シーケンスのためのPCRトラブルシューティング

トラブル

増幅されない、あるいは極端に増幅量が少ない

ターゲットのサイズ以外にも複数の増幅がある

ネガティブコントロールに増幅がみられる

予想される原因

DNAの問題

- テンプレートDNA量が不十分である
- テンプレートDNAの質が悪い（PCR阻害物質の存在）

PCR条件の問題

- プライマー特異性が低い
- 増幅困難なターゲット　他

原因はひとつに限らず複合的にかかわる場合もある

試薬の汚染、あるいは作業中のコンタミネーション

対処法

ターゲットの増幅量が十分にある

NO

YES

DNAの問題を解決する

- テンプレートDNA量を増やす
- DNAを再抽出する（DNAの質の改善）

劣化、コンタミ、阻害物質の混入について疑われる場合はITS領域をPCRしてみると良い。 ITS領域はコピー数が多く、プライマーもユニバーサルなので必ず増幅するはずである。問題があればDNAを再抽出する。

改善なければ

PCR条件を変更する

- アニーリング温度を下げる（-2℃から徐々に）
- サイクル数を増やす（+5サイクル）

PCR条件を変更するとまた新たなトラブルが出てくることも多い。各シーケンス領域の注意事項表を参考にする。

試薬の交換、機器の滅菌、作業環境を整備する

電気泳動アガロースゲルからターゲットバンドを切り出して抽出する

あるいは、
非特異のバンドが薄い場合、アニーリング温度を上げることでターゲット単一の増幅産物を得ることもできる（+2℃から徐々に）

ターゲット以外にも複数のバンドがあれば

電気泳動アガロースゲルの切り出し抽出へ

各領域別の予想されるトラブルと注意事項

	PCR	シーケンス解析
全領域共通	<u>増幅されない、あるいは増幅量が極めて少ない場合</u> どの領域においてもテンプレート DNA 量は通常 100pg とした。増幅が悪い場合はテンプレート DNA 量を増やして再試する(通常の 5 倍量)。逆にテンプレートが多すぎると増幅されない現象が起こるのでむやみに入れすぎないことが肝要である。それでも増幅が改善されない時は DNA の、劣化・阻害物質の混入・コンタミネーションが疑われる。DNA の質については、ITS 領域の PCR 結果から判断できる。 ITS 領域はコピー数が多く、ユニバーサルプライマーなので必ず増幅するはずである。問題があれば DNA を再抽出することをお勧めするが、再抽出ができない時は、エタノール沈殿で精製・濃縮を行うと改善する場合がある。 以上の対処で解決できない場合は、PCR のアニーリング温度を下げ(-2℃から徐々に試行する)、サイクル数(+5 サイクル)を上げることで増幅できることもある。 <u>ターゲットサイズ以外の非特異なバンドがみられる場合</u> ターゲットの増幅量が十分であり、非特異の増幅量が少ない場合は、アニーリング温度をあげて非特異の増幅を抑えることができる。＋2℃から徐々に試行する。 またターゲットの増幅量が十分であり、近いサイズに非特異のバンドがない場合、アガロースゲルからターゲットバンドを切り出して単一の増幅産物を抽出・精製をすることができる。 ターゲットの増幅量が十分に得られない場合は、上段に示した“増幅量が少ない場合”の対処を行う。 <u>PCR 産物の精製方法について</u> 状況に応じて主に次の 3 つを採用した。 1. 単一のバンドで十分な増幅がある場合、酵素精製（Exosap-it, Thermo Fisher） 2. 単一だが増幅が少ない場合、カラム精製。溶出量が調整できるので濃縮することが可能である(総量 25μl から回収量 10μl へ。 Monarch PCR & DNA Cleanup Ki, BioLabs） 3. ターゲット以外のサイズにも増幅が見られる場合、アガロースゲルからターゲットバンドを切り出して抽出する(Thermostable β-Agarase, ニッポンジーン)	<u>シーケンスデータが全く得られない</u> 分離したピークが全く見られない。 N（未決定）のみのデータ　などの現象。 シーケンス操作のミスがないのであれば、増幅産物とプライマーが適合しなかった、つまりターゲットの増幅ができていなかったと考えられる。最初の PCR からやり直す。 <u>解読できたシーケンスデータが短い</u> シーケンス反応のテンプレートとなる増幅産物の濃度が薄かったり、不純物が混入していると、シグナル強度は早い段階で衰退する。最初の PCR を改良して質のよい増幅産物を得る。また濃度の問題は、酵素精製からカラム精製に変更することで濃縮して高濃度の産物を得ることができる。 <u>ピークの重なりが見られる</u> 菌株内多型の可能性がある。 同じ塩基の連続した領域があるときのポリメラーゼのスリップ現象も要因として考えられる。 シーケンス方向を逆にするとよめることも多い。ピークの重なりが始まるポイントより内側のインナープライマーを選びシーケンスする。 それでも改善されない場合は、クローニングにより分離して目的のクローンをシーケンスする。

<table>
<tr><th></th><th>PCR</th><th>シーケンス解析</th></tr>
<tr><td>ITS</td><td>増幅は容易。
上記共通項を参照</td><td><u>読み始めはきれいだが途中からピークの重なりが見られる</u>
シーケンス方向を逆にするとよむことができる場合もあるので、必要に応じてインナープライマーを使用する。</td></tr>
<tr><td>LSU</td><td>増幅は容易。
上記共通項を参照</td><td><u>インナープライマーについて</u>
5’末端を読むためにインナープライマー LSURint が必要である。
3’末端を読むためにインナープライマー LSUFint が必要である。</td></tr>
<tr><td>cox1</td><td>増幅は容易。
上記共通項を参照</td><td><u>末端が見つからない</u>
cox1 の各末端は反対側から読むしかないので、PCR の増幅が不十分だと長くよめず末端までとどいてない場合がある。680bp の長さを目安に判断して長さが足りないようなら最初の PCR からやり直す。

