

## Oragene による細菌 DNA 混入量

J.Chartier and H.C.Birnboim

DNA Genotek, Ottawa, Ontario, Canada

Oragene サンプルの平均的な細菌 DNA 混入量は 6.8% である。それに対し、口内採取やマウスウォッシュによる細菌 DNA 混入量は 88.5% もある。Oragene は他の口腔の採取方法と比較して圧倒的に少ない細菌 DNA 混入量で大量のヒト DNA を抽出することのできる便利な方法である。

### イントロダクション

大きな集団を対象とした研究には数千もの個体検体の DNA 収集が必要になってくる。個体検体の協力を得るためには体を傷付けず、各自で簡単に収集できる方法が望まれている。このことから多くの研究では口壁細胞を DNA 源として使用している。口腔内のサンプルの DNA にはヒト DNA と共に細菌 DNA も混入している。この混入している細菌 DNA は事実的にはあまり影響がなく、口腔から得られた DNA は血液から得られた DNA と PCR や SNP genotyping などによる分析結果で変わらないことが研究により示されている。ここでは Oragene/唾液サンプルの細菌 DNA 混入量について示す。

### 実験材料及び方法

唾液サンプルは 22 人のドナーから収集された。DNA の抽出及び精製は Oragene キットのプロトコールに基づいて行われた。全 DNA 量は Fluorescence/DNase assay により測定された。Fluorescence/DNase assay は DNA 量を測定するために SYBR Green I 染色（分子プローブ）と蛍光分光光度計を用いている。

#### 標準曲線

精製された細菌コントロール DNA は Sigma (*E.coli*, strain B, Cat. #D4889) から得た。標準曲線は異なったコントロール DNA 量を使用して作成した。

#### PCR

PCR プライマーは 16SrRNA 遺伝因子領域から選んだ。この領域は多くの種の微生物において存在し、ヒトでは見つかっていないことが知られている。22 個の Oragene サンプルは Rotor-Gene 3000 real-time thermal cycler (Corbett Research) を用いた PCR によって 16SrRNA 遺伝因子についてテストされた。各反応にはテンプレートとして 12.5ng の全 DNA が使用された。各反応の効率を調べるために別の各サンプル (12.5ng のテンプレート) に 5ng の細菌コントロール DNA を加え、前述したものと平行して PCR を行った。反応効率が良ければ、細菌 DNA 量は未知の細菌 DNA 量に 5ng 分プラスになっているはずである。

## 結果

細菌コントロール DNA を入れた DNA サンプルと入れなかったものを比較すると real-time PCR 反応は効率良く結果が得られなかった。混入しているであろう細菌 DNA 量は実際よりも少なく見積もられていたことを示し、平均的に細菌量は 27.5%と過小評価されていた。Figure1 は各サンプルにおける抽出された平均的な細菌 DNA 量が 6.8%であり 2.0 から 29.0%にまたがっていたことを示している。

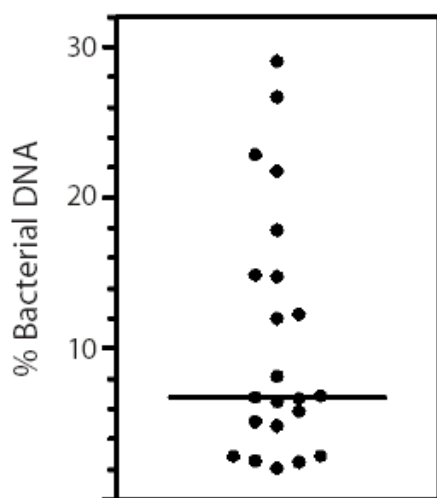


Figure 1. 22 個の Oragene サンプルにおける全 DNA に対する細菌 DNA のパーセント

| Collection method | Median percentage of bacterial DNA | References                  |
|-------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| Mouthwash         | 66.0%                              | Feigelson et al. (2001)     |
| Mouthwash         | 50.5%                              | Garcia-Closas et al. (2001) |
| Cytobrush         | 88.5%                              | Garcia-Closas et al. (2001) |
| Oragene           | 6.8%                               |                             |

Figure 2. 様々な口腔採取法による平均的な細菌 DNA 混入量

## 考察

前述した研究報告によると口腔サンプルは細菌混入量が多いため、全 DNA 量に対するヒト DNA 量の割合が少なくなってしまうとのことだった。Feigelson et al.(2001)はマウスウォッシュによるサンプルでは全 DNA 量に対してヒト DNA は平均で 34%であったことを報告し、同じく Garcia-Closas et al.(2001)はマウスウォッシュによるサンプルでは全 DNA 量に対してヒト DNA は平均で 49.5%であり、口内採取ではわずか 11.5%であったことを報告している (Figure 2)。

それに対して、Oragene/唾液サンプルからの DNA の主成分はヒト DNA であり、細菌混入量は平均でわずか 6.8%であった。Oragene による唾液サンプルへの細菌混入量が少ない理由がいくつか挙げられる。まず、Oragene が有力な抗細菌作用因子を含んでいるので DNA 採取から精製までの細菌の成長を抑えることができるからである。次に、Oragene は細菌 DNA の代わりにヒト DNA を優先的に選別し抽出するからである。要するに Oragene は他の口腔の採取方法と比較して圧倒的に少ない細菌 DNA 混入量で大量のヒト DNA を抽出することができる有効な方法といえるだろう。