

### 【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。

また、テンプレート DNA 量を多くした方が検出される生物種も増えますが、PCR の反応阻害も起こる場合がございます。その場合は、テンプレート DNA 量を減らして下さい。

反応組成：		反応条件：
10xEx buffer	2.0ul	94℃：2min
dNTPs (each 2.5mM)	1.6ul	94℃：20sec
10 uM Forward primer (MiFish_MIX_F)	1.0ul	65℃：15sec   35 cycles
10 uM Reverse primer (MiFish_MIX_R)	1.0ul	72℃：20sec
Template DNA (~50ng)	1.0ul	72℃：5min
Ex-taq	0.2ul	4℃：infinite
Milli-Q 水	13.2ul	
-----		
Total	20ul	

#### MiFish\_MIX\_F：

ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-**NNNNNN**-**GTCGGTAAACTCGTGCCAGC**

および ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-**NNNNNN**-**GTTGGTAAATCTCGTGCCAGC**

#### MiFish\_MIX\_R：

GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-**NNNNNN**-**CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG**

および GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-**NNNNNN**-**CATAGTGGGGTATCTAATCCTAGTTTG**

\*細字：アダプター配列、太字：MiFish 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 1~6 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 Miya M et al. R. Soc. open sci. (2015) 2:150088

### 【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 (おおよそ 100bp 以下) なので、ビーズ精製以外 (カラム精製やゲル切り出し) の方法でも可能です。

**【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℃：30sec
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：  
AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGC

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。

※カラム精製でも可能です。ゲル切り出しは濃度不足になる可能性があるので推奨しません。

**【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。