

次世代シーケンス解析サービス

NGS

DNA-Seq  
ゲノム配列決定

RNA-Seq  
遺伝子発現解析

リシーケンス  
変異解析

small RNA-Seq

アンプリコン  
シーケンス解析

ChIP-Seq  
ピーク検出

CRISPR  
スクリーニング

16S rRNA  
微生物群集解析

Bioinformatics

# 次世代シーケンス解析 ご依頼から納品までの流れ



## お問い合わせ

HSS ホームページのお問い合わせフォーム、または、お電話にてご相談ください。



TEL : 0120-613-190  
(平日 9:00 - 17:30)



## お見積り

ご依頼内容についてお見積りをいたします。



## ご注文

注文書にご依頼内容をご記入いただき、メール添付の上、下記アドレスまでお送りください。

- \* 注文書ダウンロード  
弊社ホームページ > ご注文 (Online 申込)
- \* お送り先 (メールアドレス)  
hss-ngs@hssnet.co.jp



## サンプルご送付

1.5mLチューブ等サンプルを入れていただき、ドライアイスと同梱の上、お送りください。

【サンプル送付先】  
〒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  
次世代シーケンス解析サービス担当  
TEL : 011-768-5901



## サンプル品質検査

ご提供いただいたサンプルの濃度測定・品質検査を行い、メールで結果をご報告いたします。

弊社基準に満たなかったサンプルについては、再送をお願いするなど、お取扱いについてご相談させていただきます。



## ライブラリ調製

品質検査を通過したサンプルを使用して、シーケンス用ライブラリを作製します。



ライブラリの品質検査にて異常が見られた場合には、お取扱いについてご相談させていただきます。



## 次世代シーケンスデータ取得



品質検査を通過したライブラリを使用して、次世代シーケンサーでデータを取得します。



## Raw Data 出力

シーケンサーより出力されたシグナルデータについてベースコールを行い、リード配列データ (FASTQ 形式) を取得します。その際、インデックス配列に基づき各サンプルのデータの振り分けも行います。



### Raw データ取得までのご依頼



FASTQ 形式のリードデータを DVD、USB、HDD などに収録し納品いたします。



## データ解析

リードデータを用いたデータ解析を行います。



データ解析のみのご依頼も承ります。お気軽にお問い合わせください。



### データ解析までのご依頼



ご依頼のデータ解析結果を DVD、USB、HDD などに収録し、納品いたします。

※ Raw Data も併せて納品いたします。

# ILLUMINA シーケンス解析

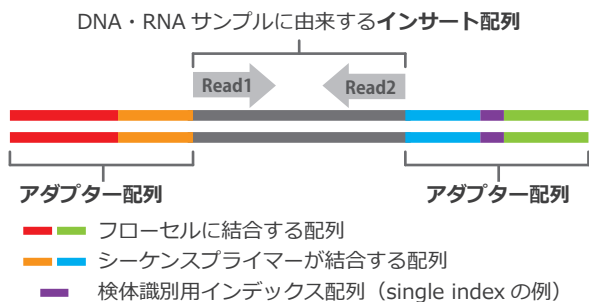
ILLUMINA シーケンサーでは、100 ~ 300bp 程度のショートリードを数千万~数億リードの高スループットで出力します。ゲノムシーケンスや遺伝子発現解析など、カバレッジを必要とする解析に広くご利用いただけます。

## シーケンサー

### ● シーケンス原理

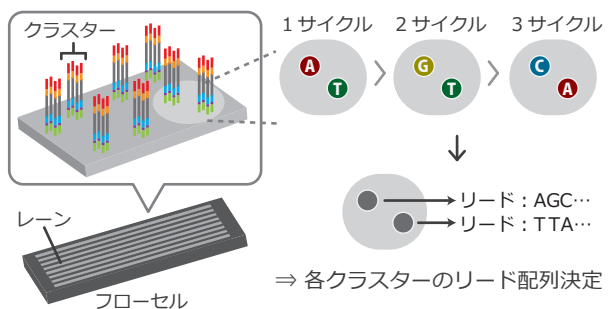
#### 【ライブラリ構造】

ILLUMINA のシーケンスライブラリは、インサート配列にアダプターが付いた構造となり、インサートの末端からシーケンスが行われます。



#### 【シーケンス】

フローセルと呼ばれる基板上で、ライブラリのクラスターが形成されます。各クラスターで、1塩基伸長と蛍光読み取りのサイクルを繰り返します。



### ● 出カスループット

シーケンサー	RUN 条件	レーンあたりのリード数の目安	リード長	取得塩基数	乗り合い対応 ● : 対応可
MiSeq	V2	2000 万リード (1000 万リードペア)	150PE	3Gb	—
			250PE	5Gb	—
	V3	3200 万リード (1600 万リードペア)	75PE	2.5Gb	—
			300PE	10Gb	● (10 万リードペア単位)
NextSeq	MidOutput	2.6 億リード (1.3 億リードペア)	75PE	19.5Gb	—
			150PE	39Gb	—
	HighOutput	4 億リード 8 億リード (4 億リードペア)	75PE	30Gb	—
			150PE	60Gb	—
NovaSeq	S4	52 億リード (26 億リードペア)	150PE	800Gb	● (1Gb 単位)

※ 上記データ量は参考値であり、保証値ではございません。 PE : ペアエンド

### ● Raw Data

ILLUMINA シーケンサーより出力される Raw Data は、FASTQ形式のリードデータとなります。

※ FASTQ 形式ファイル : 各リードの塩基配列とクオリティ値が 4 行ごとに記載されたファイル形式です (右図)。

#### 【FASTQ 形式ファイル】

```
① @XXX:XX:XX:X:XX:XX:X
② AGCTTTTCATTCTGACTGCAACGGGCA
③ +
④ CCCCCFFHHHHJJJJJJJJJJJJJJ
```

① : 配列 ID ② : 塩基配列  
③ : +記号 ④ : クオリティ値

## ライブラリ

### ●DNA-Seq ライブラリ

#### 【サンプル必要量】

PCR-Plus : 精製済みゲノム DNA 500ng (10ng/μL) 以上, 液量 30μL 以上  
PCR-Free : 精製済みゲノム DNA 4μg (50ng/μL) 以上, 液量 30μL 以上

