1. 解析の流れ

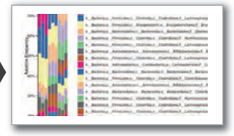
DNA抽出[*3]
弊社は、糞便や土壌、水など様々なサンプルからの抽出実績があり、それぞれのサンプルに最適な抽出方法で行います。その後、DNA濃度を測定します。

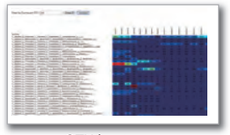
ライブラリー作製
PCR反応と精製を2回行い(2-step tailed PCR)、ライブラリーを作製します。その後、ライブラリーの濃度と品質を確認します。

シーケンシング解析
MiSeqまたはNextSeq 1000 (Illumina)を用いて、2x300 bpの条件でシーケンシングを行います(他のお客様と相乗り)。

データ解析
菌叢解析用パイプラインQiimeを用いて解析を行い、「菌相組成の棒グラフ」や「ヒートマップ」などの形でデータの可視化まで行います。一部の遺伝子領域(12S rRNAやCOIなど)は、「エクセルデータ」のみを提供いたします。
Qiime2.0(DADA2モデル)が標準です。Qiime1での解析をご希望の方はお知らせください(追加料金は発生しません)。

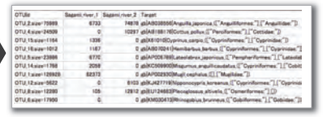
16S rRNAやITS領域、18S rRNAの場合
可視化データを納品


菌相組成の棒グラフ


OTU heatmap

サンバーストチャート

12S rRNAやCOIの場合
エクセルデータを納品



各ASVに対して、検出されたリード数と対応する生物種を示した「エクセルデータ」を提供致します。

解析に用いるデータベース

遺伝子領域	データベース
細菌 16S rRNA	Greengene・SILVA・Human Oral Microbiome Database より選べます。特にご指定がない場合はGreengeneを用いて解析します。EzBioCloud 16S Database を用いる場合は +10,000円/解析かかります。
真菌 ITS	UNITE
18S rRNA	SILVA
cMiFish	魚類ミトコンドリアゲノムデータベースMitoFish とMiFish用参照配列
その他	NCBI

ゲノム編集結果の確認や多型を知りたい方には、以下の解析方法がオススメです。
- **CRISPR-DAVを用いた解析**: CRISPR-Cas9 によるゲノム編集後の配列・変異率が確認できます。
- **カスタム多型解析**: 取得した配列データをカスタム多型解析で解析すると、各アレルのリード数が得られます。

いずれも追加料金はかかりません。お見積り時にどちらかご希望をお知らせください。デモデータは弊社HPにご用意しています。

オプション
詳細はHPをご覧ください

群間比較解析 ※細菌16S/真菌 ITS/18Sのみ対応	LEfSeを用いて、比較する群間の違いと相関を示す微生物群の抽出やある現象の原因微生物の探索を行います。有意差検定を行うため、1グループ(群)あたり3サンプル以上必要です。
多様性解析	Qiime2のdiversityプラグインを用いて、レアファクション解析(chao1やshannonなど)と主座標分析 (PCoA)を行います。サンプルのグループ(群)分けをご指示いただくことで、グループ(群)単位での比較が可能です。
└ 多様性解析の統計解析	ベータ多様性はPERMANOVAで検定し、アルファ多様性はKruskal-Wallisで検定します。有意差検定を行うため、1グループ(群)あたり3サンプル以上必要です。
機能予測解析 ※細菌16Sのみ対応	PICRUSt2を用いて、菌叢解析結果を特定の機能(酵素・KEGG ID・代謝パスウェイ)へと紐づける予測を行います。サンプルのグループ(群)分けをご指示いただくことで、グループ(群)単位での比較が可能です。
└ 機能予測解析の統計解析	STAMPを用いて、比較するグループ間で機能予測解析結果に有意な差がみられるかを検定します。有意差検定を行うため、1グループ(群)あたり3サンプル以上必要です。
コピー数の取得	リアルタイムPCR解析を行い、サンプル中の対象遺伝子のコピー数を測定します。アンプリコンシーケンス解析の結果を相対値から絶対値に変換したデータをお返しします。
ネットワーク解析	SpiecEasi(MB法)を使用して、ネットワーク解析を行います。経験上、最低8サンプル以上は必要です。
生息環境の推測 ※細菌16Sのみ対応	16S rRNA遺伝子配列と微生物の生息環境を網羅的に結びつけるデータベース「ProkAtlas」を用いて、生息環境を推測します。

