

Custom DNA Sequencing Service

.....

受託 DNA シーケンス解析サービス

DNA -Seq

キャピラリー
シーケンス

Primer Walking

微生物同定

プライマー
設計

PCR 増幅

PCR 産物精製

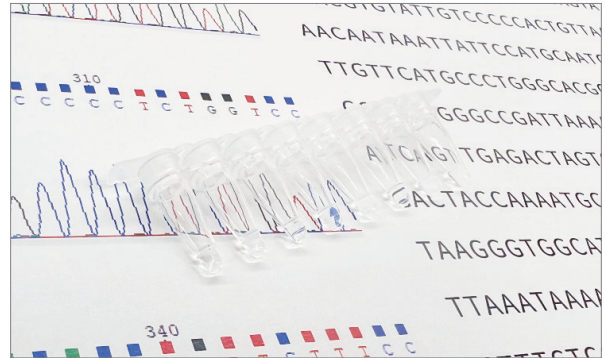
キャピラリーシーケンス

キャピラリーシーケンスサービスは、サンガー法を用いて迅速かつ低コストで高品質な DNA シーケンスを提供します。熟練したスタッフが対応し、信頼性の高いデータを実現。難読配列にも対応し、条件の最適化をサポートします。

■ サービス内容









送付いただいたDNAサンプルのシーケンス解析を行います。
サイクルシーケンス反応を1回行い、得られたデータを送付いたします。

作業内容	シーケンス反応 シーケンサー Run データ納品
使用試薬	BigDye Terminator v3.1
シーケンサー	3730xl DNA Analyzer
平均解析長	約 500 - 700 塩基 ※ サンプルの状態により異なります



■ 解析プラン

ご希望のサポート内容に応じて、3つのプランからお選びいただけます。

	Pre-mix プレミックス	One-pass ワンパス	Full フル
	コストを抑えたい方に	手間を省きたい方に	初めての方や難読配列に
	テンプレートとプライマーを ミックスしてお送りいただく 読みきりサービス	テンプレートとプライマーを 別々にお送りいただく 読みきりサービス	サンプル品質検査、 再解析を含む フルサポートサービス
品質検査	-	 1チューブ単位のご注文のみ実施	
サンプル調製	-	 ユニバーサルプライマー利用可	 ユニバーサルプライマー利用可
シーケンス	 ランタイム：1hr	 ランタイム：1hr	 ランタイム：2hr
再解析	-	-	

■ 必要サンプル

プレミックス	ワンパス	フル
<p>● DNAとシーケンスプライマーのmixサンプル</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> <p>プラスミド 450 - 900 ng</p> </div> <p>または</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> <p>PCR 産物 サイズに応じた適量 (詳細は 3 ページ)</p> </div> </div> <p style="text-align: center; font-size: 2em;">+</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center; margin: 0 auto; width: 60%;"> <p>シーケンス プライマー 10 pmol</p> </div> <p style="text-align: center;">→ 滅菌水で 20μL にメスアップ</p>	<p>● DNAテンプレート</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> <p>プラスミド 濃度：100 - 300ng/μL 液量：20μL 以上</p> </div> <p>または</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> <p>PCR 産物 濃度：10 - 50ng/μL 液量：20μL 以上</p> </div> </div> <p>● シーケンスプライマー</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center; width: 40%;"> <p>シーケンス プライマー 濃度：3.2μM 液量：10μL 以上</p> </div> <div style="width: 55%;"> <p>ご希望の方は、無償で ユニバーサルプライマーを ご利用いただけます (詳細は4ページ)</p> </div> </div>	

PCR 産物は、PCR 反応後に精製が必要です。
精製のオプションサービスもご用意しています。(詳細は 6 ページ)

▶▶▶ サンプル調製方法について詳しくは次ページ、「サンプル調製ガイド」をご覧ください。

■ 納期

ご注文単位	納期
シングルチューブ	2 営業日
8 連チューブ	3 営業日
プレート	4 営業日～

納期の延長について

ご注文内容や解析の混み具合によって納期が変動する場合がございます。

再解析・再泳動が発生した場合には、納期に追加日数がかかる場合がございます。あらかじめご了承ください。

■ 納品

解析結果はWebを通じて提供いたします。

データの準備が整い次第、ダウンロード用の URL をメールにてご案内いたします。

納品データ
塩基配列データ (TXT 形式)
波形データ (Ab1 形式)

ab1 ファイルの閲覧について

初めてご利用のお客様には、波形データ (Ab1 ファイル) 閲覧用のフリーソフトウェアをご案内します。

Web サーバー上の解析データは納品後 3 か月で消去されますのでご注意ください。

サンプル調製ガイド

調製に関する留意事項

● DNA テンプレートの精製

サンプル中の汚染物質はサイクルシーケンス反応に悪影響を与え、低品質なデータの原因となります。DNAテンプレートの抽出・精製には、市販の精製キットの使用を推奨します。

