

Fungal Metagenomic Sequencing Demonstrated Protocol

イルミナシーケンスシステムでシーケンスするためのITSアンプリコンの調製

はじめに	2
ワークフローの概要	2
ヒントおよびテクニック	2
ライブラリー調製ワークフロー	5
アンプリコンPCR	5
PCRクリーンアップ	7
インデックスPCR	8
セカンドPCRクリーンアップ	10
（オプション）ライブラリーのチェック	11
ライブラリーの定量、ノーマライゼーション、プーリング	12
サンプルローディング	12
サポート情報	12
改訂履歴	18

重要なお知らせ この文書では、イルミナ社内で検証された特定のアプリケーションに関する情報を記載しています。このプロトコルは、イルミナ製品および非イルミナ製品を用いた手法として提供しておりますが、弊社が何らかの権利または保証を伴うものではありません。お客様がこの情報を使用または活用する場合は、それぞれの販売業者のライセンス条項に基づいて実施いただく必要があります。ここに記載したイルミナ製品は、特に記載がない限り研究での用途に限りませ。お客様からのご意見・ご感想は頂戴いたしますが、このアプリケーションは弊社テクニカルサポート部およびフィールドアプリケーション部によるサポートの対象外となりますのでご了承ください。

はじめに

『Fungal Metagenomic Sequencing Demonstrated Protocol』では、真菌またはメタゲノムのサンプル解析のため、BaseSpace Sequence Hub解析ソリューションを用いたプライマーシーケンスとアッセイワークフローについて説明しています。rRNAシストロンの内部転写スペーサー（ITS）は、真菌ならびに多様な環境サンプル（便、痰、皮膚、土壌、および水など）の特性分析に有用なDNAバーコードです。どのITS領域が真菌の遺伝子解析に最適か（ITS1/ITS2）については議論が続いていますが、どちらもメタゲノム研究に広く使用されています。このマルチプレックスPCR（mPCR）プロトコールでは、広範囲の分類群に対して正確な分類能を提供するためのITS1領域の増幅および解析のワークフローを詳述しています。

ワークフローの概要

- 1 アンプリコンプライマーの注文：本プロトコール用のプライマーの一部は、第三者のオリゴヌクレオチド製造業者に注文する必要があります。詳細は、13ページの「アンプリコンプライマー」を参照してください。
- 2 ライブラリーの調製：少サイクルPCRを使用してITS1領域を増幅した後、アンプリコンターゲットにイルミナシーケンスアダプターおよびデュアルインデックスバーコードを添加します。Nextera™ XT v2インデックスによるシーケンス用に、最大384個のライブラリーをプールすることができます。また、Nextera DNA CDインデックスを使用して、最大96個のライブラリーをシーケンス用にプールすることができます。
- 3 シーケンス：1サンプルあたり2x 150サイクルおよび15,000~100,000リードのシーケンスにより、高い分類能と精度が得られます。マルチプレックス性能は、使用するシーケンスプラットフォームに応じて異なります。
- 4 BaseSpace ITS Metagenomicsアプリケーションによる解析：ITSメタゲノムワークフローは、UNITEデータベース¹を使用して分類学的な分類を実行し、すべての分類学的レベルにわたる分類をグラフィカル形式で表示します。



注意

本プロトコールは、アンプリコンプライマーの座位特異的配列を変更することによって、ITS2のシーケンスに使用することができます。詳細は、13ページの「アンプリコンプライマー」を参照してください。



免責事項

本書の情報は、利用者の方への便宜を目的として提供されています。場合によっては、許可されていない第三者のサプライヤーから試薬を購入する必要があります。許可されていない第三者のサプライヤーから購入した試薬をご使用の場合、弊社製品のパフォーマンスに対して保証は伴われず、技術サポートも限られません。

リソース

1. Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of Fungi. *Mol Ecol*.2013;22(21):5271-5277.

ヒントおよびテクニック

シーケンス決定のためにライブラリーを調製する際は、常に、正しい分子生物学手法に準じて作業を行う必要があります。また、作業を開始する前に、プロトコール全体の手順をよく読んで理解し、必要な材料をすべて揃え、器具をプログラミングして使用できる状態にしてください。

溶液の取り扱い

ライブラリーを定量化したり、クラスターを形成するために濃縮されたライブラリーを希釈したりする際には、正しい方法で溶液の取扱いを行うことが非常に重要です。

- ▶ 時として、量の違いがわずかでも ($\pm 0.5 \mu\text{L}$)、クラスター数に大きな違い (~ 10 万) が生じることがあります。
- ▶ 少量のピペッティングは、標準曲線、または少量ですが正確な量の生成を求めるプロトコールにおいて、潜在的なエラーの原因となる可能性があります。
- ▶ 少量の取り扱いを行う必要がある場合は、ピペットが正しく校正されていることを十分に確認してください。
- ▶ ピペットは、性能仕様で定められている容量の極限值では使用しないようにしてください。
- ▶ 特に少量の酵素を追加する際は、ピペットの操作ミスを最小に抑えるため、複数のサンプル用の試薬を同時に調製してください。これによって、少量のピペット操作を何度も繰り返すことなく、試薬チューブからまとまった量を1回の操作で扱うことができます。1回のピペット操作で個々のサンプルに分取すれば、複数のサンプル間で標準化が実現します。

