製品コード RR180A

研究用

TaKaRa

Bacterial 16S rDNA PCR Kit

説明書

v202203Da

微生物の同定は、形態的特徴、生理・生化学的性状、化学分類学的性状などを利用して行われますが、これらの方法では同定までに時間を要します。また、同定が困難な場合や正しい結果が得られない場合もあります。
近年、微生物同定にも分子生物学を利用した方法が採用されるようになり、微生物の持つ DNA を対象として解析を行う方法が活用されています。そのターゲットの一つとして、遺伝子の長さが比較的長く、機能変化に伴う遺伝子変異の可能性が低い rDNA 領域が用いられています。
本キットは、細菌の 16S rDNA 領域内の特定領域（約 1.5 kb）を増幅するための試薬、および PCR により得られた増幅産物のシーケンスのためのプライマーから成るキットです。16S rDNA 領域を増幅するための PCR 酵素には *TaKaRa Ex Taq*® HS を使用していますので、サイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができます。本キットを使用して得られた増幅産物に対して、キットのシーケンスプライマーを用いた塩基配列解析を行い、得られた塩基配列とデータベース上の配列との相同検索により、細菌の分類を行います。

注意：本キットは、細菌の種類によっては適合しない場合があります。
なお、真菌の場合は、Fungal rDNA (ITS1) PCR Kit Fast（製品コード RR183A）、または、Fungal rDNA (D1/D2) PCR Kit Fast（製品コード RR184A）をご利用ください。

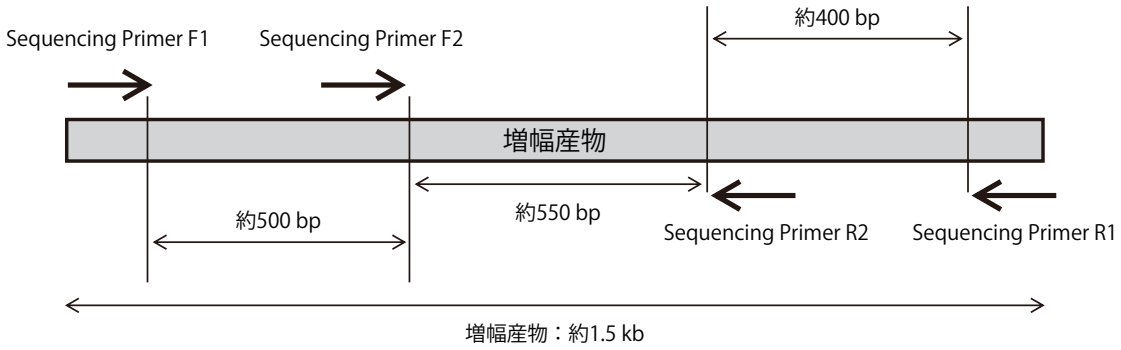
備考：第十八改正日本薬局方 参考情報「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」に収載されたプライマーを利用したキット Bacterial 16S rDNA PCR Kit Fast (800)（製品コード RR182A）も用意しています。詳細は弊社ウェブカタログでご確認ください。

I. 内容（25 μl PCR 反応系、50 回分）

1）*Premix Ex Taq*™ HS (2 × conc.)＊1	2 ×	625 μl
2）16S rDNA Primer Mix (bacterial)＊2	10 ×	125 μl
3）dH_2O		650 μl
4）Positive Control (*E. coli* DNA)	1 ng/μl	25 μl
5）Sequencing Primer F1 (bacterial)＊2	7.5 pmol/μl	50 μl
6）Sequencing Primer F2 (bacterial)	7.5 pmol/μl	50 μl
7）Sequencing Primer R1 (bacterial)＊2	7.5 pmol/μl	50 μl
8）Sequencing Primer R2 (bacterial)	7.5 pmol/μl	50 μl

＊1：*TaKaRa Ex Taq* HS、反応 Buffer、dNTP mixture を含む 2 倍濃度の PCR 反応試薬です。
＊2：16S rDNA Primer Mix (bacteria) に含まれるプライマーは、Sequencing Primer F1 (bacterial) および Sequencing Primer R1 (bacterial) と同じ配列です。

Sequencing Primer の位置関係については、下図をご参照ください。



図．増幅産物とシーケンスプライマーの位置関係

II. 保存

－ 20℃

Premix Ex Taq HS は、過剰に凍結融解を繰り返すと活性が低下する場合がありますのでご注意ください。
融解の際は激しい攪拌は避け、融解後は穏やかにチューブを転倒混和してください。

