

製品コード R161A

研究用

Takara

16S (V3-V4) Metagenomic Library Construction Kit for NGS

説明書

v201904Da

本製品は、イルミナ社 MiSeq で 16S rRNA 細菌叢解析を行うための PCR 増幅キットです。細菌 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を対象とし、PCR 酵素に、多様な配列を効率よく増幅可能な Tks Gflex™ DNA Polymerase を採用しています。

V3-V4 領域の増幅には使用実績の高い 341F、806R プライマーを採用しており (VIII. 参考文献 1～2、図 1)、プライマーの 5' 側には、Illumina MiSeq 用の overhang 配列が付加されています。本製品で増幅した PCR 産物に、Nextera XT Index Kit (イルミナ社) のプライマーでシーケンスアダプターと検体ごとのシーケンスデータを識別するための Index 配列を付加することにより、MiSeq 用のライブラリーを調製します (図 2)。

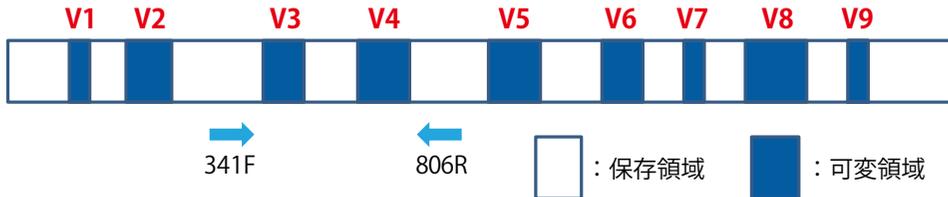


図 1. 16S rRNA の可変領域と本製品の PCR 増幅領域

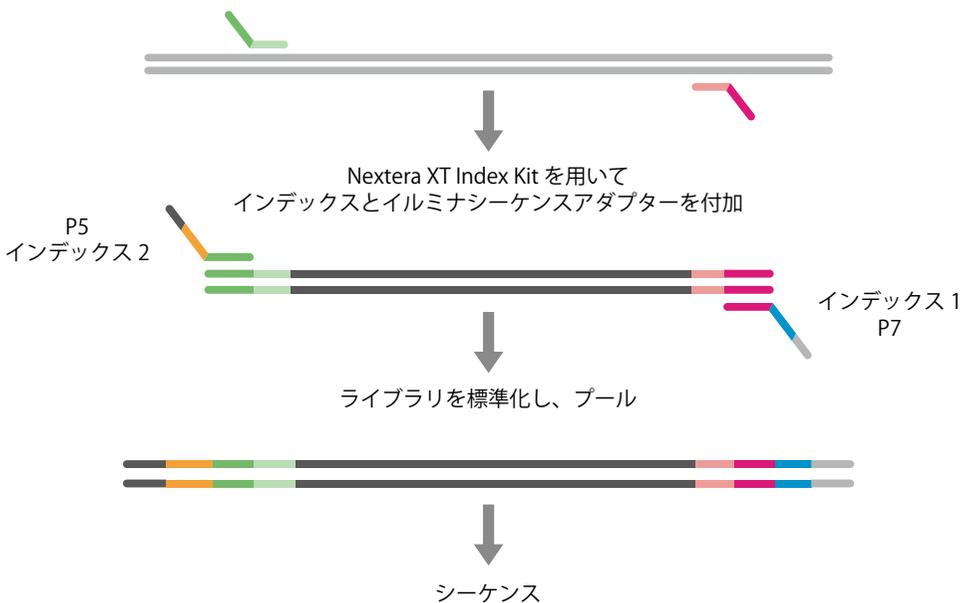
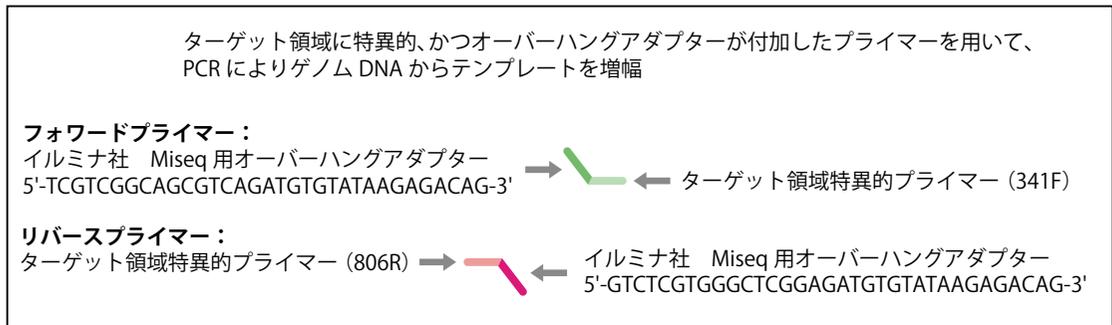