ビーズの取扱い

- ▶ ビーズは使用前に室温に戻してください。
- ▶ ビーズを再利用することは避けてください。これらの手順を実行するときには必ず新しいビーズを添加してください。
- ▶ ビーズは使用直前に十分に懸濁して色が均一になるまでボルテックスしてください。
- ▶ ビーズをピペッティングする際は、溶液の粘度に応じて、ゆっくり吸引し、ゆっくり分注してください。
- ▶ 最終収量に影響を与える可能性があるため、ビーズの損失は最小限に抑えるよう気を付けてください。
- ▶ 別段の記載が無い限り、各サンプルを取り扱うたびにチップを交換してください。
- ▶ 回収量を最大にするため、ビーズと混合したサンプルをプロトコールに記載の時間室温でインキュベートしてください。
- ▶ ウェルから上清を取り除いて廃棄する際には、シングルチャンネルピペットまたはマルチチャンネルピペットを使用して、ビーズの塊を崩さないように注意してください。
- ▶ 透明な上清を反応プレートから取り除く作業や、洗浄手順では、磁気スタンド上にプレートを置いたままにし、凝集した磁気ビーズの塊を崩さないようにすることが重要です。凝集した磁気ビーズがウェルの壁面から滑り落ちないように、ピペットのチップでの吸引はゆっくりと行ってください。
- ▶ 溶出後にビーズのキャリーオーバーを防ぐため、溶出液をビーズペレットから取り除く際には、 $\sim 2.5 \mu\text{L}$ の上清を残してください。
- ▶ 残留汚染要因となる可能性があるため、ウェルの底からエタノールを完全に取り除くようにしてください。
- ▶ 静電気の力によるビーズの損失を防ぐため、反応プレートは磁気スタンド上に置いたままにし、室温で風乾させてください。ビーズにエタノールが残留していると、後続の反応の効率に影響を与えるため、残留エタノールは完全に蒸発させてください。少なくとも10分間乾燥しますが、より長い乾燥時間が必要となる場合があります。残っているエタノールは、 $10 \mu\text{L}$ のピペットで取り除くことができます。
- ▶ 最終収量に影響を与える可能性があるため、ビーズが乾燥しすぎないようにしてください。
- ▶ ピペットチップでビーズをウェルの端から剥がさないでください。
- ▶ 溶出中のサンプル回収率を最大にするため、サンプルをマグネットに置く前に、サンプルとビーズの混合物を室温で2分間インキュベートしてください。



注意

クリーンアップの手順は、15ページの「消耗品および機器」で指定されている96ウェルプレートおよび磁気スタンドを使用した場合にのみ検証されています。マイクロ遠心チューブやその他の形式、または他のマグネットを使用した場合、同じようなパフォーマンスは保証されません。

クロスコンタミネーションの防止

クロスコンタミネーションを避けるため、以下を実践してください。

- ▶ アダプターチューブは、一度に1つのみを開けるようにしてください。
- ▶ サンプルを追加または移す場合、他の指示がない限り、**サンプルごとにチップ**を交換してください。
- ▶ ピペット操作は慎重に行って、こぼれないようにしてください。
- ▶ 異なるアダプターストックを取り扱うたびに、ピペットの洗浄および手袋の交換を行ってください。

温度について

- ▶ 特に指定されていない限り、ライブラリーは37°C以下の温度で保持してください。
- ▶ 試薬は、室温で解凍した後、氷の上に置いてください。

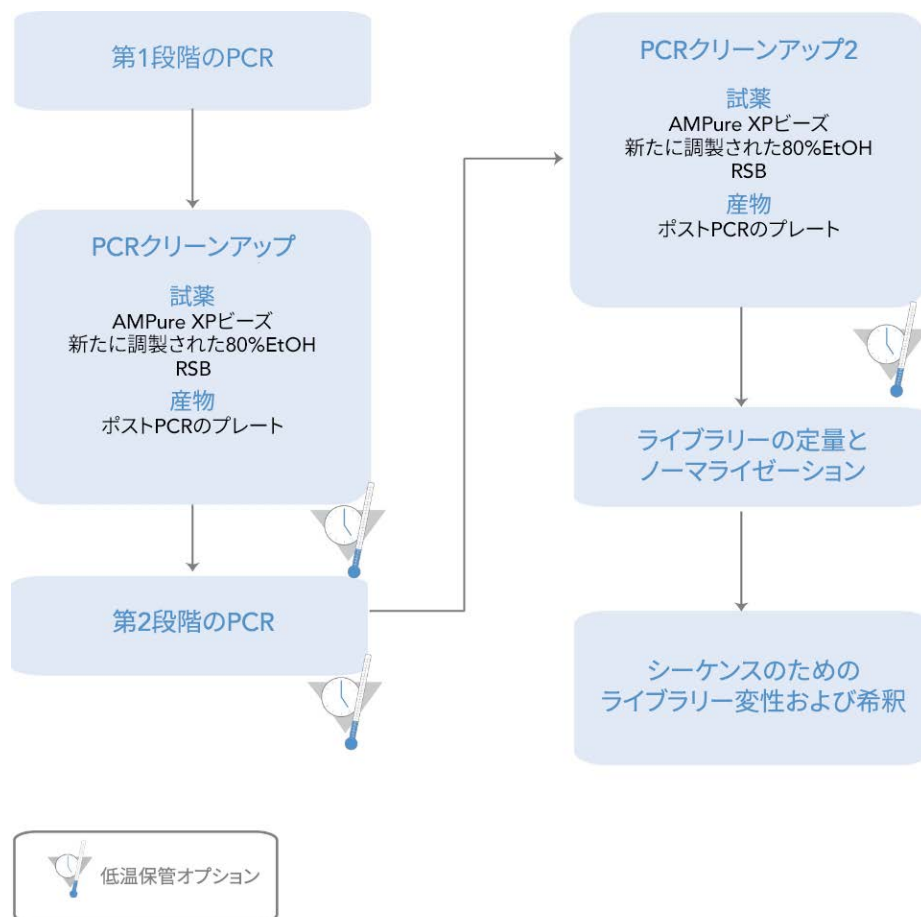
機器

- ▶ ご使用のサーマルサイクラーのユーザーガイドで説明されているプログラミング方法の指示に従い、ヒートリッド機能を使用してサーマルサイクラーを適切にプログラミングしてください。
- ▶ サーマルサイクラーに搭載のヒートリッド機能を利用して差し支えありません。

