

Bar-Coded Split Tag (BStag) を用いた DNA マーカーのポストラベル条件の検討

小西 あや子*・大山 暁男**・柿崎 智博・宮武 宏治
山口 博隆・布目 司・福岡 浩之

(平成 26 年 8 月 15 日受理)

Optimization of Post-Labeling Conditions for DNA Markers Using a Bar-Coded Split Tag (BStag)

Ayako Konishi, Akio Ohyama, Tomohiro Kakizaki, Koji Miyatake,
Hirotaka Yamaguchi, Tsukasa Nunome and Hiroyuki Fukuoka

I 緒 言

DNA マーカーを利用した選抜技術は、多数の優良形質を集積する必要がある作物育種の現場において、選抜の効率化、省力化さらには早期選抜による育種年限短縮のための重要な手法の一つである。効果的に DNA マーカー選抜を行うためには、操作が簡便でアレル変異の検出力が高く汎用性に優れた DNA マーカー、特に SSR などの PCR ベースマーカーを多数用意する必要がある。SSR マーカーの多型を検出するには、電気泳動による PCR 増幅産物サイズの識別が必要になるが、育成現場においては栽培種内それも系譜が似る系統同士の交雑も日常的である。このような非常に近い系譜間の交雑においてはアレルサイズの多型が極めて小さいことが多く、識別には蛍光 DNA シーケンサ等の解像力の高い分析装置の使用が前提となる。しかしながら、蛍光 DNA シーケンサを用いた増幅サイズの識別においては、可視化のための増幅産物の蛍光標識も別途必要になる。予めプライマーを標識しておく方法は従来から広く用いられているが (Guichoux ら 2011)、全てのマーカー (プライマー) を標識するための初期投資が莫大になりがちである。こ

れを解決するための低コスト化手法が幾つか考案されている。PCR 反応の増幅産物に後から蛍光標識するポストラベル法については Iwahara ら (1995) や Inazuka ら (1996,1997) によって報告されており、これらは蛍光プライマーの作成経費を削減できる手法として有用であるが、蛍光標識を行う際に非常に手間がかかる。一方、ユニバーサルプライマーを利用したポストラベル法は forward プライマーにユニバーサルプライマーを付加したもの、reverse プライマー、および蛍光標識したユニバーサルプライマーの 3 つのプライマーを用いた PCR を行うことで増幅産物が標識される方法であり、解析時の手間と経費を削減するために極めて有用である。これまでに Oettinger ら (1995)、Neilan ら (1997)、Schuelke (2000) が単一のユニバーサルプライマーと一種類の蛍光色素を用いたポストラベル法を報告しているが、似通ったサイズの増幅産物については同時に解析を行えないことから、一度に解析を行うマーカー数には限りがある。また、Missiaglia ら (2006) は複数のユニバーサルプライマーおよび複数の蛍光標識を PCR に用い、増幅産物を混合して分析を行ったが、1 つの反応で複数マーカーを用いた多型分析 (マルチプレックス PCR) を行うことは難しいとしている。一方、Guo ら (2003) は 2 つのユニバーサルプライ

〒 514-2392 三重県津市安濃町草生 360

野菜育種・ゲノム研究領域

* 京都府農林水産技術センター生物資源研究センター

** 野菜生産技術研究領域

マーにそれぞれ異なる蛍光標識をすることで、ポストラベルによるマルチプレックス PCR を可能とした。この手法の発展型として Shimizu ら (2011) が報告した bar-coded split tag (BStag) を利用した 1 チューブ多重ポストラベル法は、ユニバーサルプライマーとしての BStag 配列を付加したプライマーおよび同じ BStag 配列に対し蛍光標識したプライマーを混合して PCR を行う手法であり、通常の増幅反応に引き続き標識のための少数回の PCR を行うことで手間なくポストラベルができる。また、BStag 配列は特異性が高いため、1 つのチューブ内で複数のプライマーを用いた PCR の後、異なる蛍光色素で標識した BStag で増副産物を別個に標識することにより容易にマルチプレックス PCR ができることも大きな特徴である。本研究では、この手法を行う上で問題となる非特異の増幅産物を削減する方法および 1 反応で用いる最適プライマー数について検討を行った。

本研究は 2012 年 11 月まで野菜茶業研究所に依頼研究員として在籍した期間に行った研究であり、ご支援を頂いた野菜育種・ゲノム研究領域の諸氏ならびに宮崎県総合農業試験場の杉田亘博士に深く感謝いたします。

