

次世代 シーケンス



最先端技術を用いた高速シーケンスをお手元に。

■ ゲノム 一次構造解析サービス

- ゲノム de novo シーケンス
- ゲノム リシーケンス
- ヒト/マウス エクソーム解析
- ターゲットゲノム シーケンス (癌パネル、疾患パネル、その他)
- メタゲノム解析 (16S rRNA シーケンス)
- CHIP シーケンス
- メチル化解析 (MBDシーケンス、バイサルファイト シーケンス)
- GBS (Genotyping By Sequence) 解析

■ RNA の次世代シーケンス解析サービス

- mRNA シーケンス
- small RNA の同定・定量化、その他

■ 超ロングリード 第3世代シーケンスサービス

- PacBio シーケンス (RS II, Sequel)



次世代シーケンス解析 サービス選定の目安

次世代シーケンス フローチャート

各サービスの選定基準となるフローチャート

次世代シーケンスは、サンプルの前処理、分析条件、インフォマティクス解析の多様化に伴い、様々な目的に合う技術が日々確立されております。各種分析手法を選定する際の、選定基準をフローチャートにまとめました。

ゲノムDNA 一次構造解析

(掲載 P.)

ゲノム全体を網羅的に見たい	リファレンス なし	大規模な配列情報を取得したい	ゲノム <i>de novo</i> シーケンス (P. 4) PacBio シーケンス (P. 8)
		品種間、株間の遺伝子型を構築したい	GBS 解析 (P. 6)
	リファレンス あり	SNPs, in/del などの変異を探索したい	ゲノム リシーケンス (P. 4) PacBio シーケンス (P. 8)
		機能解析がしたい	転写調節因子や DNA 結合タンパク質との相互作用 ChIP シーケンス (P. 6)
特定領域に限定して見たい	SNPs, in/del などの変異を探索したい	エクソン領域を中心に見たい	ヒト/マウス エクソーム解析 (P. 5)
		特定の領域に限定して、多検体をプロファイリングしたい	ターゲット シーケンス (癌パネル、疾患パネル etc.) (P. 5)
	配列の差異から同定したい	含まれる生物種を同定したい	メタゲノム解析 (P. 6)
		遺伝子の発現調節 (メチル化)	メチル化 解析 (P. 6)

RNA の次世代シーケンス

mRNA が対象	サンプル間での遺伝子の発現解析をしたい	mRNA シーケンス (P. 7)
	新規アイソフォームやスプライスバリエントを見つけたい	mRNA シーケンス (P. 7) PacBio シーケンス (P. 8)
mRNA, non-coding RNA が対象	mRNA に加えて、non-coding RNA も解析したい	mRNA シーケンス (Total RNA シーケンス) (P. 7)
small RNA が対象	small RNA の探索や、定量的なプロファイリングがしたい	small RNA の同定・定量、その他 (P. 7)

上記以外にも、多様な目的に対してフレキシブルに対応いたします。「アプリケーションが決まらない、迷っている」など、お困りでしたら遠慮なくお問合せください。



次世代シーケンス解析 とは

ライフサイエンス研究に重要な役割を担う最先端技術

次世代シーケンスは、従来のサンガー法とは異なり処理能力やコストの面で格段の進化を遂げ、たった一回の分析で数億塩基以上も得ることが可能になりました。

さらに、様々な前処理、シーケンス条件、インフォマティクス解析を組み合わせることで、膨大な取得データから多様な目的情報を得ることができ、ゲノム配列の決定だけでなく、SNPs解析や、mRNA、small RNA解析などの発現解析、メタゲノム解析やChIPシーケンスなど、多くの手法が確立されています。

これら次世代シーケンス解析は、現在のライフテクノロジーにおいて、最も重要な解析手法の一つです。



当社受託サービスの特長

コストパフォーマンスの高いシーケンスと、多様なインフォマティクス解析

- HiSeq/MiSeq や PacBio RS II など、多様なシーケンサーを駆使した高速シーケンスをご提供します。
- 世界規模でサービスを提供する企業と提携することで、スケールメリットによる低コスト化を実現しました。
- インフォマティクス専門の企業とも提携しておりますので、ニッチな解析目的のご相談にも応じます。
- ライブラリ調製からのご依頼や、インフォマティクス解析のみのご依頼など、お客様のご要望に即してご提供いたします。