ライブラリー調製ワークフロー

下図に、ITSライブラリー調製プロトコルのワークフローを示します。安全に実験を中断できるポイントは、ステップ間にマークされています。

図1 ITSライブラリー調製ワークフロー



アンプリコンPCR

この手順ではPCRにより、オーバーハングアダプターが接合した、対象領域に特異的なオーバーハング配列を含むプライマーを用いて、DNAサンプルからテンプレート領域を増幅します。プライマーシーケンスの詳細は、13ページの「アンプリコンプライマー」を参照してください。



注意

使用する消耗品および機器の詳細は、15ページの「消耗品および機器」を参照してください。

消耗品

アイテム	数量	保管条件
微生物のゲノムDNA (10 mM Tris中5 ng/μL、pH 8.5)	1サンプルあたり2.5 μL	-25°C~-15°C
アンブリコンPCRリバースプライマー (1 μM)	1サンプルあたり5 μL	-25°C~-15°C
アンブリコンPCRフォワードプライマー (1 μM)	1サンプルあたり5 μL	-25°C~-15°C
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	1サンプルあたり12.5 μL	-25°C~-15°C
Microseal 「A」 粘着フィルム		
96ウェル0.2 mL PCRプレート	1プレート	
(オプション) バイオアナライザチップ (Agilent DNA1000 キット：カタログ番号5067-1504)		

手順

- 1 各サンプルウェルに以下の量を添加します：

試薬	容量 (μL)
微生物のDNA (5 ng/μL) *	2.5
アンブリコンPCRフォワードプライマー、またはプライマープール (1 μM) **	5
アンブリコンPCRリバースプライマー、またはプライマープール (1 μM) **	5
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	12.5
合計	25

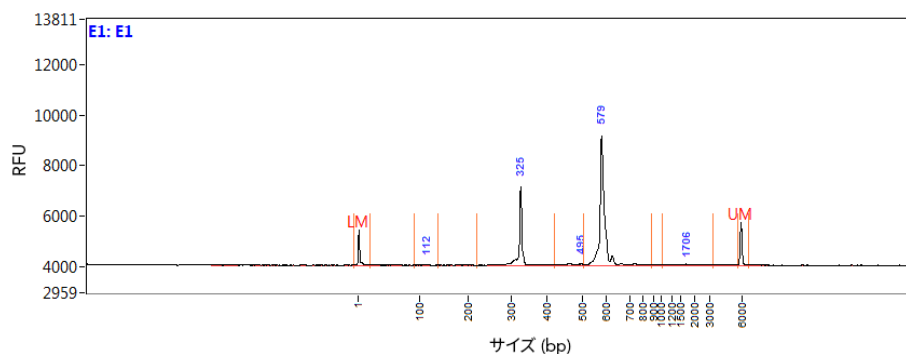
*高品質の真菌gDNAを使用した場合、わずか0.1 ngの総DNAインプット量で、十分アッセイすることが可能です。環境サンプル中の真菌内容物にはばらつきがある可能性があるため、インプット量を増やすことをお勧めします。

**推奨のプライマーまたは他のプライマーセットを使用する場合、各プライマーのアリコート量を1 X TE pH 8バッファーで1 μMに希釈します。フォワードプライマープール、およびリバースプライマープールを作製するために、各プライマーを等量ずつプールします。サンプルを入れた各ライブラリーのプレートウェルに、各プライマープールを5 μLずつ分注します。

- 2 プレートにフィルムで蓋をした後、以下のプログラムを使用してサーマルサイクラーでPCRを実行します：
 - ▶ 95°C 3分間
 - ▶ 以下を25サイクル：
 - ▶ 95°C 30秒間
 - ▶ 55°C 30秒間
 - ▶ 72°C 30秒間
 - ▶ 72°C 5分間
 - ▶ 4°C ホールド

- 3 (オプション) 増幅が成功したことを検証するために、最適なフラグメントアナライザー (例: Agilent Bioanalyzer DNA1000またはAATI Fragment Analyzer High Sensitivity Kit (1:10に希釈) など) で、PCR産物1 μ Lをランします。標準的ライブラリーは、145~695 bpのサイズ分布を示します。ITS1のアンプリコンは、分類群に応じて、長さが異なります。

図2 アンプリコンPCRステップ後のフラグメントアナライザーによるトレース例



PCRクリーンアップ

この手順ではAMPure XPビーズを使用して、ITS1アンプリコンを精製し、遊離プライマーとプライマーダイマーを取り除きます。

消耗品

アイテム	数量	保管条件
10 mM Tris pH 8.5	1サンプルあたり52.5 μ L	-25°C~-15°C
AMPure XPビーズ	1サンプルあたり20 μ L	2°C~8°C
用時調製80% エタノール (EtOH)	1サンプルあたり400 μ L	
96ウェル0.2 mL PCRプレート	1プレート	
(オプション) Microseal 「B」 フィルム		
(オプション) 96ウェルMIDIプレート	1プレート	

事前準備

- AMPure XP Beadsを室温に戻します。

手順

- アンプリコンPCRプレートを20°C、1,000 \times gで1分間遠心し、蓋についた水滴を集め、シールを慎重にはがします。
- (オプション) 攪拌にシェーカーを使用する場合は、すべてのアンプリコンPCR産物をPCRプレートからMIDIプレートへ移します。
- AMPure XPビーズを30秒間ボルテックスして、ビーズを均一に分散させます。
- サンプルの数に応じて、適切な量のビーズをリザーバーに添加します。
- 20 μ LのAMPure XPビーズをアンプリコンPCRプレートの各ウェルに添加します。