III. 使用に際して

本キットは不活化した細菌の 16S rDNA 領域を増幅します。
また、設計した Primer の配列内に遺伝子の変異や欠損／挿入が生じた際には、同定できない場合があります。

IV. キット以外に必要な試薬・機器（主なもの）

1）遺伝子増幅システム（authorized instruments）
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch*（製品コード TP350）
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient（製品コード TP600）

2）PCR チューブ
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap（製品コード NJ200）
0.2 ml Hi-8-Tube（製品コード NJ300）
0.2 ml Hi-8-Dome Cap（製品コード NJ301）
0.2 ml Hi-8-Flat Cap（製品コード NJ302）

3）アガロースゲル電気泳動装置
Mupid-2plus（製品コード M-2P）
Mupid-exU（製品コード EXU-1）
Mupid-One（製品コード O1-01）

4）アガロースゲル
Agarose L03「TAKARA」（製品コード 5003/B）
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve（製品コード 5810A）など

5）DNA 染色剤
SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain（製品コード 5760A/5761A）
エチジウムブロマイド
注）SYBR Green I を使用する場合は専用のフィルターが必要です。

6）マイクロ遠心機

7）マイクロピペットおよびチップ（オートクレーブ処理したもの）

8）DNA 調製試薬
SimplePrep™ reagent for DNA（製品コード 9180）
NucleoSpin Tissue（製品コード 740952.10/.50/.250）など

9）PCR 産物精製試薬
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up（製品コード 740609.10/.50/.250）など

V. 操作

V-1. DNA サンプルの調製

同定を行うための菌体サンプルにはコロニーもしくはコロニーより培養を行った培養液を使用し、以下の方法で PCR に用いる DNA サンプルを調製してください。複数の菌体の混合物では、PCR の際に複数の増幅産物が産生されるため、シーケンスによる塩基配列解析で正しい情報を得ることができません。複数の菌体混合物の場合は、増幅産物のクローニングを行った後、複数のクローンの塩基配列解析を行ってください。
DNA サンプルの調製の際、V-1-1. の「熱抽出による調製」で PCR に使用できる DNA サンプルが得られない場合は、V-1-2. ～ 5. の方法をお試しください。

V-1-1. 熱抽出による調製

1. コロニーから調製する場合は、マイクロチューブに入れた滅菌精製水 100 μl にコロニーより採取した菌体を懸濁する。培養液の場合は、培養液 50 μl をマイクロチューブに取り、遠心操作で上清を除去後、菌体に滅菌精製水 100 μl を添加して菌体懸濁液を作製する。
2. 1. の懸濁液を 95℃で 15 分間熱処理する。
3. 軽く遠心後、上清をサンプル DNA 液として使用する。

V-1-2. アルカリ熱抽出による調製

1. コロニーから調製する場合は、マイクロチューブに入れた滅菌精製水 50 μl にコロニーより採取した菌体を懸濁する。培養液の場合は、培養液 50 μl をマイクロチューブに取り、遠心操作で上清を除去後、菌体に滅菌精製水 50 μl を添加して菌体懸濁液を作製する。
2. 1. の懸濁液に 100 mM NaOH を 50 μl 添加し、混合後、95℃で 15 分間熱処理する。
3. 1 M Tris-HCl（pH7.0）を 11 μl 添加し混合する。
4. 軽く遠心後、上清をサンプル DNA 液として使用する。

V-1-3. SimplePrep reagent for DNA（製品コード 9180）による調製

1. コロニーから調製する場合は、マイクロチューブに入れた滅菌精製水 100 μl にコロニーより採取した菌体を懸濁する。培養液の場合は、培養液 50 μl をマイクロチューブに取り、遠心操作で上清を除去後、菌体に滅菌精製水 100μl を添加して菌体懸濁液を作製する。
2. 0.2 ml の PCR チューブに、SimplePrep reagent for DNA の Reagent A を 20 μl と Reagent B を 4 μl 混合し、1. の懸濁液 20 μl を加えて混合後、サーマルサイクラーを用いて 37℃で 6 分、さらに 95℃で 3 分の処理を行う。
3. 滅菌精製水 80 μl を加え、ピペッティングで混和したものをサンプル DNA 液として使用する。（PCR 反応系への持ち込みは、反応液の 1/10 量までとする。）