#### 【ゲノム DNA 品質検査方法】

- 1) 濃度の確認 : アガロース電気泳動、二本鎖 DNA 定量キットによる測定
- 2) 純度の確認 : 分光光度計で A260/A280 が 1.8-2.0、A260/A230 が  $\geq 1.6$
- 3) 分解度の確認 : アガロース電気泳動、TapeStation 等による測定

#### <ワークフロー>

ゲノム DNA

断片化

アダプター付加・PCR

シーケンスライブラリ

### ●RNA-Seq ライブラリ

#### 【サンプル必要量】

真核生物 : 精製済み Total RNA 600ng (20ng/μL) 以上, 液量 30μL 以上  
原核生物 : 精製済み Total RNA 1.5μg (50ng/μL) 以上, 液量 30μL 以上

#### 【Total RNA 品質検査方法】

- 1) 濃度の確認 : 分光光度計、BioAnalyzer による測定
- 2) 純度の確認 : 分光光度計で A260/A280 が  $\geq 2.0$ 、A260/A230 が  $\geq 2.0$
- 3) 分解度の確認 : アガロース電気泳動、BioAnalyzer 等による測定

#### <ワークフロー>

Total RNA

polyA-RNA 精製  
または rRNA 除去

断片化・逆転写

アダプター付加・PCR

シーケンスライブラリ

#### 【mRNA 精製方法】

##### ●polyA-RNA 精製

oligo-dT ビーズを使用して Total RNA から polyA の付いた mRNA を精製します。  
真核生物で protein coding gene の遺伝子発現解析を行う場合にご利用いただけます。

##### ●rRNA 除去

rRNA 除去キットを使用して Total RNA から rRNA を除去します。原核生物の RNA-Seq や、真核生物でも polyA の付いていない転写産物を解析対象にする場合にご利用いただけます。

#### 【転写の方向性について】

##### ●方向性有り

RNA から 1st 鎖 cDNA を合成した後、2nd 鎖 cDNA 合成において dTTP の代わりに dUTP を加えることで、最終的なライブラリの多くが 1st 鎖 cDNA 由来となります。  
データ解析において、センス鎖とアンチセンス鎖の転写産物を識別して解析を行うことができます。

##### ●方向性無し

RNA の逆転写で得られた 1st 鎖および 2nd 鎖 cDNA の両方からライブラリが得られ、出力されるリードには転写の方向性情報が無い状態となります。  
過去にこちらの調製方法で取得されたデータとあわせて解析を行うなど、特別な理由がない場合には、左の「方向性有り」の調製方法を推奨いたします。

## ●エクソームシーケンスライブラリ

### 【サンプル必要量】

精製済みゲノム DNA 2 $\mu$ g (10ng/ $\mu$ L) 以上, 液量 30 $\mu$ L 以上

### 【ゲノム DNA 品質検査方法】

- 1) 濃度の確認: アガロース電気泳動、二本鎖 DNA 定量キットによる測定
- 2) 純度の確認: 分光光度計で A260/A280 が 1.8-2.0、A260/A230 が  $\geq$ 1.6
- 3) 分解度の確認: アガロース電気泳動、TapeStation 等による測定

<ワークフロー>

ゲノム DNA

断片化

ターゲットキャプチャ

アダプター付加・PCR

シーケンスライブラリ

## ●ChIP-Seq ライブラリ

### 【サンプル必要量】

精製済み ChIP DNA 20ng (1ng/ $\mu$ L) 以上, 液量 30 $\mu$ L 以上  
サイズ: 100-500bp

### 【ChIP DNA 品質検査方法】

- 1) 濃度の確認: 二本鎖 DNA 定量キットによる測定
- 2) サイズの確認: アガロース電気泳動、BioAnalyzer 等による測定

<ワークフロー>

ChIP DNA

アダプター付加・PCR

シーケンスライブラリ

## ●small RNA-Seq ライブラリ

### 【サンプル必要量】

精製済み Total RNA 2 $\mu$ g (50ng/ $\mu$ L) 以上, 液量 30 $\mu$ L 以上

### 【Total RNA 品質検査方法】

- 1) 濃度の確認: 分光光度計、BioAnalyzer による測定
- 2) 純度の確認: 分光光度計で A260/A280 が  $\geq$ 2.0、A260/A230 が  $\geq$ 2.0
- 3) 分解度の確認: アガロース電気泳動、BioAnalyzer 等による測定

<ワークフロー>

Total RNA

miRNA 3'・5' 末端への  
アダプターライゲーション

逆転写・PCR

サイズ選択

シーケンスライブラリ

## ●アンプリコン / 微生物群集解析 / CRISPR ライブラリ

### 【サンプル必要量】

精製済み 1st PCR 産物 5ng (0.2ng/ $\mu$ L) 以上, 液量 20 $\mu$ L 以上  
※ 1st PCR 産物には弊社指定のリンカー配列を付与してください。  
リンカー配列・インサート長についてはお問い合わせください。

### 【PCR 産物品質検査方法】

- 1) 濃度の確認: アガロース電気泳動による測定
- 2) サイズの確認: アガロース電気泳動、BioAnalyzer 等による測定

<ワークフロー>

ゲノム DNA

1st PCR  
(ターゲット領域の増幅)

2nd PCR  
(アダプター付加)

