

製品コード NN0002

研究用

Takara

**16S DNA Quantitative Standard
for Microbiome**

説明書

v202407Da

本製品は、次世代シーケンサー（NGS）で定量的な 16S rRNA 細菌叢解析を行うことができる人工核酸標準物質です。異なる 12 種類の人工 16S rRNA 遺伝子（rDNA）の可変領域（V1～V9）が設計されており、それぞれが既定のコピー数で混合されています。自然界に存在しない人工配列を用いているため、解析サンプルにスパイクインをしても菌叢解析に影響を与えず、あらゆる生体サンプルにスパイクインすることが可能です（図 1）。本製品を解析サンプル DNA にスパイクインして 16S rRNA NGS 解析を実施し、X 軸に各標準配列の 16S rDNA copy 数理論値、Y 軸に各標準配列の取得 read 数をプロットして検量線を作成することで、従来の 16S rRNA NGS 解析では困難であった菌の絶対定量が可能です（表 1）。また、本製品をコントロールとすることで、試験デザインの性能評価や、試験ごとの精度管理に用いることが可能です。

本プロトコールでは Sequence Library 作成に 16S (V3-V4) Metagenomic Library Construction Kit for NGS（製品コード R161A）を用いますが、本製品の人工配列は V1～V9 の領域全てを含んでいるため、16S rRNA NGS 解析の手法は本プロトコールに限定されません。

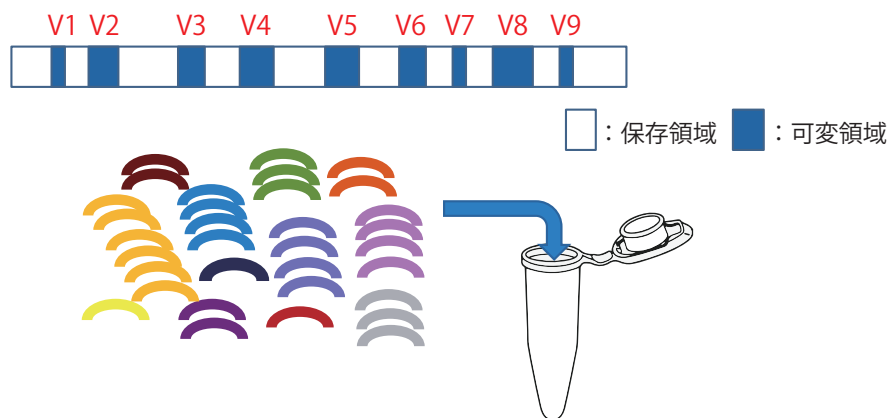


図 1. 12 種類の 16S rDNA 配列を異なるコピー数で混合

可変領域には設計された人工配列を用いており、保存領域は 16S rDNA の配列を用いています。そのため、保存領域にプライマーを設計することで菌の持つ 16S rDNA 配列と、本標準品の 16S rDNA 配列を同時に増幅することが可能です。

表 1. 原液 16S DNA Quantitative Standard (1.3×10^8 copies/ μ l) の組成

identifier	GenBank accession number	16S rDNA (copies/ μ l)	16S rDNA copies (%)
Std_01	LC140931	6.31×10^7	47.39
Std_02	LC140932	3.32×10^7	24.93
Std_03	LC140933	1.75×10^7	13.14
Std_04	LC140934	9.20×10^6	6.91
Std_05	LC140935	4.84×10^6	3.63
Std_06	LC140936	2.55×10^6	1.91
Std_07	LC140937	1.34×10^6	1.01
Std_08	LC140938	7.06×10^5	0.53
Std_09	LC140939	3.72×10^5	0.28
Std_10	LC140940	1.96×10^5	0.15
Std_11	LC140941	1.03×10^5	0.08
Std_12	LC140942	5.42×10^4	0.04

I. 内容 (200 回分)

○ 16S DNA Quantitative Standard	1.3×10^8 copies/ μ l	20 μ l
16S DNA Dilution Buffer		300 μ l

II. 保存

− 20°C

III. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器 (主なもの)

【試薬】

- ・核酸抽出キット
 - [糞便の場合]
NucleoSpin DNA Stool (製品コード 740472.10/.50/.250) 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
 - NucleoMag NGS Clean-up and Size Select (製品コード 744970.5/.50/.500) など
 - 80%エタノール
 - 溶出液 (10 mM Tris-HCl, pH8.5)
- ・16S rRNA Sequence Library 作製キット
 - 16S (V3-V4) Metagenomic Library Construction Kit for NGS (製品コード R161A)
 - Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A-D, Tagmentation (v3)
 - (Illumina 社 Code. 20091654/20091656/20091658/20091660)