特にPCR産物は、未反応のプライマーやdNTP等を除去するため必ず精製を行ってください。

● 溶解 Buffer について

TE等のEDTA含有Bufferでサンプルを溶解させた場合、EDTAがサイクルシーケンス反応を阻害する恐れがあります。サンプルおよびプライマーの調製には、滅菌水の使用をお勧めします。

● DNA の濃度測定について

シーケンス反応を成功させるためには、適切なDNAテンプレート量が重要です。Qubitやアガロースゲル電気泳動を用いて正確に濃度を測定してください。分光光度計はDNA以外の残存物の影響で誤差が生じる可能性があるため、注意が必要です。

シーケンスサンプルの調製方法

プレミックス

右表の量のDNAテンプレートと、プライマー（10pmol）をミックスし、滅菌水でトータル20 μ Lに調製します。

サンプルの種類	サンプルサイズ	推奨量
プラスミド	-	450 - 900 ng
PCR 産物	100 - 200 bp	3 - 10 ng
	200 - 500 bp	10 - 30 ng
	500 - 1,000 bp	15 - 60 ng
	1,000 - 2,000 bp	30 - 115 ng
	> 2,000 bp	60 - 140 ng

Point

プレミックスでは、お客様が調製したサンプルをそのまま一律量にてシーケンス解析に使用します。濃度が推奨範囲と異なる場合、良好な結果が得られない恐れがありますのでご注意ください。

ワンパス・フル

右表の濃度にサンプル、プライマーを調製のうえ、必要量以上を送付してください。

サンプルの種類	濃度	必要量
プラスミド	100 - 300 ng/ μ L	20 μ L 以上
PCR 産物	10 - 50 ng/ μ L	20 μ L 以上
プライマー	3.2 μ M	10 μ L 以上

Point

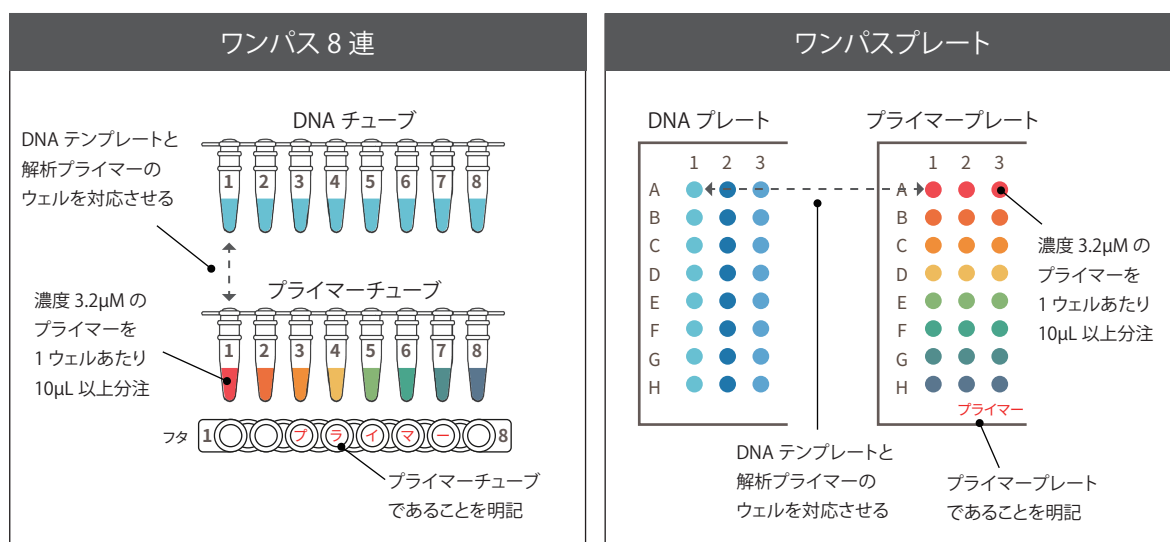
サンプル送付時の蒸発等により、体積がロスする可能性があります。濃度が高い場合でも、送付量は必ず必要量以上でお願いいたします。