シーケンスライブラリ

※ サンプル量が上記基準に満たない場合でも、解析可能な場合がございますので、事前にご相談ください。

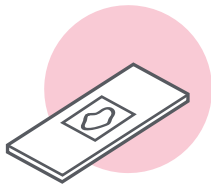
新サービス

## 一本鎖・微量・損傷 DNA 対応ライブラリ調製

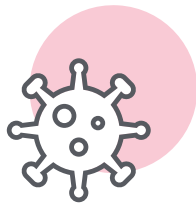
従来困難だった一本鎖 DNA や損傷 DNA に対しても対応可能なライブラリ調製サービスを提供します。また、pg レベルの微量 DNA にも対応しています。

### 【ご利用例】

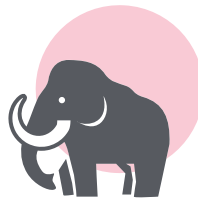
以下のようなサンプルの解析にお使いいただけます。



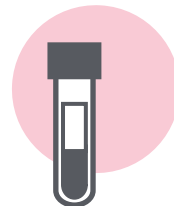
FFPE 由来 DNA



ssDNA ウイルス



古代 DNA



cfDNA

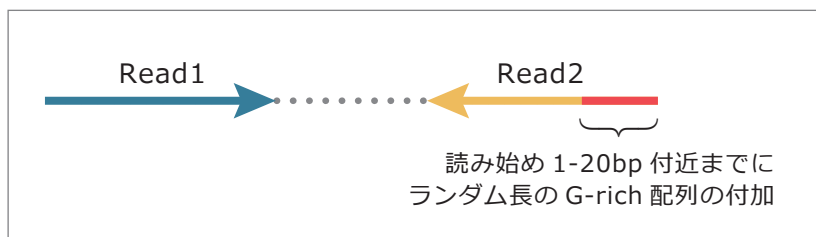


損傷・分解 DNA

### 【Read2 の配列付加について】

本サービスで使用するキットでは、Read2 のシーケンス冒頭部分にランダムな G-rich 配列が付加されます。このため、Read2 の冒頭の配列は解析時にトリミングが必要となり、有効リード長が短くなります。

※ 付加される配列の長さは、6 - 8 bp をピークとし、約 25 bp までの範囲で現れます。



### 【サンプル必要量】

精製済み DNA 50pg (20ng/μL) 以上<sup>※1</sup>, 液量 20μL 以上, サイズ 40bp 以上<sup>※2</sup>

※1 サンプル受入時に品質検査を行います。濃度が 10ng/μL 未満の場合、正確な濃度や DNA の分解状況を事前に判断することはできません。上記の濃度は社内テストに基づく目安ですので、ご了承ください。

※2 40bp 未満の低分子 DNA は精製過程で除去されるため、解析対象外となります。

## データ解析

次世代シーケンスデータを使用したバイオインフォマティクス解析の概要をご紹介します。  
詳細は、弊社ホームページの各種アプリケーションページにてご確認ください。

### ゲノム配列決定

#### ● De novo アセンブル

DNA-Seq リードのアセンブルを行い、ゲノム配列を構築します。アセンブルで得られたひと続きの配列が、コンティグとして出力されます。

[ 納品データ ]

コンティグ配列 (FASTA)

#### ● アノテーション情報付与

アセンブルにより得られたコンティグ配列を対象として、ORF 領域を予測します。予測された ORF 領域について、既知遺伝子データベースを用いた相同遺伝子検索によりアノテーション情報を付与します。

[ 納品データ ]

予測遺伝子領域情報 (GTF/GFF)、予測遺伝子配列情報 (FASTA) アノテーション結果 (TXT/EXCEL)

### ゲノム変異検索 (リシーケンス)

#### ● マッピング + SNP 候補検索

DNA-Seq リードをリファレンスゲノムにマッピングし、SNP、short InDel の候補箇所を検出します。

[ 納品データ ]

アライメントデータ (BAM)、変異テーブル (VCF/TXT/EXCEL)



#### 【コントロールサンプルの必要性】

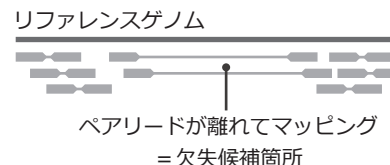
リファレンスゲノムに対する変異検索を行うと、サンプルのゲノムとの個体差や、ミスマッピングに由来する変異候補も多数検出されます。コントロールサンプル (変異株に対する野生株、疾患組織に対する正常組織など) と共に解析を行うことで、そのような変異候補箇所を除外することができます。

#### ● マッピング + 構造変異検索

DNA-Seq リードをリファレンスゲノムにマッピングし、ペアリードの異常なアライメント状態に基づき、大規模構造変異箇所を検出します。

[ 納品データ ]

アライメントデータ (BAM)、変異テーブル (VCF/TXT/EXCEL)

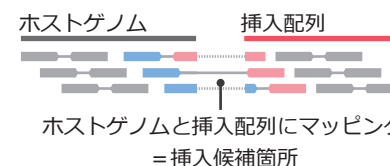


#### ● マッピング + 外来配列の挿入箇所探索

DNA-Seq リードをホストゲノムと外来配列にマッピングし、ホストゲノムと外来配列の境界にマッピングされるリードの情報を用いて、外来配列の挿入箇所を探索します。ウイルスや、トランスジーン of 挿入箇所を同定することができます。

[ 納品データ ]

アライメントデータ (BAM)、挿入候補箇所データ (TXT/EXCEL)



# De novo トランスクリプトーム解析 (リファレンスゲノムのない生物の RNA-Seq 解析)

## ● De novo アセンブル

RNA-Seq リードのアセンブルを行い、トランスクリプト配列を構築します。  
ゲノム配列が解読されていない生物において、網羅的な遺伝子情報を得ることができます。

[ 納品データ ]  
コンティグ配列 (FASTA)

