製品コード NN0006
NN0007

研究用

TaKaRa

# GRAS-Di™ Genotyping Library Prep Kit

（製品コード NN0006）

# GRAS-Di™ Genotyping Library Prep Kit for Plant

（製品コード NN0007）

# 説明書

v202611w

# 目次


I. 製品概要 ..... 3

II. 内容 ..... 4

III. 保存 ..... 4

IV. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器（主なもの） ..... 4

V. インプット DNA について ..... 5

VI. 組織片のインプット量について ..... 5

VII. 操作上の注意 ..... 6

VIII. 操作 ..... 7

A. 標準プロトコール ..... 8

B. オプションプロトコール（ダイレクト法） ..... 14

IX. シーケンシング ..... 18

X. GRAS-Di™ Index Primer Plate について ..... 18

XI. トラブルシューティング ..... 19

XII. 参考文献 ..... 19

XIII. 関連製品 ..... 19

XIV. 注意 ..... 20

## I. 製品概要

本製品は、GRAS-Di（Genotyping by Random Amplicon Sequencing-Direct）技術を利用して、ゲノム DNA からイルミナ社の次世代シーケンサー（NGS）解析用ライブラリーを調製するためのキットです。得られたライブラリーをシーケンスすることで、多型検出や集団遺伝解析に適した高品質なジェノタイピングデータを取得できます。取得したデータは、連鎖地図構築、QTL 解析などの遺伝解析に利用でき、生態学や育種の分野で幅広く応用できます。
GRAS-Di は、ゲノム上の多数の領域を PCR で増幅して DNA マーカーを取得するジェノタイピング技術です。PCR 増幅に独自設計のランダムプライマーを用いることにより、特定の制限酵素認識配列や既知領域に依存することなく、多数の DNA マーカーを取得できます。
さらに、検体間で再現性の高いジェノタイピングデータが得られます。また、リファレンスゲノム情報が整備されていない生物種にも適用可能であり、植物、魚類、畜産動物をはじめとする多様な生物種で利用されています。

本製品では 2 種類のプロトコールを選択できます。精製ゲノム DNA を用いる標準プロトコールでは、同一チューブまたはウェル内で連続的にライブラリー調製を行うことができ、100 pg からの極微量 DNA に対応しています。一方で、ゲノム DNA 抽出を行わずに組織片から直接ライブラリーを調製できるオプションプロトコール（ダイレクト法）では、DNA 抽出工程の省略による作業時間の短縮および多検体処理の効率化が期待できます。
ライブラリー調製反応は、標準プロトコールとダイレクト法のいずれにおいても約 2 時間で完了します。

ライブラリー調製は以下の 2 つのステップで構成されます。

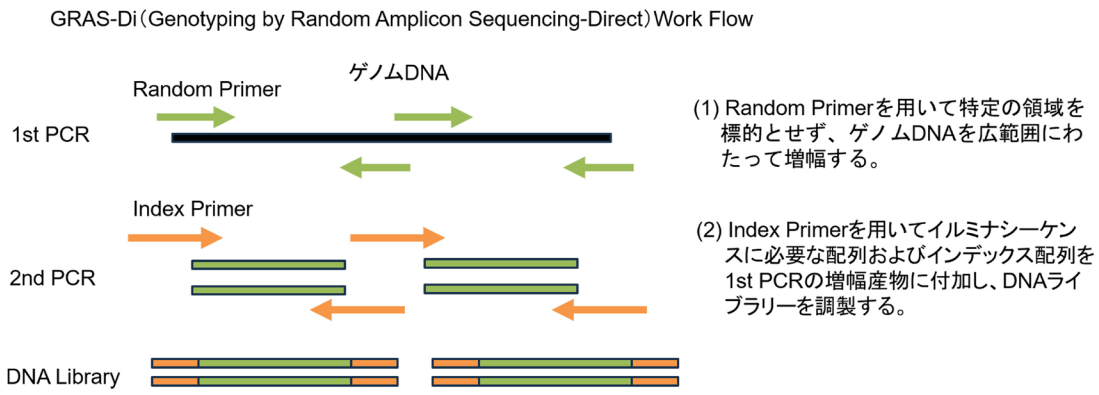



図 1. ライブラリー調製フロー

## II. 内容（96 回分）

**GRAS-Di Genotyping Library Prep Kit（製品コード NN0006）**

| | | |
|---|---|---|
| ① | GRAS-Di™ 1st PCR Premix | 625 μl |
| ② | GRAS-Di™ Primer Mixture | 240 μl |
| ③ | GRAS-Di™ 2nd PCR Premix | 800 μl ×3 |
| ◯ | Nuclease-Free Water | 1300 μl ×3 |
| （＊） | GRAS-Di™ Index Primer Plate | 5 μl/well |