II 材料および方法

1 植物材料

トウガラシ ‘京都万願寺 2 号’、‘S3586’、ナス ‘AE-P03’、トマト系統 ‘GMRF10-009’、キュウリ ‘CSPMR1’、メロン ‘AR5’、ネギ ‘夏扇 4 号’ およびイチゴ ‘中間母本 2 号’ の若い葉を採取し、DNA 抽出の材料とした。

2 植物体からの DNA の抽出

植物体の若葉約 50mg に対し DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 社) の buffer AP1 400ul を加え、マルチビーズショッカー (安井器械) を用いて室温条件で破碎し、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 社) の添付プロトコルに基づき抽出した。抽出した DNA を Picogreen (invitrogen 社) で染色した後、プレートリーダー (ARVO MX, Perkin Elmer 社) で吸光度 (485nm/535nm) を測定し、定量した。

3 PCR 条件

PCR の酵素として、Shimizu ら (2011) で用いられている酵素 (KAPA 2G FAST, KAPA BIOSYSTEMS 社) と同一メーカーの Multiplex PCR 用酵素 (KAPA 2G FAST Multiplex Mix, KAPA BIOSYSTEMS 社) を供試した。PCR 溶液の組成は表-1 のとおりとした。PCR にはサーマルサイクラー (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystem 社) を用いた。また、PCR の温度条件は表-2 のとおりである。蛍光標識されていないプライマーによる PCR 増幅産物は、2% アガロースゲル電気泳動を行った後 Et-Br (10μl/l) で染色し、目視でバンドを確認した。蛍光標識された PCR 増幅産物は、希釈後にホルムアミドおよびサイズマーカー (Gene-Scan-500LIZ Size Standard, Applied Biosystems) を加え、蛍光 DNA シーケンサ (3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems) で泳動した。増幅産物の長さは GeneMapper ver.3.7 (Applied Biosystems) で解析した。

表-1 酵素毎の PCR 溶液

KAPA 2G FAST ^a		KAPA 2G FAST Multiplex Mix	
鋳型 DNA	10ng ^b	鋳型 DNA	10ng ^b
KAPA 2G Buffer A	1x	KAPA 2G FAST Multiplex Mix	1x
dNTP	0.2mM	BStag プライマー ミックス ^c	3pmol
MgCl ₂	0.5mM	蒸留水	up to 10μl
BStag プライマー ミックス ^c	3pmol		
又は BStag プライマー	0.5pmol		
KAPA 2G FAST	0.1U		
蒸留水	up to 10μl		

a Shimizuら(2011)

b Shimizuら(2011)の溶液では2.5ngであったが、酵素毎の推奨鋳型DNA量(KAPA 2G FAST: ≤100ng KAPA2G FAST Multiplex Mix:4~100ng)を参考に10ngに変更した

c BStag プライマー ミックス

forward プライマー + BStag 0.5pmole

reverse プライマー 2pmole

蛍光標識した BStag 0.5pmole

表-2 PCR の温度条件

A ^a		B ^b		C ^b		D ^b				
94°C	3分	94°C	3分	94°C	3分	94°C	3分			
94°C	20秒	} x30	94°C	20秒	} x30	94°C	20秒	} x30		
54°C	30秒		62°C	60秒		60°C	30秒		60°C	30秒
62°C	30秒		72°C	60秒		72°C	60秒		72°C	30秒
94°C	20秒	} x3	94°C	20秒	} x3	94°C	20秒	} x3		
49°C	10秒		49°C	10秒		49°C	10秒		49°C	10秒
72°C	5秒		72°C	5秒		72°C	5秒		72°C	5秒
72°C	10分		72°C	10分		72°C	10分			

a Shimizuら(2011)

b 酵素毎の推奨温度条件を参考に条件を設定

KAPA 2G FAST(アニーリング:72°C 10秒, 伸長:72°C 1~15秒/kb)

KAPA 2G FAST Multiplex Mix(アニーリング:60°C 30秒, 伸長:72°C 15~90秒)

