

サンプル調製方法 — ITS2 領域 : gITS7 – ITS4 —

株式会社 生物技研

【1st PCR】

弊社では PCR 酵素に ExTaq HS (TaKaRa)を使用しておりますが、お客様が普段ご利用されている PCR 酵素でも問題ございません。

反応組成 :		反応条件 :
10xEx buffer	2.0ul	94°C : 2min
dNTPs (each 2.5mM)	1.6ul	94°C : 30sec
10 uM Forward primer (gITS7_MIX)	1.0ul	50°C : 30sec 25 cycles
10 uM Reverse primer (ITS4_MIX)	1.0ul	72°C : 60sec
Template DNA (1ng)	1.0ul	72°C : 5min
Ex-taq (5units/ul)	0.2ul	4°C : infinite
Milli-Q 水	13.2ul	

Total	20ul	

gITS7_MIX :

ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-**NNNNN**-**GTGARTCATCGARTCTTTG**

ITS4_MIX :

GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-**NNNNN**-**TCCTCCGCTTATTGATATGC**

*細字 : アダプター配列、太字 : ITS 配列

赤字 N : シーケンス解析時における品質向上を目的としてランダム配列を数塩基挿入しています。ご提供するプライマーは異なる長さのランダム配列が挿入された混合プライマーです。

参考文献

Ihrmark K et al. FEMS Microbiol Ecol (2012) 82(3):666-677

【AMPure を用いたビーズ精製】

20ul の PCR 産物に対して、AMPure を 20ul 添加する。80%エタノールで wash を 2 回行い、10mM Tris-HCl (pH 8.0) 20ul で溶出する。

(注意)

精製の目的は使用したプライマーの除去なので、ビーズ精製以外の方法でも可能です。しかしながら、ITS 領域は種により長さが異なりますので、ゲル切り出しによる精製はデータのバイアスの原因となる場合があるのでお勧めできません。

【2nd PCR (tailed PCR)】

インデックス配列を含む 2nd プライマーを用いて tailed PCR を行う。この際、組み合わせ例を参考にして、サンプル間でインデックス配列が重ならないように注意してください。

反応組成：		反応条件：
10xEx buffer	2.0ul	94℃：2min
dNTPs (each 2.5mM)	1.6ul	94℃：30sec
2nd primer mix (each 5uM)	2.0ul	60℃：30sec 8-12 cycles
Template DNA (1st PCR)	2.0ul	72℃：60sec
Ex-taq (5units/ul)	0.2ul	72℃：5min
Milli-Q 水	12.2ul	4℃：infinite

Total	20ul	

2nd primer mix は下記のプライマーを混合したものです。

2nd Forward primer：

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXXACACTCTTTCCCTACACGACGC

2nd Reverse primer：

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATXXXXXXXXXGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG

*XXXXXXXXX：インデックス配列

組み合わせ例：

サンプル	2nd primer mix	サンプル	2nd primer mix	サンプル	2nd primer mix
A	F1-R1	E	F5-R1	I	F1-R2
B	F2-R1	F	F6-R1	J	F2-R2
C	F3-R1	G	F7-R1	K	F3-R2
D	F4-R1	H	F8-R1	L	F4-R2

【AMpure を用いたビーズ精製】

20ul の PCR 産物に対して、AMpure を 20ul 添加する。80%エタノールで wash を 2 回行い、10mM Tris-HCl (pH 8.0) 20ul で溶出する。

【サンプル送付】

精製した DNA を 8 連チューブに入れて冷蔵便で送付してください。濃度と液量は、10ng/μl、20μl 以上でお願いします。濃度が満たない場合はご相談ください。