V-1-4. ビーズ処理による調製

市販の DNA 調製用のビーズを使用して調製することも可能である。イージー・ビーズ（住化分析センター／エーエムアール）を使用した調製方法を例として示す。

1. コロニーから調製する場合は、マイクロチューブに入れた滅菌精製水 100 μl にコロニーより採取した菌体を懸濁する。培養液の場合は、培養液 50 μl をマイクロチューブに取り、遠心操作で上清を除去後、菌体に滅菌精製水 100 μl を添加して菌体懸濁液を作製する。
2. 1. の懸濁液をイージー・ビーズが充填されたチューブに加える。
3. ビーズ破砕機にかける、あるいはボルテックスミキサーを用いて最大スピードで 2 分間処理する。
4. 滅菌精製水 100 μl を加え、軽く混合した後に遠心を行い、上清をサンプル DNA 液として使用する。

V-1-5. NucleoSpin Tissue（製品コード 740952.10）による調製

200 μl の Buffer T1 にコロニーを懸濁、または菌体ペレットに 200 μl の Buffer T1 を加えて懸濁させたものを準備し、プロトコールに従って抽出を行う。

【注意】サンプル DNA 液は使用するまで 4℃で保存し、できるだけ早くご使用ください。直ちに使用しない場合は、－ 20℃で保存してください。

V-2. 16S rDNA 領域の増幅

（1）以下の反応液を準備する。

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量
Premix Ex Taq HS (2 ×)	12.5 μl
16S rDNA Primer Mix (bacteria) (10 ×)	2.5 μl
サンプル DNA 液	1 ～ 2.5 μl＊3
dH_2O	X μl＊4
Total	25 μl

＊ 3：サンプル DNA 液以外のコンポーネントで反応液を調製し、0.2 ml チューブに分注後に加えてください。サンプル DNA 液の調製法によっては、PCR を阻害することがあります。その際には、使用するサンプル DNA 液量を少なくする、滅菌精製水で希釈をして使用するなど、適宜検討してください。

＊ 4：使用するサンプル DNA 液の量に応じて、最終反応容量が 25 μl となるように加えてください。

反応後に電気泳動、精製などを行った際に、得られた増幅産物量が塩基配列解析に不足すると考えられる場合は、反応液を倍量にして反応を行ってください。

（2）調製した反応液を 0.2 ml チューブに分注する。

（3）サンプル DNA 液を加え、サーマルサイクラーにセットする。
必要に応じて、Negative Control としてサンプル DNA 液の代わりに dH_2O を加えたもの、Positive Control として Positive Control (*E. coli* DNA) を 1 μl 加えたものを用意する。

（4）以下の条件で PCR を行う。

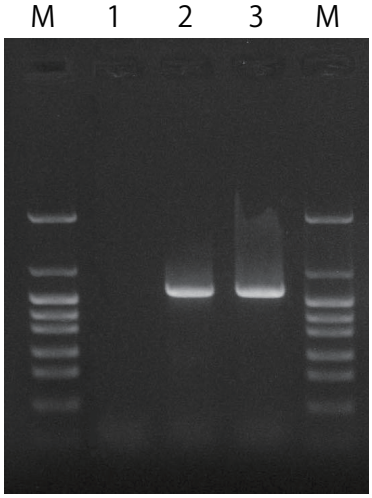
94℃　1 min.
↓
94℃　30 sec.
55℃　30 sec.　30 cycles＊5
72℃　1 min.
↓
72℃　3 min.

＊ 5：PCR 増幅産物を増やすためにサイクル数を増やすことも可能ですが、その場合、Negative Control において環境由来の細菌の増幅が見られる可能性があります。

反応終了後、解析するまでに時間がある場合は、－ 20℃で保存する。

V-3. 増幅産物の確認

反応終了後、反応液の一部をアガロースゲル電気泳動に供する（1% agarose gel など）。Positive Control (*E. coli* DNA) およびサンプル DNA 液を用いた場合、約 1.5 kb（～約 1.7 kb）の増幅産物が得られていることを確認する。



1： Negative Control
2： サンプル DNA 液
3： Positive Control (*E. coli* DNA)
M：pHY Marker

1% agarose gel

V-4. DNA 増幅産物の精製

増幅産物を電気泳動で確認した後、シーケンス解析を行うために PCR 反応液を精製する。約 1.5 kb（～約 1.7 kb）の単一バンドが得られた場合、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up（製品コード 740609.10）などを使用して精製を行う。非特異的バンドが認められた場合は、電気泳動後、アガロースゲルから目的バンドを回収し、精製する。（アガロースゲルからの精製にも、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up が使用できる。）
精製後、A_{260} の吸光度を測定し、得られた精製増幅産物の収量を算出する。