表-3 供試した BStag プライマーの配列

番号	名称	塩基配列
BS01	F9TCG	CTAGTATGAGGACTCG
BS02	F9AGC	CTAGTATCAGGACAGC
BS03 ^a	F9GAC	CTAGTATCAGGACGAC
BS04	F9CTG	CTAGTATGAGGACCTG
BS05	F9TGC	CTAGTATGAGGACTGC
BS06	F9ACG	CTAGTATCAGGACACG
BS07	F9CAG	CTAGTATCAGGACCAG
BS08 ^a	F9GTC	CTAGTATGAGGACGTC
BS09	F9CAC	CTAGTATGAGGACCAC
BS10 ^a	F9TAC	CTAGTATCAGGACTAC
BS11	F9AAG	CTAGTATGAGGACAAG
BS12	F9ACC	CTAGTATGAGGACACC
BS13 ^a	F9GCC	CTAGTATTAGGACGCC
BS14	F9TCC	CTAGTATCAGGACTCC
BS15 ^a	F9CCG	CTAGTATTAGGACCCG
BS16	F9CGC	CTAGTATAAGGACCGC
BS17 ^a	F9AGG	CTAGTATTAGGACAGG
BS18	F9ATG	CTAGTATCAGGACATG
BS19	F9GTG	CTAGTATAAGGACGTG
BS20	F9TTG	CTAGTATCAGGACTTG

a Shimizuら(2011)

4 供試したプライマー

BStag プライマーには, Shimizu ら (2011) が報告した 6 種類に加え合計 20 種類を供試した (表-3)。また, そのうち 4 種類の BStag の 5' 末端に蛍光標識を付加したプライマー (BS08:FAM, BS10:NED, BS17:PET, BS20:VIC), およびトウガラシに特異的なプライマー配列に 4 種類の BStag を付加したプライマー (表-4) を供試した。

III 結 果

1 汎用性の高い BStag プライマーの検索

20 種類の BStag プライマーと 7 種類の植物由来 DNA を組合せ, Shimizu ら (2011) の反応条件 (表-2, A) で PCR を行い, 非特異の増幅産物を比較した。供試した DNA により非特異産物が増幅されにくい BStag プライマーが異なったが, BS08, BS10, BS20 の 3 つは 7 種類すべての植物由来 DNA で非特異産物が増幅されなかった (表-5, 図-1)。

2 BStag を利用した多重ポストラベル法における PCR の温度条件の検討

トウガラシ '京都万願寺 2 号' の DNA および蛍光標識した BStag, トウガラシに特異的な BStag プライマーミックスを供試し, PCR の温度条件を検討した。PCR 溶液は Shimizu ら (2011) と同様にした (表-1, KAPA 2G FAST)。温度条件は Shimizu ら (2011) の条件を基に酵素供給元の推奨温度に従って設定した。表-2 の A~D の温度条件では, A で最も非特異の増幅産物が多かった。A の温度条件で多くの非特異産物が増幅されたプライマーでも, B または C に温度条件を変えることで非特異産物の増幅が抑えられた。しかし, B の温度条件では目的とする増幅産物も増幅しにくくなる傾向が見られた (表-6, 図-2)。

