの加熱処理を加えることが指示されている。これらのことから、K2法ではグラム陽性細菌由来DNAの抽出量が少なかった可能性が考えられた。

3-2 プライマーの増幅効率

全細菌および各門に特異的なプライマーセットによるリアルタイムPCRの増幅直線と増幅効率を図2に示した。全てのプライマーセットで、相関係数 r^2 は0.99を超えており、高い直線性を示した。増幅効率 e_{spec} は、 $e_{univ} = 94.42\%$ 、 $e_{firm} = 99.79\%$ 、 $e_{act} = 90.95\%$ 、

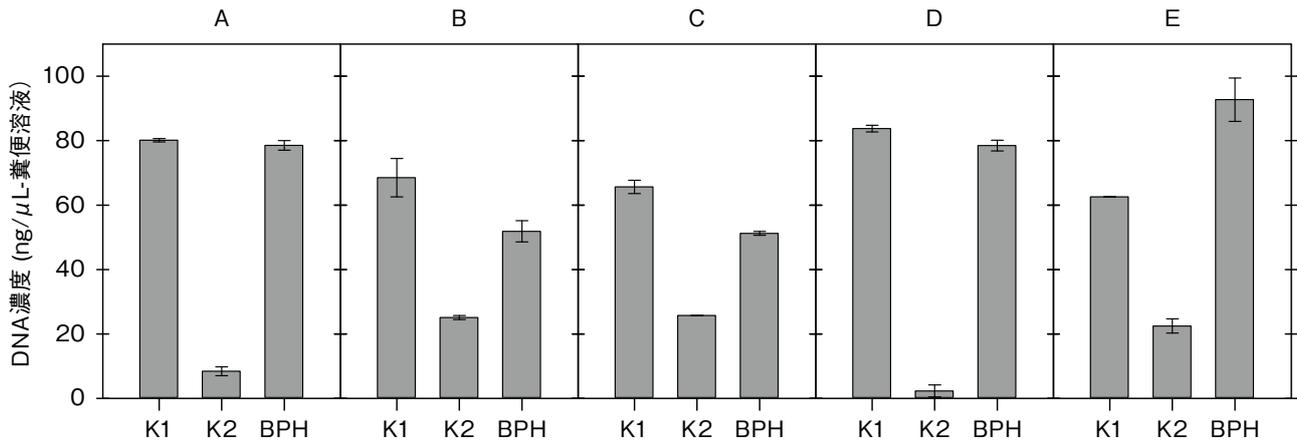


図1 糞便溶液からのDNA抽出における3種類の抽出法の比較

A～Eは被験者。

K1；市販キット1、K2；市販キット2、BPH；Beads-Proteinase-Heating法。

データは、2連で抽出した平均±標準偏差。

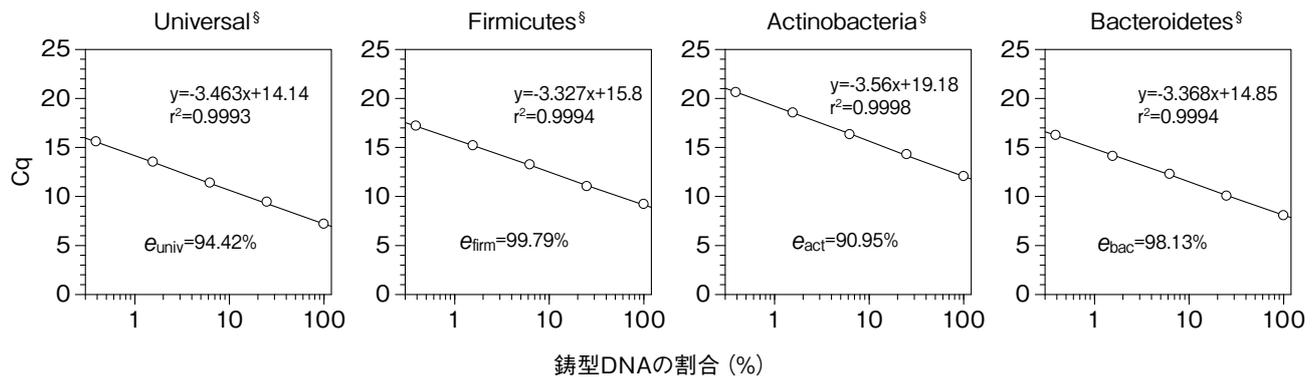


図2 腸内細菌の全細菌および門特異的PCRプライマーによるリアルタイムPCRの増幅直線と増幅効率

§；全細菌 (Universal) および細菌の門。

5名の被験者のDNA溶液を等量混合し、1倍、4倍、16倍、64倍、256倍に希釈した溶液をそれぞれ鋳型DNAとした。

横軸を対数とし、グラフを直線的に表示した。

$e_{bac} = 98.13\%$ であり、 e_{act} は他の3つのプライマーセットでの増幅効率よりやや低めであった。リアルタイムPCRでは増幅する塩基配列が長いほど増幅効率が低下することが知られており¹⁸⁾、Actinobacteriaを標的とするプライマーセットで増幅されたPCR産物は、他のプライマーセットで増幅されたPCR産物より塩基配列の長さが長いこと、増幅効率が他のプライマーセットより低かったことが推察された。しかし、リアルタイムPCRでの増幅効率の許容範囲は、90～110%と言われており¹⁹⁾、全てのプライマーセットで