また 3'末端は、
……TCAA…8 塩基目でカットが主流だが、種によっては…..TACCAA…..の場合があった。必ず全長 680bp であるので、長さを目安に見極める。</td></tr>
<tr><td>cox2 + spacer</td><td><u>上記共通項の対処をしても増幅が悪い場合</u>
増幅産物をさらに nested PCR をして十分な産物を得ることもできる。薄いバンドだが目視で確認できる程度なら、その PCR 産物を 10 倍希釈してテンプレート DNA とし、最初の PCR と同じプライマーおよび同じ反応条件で再 PCR する。また、非特異なバンドが現れる場合は、アガロースゲル抽出でターゲットバンドを切り出して純化する。</td><td><u>インナープライマーについて</u>
5’末端を読むためにインナープライマーFM78 が必要である。

<u>spacer が読めない</u>
このプライマーセットを使用することで、cox2 と spacer の連続したシーケンスデータを得ることができる。しかし spacer 領域は AT リッチの配列であるため、一部の種において読むことができない場合があった。</td></tr>
<tr><td>cox2 + spacer + cox1</td><td colspan="2">cox2 から cox1 までの連続した領域で増幅することも可能である (amplicon size 1700bp ぐらい)。この連続したひとつの amplicon から、各ターゲットの領域に適したシーケンスプライマーを選択することで、 cox2+spacer、cox1 の各シーケンスデータを得ることができる（下表参照)。増幅サイズが大きいので増幅困難な場合も多い。その場合は上記のとおり各領域別に増幅してシーケンスする。
<table>
<tr><th rowspan="2">最初の PCR で用いるプライマー</th><th rowspan="2">シーケンス領域</th><th colspan="5">シーケンス反応で用いるプライマー</th></tr>
<tr><th>FM75</th><th>FM78</th><th>Oom-col-Lev-up</th><th>FM80</th><th>FM85-mod</th></tr>
<tr><td rowspan="2">Fw; FM75,
Rv; FM85-mod</td><td>cox2+spacer</td><td>○</td><td>○</td><td></td><td>○</td><td></td></tr>
<tr><td>cox1</td><td></td><td></td><td>○</td><td></td><td>○</td></tr>
</table></td></tr>
</table>

	PCR	シーケンス解析
β-tubulin		

DNA に問題がなくても種によっては増幅困難な場合が多いので、次の順に攻略していく。

Trial1 領域内の最も外側のプライマー(Fw; 9A, Rv; 10)で増幅することで最大の Sequence length1287bp を得ることができる。非特異の増幅が出ることが多いので、ターゲットサイズのバンドの増幅が十分ならばアガロースゲルからターゲットバンドを切り出して DNA を抽出して純化する。

Trial2 上記が困難な場合、5'側パーシャル(Fw; 9A, Rv; 13A)、3'側パーシャル(Fw; 7, Rv; 10)を各々増幅してシーケンスする。のちに assemble して Sequence length1287bp を得る。この場合も 1 と同様に非特異のバンドが出やすいので、必要に応じてアガロースゲルから DNA 抽出して純化する。

参考)
5'側パーシャルとして、プライマーセット(Fw; 9A, Rv; 11B)でも増幅が可能である。長さが短いので、3'側パーシャル(Fw; 7, Rv; 10)とは assemble できない。しかし、 Trial3 のデータに assemble することができるので、5'末端を限定的に読む上では有用である。

Trial3 上記 2 法とも増幅困難な場合、領域内のさらに内側のプライマー(Fw; Btub_F1A, Rv; Btub_R1A)を用いる。増幅は容易だが両末端各 80bases 程が読めない。目的によってはこの方法から試してもよい。

使用したプライマーセットを各種ごとに表に記したので参考にするとよい。

シーケンスで用いるプライマーについて

Trial 1 と 2 においては末端を読むためにインナープライマーが必要な場合がある。下表にシーケンス PCR に必要なプライマーを記した。

Trial		Sequencing primer				
		9A	11B	7	13A	10
1	Fw; 9A, Rv; 10	○	○	○	○	○
2	5' partial					
	Fw; 9A, Rv; 13A	○	○		○	
	Fw; 9A, Rv; 11B	○	○			
	3' partial					
	Fw; 7, Rv; 10			○		○

増幅産物が得られてもインナープライマーが適合しない場合もある。最長の Sequence length を得るためには、5'末端には 11B、3'末端には 13A が必須だが、解析できない場合は次の Trial へすすむ。

より長く読むために

Trial 3 で得たシーケンスデータに、Trial 1 あるいは 2 で解析可能であったパーシャルなデータを assemble することでより長い領域を読むことができる。獲得したデータは上手に活用しよう。

<table>
<tr><th></th><th>PCR</th><th>シーケンス解析</th></tr>
<tr><td>TigA</td><td>
<u>タッチダウン PCR について</u>
非特異の増幅を防ぐために有効だが、ターゲットが増幅できないときは通常の PCR に戻し、ターゲットを増幅させることを優先させるのもよい。

<u>DNA の問題を解決しても、PCR 条件を変更しても増幅ができなかった場合</u>
TPI と G3PDH をコードする領域をそれぞれ増幅してシーケンスすることができる。この場合２つの領域を連結することはできない。

