



ファスマック

次世代シーケンス解析



次世代シーケンス (NGS) とは？

現在ではHigh through-put sequenceとも呼ばれ、短時間に大量のDNA/RNAの配列情報を得ることができる、新しい世代のDNAシーケンシング技術のことを指します。従来のシーケンサーと比べ、データ量あたりのコストが安いことから、より広範な研究者層がこの技術を使用しています。本技術は、新種の生物のゲノム解析、微生物のメタゲノム解析、集団遺伝学的解析、環境調査、創薬、疾患診断など、様々な領域・分野で活用されており、研究内容に応じて最適な解析手法を決定する必要があります。

私たちはNGSを多くの方にご利用いただくために、最適な解析をご提案するとともに、安価に、より短期間で結果をお届けすることで、お客様の調査・研究を加速させることを目的としています。

FASMAC

アンプリコン解析

価格:100,000円／8サンプル 150,000円／16サンプル + オプション

納期:15営業日～ ※オプションありの場合は、+5営業日

2 step PCR法によりターゲット領域を増幅し、アンプリコンライブラリをNGSで解析します。

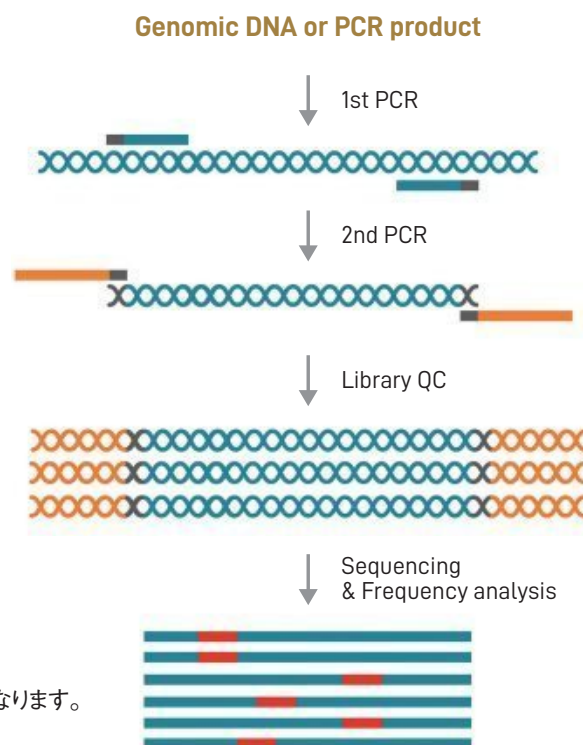
プライマーをご指定いただければ、生物相の把握や、遺伝子変異の頻度解析等にご利用いただくことが可能です。

★ご希望の1st PCRプライマー1セット & 2nd PCRプライマーを無償提供します

★サンプル由来のライブラリ調製不良の場合も無償で再調製します※

実施概要

- 1 GenCheckシリーズによるDNA抽出**
試料を凍結乾燥後、ビーズ破碎を行った上で抽出します。
- 2 蛍光試薬を使用した濃度測定**
- 3 2 step PCR法によるライブラリ調整**
- 4 濃度測定 & ライブラリサイズの確認**
- 5 MiSeq 2x250 bpによるシーケンシング**
他のお客様と1runを共有して解析します。
2x300 bpによるランへの変更も可能です。
- 6 データ解析**
菌叢解析用のパイプラインQIIME等を用いて解析を行い、
菌群組成グラフやヒートマップ形式でデータの可視化を行います。
ご希望いただく遺伝子領域によっては、Excelファイルでの納品となります。



作業内容	価格	備考
DNA抽出～	+40,000円／8サンプル	弊社開発のGenCheckを用いて抽出をおこないます。
1st PCR～	+20,000円／8サンプル	DNAをお送りいただき、弊社にてPCRを実施いたします。 お見積りをご依頼いただく際にプライマー配列をご指定ください。
2nd PCR～	+10,000円／8サンプル	弊社から提供する1st PCR用プライマーを用いて、PCRを実施していただきます。 精製済みのPCR産物をお送りいただき、 弊社にてBarcode (Index) 配列の付加から実施いたします。
ライブラリの混合	16サンプルまで無償	お送りいただいたライブラリを等濃度混合します。 ライブラリごとのサイジングをご希望の場合は別途費用を頂戴します。