*3 弊社からご提供させていただく専用チューブに入れて発送いただきます。サンプルの形状等により弊社で追加の作業が必要と判断した場合は別途料金をいただきます。
また、サンプルの内容(例えば感染性の有無)によりお断りする場合がございます。
DNA 抽出は、対象生物やサンプルの状況によって抽出方法を最適化する必要がございます。より良いデータを得るための非常に重要なステップであると位置づけております。この観点から弊社におけるDNA抽出ノウハウに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。

2. 料金早見表

(税別)

サンプル数	試料を送る	1サンプルあたり	抽出DNAを送る	1サンプルあたり	1stPCR産物を送る 精製前でOK!	1サンプルあたり
1	20,000円	@20,000円	15,000円	@15,000円	15,000円[*4]	@15,000円
8	120,000円	@15,000円	96,000円	@12,000円	72,000円[*4]	@9,000円
16	240,000円		192,000円		144,000円[*4]	
24	360,000円		288,000円		216,000円[*4]	
32	480,000円		384,000円		288,000円[*4]	
40	540,000円	@13,500円	420,000円	@10,500円	360,000円[*4]	
48	576,000円	@12,000円	432,000円	@9,000円	384,000円[*4]	@8,000円
56	616,000円	@11,000円	448,000円	@8,000円	392,000円[*4]	@7,000円
64	672,000円	@10,500円	480,000円	@7,500円	416,000円[*4]	@6,500円
72	720,000円	@10,000円	504,000円	@7,000円	432,000円[*4]	@6,000円
73〜	@10,000円		@7,000円		@6,000円[*4]	

*4 1stPCR用のプライマー送付料金 1,500円/依頼が別途かかります。

サンプル数が8の倍数でないときも、上記1サンプルあたりの単価で対応します。
例) 試料を18サンプル送る場合
16サンプルの場合の単価は@15,000円ですので、15,000円×18サンプル=270,000円(税別)となります。

(税別)

サンプル数	2ndPCR産物(精製後・混合不要)を送る
1〜32	受け入れ可能ですが、価格は「1stPCR産物を送る」と同じです。
33〜96	パッケージではなく、下記項目を足し合せた価格になります。 ・シーケンシング解析 300,000円/式 ・データ解析 500円/サンプル ・プライマー送付 10,000円/回

◆シーケンシング解析の条件
MiSeq または NextSeq1000を用いて2×300 bpの条件で解析します。
◆データ量
トータル300-400万リードペア程度です。
◆納期
12営業日(但し、他のお客様とのインデックスの重複がある場合、5営業日程度追加になります)
◆ご提供サンプルと送付方法
濃度と液量は、10 ng/ul以上、20 ul 以上でお願いします。精製済サンプルをプレート(または8連チューブ)に入れて冷蔵便or冷凍便で送付してください。

3. オプション料金表

(税別)

項目	価格
液体サンプルのフィルターろ過	4,000円/サンプル
PCR阻害物質の除去(カラム精製)	2,000円/サンプル
1stPCR 4反復	16,000円/8サンプル
ライブラリーのビーズ精製[*5]	5,000円/8サンプル ごめんね! 値上げ
残サンプルの返却 ※送料込	2,500円/回
EzBioCloud 16S database使用 ※細菌16Sのみ対応	10,000円/解析
群間比較解析 ※細菌16S/真菌ITS/18Sのみ対応	1比較目 30,000円 ※追加1比較ごと10,000円
多様性解析	10,000円/解析
└ 多様性解析の統計解析	20,000円/解析 ※複数領域のご注文時など2解析目以降は10,000円/解析
機能予測解析 ※細菌16Sのみ対応	30,000円/解析
└ 機能予測解析の統計解析 ※細菌16Sのみ対応	1比較目 30,000円 ※追加1比較ごと10,000円
機能予測解析と群間比較解析セット割引	各3割引
コピー数の取得[*6] リアルタイムPCR解析 1反復	・リアルタイムPCR解析 5,000円/サンプル ・検量線作成 20,000円(80サンプルごと)
コピー数の取得[*6] リアルタイムPCR解析 4反復	・リアルタイムPCR解析 8,000円/サンプル ・検量線作成 20,000円(20サンプルごと)
ネットワーク解析	50,000円/解析
生息環境の推測 ※細菌16Sのみ対応	20,000円/解析