使用するプライマーは下記のとおり
反応液組成、サーマル条件は従来と同じ
<table>
<tr><td rowspan="2">TPI</td><td>Forward;</td><td>Tig_FY;</td></tr>
<tr><td>Reverse;</td><td>Tig_rev</td></tr>
<tr><td rowspan="2">G3PDH</td><td>Forward;</td><td>G3PDH _for</td></tr>
<tr><td>Reverse;</td><td>G3PDH_rev</td></tr>
</table>
</td><td>
<u>シーケンスで用いるプライマーについて</u>
全長読むためにはインナープライマーが必要である。本研究室では次の 2 パターンが可能であった。方法 1 は、当研究室オリジナルのインナープライマーを使用しており、assemble のしやすさから推奨する。
<table>
<tr><td rowspan="2"></td><td colspan="7">Sequencing primer</td></tr>
<tr><td>Tig_FY</td><td>Tig_Rv2
469-488</td><td>G3PDH
_for</td><td>Tig_rev</td><td>Tig_Rev
1455-
1474</td><td>Tig_fw
1442-
1461</td><td>G3PDH
_rev</td></tr>
<tr><td>1</td><td>○</td><td>○</td><td></td><td></td><td>○</td><td>○</td><td>○</td></tr>
<tr><td>2</td><td>○</td><td></td><td>○</td><td>○</td><td></td><td></td><td>○</td></tr>
</table>
</td></tr>
</table>

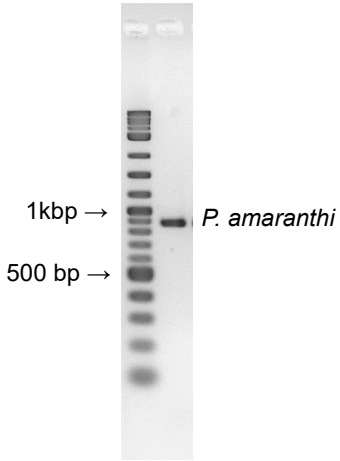
フローチャート；“シーケンスのための PCR トラブルシューティング” を参照にするとよい。

ITS

Reaction mixture

			Final conc.
DNA	1	µl	
SDW	15.875		
BSA (4 mg/ml)	2.5		
X10 Buffer	2.5		
dNTP (2.5mM)	2		0.2 mM
Forward (10µM)	0.5		0.2 µM
Reverse (10µM)	0.5		0.2 µM
TaKaRa Taq	0.125		
	25		

Amplicon size



Thermal condition

94 ℃	3 min	
94 ℃	30sec	35 cycles
55 ℃	30sec	35 cycles
72 ℃	1 min	35 cycles
72 ℃	10 min	

Primer sequence

Forward; ITS 5; GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG

Reverse; ITS 4; TCCTCCGCTTATTGATATGC

Additional sequencing primers (if necessary);

Froward; ITS 3; GCATCGATGAAGAACGCAGC

Reverse; ITS 2; GCTGCGTTCTTCATCGATGC

Sequence length

around 750-900 bases

>ITS_amranthi_P20892

.....**/CCACAC**CTAAAAAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAACCCTTTTAGTTGGGGGTCTTGTACCCTATCATGGCGA

ATGTTTGGACTTCGGTCCGGGCGAGTAGCTTTTTGTTTTAAACTCATTTCACAATTCTGATTATACTGTGGGGACGA

ITS3 / ITS2

AAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGA

ACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGT

CCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACTTGGCTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGAGGATGTG

CCAGATGTGAAGTGTCTTGCGTGTTGTCCTTCGGGTCGGCTGCGAGTCCTTTTAAATGTACTGAACTGTACTTCTC

TTTGCTCGAAAAGCGTGGTGTTGCTGGTTGTGGAGGCTGCCTGCGTGGCCAGTCGGCGACCGGTTTGTCTGCTG

CGGCGTTTAATGGAGGAGTGTTCGATTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAGGCGCTTATTGAATGCTTTTCC

TGCTGTGGCGTGATGGGCTGGTGAACCGTAGCTGTGTTTGGCTTGGCTTTTGAATCGGCTTTGCTGTTGCGAAGT

AGAGTGGCGGCTTCGGCTGTCGAGGGTCGATCCATTTTGGGAAATTTGTGTGCACTTCGGTGCGCATCTCAA/**TTG**

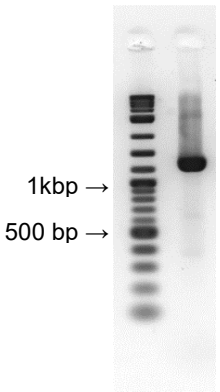
GACC.....

LSU

Reaction mixture

			Final conc.
DNA	1	μl	
SDW	14.875		
BSA (4 mg/ml)	2.5		
X10 Buffer	2.5		
dNTP (2.5mM)	2		0.2 mM
Forward (25μM)	1		1 μM
Reverse (25μM)	1		1 μM
TaKaRa Taq	0.125		
	25		

Amplicon size



P. pseudolactucae

Thermal condition

94 ℃	2 min	
94 ℃	30sec	35 cycles
53 ℃	30sec	35 cycles
72 ℃	2 min	35 cycles
72 ℃	5 min	

Primer sequence

Forward;	LROR-O;	ACCCGCTGAACTYAAGC	25-41
Reverse;	LR6-O;	CGCCAGACGAGCTTACC	1365-1349

Additional seqencing primers;

Forward;	LSUFint;	CKTTGACGAAATGGAGCGAT	816-797
Reverse;	LSURint;	TTTCCACACCCTAACACTTGC	879-859