**GRAS-Di Genotyping Library Prep Kit for Plant（製品コード NN0007）**

| | | |
|---|---|---|
| ① | GRAS-Di™ 1st PCR Premix | 625 μl |
| ② | GRAS-Di™ Plant Primer Mixture | 240 μl |
| ③ | GRAS-Di™ 2nd PCR Premix | 800 μl ×3 |
| ◯ | Nuclease-Free Water | 1300 μl ×3 |
| （＊） | GRAS-Di™ Index Primer Plate | 5 μl/well |

注：（＊）にはコンポーネントカラーの設定はありません。

## III. 保存　　－ 20℃

## IV. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器（主なもの）

- NucleoMag NGS Clean-up and Size Select（製品コード 744970.5/.50/.500）
- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up（製品コード 740609.10/.50/.250）
- サーマルサイクラー
  - Clontech PCR Thermal Cycler GP（製品コード WN400）　等
- 80% (v/v) エタノール（用時調製）もしくは 96 ～ 100%エタノール
- マイクロ遠心機（スピンダウン可能なもの）もしくは遠心機
- ボルテックスミキサー
- マグネットスタンド
- 0.2 ml PCR tube
  - 0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps（製品コード NJ600）
  - 0.2 ml Hi-8-Tube（製品コード NJ300）　等
- 96 well PCR plate
  - 0.2 ml 96 well-plate for Real Time (Frosted)（製品コード NJ401）
  - 96 well snap plate（製品コード NJ710）　等
- PCR plate seal（plate を使う場合）
- 1.5 ml DNA Low-Bind tube
- Bioanalyzer もしくは TapeStation（ともに Agilent Technologies 社）
- Qubit Fluorometer（Thermo Fisher Scientific 社）
- マイクロパンチャーΦ 0.75 mm（例：フロンティア・ラボ社（Code. FMP-0.75S））　等
- 解剖ハサミ
- 滅菌ピペットチップ 250 μl（例：Mettler-Toledo Rainin 社（Code. 30389278））　等
- MightyPrep reagent for DNA（製品コード 9182）

## V. インプット DNA について

表 1. インプット DNA の要件

| 項目 | 要件 |
|---|---|
| 形態 | 精製ゲノム DNA |
| インプット DNA 量 | 100 pg ～ 5 ng |
| 調製用 buffer | TE buffer（10 mM Tris, 0.1 mM EDTA）<br>もしくは Nuclease-Free Water |

・本製品は RNA に適していません。
・過度に分解された DNA、断片化処理（酵素的断片化または機械的断片化）された DNA をインプット DNA にすることは推奨していません。
・インプット DNA 濃度の定量には Qubit Fluorometer もしくはそれに相当する試薬および機器を使用してください。
・複数のサンプル間で結果を比較する場合は、サンプル間でインプット DNA 量を統一することを推奨します。

## VI. 組織片のインプット量について

表 2. 組織片のインプット量の要件

| 項目 | 要件 |
|---|---|
| 形態 | 組織片（葉／魚のヒレ／魚肉など）<br>※ 冷凍保存した組織片も使用可能です |
| インプット量 | [ 植物の葉 ]<br>マイクロパンチャーのパンチング片（Φ 0.75 mm）1 枚<br><br>[ 動物（哺乳類・魚類など）の肉片 ]<br>ピペットチップ 250 μl の先端で軽く 2 回程度突き刺し、チップ先端に付着した量の組織<br><br>[ 魚類のヒレなどの組織 ]<br>Φ 0.75 mm 相当の切片 1 枚<br>※ 魚類のヒレは、薄い膜状組織（鰭膜）であれば、マイクロパンチャーによるサンプリングが可能です。 |

・組織片は表面付着物や病変部を避け、健全な部位から採取してください。付着物や病変部に含まれる目的以外の生物のゲノム DNA が PCR で増幅される場合があります。表面に土壌や泥等が付着している場合は、採取前に純水等で入念に洗浄して除去してください。
・コンタミネーションを防ぐため、組織片を採取するマイクロパンチャーなどの道具はサンプルを変えるごとに純水および 80%エタノールで入念に洗浄することを推奨します。

## VII. 操作上の注意

**本製品を使用する際の注意事項です。使用前に必ずお読みください。**

[ 一般的な注意事項 ]

