次世代シーケンス

Illumina

アンプリコンシーケンス解析

■ 解析概要

Illumina シーケンサーを使用してPCR産物のディープシーケンスを行い、配列の種類と割合を集計します。

■ 解析プラン

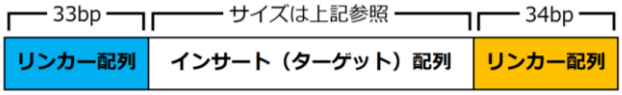
シーケンサー	NovaSeq	MiSeq
ご用意いただくサンプル	リンカー配列付き・精製済み PCR産物	リンカー配列付き・精製済み PCR産物
読み取り方法	Paired-End 150 bp x 2	Paired-End 300 bp x 2
データ取得量の単位	330万リードペア(1 Gb)/検体～	10万リードペア(60 Mb)/検体～
標準解析仕様	○ ライブラリ調製 ○ 150 PE 330万リードペア/検体 ○ リードカウント解析 ○ 検体間比較テーブル作成	○ ライブラリ調製 ○ 300 PE 10万リードペア/検体 ○ リードカウント解析 ○ 検体間比較テーブル作成
追加データ取得	330万リードペア/検体単位で可能	10万リードペア/検体単位で可能
推奨インサートサイズ (対応可能インサートサイズ)	**200 bp～250 bp** (約 20 bp ～ 約 800 bp)	**250 bp～450 bp** (約 20 bp ～ 約 800 bp)
PCR産物(インサート) サイズについて ※ インサートサイズ： 1st PCR産物のサイズからリンカー配列の 67bpを除いたサイズ	PCR産物サイズが推奨インサートサイズの範囲外であってもシーケンスは可能です。 ただし、データ量保証の対象外とさせていただく場合がございますので、推奨範囲から大きく異なる場合は事前にご相談ください。 推奨インサートサイズよりも大きいPCR産物の場合、リード後半部のQV低下により Read1/Read2 のオーバーラップが取り難くなります。Amplicon-Seqでは Read1/Read2 のオーバーラップを取ることでアンプリコン全長の配列を決定するため、解析上の有効リード数が減少しますのでご注意ください。	

■ ご提供いただくサンプル

以下の条件をご確認の上、サンプルをご用意ください。

- □ 精製済みPCR産物の必要量：5 ng (0.2 ng/μl) 以上
- □ 指定リンカー配列 (右図参照) が付加されていること
- □ プライマーや非特異的産物の除去が行われていること

アンプリコンの配列構造

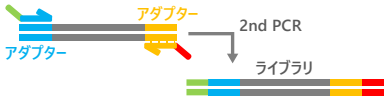


※ リンカー配列・プロトコル詳細はお問い合わせください。

■ 標準解析内容

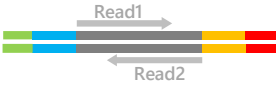
【 ① ライブラリ調製 】

2nd PCRによりアダプターを付加し、ライブラリを作製します。



【② シーケンスデータ取得 】

Illuminaシーケンサーを使用して、シーケンスデータを取得します。



【 ③ リードカウント解析 】

各検体で Read1-Read2 を連結し、アンプリコン全長で同一配列を集計します。

データ例） リードカウント

Sequence	Count
AGCTTTTCATTCTGACTGCAACGG...	26, 552
AGCTTTTCATTCTGACTCCAACGG...	21, 408
AGCTTTTCATTCTGCCGG...	6, 585
AGCTTTTCATTCTGACTGCACCGG...	5, 033

【 ④ 検体間比較テーブル作成 】

各検体のリードカウント結果を統合し、検体間でカウント数を比較可能なテーブルを作成します。

データ例） 比較テーブル

Sequence	SampleA Count	SampleB Count	SampleC Count
AGCTTTTCATTCTGACTGCAACGG...	26552	18742	32088
AGCTTTTCATTCTGACTCCAACGG...	21408	37819	534
AGCTTTTCATTCTGCCGG...	6585	43	25643
AGCTTTTCATTCTGACTGCACCGG...	5033	12013	7431