Sequence length

around1260 bases

>LSU_pseudolactuae_CBS137103

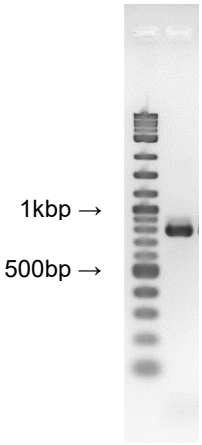
...../**CTAACAA**GGATTCCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGGAAGAGCTCAAGCTTAAAATCTCCGTGCAAGTTTTGCATGGCGAAT
TGTAGTCTATAGAAGCGTGGTCAGTGAGGGTACTCGGGGTAAGTTCCTTGGAAGAGGACAGCATGGAGGGTGAAACTCCCGTTC
ATCCCTGAGTGGCTCTTGCGTACGACCCGTTTTCTTTGAGTCGCGTTGTTTGGGAATGCAGCGCAAAGTAGGTGGTAAATTCCATC
TAAAGCTAAATATTGGTGCGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTTAAAGAGT
ACCTGAAACTGCTGAAAGGGAACCGAATCGTTTCCAGTGTCTATAATCCGTGGCATATTTCATTGGCGAGTGTGTGCGTGTGTGTG
CTGTGGCAGTGGCTTTTATTAGCTGCGCTCGGTGTGCGTGCTGTGTGTGCTTGCTGGTGCCCTGTGCTGTGGTGGGACGTCAAT
GTCAGTTCGTATGCTGCGGGAAATGGCTGCCGAGGAGGTAGGGCTTACGCTTGCGTTTGTCTGTTATATCTTGGTGGACGAGTCG
TCGCGGTTGGGACTGAGGTGCCTATAACGTGCTTTTGAGTGTGTGTGGGTCTCCGTGTGCGCCGTGTGCGGATAGCTTGCTATG
CGTGTGTGGTTGTGCGTGGATTGATGCGCGCTGTAGCTTGTCGCCGTTCGGGA[LSUFint]CGTTGACGAAATGGAGCGATCCGACCCGTC
TTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATATGT[LSURint]GCAAGTGTTAGGGTGTGGAAACCCCAGCGCGAAATGAAAGTAAAGAGCAG
CGCAAGTTGTTTAAGGTAGGAAACGCTGTGGGCTTCGGTCTGCGGTGTGGCACTATCGACCGATCATGAGCCTTCGTGGCGAAA
GATTTGAGTTTGAGCACATATGTTGGTACCCGAAAGATGGTGAACTATGCCTGAGTAGGGTGAAGCCAGGGGAAACTCTGGTGGA
AGCTCGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCGAACTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATCGAACCATCTAGTAGCTGGTTC
CCTCCGAAATTTCCCTCAGGATAGCAGCAACTTATTTACGATAGTTTTATGAGGTAAAGCGAATGATTAGAGGATTCGGGGAAGAAA
CTTTCTCGACCTATTCTCAAACTTTAAATCTGTAAGACCTGCAGGTTTCTTAATTGAACTTGTGGAAGC**GAATATCAA**/.....

*cox*1

Reaction mixture

			Final conc.
DNA	1	μl	
SDW	15.875		
BSA (4 mg/ml)	2.5		
X10 Buffer	2.5		
dNTP (2.5mM)	2		0.2 mM
Forward (25μM)	0.5		0.5 μM
Reverse (25μM)	0.5		0.5 μM
TaKaRa Taq	0.125		
	25		

Amplicon size



P. gregata

Thermal condition

94 ℃	2 min	
94 ℃	1 min	35 cycles
55 ℃	1 min	35 cycles
72 ℃	1 min	35 cycles
72 ℃	10 min	

Primer sequence

Forward; Oom-COI-Lev-up; TCAWCWMGATGGCTTTTTTCAAC

Reverse; FM85-mod; RRHWACKTGACTDATRATACCAAA

Sequence length

680 bases

>*cox*1_gregata_CH97TUL2

.....**A/AATC**ATAAAGATATTGGTACTTTATATTTAATTTTTAGTGCTTTTGCTGGTATTGTTGGTACAACTTTATCACTTTT
AATTCGTATGGAATTAGCACAACCCGGTAATCAAATTTTTATGGGAAATCATCAATTATATAATGTTGTTGTTACTGCA
CATGCTTTTATTATGGTTTTCTTTTTAGTTATGCCTGCTTTAATTGGTGGTTTTGGTAATTGGTTTGTTCCTTTAATGAT
TGGGGCACCTGATATGGCTTTTCCTCGTATGAATAATATTAGTTTTTGGTTATTACCACCCGCTTTATTATTATTAGTAT
CATCAGCTATTGTTGAATCTGGTGCTGGTACTGGTTGGACAGTTTATCCACCATTAGCAAGTGCACAAGCACACTC
AGGACCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTTAGTTTACATTTAACAGGTATTTCATCTTTATTAGGTGCTATTAATTTTATTTC
AACTATTTATAATATGAGAGCTCCTGGTTTAAGTTTTCATAGATTACCTTTATTTGTTTGGTCTGTATTAATTACAGCTT
TTCTTTTATTATTAACATTACCAGTGTTAGCAGGTGCTATTACAATGTTATTAACCGATAGAAATTTAAATACTTCTTTTT
ATGACCCATCAGGTGGAGGAGATCCAGTATTATA**TCAA**CATTTATT/.....

cox2 & spacer

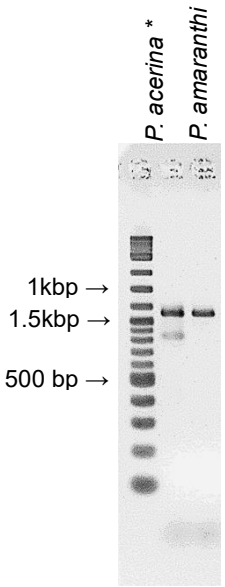
Reaction mixture

		Final conc.
DNA	1 μ	
SDW	14.875	
BSA (4 mg/ml)	2.5	
X10 Buffer	2.5	
dNTP (2.5mM)	2	0.2 mM
Forward (25μM)	1	1 μM
Reverse (25μM)	1	1 μM
TaKaRa Taq	0.125	
	25	

Thermal condition

95 ℃	4 min	
95 ℃	1 min	35 cycles
52 ℃	1 min	35 cycles
72 ℃	1 min	35 cycles
72 ℃	5 min	

Amplicon size



*; 非特異なバンドが現れる時は、ゲル抽出で純化する

Primer sequence

Forward;	Cox2-F;	GGCAAATGGGTTTTCAAGATCC
Reverse;	FMPhy-10b;	GCAAAAGCACTAAAAATTAAATA

Additional seqencing primers;