増幅効率は90%を超えていたことから、本研究でのリアルタイムPCRの信頼性は高いと判断した。

3-3 門レベルでの細菌群の相対割合

腸内細菌叢の門レベルでの優占率は、Firmicutes、Bacteroidetes、Actinobacteriaが上位を占める^{13, 20)}ことから、糞便サンプルからの腸内細菌由来DNAの抽出について比較する場合には、これら3つの門の割合を調べるのが有効であると考え、リアルタイムPCRの結果に基づく相対割合で比較した。相対割合

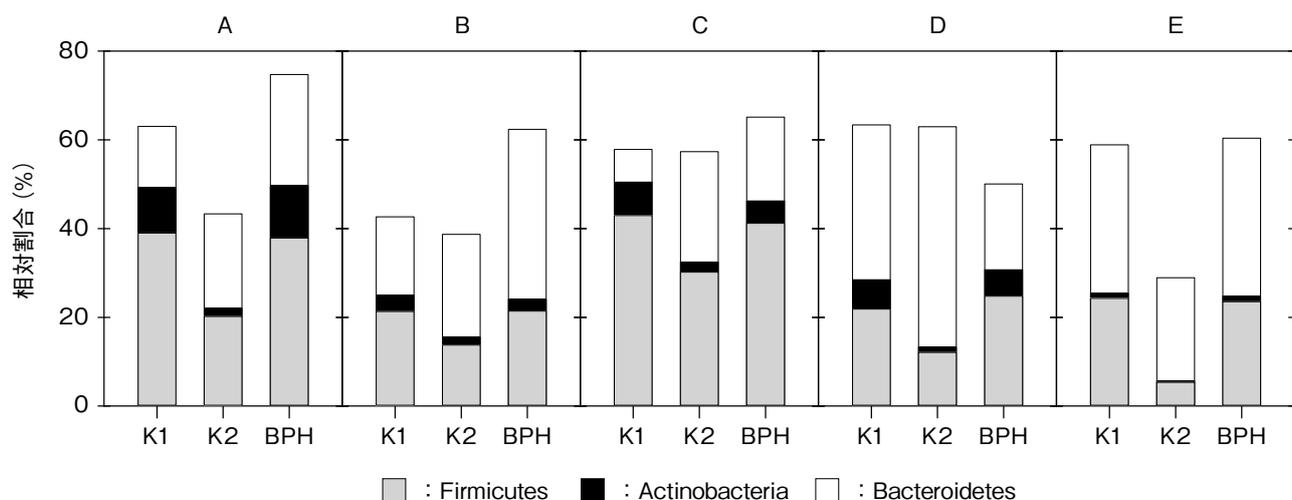


図3 門レベルでの細菌群の相対割合

A～Eは被験者。

K1；市販キット1、K2；市販キット2、BPH；Beads-Proteinase-Heating法。

は、Bacchetti De Gregorisらの論文¹⁴⁾にしたがって算出したが、彼らの研究ではCt (Threshold Cycle；遺伝子増幅の検出がベースラインシグナルに対して統計学的に有意な増加を示した増幅回数) 値を採用していた。これは彼らが用いた機器がCt値を出力するためであり、今回使用した機器はCq (Quantification Cycle) 値を出力するので、その値を適用した。リアルタイムPCRの実験と報告に関するガイドライン²¹⁾では、定量に使用されるPCRサイクル数にはCt、Cp (Crossing Point)、Cqなどの用語が使用されているが、これらはすべて同じ値を指しており、表記の違いは機器メーカーによる製品の差別化のためなので、共通して使用されるべき用語としてはCqの使用を提案していることから、本研究での適用は妥当であると判断した。解析結果は図3に示した。

