

# 次世代シーケンス 受託サービス

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

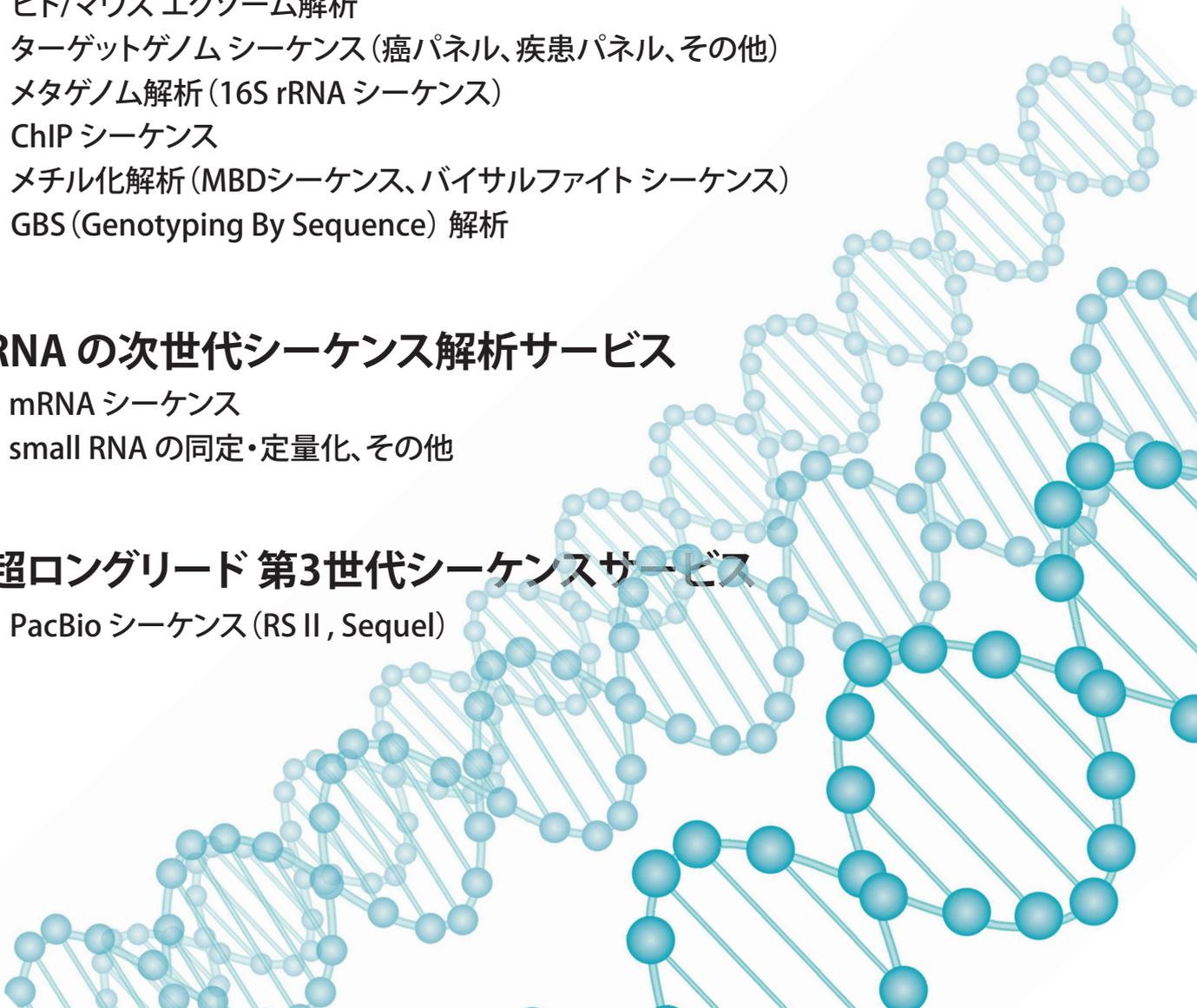
- ゲノム de novo シーケンス
- ゲノム リシーケンス
- ヒト/マウス エクソーム解析
- ターゲットゲノム シーケンス (癌パネル、疾患パネル、その他)
- メタゲノム解析 (16S rRNA シーケンス)
- ChIP シーケンス
- メチル化解析 (MBDシーケンス、バイサルファイト シーケンス)
- GBS (Genotyping By Sequence) 解析