Reverse;	FM78;	ACAAATTTCACTACATTGTCC

Sequence length

cox2;	684 bases
cox2 & spacer;	around 880-920 bases

>cox2&spacer_acerina_CBS133931

...../**ATGG**AAGGTATTATAAATTTTCATCATGATTTAATGTTTTTTTTAATTATGATTGTTATATTTGTATGTTGGATGTTAT
TTAGAGTTGTTACTCTTTTTGATGAAAAAAAAAATAAAATTCCAGCAACTGTTGTACATGGTGCAACTATTGAAATTAT
TTGGACTTCTATTCCAGCTTTAATTTTATTAACTGTAGCAATACCATCTTTTGCATTATTATATTCAATGGATGAAGTAAT
TGATCCTATTATTACTTTAAAAGTAATAGGTAGTCAATGGTACTGGAGTTATGAATATTCAGATAATTTAGAATTTTCTG
ATGAACCTTTAATTTTTGATAGTTATATGATACAAGAAGATGATTTAGCTATAGGTCAATTTAGACTTTTAGAAGTAGAT
AATCGTGTTGTAGTTCCAACTAATAGTCATATTAGGGTATTAATTACAGCATCAGATGTTTTACATTCTTGGGCTATAC
CATCATTAGGTATAAAATTAGATGCATGTCCTGGACGTTTAAATCAAACTTCAATGTTTATTAAAAGAGAAGGTGTTTT
FM78
TTATGGACAATGTAGTGAAATTTGTGGAGTAAATCATGGATTTATGCCTATTGTTGTTGAAGCTGTTTCATTAGAAGA
cox2 ← → spacer
TTATTTAACTTGGTT**AAAAAATAAAA**TCAATTTTGATTTTAATGTATAA / TTAAAAATTTTTATGATATTTAAAATTATTG
GTATTATTTTTTTAATCTTATTATTATTTACGGATATAAAACAGATAATAAATAAAATTAAACAATTTTTTAATAAATAAAGA
GATACTTTATTAACTTAAATAATAAAAAATTAAAAAAACCAACGCTTTTTTTAATTTTTAAATAAAATATATAATTTTGCTT
→ cox1
TTAAAAAGAATTAAAAAATATTTAAAA / **ATGAATTTTCAAAATATAAA**.....

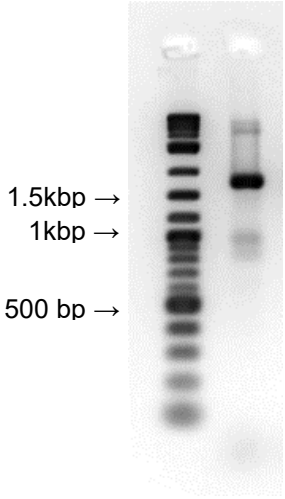
番外編　*cox2* & *cox1*

cox2 、*cox1*、spacer を含めた連続した領域で増幅して(amplicon size 約 1700bp)、シーケンス反応でターゲットの領域に適した primer を選択することで、ひとつの amplicon から各領域のシーケンスデータを得ることが可能である。

Reaction mixture

			Final conc.
DNA	1	μl	
SDW	15.875		
BSA (4 mg/ml)	2.5		
X10 Buffer	2.5		
dNTP (2.5mM)	2		0.2 mM
Forward (25μM)	0.5		0.5 μM
Reverse (25μM)	0.5		0.5 μM
TaKaRa Taq	0.125		
	25		

Amplicon size



P. syringae

Thermal condition

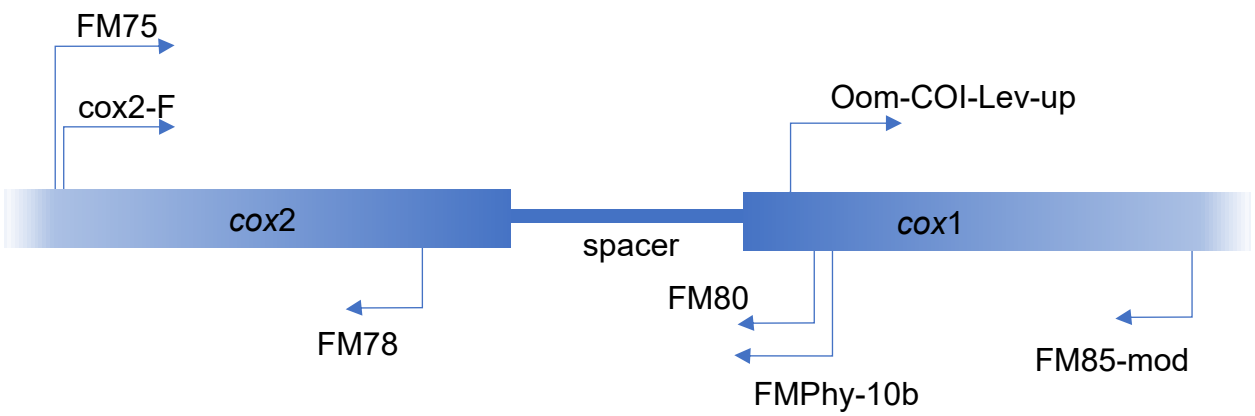
94 ℃	3 min	
94 ℃	30sec	35 cycles
52 ℃	30sec	35 cycles
72 ℃	1 min	35 cycles
72 ℃	10 min	

Primer sequence

Forward; FM75; CCTTGGCAATTAGGATTTCAAGAT
Reverse; FM85-mod; RRHWACKTGACTDATRATACCAAA

Sequencing primers for *cox2*;
FM75; CCTTGGCAATTAGGATTTCAAGAT
FM78; ACAAATTTCACTACATTGTCC
FM80; AATATCTTTATGATTTGTTGAAA

Sequencing primers for *cox1*;
Oom-COI-Lev-up; TCAWCWMGATGGCTTTTTTCAAC
FM85-mod; RRHWACKTGACTDATRATACCAAA