使用装置のご紹介

機器名	Illumina HiSeq 2000 / 2500 / 4000		Illumina HiSeq X Ten	Illumina MiSeq		PACIFIC BIOSCIENCE PacBio RS II
リード長	~ 250 bp		150 bp	~ 300 bp		~ 40,000 bp
リード数	シングルリード	約3億リード/レーン	-	シングルリード	約2,400万リード	約6万リード/セル
	ペアエンド	約6億リード/レーン	約6億リード/レーン	ペアエンド	約4,400万リード	
データ量	シングルリード	約45Gb/レーン	-	シングルリード	約7.2Gb/レーン	約500M~1Gb/セル
	ペアエンド	約90Gb/レーン	120-140Gb/レーン	ペアエンド	約13Gb/レーン	
主な利用目的	<ul style="list-style-type: none"> ・ホールゲノムシーケンス ・新規ゲノムアセンブル ・エクソーム ・RNA-Seq など 			<ul style="list-style-type: none"> ・メタゲノム解析 ・アンプリコンシーケンス ・ターゲット遺伝子パネル (癌遺伝子) など 		<ul style="list-style-type: none"> ・新規微生物の完全長ゲノムの構築 ・ギャップクロージング

※ NovaSeq 6000 も導入しました。

※ PacBio Sequel も導入しました。目的に応じて最適な仕様を提案いたします。

各機種種の概要

■ Illumina HiSeq 2000/2500/4000, MiSeq, X Ten

目的DNAを断片化してからライブラリーとした後、ブリッジPCR法によりフローセル上で膨大な数の目的DNAを増幅させ、Sequencing-by-synthesis法により合成しながらシーケンスを行います。特にHiSeqの場合は、他の機器に比べて大量の配列データを取得できるため、網羅的な解析に適しています。

■ Pacific Bioscience PacBio (RS II, Sequel)

比較的長めに断片化したDNAからライブラリー調製し、SMRT (Smart Molecule Real Time) 法によりシーケンスを行います。1分子レベルでリアルタイムに塩基を読み取ることができるため増幅によるバイアスのリスクを排除でき、同時に塩基修飾も検出できるシーケンサーです。中でも最大の特徴は圧倒的に長いリードを獲得できる点にあり、そのため新規のゲノムドラフトを作成する目的などに効果を発揮します。

分析条件の概要

■ シングルリード法

シングルリード法は、ゲノムDNA断片の片側のみを読み取る手法です。コスト面に優れており、ターゲット領域が限定されているなど、データ量を多く求めない場面で利用されます。

■ ペアエンド法

シングルリード法の2倍のデータ量が得られ、各断片の両端の配列情報も獲得できます。そのため、より多くの情報を必要とする *de novo* アセンブルや変異の確認 (点変異や Insertion/Deletionの確認) などに効果的であり、最も多用されている手法です。

■ マルチプレックス法

DNA断片にバーコード配列 (インデックス) を付与することによって、複数サンプル由来のDNA配列を正確に識別することができます。この方法は、ゲノムターゲット領域に特化した研究や、ゲノムサイズが小さい生物種の解析に最適です。少ないレーン数で多くのサンプルを解析可能であるため、サンプル当たりのコストメリットを得ることが出来ます。

ゲノム一次構造解析 各種サービスのご案内

ゲノム de novo シーケンス

リファレンス配列の無い生物のゲノムDNAを構築する

リファレンスとなる配列が無い生物種を対象に行う分析です。得られたリードデータをインフォマティクス解析によってアセンブルすることで、新規の配列を構築することができます。また、リファレンス配列があるものでも、insertion配列が長く重要な場合、de novo アセンブルが有効となります。

サービス仕様

- サービス内容：サンプルQC、シーケンス、インフォマティクス解析
- 対象サンプルのゲノムサイズや目的によって、分析条件、データ量をご提案します。
- 新規ゲノム配列やinsertion配列の構築など、ご要望に合わせたインフォマティクス解析を実施いたします。