*5 送付いただいたライブラリーが精製不足の場合、弊社で再精製を行います。
*6 アンプリコンシーケンス解析と同時にご依頼いただいた場合の価格です。
リアルタイムPCR解析と検量線作成の両方が必要です。

4. 対象遺伝子領域

ターゲット生物種	対象領域 ( ) はプライマーセット名
細菌と古細菌	16S rRNA V4:515F-806R
	16S rRNA V4 ver2:515F-806RB
細菌	16S rRNA V1/V2:27Fmod-338R
	16S rRNA V3/V4:341f-805r
真菌類	ITS1:ITS1F_KYO1 – ITS2_KYO2 (植物由来DNAは増幅しにくい)
	ITS2:gITS7 – ITS4 (真菌類を広くカバーしているが、植物由来DNAが増幅する)
	ITS2:fITS7 – ITS4 (gITSほど真菌類を広くカバーしていないが、植物由来DNAは増幅しにくい)
真核生物	18S rRNA:1422f-1642r
	18S rRNA ver2:V8f-1510r
動物	COI:IntF-HCOmR
魚類[*7]	12S rRNA(cMiFish)
哺乳類[*8]	12S rRNA(MiMammal)
節足動物[*9]	16S rRNA(gInsect)
鳥類[*9 *10]	16S rRNA(gBird)
二枚貝[*9]	18S rRNA(gClam)
巻貝[*9]	28S rRNA(gSnail)
有尾目(イモリ類とサンショウウオ類)[*9]	12S rRNA(gSalamander)
無尾目[*9]	16S rRNA(gFrog)
環形動物[*9]	16S rRNA(gWorm)
線虫[*9 *11]	18S rRNA(Ecdysozoa)
陸上植物[*9]	rbcL(gPlant)
光合成生物(主に単細胞生物)[*9]	psbA:psbA_597f-psbA_927r
褐藻[*9]	rbcL(gKasso)
紅藻[*9]	rbcL(gKoso)
カスタム	任意の領域 ※120 bp〜500 bp

*7 MiFish-UとMiFish-E、MiFish-U2、MiFish-Ayu&Wakasagiを混合したプライマーセットとなり、名称変更しました。
*8 弊社でのテスト解析の結果、脊椎動物全般が検出されています。
*9 自社で開発したプライマーでの解析です。
*10 鳥類は環境DNAへの移行が少なく、環境サンプルでは検出が困難な傾向にあります。
*11 植物由来DNAも増幅されます。

生物技研のアンプリコンシーケンス解析についてのギモン・シツモン

Q1.納品物の内容は?
ダウンロード形式で納品します。
<データ内容>
・報告書
・シーケンスデータ(fastq形式)
・データ解析結果
エクセルファイルと可視化データ、または
エクセルファイルのみ(遺伝子領域による)
・DDBJのデータベース登録に必要なデータ

納品デモデータは弊社HPからダウンロードできます

Q2.解析を依頼したい。まず何をすればよい?
まずは見積をご依頼ください。弊社HPに見積り依頼フォームがあります。すぐにチューブやプライマーが必要な方は、その旨もお知らせください。

Q3.残サンプルの返却は可能?
DNAの返却は、2,500円(送料込・税別)で対応しています。
弊社では、解析完了後3カ月経過すると、サンプルを処分しますので、返却希望の場合はお早目にご連絡ください。なお、試料やPCR産物の返却はできません。