## ■ 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 サービスの概要

## 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、様々な目的に適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

ゲノムDNA 一次構造解析	▶ 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 ▶ PacBio シーケンス	
	▶ 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	
		▶ 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
			▶ 遺伝子の発現調節 (メチル化)	▶ メチル化解析 (バイサルファイトシーケンス)
ゲノムDNA 一次構造解析	▶ 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	▶ エクソーム解析	
		▶ 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	▶ キャンサーパネル	
	▶ 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	

### 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
	▶ 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 ▶ PacBio シーケンス
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)
	▶ small RNA の探索や、定量的なプロファイリングがしたい	▶ miRNA シーケンス (small RNA シーケンス)

## 次世代シーケンス解析サービスの概要・特長

### 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。

機器名	Illumina MiSeq	Illumina HiSeq 2500		Illumina HiSeq 4000	Illumina HiSeq X	Illumina NovaSeq6000	
条件	300pb, Paired-read	50bp, Single-read	100pb, Paired-read	100pb, Paired-read	150pb, Paired-read	100pb, Paired-read	150pb, Paired-read
リード数	約 3000 万リード	2.2-2.5 億リード	4.4-5.0 億リード	5.4-6.0 億リード	約 8億リード	約 50 億リード	約 50 億リード
データ量	約 9 Gb	10-12 Gb	44-50 Gb	54-60 Gb	120~130 Gb	約 500 Gb	約 750 Gb
用途	<ul style="list-style-type: none"> <li>メタゲノム解析 (細菌叢解析)</li> <li>アンプリコンシーケンス</li> <li>キャンサーパネル</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ChIP-Seq</li> <li>miRNA-Seq</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>RNA-Seq</li> <li>エクソーム解析</li> <li>DNA-Seq</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>RNA-Seq</li> <li>エクソーム解析</li> <li>DNA-Seq</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ホールゲノム解析専用</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>RNA-Seq</li> <li>エクソーム解析</li> <li>DNA-Seq</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>エクソーム解析</li> <li>DNA-Seq</li> </ul>

機器名	PACIFIC BIOSCIENCE PacBio RS II	PACIFIC BIOSCIENCE PacBio Sequel
条件	約 10kb	約 10kb
リード数	約 6 万リード	約 24 万リード
データ量	0.5-1.0 Gb	約 4.0 Gb
用途	<ul style="list-style-type: none"> <li>新規ゲノム解析</li> <li>Iso-Seq</li> </ul>	



### 各機種の概要

- **Illumina HiSeq 2500/4000, MiSeq, X Ten, NovaSeq 6000**  
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* アッセムブルや変異の確認 (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。

## 新規ゲノム構築 (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。取得した生データを *de novo* アセンブルすることで、新規のゲノム配列を構築します。目的やご予算に合わせて、ライブラリ調製の方法や使用する装置を選択することが可能です。

#### 実施可能なアプリケーション例

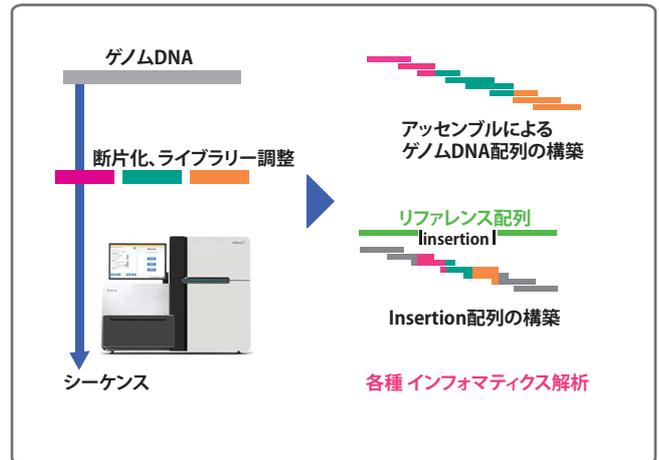
- ショットガン シーケンス：短い配列情報を多量に取得。
- メイトペア シーケンス：インサートサイズが長いペアエンドライブラリー
- Pac Bio シーケンス：数十kbのロングリードシーケンス
- Chromiumシステム (10X Genomics社)