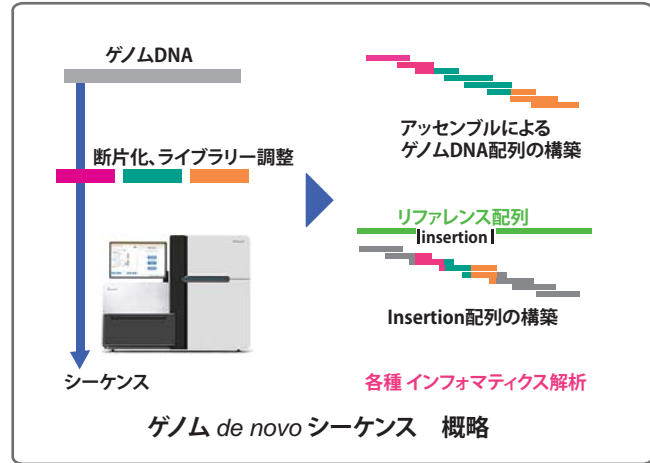
サンプルについて

項目名	illumina HiSeq	PacBio (※1)
種類	ゲノムDNA (精製済み)	ゲノムDNA (精製済み)
必要量	1 µg 以上 (※2)	16 µg 以上 (※2)
濃度	20 ng / µl 以上	50 ng / µl 以上
溶媒	TE Buffer 等	Tris-HCl (pH8.0)

※1：P.8もご参照ください。

※2：目的やサンプルによっては、上記以上に必要な場合もあります。

- ゲノムDNAの精製時に使用された手法、キット名をお知らせください。
- 可能であれば電気泳動写真をご用意ください。
- 凍結融解は極力避け、4℃のTE Bufferに溶解して下さい(長期保存の場合は -20℃)。
- HCV, HIVなど、感染性のあるサンプルはお受けできません。
- サンプル送付先については、お問い合わせください。



ゲノムリシーケンス

シーケンシングの基本解析で、既知配列と比較して変異を確認

基本的に、ゲノムの塩基配列が判明している生物種を対象とします。既知のリファレンス配列に対してマッピングを行い、塩基の置換や逆位、in/del など、わずかな配列の差を明らかにすることを主な目的とします。

これにより、個体の差や病因の特定、微生物が持つ様々な特徴をリファレンスと対応させて明確にすることができます。

サービス仕様

- サービス内容：サンプルQC、シーケンス、インフォマティクス解析
- 対象サンプルのゲノムサイズによって、分析条件、データ量をご提案します。
- サンプル間での変異の確認やリファレンス配列との比較など、目的に合わせたインフォマティクス解析を実施いたします(オプション含む)。

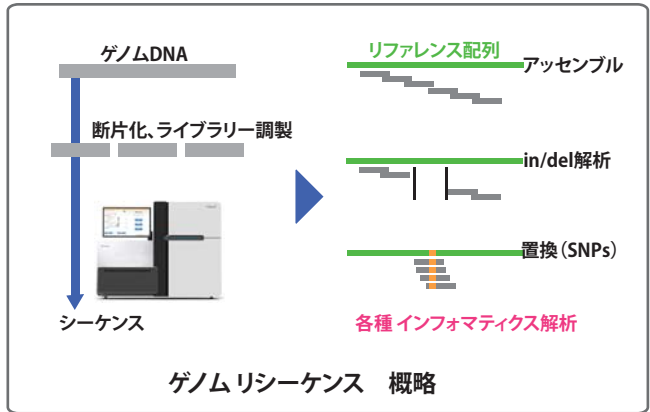
サンプルについて

項目名	illumina HiSeq	PacBio (※1)
種類	ゲノムDNA (精製済み)	ゲノムDNA (精製済み)
必要量	1 µg 以上 (※2)	16 µg 以上 (※2)
濃度	20 ng / µl 以上	50 ng / µl 以上
溶媒	TE Buffer 等	Tris-HCl (pH8.0)

※1：P.8もご参照ください。

※2：目的やサンプルによっては、上記以上に必要な場合もあります。

- ゲノムDNAの精製時に使用された手法、キット名をお知らせください。
- 可能であれば電気泳動写真をご用意ください。
- 凍結融解は極力避け、4℃のTE Bufferに溶解して下さい(長期保存の場合は -20℃)。
- HCV, HIVなど、感染性のあるサンプルはお受けできません。
- サンプル送付先については、お問い合わせください。