- 正しく校正されたピペットを使用してください。
- PCR 増幅および増幅後の操作は、コンタミネーションリスクを低減するため専用エリアで実施してください。
- 反応液を調製する際は、酵素（ ① GRAS-Di™ 1st PCR Premix もしくは ③ GRAS-Di™ 2nd PCR Premix）を最後に添加し、十分に混合してください。
- 本製品が適切に機能していることを確認するためにコントロールサンプルの使用を推奨します（例：Human Genomic DNA（製品コード 636401））。
- 反応液を調製する際には、ピペッティングによるロスを考慮して必要サンプル数より 1 サンプル分多めに調製することを推奨します。
- 反応液の調製は氷上で実施してください。

[ コンポーネントの取り扱いについて ]

- 酵素（ ① GRAS-Di™ 1st PCR Premix、③ GRAS-Di™ 2nd PCR Premix）は使用前に氷上で融解させ、スピンダウンします。その後、ピペッティングもしくはタッピングで十分に混合し、スピンダウンしてください。
- その他のコンポーネントは使用前に室温で融解させ、スピンダウンを行います。十分に混合し、再度スピンダウンしてください。
- 過度な凍結融解は控えてください。

## VIII. 操作

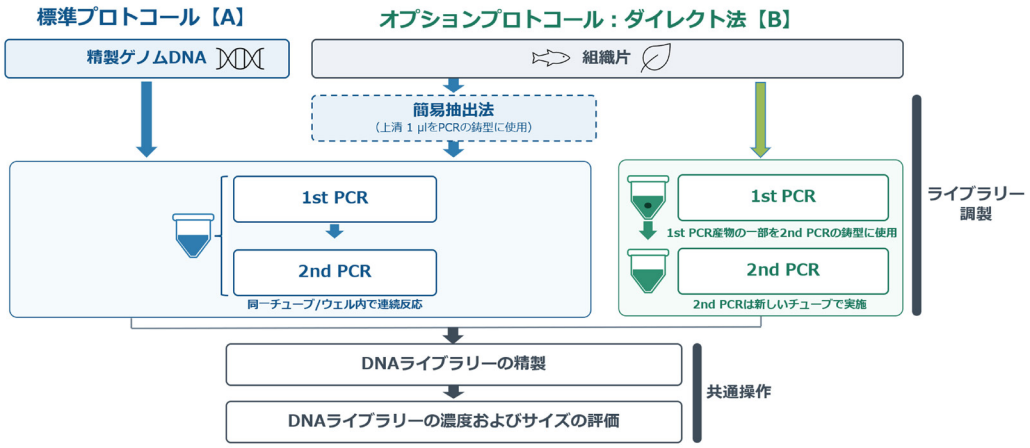



図 2. 操作の概要図

・本操作は、GRAS-Di Genotyping Library Prep Kit（製品コード NN0006）と GRAS-Di Genotyping Library Prep Kit for Plant（製品コード NN0007）で共通です。

・GRAS-Di Genotyping Library Prep Kit（製品コード NN0006）と GRAS-Di Genotyping Library Prep Kit for Plant（製品コード NN0007）では、対象とする生物種が異なります。製品コード NN0006 は葉緑体ゲノムを有しない生物種を、製品コード NN0007 は葉緑体ゲノムを有する生物種を対象としています。

・本製品には精製ゲノム DNA を用いる標準プロトコール【A】と、組織片を用いるオプションプロトコール（ダイレクト法）【B】の 2 種類があります。ダイレクト法では組織片をそのまま用いる方法と、組織片から簡易抽出した溶液を用いる方法（簡易抽出法）の 2 通りを選択できます。

・「ライブラリー調製」の操作は、用いるサンプルにより異なります。標準プロトコールおよび簡易抽出法では、1st PCR と 2nd PCR を同一のチューブまたはウェルで連続して行います。一方、組織片をそのまま用いる方法では、1st PCR と 2nd PCR を別々のチューブまたはウェルで行います。ただし、「DNA ライブラリーの精製」および「DNA ライブラリーの濃度およびサイズの評価」の操作は、いずれの方法でも共通です。

## 【A. 標準プロトコール】

本操作は、精製ゲノム DNA を用いて DNA ライブラリーを調製する方法です。

### A-1. 1st PCR

＜注意＞
- 本製品が適切に機能していることを確認するために、コントロールサンプルの使用を推奨します（例：Human Genomic DNA（製品コード 636401））。
- 0.2 ml PCR tube を使用する方法を記載していますが、96 well plate での実施も可能です。