ご案内・ご注意事項

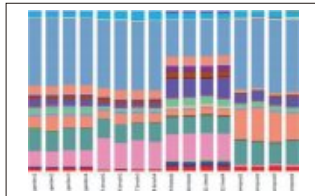
ご希望のプライマー配列でライブラリ調製いたします。弊社標準仕様のプライマーのご用意もございますので、お気軽にご相談ください。お客様ご自身でライブラリ調製いただく場合は、ターゲット増幅用の1st PCR プライマー 1セット、およびサンプル識別用インデックス配列を含む2nd PCR プライマーを無償でお送りいたします。複数ターゲットの1st PCR プライマーをご希望の場合、別途プライマー合成費用をいただく場合がございます。お送りいただくDNA濃度は10 ng/μl・20 μl以上を目安にお送りください。DNA抽出は対象生物やサンプルの状態によって抽出方法を最適化する必要があるため、良いデータを得るための重要なステップであると位置づけております。そのため、弊社で抽出経験の乏しいサンプルについては、お断りさせていただく場合がございます。※無償でのライブラリ再調製は2回までとなります。

解析事例

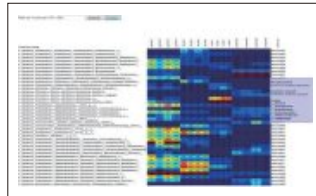
■ 16Sr RNAアンプリコン解析

土壌サンプルの自社データで、4地点について各4サンプル、合計で16ライブラリについて解析した結果です。こちらは1パッケージに相当するサンプル数です。抽出には、弊社で販売しているGencheck Extraction kit [TypeS/F]を使用しております。

※より詳しいデータは、各QRコードからご確認ください。→



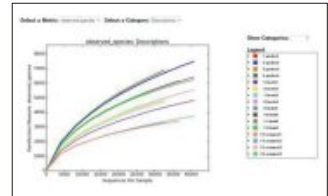
16SrRNAのV4領域のデータを用いた微生物群集構造解析の結果



OTU heatmap



主座標分析 (PCoA)
※オプションとなります



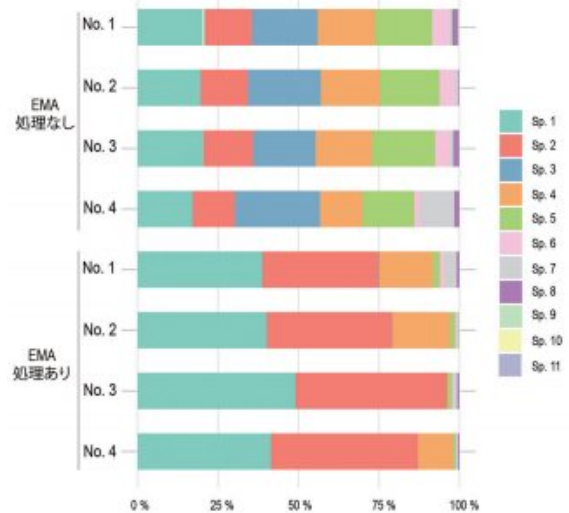
レアファクションカーブ
※オプションとなります

■ 生菌微生物 群集構造解析

環境サンプル中で実際に活動している生菌の微生物群集構造を把握することができます。

生菌由来の群集構造を解析する手法として、弊社では2通りの解析を提供しています【選択的膜透過色素EMA処理法】【RNAからの逆転写cDNAによる群集構造解析】。EMA処理法では、死菌由来DNAのみが修飾され、修飾を受けたDNAが増幅できない状態とすることで、生菌由来DNAのみが選択的にPCR増幅・検出される群集構造解析です。