10x Genomics-chromium™ system による phasing 解析も可能です。まずはお問い合わせください。

お客様にて取得されたシーケンシングデータを用いて、ご要望のインフォマティクス解析のみをお受けすることも可能です。お気軽にご相談ください。



ヒト/マウス エクソーム解析

エクソン領域を特異的に読み取り、各種多型の探索が可能

ゲノムのエクソン領域に対するプローブを設計してエクソン特異的な解析を行います。SNPs や in/del など、エクソンに内包された各種多型の探索から、インフォマティクス解析を駆使した統計解析まで、ご希望に合わせた解析をご提供いたします。

本サービスの特徴

- ヒト、マウスのエクソンのみを特異的に回収し、シーケンスします。
- エクソンにコードされた変異を、平均 100 × coverage 以上で読み取ります。
- 非コード領域をシーケンシング対象外とすることで、リーズナブルな価格で解析可能です(イントロン・プロモーターは解析対象外です)。

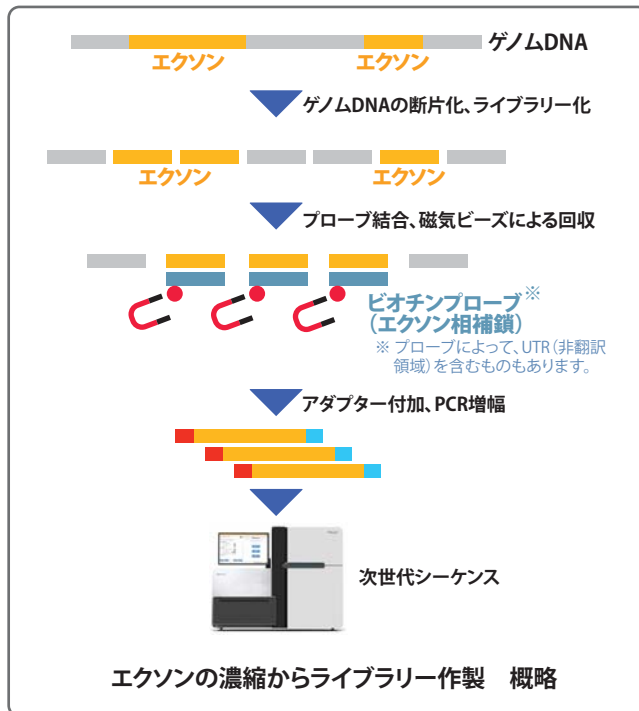
応用解析例

- アミノ酸残基レベルでの変異の有無を見る
- 病態差や、個体差を配列から特定する
- SNPs と疾患感受性の相関を確認する

サービス仕様

- サンプル QC、エクソーム解析用 ライブラリー調製
- エンリッチメントキットによるエクソン濃縮(各種キット)
- シーケンス解析 (100bp, paired end)、生データ
- インフォマティクスデータ解析 (SNPs, in/del など)

ヒト、マウス
以外でも
ご相談ください!



サンプルについて

項目名	情報
種類	ゲノムDNA (精製済み)
必要量	1 μg 以上
濃度	50 ng / μl 以上
溶媒	TE Buffer 等

※ 目的やサンプルによっては、上記以上に必要な場合もあります。

- ゲノムDNAの精製時に使用された手法、キット名をお知らせください。
- 可能であれば電気泳動写真をご用意ください。
- 凍結融解は極力避け、4℃のTE Bufferに溶解して下さい(長期保存の場合は -20℃)。
- HCV, HIVなど、感染性のあるサンプルはお受けできません。
- サンプル送付先については、お問い合わせください。

ターゲットゲノムシーケンス (癌パネル、疾患パネル、その他)

特定の領域に絞込むことで、多検体を低コストに解析可能

Illumina社などから提供されている癌パネル、疾患パネルなどを用いると、特定の癌遺伝子や、特定の疾患に関わる遺伝子のみを対象として、多検体の遺伝子変異を低コストで解析することができます。