表-4 供試したプライマーの配列

名称	塩基配列 ^a
ge204F-BS08	<u>CTAGTATGAGGACGTC</u> AGACAGGTTATTAAGAGAGGTCTGGA
ge204R	GTTTAACTTTCAGCCAACCTAAACCCAA
ge104F-BS10	<u>CTAGTATCAGGACTAC</u> GAGTCATGTTGGAGCCACTT
ge104R	GTTTCTAAAGGAGAATCTTTTAATGAAGG
ge258F-BS17	<u>CTAGTATTAGGACAGGAT</u> CACCAAGGCTACAACCCTCCTA
ge258R	GTTTGAAGGTATAGGTCCCAAGGGGAT
ge246F-BS20	<u>CTAGTATCAGGACTTG</u> ATTTCAACTCGACACGATTCACCA
ge246R	GTTTAAGGAAGGTCGAATGAACGCATAA
es709F-BS08	<u>CTAGTATGAGGACGTC</u> ATACTATTGGCACCAAGTTCAGGC
es709R	GTTTGCAGAGAAGACTCACCAGTCCTAGC
ge095F-BS10	<u>CTAGTATCAGGACTAC</u> GACAAAAATACCCTTATCACAC
ge095R	GTTTAATCAAACATGTAAGATACG
ge267F-BS17	<u>CTAGTATTAGGACAGGAT</u> GGAAGGGAGAAATGAGGGATCT
ge267R	GTTTCACGTTGAGTGAGGGTATCCAGTG
es762F-BS20	<u>CTAGTATCAGGACTTG</u> AGGATGTTATTCTTCAACGTTGGCT
es762R	GTTTCCTGGACTTTTTCCAGTACCTGC
ge266F-BS08	<u>CTAGTATGAGGACGTC</u> AACGACATCACTCACAGACAATCG
ge266R	GTTTGGAGTGAAGCTGGTGATGCTTTTT
ge041F-BS10	<u>CTAGTATCAGGACTAC</u> ATGTAGAGAGGGATGGTGAAAGCC
ge041R	GTTTAAGAGACCACACCGAACAAGAAGC
es741F-BS17	<u>CTAGTATTAGGACAGGAT</u> AGGGAAGCGGAAACTTGAAGAG
es741R	GTTTCCAGGGTGATATCAAAGCCCT
es734F-BS20	<u>CTAGTATCAGGACTTG</u> ATGGAGCACCATACTCAAACAACC
es734R	GTTTACATCTCCCGACTGAAACTCCG
HpmsE016F-BS20	<u>CTAGTATCAGGACTTG</u> CCAAGTTCAGGCCCAGGAGTAA
HpmsE016R	GTTTGCAGAGAAGACTCACCAGTCC
es728F-BS08	<u>CTAGTATGAGGACGTC</u> ATCGAACACTCGCACACTTCTCT
es728R	GTTTGGTGCATCTCCGCTTAGTGTTA
es737F-BS10	<u>CTAGTATCAGGACTAC</u> ACAACCTCACCTACTCAATGGATGG
es737R	GTTTGAGACCTTCTTCGAATCGGTTTCA
PM32F-BS17	<u>CTAGTATTAGGACAGGCT</u> ACTAGCTACACTCCCACA
PM32R	GTTTCGGTGGAGCCTCCTCT
es742F-BS08	<u>CTAGTATGAGGACGTC</u> AGCGCAAGAAGAAAGGAGGTAAGG
es742R	GTTTCCCCTCCTCTTCAAATCATCC
HpmsE072F-BS17	<u>CTAGTATTAGGACAGGGCT</u> CATCAACCCACCTTCATCA
HpmsE072R	GTTTGCCTTGTCCGAGTAGGGAAG
es738F-BS17	<u>CTAGTATTAGGACAGGAG</u> CTCGCAATTTCACTTCAGTTAC
es738R	GTTTGCCTAGGGAGGAGCGATAGAGAA
PM6F-BS10	<u>CTAGTATCAGGACTAC</u> CACGCCAAGAAAATCATCTCC
PM6R	GTTTCAGAGATGGAGACCTGAGC
es732F-BS08	<u>CTAGTATGAGGACGTC</u> AGATGGGATGCAAGAGTTTCATGT
es732R	GTTTCCCACGTTATACCATCCAGGTTGT
Hpms2-21F-BS20	<u>CTAGTATCAGGACTTG</u> TTTTTCAATTGATGCATGACCGATA
Hpms2-21R	GTTTGTCAATTTGTCATTGATTTGG

a 下線部分: BStag配列

3 BStag を利用した多重ポストラベル法に使用する酵素およびプライマー数の検討

トウガラシの DNA およびトウガラシに特異的なプライマーの BStag プライマーミックスを供試して, KAPA 2G FAST (反応温度: 表-2, A) と KAPA 2G FAST

Multiplex Mix (表-2, C) の比較を行った. 両方の酵素で同様に目的とする増幅産物が得られた. 非特異的増幅産物は KAPA 2G FAST Multiplex Mix の方が少なかった (図-3). 1 反応で同時に増幅させるプライマーの数を検討したところ, プライマー対が 4 組以下の場合