RNAからの逆転写cDNAによる群集構造解析では、環境サンプル中から抽出したRNAの逆転写反応によって得られたcDNAを鋳型に、16S rRNA遺伝子領域のアンプリコンライブラリを作製します。環境サンプル中に存在する生きた菌を特定することで、実際に活動している微生物群集構造を経時的に把握することが可能です。検体の性質・保存状況に応じて、最適な手法をお選びいただけます。



■ ジェノタイピング解析

次世代シーケンスにより、FO世代でのアリル頻度を評価することで、交配に用いるべき個体選抜を行うことができます。

CRISPR/Casでゲノム編集した培養細胞株からDNA抽出後、ターゲットアンプリコンシーケンスをMiSeqにて実施し、得られたデータをCrispRVariants (<http://www.bloconductor.org/packages/release/bioc/html/CrispRVariants.html>)にて解析しました。次世代シーケンスを利用することでより高い解像度でジェノタイピングを行うことが可能です。

データ提供: 安田秀世様 (Konkuk University, Korea)

関連文献: J Genet Genomics. 2016 Dec 20; 43(12): 705-708

A highly efficient method for enriching TALEN or CRISPR/Cas9-edited mutant cells.



ゲノムショットガン解析パッケージ

価格:90,000円／20 M paired-end read・1サンプル

納期:20営業日～

ゲノムショットガン法は、DNAサンプルを断片化してから、それらの断片をランダムにシーケンス解析することにより、全体のゲノム情報を得る方法です。従来のSanger法に代わって、より高速でコスト効率の良い方法として広く使われています。弊社ではilluminaライブラリからのコンバージョンによる調製を採用しています。

★低濃度サンプルからの受け入れも可能です※

★リード長を2x300 bpへ変更して解析を承ることが出来ます

★ご要望に応じて、illuminaライブラリの受け入れも可能です

実施概要

1 蛍光試薬を使用した濃度測定

RNAのコンタミネーションを防ぐため、RNase処理済みのDNAサンプル10 ng/μl・50 μl以上をお送りください。規定濃度以下でも解析を承ることは可能ですので、まずはご相談ください。

2 超音波によるDNAの物理せん断

3 ゲノムショットガン用ライブラリ調製

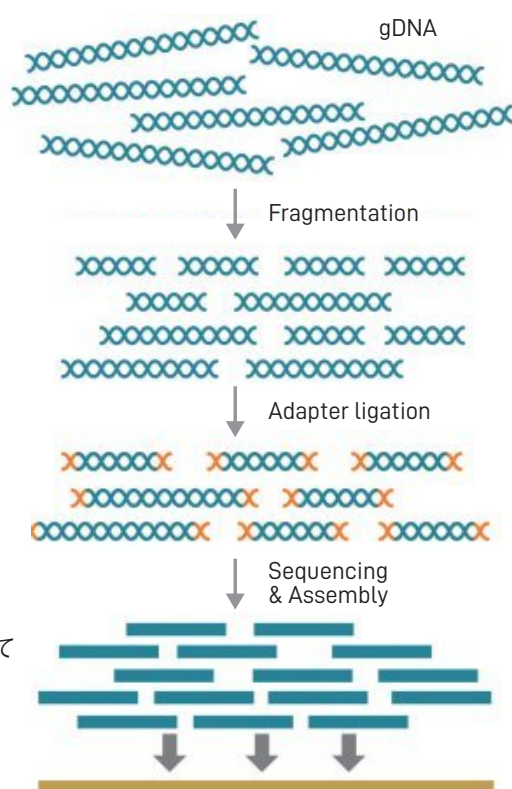
アダプターライゲーション後、数サイクルのPCRを行い、濃度測定およびライブラリサイズの確認を行います。

4 DNBSEQ 2x150 bp によるシーケンシング

MGI社 DNBSEQを用いて他のお客様と共有で解析を行います。

5 de novo Assembly

アダプター及び低品質のリードを取り除いた後、適切なAssemblerを使用してContigとScaffoldを構築します。Fastqファイル納品をご希望の場合は、より安価なオーダーメイド解析をご提案しますので、お気軽にご相談ください。