全細菌に対する各門の細菌が占める割合は、全体的に同じような傾向であったが、門ごとの割合は抽出法によって差異が認められた。全ての被験者で、FirmicutesとActinobacteriaの割合は、K2法が最も少なく、K1法とBPH法では同等であったことから、K2法ではFirmicutesとActinobacteria由来のDNA抽出量が少なかったことが推察された。また、被験者A、EではK2法での累積割合が減少していたことから、Firmicutes、Actinobacteria、Bacteroidetesの3つ

全ての門由来のDNA抽出量が少なく、また被験者B、C、DではK1法とK2法の累積割合が同等であったことから、K2法ではFirmicutesとActinobacteria由来のDNA抽出量が少なかったことが推察された。この結果は、K2法でDNA抽出量が少なかった(図1)原因として、FirmicutesとActinobacteriaからの抽出が充分でなかったことを示唆するものと考えられた。

被験者A、B、Cの累積割合は、K1法よりBPH法の方が多く、とくにBPH法でのBacteroidetesの割合が大きい傾向が認められた。これにより、BPH法では全体的により多くのDNAが抽出されたとともに、Bacteroidetes由来のDNAの抽出量がより多かった可能性が考えられた。さらにこのことは、Bacteroidetesの細菌の中には、K1法では十分に溶菌されない細菌が存在していた可能性も考えられた。

一方、被験者Dでは、BPH法での累積割合が少なく、かつBacteroidetesの割合が減少し、Firmicutesの割合が増加した傾向が認められた。このことから、BPH法ではK1法よりBacteroidetes由来のDNAの抽出量が少なかった可能性があり、さらにBacteroidetesの細菌の中には、BPH法では十分に溶菌されない細菌も存在していた可能性も考えられた。

被験者Eでは、K1法とBPH法での累積割合および3つの門の細菌の割合は同等であったことから、両法

でのDNAの抽出程度も同等であったことが推察された。

腸内細菌叢には個人差があることは知られているが、その違いは糞便サンプルからDNAを抽出する際にも影響することが本研究の結果から示唆された。物理的破碎を行って腸内細菌のゲノムDNAを抽出する場合、DNA鎖の細断化が懸念されるが、菌叢解析のためにrRNA遺伝子のアンプリコンシーケンスやリアルタイムPCRなどを行う場合には必ずしも長鎖のDNAである必要はなく、できるだけ多種類の細菌から多くのDNAが抽出された方が良い。そのような視点では、本研究で供試したK1法やBPH法の方が望ましいと言える。また、K1法とBPH法では、糞便サンプルからのゲノムDNAの抽出も同等レベルであったことから、糞便サンプルからのDNA抽出において、両法は互換的である可能性も示唆された。一方、同時に、市販のキットの中にはゲノムDNAの抽出に差があることが示されたため、市販キットの導入にあたっては注意が必要であることがわかった。

利益相反に関する開示

本発表内容について開示すべき利益相反 (COI: Conflict of interest) はない。

[参考文献]

- 1) Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 464(7285), 59-65. 2010. doi: 10.1038/nature08821.
- 2) Hague A, Singh B, Paraskeva C. Butyrate acts as a survival factor for colonic epithelial cells: further fuel for the in vivo versus in vitro debate. *Gastroenterology*. 112, 1036-1040. 1997. doi: 10.1053/gast.1997.v112.agast971036.
- 3) Waldecker M, Kautenburger T, Daumann H, et al. Inhibition of histone deacetylase activity by short chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *J Nutr Biochem*. 19, 587-593. 2008. doi: 10.1016/j.jnutbio.2007.08.002.
- 4) Hamer HM, Jonkers D, Venema K, et al. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther*. 27, 104-119. 2008. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x.
- 5) Arpaia N, Campbell C, Fan X, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T cell generation. *Nature*. 504, 451-455. 2013. doi: 10.1038/nature12726.
- 6) Chang PV, Hao L, Offermanns S, et al. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111, 2247-2252. 2014. doi: 10.1073/pnas.1322269111.
- 7) 平山和宏. 腸内細菌叢の基礎. *モダンメディア*. 60(10), 307-311. 2014
- 8) Ferrocino I, Cagno, R D, De Angelis M, et al. Fecal microbiota in healthy subjects following omnivore, vegetarian and vegan diets: culturable populations and rRNA DGGE profiling. *PLOS one*. 10(6), e0128669. 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0128669.
- 9) Nishijima S, Suda W, Oshima K, et al. The gut microbiome of healthy Japanese and its microbial and functional uniqueness. *DNA Res*. 23(2), 125-133. 2016. doi: 10.1093/dnares/dsw002.
- 10) Nishimoto Y, Mizutani S, Nakajima T, et al. High stability of faecal microbiome composition in guanidine thiocyanate solution at room temperature and robustness during colonoscopy. *Gut*. 65(9), 1574-1575. 2016. doi: 10.1136/gutjnl-2016-311937.
- 11) Beveridge TJ. Use of the Gram stain in microbiology. *Biotech Histochem*. 76(3), 111-118. 2001. doi: 10.1080/bih.76.3.111.118.
- 12) Kim S-W, Suda W, Kim S, et al. Robustness of gut microbiota of healthy adults in response to probiotic intervention revealed by high-throughput pyrosequencing. *DNA Res*. 20, 241-253. 2013. doi: 10.1093/dnares/dst006.
- 13) Odamaki T, Kato K, Sugahara H, et al. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol*. 16, 90. 2016. doi: 10.1186/s12866-016-0708-53.