1. 下記の組成に従い、1st PCR 反応液を調製する。

[ 1 反応あたり ]

| 試薬 | 使用量 |
|---|---|
| インプット DNA | x μl |
| ① GRAS-Di™ 1st PCR Premix | 6.5 μl |
| ② GRAS-Di™ Primer Mixture　もしくは<br>② GRAS-Di™ Plant Primer Mixture | 2.5 μl |
| ◯ Nuclease-Free Water | up to 13.0 μl |

2. ピペッティングによる懸濁もしくは穏やかにボルテックスした後、スピンダウンする。

3. 蓋をしっかりと閉めた後、いずれかの条件を用いてサーマルサイクラーで反応させる。

Tips： 標準条件と異なるアンプリコンをより多く得たい場合は、「低温条件」を実施できます。ただし、適用可否を確認するために、事前検証を推奨します。

[ 標準条件 ]

| | | |
|---|---|---|
| 98℃ | 2分 | |
| ↓ | | |
| 98℃ | 10秒 | ┐ |
| 50℃ | 15秒 | ├ 30サイクル |
| 72℃ | 20秒 | ┘ |
| ↓ | | |
| 4℃ | ∞ | |

[ 低温条件 ]

| | | |
|---|---|---|
| 98℃ | 2分 | |
| ↓ | | |
| 98℃ | 10秒 | ┐ |
| 15℃ | 15秒 | ├ 30サイクル |
| 72℃ | 20秒 | ┘ |
| ↓ | | |
| 4℃ | ∞ | |

4. 反応終了後、スピンダウンを行い、そのまま次の工程に速やかに進む。

## A-2. 2nd PCR

＜注意＞
- 必ず GRAS-Di™ Index Primer Plate を使用してください。他のインデックス試薬での代用はできません。
- 複数のサンプルを同時にシーケンスする場合は、サンプルごとに異なるインデックスを付与してください。
- GRAS-Di™ Index Primer Plate は室温で融解した後、ボルテックスおよびスピンダウンしてください。
- GRAS-Di™ Index Primer Plate のプライマーと GRAS-Di™ 2nd PCR Premix の混合溶液は調製しないでください。
- コンタミネーションを避けるために、GRAS-Di™ Index Primer Plate のプライマーを添加するたびにピペットのチップを必ず交換してください。

1. 1st PCR 産物 13 μl に GRAS-Di™ Index Primer Plate のプライマー 5 μl を添加する。

2. 下記の 2nd PCR 反応液を調製し、1. の溶液 18 μl に 32 μl を添加する。

[ 1 反応あたり ]

| 試薬 | 使用量 |
|---|---|
| ③ GRAS-Di™ 2nd PCR Premix | 25.0 μl |
| ◯ Nuclease-Free Water | 7.0 μl |
| Total | 32.0 μl |

3. ピペッティングによる懸濁もしくは穏やかにボルテックスした後、スピンダウンする。

4. 蓋をしっかりと閉めた後、以下の条件を用いてサーマルサイクラーで反応させる。

[ 反応条件 ]

| | | |
|---|---|---|
| 95℃ | 2分 | |
| ↓ | | |
| 98℃ | 15秒 | ┐ |
| 55℃ | 15秒 | ├ 19サイクル |
| 72℃ | 20秒 | ┘ |
| ↓ | | |
| 72℃ | 1分 | |
| 4℃ | ∞ | |

5. 反応終了後、スピンダウンを行い、次の工程に速やかに進む。

## A-3. DNA ライブラリーの精製

精製はいずれかの製品を用いて実施してください。
・NucleoMag NGS Clean-up and Size Select（製品コード 744970.5/.50/.500）
・NucleoSpin Gel and PCR Clean-up（製品コード 740609.10/.50/.250）

### ◆ NucleoMag NGS Clean-up and Size Select を使用する場合

＜注意＞
当日調製した 80%エタノールを使用してください。

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、よく混合する。

2. ビーズの添加と混合
   1）2nd PCR 産物 50 μl に NucleoMag NGS Bead Suspension 100 μl を添加する。
   2）ただちによく混合する。
   3）室温で 5 分間静置する。
   4）スピンダウンを行い、マグネットスタンドに置き、5 分間静置する。
   5）マグネット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）マグネットスタンドに置いたまま、80%エタノール 200 μl を加える。
   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
   マグネットスタンドにチューブを立てたままの状態で、蓋を開けて室温にて 5 ～ 15 分間静置する。

5. 溶出
   1）溶出液（TE buffer もしくは Nuclease-Free Water）21 μl を添加し、蓋をする。
   2）マグネット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）スピンダウンを行い、マグネットスタンドに置き、5 分間静置する。
   5）上清 20 μl を新しいチューブに回収する。