また、PCRにより特定領域を増幅、あるいはSureSelectなどを用いて特定領域を回収するなどのカスタムが可能です。

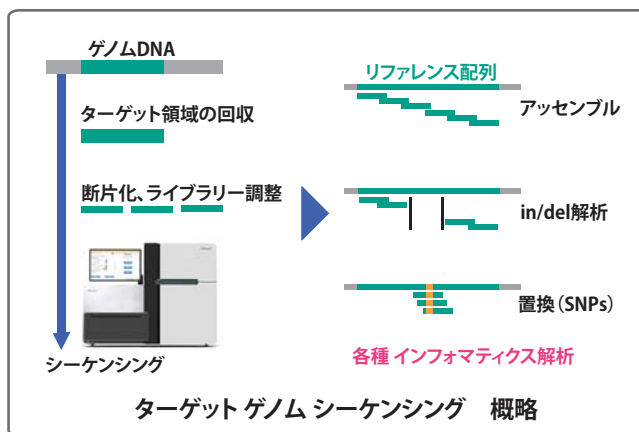
サービス仕様

- サービス内容：サンプルQC、シーケンシング、インフォマティクス解析
- 特定領域の長さやサンプル数によって、分析条件、データ量をご提案します。
- 特定流域の回収方法や、インフォマティクス解析の内容 (SNPs, in/del解析) など、多様なご要望にお応えいたします。

サンプルについて

項目名	情報
種類	ゲノムDNA (精製済み)
必要量	ご相談ください。
濃度	ご相談ください。
溶媒	TE Buffer 等

※ 使用するパネルにより異なります。ご相談ください。



- ゲノムDNAの精製時に使用された手法、キット名をお知らせください。
- 可能であれば電気泳動写真をご用意ください。
- 凍結融解は極力避け、4℃のTE Bufferに溶解して下さい(長期保存の場合は -20℃)。
- サンプル送付先については、お問い合わせください。
- サンプルがアンプリコンライブラリーの場合には、別途ご相談下さい。

ゲノム一次構造解析 各種サービスのご案内

メタゲノム解析：16S rRNA をコードする DNA

サンプル中のゲノムを網羅的に解析し、含まれる細菌などを特定

目的サンプル内に多様な細菌が含まれている時に、16S rRNA領域をコードしているDNAを増幅したPCR産物からライブラリー調製後、アンプリコンシーケンスを行います。

膨大なリードデータから、16Sデータベースに対して検索および系統解析を行うことで、サンプル中の多様な細菌の特定や生存量、実施培養が困難であった細菌などのゲノム情報を得ることができます。また、カビなどのメタゲノムの解析も可能です。

サービス仕様

- サービス内容：サンプルQC、シーケンス、BLAST Search/OTU解析
- 16S 以外の領域においても対応可能ですので、ご相談ください。

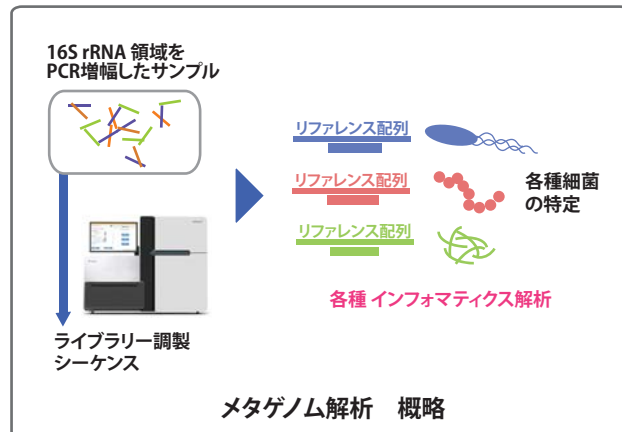
サンプルについて

項目名	情報	情報
種類	細菌ゲノムDNA (精製済み)	16S rRNAをコードしているゲノムDNAを増幅したPCR産物
必要量	60 ng 以上	50 ng 以上
濃度	2 ng / μ l 以上	10 ng / μ l 以上
溶媒	TE Buffer 等	TE Buffer 等

※ 目的やサンプルによっては、上記以上に必要な場合もあります。

- PCR産物の精製時に使用された手法、キット名をお知らせください。
- 可能であれば電気泳動写真をご用意ください。
- 凍結融解は極力避け、4℃のTE Bufferに溶解して下さい(長期保存の場合は -20℃)。
- HCV, HIVなど、感染性のあるサンプルはお受けできません。
- サンプル送付先については、お問い合わせください。

メタゲノム解析を応用した、アンプリコンシーケンスも可能です。
1サンプルからでも対応します。まずはお問い合わせください。



ChIP シーケンス

転写調節因子などのDNA結合タンパク質とDNAとの相互作用を網羅的に確認

クロマチン免疫沈降 (ChIP) と、次世代シーケンスを組み合わせることによって、転写調節因子やクロマチン結合タンパク質とDNAの結合部位の同定や、修飾ヒストンのゲノム上へのマッピング、DNAメチル化領域の推定など、DNAとタンパク質の相互作用を解明するツールとして利用できます。