### サンプルについて

項目名	Illumina HiSeq	PacBio <sup>(※1)</sup>
種類	ゲノムDNA (精製済み)	ゲノムDNA (精製済み)
必要量	1 $\mu$ g 以上 <sup>(※2)</sup>	8 $\mu$ g 以上 <sup>(※2)</sup>
濃度	20 ng / $\mu$ l 以上	50 ng / $\mu$ l 以上
溶媒	TE Buffer 等	Tris-HCl (pH8.0)

※1：P.16 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。



### サービス仕様

- サンプル品質チェック
  - ライブラリ調製
  - シーケンス
  - データ解析
- ゲノムサイズ・目的・ご予算に応じて、仕様と価格をご提案します。

## ゲノム 変異解析 (DNA-Seq, ホールゲノム解析)

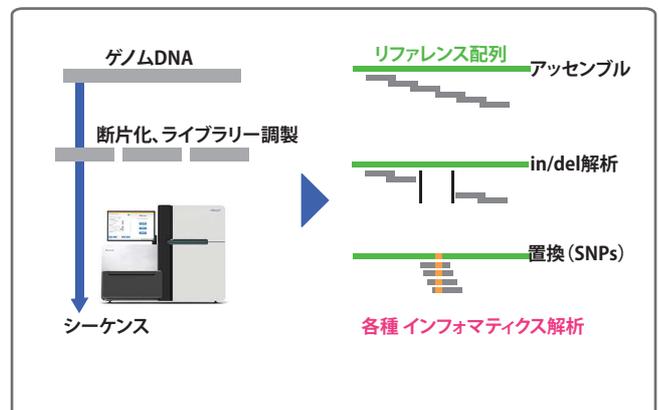
### 既知配列と比較して変異を確認。

リファレンスとなる配列がある(ゲノムの塩基配列が判明している)生物種について変異解析を行います。

取得した生データを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(SNP 解析)、small In/Del 解析を行います。また、ヒトの場合は、SV(Structural Variant, 構造変異)、CNV(Copy Number Variation, コピー数変動)の解析も可能です。

#### 実施可能なアプリケーション例

- ショットガンシーケンス  
ライブラリ調製: TruSeq DNA PCR-Free もしくは TruSeq DNA nano Kit  
シーケンス条件: NovaSeq6000, 150bp, paired end, 数~数十Gb /sample  
データ解析 : マッピング, SNP解析, small In/Del 解析, CNV, SV  
※CNV, SVは、ヒトの場合のみの対応となります。



### サンプルについて

項目名	Illumina HiSeq
種類	ゲノムDNA (精製済み)
必要量	1 $\mu$ g 以上 <sup>(※)</sup>
濃度	20 ng / $\mu$ l 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。

### サービス仕様

- サンプル品質チェック
  - ライブラリ調製
  - シーケンス
  - データ解析
- ゲノムサイズ・目的・ご予算に応じて、仕様と価格をご提案します。

## 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

ゲノム上のタンパク質に転写・翻訳される領域「エクソン」を限定的に回収し、シーケンス・解析する手法です。エクソンに対して特異的なプローブを用いることで、エクソン領域のみを回収してシーケンスを行います。ホールゲノム解析と比べて取得データ量を抑えることで、低コストに解析できる点がメリットになります。ガン組織の解析などの厚みのあるデータが必要な場合に、有効な手法になります。