**◆ NucleoSpin Gel and PCR Clean-up を使用する場合**

＜注意＞
該当製品の最新プロトコールに従って、最初に Buffer NT3 を調製してください。
参考情報：Buffer NT3 Concentrate に規定量の 96 ～ 100%エタノールを添加します。添加量はキットサイズによって異なります（製品コード 740609.10 は 24 ml、製品コード 740609.50 は 100 ml、製品コード 740609.250 は各ボトルに 200 ml）。

1. サンプル調製
   2nd PCR 産物 50 μl に Buffer NTI 100 μl を添加し、混合する。

   ※ 混合後、溶液の色調が緑（pH7.0 付近）か青（pH ＞ 7.0）に変化した場合、少量の 4 M 酢酸ナトリウム（pH5.0）または塩酸を用いて、色調が黄色（pH ＜ 6.0）になるように調整してください。

2. カラムへのサンプル添加
   1）NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column（カラム）を Collection Tube（回収容器）に設置する。
   2）カラムにサンプル全量を添加する。
   3）遠心（11,000 × *g*、30 秒）
   4）フロースルーを捨て、カラムを再び回収容器に戻す。

3. メンブレン洗浄
   1）Buffer NT3 700 μl をカラムに添加する。
   2）遠心（11,000 × *g*、30 秒）
   3）フロースルーを捨て、カラムを再び回収容器に戻す。

4. メンブレン乾燥
   遠心（11,000 × *g*、1 分）

5. 溶出
   1）カラムを新しい 1.5 ml DNA Low-Bind tube に設置する。
   2）溶出液（TE buffer、Nuclease-Free Water、Buffer NE のいずれか）21 μl をカラムに添加する。
   3）室温で 1 分間静置する。
   4）遠心（11,000 × *g*、1 分）
   5）1.5 ml DNA Low-Bind tube に溶出液が回収されていることを確認する。

## A-4. DNA ライブラリーの濃度およびサイズの評価

Bioanalyzer もしくは TapeStation で DNA ライブラリーの濃度とサイズを測定する。測定する DNA ライブラリーは機器の測定範囲内の濃度にするために、Qubit Fluorometer もしくはそれに相当する試薬および機器により定量した DNA 濃度に基づき、TE buffer もしくは Nuclease-Free Water で希釈したものを使用する。

＜注意＞
1st PCR の反応条件（標準条件／低温条件）およびプロトコール（標準プロトコール／ダイレクト法）によって、ライブラリーの波形は大きく異なることがあります。これは条件および手法の違いによるものです。いずれの場合も、得られたライブラリーはシーケンスに使用できます。

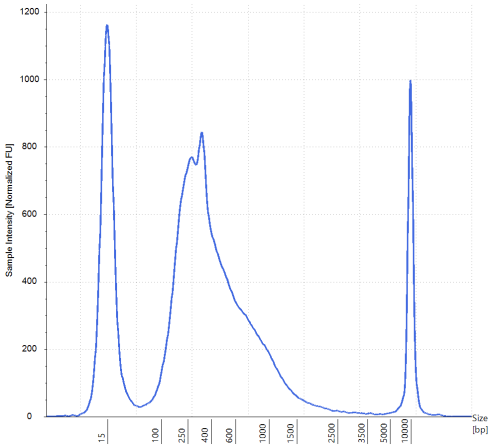
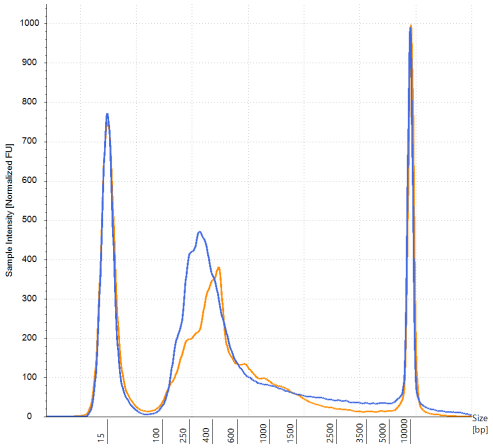
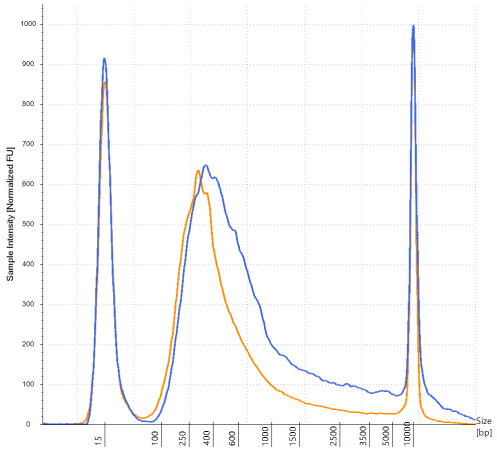