【器具】

- ・0.2 ml 磁気スタンド
 - SMARTer-Seq® Magnetic Separator - PCR Strip (製品コード 635011) など
- ・マイクロピペットおよびチップ
- ・PCR 用のチューブなど

【機器】

- ・サーマルサイクラー
 - Clontech PCR Thermal Cycler GP (製品コード WN400) など
- ・微量高速遠心機

IV. 操作上の注意

1. マスターミックスの調製から検出まで、次の4つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します (VII. 補足：エリア分けについてを参照)。コンタミネーション発生の原因となりますので、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。
2. サーマルサイクラーの取扱いは、それぞれの装置の取扱説明書に従ってください。

V. 操作

16S (V3-V4) Metagenomic Library Construction Kit for NGS (製品コード R161A) を用いた 16S rRNA 遺伝子定量解析方法を以下に示します。

【注意】10 ng の DNA サンプルに対し、 1.3×10^7 copies の 16S DNA Quantitative Standard を混合することで、多くの菌が検量線に乗るよう設計されています。DNA サンプルにホストゲノムなどが多く含まれる場合等、検量線から外れる場合は用いる DNA サンプルの量を増やす等の調整をしてください。

V-1. 10 倍希釈 16S DNA Quantitative Standard (1.3×10^7 copies/ μ l) の調製

16S DNA Quantitative Standard を 16S DNA Dilution Buffer で 10 倍希釈する。
(エリア3で実施)

【注意】・希釈液は必ず用時調製してください。

- ・原液 16S DNA Quantitative Standard (1.3×10^8 copies/ μ l) を 5 μ l 以上使用して調製してください。

[調製例]

1. 45 μ l の 16S DNA Dilution Buffer を 1.5 ml マイクロチューブに分注する。
2. 16S DNA Quantitative Standard (1.3×10^8 copies/ μ l) を 5 μ l 添加し、よく混合後、スピンドウンする。

V-2. 1st PCR

検体から抽出したDNAサンプルを鋳型として、16S (V3-V4) Metagenomic Library Construction Kit for NGS (製品コード R161A) により、V3～V4 領域の増幅を行う。

1. マスターミックス 1 を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)

必要反応数 (DNA サンプル数+ネガティブコントロール) + α 分のマスターミックス 1 を調製する。 α は必要反応数の 10% 程度を目安とする。

<マスターミックス 1 (1 反応あたり)>

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
Total	15.5 μ l

2. ネガティブコントロール用として 15.5 μ l のマスターミックス 1 を PCR 用チューブに分取する。分取した PCR 用チューブに 16S (V3-V4) Metagenomic Library Construction Kit for NGS (製品コード R161A) の H₂O を 9.5 μ l 加え、チューブのキャップをしっかり閉める。
3. マスターミックス 2 を氷上で調製する。(エリア 3 で実施)
2. で分取した残りのマスターミックス 1 に、必要本数 (DNA サンプル数) + α 分の 10 倍希釈 16S DNA Quantitative Standard を添加してマスターミックス 2 を調製し、16.5 μ l ずつ PCR 用チューブに分注する。

<マスターミックス 2 (1 反応あたり)>

試薬	使用量
マスターミックス 1	15.5 μ l
10 倍希釈 16S DNA Quantitative Standard (1.3×10^7 copies/ μ l)	1.0 μ l
Total	16.5 μ l

4. DNA サンプルを添加し、合計で 25 μ l となるように H₂O を加える。(エリア 3 で実施)
※ DNA サンプル添加量は 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 (8.5 μ l) を添加してください。

マスターミックス 2	16.5 μ l
DNA サンプル	x μ l (10 ng)
H ₂ O	up to 25 μ l

5. 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-3. Purification of Amplified DNA

1st PCR の増幅産物を NucleoMag NGS Clean-up and Size Select (製品コード 744970.5 / .50 / .500) を用いて精製する。

1. 準備

- 1) NucleoMag NGS Bead Suspension は、使用する 30 分前に室温に戻す。
- 2) NucleoMag NGS Bead Suspension の磁性ビーズが分散するよう、良く混合する。