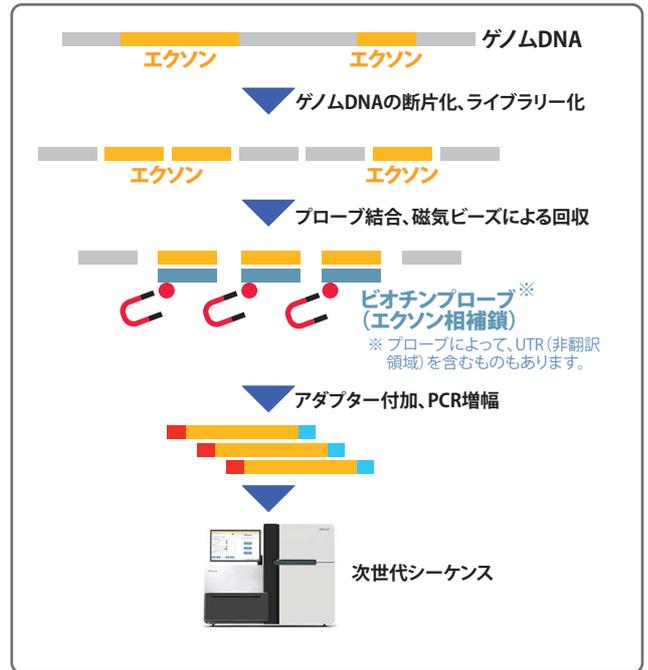
#### 実施可能なアプリケーション例

使用キット : Agilent SureSelect Human v6 (UTR 無し)  
 シーケンス条件 : NovaSeq6000 150bp, paired end, 7 Gb /sample  
 データ解析 : マッピング、SNP解析、small In/Del 解析  
 ※V5, UTRあり、Mouse 等のキットの選択も可能です。

#### サービス仕様

- サンプル品質チェック
- ライブラリ調製
- シーケンス
- データ解析

V5, UTRあり、等の  
 キット使用も  
 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

- 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。

※ 目的やサンプルによっては、左記以上に必要な場合もあります。

## がんパネル

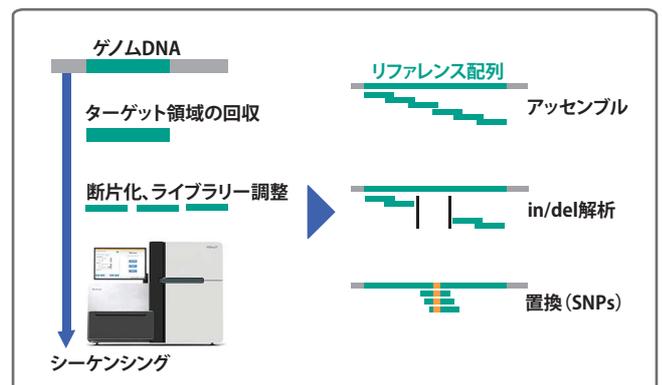
### ガン遺伝子に限定する事で、多検体を低コストに解析可能

ガン遺伝子・ガン抑制遺伝子をターゲットに設計された領域について、シーケンス・解析する手法です。既存の標的遺伝子について限定的に解析することで、低コストに解析できる点がメリットです。

Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2、Ion AmpliSeq™ Comprehensive Cancer Panel の使用が可能です。

#### 実施可能なアプリケーション例

使用キット : Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2  
 使用キット : Ion AmpliSeq™ Comprehensive Cancer Panel



#### 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

- 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。

## メタゲノム解析（16S rRNA 領域の細菌叢解析）

### 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、サンプル中の細菌叢を解析します。

### サービス仕様

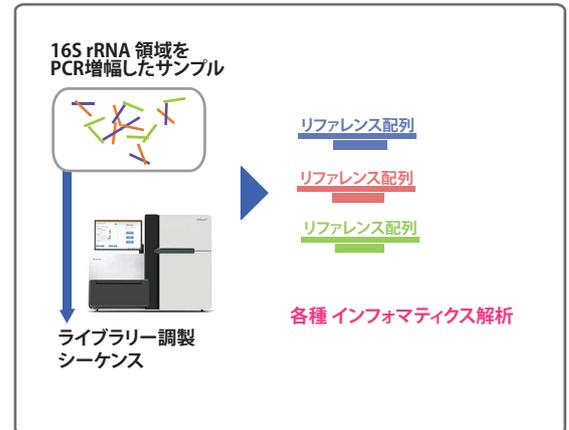
- サービス内容：サンプルQC、シーケンス、OTU解析
- 16S以外の領域においても対応可能ですので、ご相談ください。

