

16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく細菌の分類・同定

【ゲノム DNA の調製】

直径 1 mm 程度のコロニーを一人 6 個ずつ選び、チップでサンプリングする（コロニーの真上から、チップの先端が 1 mm くらい培地に刺さるように突き刺し、そっと引き抜く）。
※サンプリングしたコロニーがどのような特徴（色、大きさ、光沢、におい、シャーレ内における出現頻度、など）を持っていたかをメモしておくこと。

エッペンチューブに入れた Lysozyme 液（MiniPrep A 液 + 2 mg/ml Lysozyme）20 μ l に懸濁する。

37°C に 30 分間置く。

Proteinase K 液（0.1 mg/ml Proteinase K + 1 % Tween 20）を 20 μ l 加える。

60°C で 20 分間、さらに 95°C で 3 分間処理する。

微量冷却遠心機を 4°C にセットし、15,000 rpm で 10 分間遠心する。

上清を新しいエッペンチューブに移す。

【PCR】

次のように混合する。

H ₂ O	13.2 μ l	} プレミックス液 19 μ l
10x Buffer	2 μ l	
2.5 mM dNTPs	1.6 μ l	
Primer 16S-63f (2 μ M)	1 μ l	
Primer 16S-1387r (2 μ M)	1 μ l	
Taq polymerase	0.2 μ l	
Bacterial DNA	1 μ l	
(Total 20 μ l)		

94°C, 4 min → (94°C, 30 sec → 50°C, 30 sec → 72°C, 30 sec) x 30 cycles → 72°C, 7 min
→ 4°C

10 μ l を電気泳動する。

十分な濃度（100 ng 以上）のバンドが見えたサンプルを選ぶ。

【シーケンス反応】

BigDye 3.1*	1 μ l	} プレミックス液 9 μ l
5 x buffer	1.5 μ l	
H ₂ O	5.5 μ l	
Primer (1.6 μ M)**	1 μ l	
PCR fragment	1 μ l	
(Total 10 μ l)		

96°C, 1 min → (96°C, 10 sec → 50°C, 5 sec → 60°C, 4 min) x 25 cycles → 4°C

* Buffer, Taq polymerase, dNTP, labeled ddNTP の混合液

** 16S-63f

【シーケンス反応サンプルの精製】

反応液に、125 mM EDTA を 2.5 μ l と EtOH を 30 μ l 加える。

遮光して、室温で 15 分置く。

5000 x g、4°C で 15 分間遠心する。

上清を除く。沈殿に 70% EtOH を 30 μ l 加える。

5000 x g、4°C で 5 分間遠心する。

上清を除く。

60°C の乾燥機で沈殿を乾燥させる。(液がなくなったらやめる。乾かしすぎると溶けなくなる。)

Hi-Di Formamide を 25 μ l 加える。

95°C で 3 分間加熱する。(変性)

氷冷

専用チューブに移し、シーケンサーにセットする。

【参考】プライマーの配列

16S-63f CAGGCCTAACACATGCAAGTC
16S-1387r GGGCGGWGTGTACAAGGC