

生物技研の RNA-seq解析・ メタトランスクリプトーム解析 についての ギモン・シツモン



Q1. 推奨のRNA抽出キットは？

特にございません。弊社ではQIAGEN社のRNeasyシリーズを使用することが多いです。

Q2. DNase処理は必要？

ゲノムDNAの混入は望ましくないので、DNase処理をお勧めします。

Q3. 送付の際のバッファは？

滅菌水のほか、Tris や TE、抽出キットの溶出バッファでも構いません。但し、塩濃度が高いバッファの場合、QCの電気泳動がうまくいかない可能性がありますので、避けてください。

Q4. RIN値の目安は？

バイオアナライザーのRIN値で7以上が目安です。送付前にお客様側でも品質確認される際は、参考にしてください。

Q5. 送付時の温度帯は？

- total RNA送付の場合
冷凍便を利用し、必ずドライアイスと同梱してください。
- 生サンプル送付(弊社にRNA抽出もご依頼)の場合
◇ RNAlaterなどの核酸保存液に浸しているサンプル
冷凍便を利用し、ドライアイスは同梱せずに送付してください(核酸保存液は-20℃以下で凍結してしまうため)。
◇ -80℃で保管していたサンプル
冷凍便を利用し、必ずドライアイスと同梱してください。

Q6. ウイルスの解析は可能？

下記の通り、ゲノムの形状により解析できるものとできないものがあります。また、①宿主由来のrRNAの混入があるか、②対象ウイルスのRNAにpolyAがあるかによって、ライブラリー調製方法が変わりますので、お見積り依頼時に①②の情報をお知らせください。

- 一本鎖DNA (ssDNA) : ×
- 二本鎖DNA (dsDNA) : ○
- 一本鎖RNA (ssRNA) : ○
- 二本鎖RNA (dsRNA) : ○ ※環状化dsRNAは×

Q7. 納品後にデータ解析を追加で依頼できる？

ご依頼いただけます。データの保管期限は納品後3か月です。それ以降はデータ送付をお願いする場合があります。

Q8. オプションのデータ解析は必要？

必要かどうかは目的によります。オプションを付けない標準のRNA-seq解析でも遺伝子の発現量やざっくりとした遺伝子発現の違いは明らかにできます。それが統計的に有意かどうか解析する場合には「発現比較解析」が必要になります。「発現比較解析」は発現量に有意差のある遺伝子(発現変動遺伝子)をリストアップするだけです。同定された発現変動遺伝子の代謝系における役割や機能的グループを明らかにしたい場合は、「エンリッチメント解析(パスウェイ解析& Gene Ontology (GO) 解析)」が必要になります。「パスウェイ解析」では発現変動遺伝子が代謝系のどの部分で変動しているのかが分かり、「GO解析」では発現変動遺伝子がどのような機能をもったグループが多いかが分かります(出現頻度の解析)。

miRNA-seq解析も受託可能です！

8サンプル以上～
60,000円/サンプル ※税別

※8サンプル未満の場合、サンプル数に限らず480,000円(税別)のご対応となります。

【納期】30営業日

【ご提供サンプル】トータルRNA1 ug以上 (>50 ng/ul, >20 ul)

【作業内容】

- ・送付サンプルの品質確認^(注3)
- ・ライブラリー調製 (MGIEasy Small RNA Library Prep Kit 使用)
- ・シーケンシング解析 (DNBSEQ-G400 50シングルエンド解析・3,000万リード保証)
- ・データ解析 (配列長の分布図作成・リードカウント・マッピング)

(注3) バイオアナライザーのRIN値で7.5以上、A260/280は1.8-2.0が目安です。送付前にお客様側でも品質確認される際は、参考にしてください。

RNA-seq解析 メタトランスクリプトーム解析

2024年9月 サービス UP!

取得データ量が増加!! 一部値下げ!

RNAseq解析: 1,000万または2,000万リード→4,000万リード
メタトランスクリプトーム解析: 3,000万リード→4,000万リード
原核生物のrRNA除去: 20,000円→10,000円