## ● アノテーション情報付与

アセンブルにより得られたトランスクリプト配列を対象として、既知遺伝子データベースを参照した BLAST 検索を行い、相同遺伝子情報を付与します。

[ 納品データ ]  
BLAST 検索結果 (TXT/EXCEL)

## ● マッピング + 発現頻度解析

アセンブルにより得られたトランスクリプト配列を参照配列として、RNA-Seq リードをマッピングし、発現頻度情報を算出します。検体間・群間の発現比較も可能です。

[ 納品データ ]  
アライメントデータ (BAM)、発現頻度解析結果 (TXT/EXCEL)

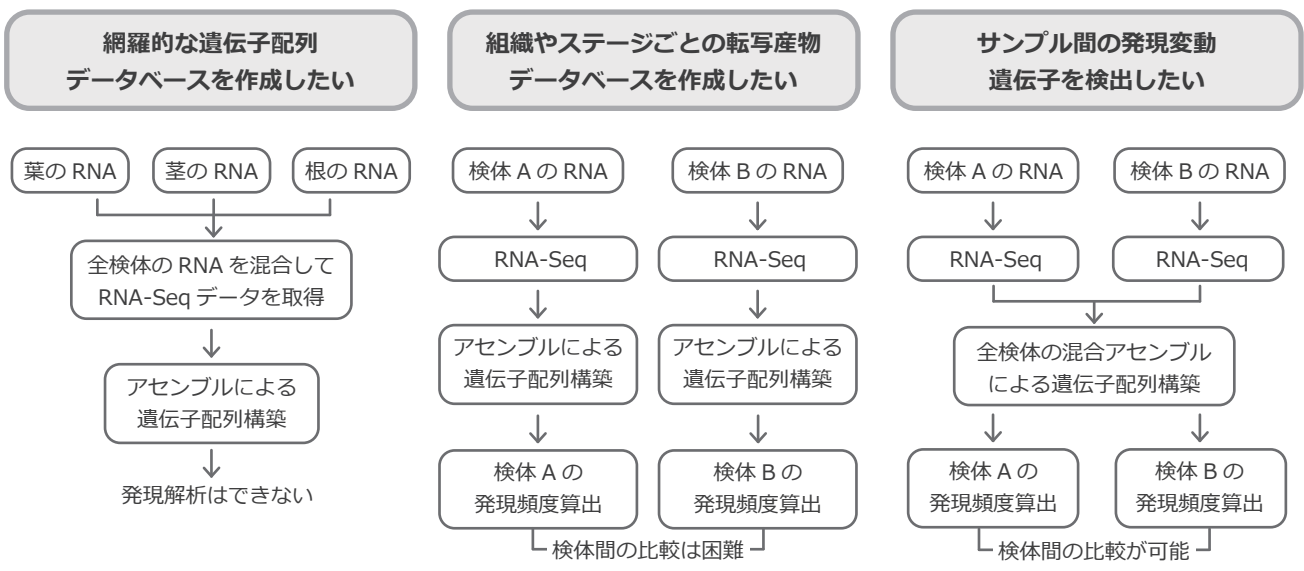
## ● 指定配列の検索

アセンブルにより得られたトランスクリプト配列の中から、ご指定いただく任意の配列と相同性の高いトランスクリプト配列を検索します。(指定配列の例：近縁種の相同遺伝子、ペプチド断片配列など)

[ 納品データ ]  
BLAST 検索結果 (TXT/EXCEL)

### 【目的に応じたワークフロー】

生物のゲノムワイドな遺伝子配列情報を取得することを目的とした解析では、さまざまな組織の Total RNA をプールし、遺伝子発現プロファイルが均衡化されたサンプルでシーケンスを行います (下図①)。各検体の発現プロファイルも取得したい場合 (下図②)、検体間の発現比較解析を行いたい場合 (下図③) は、検体ごとに RNA-Seq データを取得する必要があります。



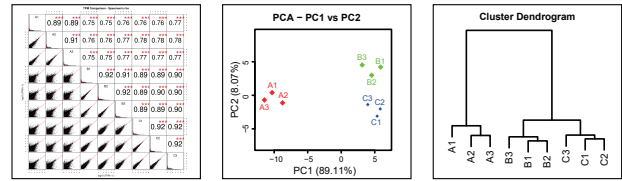


● 遺伝子発現解析

RNA-Seq リードを既知のトランスクリプト、ゲノム配列に照合し、遺伝子発現量 (TPM 値) を算出、検体間・群間の発現比較テーブルを作成します。

[ 納品データ ]

発現頻度解析結果 (TXT)、各種サマリー (ScatterMatrix, PCA, 系統樹等) 情報 (HTML)

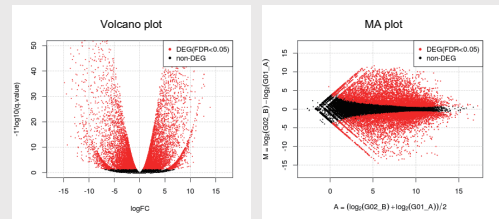


■ オプション解析

有意差検定

遺伝子発現解析結果を用いて、群間における遺伝子発現変動の有意差検定を行います。(n≥3 推奨)

Gene ID	Gene Name	mean count [Group]		statistical significance					
		A (A1,A2,A3)	B (B1,B2,B3)	a.value	m.value	p value	q value	rank	DEG
ENSG00000121410	A1BG	108.356	61.610	6.352	-0.815	0.091	0.201	15765	0
ENSG00000148584	A1CF	0.812	1.368	0.076	0.752	0.828	1.000	28494	0
ENSG00000175899	A2M	669.289	1239.704	9.831	0.889	0.023	0.064	12595	0
ENSG00000166535	A2ML1	258.282	11.054	5.740	-4.546	0.000	0.000	5229	1
ENSG00000184389	A3GALT2	2.290	1.004	0.600	-1.190	0.530	0.768	24038	0
ENSG00000128274	A4GALT	4268.418	23.398	8.304	-7.511	0.000	0.000	219	1
ENSG00000094914	AAAS	649.336	559.536	9.235	-0.215	0.489	0.724	23563	0
ENSG00000081760	AACS	1065.693	2004.674	10.513	0.912	0.003	0.011	9802	1