作業内容	価格	備考
リファレンスマッピング	+100,000円／サンプル	ご指定いただいたリファレンス配列に対してマッピングを行います。
オートアノテーション	+50,000円／サンプル	予測遺伝子配列やたんぱく質配列 (multi-fasta)、アノテーション (gff)、genbank形式データ等を納品いたします。
コンティグのBLAST解析	+30,000円／サンプル	Nucleotide Collection (nr/nt) に基づく検索結果をExcel形式で納品いたします。
Sequence Typeのタイピング	+40,000円／サンプル	Multi locus sequencing typing 解析をご希望の際にご指定ください。
変異解析	+50,000円／サンプル～	マッピングデータより変異の検出をおこないます。
遺伝距離の算出 (アセンブリフリー)	+100,000円／式	データベースにあるSRAデータを含めた解析も可能です。

ご案内・ご注意事項

※Total DNA 1ngからの調製実績がありますが、安定した物理せん断およびライブラリ調製を行うためには10 ng/μl・20 μlが必要です。そのため、ライブラリ調製・ランの結果を保証するものではありません。

RNA-seq解析パッケージ

価格:45,000円 / 20 M paired-end read・1サンプル

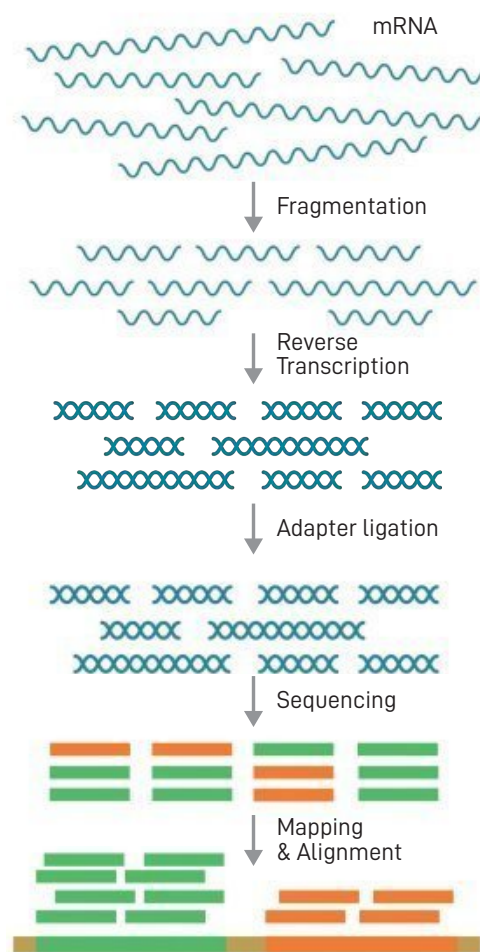
納期:20営業日~

RNA-seq は、次世代シーケンサーを用いてmRNAの配列情報を取得し、その発現量を算出することで、細胞内で発現する転写産物の網羅的な定量を可能とし、転写制御機構の解析等にも使用されています。

- ★安価に最短で解析結果を納品いたします
- ★ヒト・マウス等のモデル生物以外の解析実績もございます
- ★実験デザインのご相談~発現比較等の解析までサポートいたします

実施概要

- 1 蛍光試薬を使用した濃度測定**
 DNAのコンタミネーションを防ぐため、DNase処理済みのRNAサンプル 1 µg以上をお送りください。吸光度計等により、サンプルの純度を事前にご確認ください。
 A260/A280 ≧ 2が推奨値となります。
 また、電気泳動にて分解されていないことをご確認ください。
 規定量以下でも解析を承ることは可能ですので、まずはご相談ください。
- 2 mRNAの精製**
 Poly T 結合ビーズを用いて精製を行います。
 生物種に応じてプローブ式のリボソームRNA除去を承ることも可能です。
- 3 ライブラリ調製**
 市販のキットを使用し、酵素せん断、ランダムプライマーによるcDNA合成等を行います。
- 4 DNBSEQ 2x150 bp によるシーケンシング**
 MGI社 DNBSEQを用いて他のお客様と共有で解析を行います。
- 5 発現量算出 (TPM / RPKMによる正規化)**
 アダプター及び低品質のリードを取り除いた後、既知のリファレンス配列へマッピングを行います。
 遺伝子領域ごとにマッピングされたリード数をカウントし、TPM/RPKM正規化法により、カウントデータを補正します。