2. 増幅産物と NucleoMag NGS Bead Suspension の結合

- 1) 以下の比率で PCR 産物に NucleoMag NGS Bead Suspension を添加する。

PCR 産物	25 μ l
NucleoMag NGS Bead Suspension	20 μ l

- 2) ただちによく混合する。
- 3) 室温で 5 分間静置する。
- 4) スピンドアウンを行い、磁気スタンドに置き、5 分間静置する。
- 5) 磁気スタンドにチューブを置いたまま上清をピペットで除去する。

3. 洗浄

1 回目の洗浄

- 1) 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。
- 2) 室温で 30 秒間静置する。
- 3) 上清の 80%エタノールを除去する。

2 回目の洗浄

「1 回目の洗浄」と同じ操作を再び行う。

4. ビーズの乾燥

磁気スタンドにチューブを立てたまま室温にて 5～15 分間静置する。

5. 増幅産物の溶出

- 1) 30 μ l の溶出液 (10 mM Tris-HCl, pH8.5) を添加し、蓋をする。
- 2) 磁気スタンドからチューブを外して静かにタッピングし、よく混合する。
- 3) 室温で 2～5 分間静置する。
- 4) 磁気スタンドに置き、5 分間静置する。
- 5) 上清を新しいチューブに回収する。

※ 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。
(エリア 4 で実施)

※ 増幅鎖長は約 550 bp です。

SAFE STOPPING POINT :

直ぐに「V-4. 2nd PCR」に進まない場合は、- 20°C で保管してください。

V-4. 2nd PCR

V-3. 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、16S (V3-V4) Metagenomic Library Construction Kit for NGS (製品コード R161A) の PCR 試薬と、Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A-D, Tagmentation (v3) (Illumina 社) または同等品を使用する。DNA サンプルごとに異なる Index primer の組み合わせとなるように 2nd PCR を実施する。

1. マスターミックスを氷上で調製する。(エリア 1 で実施)

- 1) 必要反応数 (DNA サンプル数 + ネガティブコントロール) + α 分を調製する。 α は必要反応数の 10% を目安とする。
PCR 用チューブに 18 μ l ずつ分注する。

<マスターミックス (1 反応あたり)>

試薬	使用量
2 × Gflex PCR Buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus)	12.5 μ l
Tks Gflex DNA Polymerase	0.5 μ l
H ₂ O	5.0 μ l
Total	18 μ l

2) DNA サンプルごとに異なる Index primer を 5 μ l 添加する。

2. 1st PCR 精製産物を 2 μ l 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-5. Purification of Amplified DNA

「V-3. Purification of Amplified DNA」と同様の操作で 2nd PCR 増幅産物の精製を行う。

※ 精製したライブラリーは、- 20°C で保存してください。

V-6. Amplified DNA QC

精製後、濃度測定や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する。

※ 増幅鎖長は約 600～800 bp です。(エリア 4 で実施)

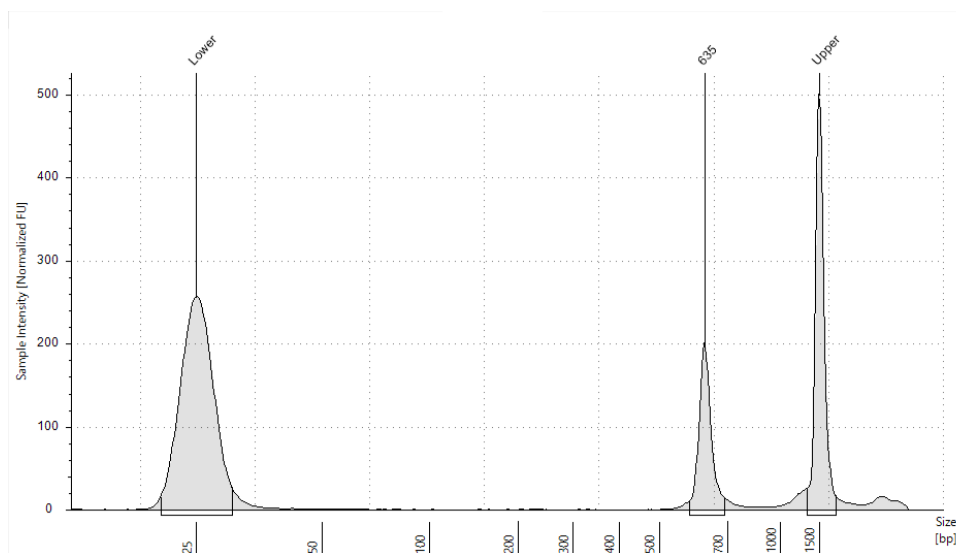


図 2. 精製ライブラリーのサイズ分布例

本製品のプロトコールに従って作製したライブラリーについて、TapeStation D1000 (Agilent 社) で増幅産物のサイズを測定した。良好なライブラリーにおいては 600～800 bp 付近にシャープなピークが確認される。