GO 解析

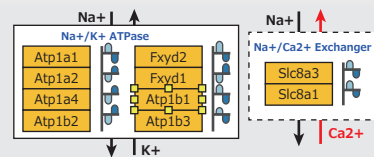
GO : Gene Ontology

発現変動遺伝子群と関連性の高い GO を探索します。

GO Accession	GO Term	p-value
GO:0044802	single-organism membrane organization	8.37E-12
GO:0044702	single organism reproductive process	3.27E-10
GO:0050818	regulation of coagulation	3.61E-10
GO:0051917	regulation of fibrinolysis	5.58E-10
GO:0051781	positive regulation of cell division	4.81E-07
GO:0006600	creatine metabolic process	5.54E-07

パスウェイ解析

発現変動遺伝子群と関連性の高いパスウェイを探索します。



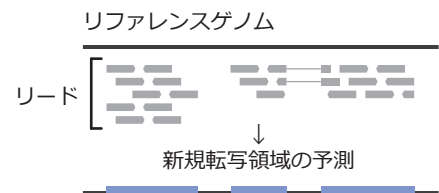
※ GO 解析、パスウェイ解析について、ヒト・マウス以外の生物種の場合は事前にお問い合わせください。

● マッピング+新規遺伝子予測

RNA-Seq リードをリファレンスゲノムにマッピングし、ゲノム上の転写領域を予測します。新たに決定したゲノム配列にアノテーション情報を付与することができます。

[ 納品データ ]

アライメントデータ (BAM)、新規遺伝子情報 (FASTA/GFF)、発現頻度解析結果 (TXT)

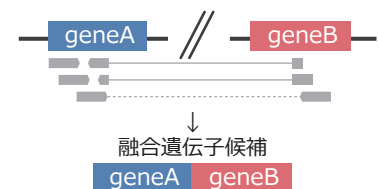


● マッピング+融合遺伝子検索

RNA-Seq リードをリファレンスゲノムにマッピングし、融合遺伝子の候補箇所を検索します。

[ 納品データ ]

アライメントデータ (BAM)、融合遺伝子検索結果 (TXT/HTML)

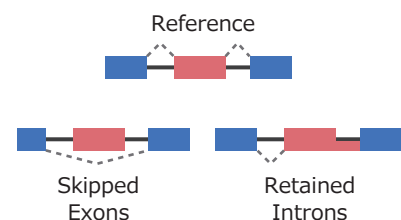


● マッピング+選択的スプライシングイベント検出

RNA-Seq リードをリファレンスゲノムにマッピングし、既知の遺伝子情報に基づく選択スプライシングイベントについて、発現頻度を算出します。

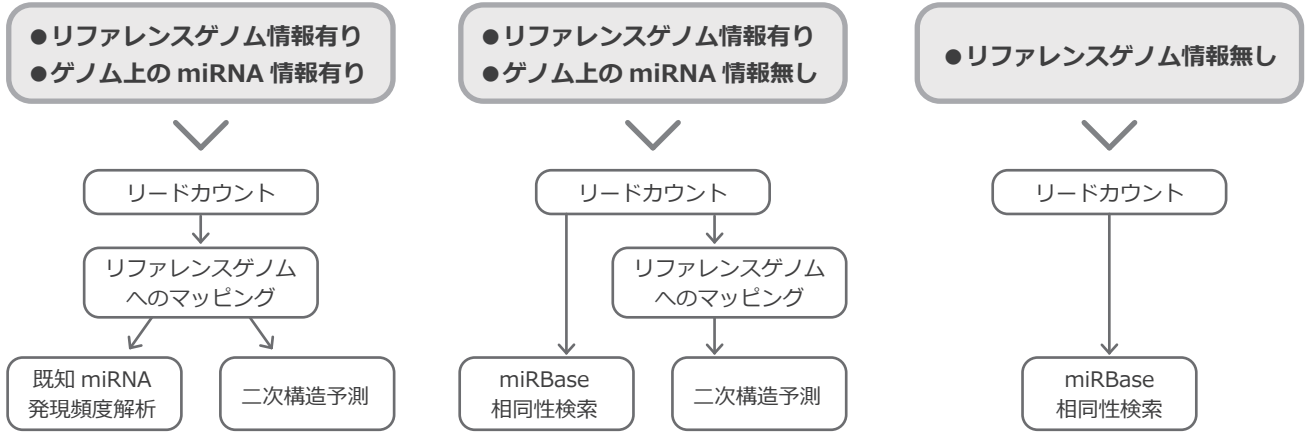
[ 納品データ ]

アライメントデータ (BAM)、選択的スプライシング発現テーブル (TXT/EXCEL)



## small RNA-Seq 解析

small RNA-Seq 解析では、リファレンスゲノム情報および miRNA 情報の有無により解析ワークフローが異なります。



### ● マッピング + 既知 miRNA の発現頻度解析

small RNA-Seq リードをリファレンスゲノムにマッピングし、既知 miRNA の発現頻度を算出します。

[ 納品データ ]

アライメントデータ (BAM)

miRNA 発現テーブル (TXT/EXCEL)

■ miRNA 発現テーブル

miRBase ID	Chr	Start	End	SampleA RPM	SampleB RPM
hsa-miR-4635	5	1062903	1062924	33.03	32.87
hsa-miR-4457	5	1309313	1309335	13.20	0
hsa-miR-6075	5	1510766	1510787	80.07	52.91
hsa-miR-4277	5	1708837	1708858	0	9.09
hsa-miR-4278	5	6827862	6827880	804.43	1388.46