同一サンプルで複数の解析をご希望の場合は、解析数に応じた分量のサンプルを1本のチューブにまとめて送付してください。

プライマープレートの作成方法

ワンパス8連またはワンパスプレートで、3種類以上のプライマーを使用する場合、DNAテンプレートと対応するプライマープレートをご準備ください。

- DNAサンプルとは別に、8連チューブまたはプレートをご用意いただき、DNAテンプレートに対応するようにプライマーを整列させてください。
- 濃度3.2μMのプライマーを、1ウェルあたり10μL以上分注してください。
- プライマープレート（チューブ）には、必ず「プライマー」と明記してください。



INFORMATION 02

ユニバーサルプライマーリスト

DNAシーケンス解析のワンパス・フル、および、Primer Walking サービスでは、ユニバーサルプライマーを無料でご利用いただけます。

ユニバーサルプライマー

ご利用の際には、注文書にてご指定ください。

使用文字の制限がございますので、**略名でのご記入**をお願いします。

プライマー名	略名	配列
T7 promoter	T7pro	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G
T7 terminator	T7term	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G
T3	T3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG
M13FW	M13FW	GTA AAA CGA CGG CCA GT
M13RV	M13RV	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G
M13 P1	M13P1	GTA AAA CGA CGG CCA GT
M13 P5	M13P5	CAG GAA ACA GCT ATG AC
M13 M4	M13M4	GTT TTC CCA GTC ACG AC
SP6	SP6	TAT TTA GGT GAC ACT ATA G
pGEX5'	pGEX5	GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG
pGEX3'	pGEX3	CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG
BGH-Reverse	BGH-R	TAG AAG GCA CAG TCG AGG

オプションサービス

DNA シーケンスサービスでは、お客様の研究をサポートするため、さまざまなオプションサービスを提供しています。ご希望に合わせて、以下のオプションを組み合わせご利用いただけます。



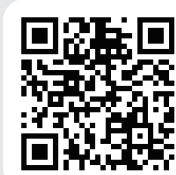
1. DNA抽出

組織、細胞、血液等から、DNAの抽出と精製を行います。

▶▶▶ サービスについて詳しくは Web をご覧ください。

核酸抽出サービス

<https://hssnet.co.jp/product/nucleic-acid-extraction/>



2. プライマー設計

ご提供いただいた配列情報をもとに、シーケンス解析に最適なプライマーの設計を行います。

PCR増幅用プライマー設計

プライマー 1セット (Fw/Rv)

ダイレクトシーケンシングを目的としたPCR増幅用プライマーを設計します。

🕒 設計のみ 1週間～
設計+合成 1週間～

シーケンス用プライマー設計

プライマー 1本

シーケンス解析結果や近隣の配列情報をもとに、シーケンス用プライマーを設計します。一部の既知配列をもとに Primer Walking を行いたい場合などにもご利用いただけます。

🕒 設計のみ 2営業日～
設計+合成 お問い合わせください

ご提供いただくもの

配列情報 または 生物種と対象領域（遺伝子）の Accession No. 等

3. PCR 増幅

シーケンス解析の前処理として、目的領域の PCR 増幅を行います。

PCR増幅

指定のPCR条件で PCRを行います。
PCR条件が未設定の場合は、条件検討も承ります。

🕒 お問い合わせください

条件検討の回数上限について

2 回の条件変更を行っても増幅が確認できない場合は、作業を終了させていただきます。

- ご提供いただくもの
- ・精製済みのゲノム DNA (1 領域につき 20ng/μL 以上、10μL 以上)
 - ・プライマーセット
 - ・増幅確認済みの PCR 条件 (ある場合)