- 6 以下のオプションから、1つ選択します：
 - ▶ 96ウェルPCRプレート：上下に10回ピペティングして、攪拌。
 - ▶ MIDIプレート：プレートを密封し、1800 rpmで2分間振盪。
- 7 室温で5分間インキュベートします。
- 8 プレートを磁気スタンドに置き、上清が透明になるまで待ちます（～2分）。ステップ13まで、磁気スタンドの上に置いておきます。
- 9 上清を取り除き、廃棄します。
- 10 以下の手順で、ビーズを2回洗浄します。
 - a 各サンプルウェルに、80%エタノールを200 μ L添加します。
 - b プレートを磁気スタンドに置き、室温で30秒間インキュベートします。
 - c 上清を取り除き、廃棄します。
- 11 余分なエタノールを取り除きます。
- 12 10分間、風乾します。
- 13 各ウェルに10 mM Tris pH 8.5を52.5 μ L添加します。
- 14 以下のオプションから、1つ選択します：
 - ▶ 96ウェルPCRプレート：上下に10回ピペティングして、攪拌。
 - ▶ MIDIプレート：プレートを密封し、1800 rpmで2分間振盪。
ビーズが完全に再懸濁していることを確認してください。
- 15 室温で2分間インキュベートします。
- 16 プレートを磁気スタンドに置き、上清が透明になるまで待ちます（～2分）。
- 17 アンプリコンPCRプレートから新しい96ウェルPCRプレートに50 μ Lの上清を慎重に移します。

安全なストップポイント

ただちに8ページの「インデックスPCR」に進まない場合、Microseal「B」粘着シールでプレートを密封し、-15°Cから-25°Cで保管してください（最長1週間）。

インデックスPCR

この手順では、Nextera XT Index Kit v2、Nextera DNA CD Index（24インデックス、24サンプル）（チューブ）、またはNextera DNA CD Index（96インデックス、96サンプル）（プレート）を用いて、デュアルインデックスおよびイルミナシーケンスアダプターを添加します。

消耗品

アイテム	数量	保管条件
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	1サンプルあたり25 μ L	-25°C～-15°C
Nextera XT Index Kit v2 set A、B、C、またはD (FC-131-2001、FC-131-2002、FC-131-2003、またはFC-131-2004) の Nextera XT Index 1 Primer (N7XX)	1サンプルあたり5 μ L	-25°C～-15°C
Nextera XT Index Kit v2 set A、B、C、またはD (FC-131-2001、FC-131-2002、FC-131-2003、またはFC-131-2004) の Nextera XT Index 2 Primers (S5XX)	1サンプルあたり5 μ L	-25°C～-15°C

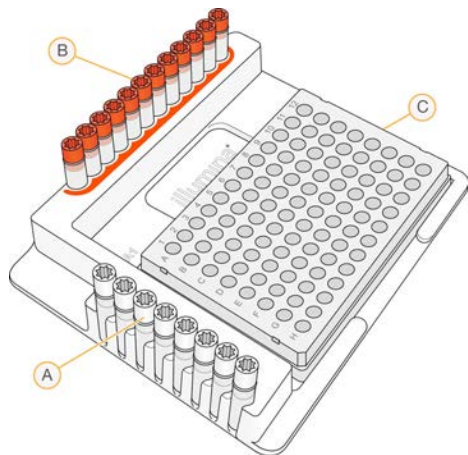
アイテム	数量	保管条件
Nextera DNA CD Index Kit (24インデックス、24サンプル) の Nextera DNA CD Index 1 Primer (20018707)	1サンプルあたり5 μ L	-25°C~-15°C
Nextera DNA CD Index Kit (24インデックス、24サンプル)の Nextera DNA CD Index 2 Primer (20018707)	1サンプルあたり5 μ L	-25°C~-15°C
Nextera DNA CD Index Kit (96インデックス、96サンプル)の Nextera DNA CD Index 1 PrimerおよびIndex 2 Primer Mix (20018708)	1サンプルあたり10 μ L	-25°C~-15°C
水、PCRグレード	1サンプルあたり10 μ L	-25°C~-15°C
TruSeqインデックスプレートフィクスチャー (FC-130-1005)	1	
96ウェル0.2 mL PCRプレート	1プレート	
Microseal 「A」 粘着フィルム	1	

手順

- 各ウェルから新しい96ウェルプレートに、5 μ Lのライブラリーを移します。
残りの45 μ Lは本プロトコルで使用しませんので、他の用途で使用することができます。
- 必要に応じて以下のように、インデックス1と2のプライマーをラック (TruSeqインデックスプレートフィクスチャーなど) に配置します：
 - インデックス2のプライマーチューブ (白いキャップ) を、A~Hの列に合わせて、縦方向に配置します。
 - インデックス1のプライマーチューブ (オレンジのキャップ) を、1~12の列に合わせて、横方向に配置します。

インデックスの選択に関する詳細は、16ページの「デュアルインデックスの原理」を参照してください。

図3 TruSeqインデックスプレートフィクスチャー



- A インデックス2のプライマー (白いキャップ)
 B インデックス1のプライマー (オレンジのキャップ)
 C 96ウェルプレート

- 3 5 µLの再懸濁したPCR産物DNAを96ウェルPCRプレートに入れ、プレートをラックに置きます。
- 4 インデックスキットに応じて、各サンプルウェルに以下の量を追加します：

試薬	容量 (µL)
ポストクリーンアップPCR1ライブラリー	5
Nextera XTインデックスプライマー1 (N7xx)	5
Nextera XTインデックスプライマー2 (S5xx)	5
CD インデックスプライマー1(24)	5
CD インデックスプライマー2(24)	5
CD インデックスプライマー1、2ミックス(96)	10
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25
水、PCRグレード	10
合計	50

- 5 上下に10回ピペティングして混ぜ合わせます。
- 6 Microseal 「A」 でプレートをシールします。
- 7 プレートを20°Cで1分間、1,000 × gで遠心します。
- 8 以下のプログラムを使用して、サーマルサイクラーでPCRを実行します。
 - ▶ 95°C 3分間
 - ▶ 以下を8サイクル：
 - ▶ 95°C 30秒間
 - ▶ 55°C 30秒間
 - ▶ 72°C 30秒間
 - ▶ 72°C 5分間
 - ▶ 4°C ホールド