V-5. DNA 増幅産物のシーケンス解析

得られた精製増幅産物をシーケンス解析する。
シーケンス用のプライマーは 4 種類用意しているが、I. 内容で示している位置関係から、適宜プライマーを選択して使用する。

＜シーケンスプライマーの選択＞

◎片鎖解析

- Sequencing Primer F1 と Sequencing Primer R1 の 2 種類のプライマーで増幅産物全体のシーケンスデータを得ることは可能であるが、中央部分の精度がやや低下する。
- 上記 2 種類に Sequencing Primer F2 あるいは Sequencing Primer R2 のどちらかを加えた 3 種類のプライマーを使用すると、より精度の高い結果が得られる。

◎両鎖解析の場合

Sequencing Primer F1、Sequencing Primer F2、Sequencing Primer R1、Sequencing Primer R2 の 4 種類のプライマーを使用する。精度の高いシーケンスデータが得られる。

※ シーケンス解析には、タカラバイオ受託サービス「プレミックスシーケンス解析」のご利用をお勧めします。

＜プレミックスシーケンス解析にご依頼いただく場合＞

Sequencing Primer 毎に以下の混合物を準備する。

精製増幅産物	20 ～ 150 ng
Sequencing Primer (7.5 pmol/μl)	1 μl
滅菌精製水	全量を 15 μl とする

上記混合物を 1 つのウェルに分注する。

- 精製して得られた増幅産物を 1 反応につき 20 ～ 150 ng ご用意ください。（1 サンプルについて最大 4 反応となりますので、最大 80 ～ 600 ng の精製増幅産物が必要となります。）
- 1 つの反応ウェルについて 1 つの Sequencing Primer (7.5 pmol/μl) を 1 μl 加え、全量を 15 μl/ ウェルとなるように調製いただき、ご送付ください。

詳細は弊社ウェブサイト「プレミックスシーケンス解析（8 連チューブ／ 96 ウェルプレート）」をご参照ください。

【注意】シーケンスは、ご自身で行われることも可能です。
その場合、キットのシーケンス用プライマーは 7.5 pmol/μl となっていますので、適宜使用量を調整してご使用ください。

V-6. 塩基配列情報の解析

得られた塩基配列情報をデータベース上の配列と相同性検索＊6 を行い、その結果より細菌の種類を類推します。

＊ 6：BLAST 検索は、BLAST アルゴリズムを実装したプログラムをダウンロードして利用することができます。
NCBI：https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/

NCBI BLAST や DDBJ のウェブ上で使用することもできます。
NCBI BLAST：https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
DDBJ：https://www.ddbj.nig.ac.jp/services/blast.html

VI. トラブルシューティング

PCR 産物が確認されない。

・プロトコールに従って増幅を行うのに十分なサンプルが得られていない。
→ DNA 調製に使用する菌体量を増やしてください。
→ 別の DNA サンプル調製方法を試してください。

・PCR の阻害がある。
→ 調製した DNA サンプルを適宜希釈して使用してください。

・対象微生物が真菌である。
→ 真菌増幅用のキット（Fungal rDNA (ITS1) PCR Kit Fast（製品コード RR183A）、または、Fungal rDNA (D1/D2) PCR Kit Fast（製品コード RR184A）を使用してください。

VII. 関連製品

Bacterial 16S rDNA PCR Kit Fast (800)（製品コード RR182A）
Fungal rDNA (ITS1) PCR Kit Fast（製品コード RR183A）
Fungal rDNA (D1/D2) PCR Kit Fast（製品コード RR184A）
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch*（製品コード TP350）
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient（製品コード TP600）
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap（製品コード NJ200）
0.2 ml Hi-8-Tube（製品コード NJ300）
0.2 ml Hi-8-Dome Cap（製品コード NJ301）
0.2 ml Hi-8-Flat Cap（製品コード NJ302）
SimplePrep™ reagent for DNA（製品コード 9180）
NucleoSpin Tissue（製品コード 740952.10/.50/.250）
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up（製品コード 740609.10/.50/.250）

VIII. 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。

・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。

・*TaKaRa Ex Taq*、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。*Premix Ex Taq*、PrimeGel、SimplePrep はタカラバイオ株式会社の、SYBR は Life Technologies Corporation 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　https://www.takara-bio.co.jp
タカラバイオ株式会社

v202203Da