図 3. Human Genomic DNA（製品コード 636401）から調製した DNA ライブラリーの例（TapeStation で評価）



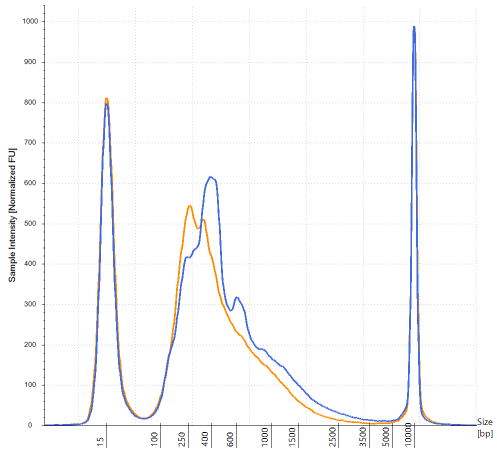

青　　：サーモンの DNA ライブラリー
オレンジ：イネの DNA ライブラリー

図 4. サーモン由来 DNA およびイネ由来 DNA から調製した DNA ライブラリーの例（TapeStation で評価）




青　　：標準条件の 1st PCR を実施した DNA ライブラリー
オレンジ：低温条件の 1st PCR を実施した DNA ライブラリー

図 5.　異なる 1st PCR 条件でサーモン由来 DNA から調製した DNA ライブラリーの例（TapeStation で評価）




青　　：標準条件の 1st PCR を実施した DNA ライブラリー
オレンジ：低温条件の 1st PCR を実施した DNA ライブラリー

図 6.　異なる 1st PCR 条件でイネ由来 DNA から調製した DNA ライブラリーの例（TapeStation で評価）

## 【B. オプションプロトコール（ダイレクト法）】

本操作は、組織片を用いて DNA ライブラリーを調製する方法です。DNA 抽出を行わずにライブラリーを調製できるため、DNA 抽出工程の省略による作業時間の短縮および多検体処理の効率化が期待できます。また、ライブラリーが得られない場合は、MightyPrep reagent for DNA（製品コード 9182）による簡易抽出でライブラリーが得られることがあります。

※ ダイレクト法の適用可否を確認するために、事前検証を推奨します。本操作によるライブラリー調製が困難な場合は、精製ゲノム DNA を用いる標準プロトコールを推奨します。

### B-1. 組織片の調製

＜注意＞
- 組織片を採取する方法は「VI. 組織片のインプット量について」を参照してください。
- 最初は「1. 組織片をそのまま用いる方法」を試し、ライブラリーが得られない場合は「2. 組織片から簡易抽出した溶液を用いる方法（簡易抽出法）」を選択することを推奨します。

1. 組織片をそのまま用いる方法
   組織片の採取後は、「B-2. 1st PCR」以降の操作に従ってください。

2. 組織片から簡易抽出した溶液を用いる方法（簡易抽出法）
   MightyPrep reagent for DNA（製品コード 9182）の使用方法を以下に示します。

   1）採取した組織片を 1.5 ml DNA Low-Bind tube もしくは 0.2 ml PCR tube に移す。
   2）MightyPrep reagent for DNA 100 μl を添加し、ボルテックスで混合する。
   3）95℃で 10 分加熱する。
   4）12,000 ～ 15,000 rpm で 2 分間遠心する。
   5）上清 1 μl を 1st PCR の鋳型として使用する。
   6）以降の操作は「A. 標準プロトコール」に従ってください。

## B-2. 1st PCR

＜注意＞
- 組織片を添加した 1st PCR 反応液では、ホモジナイズ、タッピング、ピペッティングは不要です。
- 0.2 ml PCR tube を使用する方法を記載していますが、96 well plate での実施も可能です。

植物の葉や魚類のヒレなどの場合：
- 組織片と反応液を入れる順番は問いません。
- 組織片がチューブ壁面についた場合は反応液内に沈めてください。

動物（哺乳類・魚類など）の肉片の場合：
- 1st PCR 反応液には、目視で確認できる大きさの肉片は入れないでください。
- 肉片に 2 回程度軽く突き刺したピペットチップの先端を 1st PCR 反応液に入れ、チューブ内で左右に振って混合してください。

1. 下記の組成に従い、1st PCR 反応液を調製する。

[ 1 反応あたり ]

| 試薬 | 使用量 |
|---|---|
| ① GRAS-Di™ 1st PCR Premix | 6.5 μl |
| ② GRAS-Di™ Primer Mixture　もしくは<br>② GRAS-Di™ Plant Primer Mixture | 2.5 μl |
| ◯ Nuclease-Free Water | 4.0 μl |
| Total | 13.0 μl |