セカンドPCRクリーンアップ

この手順では、AMPure XPビーズを使用し定量前に最終ライブラリー産物を精製します。

消耗品

アイテム	数量	保管条件
10 mM Tris pH 8.5	1サンプルあたり27.5 µL	-25°C~-15°C
AMPure XPビーズ	1サンプルあたり56 µL	2°C~8°C
用時調製80% エタノール (EtOH)	1サンプルあたり400 µL	
96ウェル0.2 mL PCRプレート	1プレート	
(オプション) Microseal 「B」 フィルム		
(オプション) 96ウェルMIDIプレート	1プレート	

手順

- 1 インデックスPCRプレートを20°C、280 × gで1分間遠心し、蓋についた水滴を集めます。
- 2 (オプション) 攪拌にシェーカーを使用する場合は、すべてのアンプリコンPCR産物をPCRプレートからMIDIプレートへ移します。



注意

攪拌にシェーカーを使用する場合は、サンプルを96ウェルMIDIプレートに移します。ピペットで攪拌する場合は、サンプルは96ウェルPCRプレートに入れたままでかまいません。

- 3 AMPure XPビーズを30秒間ボルテックスして、ビーズを均一に分散させます。
- 4 マルチチャンネルピペットを使用する場合は、適切な容量のビーズをリザーバーに添加します。
- 5 56 μ LのAMPure XPビーズを、インデックスPCRプレートの各ウェルに添加します。
- 6 以下のオプションから、1つ選択します：
 - ▶ 96ウェルPCRプレート：上下に10回ピペッティングして、攪拌。
 - ▶ MIDIプレート：プレートを密封し、1800 rpmで2分間振盪。
- 7 室温で5分間インキュベートします。
- 8 プレートを磁気スタンドに置き、上清が透明になるまで待ちます（～2分）。ステップ13まで、磁気スタンドの上に置いておきます。
- 9 上清を取り除き、廃棄します。
- 10 以下の手順で、ビーズを2回洗浄します。
 - a 各サンプルウェルに、80%エタノールを200 μ L添加します。
 - b プレートを磁気スタンドに置き、室温で30秒間インキュベートします。
 - c 上清を取り除き、廃棄します。
- 11 余分なエタノールを取り除きます。
- 12 10分間、風乾します。
- 13 各ウェルに10 mM Tris pH 8.5を27.5 μ L添加します。
- 14 以下のオプションから、1つ選択します：
 - ▶ 96ウェルPCRプレート：上下に10回ピペッティングして、攪拌。
 - ▶ MIDIプレート：プレートを密封し、1800 rpmで2分間振盪。
ビーズが完全に再懸濁していることを確認してください。
- 15 室温で2分間インキュベートします。
- 16 プレートを磁気スタンドに置き、上清が透明になるまで待ちます（～2分）。
- 17 インデックスPCRプレートから新しい96ウェルPCRプレートに、25 μ Lの上清を慎重に移します。

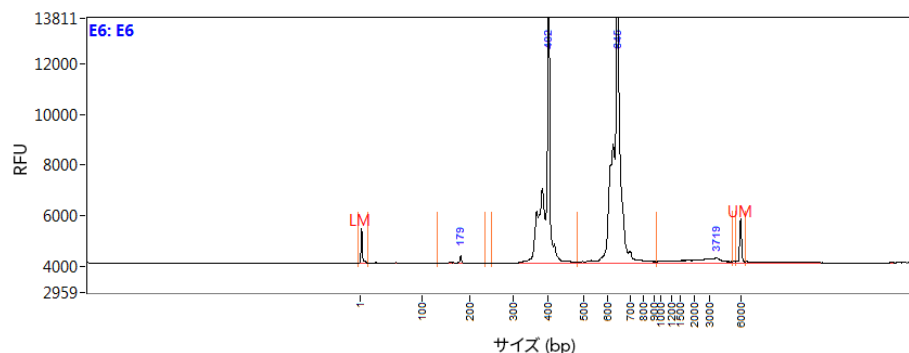
安全なストップポイント

ライブラリーの定量、ノーマライゼーション、プーリングに進まない場合、Microseal「B」粘着シールでプレートを密封し、-15°Cから-25°Cで保管してください（最長1週間）。

(オプション) ライブラリーのチェック

- 1 次のいずれかの方法を用いて、ライブラリーを検証します：
 - ▶ Bioanalyzer DNA 1000チップで1:50希釈液1 μ Lを分析します。
 - ▶ AATI High Sensitivity Kitを用いて1:20希釈液1 μ Lを分析します。標準的なライブラリーは、225～775 bpのサイズ分布を示します。ITS1のアンプリコンは、分類群に応じて、長さが異なります。

図4 バイオアナライザでの最終ライブラリーのトレースの例



ライブラリーの定量、ノーマライゼーション、プーリング

- 1 dsDNA結合色素を使用する蛍光定量法を用いて、ライブラリーを定量します。
- 2 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzerのトレースで確認したDNAアンプリコンのサイズに基づき、DNA濃度をnM単位で算出します：

$$\frac{ng / \mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{平均ライブラリーサイズ (bp)}} = \text{容積モル濃度}$$

例：

$$\frac{15 \text{ ng} / \mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times 500} = 45 \text{ nM}$$

- 3 Resuspension Buffer (RSB) または10 mM Tris pH 8.5を用いて、最終ライブラリーの濃度を4 nMに希釈します。
- 4 各ライブラリーから希釈DNAを5 μ l分取し、特有なインデックスのライブラリープールのためにアリコートを混合します。
メタゲノムサンプルでは、サンプルごとのリード数が1万5,000~10万超であれば、真菌組成の解析が十分に可能です。このリード数があれば、シーケンスプラットフォームおよびシーケンスキットに応じて、1回のランで最大384サンプルのサンプルプーリングが可能となります。