| 解析内容・対象 | RNA-seq解析 | | | メタトランスクリプトーム解析 |
|---------|---|--------------------------|-------------------|---|
| | 真核生物 (S. cerevisiaeを除く) | Saccharomyces cerevisiae | 原核生物 | |
| 価格(税別) | 40,000円/サンプル | 60,000円/サンプル | 値下げ! 50,000円/サンプル | 50,000円/サンプル |
| 納期 | 25 営業日 ※データ解析不要(生データ納品)の場合は20営業日 | | | 20 営業日 |
| データ量 | データ量 UP! 4,000万リード/6 Gb | | | データ量 UP! 4,000万リード/6 Gb |
| 作業内容 | <p>送付サンプル(トータルRNA)の品質確認^(注1)</p> <p>オリゴdTでmRNAを精製します</p> <p>各対象生物用のキットを用いてrRNAを除去します</p> <p>ランダムプライマーでcDNA合成後、シーケンスライブラリー作製</p> <p>シーケンシング解析 (DNBSEQ 150 bpペアエンド解析)</p> <p>データ解析^(注2)</p> <p>Bowtie2/STARソフトウェアを用いて参照配列にマッピングいたします。その後、featureCountsを用いてカウントを行った後、TPM正規化を行います。 ※StringTieを用いた解析も対応可能です。</p> | | | |
| 納品物 | <p>以下をUSB等の記録媒体に保存して納品します。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・報告書 ・シーケンス生データ (fastq形式) ・DDBJのデータベース登録に必要なデータ ・マッピング (bam形式) とカウント結果 (エクセルファイル) ・参照配列 (fasta形式) と遺伝子アノテーション (gff形式) <p>※データ量が多い場合は外付けHDD納品となり、HDD代として別途20,000円(税別)がかかります。お手持ちのHDDを送付いただき、そちらに保存して納品することも可能です。 <HDD納品となる目安>生データ納品の場合は40 サンプル、データ解析ありの場合は20 サンプル</p> | | | <p>※生データ出荷です。データ解析はオプションです(中面をご覧ください)。</p> <p>以下をUSB等の記録媒体に保存して納品します。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・報告書 ・シーケンス生データ (fastq形式) ・DDBJのデータベース登録に必要なデータ |
| ご提供サンプル | トータルRNA1 ug以上 (>50 ng/ul, >20 ul) ※ドライアイスを同梱し、冷凍便を使用して送付ください。 RNA濃度が基準値未満の場合は「微量RNA対応」のオプションをご覧ください。 | | | |
| 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。 | | | |

(注1)rRNAの分解が進んでおり、シーケンシング解析を行ってもデータが得られないと判断した場合は、中止させていただきます(この場合のご請求は行いません)。
(注2)参照配列がない生物種は、De novo transcriptome assembly解析(オプション/中面参照)を行って発現遺伝子カタログを作成し、それを参照配列の代わりとしてマッピングに用います。De novo transcriptome assembly解析を実施しない場合は、生データでの納品となります。また、ヒト・マウス・ラット・イヌ・ニワトリ・アナウサギの場合は、リードカウントと正規化の代わりに、融合遺伝子の検出を行うことも可能です(リードカウントと正規化も行う場合は、10,000円(税別)がかかります)。

RNA抽出&rRNA除去 オプション

| 項目 | 備考 | 価格(税別) | 追加納期 | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|---|--------------|--------------------------------------|----|--------------------------------------|-------|---------------------|------|--------------------------------------|------|-------------|--------------|------|
| RNA抽出(土壌・汚泥以外) | <p>QIAGEN社のRNeasy等を使用して、トータルRNAを抽出します。</p> <p>▼ご提供サンプル量の目安</p> <table border="1"> <tr> <td>細菌</td> <td>細胞数 1×10⁹程度、湿重量 20 mg程度</td> </tr> <tr> <td>酵母</td> <td>細胞数 5×10⁷程度、湿重量 25 mg程度</td> </tr> <tr> <td>植物(葉)</td> <td>湿重量 50 mg程度、直径1.5cm</td> </tr> <tr> <td>動物細胞</td> <td>細胞数 1×10⁷程度、湿重量 20 mg程度</td> </tr> <tr> <td>動物組織</td> <td>湿重量 20 mg程度</td> </tr> </table> <p>▼サンプルの保管温度と送付方法</p> <p>◇RNAlaterなどの核酸保存液に浸す場合 採取後すぐにサンプルに核酸保存液を添加します。 一晩は冷蔵保管(4℃)し、翌日に冷凍(-20℃)保管にします。 送付時は、冷凍便を利用し、ドライアイスは同梱せずに送付してください(RNAlaterは-20℃以下で凍結してしまうため)。</p> <p>◇核酸保存液を添加しない場合 採取後すぐにサンプルを-80℃保管します。 送付時は、冷凍便を利用し、必ずドライアイスを同梱してください。</p> | 細菌 | 細胞数 1×10 ⁹ 程度、湿重量 20 mg程度 | 酵母 | 細胞数 5×10 ⁷ 程度、湿重量 25 mg程度 | 植物(葉) | 湿重量 50 mg程度、直径1.5cm | 動物細胞 | 細胞数 1×10 ⁷ 程度、湿重量 20 mg程度 | 動物組織 | 湿重量 20 mg程度 | 20,000円/サンプル | 5営業日 |
| 細菌 | 細胞数 1×10 ⁹ 程度、湿重量 20 mg程度 | | | | | | | | | | | | |
| 酵母 | 細胞数 5×10 ⁷ 程度、湿重量 25 mg程度 | | | | | | | | | | | | |
| 植物(葉) | 湿重量 50 mg程度、直径1.5cm | | | | | | | | | | | | |
| 動物細胞 | 細胞数 1×10 ⁷ 程度、湿重量 20 mg程度 | | | | | | | | | | | | |
| 動物組織 | 湿重量 20 mg程度 | | | | | | | | | | | | |
| RNA抽出(土壌・汚泥) | <p>RNeasy Powersoil TotalRNA kitを使用して、トータルRNAを抽出したのち、DNase処理を行います。</p> <p>サンプル量の目安: 土壌 湿重量 1~2g サンプルの保管温度と送付方法: 上記と同じ</p> | 24,000円/サンプル | 7営業日 | | | | | | | | | | |
| rRNA除去(原核生物対象) | Vazyme社のRibo-off rRNA Deletion Kit 等を使用して、rRNAを除去します。 | 10,000円/サンプル | なし | | | | | | | | | | |
| rRNA除去(<i>S. cerevisiae</i> 対象) | siTOOL社のriboPOOL等を使用して、rRNAを除去します。 | 20,000円/サンプル | なし | | | | | | | | | | |
| 微量RNA対応(真核生物のみ可) | <p>微量RNA (>1 ng/ul, >20 ul) に対して、ライブラリー調製を行います。</p> <p>劣化したRNAではライブラリー調製ができません。</p> <p>また、微量RNA対応は通常のライブラリー調製方法と異なるため、複数サンプルをご依頼いただく際は、どちらかの調製方法に統一することを強く推奨します(統一しないと、サンプル間の結果の比較ができなくなります)。</p> | 20,000円/サンプル | 5営業日 | | | | | | | | | | |