FFPE 由来のサンプルの場合は事前にご相談ください。

4. PCR 産物精製

未精製の PCR 産物をお送りいただき、弊社にて精製を実施いたします。

<div style="text-align: center; margin-bottom: 10px;"> <h4>カラム精製</h4> </div> <div style="text-align: center; border: 1px solid black; border-radius: 10px; padding: 5px; margin-bottom: 10px;"> シングルチューブ用 </div> <p>シリカカラムを用いて残存プライマーやdNTPを除去し、高純度のDNAを迅速に得る精製法</p> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;"> 🕒 3営業日～ </div>	<div style="text-align: center; margin-bottom: 10px;"> <h4>ゲル切り出し精製</h4> </div> <div style="text-align: center; border: 1px solid black; border-radius: 10px; padding: 5px; margin-bottom: 10px;"> シングルチューブ用 </div> <p>電気泳動後のゲルから目的サイズのDNA断片を切り出す精製法</p> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;"> 🕒 3営業日～ </div>	<div style="text-align: center; margin-bottom: 10px;"> <h4>ビーズ精製</h4> </div> <div style="text-align: center; border: 1px solid black; border-radius: 10px; padding: 5px; margin-bottom: 10px;"> 8連チューブ・プレート用 </div> <p>磁気ビーズを使ってDNAを特異的に捕捉し、残存プライマーやdNTPを洗い流す精製法</p> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;"> 🕒 お問い合わせください </div>
--	---	--

- ご提供いただくもの
- カラム・ゲル切り出し精製 ---- 未精製 PCR 産物 (30μL 以上 / チューブ)
 ビーズ精製 ----- 未精製 PCR 産物 (一律 20μL/well)

濃度の薄いサンプル、近接する複数のバンドの切り出し精製につきましては、困難な場合がございます。

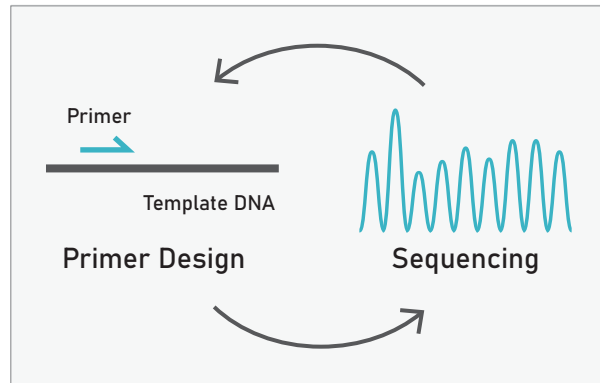
Primer Walking

Primer Walking サービスでは、DNA サンプルをご提供いただき、プライマーウォーキング法を用いて長鎖の塩基配列を解析します。

■ サービス内容

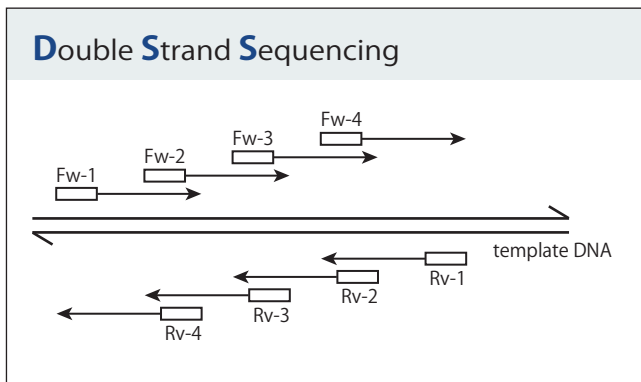
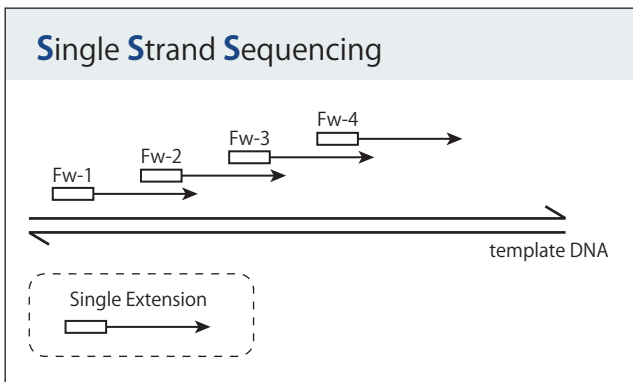
お送りいただいたDNAサンプルを用いて、複数回のシーケンス解析を行います。
解読した塩基配列からプライマー設計・合成とシーケンス反応を繰り返すことで、長鎖のシーケンス解析を進めます。

作業内容	品質検査 プライマー設計・合成 シーケンス反応 シーケンサー Run データ確認 アセンブルデータ作成
使用試薬	BigDye Terminator v3.1
シーケンサー	3730xl DNA Analyzer