サンプルローディング

- 1 シーケンスランに適したローディング濃度にするため、ライブラリープールを変性し希釈します。シーケンスシステムのライブラリーの変性および希釈に関する指示事項を参照してください。

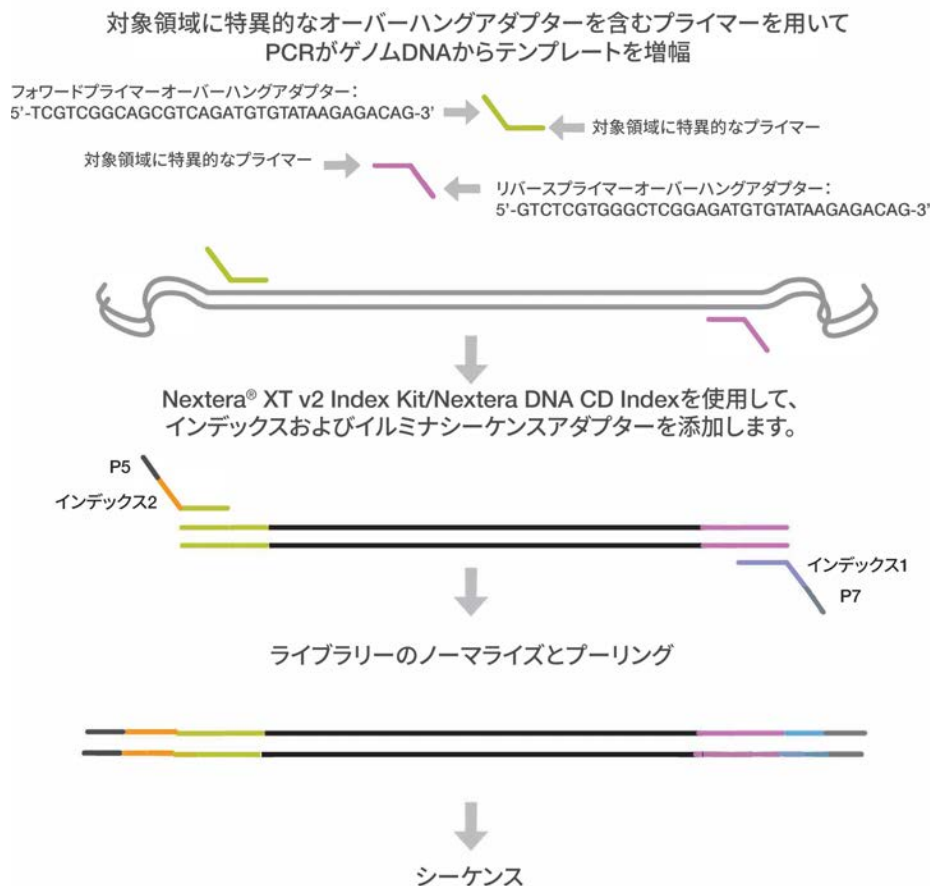
サポート情報

このプロトコルを実施するに当たり必要な情報、および準備品について下記に記しています。

ITS アンプリコンワークフロー

目的の領域の上流および下流に相補的なユーザー定義のフォワードおよびリバースプライマーは、オーバーハングアダプターと共にデザインされています。これらのプライマーを用いて、ゲノムDNAからテンプレート領域を増幅します。次に少サイクルPCRによる増幅が行われ、マルチプレックスインデックスとイルミナシーケンスアダプターが付加されます。その後、ライブラリーをノーマライズし、シーケンス前にプールします。

図5 ITS アンプリコンワークフロー



アンプリコンプライマー

本プロトコルで使用される遺伝子特異的なシーケンスは、18Sおよび5.8S rRNA遺伝子の間の真菌ITS1領域をターゲットにしています。真菌バーコード研究において広く用いられているBellemainら¹の研究によると、それらにはITS1-FおよびITS2プライマーが含まれています。

これらのプライマーシーケンスの潜在的なパフォーマンスを評価するために、プローブヒット解析を実施しました。ITS1シーケンスは、使用した解析データベース（RDP Classifier Fungal ITS Warcup Training Set V2²）では切断され、フォワードプライマーを含まなかったため、フォワードプライマーシーケンスおよびリバープライマーシーケンスについて別々のプローブヒット解析を実施しました。Warcup ITSトレーニングセットに対して、オリジナルのリバープライマーシーケンスのプローブヒット解析を実施すると、分類学的範囲にギャップが認められました。これらのギャップに対応するために、追加のプライマーをリバープライマープールに追加しました。フォワードプライマーシーケンスについてSILVAデータベースを使用して同様の解析を実施し、フォワードプライマープールに追加するプライマーシーケンスを同定しました。ITS1領域のプライマーシーケンスは、表1および表2に示します。

表1 フォワードプライマーセット

名称	シーケンス (5')
ITS_fwd_1	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS_fwd_2	CTCGGTCATTTAGAGGAAGTAA

名称	シーケンス (5')
ITS_fwd_3	CTTGTCATTTAGAGGAACTAA
ITS_fwd_4	CCCGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS_fwd_5	CTAGGCTATTTAGAGGAAGTAA
ITS_fwd_6	CTTAGTTATTTAGAGGAAGTAA
ITS_fwd_7	CTACGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS_fwd_8	CTTGTCATTTAGAGGTCGTAA

表2 リバースプライマーセット

名称	シーケンス (5')
ITS_rev_1	GCTGCGTTCATCGATGC
ITS_rev_2	GCTGCGTTCATCGATGG
ITS_rev_3	GCTACGTTTCATCGATGC
ITS_rev_4	GCTGCGTTCATCGATGT
ITS_rev_5	ACTGTGTTTCATCGATGT
ITS_rev_6	GCTGCGTTCATCGTTGC
ITS_rev_7	GCGTTCATCGATGC