作業内容	価格	備考
リボソームRNA除去	+30,000円 / サンプル	polyA-tailを持たないバクテリアのmRNAを精製します。
発現比較解析	+50,000円 / 比較	ご指定いただいたグループごとに発現比較をおこないます。
主成分分析	+10,000円 / 比較	3サンプルから解析を承ります。
ヒートマップ作製	+10,000円 / 図	ご指定の閾値以上の発現量の差異を示した遺伝子について作図します。
de novo transcriptome assembly	+100,000円 / 式~	リファレンス配列がない生物の発現解析をご希望の場合にご利用ください。

オーダーメイド解析

- ★お客様の実験・研究プランに応じて、解析内容をお選びいただけます
- ★パンフレット等に記載されていない手法についてもできる限り対応いたします
- ★まずはお気軽にご相談ください

これまでのお問い合わせ例

■ 特殊なサンプルからのDNA抽出からお願いしたい!

→ サンプルの状態にあった抽出方法をご提案させていただきます。
凍結乾燥や破碎作業も承っておりますので、お気軽にお問合せください。

※詳しくはHPをご覧ください。→



■ 自分で調製したライブラリのランだけお願いしたい!

→ 調製に使用したキット等をお聞き取りした上で、最適な解析をご案内いたします。
ご希望の取得リード数によってご提案内容が変わる可能性がありますので、必要なデータ量についても事前にお申し付けください。

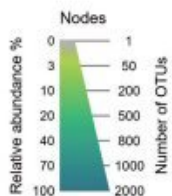
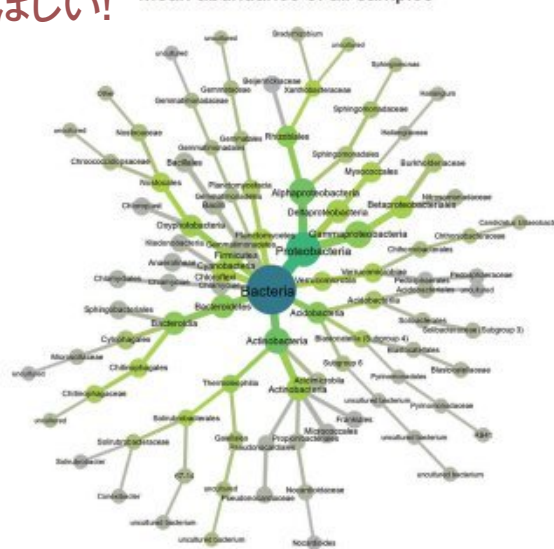
■ 先行研究と同じキットや条件でライブラリ調製してほしい!

→ 先行研究およびキットのマニュアル等を拝見させていただき、同一の方法にて調製させていただきます。
調製方法・機器に変更がある場合は事前にご相談させていただきます。

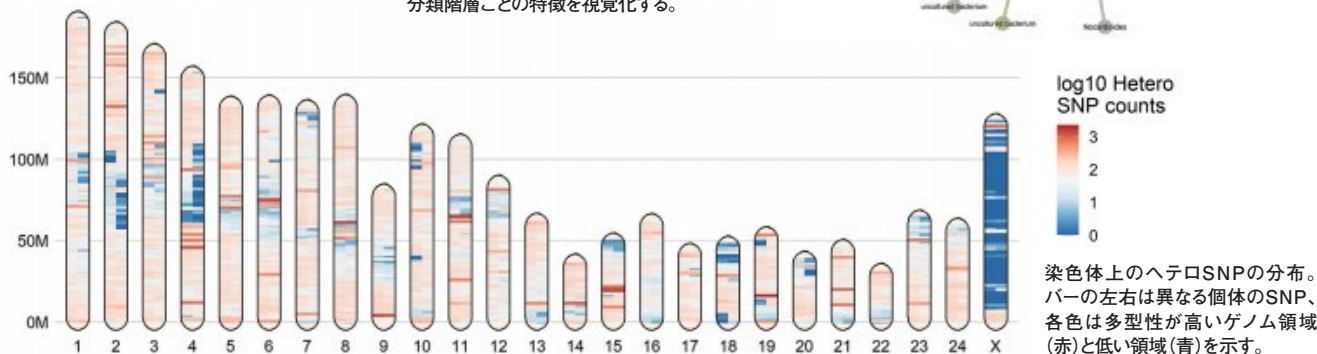
■ 手元のfastqファイルから解析と作図してほしい!