### ● リードカウント + miRBase 相同配列検索

small RNA-Seq リードの同一配列を集計し、既知 miRNA との相同配列検索を行います。

[ 納品データ ]

リードカウント結果 (TXT/EXCEL)

miRBase 相同配列検索結果 (TXT/EXCEL)

■ miRBase 相同配列検索結果

small RNA Sequence	Length	SampleA Count	SampleB Count	miRBase BLAST
CTGACCTATGAATTGACAGCC	21	374,123	298,255	hsa-miR-192-5p
CAACGGAATCCCAAAGCAGCTG	23	80,017	80,835	hsa-miR-191-5p
TATTGCACTTGCCCGCCTGT	22	194,921	40,832	hsa-miR-92a-3p
TAGCTTATCAGACTGATGTTGACT	24	220,098	3,532	hsa-miR-21-5p
AAATCTACATTGTATGCCAGG	21	123	5,001	hsa-miR-21-5p

### ● 二次構造予測

small RNA-Seq リードをリファレンスゲノムにマッピングし、ゲノム上でアライメントされた領域の上流・下流配列情報を利用して、ヘアピンループ構造を予測します。

[ 納品データ ]

二次構造予測結果 (TXT/PDF)

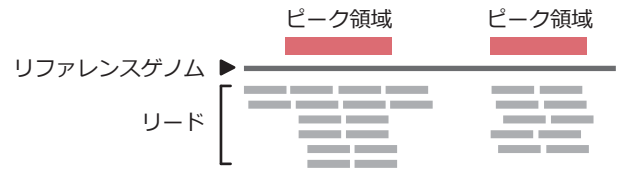
## ● マッピング+ピーク検出

ChIP-Seq リードをリファレンスゲノムにマッピングし、ピーク領域を検出します。

[ 納品データ ]

アライメントデータ (BAM)

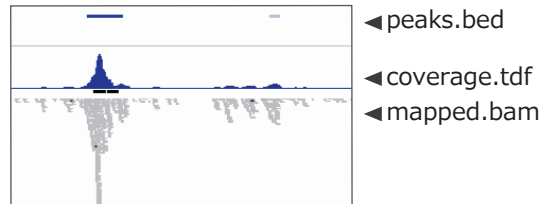
ピーク検出結果 (BED/TXT/EXCEL)



### ■ ピーク検出結果のテーブル

Peak	Chr	Start	End	Length	pileup	near gene
peak_1	1	16,208,541	16,209,116	576	5.8	.
peak_2	1	24,109,073	24,109,961	889	5.7	GeneA
peak_3	1	27,640,034	27,640,231	198	11.2	.
peak_4	1	31,095,722	31,095,988	267	4.6	GeneB
peak_5	1	31,157,853	31,158,245	393	5.2	GeneC

### ■ アライメントビューアでの表示



## ● 検体間ピーク領域比較

複数検体のピーク領域について、比較テーブルを作成します。検体間で共通したピークや、一方のサンプルで特異的なピークを抽出することができます。

[ 納品データ ]

検体間比較テーブル (TXT/EXCEL)

## ● モチーフ検索 (シーケンスロゴ作成)

ゲノムワイドに得られたピーク領域の塩基配列を対象として、高頻度で出現する配列モチーフを検索します。

[ 納品データ ]

モチーフ検索結果 (HTML/TXT)、シーケンスロゴ (HTML/PNG)

### ■ シーケンスロゴ



### 【コントロールサンプルについて】

ChIP-Seq では、バックグラウンドのノイズを除去するために、input DNA や IgG-ChIP DNA などのコントロールサンプルをご用意いただくことを推奨いたします。

#### ○input DNA サンプル

input DNA は、IP 処理を行わずに断片化したゲノム DNA のサンプルです。DNA 断片化や PCR 増幅で生じるバイアスに由来したピークが得られ、バックグラウンドデータとして使用することができます。

#### ○IgG ChIP サンプル

IgG の ChIP を行ったサンプルでは、IgG への非特異的な結合の情報が得られます。非特異的結合が少ない場合には、十分な DNA 量を回収することができず、次世代シーケンス解析を行うことが困難になりますので、その場合には上記 Input DNA をコントロールとしてご提供ください。

●リードカウント

サンプルごとにリードの同一配列を集計し、塩基長とカウント数をまとめたテーブルを作成します。

[ 納品データ ]

リードカウントテーブル (TXT/EXCEL)

■リードカウントテーブル

Sequence	Length	Count
AGCTTTTCATTCTGACTGCAACGG...	456	26552
AGCTTTTCATTCTGACTGCAACGG...	456	21408
AGCTTTTCATTCTGACTGCCGG...	454	6585
AGCTTTTCATTCTGACTGCACGG...	456	5033

●検体間比較テーブル作成

複数検体のリードカウント結果を統合し、各配列の存在頻度を検体間で比較できるテーブルを作成します。

[ 納品データ ]

検体間比較テーブル (TXT/EXCEL)

●アドバンス解析

アンプリコン全長の中から保存配列をトリミングし、ターゲット領域の配列集計を行います。また、ターゲット配列のアミノ酸配列への翻訳や、配列間のアライメントを行うこともできます。

[ 納品データ ]