Q4.推奨のDNA抽出キットは?
特に推奨はございませんが、DNA精製工程が含まれているキットをお使いください。精製されていないクルードサンプルを送付いただいた場合は、それに対応したPCR用酵素を用いる必要がございます。

Q5.データ解析のみを依頼できる?
可能です。他社で取得されたデータでも対応しています。
弊社に解析いただいたデータであれば、納品後1ヵ月以内は、上記料金で追加解析も対応しています。1ヵ月を過ぎると一部再解析手数料が発生します。

お問合せ・見積依頼・サンプル送付先
株式会社生物技研
〒252-0154 神奈川県相模原市緑区長竹657
tel: 042-780-8333 Email: dna@gikenbio.com

応用編

食性解析や植物病原菌の菌叢解析に!

DNA増幅阻害/選択的増幅技術を用いた解析

※価格は税別です

1.C3 spacer修飾を用いた食性解析

解析費用は安価ですが、宿主DNAを完全に抑制することが難しく、また種特異的なブロッキングも困難です。予備的な実験に向いています。

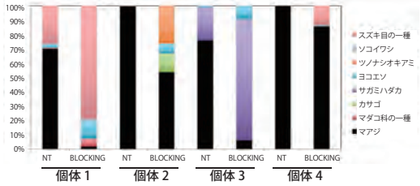
＜追加料金＞
C3 spacer修飾ブロッキングプライマー設計・合成費用
20,000円/生物種
※プライマーの設計・合成は5営業日程度かかります。

＜解析の具体例＞

アジの餌生物の推定(COI領域)

スーパーで購入したアジの内臓を用いて、食性解析を行いました。
右下に、検出された生物由来のリード数を棒グラフで示します。

ターゲット 動物全般
ブロック アジ



2.人工核酸 Locked Nucleic Acid (LNA) を用いた食性解析

解析費用は高価ですが、種特異的なブロッキングが可能です。

＜追加料金＞
LNAブロッキングプライマー設計・合成費用
60,000円/生物種
※プライマーの設計・合成は10営業日程度かかります。

3.ペプチド核酸 Peptide Nucleic Acid (PNA) を用いた細菌叢解析

解析費用は高価ですが、特異的なブロッキングが可能です。
弊社では、葉緑体とミトコンドリアの増幅を阻害するPNAを用いた解析に対応しています(16S rRNA V3/V4領域またはV4領域の解析でのみ可能です)。

＜追加料金＞
ライブラリー調製費用
15,000円/8サンプル

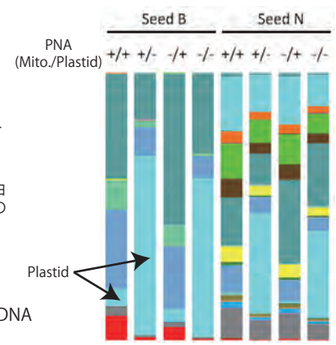
＜解析の具体例＞

種子の菌叢解析(16S rRNA V4領域)

牧草の種子を用いて、菌叢解析を行いました。

※本解析では、種子にミトコンドリア由来DNAが少なく、Anti-mitochondriaの効果は検証できていません。

ターゲット 細菌
ブロック ミトコンドリア由来DNA
葉緑体由来DNA



4.LNA を用いた植物内生細菌叢・植物内生糸状菌叢の解析

鹿児島大学農学部の池永先生・境先生が開発した、特許第5846496および特願2016-051621の遺伝子増幅方法を使用します。植物内生細菌選択的増幅プライマーは16S rRNA V3/V4領域またはV4領域の解析のみ、植物内糸状菌選択的増幅プライマーはgITS-ITS4の解析のみ可能です。

＜追加料金＞
ライブラリー調製費用
20,000円/8サンプル

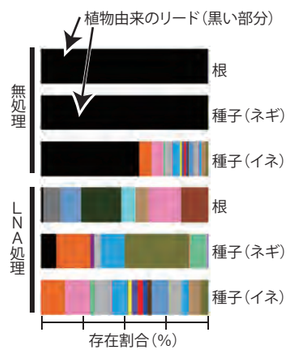
＜追加納期＞
5営業日

＜解析の具体例＞

植物サンプルの真菌叢解析(ITS領域)