β-tubulin (1st trial)

Reaction mixture

			Final conc.
DNA	1	μl	
SDW	15.875		
BSA (4 mg/ml)	2.5		
X10 Buffer	2.5		
dNTP (2.5mM)	2		0.2 mM
Forward (10μM)	0.5		0.2 μM
Reverse (10μM)	0.5		0.2 μM
TaKaRa Taq	0.125		
	25		

Thermal condition

94 ℃	3 min	
94 ℃	1 min	40 cycles
52 ℃	1 min	40 cycles
72 ℃	2 min	40 cycles
72 ℃	10 min	

Primer sequence

Forward;	9A;	TAGTTCACATCCAAGGTGGC	11-30
Reverse;	10;	CTACATCATTTCGTCCATTTCTTC	1341-1318

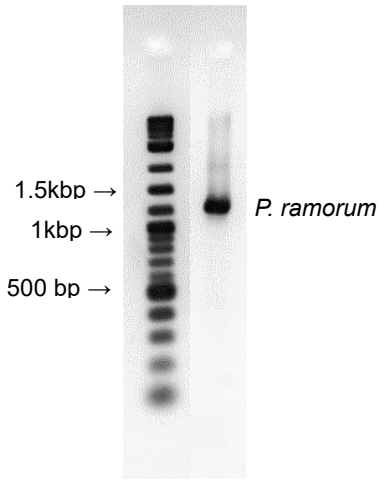
Additional sequencing primers;

Forward;	7;	TTCATGATTGGTTTCGCGCC	796-815
Reverse;	13A;	CGGCGCACATCATGTTCTT	907-889
	11B;	CACATCACTTCATCGGCGTT	602-583

Sequence length

1287 bases

Amplicon size



β-tubulin (2nd trial)

Reaction mixture

			Final conc.
DNA	1	μl	
SDW	15.875		
BSA (4 mg/ml)	2.5		
X10 Buffer	2.5		
dNTP (2.5mM)	2		0.2 mM
Forward (10μM)	0.5		0.2 μM
Reverse (10μM)	0.5		0.2 μM
TaKaRa Taq	0.125		
	25		

Thermal condition

94 ℃	3 min	
94 ℃	1 min	40 cycles
52 ℃	1 min	40 cycles
72 ℃	2 min	40 cycles
72 ℃	10 min	

Primer sequence

- 5' partial

Forward;	9A	TAGTTCACATCCAAGGTGGC	11-30
Reverse;	13A	CGGCGCACATCATGTTCTT	907-889
Additional sequencing primers;	11B;	CACATCACTTCATCGGCGTT	602-583

- 3' partial

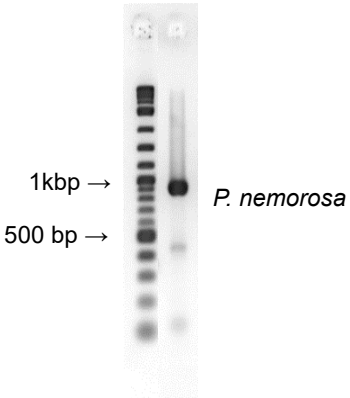
Forward;	7	TTCATGATTGGTTTCGCGCC	796-815
Reverse;	10	CTACATCATTTCGTCCATTTCTTC	1341-1318

Sequence length

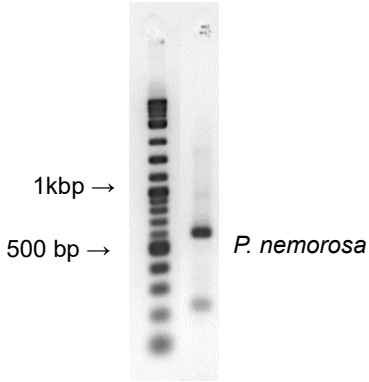
1287 bases

Amplicon size

5' partial (9A+13A)



3' partial (7 +10)



β -tubulin (3rd trial)

Reaction mixture

			Final conc.
DNA	1	µl	
SDW	14.875		
BSA (4 mg/ml)	2.5		
X10 Buffer	2.5		
dNTP (2.5mM)	2		0.2 mM
Forward (25µM)	1		1 µM
Reverse (25µM)	1		1 µM
TaKaRa Taq	0.125		
	25		

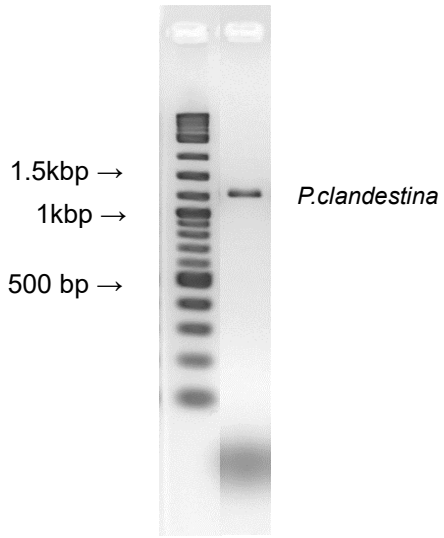
Thermal condition

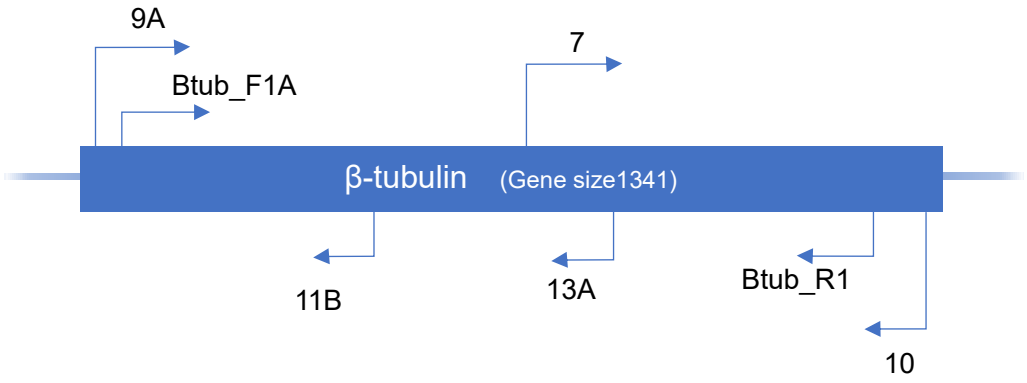
94 ℃	5 min	
94 ℃	30sec	35 cycles
60 ℃	30sec	35 cycles
72 ℃	1 min	35 cycles
72 ℃	10 min	