ターゲット領域のカウントテーブル (TXT/EXCEL) 等

微生物群集解析

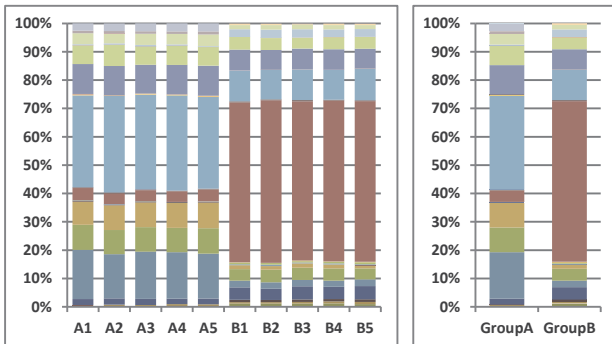
●微生物群集解析

16S rRNA などの PCR 産物をシーケンスし、菌叢解析を行います。リードデータから代表配列を作成し、カウント情報と Taxonomy 情報を付与します。

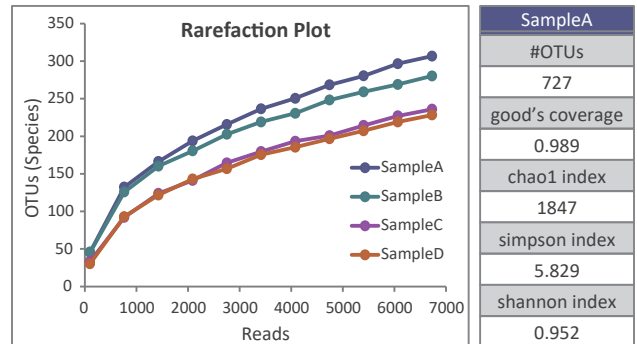
[ 納品データ ]

代表配列データ (FASTA)、菌叢構成のテーブル・グラフ (TXT/EXCEL/HTML)、 $\alpha$ 多様性情報 (EXCEL)、レアファクションプロット (HTML)、PCoA プロット (HTML)、PERMANOVA (HTML)

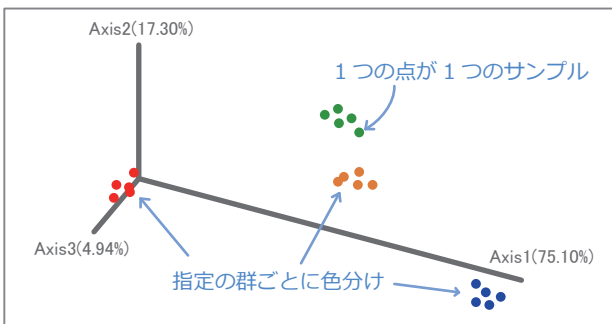
■菌叢構成のグラフ



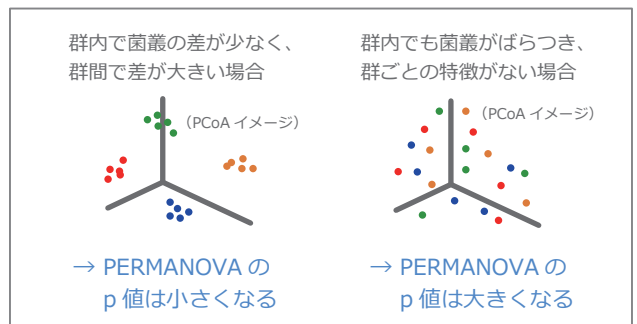
■ $\alpha$ 多様性情報



■PCoA プロット



■PERMANOVA 解析イメージ



●gRNA のリードカウント・比較テーブル作成

各サンプルより得られたリードを対象に gRNA 領域の切り出しを行い、ご指定の gRNA リストと照合しつつ各 gRNA の存在量を算出します。

また、任意のサンプル間・群間で検出された gRNA の存在量を比較し、ターゲット遺伝子の増減を評価します。

[ 納品データ ]

gRNA カウントデータ (TXT/EXCEL), 検体間・群間比較結果 (TXT/EXCEL) 等

■gRNA のカウント比較テーブル

gRNA ID	SampleA (Control)	SampleB (Control)	SampleC (Treat)	SampleD (Treat)	LOG2FC	p_value	FDR	High in Treat
ID_0001	213	274	883	175	1.12	0.9996	0.00699	FALSE
ID_0002	294	412	1554	1891	2.29	0.0000	0.00000	TRUE
ID_0003	421	368	566	759	0.75	0.9995	0.00726	FALSE

■遺伝子の negative/positive selection 情報

Gene	negative selection			positive selection		
	p_value	FDR	Rank	p_value	FDR	Rank
RPS5	0.000	0.000236	1	1.000	1.000	19147
YARS	0.000	0.000236	2	1.000	1.000	19146
GTF2B	0.000	0.000236	3	1.000	1.000	19145
NRF1	0.000	0.000236	4	1.000	1.000	19144
NLE1	0.000	0.000236	5	1.000	1.000	19143

【1st PCR に使用する鋳型量について】

CRISPR スクリーニング実験で NGS 解析を実施する際に行う 1st PCR では、スクリーニング処理後の細胞内に含まれる sgRNA のバリエーションを十分にカバーするため、ゲノム抽出の際の細胞数や 1st PCR に投入する鋳型の量を検討する必要があります。