図 2. ライブラリー作製のフロー

I. 内容 (50 テスト)

1. 2 × Gflex PCR Buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus)	1.25 ml
2. Tks Gflex DNA Polymerase (1.25 units/μl)	62.5 U (50 μl)
3. 16S V3-V4 Primer Mix (10 ×)	125 μl
4. H ₂ O	1 ml

II. 保存

− 20°C

III. キット以外に必要な試薬、機器など (主なもの)

- ・核酸抽出キット
 - [糞便試料の場合]
NucleoSpin DNA Stool (製品コード 740472.10/.50) など
 - [土壌試料の場合]
NucleoSpin Soil (製品コード 740780.10/.50/.250) など
- ・PCR 産物の精製
 - Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter 社 Code. A63880/A63881/A63882)
 - 0.2 ml 磁気スタンド : Magnetic Separator-PCR Strip (製品コード 635011) など
 - 80% エタノール
 - 溶出液 (10 mM Tris-HCl, pH8.5)
- ・シーケンスアダプターと Index 配列の付加
 - Nextera XT Index Kit (イルミナ社 Code. FC-131-1001/FC-131-1002)
 - Nextera XT Index Kit v2 set A-D (イルミナ社 Code. FC-131-2001 ~ 2004)
- ・サーマルサイクラー
 - TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)
 - TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient (製品コード TP600) など
- ・アガロース電気泳動装置
 - Mupid-2plus (製品コード M-2P)
 - Mupid-exU (製品コード EXU-1) など
- ・アガロースゲル
 - Agarose L03「TAKARA」(製品コード 5003/5003B)
 - PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A) など
- ・微量高速遠心機
- ・マイクロピペットおよびチップ

IV. 操作上の注意

1. PCR 装置の取扱いは各装置の取扱説明書に従ってください。
2. 反応液の調製から検出まで、次の 4 エリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します。エリア 4 以外では、増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。
 - エリア 1 : PCR 反応液の調製、分注を行います。
 - エリア 2 : 検体の調製 (DNA 抽出等) を行います。
 - エリア 3 : PCR 反応液への鋳型 DNA の添加を行います。
 - エリア 4 : 電気泳動等、PCR 増幅産物の解析を行います。

V. 操作

V-1. 1st PCR

検体から抽出した DNA を鋳型として本製品のプライマーと PCR 酵素による V3-V4 領域の増幅を行う。ネガティブコントロールとして、鋳型 DNA の代わりに H₂O を添加した反応を並行して実施する。

1. 以下の反応液を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)
DNA 抽出液と H₂O 以外のマスターミックスを必要数 + α 分まとめて調製し、PCR 用チューブに分注する。

< 1 反応当り >

試薬	使用量
2 × Gflex PCR Buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus)	12.5 μ l
16S V3-V4 Primer Mix (10 ×)	2.5 μ l
Tks Gflex DNA Polymerase	0.5 μ l
DNA 抽出液または H ₂ O	x μ l*
H ₂ O	9.5 - x μ l
Total	25 μ l

* : 検体 DNA 抽出液はこの段階では加えません。

そのうちの一本に陰性コントロールとして H₂O を加え反応チューブのキャップをしっかり閉める。

2. DNA 抽出液を添加する。(エリア 3 で実施)

※ DNA 添加量は 1 反応あたり 10 ng 程度が最適です。10 ng に満たない場合は、最大持ち込み量 (9.5 μ l) の DNA 抽出液を添加してください。

3. 以下の条件で反応を実施する。

< 初期変性 >

94°C 1 分

< PCR : 28 サイクル >

98°C 10 秒

50°C 15 秒

68°C 15 秒

< Hold >

4°C Hold

V-2. 1st PCR 増幅産物の精製

1st PCR の増幅産物を Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter 社) を用いて精製する。