表-5 BStag プライマーによる作物ごとの増幅産物の比較

プライマー名	作物名						
	トウガラシ	ナス	トマト	キュウリ	メロン	ネギ	イチゴ
BS01	++	++	++	++	++	++	+
BS02	++	-	++	++	++	++	+
BS03	+	++	-	+	++	++	+
BS04	++	++	+	++	++	+	++
BS05	++	++	++	+	++	++	++
BS06	++	+	+	++	+	+	++
BS07	++	++	++	++	++	++	++
BS08	-	-	-	-	-	-	-
BS09	++	++	++	++	++	++	++
BS10	-	-	-	-	-	-	-
BS11	++	++	-	++	++	++	+
BS12	++	++	++	++	++	++	++
BS13	++	++	++	++	++	++	++
BS14	-	+	+	+	+	-	-
BS15	++	++	++	++	++	++	++
BS16	++	++	++	++	++	++	++
BS17	++	++	+	++	++	-	+
BS18	-	+	+	-	++	-	-
BS19	+	+	++	++	++	-	-
BS20	-	-	-	-	-	-	-

a -: 増幅なし, +: 1~2つの増幅産物あり, ++: 3つ以上の増幅産物あり

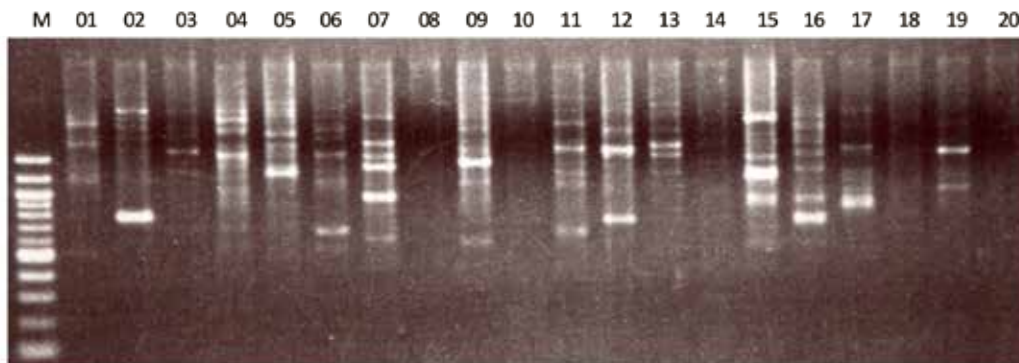


図-1 BStag による増幅産物 (鋳型 DNA: トウガラシ 'S3586')

M: 100bp ladder marker; 01 ~ 20: BS01 ~ BS20

表-6 非特異および目的とする増幅産物の温度条件による比較

プライマー名	非特異の増幅産物				目的とする増幅産物			
	温度条件				温度条件			
	A	B	C	D	A	B	C	D
BS08	-	-	-	-				
BS10	-	-	-	-				
BS17	++	-	-	-				
BS20	+	-	-	-				
ge204-BS08	-	-	-	-	++	+	++	++
ge104-BS10	++	-	+	+	++	+	++	++
ge258-BS17	++	-	++	++	++	++	++	++
ge246-BS20	++	-	+	+	++	+	++	++
es709-BS08	+	-	-	-	++	+	++	++
ge095-BS10	++	-	+	+	++	++	++	++
ge267-BS17	-	-	-	-	++	+	++	++
es762-BS20	+	-	-	-	++	+	++	++