Primer sequence

Forward;	Btub_F1A;	GCCAAGTTCTGGGARGTSAT	52-71
Reverse;	Btub_R1A;	CCTGGTACTGCTGGTAYTCMGA	1280-1259

Amplicon size





>Btub_ramorum_CBS101553

....**AAGGTGGC** / CAGTGCGGTAACCAGATCGGCGCCAAGTTCTGGGAGGTTATCTCCGACGAGCACGGCGTGGA
CCCCACGGGCTCGTACCACGGCGACTCGGACCTGCAGCTGGAGCGCATCAATGTGTACTACAACGAGGCCACGGG
CGGCCGCTACGTGCCCCGCGCCATCCTCATGGACCTGGAGCCCGGCACCATGGACTCGGTCCGCGCCGGCCCCT
ACGGCCAGCTCTTCCGCCCGGACAACTTCGTGTTCGGTCAGACCGGCGCCGGTAACAACTGGGCTAAGGGACACT
ACACGGAGGGTGCCGAGCTTATCGACTCGGTGCTCGACGTCGTCCGCAAGGAGGCCGAGAGCTGTGACTGCCTG
CAGGGGTTCCAGATCACGCACTCGCTTGGTGGCGGTACCGGTTCTGGTATGGGCACGCTTTTGATCTCCAAGATCC
GTGAGGAGTACCCGGACCGTATCATGTGCACGTACTCGGTGTGCCCGTCGCCCAAGGTGTCGGACACGGTCGTGG
AGCCCTACAACGCCACGCTGTCGGTGCACCAGCTTGTCGAGAACGCCGACGAGGTCATGTGCCTGGATAACGAGG
CGCTGTACGACATTTGCTTCCGCACGCTCAAGCTCACCACCCCCACCTACGGTGACCTGAACCACCTGGTGTGCGC
CGCTATGTCCGGCATCACCACGTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAGCTGAACTCGGACCTGCGGAAGCTGGCGGTGAA
CTTGATTCCGTTCCCGCGTCTTCACTTCTTCATGATTGGTTTCGCCCCGCTGACCTCGCGTGGCTCGCAGCAGTAC
CGTGCCCTGACGGTGCCCGAGCTGACCCAGCAGCAGTTCGACGCAAAGAACATGATGTGCGCCGCCGACCCTCG
TCACGGCCGCTATTTAACTGCCGCGTGTATGTTCCGCGGACGTATGAGCACGAAGGAGGTTGATGAGCAGATGCTG
AACGTGCAGAACAAGAACTCGTCGTACTTCGTCGAGTGGATCCCTAACAACATCAAGGCTAGCGTGTGTGACATCCC
GCCCAAGGGGCTGAAGATGAGCACTACGTTCATCGGTAACTCGACCGCTATCCAGGAGATGTTCAAGCGTGTGTCT
GAGCAGTTTACGGCTATGTTCCGTCGTAAGGCTTTCTTGCACTGGTACACGGGCGAGGGTATGGACGAGATGGAGT
TCACGGAGGCCGAGTCCAACATGAACGATCTTGTGTCTGAGTACCAGCAGTACCAGGACGCCACCGCAGAGGAGG
AGGGCGAGTTCGACGAGGAT/**GAAGAAAT**.....

*Tig*A

Reaction mixture

			Final conc.
DNA	1	μl	
SDW	14.875		
BSA (4 mg/ml)	2.5		
X10 Buffer	2.5		
dNTP (2.5mM)	2		0.2 mM
Forward (25μM)	1		1 μM
Reverse (25μM)	1		1 μM
TaKaRa Taq	0.125		
	25		

Thermal condition

94 ℃	2 min	
94 ℃	30sec	10 cycles
65 ℃ (-1℃ / cycle to 56℃)	30sec	10 cycles
72 ℃	2 min	10 cycles
94 ℃	30sec	30 cycles
56 ℃	30sec	30 cycles
72 ℃	2 min	30 cycles
72 ℃	5 min	

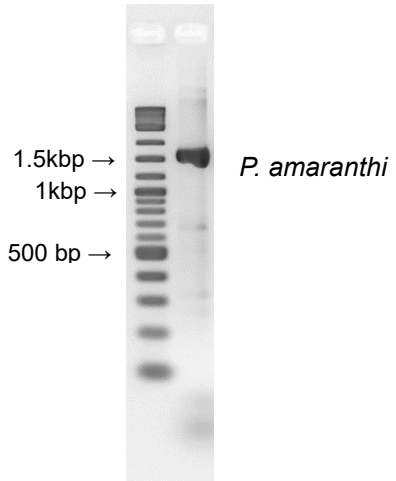
Primer sequence

Forward;	Tig_FY;	TCGTGGGCGGYAAYTGGAA	25-42
Reverse;	G3PDH_rev;	GCCCCACTCRTTGTCRTACCAC	1719-1698
Alternative			
Forward;	G3PDH_for;	TCGCYATCAACGGMTTCGG	779-797
Reverse;	Tig_rev;	CCGAAKCCGTTGATRGCGA	797-779

Additional sequencing primers;