2. 1st PCR 反応液に組織片を添加し、蓋をしっかりと閉めた後、いずれかの条件を用いてサーマルサイクラーで反応させる。

Tips： 標準条件と異なるアンプリコンをより多く得たい場合は、「低温条件」を実施できます。ただし、適用可否を確認するために、事前検証を推奨します。

[ 標準条件 ]

98℃　2分
↓
98℃　10秒
50℃　15秒　] 30サイクル
72℃　20秒
↓
4℃　∞

[ 低温条件 ]

98℃　2分
↓
98℃　10秒
15℃　15秒　] 30サイクル
72℃　20秒
↓
4℃　∞

3. 反応終了後、スピンダウンを行い、次の工程に速やかに進む。

### B-3. 2nd PCR

＜注意＞
- 必ず GRAS-Di™ Index Primer Plate を使用してください。他のインデックス試薬での代用はできません。
- 複数のサンプルを同時にシーケンスする場合、サンプルごとに異なるインデックスを付与してください。
- GRAS-Di™ Index Primer Plate は室温で融解した後、ボルテックスおよびスピンダウンしてください。
- GRAS-Di™ Index Primer Plate のプライマーと GRAS-Di™ 2nd PCR Premix の混合溶液は調製しないでください。
- コンタミネーションを避けるために、GRAS-Di™ Index Primer Plate のプライマーを添加するたびにピペットのチップを必ず交換してください。

1. 新しい 0.2 ml PCR tube を用意し、◯ Nuclease-Free Water 18 μl、1st PCR 産物 2 μl、GRAS-Di™ Index Primer Plate のプライマー 5 μl、③ GRAS-Di™ 2nd PCR Premix 25 μl の順に添加する。

2. ピペッティングによる懸濁もしくは穏やかにボルテックスした後、スピンダウンする。

3. 蓋をしっかりと閉めた後、以下の条件を用いてサーマルサイクラーで反応させる。

[ 反応条件 ]

| | | |
|---|---|---|
| 95℃ | 2分 | |
| ↓ | | |
| 98℃ | 15秒 | ┐ |
| 55℃ | 15秒 | ├ 19サイクル |
| 72℃ | 20秒 | ┘ |
| ↓ | | |
| 72℃ | 1分 | |
| 4℃ | ∞ | |