サンプルについて

項目名	情報
種類	クロマチン免疫沈降で回収したDNA産物
必要量	10 ng 以上
濃度	1 ng / μ l 以上 (容量: 10 μ l 以上)
溶媒	-

メチル化解析 (MBDシーケンス、バイサルファイトシーケンス)

DNA上のメチル化を、ゲノムワイドに同定・定量

通常、遺伝子のプロモーター領域にはメチル化されたシトシンが存在し、遺伝子の発現調節に関与していると云われています。

メチル化解析は、メチル化抗体を用いて回収したゲノム断片をシーケンスすることで大まかなメチル化領域を特定する「MBDシーケンス」と、バイサルファイト処理で起こるシトシンからウラシルへの変換がメチル化シトシンでは起こらないことを利用し、メチル化部位を精度良く同定・定量する「バイサルファイトシーケンス」の2種類をご用意しております。

サンプルについて

項目名	MBDシーケンス	バイサルファイト
種類	ゲノムDNA (精製済み)	
必要量	1 μ g 以上	5 μ g 以上
濃度	20 ng / μ l 以上	100 ng / μ l 以上
溶媒	TE Buffer 等	

GBS (Genotyping by sequencing) 解析

細菌株の選別や動植物の品種改良に有用な遺伝子型の探索

GBS (Genotyping by sequencing) 解析は制限酵素処理したDNAをシーケンスし、制限酵素認識サイトの近隣領域を解析する手法です。遺伝子型を特徴付けるようなマーカーとなりうる変異を探索することができ、リファレンス配列が無い生物種でも可能です。

近年、農業や畜産の分野で注目され始めている手法で、動植物の品種改良や、細菌株の選別などに効果的な情報 (表現型と遺伝子型の相関) を得ることができます。

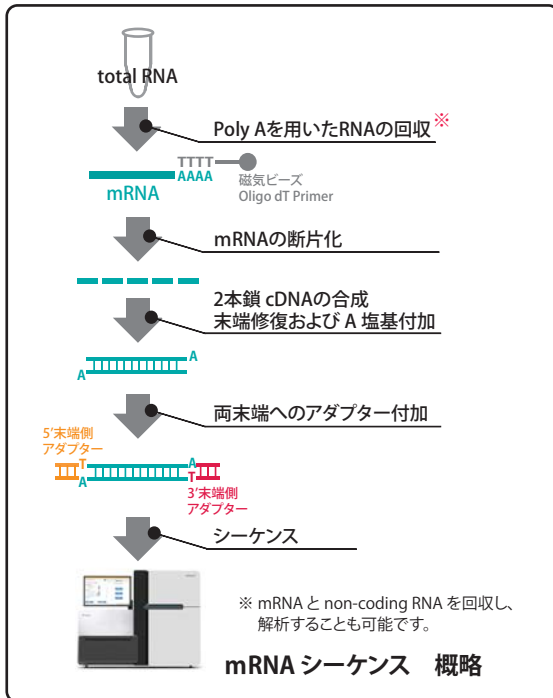
サンプルについて

項目名	情報
種類	調製済みライブラリーまたは精製ゲノムDNA
必要量	ご相談ください。
濃度	ご相談ください。
溶媒	ご相談ください。

mRNA シーケンス (RNA-Seq)

SNPsや In/Del など遺伝子レベルでの変異確認、新規アイソフォームの探索など多岐に应用可能

mRNAシーケンス (RNA-Seq) は、転写産物をゲノムワイドに読み取ることが可能なサービスです。mRNAを断片化した後に、両端にアダプターを付けシーケンスすることで、全mRNAの探索と、ある程度の定量的なプロファイリングが可能となります。完全長のmRNAを解析できるため、新規転写産物だけでなく、新規アイソフォームやスプライスバリエントの探索、疾患特異的な遺伝子配列の変異を知ることを目的とする場合に、有効なサービスです。



Pick Up!!



mRNAを対象に色々できるなら・・・
 遺伝子発現の変化を見たい
 スプライスバリエントを探索したい
 癌特異的な融合遺伝子を探索したい

サンプルについて

項目名	情報
種類	total RNA
必要量	1 μg 以上
濃度	20 ng / μl 以上
溶媒	TE Buffer 等 エタノール沈殿 (下記をご参照下さい)