→ できるだけお客様のイメージに沿うように作図させていただきます。
具体的なイメージがございましたら、ご共有ください。
他社で解析したデータからの作図や再解析も可能です。
想定される工程数に基づいてお見積りさせていただきます。

Mean abundance of all samples



HeatTree:異なる分類レベルでの存在量を視覚化。バープロットでは同時に把握できなかった分類階層ごとの特徴を視覚化する。



染色体上のヘテロSNPの分布。バーの左右は異なる個体のSNP、各色は多型性が高いゲノム領域(赤)と低い領域(青)を示す。

保有機器 / illumina:MiSeq・NextSeq 500 MGI:DNBSEQ-G400 等

ご依頼の流れ

御見積依頼、作成

メールにて、ご希望のサンプル数、解析内容、納品物、納品日などをNGS担当までお知らせください。
お客様よりご希望いただいた内容に基づき、御見積書を作成し、メールにてお送りいたします。

Webサイト事前オーダー

受託サービス専用ログインサイトに次世代シーケンス解析用のご注文ページがございます。
<https://www.bio.fasmac.co.jp/FasmacWebSystem/ja-JP/Account/Login.mvc>
 サンプル発送の際にログインサイトで、御見積書に記載の見積No.、
 ご依頼情報、サンプル名等の必要事項の記入をお願いします。情報入力後、弊社より自動配信メールが送信されます。
 ※ユーザー登録をしていないお客様は最初に新規ご登録をお願いしております。入力完了後すぐにログインできます。

サンプル、サンプル情報 (印刷物)の送付

御見積書を同梱の上、冷凍便・平日着・着払いにて、以下の住所までお送りください。

〈送り先〉
 〒 243-0021
 神奈川県厚木市岡田3088 ケーオービルA棟4階
 株式会社ファスマック NGSグループ
 TEL:046-281-9909

ファスマックにサンプル到着、解析開始

サンプルを確認後、お客様へ受注ご報告をメールにて送信いたします。

解析データの納品

解析が完了いたしましたら、メールにて解析報告書をお送りいたします。
 別途、USBメモリ等にてデータを納品いたします。

【重要】サンプルおよびデータの保管期限

弊社にお送りいただいたサンプルは、お客様の返却希望のお申し出がない場合、解析完了後、廃棄させていただきます。返却をご希望のお客様は、弊社ログインサイトからご注文いただく際に、その旨をご明記いただくか、メールにてお問い合わせください。返却可能なサンプルはDNA/RNAのみとなります。生の試料の返却は承っておりませんので、ご了承ください。解析データに関して、保管期限を納品後より1年間とさせていただきます。弊社での保管期限後に、データの再解析をご希望いただく場合には、弊社からお送りした解析データをお送りください。

ご注意事項

得られるデータ量について、解析する配列によって得られる量が変化します。一般的にはアンプリコン(PCR産物)についてはデータ量が少なくなる傾向にあります。また、解析時にはコントロールとしてPhiXライブラリをサンプルに応じて10~50%程度添加します。このような理由から、弊社はリード数およびデータ量の保証は行っておりません。

株式会社ファスマック

〒243-0021 神奈川県厚木市岡田3088 ケーオービルA棟 4階

バイオ研究支援事業部 NGSグループ

TEL:046-281-9909

E-mail:ngs@fasmac.co.jp

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