a -: 増幅なし, +: 増幅産物あり, ++: はっきりした(複数の)増幅産物あり

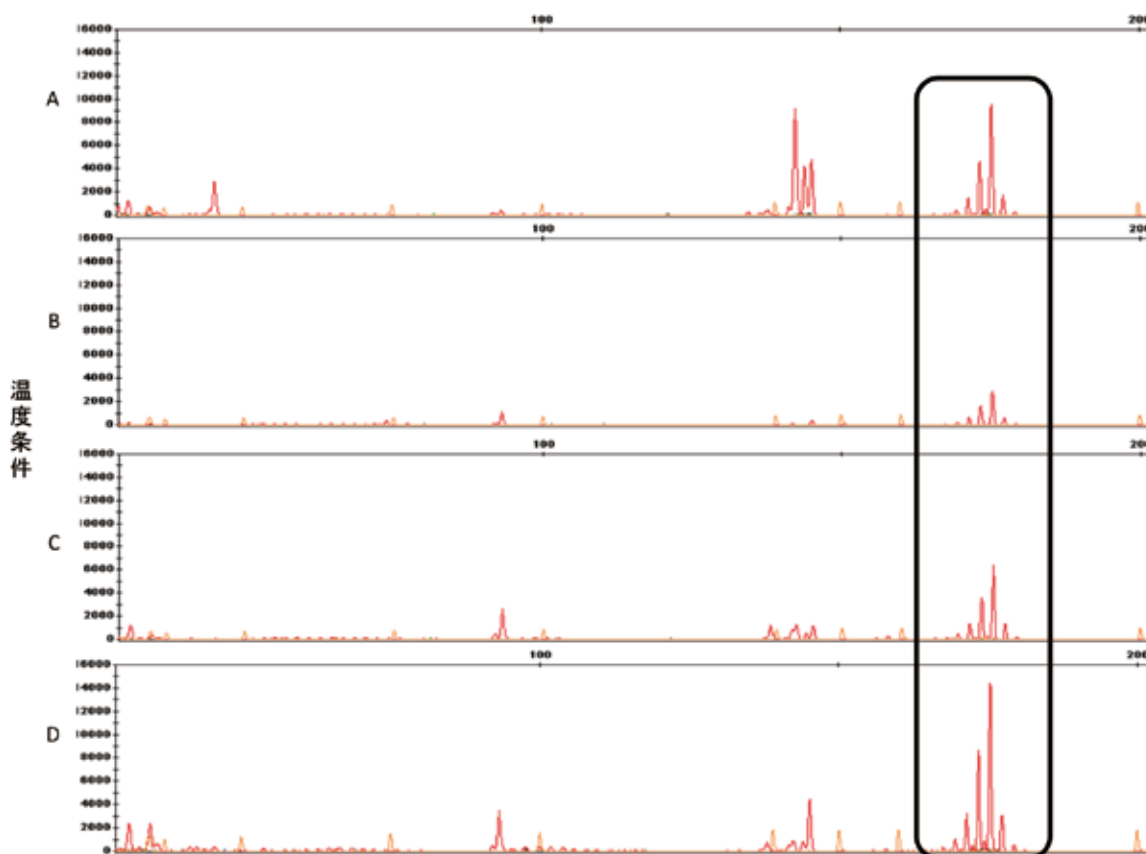


図-2 異なる温度条件での増幅産物の比較

鋳型 DNA: トウガラシ '京都万願寺2号', プライマー: ge258-BS17

囲み内のバンド: 目的の増幅産物 (アリル数: 1)

はどちらの酵素でも同様の増幅産物が得られたが、プライマー対が6組以上になると KAPA 2G FAST で増幅が減少し、プライマーによっては増幅産物が得られない場合もあった (図-3)。KAPA 2G FAST Multiplex Mix を用いた場合、6組以上のプライマー対でも増幅産物が得られ、最大8組のプライマー対を用いた多型解析も可能であった (図-3)。複数のプライマー対を用いたマルチプレックス PCR では溶液中に複数の蛍光標識 BStag が混在するが、増幅産物はそれぞれのプライマー対に対応した蛍光標識 BStag のみで標識された (図-3)。

IV 考 察

BStag を利用した多重ポストラベル法を効率よく行うためには、まず使用する BStag プライマーを選抜する必要があるが、本研究の結果 BS08, BS10, BS20 が様々な植物由来 DNA に対し汎用性が高いと考えられた。Shimizu ら (2011) の報告ではカンキツ, リンゴ, ニホンナシ, ニホングリ, オウトウ, ダイズ, キュウリ, ナス, トマト,

スイカ, トウガラシ, ホウレンソウで検討され、上記3種類の BS-Tag 以外にも BS03, BS13, BS15, BS17 でも非特異産物が増幅されないと報告している。本試験では Shimizu ら (2011) より鋳型 DNA の供試量を増やしていることも非特異産物が多く見られた一因と考えられるが、品種や系統により非特異産物の増幅程度に差があることも推測された。また、本研究で用いた BStag 以外にも BStag の設計ができるため、非特異産物の増幅が多く見られる場合には他の BStag 配列を検討する必要がある。

一方、Shimizu ら (2011) の反応条件で PCR を行い非特異産物の増幅が多かった場合には、アニーリング温度を上げるなど反応温度を変えることで減らすことが可能であった。特に、目的とする増幅産物の付近に非特異産物の大きな増幅が見られる場合には、有効な手段と考えられる。しかし、アニーリング温度を上げることにより、目的とする増幅産物の増幅が減少してしまう場合もあるため (表-6, 図-2), 用いるプライマーによっては注意が必要である。