- DNase, RNaseフリーのスクリーキャップ式の1.5mlエッペンチューブをご使用ください。
- total RNA は TE Buffer (またはRNAase free 水) に溶解し、ドライアイス梱包 (冷凍便) でご送付下さい。
- 3 μg以上のtotal RNAをご調製頂ける場合にはエタノール沈殿後のサンプルのご送付も可能です。
 (例) 3 μg以上のRNAを RNase free 水 100 μl に溶解し、これに対して、次の液体を入れてください。
 ・ 0.1 倍量の 3M 酢酸ナトリウム (10 μl)
 ・ 2.5 倍量の エタノール (250 μl)

DNase処理を行うとより確実です!!



small RNA の同定・定量化、その他

small RNA の解析が可能

18~30塩基程度の small RNA の両端にアダプターを付加し、シーケンシングを行うことで、small RNAの同定と発現量を解析するサービスです。検出できるダイナミックレンジが広いので、miRNA などの small RNA の発現量を調べたい場合に有効です。

サンプルについて

項目名	情報
種類	total RNA
必要量	3 μg 以上
濃度	-
溶媒	TE Buffer 等 エタノール沈殿 (右記をご参照下さい)

※ 目的やサンプルによっては、上記以上に必要な場合もあります。

- DNase, RNaseフリーのスクリーキャップ式の1.5mlエッペンチューブをご使用ください。
- total RNA は TE Buffer (またはRNAase free 水) に溶解し、ドライアイス梱包 (冷凍便) でご送付下さい。
- 3 μg以上のtotal RNAをご調製頂ける場合にはエタノール沈殿後のサンプルのご送付も可能です。
 (例) 3 μg以上のRNAを RNase free 水 100 μl に溶解し、これに対して、次の液体を入れてください。
 ・ 0.1 倍量の 3M 酢酸ナトリウム (10 μl)
 ・ 2.5 倍量の エタノール (250 μl)

サンプル前処理から

レーザーマイクロダイセクションによる標的部位の切り出し、DNA/RNAの抽出から可能です。



次世代シーケンシング



レーザーマイクロダイセクションによって組織中の標的部分を切り出すことで、その部位に特異的なDNA/RNAを検出できます。病変特異的な変異の確認や、寄生虫の同定などの実績を持っています。

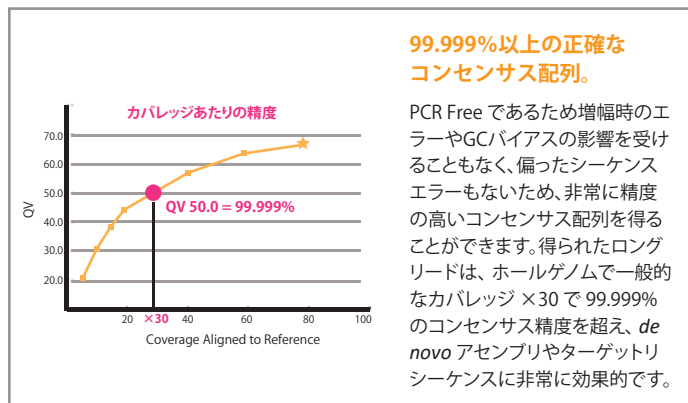
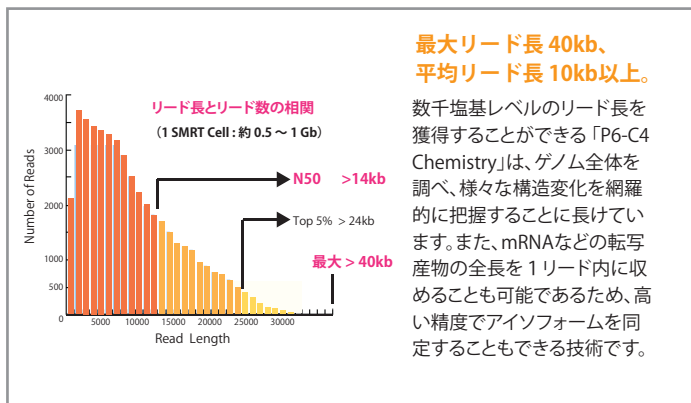
PacBio シーケンス