また、遺伝子特異的シーケンスは、ゲノム上の他の領域を標的化するために利用される可能性があります（他のプライマー対とのITS1領域、またはITS2またはD1/D2などのゲノムにわたる非ITS1領域のいずれか）。ターゲットにする領域の座位特異的なプライマーに、オーバーハングアダプターシーケンスを添加する必要があります（図5参照）。座位特異的シーケンスに添加するイルミナオーバーハングアダプターシーケンスは、表3に示します。

表3 オーバーハングアダプターシーケンス

名称	シーケンス (5')
Forward overhang: 5'	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG- [座位特異的シーケンス]
Reverse overhang: 5'	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG- [座位特異的シーケンス]

他の領域に特異的なプライマーを設計する場合は、以下の点を考慮するようお勧めします：

- ▶ プライマーの座位特異的部分（オーバーハングシーケンスを含まない）の融解温度（ T_m ）は、PCRアニーリング温度と適合しなければなりません。オンラインのPCRプライマーシーケンス解析ツールを使用して、プライマーデザインの特性を確認してください。 T_m のみを計算する場合は、遺伝子特異的シーケンスのみを使用する必要があります。ヘアピンおよびダイマーを確認する場合は、組み立てたプライマーシーケンス全体（オーバーハングを含む）を使用しなければなりません。
- ▶ オリゴプライマーセットを注文する場合は、標準脱塩を精製したものを使用してください。



注意

このプロトコールに使用する試薬の詳細は、15ページの「消耗品および機器」を参照してください。

リソース

1. Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. BMC Microbiol. 2010;10(189).

2. Deshpande V, Wang Q, Greenfield P, et al. Fungal identification using a Bayesian classifier and the Warcup training set of internal transcribed spacer sequences. Mycologia. 2015;108(1):1-5.

消耗品および機器

サンプルを調製する前に、ユーザーが用意する必要な消耗品と器具がすべて揃っていることを点検して確認してください。

表4 ユーザーが用意する消耗品

消耗品	サプライヤー
1.7 mLマイクロ遠心チューブ	一般的なラボ用品サプライヤー
10 µLフィルターチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
10 µLマルチチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
10 µLシングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
20 µLフィルターチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
20 µLマルチチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
20 µLシングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
200 µLフィルターチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
200 µLマルチチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
200 µLシングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
1000 µLフィルターチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
1000 µLマルチチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
1000 µLシングルチャンネルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
スカートのない96ウェル0.2 mL PCRプレートまたはTwin.Tec96ウェルPCRプレート	BIO-RAD、パーツ番号 MSP-9601
Agencourt AMPure XP 60 mLキット	Beckman Coulter Genomics、パーツ番号A63881
エタノール200 proof（無水エタノール）分子生物学用（500 mL）	Sigma-Aldrich、パーツ番号 E7023
アンプリコンPCRフォワードプライマー（標準脱塩）	
アンプリコンPCRリバースプライマー（標準脱塩）	
KAPA HiFi HotStart ReadyMix（2X）	KAPA Biosystems、パーツ番号：KK2601
Microseal「A」粘着シール	Bio-Rad、パーツ番号MSA-5001
Microseal「B」粘着シール	Bio-Rad、パーツ番号 MSB-1001
MiSeq Reagent Kit v3（600 サイクル）	イルミナ、カタログ番号MS-102-3003
Nextera XT Index Kit v2	イルミナ、カタログ番号：FC-131-2001、または イルミナ、カタログ番号：FC-131-2002、または イルミナ、カタログ番号：FC-131-2003、または イルミナ、カタログ番号：FC-131-2004
Nextera DNA CD Indexes	イルミナ、カタログ番号：20018707、または イルミナ、カタログ番号：20018708
PhiX Control Kit v3	イルミナ、カタログ番号：FC-110-3001
水、PCRグレード	一般的なラボ用品サプライヤー
dsDNA結合性色素試薬による蛍光定量的な定量	一般的なラボ用品サプライヤー
RNase/DNase フリーの8ウェルPCRストリップチューブとキャップ	一般的なラボ用品サプライヤー
RNase/DNaseフリーのマルチチャンネル試薬リザーバー、ディスポーザブル	WWR、パーツ番号 89094-658
Tris-HCl 10 mM、pH 8.5	一般的なラボ用品サプライヤー
（オプション）96ウェル保管プレート、ラウンドウェル、0.8 mL（「MIDI」プレート）	Thermo Scientific、パーツ番号：AB-0859

表5 ユーザーが用意する機器

消耗品	サプライヤー
容量2.5 Lのアイスバケット	一般的なラボ用品サプライヤー
96ウェルサーマルサイクラー（加熱リッド付き）	一般的なラボ用品サプライヤー
dsDNA結合性色素による蛍光定量	一般的なラボ用品サプライヤー
磁気スタンド-96	Thermo Fisher Scientific、カタログ番号：AM10027
マイクロプレート遠心機	一般的なラボ用品サプライヤー
TruSeqインデックスプレートフィクスチャーキット（再利用可能）	イルミナ、カタログ番号：FC-130-1005
ボルテックスミキサー	一般的なラボ用品サプライヤー
（オプション）2100 Bioanalyzer Desktop System	Agilent、パーツ番号：G2940CA
（オプション）Agilent DNA 1000 Kit	アジレント、パーツ番号5067-1504
（オプション）高速マイクロプレートシェーカー	WWR、カタログ番号13500-890（110V/120V）またはWWR、カタログ番号14216-214（230V）