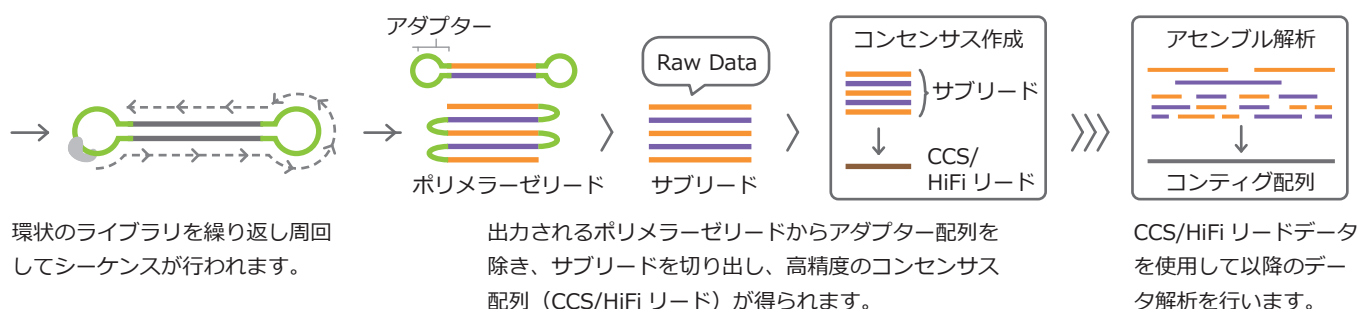
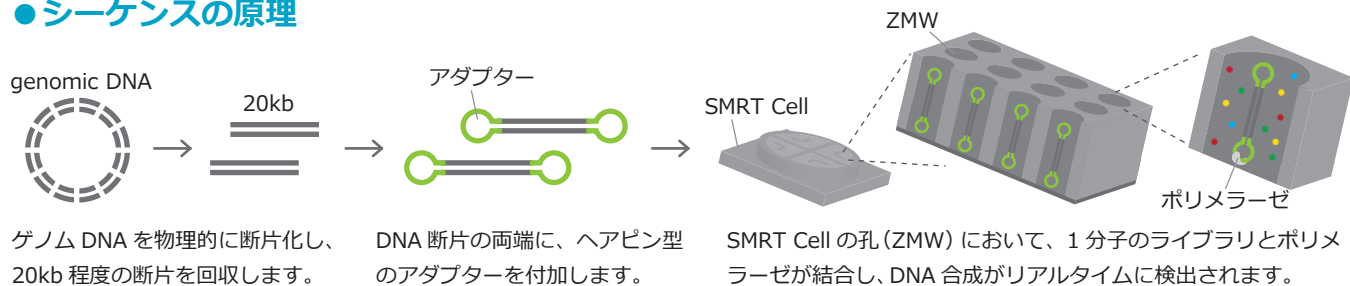
ヒトやマウスの 1 細胞内に含まれるゲノム DNA 重量は約 6.6 ~ 7pg と見積もられますので、例えば約 5 万種類の sgRNA ライブラリを対象として、全 sgRNA の種類数に対し 300 ~ 500 カバレッジを想定する場合、鋳型の必要量は約 100µg 程度と見積もられます。

ご利用の sgRNA やスクリーニング条件に応じて、必要な鋳型量を算出し、PCR ボリュームや反応本数を適宜調整してください。

# PacBio シーケンス解析

PacBio シーケンサーでは 10 ~ 20kb 程度のロングリードの読み取りができます。ゲノムアセンブル解析や、mRNA 全長のシーケンス (Iso-Seq) 解析、数 kb のアンプリコンシーケンスなどに使用されます。

## ● シーケンスの原理



## ● 出カスループット

シーケンサー	対応セル	1 ランあたりのリード数の目安	リード長	取得塩基数	乗り合い対応 ●: 対応可
Sequel	1M ZMW	約 50 万リード	10 ~ 15kb	1 ~ 3Gb	-
Sequel II / IIe	8M ZMW	約 400 万リード	10 ~ 15kb	15 ~ 30Gb	●
Revio	25M ZMW	約 1200 万リード	10 ~ 15kb	約 50Gb	※Sequel II / Revio 機種選択不可

※ 上記データ量は参考値であり、保証値ではございません。

## ゲノムシーケンス解析

### <ゲノム DNA サンプル>

PacBio のゲノムシーケンス解析では、長いリードを得るために高分子・高純度のゲノム DNA サンプルが必要となります。サンプル要件詳細はお問い合わせください。

### <取得データ量>

バクテリア・真菌のゲノム解析には、ゲノムサイズの 20 ~ 30 倍程度の HiFi リードの取得を推奨いたします。

その他、真核生物の解析についてはお問い合わせください (推定ゲノムサイズをお知らせください)。

## Iso-Seq 解析

### < サンプル必要量 >

精製済み Total RNA  
1.5µg (50ng/µL) 以上、液量 30µL 以上

### <取得データ量>

Iso-Seq では、サブリードで 20Gb ~ 40Gb /sample 程度のデータ取得を推奨いたします。

### < 解析概要 >

RNA を断片化せずにライブラリ化し、トランスクリプト配列の全長を決定します。

シーケンス原理上、ライブラリのサイズにより取得データ量にバイアスが生じるため、発現量を算出することはできません。

## カスタムデータ解析

お手持ちの Raw データを用いて、弊社標準パイプラインやご希望の解析プログラムによるデータ解析を提供します。担当スタッフによるヒヤリングを行い、様々な解析ニーズに応じた柔軟な対応が可能です。

### ● データ抽出

- コンタミが疑われるサンプルから、特定の生物由来のリード情報を抽出し、アセンブルを行いたい

### ● 配列検索

- RNA-Seqで得たトランスクリプト配列から、注目する遺伝子やタンパクの配列を検索したい
- タンパクのN末端配列解析で得た断片的なアミノ酸配列を元に、対応するトランスクリプト配列を抽出したい
- 近縁な2種のバクテリアゲノムを比較し、一方に特有の領域を検索してプライマーを設計したい

### ● 再解析

- 過去のデータについて、最新のデータベース情報を使って再解析したい
- 過去データと追加取得データを合わせて再解析したい

### ● 解析条件指定

- 解析ソフトやパイプラインにインプット可能な形式でデータの編集・変換を行ってほしい
- 参考論文で使用されている解析プログラムを用いて、お手持ちのデータを解析したい

### ● 論文投稿

- NGSデータを利用した論文化のため、参考文献にあるような図を作成したい
- シーケンスデータを公共データベース（DRA、DDBJ、GEO）に登録したい

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 : [hss-ngs@hssnet.co.jp](mailto:hss-ngs@hssnet.co.jp)

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