データ解析オプション(RNA-seq解析)

2024年9月
目的別に
パッケージ化
しました

| 項目 | 備考 | 価格(税別) | 追加納期 |
|--------------------------------|--|-------------------------------------|------|
| 発現プロファイルの類似性 | 発現比較解析前に各サンプルの遺伝子プロファイルの類似性をいくつかの手法で可視化し、反復内や反復間で遺伝子発現の差を確認します。(主成分分析、相関分析、階層的クラスターリング) | 30,000円 ※3サンプル以上で解析可 | なし |
| 発現比較解析 | 統計解析によって発現量が有意に異なる遺伝子群を特定した後、それをMA plotやVolcano plot、ヒートマップで描写します。 | 1比較目 30,000円 追加1比較ごと +10,000円 | |
| エンリッチメント解析 | 発現変動した遺伝子群が、どのような機能をもつのか体系的に分類し、有意差検定を行います。また、KEGGの代謝マップ上に可視化するための情報を納品します。(Gene Ontology(GO)解析、パスウェイ解析、KEGG pathway classification chart) | 1比較目 50,000円 追加1比較ごと +10,000円 | |
| De novo transcriptome assembly | 参照配列がない非モデル生物の遺伝子カタログ配列を、Trinityで構築します。 | 100,000円/生物種 | |

例) 比較数の数え方

sample1 A群
sample2 A群
sample3 B群
sample4 B群
sample5 C群
sample6 C群

A群 vs B群, A群 vs C群 で比較したい ⇒ 2比較
A群 vs B群, A群 vs C群, B群 vs C群 で比較したい ⇒ 3比較

3群間比較(A群 vs B群 vs C群)も可能ですが、発現比較の発現平均値(A値)と発現比(M値)が算出されないため、MAプロットとVolcanoの図の納品はなく、エクセルデータのための納品となります。



データ解析オプション(メタトランスクリプトーム解析)

| 項目 | 備考 | 価格(税別) | 追加納期 |
|------------------------|--|--|---|
| 特定生物由来のリードの除去 | <p>取得したリードから特定の生物のリードを除去します。</p> <p>例1) ヒト糞便サンプルから腸内細菌を解析する場合に、大量に含まれているヒト由来のリードを除去する</p> <p>例2) 植物サンプルから共生細菌を解析する場合に、大量に含まれている植物由来のリードを除去する</p> | 8サンプルまで一律 50,000円 9サンプル以上の場合、 1サンプルあたり +6,250円 | 8サンプルまで 2営業日 9-20サンプル #:3営業日 21-40サンプル #:5営業日 41サンプル #:要相談 |
| アセンブル・マッピング | Trinity によるアセンブルを行い、Contigを提供します。同時に、各配列にマップされたリード数を提供します(下記参照)。 | 8サンプルまで一律 100,000円 9サンプル以上の場合、 1サンプルあたり +12,500円 | 8サンプルまで 10営業日 9-20サンプル #:15営業日 21-40サンプル #:20営業日 41サンプル #:要相談 |
| アセンブル・マッピング・遺伝子予測・機能解析 | アセンブルによって得られたドラフト配列に対して、prokka(ソフトウェア)によるオートアノテーションを行います。KEGG解析を用いて、予測されたタンパク質の機能的分類を行います(下記参照)。 | 8サンプルまで一律 200,000円 9サンプル以上の場合、 1サンプルあたり +25,000円 | 8サンプルまで 20営業日 9-20サンプル #:30営業日 21-40サンプル #:40営業日 41サンプル #:要相談 |

アセンブル・マッピング・遺伝子予測・機能解析のご説明