■ 解析プラン

片鎖解析 (SSS法) または両鎖解析 (DSS法) のいずれかを、目的に応じてお選びいただけます。



関連サービスのご紹介

次世代シーケンス
小スケール解析

NGS Petit

Primer Walkingは、既知配列を起点にシーケンシング用のプライマーを設計し、確実に配列を読み進める方法です。しかし、一度のシーケンスで読取可能な配列長が約500塩基のため、解析対象の配列が長いほど、時間やコスト、必要なサンプル量が増加します。

そのような場合には、次世代シーケンサーを使用した小スケール解析「NGS Petit」をご検討ください。NGS Petitはより効率的な解析を提供し、Primer Walkingと同様にアセンブル済みのコンティグデータでの納品が可能です。

特に解析塩基長が10kb以上の場合には、NGS Petitで価格もお得になりますので、ぜひご利用ください。



サービスページ
<https://hssnet.co.jp/product/ngs-application/ngs-petit/>

■ 必要サンプル

● DNAテンプレート

プラスミド

濃度：100 - 300ng/μL
液量：必要量（右記参照）

または

PCR 産物

濃度：20ng/μL 以上
液量：必要量（右記参照）

● シーケンスプライマー

**シーケンス
プライマー**

濃度：10μM
液量：10μL 以上

ご希望の方は、無償で
ユニバーサルプライマーを
ご利用いただけます
(詳細は4ページ)

DNA テンプレートの 必要量について

DNA テンプレートの必要量は、解析する塩基数によって異なります。

サンプルは1回のシーケンスで1-5μL 使用します。1シーケンスで約500塩基解読できるものと仮定し、できる限り多目にご提供ください。

■ 納期

対象配列の長さ	納期
～ 1 kbp	約 2 週
～ 2 kbp	約 3 週
～ 4 kbp	約 6 週
～ 10 kbp	約 12 週

既知配列について

解析対象が既知配列の場合は、納期の短縮が可能です。ご相談ください。

納期は目安となります。サンプル数や解析状況により変更となる場合がございます。

■ 納品

解析結果はWebダウンロード、および、データ収録CD-Rにて提供いたします。

納品物	納品データ
弊社合成プライマー	塩基配列データ (TXT 形式)
データ収録 CD-R	波形データ (AB1 形式)
	アSEMBルデータ (TXT 形式)
	プライマー情報

配列報告について

1回のシーケンス反応毎に配列を随時ご報告させていただくことも可能です。ご希望の方はお申し付けください。

Web サーバー上の解析データは納品後3か月で消去されますのでご注意ください。

微生物同定

微生物同定サービスでは、日本薬局方「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」に基づき、16S rRNA 領域または ITS 領域の塩基配列による、簡易同定を行います。

■ サービス内容

ご提供いただいたサンプルよりDNAを抽出後、ご指定の領域(16S rRNA領域またはITS領域)をPCR増幅します。得られたPCR産物についてダイレクトシーケンスで塩基配列を決定し、BLAST検索で既知の配列との相同検索を行い、近縁種と推定される微生物リストを作成いたします。

作業内容	DNA 抽出 PCR 増幅・精製 シーケンス解析 (両鎖) BLAST 検索 同定結果報告
使用試薬	BigDye Terminator v3.1
シーケンサー	3730xl DNA Analyzer



■ 解析対象領域

検査対象に応じて下記2種のプライマーセットからご選択いただけます。

対象領域	プライマー名	配列
細菌 16S rRNA 領域	10F	5'-GTTTGATCCTGGCTCA-3'
	800R	5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'
真菌 ITS 領域	ITS1F	5'-GTAACAAGGT(T/C)TCCGT-3'
	ITS1R	5'-CGTTCCTCATCGATG-3'

■ プライマーの適合性について

細菌の種類によっては、本サービスで使用するプライマーが適合せず同定が困難な場合がございます。

弊社にて作業が進行不可能と判断された場合、実作業分までの料金をご請求させていただきます。解析を終了させていただきますので、あらかじめご了承ください。

カスタムプライマーや全長解析をご希望の場合は、別途お問い合わせください。

■ 納期

お問い合わせください。

■ 必要サンプル

培養検体

シャーレ、ペレット

または

抽出済み DNA

PCR が可能な精製レベルのもの

- **菌株送付に関して**

弊社では菌の単離作業は行っていません。
必ず純粋培養された菌株を送付してください。
送付いただいた試料の単離が不十分なために、
シーケンス解析で塩基配列の特定が困難となっ
た場合、全額ご請求となりますので、あらかじめ
ご了承ください。