1. 準備

- Agencourt AMPure XP の磁性ビーズが十分に分散するよう、よく混合する。

2. 増幅産物と Agencourt AMPure XP の結合

- 以下の比率で PCR 産物に Agencourt AMPure XP を添加する。

PCR 産物	25 μ l
Agencourt AMPure XP	20 μ l

- よく混合する
- 室温で 15 分インキュベート
- スピンドアウン
- 磁気スタンドに置き、5 分静置
- 上清を除去

3. 1 回目の洗浄

- 磁気スタンドに置いたまま、80% エタノールを 200 μ l 加える。
- 室温で 30 秒インキュベート
- 80% エタノールを除去

4. 2 回目の洗浄

- もう一度「1 回目の洗浄」と同じ操作を行う。
- スピンドアウン
- 磁気スタンドに置き、1 分静置
- 残った 80% エタノールを除去

5. ビーズの乾燥

- 室温で 1 分間乾燥

6. 増幅産物の溶出

- 30 μ l の溶出液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) を添加。
- 静かにタッピングし、よく混合
- 室温で 5 分インキュベート
- 磁気スタンドに置き、5 分間静置
- 上清を回収

※ 必要に応じて精製後、電気泳動により増幅産物が得られていることを確認してください。

※ 増幅鎖長は約 550 bp です。

V-3. 2nd PCR

V-2. で精製した 1st PCR 増幅産物を鋳型として、2nd PCR を行う。2nd PCR には、本製品の PCR 試薬と Nextera XT Index Kit (イルミナ社) のプライマーを使用する。Nextera XT Index Kit にて検体ごとに異なる Index primer の組み合わせとなるように 2nd PCR を実施する。

1. 以下の反応液を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)
1st PCR 精製産物以外のマスターミックスを必要数 + α 分まとめて調製し、PCR 用チューブに分注する。

< 1 反応当り >

試薬	使用量
2 × Gflex PCR Buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus)	12.5 μ l
Index 1 primer	2.5 μ l
Index 2 primer	2.5 μ l
Tks Gflex DNA Polymerase	0.5 μ l
1st PCR 精製産物	2.0 μ l*
H ₂ O	5.0 μ l
Total	25 μ l

* : 1st PCR 精製産物はこの段階では加えません。

2. 1st PCR 精製産物を添加する。(エリア 3 で実施)
3. 以下の条件で反応を実施する。

< 初期変性 >

94°C 1分

< PCR : 8 サイクル >

98°C 10秒

60°C 15秒

68°C 15秒

< Hold >

4°C Hold

V-4. 2nd PCR 増幅産物の精製

「V-2. 1st PCR 増幅産物の精製」と同様の操作で 2nd PCR 増幅産物の精製を行う。

- ※ 精製後、電気泳動により増幅産物がきちんと得られていることを確認してください。
- ※ 増幅鎖長は約 600 bp です。

V-5. 2nd PCR 産物の混合

各 PCR 産物量が等モルになるように 1 本のチューブに混合する。

- ※ PCR 産物の濃度測定には Qubit dsDNA BR Assay Kit または HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific 社) などを用いて 2 本鎖 DNA を定量することを推奨します。
- ※ 別途イルミナ社より提供されているプロトコールでの等モル混合も可能です。詳細は 16S metagenomic sequencing library preparation Part#15044223 Rev.B (VIII. 参考文献 3) の 16 ページをご参照ください。
- ※ シーケンスリード後半の品質が高い MiSeq 250 bp ペアエンドでのシーケンスを推奨します。

VI. トラブルシューティング

● PCR 増幅産物が確認できない場合

PCR 増幅が確認できない場合は PCR 阻害物質の混入が予想されます。1st PCR に供するゲノム DNA サンプルの AMPure 精製やカラム精製を実施してください。カラム精製に関しては NucleoSpin gDNA Clean-up XS (製品コード 740904.10/.50/.250) を推奨します。

● 検体ごとにシーケンスデータが取得できない場合

2nd PCR で付与する Index 配列の組み合わせをご確認ください。Index 配列の組み合わせに関する詳細は 16S metagenomic sequencing library preparation Part#15044223 Rev.B (VIII. 参考文献 3) の 23 ~ 25 ページをご参照ください。

VII. 関連製品

NucleoSpin DNA Stool (製品コード 740472.10/.50) など
NucleoSpin Soil (製品コード 740780.10/.50/.250) など
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Gradient* (製品コード TP600)
NucleoSpin gDNA Clean-up XS (製品コード 740904.10/.50/.250)

VIII. 参考文献

- 1) Klindworth A, *et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan 7, **41**(1): e1.
- 2) Caporaso JG, *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 2012 Aug, **6**(8): 1621-1624.
- 3) 16S metagenomic sequencing library preparation Part#15044223 Rev.B
http://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf

IX. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- 解析により得られたシーケンス配列には一部環境由来の配列が含まれる可能性があります。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。Tks Gflex、PrimeGel はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社