### サンプルについて

項目名		
種類	細菌ゲノムDNA (精製済み)	16sRNA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 / $\mu$ l 以上	10 ng / $\mu$ 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。

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。



- 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。

## 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の結合部位を解析します。

### サンプルについて

項目名	情報
種類	クロマチン免疫沈降にて回収したDNA産物
必要量	10 ng 以上
濃度	1 ng / $\mu$ l 以上 (容量: 10 $\mu$ l 以上)
溶媒	-

## メチル化解析 (バイサルファイト シーケンス)

### ゲノム上のメチル化を、網羅的に解析

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、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解析する「バイサルファイトシーケンス」を実施しております。

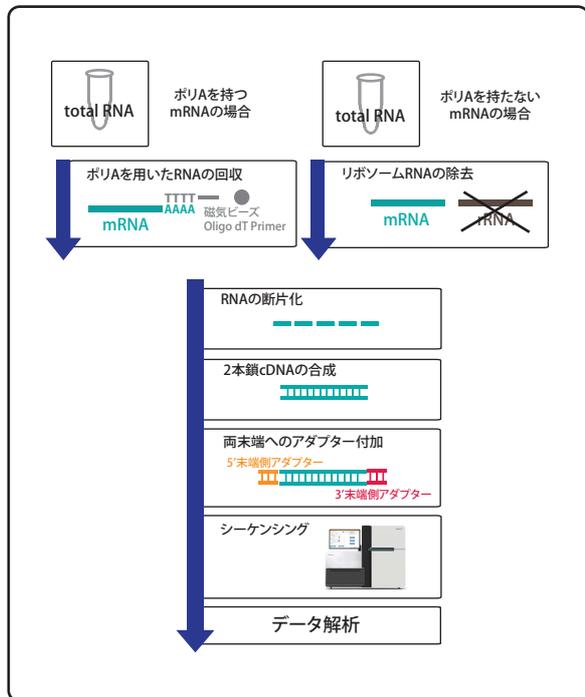
### サンプルについて

項目名	情報
種類	ゲノムDNA (精製済み)
必要量	0.3 $\mu$ g 以上
濃度	10 ng / $\mu$ l 以上
溶媒	TE Buffer 等

## mRNA シーケンス (RNA-Seq)

### 次世代シーケンサーを用いた、網羅的な遺伝子発現解析

mRNAシーケンス (RNA-Seq) は、網羅的な遺伝子発現解析を実施します。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、定量的なプロファイリングが可能となります。



### 解析目的例

- 遺伝子発現解析
- スプライスバリエントを探索する
- 新規遺伝子を探索する
- ガン特異的な融合遺伝子を探索する

### サンプルについて

項目名	情報
種類	total RNA
必要量	1 $\mu$ g 以上
濃度	20 ng / $\mu$ l 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フリーのスクリューキャップ式のマイクロ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。
- ・ DNase 処理を行って頂くと、より確実です。
- ・ 3  $\mu$ g 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。  
 <<サンプル調製例>>  
 3  $\mu$ g 以上の RNA を RNase free 水 100  $\mu$ l に溶解し、次の液体を加えてください。
  - ・ 0.1 倍量の 3M 酢酸ナトリウム (10  $\mu$ l)
  - ・ 2.5 倍量の エタノール (250  $\mu$ l)

## miRNA シーケンス (small RNA-Seq)

### 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。

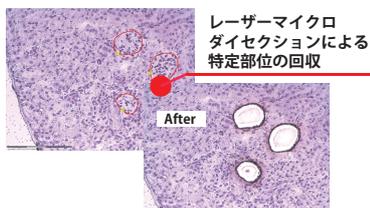
### サンプルについて

項目名	情報
種類	total RNA
必要量	3 $\mu$ g 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フリーのスクリューキャップ式のマイクロ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  $\mu$ g 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。  
 ■ サンプル調製例  
 3  $\mu$ g 以上の RNA を RNase free 水 100  $\mu$ l に溶解し、次の液体を加えてください。
  - ・ 0.1 倍量の 3M 酢酸ナトリウム (10  $\mu$ l)
  - ・ 2.5 倍量の エタノール (250  $\mu$ l)