また、一度のマルチプレックス PCR に用いるプライ

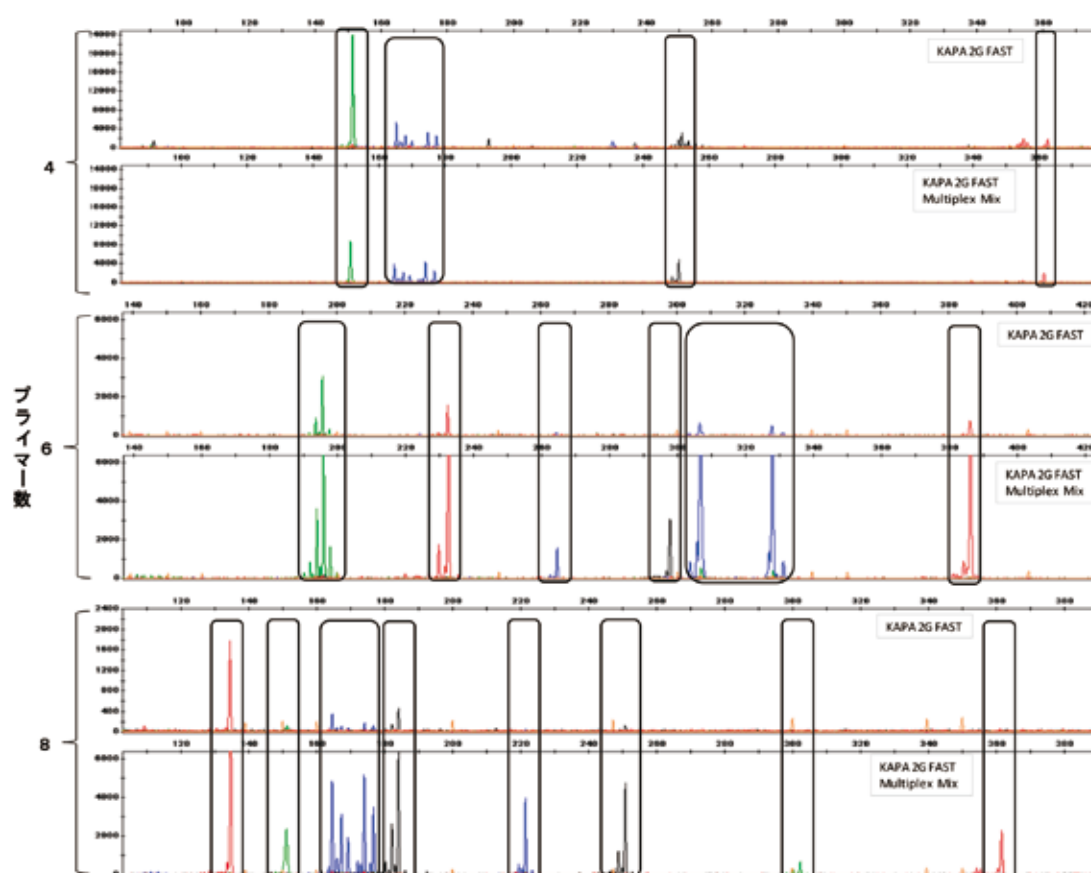


図-3 供試した酵素およびプライマー数による増幅産物の比較

鋳型 DNA：トウガラシ ‘京都万願寺 2 号’

上段：KAPA 2G FAST，下段：KAPA 2G FAST Multiplex Mix

プライマー：

4 組 (ge266-BS08, ge041-BS10, es741-BS17, es734-BS20)

6 組 (HpmsE016-BS20, es728-BS08, es737-BS10, PM32-BS17, es742-BS08, HpmsE072-BS17)

8 組 (ge266-BS08, ge041-BS10, es741-BS17, es734-BS20, es738-BS17, PM6-BS10, es732-BS08, Hpms2-21-BS20)

囲み内のバンド：目的の増幅産物

マー対が 4 組以下の場合、原報どおりの溶液および条件で問題がなかったが、プライマー対が 6 組以上の場合は増幅産物が減少してしまう傾向が見られた (図-3)。この場合、コストはやや上がるが酵素を KAPA 2G FAST から Multiplex 専用酵素 (KAPA 2G FAST Multiplex Mix) に変更することで対応が可能であった。この Multiplex 専用酵素 (KAPA 2G FAST Multiplex Mix) は、大幅に早い伸長率を持つホットスタート DNA ポリメラーゼを使用することで非特異産物を減少するとともに全体の反応効率を高めていることから、本試験でのマルチプレックス PCR においても多くのプライマー対での PCR が可能になったと考える。なお、複数のプライマーに対して同じ蛍光色素で標識された BStag を使用する場合には、増幅産物のサイズと BStag の組み合わせなどを配慮し、同じ蛍光色素で似通ったサイズの増幅