ITS1からITS2領域をPCR法で増幅後、gITS7とITS4を用いてITS2領域のみを再度増幅して菌叢解析を行いました。

ターゲット 真菌
ブロック 植物由来DNA



illumina社シーケンサーを用いた

アンプリコンシーケンス解析

本解析の特徴

- 1サンプルでもご注文可能です。
- データ解析まで含まれたパッケージサービスです。
- 全ての工程を国内(自社内)で行うから、短納期です。
- 腸内細菌相や土壌細菌相などの微生物相だけでなく、あらゆる生物相に対応。プライマー配列のご指定も可能です。

中面に料金早見表があります

	試料を送る	抽出DNAを送る	1stPCR産物を送る 未精製でOK!
価格(税別)	**120,000円/8サンプル**	**96,000円/8サンプル**	**72,000円/8サンプル**
納期	**20営業日*1**	**15営業日*1**	**12営業日*1**
作業内容	DNA抽出～データ解析	DNAの濃度測定～データ解析	1stPCR産物の精製～データ解析
ご提供サンプルと送付方法	試料:弊社提供のチューブの半分程度 必ず弊社提供の粉砕用1.5 mlチューブをご使用ください。試料の種類(土壌、糞便など)と数をお知らせください。送料は弊社負担でお送りします。 ＜量の目安＞ 湿土壌　200-500 mg程度 マウス糞便　米粒大2-3粒 冷凍便で送付ください。	DNA:濃度0.5 ng/ul以上、液量20 ul以上 ※濃度は、蛍光法を用いた2本鎖DNAの定量結果を基準としています。260 nmの吸光度ベースで定量されている場合は、上記より高めの濃度(5 ng/ul以上)が望ましいです。 濃度を0.5 ng/ulに調製していただく必要はありません。また、基準濃度未満でも、受け入れています。	1stPCR産物(精製前):液量15 ul以上 アダプター配列付きのプライマーを弊社からご提供します(1,500円 ※送料込)。ご希望の遺伝子領域をお知らせください。 1stPCR産物(未精製)の濃度測定は不要です。できれば電気泳動を行い、目的の増幅産物が得られていることをご確認ください。
		サンプル数が多いときは、8連チューブやプレートで送付ください。 冷蔵便or冷凍便で送付ください(保存時と同じ温度帯がベストです)。	
シーケンシング条件	Illumina社 NextSeq 1000またはMiSeqを用いて、2x300 bpの条件でシーケンシングを行います(他のお客様と相乗り)。		
データ量	1サンプルあたり3～5万リードペア程度		
納品物	・報告書 ・シーケンス生データ(fastq形式) ・系統解析結果 ・DDBJのデータベース登録に必要なデータ ダウンロード形式での納品となります。 データ量が4 GBを超える場合は記録媒体での納品に変更させていただきます(目安は96サンプル超)。		
ご依頼の流れ	まずは、お見積りをご依頼ください。弊社HPにお見積り依頼フォームをご用意しています。		

*1　納期は初回のPCRで良好な増幅が確認された場合です。再調製が必要な場合は追加日数をいただきます。

他のシーケンサーを用いるアンプリコンシーケンス解析もあります

シーケンサー	illumina社 NextSeq1000・MiSeq(本チラシはこれ)	MGI社 DNBSEQ T7・G400(短いアンプリコンでリード数が多くほしい)	PacBio社 Revio・Sequel IIe(長いアンプリコンを解析したい)
取得リード数	3～5万リードペア	100万リードペア	3万リード
解析長	～500 bp	150～250 bp	～数 kb
解析費用(税別)	このチラシの通り	このチラシと同じ	40,000円~/サンプル*2
納期(DNA送付の場合)	15営業日	25営業日	30営業日

*2　プライマー合成費用が別途20,000円/プライマーセット(税別)かかる場合があります

株式会社 生物技研