従来に比べてリード長が長いこと、新規ゲノムの構築や遺伝子のアイソフォームの同定に有効

最大の特長は、従来のシーケンサーと比べて、圧倒的に長いリードを獲得できること。最大リード長40kb、平均リード長10kb以上でシーケンス可能な「P6-C4 chemistry」により、例えば、バクテリアの完全長ゲノム配列を作成する、スプライシングバリエーションの配列を読み分ける、リピート配列をシーケンスするなど、従来法では難しかった目的に対して様々な場面でその威力を発揮します。

また、PCRを用いない、1分子レベルでリアルタイムに塩基を読み取る SMRTシーケンシング技術により、増幅によるGCバイアスのリスクを排除できる高精度な「第3世代次世代シーケンサー」です。PacBio RS II は約0.5~1Gb/Cell, Sequelは約4Gb/Cellのデータ量を取得でき、ご要望に合わせて最適なシーケンサー、Cell 数をご提案いたします。

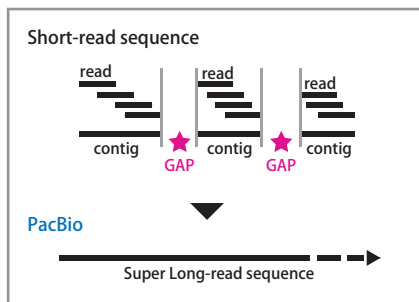
本サービスの特徴



アプリケーション例

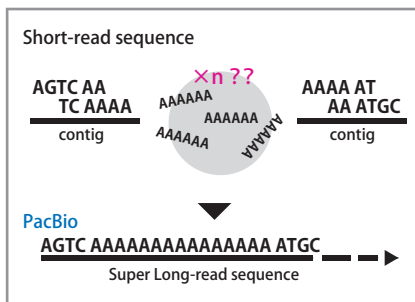
完全長ゲノムDNAの作成

ショートリードから作成したコンティグをつなげる従来法では埋まりきらないGAPが、超ロングリードではできにくい。



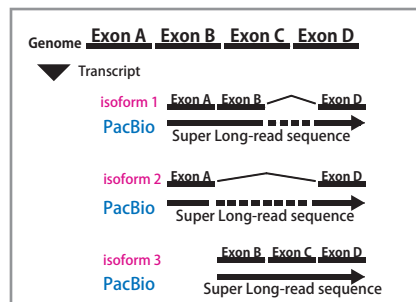
リピート配列のシーケンス

ショートリードだと長いリピート配列を繋げられないが、リードサイズが大きければ、リピートエリア全体の配列決定が可能。



mRNAアイソフォームのリストアップ

ショートリードを繋げる方法では由来のアイソフォームを判別しにくい、超ロングリードならばスプライシングのバリエーションも容易に検出可能。



サンプルについて

項目名	DNAの場合	RNAの場合
種類	ゲノムDNA (精製済み) ^(※)	total RNA (精製済み)
必要量	16 µg 以上	1 µg 以上
濃度	50 ng / µl 以上	50 ng / µl 以上
溶媒	Tris-HCl (pH 8.0)	TE Buffer 等
その他	A260/A280 : 1.8以上 A260/A230 : 1.8以上	RIN値 : 7以上 rRNA ratio : 1.5以上

※ PCR産物、コスミドなどゲノムDNA以外の分析実績も多数ございます。その場合は上記条件と異なりますので、まずはお問い合わせください。

DNAサンプルについて

PacBioは他の次世代シーケンサーと比べ、サンプル状態が結果に大きく影響いたします。左表記載のサンプル条件をお確かめの上、可能な限り条件を満たしたサンプルをご用意ください。もしも、条件に対してクリアできない項目がある場合は、事前にご相談ください。

RNAサンプルについて

RNAを用いたシーケンスはゲノムDNAを用いた場合と比べサンプル品質の重要性が高く、特に純度は結果に大きく影響いたします。左表記載のサンプル条件をお確かめの上、可能な限り条件を満たしたサンプルをご用意ください。もしも、条件に対してクリアできない項目がある場合は、事前にご相談ください。



株式会社 アプロサイエンス

☎ 088-683-7211 □ info@aprosci.com

http://aproscience.com/

【本社】

〒771-0360 徳島県鳴門市瀬戸町明神字板屋島124-4 TEL:088-683-7211 FAX:088-683-7212

販売店