※ オプションデータ解析もございます。詳細は裏面をご覧ください。

北海道システム・サイエンス株式会社

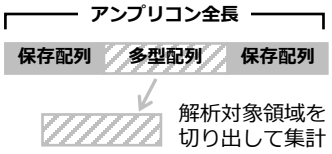
■ オプションデータ解析

表面のリードカウント解析を実施した後、下記のオプションデータ解析も承ります。

ターゲット解析

①解析対象領域の切り出し

アンプリコン全長の中から、解析対象領域の塩基配列を切り出し、配列を再集計します。
保存配列を除去することで、多型配列の集計結果が見やすくなります。



Sequence	Count
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	33, 256
ATGGTCAGCAAGGGCGAGGAG	22, 305
ATGGTGAGCAAGGAGG	
ATGGTGCGCAAGGGCG	

Sequence	Count
MVSKGEELFTGVVPILVELDG	55, 687
MVSKEELFTGVVPILVELDG	5, 267
MVRKEELFTGVVPILVELDG	2, 715
MVRKGEELFTGVVPILELDG	972

②アミノ酸配列への翻訳・集計

塩基配列をアミノ酸に翻訳し、アミノ酸配列のリードカウントを行います。

③アライメント作成

リードカウント後の塩基配列やアミノ酸配列について、カウント数上位の配列を対象としてアライメントを作成します。
リファレンスの配列を含めてアライメントを作成することもできます。

```
Ref   ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
seq1  ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
seq2  ATGGTCA
seq3  ATGGTGA
seq4  ATGGTGC
      ***** *
```

```
Ref   MVSKGEELFTGVVPILVELDG
seq1  MVSKGEELFTGVVPILVELDG
seq2  MVSK-EELFTGVVPILVELDG
seq3  MVRK--ELFTGVVPILVELDG
seq4  MVRKGEELFTGVVPIL-ELDG
      ****  *********  ****
```

塩基頻度集計

リードデータをリファレンス配列にマッピングし、リファレンス配列上の1塩基ごとに、塩基 (A･T･G･C) の出現頻度を算出します。

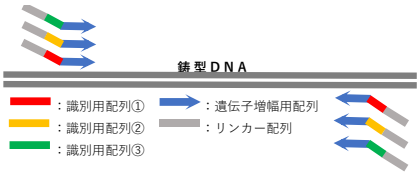
※ 変異間のフェージング情報は失われます。

Reference		A		T		G		C	
pos	seq	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%
1	T	11	0%	106,791	100%	4	0%	46	0%
2	C	2	0%	16	0%	2	0%	100,108	100%
3	T	3,104	3%	102,802	97%	22	0%	34	0%
4	G	5	0%	20	0%	98,997	100%	42	0%
5	T	49	0%	105,100	100%	41	0%	41	0%
6	G	27	0%	9	0%	56,696	32%	52,105	48%

■ こんな使い方も可能です

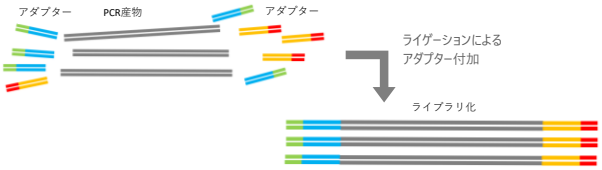
【内部バーコードを利用した多サンプル解析】

リンカー配列とPCR用プライマー配列の間に、サンプル識別用の任意配列を組み込むことで、1口分のご依頼で多サンプルのシーケンスも可能です。
低コストに多くのサンプルのタイピングを行う際に有効です。



【ライゲーション法によるアダプター付加】

1st PCRの際に、PCR用プライマーへのリンカー配列の追加が難しい場合、ライゲーション法によるアダプター付加も可能です。プライマーの変更が難しい場合、再PCRが難しい場合に有効です。



上記以外のカスタム解析につきましても、ご要望に合わせて対応いたしますのでお気軽にご相談ください。

代理店

北海道システム・サイエンス株式会社
〒001-0932　北海道札幌市北区新川西2条1丁目2-1
0120-613-190
TEL：011-768-5901　　FAX：011-768-5951
Email：hss-ngs@hssnet.co.jp
URL：https://www.hssnet.co.jp/

※ 本サービスの仕様は、予告なく変更する場合がございます。

S-230705-01