V-7. 2nd PCR 産物の混合

各 PCR 産物が等モルになるように 1 本のチューブに混合し、Illumina 社のシーケンサーを用いて塩基配列を取得する。

※ PCR 産物の濃度測定には Qubit dsDNA BR Assay Kit または Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific 社) などを用いて二本鎖 DNA を定量することを推奨します。

VI. 解析

1. 取得したシーケンスリードから OTU (操作的分類単位: Operational Taxonomy Unit) を構築する。
2. 構築した OTU から代表配列の抽出を行い、OTU に対して菌叢系統分類を実施する。
3. 系統分類された菌叢と人工的な 16S rRNA 遺伝子の核酸標準物質についての read 数を取得する。
4. 各標準配列の 16S rDNA copy 数理論値を X 軸、各標準配列の取得 read 数を Y 軸にプロットして検量線を作成し、各菌の read 数から 16S rDNA コピー数を算出する (表 2)。

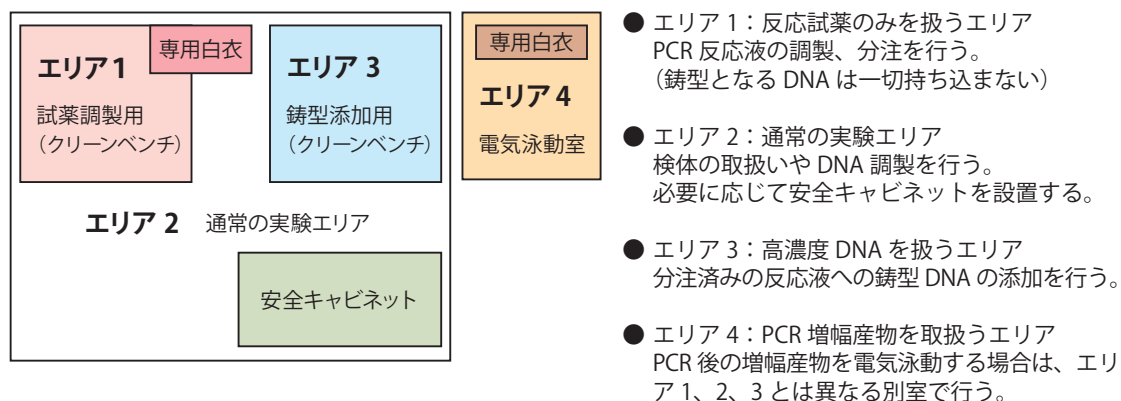
表 2. 10 倍希釈 16S DNA Quantitative Standard (1.3×10^7 copies/ μ l) の組成

identifier	GenBank accession number	16S rDNA (copies/ μ l)	16S rDNA copies (%)
Std_01	LC140931	6.31×10^6	47.39
Std_02	LC140932	3.32×10^6	24.93
Std_03	LC140933	1.75×10^6	13.14
Std_04	LC140934	9.20×10^5	6.91
Std_05	LC140935	4.84×10^5	3.63
Std_06	LC140936	2.55×10^5	1.91
Std_07	LC140937	1.34×10^5	1.01
Std_08	LC140938	7.06×10^4	0.53
Std_09	LC140939	3.72×10^4	0.28
Std_10	LC140940	1.96×10^4	0.15
Std_11	LC140941	1.03×10^4	0.08
Std_12	LC140942	5.42×10^3	0.04

<検量線評価ポイント>

- ・ 各 16S rDNA 配列の 16S rDNA copy 数と read 数の pearson 相関係数 ≥ 0.96 となること。
- ・ $Y=aX+b$ の近似式について、決定係数 $R^2 > 0.90$ であること。

VII. 補足：エリア分けについて



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) Tourlousse D, *et al.* Synthetic spike-in standards for high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing. *Nucleic Acids Res.* 2017 Feb 28; **45**(4): e23.

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。
- 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。
- SMARTer-Seq は Takara Bio USA, Inc. の登録商標です。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