Forward;	Tig_fw 1442-1461;	AGCTGACGGGCATGTCNTTC	1442-1461
Reverse;	Tig Rv2 469-488;	ATSACNACRTBGGTCCAGTC	488-469
	TigRv 1455-1474;	CMGTVGGMACACGGAACGAC	1474-1455

Amplicon size



Sequence length

1653 bases

>TigA_amaranthi_P20892

....**TGGAA**/GTGCAACGGCTCGTTGGGCCAGGCGCAGGAGCTTGTGGGAATGCTCAACACTGCCAAAATCCCAG

CCAACGTGGAGGTCGTGGTGGCCCCCTCGCAAGTGCACGCAGCTACTGTCAAGGCTTCGCTGCGCTCCGACG

TGCGTGTGAGCGGTCAGGACGTCTGGAAGCAGGGCAACGGCGCCTTCACCGGCGAGACGTCAGCCGAGATG

CTCAAGGATCTGGGCGCGGAGTACACGCTGGTGGGCCACAGTGAGCGTCGTGAGAAGGGCGAAACTAATGAG

ATTGTGGCTAAGAAGGCTGCTTATGCTCTTGAGAAGGGCCTAGGCGTCATTGCCTGCATTGGTGAGACCAAGGA

GCTCCGTGAGGCCAACCAGACGGTGGCGTACATCACGGAACAGCTCGATGCCTACGCGGCTGAGATCAAG

Tig Rv2 469-488

GACTGGACCAACGTCGTCATTGCATACGAACCCATCTGGGCCATTGGAACGGGCCTCACCGCCTCACCTGAA

CAGGCTCAGGAGGTGCACGCCAGTATCCGCGCGTGGCTCAAGGAGAAGGTCTCCTCTGACGCTGCTGAGAAG

ACCCGCTTGATTTACGGCGGCTCGGTTGGTGCTAAGAACGCCCCCGAACTCTCGCAGAAGGAGGACATTGATG

GCTTCCTGGTTGGTGGCGCATCCCTCAAGCCTGACTTCCTCCAGATCATCAACGCCCAGAACCCGACGGACAA

G3PDH_for / Tig_rev

CGTCGGTGGTGCCGTGAACGTTGCCATCAACGGCTTCGGCCGTATTGGCCGTCTGGTGCTGCGTGCTGCGG

CCACGAATCCGCTCATCAACATTGTTGCTATCAATGACCCGTTCATCTCCACCACTTACATGGAGTACATGCTCGA

GTACGACACGGTCCACGGCAAGTTCGCTGGCTCGCTTTCTCACGACGAGCAGCACATTTTCGTAAACGGCAAG

CCCATCCGTGTGTTCAACGAGATGAACCCGGCTAACATCAAGTGGGGCGAGGAGCAAGTGCAGTACGTGGTGG

AGTCCACTGGAGCCTTCACGACCACGGAGAAGGCGTCGGCCCACTTGCAGAACGGTGTGGAGAAGGTGGTGA

TCTCGGCCCCGTCCAGCGACGCTCCCATGTTCGTGATGGGCGTGAACCACGAGCTGTACGAGAAGAACATGCA

CGTGGTGTCGAACGCATCGTGCACGACGAACTGTCTGGCGCCTCTGGCCAAGGTGGTGAACGACAAGTTCGG

CATCAAGGAGGGTCTGATGACGACGGTGCACGCTGTGACTGCCACGCAGAAGACGGTGGACGGTCCGTCTAA

GAAGGACTGGCGTGGAGGTCGTGGCGCTTGCTTCAACATCATCCCTAGCTCCACTGGCGCTGCGAAGGCTGT

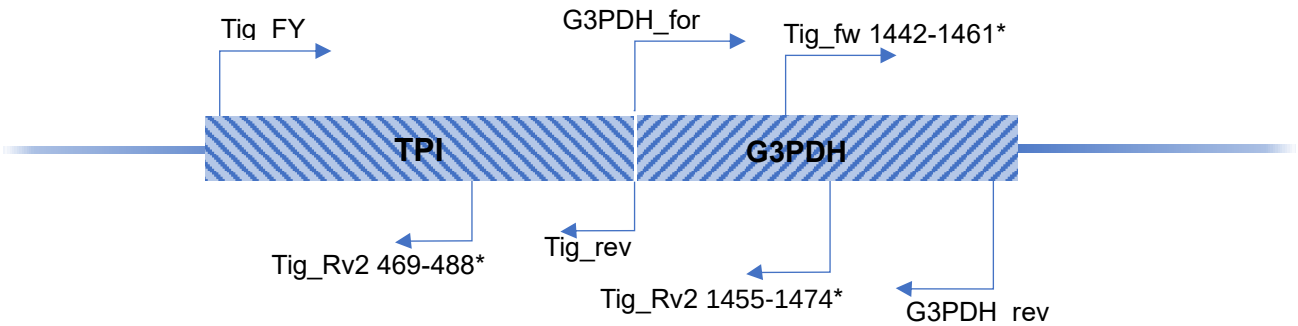
Tig_fw1442-1461/TigRv1455-1474

GGGTAAGGTGATCCCGAGCCTAAATGGCAAGTTGACTGGCATGTCGTTCCGCGTTCCTACTGATGTGTCTGTT

GTGGACCTGACTGCTCGTCTGGTGAACCCTGCGTCGTACGACGAGATTAAGGCTGCGATCAAGTCTGCCAGCG

AGAACGAGATGAAGGGAATTCTCGGCTACACCGAGAAGGCCGTCGTTTCCAGCGACTTCATTGGTGACTCGCA

CTCTTCGATCTTCGATGCTGAGGCTGGTATTGCTTTGACCAACGACTTCGTGAAACTGGTGTC/**GTGGTA**....



トリオースリン酸イソメラーゼ（TPI）とグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（G3PDH）をコードする遺伝子が融合し、Phytophthora 種の単一転写ユニット（tigA）を形成する。

*; 当研究室オリジナル primer