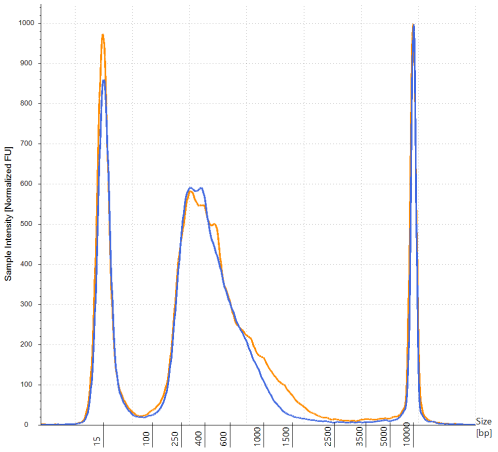
4. 反応終了後、スピンダウンを行い、次の工程に速やかに進む。

### B-4. DNA ライブラリーの精製

「A-3. DNA ライブラリーの精製」を参照

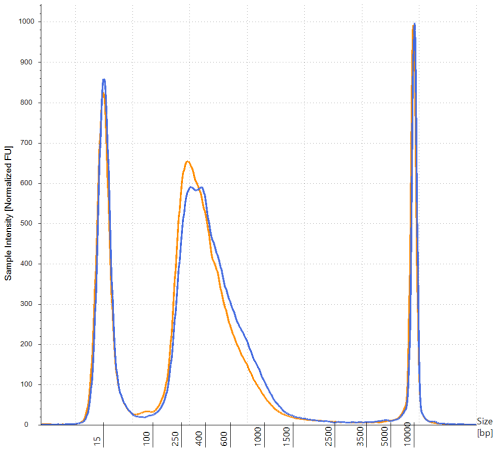
## B-5. DNA ライブラリーの濃度およびサイズの評価

「A-4. DNA ライブラリーの濃度およびサイズの評価」を参照



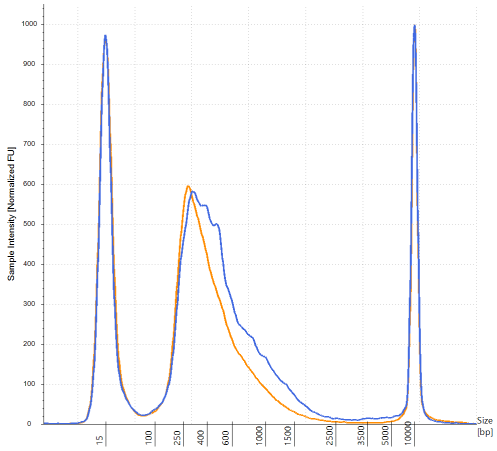

青　　：サーモンの DNA ライブラリー
オレンジ：イネの DNA ライブラリー

図 7.　サーモンの肉片およびイネの葉から調製した DNA ライブラリーの例
（TapeStation で評価）




青　　：標準条件の 1st PCR を実施した DNA ライブラリー
オレンジ：低温条件の 1st PCR を実施した DNA ライブラリー

図 8.　異なる 1st PCR 条件でサーモンの肉片から調製した DNA ライブラリーの例
（TapeStation で評価）




青　　：標準条件の 1st PCR を実施した DNA ライブラリー
オレンジ：低温条件の 1st PCR を実施した DNA ライブラリー

図 9.　異なる 1st PCR 条件でイネの葉から調製した DNA ライブラリーの例
（TapeStation で評価）

## IX.　シーケンシング

本製品により調製された DNA ライブラリーは、イルミナ社の次世代シーケンサーで解析可能なライブラリー構造を持ちます。各サンプルから調製されたライブラリーには、PCR 増幅時に選択された特定のインデックス情報が含まれており、複数の DNA ライブラリーを混合し同時にシーケンスする際には、インデックスが重複していないことを確認し混合してください。シーケンシングについてはシーケンサーの取扱説明書をご参照ください。

## X.　GRAS-Di™ Index Primer Plate について

各インデックスの配列およびウェル配置の詳細は弊社ウェブサイト掲載の「GRAS-Di™ Index Primer Plate.xlsx」をご参照ください。（https://catalog.takara-bio.co.jp）
少ないサンプル数でシーケンスする場合は、インデックスのカラーバランスを考慮して組み合わせを選択してください。

## XI. トラブルシューティング

| 問題 | 想定原因 | 対処 |
|---|---|---|
| ライブラリーが得られない | インプット DNA の不添加 | 目的サンプルのライブラリー調製と同時に、コントロールサンプルのライブラリー調製を実施する |
| | インプット DNA に含まれる反応阻害物質 | インプット DNA を希釈する |
| ライブラリー収量が低い | インプット DNA の品質が低い | インプット DNA 量の増加もしくは再調製 |
| マッピング率が低い | 目的ゲノム DNA 以外のコンタミネーション | インプット DNA の再調製 |
| | インプット DNA と異なる配列情報を解析に使用 | 解析に使用した配列情報の見直し |
| 組織片からのライブラリー調製が困難 | 組織片に含まれる反応阻害物質 | 簡易抽出法もしくは精製を行ったインプット DNA の使用（反応阻害物質を除去） |
| ライブラリーのピークが複数存在する | 複数の領域で増幅された産物 | 問題ないので、そのまま作業を続ける |
| PCR 条件およびプロトコールの違いによって、結果が異なる | 条件の違いによって増幅産物が異なる | 結果を比較するサンプルは同じ条件でライブラリーを調製する |

## XII. 参考文献


1) Hosoya, S. *et al* . Random PCR-based genotyping by sequencing technology GRAS-Di (genotyping by random amplicon sequencing, direct) reveals genetic structure of mangrove fishes. *Molecular Ecology Resources* . 2019;19:1153–1163.
2) Miki, Y. *et al* . GRAS-Di system facilitates high-density genetic map construction and QTL identification in recombinant inbred lines of the wheat progenitor *Aegilops tauschii*. *Scientific Reports* . 2020;10:21455.


## XIII. 関連製品

NucleoMag NGS Clean-up and Size Select（製品コード 744970.5/.50/.500）
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up（製品コード 740609.10/.50/.250）
Clontech PCR Thermal Cycler GP（製品コード WN400）
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps（製品コード NJ600）
0.2 ml Hi-8-Tube（製品コード NJ300）
0.2 ml 96 well-plate for Real Time (Frosted)（製品コード NJ401）
96 well snap plate（製品コード NJ710）
MightyPrep reagent for DNA（製品コード 9182）

## XIV. 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。

- GRAS-Di (Genotyping by Random Amplicon Sequencing-Direct) はトヨタ自動車株式会社の登録商標です。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

v202611w