- 14) Bacchetti De Gregoris T, Aldred N, Clare AS, et al. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacteria taxa. *J Microbiol Methods*. 86, 351-356. 2011. doi: 10.1016/j.mimet.2011.06.010.
- 15) Mühlhling M, Woolven-Allen J, Murrell JC, et al. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *ISME J*. 2, 379-392. 2008. doi: 10.1038/ismej.2007.97.
- 16) ThermoFisher Scientific. PCRの増幅効率を調べてみよう！, 今こそ本気で徹底理解！リアルタイムPCR講座 第7回. <https://www.thermofisher.com/blog/learning-at-the-bench/qpcr-basic7/>, (accessed 2024-09-28).
- 17) Morita H, Kuwahara T, Ohshima K, et al. An improved DNA isolation method for metagenomic analysis of the microbial flora of the human intestine. *Microbes Environ*. 22(3), 214-222. 2007. doi: 10.1264/jsme2.22.214.
- 18) TOYOBO. 検証してみた！リアルタイムPCRにおいて増幅効率が最も良い増幅長ってどのくらい？. <https://lifescience.toyobo.co.jp/page/break/535>, (accessed 2024-10-05).
- 19) ThermoFisher. リアルタイムPCRハンドブック. <https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/pcr/real-time-pcr.html>, (downloaded 2017-07-07).
- 20) 服部正平. 個人差を生むマイクロバイオーム. *日経サイエンス*. 2012年10月号, 50-57. 2012
- 21) Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments. *Clin Chem*. 55(4), 611-622. 2009. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.

Comparison of DNA Extraction Methods from Fecal Samples for Gut Bacterial Community Analysis

Kotaro KATO^{1,2}, Kazumasa MIYAJIMA², Akiko TONAI³, Seiji OOTSUBO⁴, Sumiko SONODA⁵, Shunro SONODA⁶, Yoshiteru MAKI⁴

Abstract

This study compared three DNA extraction methods-commercial kit 1 (K1), commercial kit 2 (K2), and the bead-proteinase-heating (BPH) method-for their effectiveness in extracting gut bacterial genomic DNA from fecal samples. DNA concentrations obtained from five male participants were comparable between the K1 and BPH methods but significantly lower for the K2 method. Relative quantification via real-time PCR using primer pairs targeting total bacterial and phylum-specific 16S rRNA genes indicated similar proportions of each phylum for the K1 and BPH methods. In contrast, the K2 method yielded lower proportions of Firmicutes and Actinobacteria. These findings suggest that the K1 and BPH methods are similarly effective for extracting gut bacterial DNA from fecal samples. However, the K2 method may be less effective, particularly for Firmicutes and Actinobacteria.

Keywords:

Gut microbiome, DNA extraction, Commercial kits, Real-time PCR, Relative quantification

¹MOA Health Science Foundation, 4-8-10 Takanawa, Minato-ku, Tokyo 108-0074, Japan ²Institute for Agriculture, Medicine, and the Environment. 1606-2 Ukihashi, Izu-no-Kuni, Shizuoka 410-2311, Japan ³Seicho-Kai Soc,Welf.Corp. 10791-18 Yoshino-cho, Kagoshima, Kagoshima 892-0871, Japan ⁴Korin-kai Kagoshima Clinic Med.Corp. 5-28 Tokai-cho, Kagoshima, Kagoshima 891-0115, Japan ⁵Satsuma Green Tea Ltd. 8-23-7 Sakuragaoka Kagoshima, Kagoshima 890-0075, Japan ⁶Seii-kai Southern Region Hospital Soc.Med.Corp. 220 Midori-machi, Makurazaki, Kagoshima 898-0011, Japan

Corresponding author: Kotaro KATO TEL: (+81) 558-79-1114, FAX: (+81) 558-79-0398, E-mail: kotaro@izu.biz

Received 11 October 2024; accepted 13 October 2024.