● **病原性微生物の取り扱いについて**

病原性を有する、もしくは、病原性の可能性のあ
る微生物の受け入れは行っていません。
該当する検体は抽出済みDNAの状態まで調製
してください。

送付いただいたサンプルは、解析終了後に滅菌破棄いたします。
サンプルの返却をご希望の場合は、必ず事前にご連絡ください。

■ 納品

解析結果はWebを通じて提供いたします。
データの準備が整い次第、ダウンロード用の URL をメールにてご案内いたします。

納品データ
作業報告書（同定結果）（PDF 形式）
塩基配列データ（TXT 形式）
波形データ（Ab1 形式）
アセンブルデータ（TXT 形式）

Web サーバー上の解析データは納品後 3 か月で消去されますのでご注意ください。

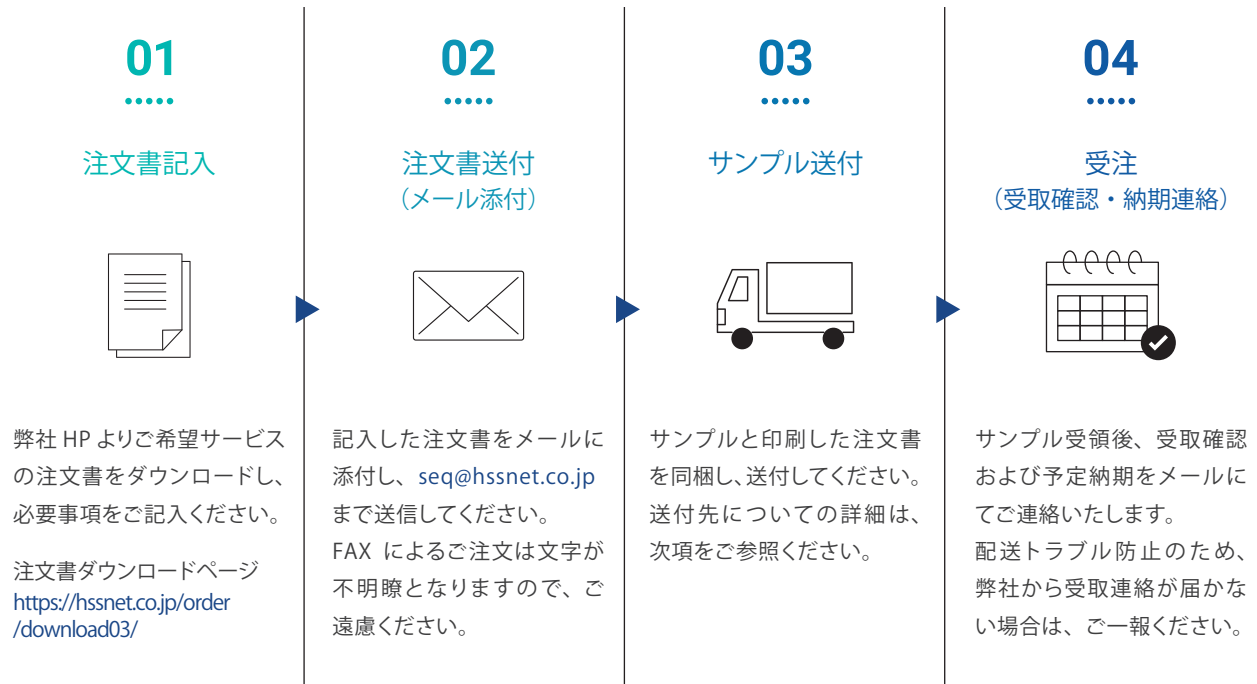
● 同定結果報告例

シーケンス配列を BLAST 検索して得たヒットテーブル

Accessions	Title	Score	Expect	Identities	Gaps
NR_126251.1	Lactobacillus helsingborgensis strain Bma5N	1380	0	750/750 (100%)	0/750 (0%)
NR_126253.1	Lactobacillus kullabergensis strain Biut2N	1376	0	748/750 (99.7%)	0/750 (0%)
NR_117812.1	Lactobacillus acidophilus strain JCM 1132	1332	0	732/740 (98.9%)	0/740 (0%)