### 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。



レーザーマイクロダイセクションによる特定部位の回収



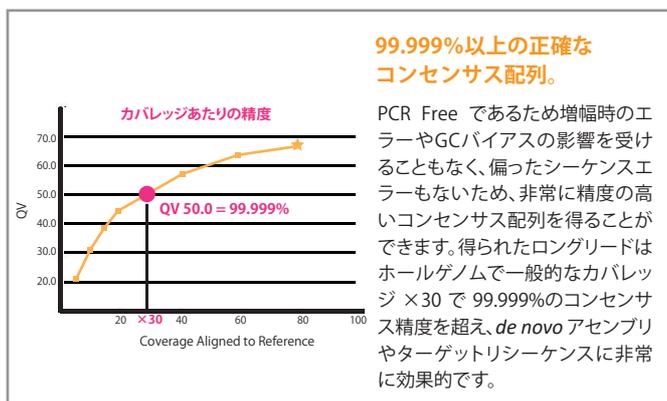
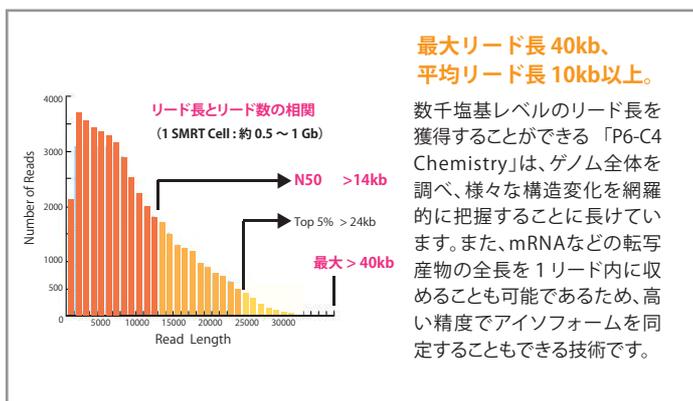
レーザーマイクロダイセクションによって組織中の標的部分を切り出すことで、その部位に特異的なDNA/RNAを検出できます。病変特異的な変異の確認や、寄生虫の同定などの実績を持っています。

# 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、ご希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。

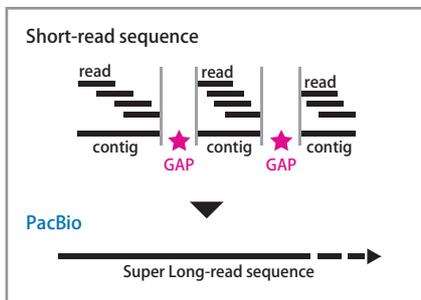
## 本サービスの特徴



## アプリケーション例

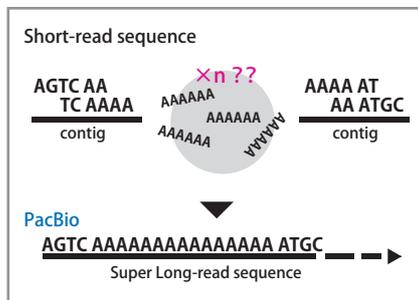
### 完全長ゲノムDNAの作成

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。



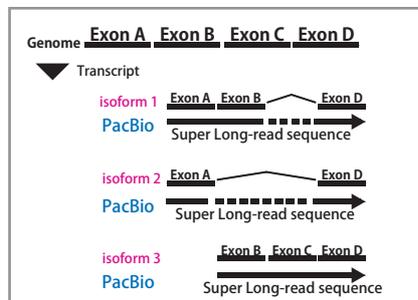
### リピート配列のシーケンス

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) <sup>(※)</sup>	total RNA (精製済み)
必要量	8 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。



株式会社アンテグラル 〒771-0360 徳島県鳴門市瀬戸町明神字板屋島 124-4

■ Mail: bio@integrale.co.jp  
■ Tel: 088-683-7211 ■ Fax: 088-683-7212

<https://integrale.co.jp/>