デュアルインデックスの原理

デュアルインデックスの方法では、2種類の8塩基のインデックス（P 7シーケンスに隣接するインデックス1(i7)、およびP 5シーケンスに隣接するインデックス2(i5))を各サンプルに添加します。Nextera XT Index Kit v2 (FC-131-2001、FC-131-2002、FC-131-2003、またはFC-131-2004)では、24種類のインデックス1 (i7) アダプター、および16種類のインデックス2 (i5) アダプターを使用します。インデックス アダプター名称において：

- ▶ NまたはSは、Nextera XTのことを指します
- ▶ 7は、インデックス1 (i7) のことを指します
- ▶ 5は、インデックス2 (i5) のことを指します
- ▶ 01~12 はインデックス番号のことを指します

サンプルを逆多重化しサンプルシートを生成するために、次のインデックスシーケンスを使用します：

インデックス1 (i7)	シーケンス	インデックス2 (i5)	シーケンス
N701	TAAGGCGA	S502	CTCTCTAT
N702	CGTACTAG	S503	TATCCTCT
N703	AGGCAGAA	S505	GTAAGGAG
N704	TCCTGAGC	S506	ACTGCATA
N705	GGACTCCT	S507	AAGGAGTA
N706	TAGGCATG	S508	CTAAGCCT
N707	CTCTCTAC	S510	CGTCTAAT
N710	CGAGGCTG	S511	TCTCTCCG
N711	AAGAGGCA	S513	TCGACTAG
N712	GTAGAGGA	S515	TTCTAGCT
N714	GCTCATGA	S516	CCTAGAGT
N715	ATCTCAGG	S517	GCGTAAGA
N716	ACTCGCTA	S518	CTATTAAG
N718	GGAGCTAC	S520	AAGGCTAT
N719	GCGTAGTA	S521	GAGCCTTA
N720	CGGAGCCT	S522	TTATGCGA

インデックス1 (i7)	シーケンス	インデックス2 (i5)	シーケンス
N721	TACGCTGC		
N722	ATGCGCAG		
N723	TAGCGCTC		
N724	ACTGAGCG		
N726	CCTAAGAC		
N727	CGATCAGT		
N728	TGCAGCTA		
N729	TCGACGTC		

Nextera DNA CD Index Kitについては、『Index Adapters Pooling Guide (文書番号1000000041074)』およびNextera DNA Flex Kitサポートページを参照してください。

低プレックスプールのガイドライン

MISeq/HiSeqにおいては、G/Tのシーケンスには緑色のレーザーまたはLED、A/Cのシーケンスには赤色のレーザーまたはLEDが使用されます。適切に登録されるよう、各カラーチャンネルに該当する2つのヌクレオチドのうち少なくとも1つが各サイクルごとに読み込まれます。シーケンスが行われるインデックスリードの各塩基に対して、カラーバランスを維持することが大切です。維持できないと、インデックスリードのシーケンスは、うまく塩基が割り当てられず、クオリティーが低くなるおそれがあります。デュアルインデックスシーケンスを選択した場合には、インデックスそれぞれ（インデックス1とインデックス2）に、必ず独立したバーコードペアを少なくとも2つ使用してください。次のテーブルは、可能なプール方式を示しています。

表6 プーリングの方法

プレックス	インデックス1 (i7) 選択	インデックス2 (i5) 選択
1プレックス (プーリングなし)	任意のインデックス1アダプター	任意のインデックス2アダプター
2プレックス	<ul style="list-style-type: none"> (オプション1) N702およびN701 (オプション2) N702およびN704 	任意のインデックス2アダプター
3プレックス	<ul style="list-style-type: none"> (オプション1) N701、N702およびN704 (オプション2) N703、N705およびN706 	任意のインデックス2アダプター
4プレックスまたは5プレックス	<ul style="list-style-type: none"> (オプション1) N701、N702、N704および他の任意のインデックス1アダプター (オプション2) N703、N705、N706および他の任意のインデックス1アダプター 	任意のインデックス2アダプター
6プレックス	N701、N702、N703、N704、N705およびN706	任意のインデックス2アダプター
7~12プレックス、デュアルインデックス	<ul style="list-style-type: none"> (オプション1) N701、N702、N704、および他の任意のインデックス1アダプター (必要に応じて) (オプション2) N703、N705、N706、および他の任意のインデックス1アダプター (必要に応じて) 	S505およびS506
7~12プレックス、シングルインデックス (96 サンプル、Nextera Index Adapter Kit)	N701-N706、および他の任意のインデックス1アダプター (必要に応じて)	任意のインデックス2 (i5) アダプター
> 12プレックス	N701、N702、N703、N704、N705、N706、および任意の他のインデックス1アダプター	S505、S506、および任意の他のインデックス2アダプター (必要に応じて)

上記の方法は、受け入れ可能な組み合わせのうちの一部だけを示しています。もしくは、各インデックスの実際のシーケンスを確認し、それぞれの塩基位置で、インデックスリード用のカラーチャンネルのどちらの色もシグナルとして検出されることを確認してください：

図6 塩基位置シグナル

好ましい				好ましくない			
インデックス1		インデックス2		インデックス1		インデックス2	
705	GGACTCCT	503	TATCCTCT	705	GGACTCCT	502	CTCTCTAT
706	TAGGCATG	503	TATCCTCT	706	TAGGCATG	502	CTCTCTAT
701	TAAGCCGA	504	AGAGTAGA	701	TAAGCCGA	503	TATCCTCT
702	CGTACTAG	504	AGAGTAGA	702	CGTACTAG	503	TATCCTCT
	√√√√√√√√		√√√√√√√√		√√√√√√√√		√√√√xxxx

√=2色チャンネルでのシグナル
x=1色チャンネルでのシグナル欠損

改訂履歴

文書	日付	変更内容
文書番号：1000000064940 v01	2019年 2月	シーケンスサイクル番号エラーの訂正。 アンプリコンPCR手順の明記。 Nextera DNA CDインデックス情報の追加。
文書番号：1000000064940 v00	2018年 9月	初版リリース