注文方法

■ ご注文の流れ



■ サンプル送付先



ご注文内容によって送付先が異なりますので、ご注意ください。

シーケンスのみ または PCR 産物精製からのご注文
Primer Walking

送付先：羽田核酸製作所

〒144-0041
東京都大田区羽田空港 1-6-2
第四総合ビル
北海道システム・サイエンス株式会社
羽田核酸製作所 シーケンスチーム
TEL：03-6840-1005

DNA 抽出 または PCR 増幅からのご注文
微生物同定

送付先：札幌本社

〒001-0932
札幌市北区新川西 2 条 1 丁目 2-1
北海道システム・サイエンス株式会社
解析チーム シーケンス担当
TEL：011-768-5901

サンプルの当日受付は15時までです。
15時以降に到着したサンプルは、翌営業日に受付となりますのでご注意ください。

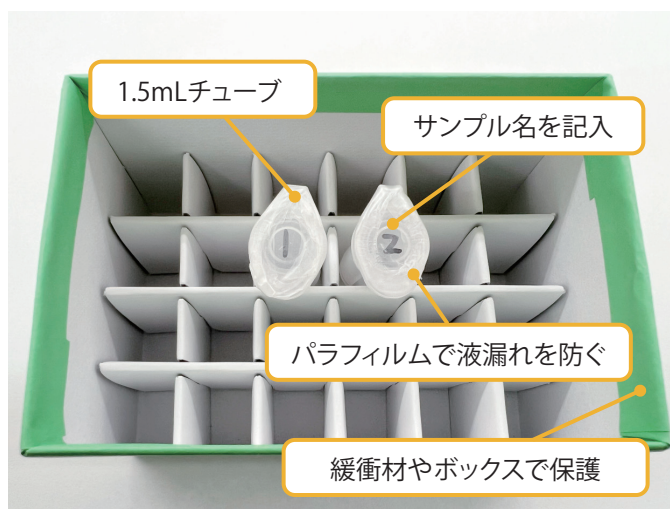
■ 発送方法

サンプル発送に関する注意事項

- 不慮の事故(チューブの亀裂や破損、フタの緩みなど)による液量の損失やコンタミネーションを防ぐため、**サンプル送付の際は必ず破損を防ぐ処置を講じてください**。輸送時の損失・損害については責任を負いかねますので、ご了承ください。
- **サンプルは平日日中(9:00~15:00)着となるように送付してください**。土・日・祝日は受付を行っていませんので、ご注意ください。
- シーケンス解析で使用したサンプル・プライマーは、解析終了後3営業日保管した後に破棄いたしますので、あらかじめご了承ください。
- サンプル送料はお客様のご負担となります。
ただし、一度に8解析以上をご注文いただく場合は、
【① 任意の配送業者の着払発送】 または
【② 日本通運の弊社専用伝票(送料弊社負担)による発送】 をご利用いただけます。
(日本通運伝票をご希望の方はお手数ですがご連絡ください)

シングルチューブ

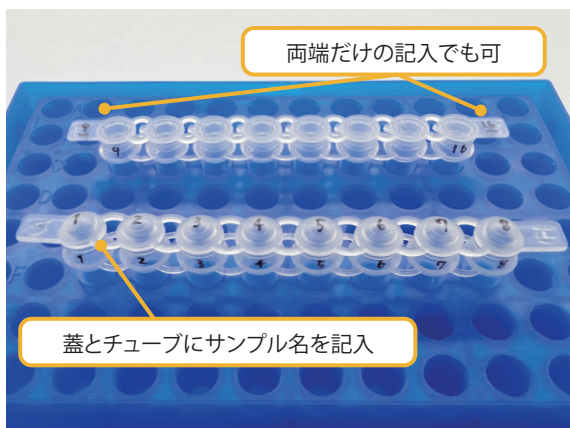
- **サンプルは1.5mLチューブでの送付をお願いいたします**。
0.2mLや0.5mLチューブは、輸送時のチューブの破損が多いため避けてください。
- 蓋またはチューブ側面に、サンプル名(またはプライマー名)を記入してください。
- パラフィルムを巻いて液漏れを防いでください。
- ボックスに入れるか、緩衝剤で包んで送付してください。
- 充分量の保冷材を同梱の上、通常便または冷凍便にて送付してください。