産物ができないよう供試するプライマーを選ぶ必要がある。本試験では 8 組のプライマーまでのマルチプレックス PCR が可能であったが (図-3)、多数のプライマーを用いたマルチプレックス PCR においては、単独反応時と比較して増幅が著しく劣るプライマーが存在する。そのため、多検体を供試する実験の前には、マルチプレックス PCR に不適なプライマーを予め除くなど詳細な検討が必要と思われる。

V 摘 要

BStag を利用したポストラベル法およびマルチプレックス PCR に使用する、非特異産物が少なく、複数品目間で汎用性の高い BStag 配列を選抜することができた。また、BStag を用いた解析時に問題となる非特異の増幅

産物について、PCRの温度条件を変更することである程度軽減できた。また、一度のマルチプレックスPCRで用いるプライマー対が4組以下であれば、原報どおりの反応条件で問題はなかったが、6組以上のプライマー対を用いた場合、酵素をKAPA 2G FAST Multiplex Mixに変更することで解析が可能となった。

引用文献

- 1) Guichoux, E., L. Lagache, S. Wagner, P. Chaumeil, P. Leger, O. Lepais, C. Lepoittevin, T. Malausa, E. Revardel, F. Salin and R.J. Petit (2011): Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, 11, 591-611.
- 2) Guo, DC. and DM. Milewicz (2003): Methodology for using a universal primer to label amplified DNA segments for molecular analysis. *Biotechnol Lett.*, 25(24), 2079-2083.
- 3) Inazuka, M., T. Tahira and K. Hayashi (1996): One-tube Post-PCR Fluorescent Labeling of DNA Fragments. *Genome Research*, 6(6), 551-557.
- 4) Inazuka, M., HM. Wenz, M. Sakabe, T. Tahira and K. Hayashi (1997): A Streamlined Mutation Detection System: Multicolor Post-PCR Fluorescence Labeling and Single-Strand Conformational Polymorphism Analysis by Capillary Electrophoresis. *Genome Research*, 7(11), 1094-1103.
- 5) Iwahara, H., K. Adzuma, Y. Takahashi, R. Katashima, K. Yoshimoto and M. Itakura (1995): Multiple fluorescence-based PCR-SSCP analysis with postlabeling. *PCR Methods Appl.*, 4(5), 275-282.
- 6) Missiaggia, A. and D. Grattapaglia (2006): Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers. *Genet Mol Res.*, 5(1), 72-78.
- 7) Neilan, BA., AN. Wilton and D. Jacobs (1997): A universal procedure for primer labelling of amplicons. *Nucleic Acids Res.*, 25(14), 2938-2939.
- 8) Oetting, WS., HK. Lee, DJ. Flanders, GL. Wiesner, TA. Sellers and RA. King (1995): Linkage Analysis with Multiplexed Short Tandem Repeat Polymorphisms Using Infrared Fluorescence and M13 Tailed Primers. *Genomics*, 30(3), 450-458.
- 9) Schuelke, M. (2000): An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol.*, 18(2), 233-234.
- 10) Shimizu, T. and K. Yano (2011): A post-labeling method for multiplexed and multicolored genotyping analysis of SSR, indel and SNP markers in single tube with bar-coded split tag (BStag). *BMC Research Notes*, 4, 161.

Optimization of Post-Labeling Conditions for DNA Markers Using a Bar-Coded Split Tag (BStag)

Ayako Konishi, Akio Ohyama, Tomohiro Kakizaki, Koji Miyatake, Hirotaka Yamaguchi, Tsukasa Nunome and Hiroyuki Fukuoka

Summary

A post-labeling method for multiplexed genotyping analysis with a bar-coded split tag (BStag) is a useful tool to reduce labeling costs and the handling time of genotyping analyses. To apply this method to the genotyping of vegetables, we identified several BStag sequences that give no nonspecific amplified products with DNAs of various vegetable cultivars and lines. Changes to some PCR conditions, especially temperatures, also reduced nonspecific amplicons. Standard conditions using KAPA2G Fast DNA polymerase were sufficient for multiplex PCR analysis with up to four primers, but not with more than six primers. However, six to eight primers could be analyzed at once by using the KAPA2G Fast Multiplex Mix.