

■ 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

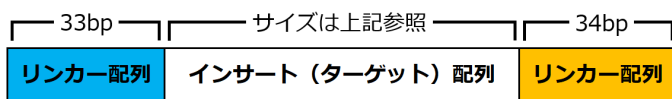
シーケンサー	NovaSeq	NextSeq・MiSeq
ご用意いただくサンプル	リンカー配列付き・精製済み PCR産物	リンカー配列付き・精製済み PCR産物
読み取り方法	Paired-End 150 bp x 2	Paired-End 300 bp x 2
データ取得量の単位	330万リードペア(1Gb)/検体～	3～5万リードペア/検体～
標準解析仕様	<ul style="list-style-type: none"> ○ ライブラリ調製 ○ 150 PE 330万リードペア/検体 ○ リードカウント解析 ○ 検体間比較テーブル作成 	<ul style="list-style-type: none"> ○ ライブラリ調製 ○ 300 PE 3～5万リードペア/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	3～5万リードペア/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 67 bpを除いたサイズ	<p>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きます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。</p> <p>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。</p>	

■ 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

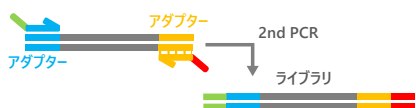


※ リンカー配列・プロトコル詳細はお問い合わせください。

■ 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ございます。詳細は裏面をご覧ください。