▶▶▶ 8連チューブ・プレートの発送方法は次ページをご覧ください。

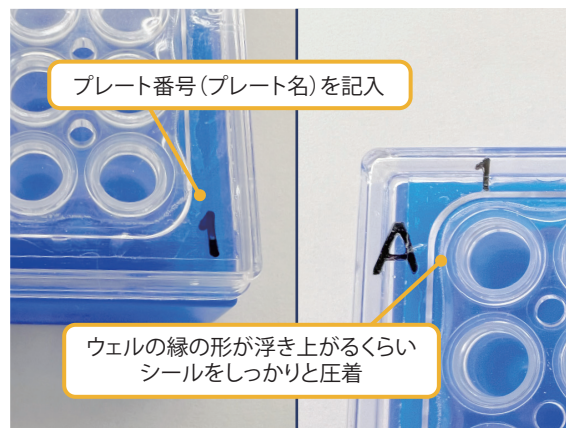
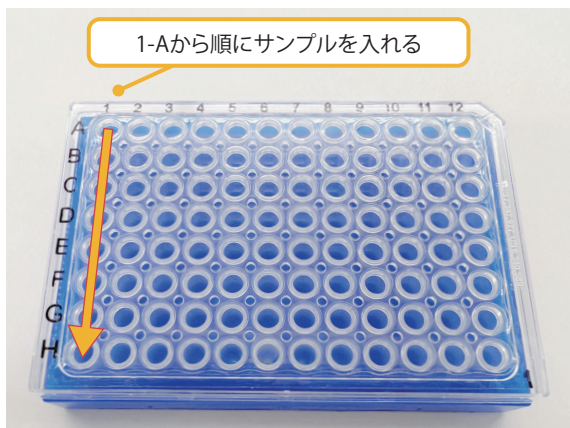
8 連チューブ

- 蓋とチューブ側に枝番号を記入してください。プライマーチューブである場合はその旨明記してください。
- パラフィルムを巻いて液漏れを防いでください。
- ボックスに入れるか、緩衝剤で包んで送付してください。
- 充分量の保冷材を同梱の上、通常便または冷凍便にて送付してください。



プレート

- プレート名または番号を記入してください。
- 粘着性のシールまたはアルミシールを使用し、剥がれないようしっかりと蓋をしてください。
- ボックスに入れるか、緩衝剤で包み、プレートが逆さまにならないように梱包してください。
- 充分量の保冷材またはドライアイスと同梱の上、**冷凍便(凍結状態)**にて送付してください。



注意事項

■ シーケンスサービスのご利用にあたって

シーケンス解析の特性について、以下の点をご理解いただけますようお願い申し上げます。

読取範囲

キャピラリー電気泳動の特性上、読み始め(プライマーの3'末端から数十base程度の領域)は分離が悪く解析が困難です。このため、使用したシーケンスプライマーの配列はデータとして得られません。

成否に影響する要因

シーケンス解析の成功率は、DNAサンプルの濃度、精製度、塩基組成によって異なります。特殊な配列(ホモポリマー、polyA、polyT、GCリッチ、繰り返し配列など)の場合、データが得られないことがありますので、ご了承ください。polyTなどのホモポリマー以降の解析では良好なデータを得ることが困難です。

アニーリング温度

サイクルシーケンス反応は通常、50℃でアニーリングを行っています。カスタムプライマーをご提供いただく場合は、プライマーのTm値にご注意ください。

mix primerの使用について

mix primerをご使用の場合、シーケンス解析の成功率が低くなる可能性があります。サイクルシーケンス反応産物の分子量がばらつくため、Basecallingの精度が低下することがあります。

■ サンプルについて

- ご依頼いただくサンプルは、文部科学省の「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(カルタヘナ法)におけるP1、P2レベルに限ります。
- 病原性菌体、感染性ウイルスパーティクル等の受け入れは弊社では行っていません。サンプルはDNAの状態まで調製していただきますようお願いいたします。
- ヒト臨床サンプルはインフォームドコンセントを得ていることを確認してください。

注意事項

- * 製品の規格仕様・サービス内容などにつきまして、予告なしに変更することがあります。
- * 本受託解析サービスは、試験研究を目的にご利用ください。その他の目的（医療品・食品の製造・品質管理や医療診断など）には使用しないでください。
- * 本受託解析サービスで得られた結果が原因となり生じた損失・損害等について、サービスの仕様上、責任を負いかねます。

代理店

 北海道システム・サイエンス株式会社

〒001-0932 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

E-mail : seq@hssnet.co.jp

URL : <https://www.hssnet.co.jp>