ロングリードシーケンサー

PacBio® Revio/Sequel IIe を用いた遺伝子解析

HiFiリードを用いた ロングアンプリコン解析

種レベルで細菌叢解析したい！

1 kbp ～ 数 kbp の アンプリコンを解析したい！

プラン	説明	取得リード数	初期費用（税別）	解析費用（税別）	納期
16S rRNA V1-V9 **（原核生物が対象）** ※Strain IDプランとComplete V1-V9プランは終了しました（ライブラリー調製キットが販売終了のため）。	16S rRNAのV1-V9領域（約1,500 bp）を解析します。	30,000 リード程度	**なし**	1~7サンプルご依頼の場合 **40,000円/サンプル** 8~23サンプルご依頼の場合 **35,000円/サンプル** 24サンプル以上ご依頼の場合 **30,000円/サンプル**	30営業日
カスタムロングアンプリコン	多様な配列の解析を目的とし、任意の領域（1 kbp～数 kbpまで）を解析したい場合に適しています。	30,000 リード程度	**●プライマー合成 *3** **20,000円/プライマー** **●PCR 条件検討 *4** **100,000円/プライマー**	1~7サンプルご依頼の場合 **70,000円/サンプル** 8~23サンプルご依頼の場合 **60,000円/サンプル** 24サンプル以上ご依頼の場合 **50,000円/サンプル**	プライマー合成完了後、PCR 条件検討 20営業日 ＋ 解析 30営業日

*3　5′末端に Amino Modifier C6 修飾プライマーを合成する必要があるため、プライマー合成費用が初期費用としてかかります。プライマー配列をご指定ください。プライマー設計からのご相談も承っています。
*4　ご指定のプライマー（NGS 用のタグは付加されていないプライマーで OK）で対象領域が増幅できることを確認済であり、PCR 反応条件の情報を提供いただける場合、PCR 条件検討費用は不要です。詳しくは裏面をご覧ください。

作業内容

- 送付DNAの品質確認（蛍光法による2本鎖DNAの定量と電気泳動による断片長の確認）
- シーケンスライブラリー作製（PCR法でライブラリーを作製）
- シーケンシング解析（PacBio Revio または Sequel IIe を用いてHiFiリードを取得）
- データ解析（系統解析）

系統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	MIrROR
その他（virus等含む）	NCBI

データ解析は以下に変更可能です。

- **データ解析不要（-500円/サンプル）**
- **カスタム多型解析（0円）**：各配列のリード数をエクセル形式で納品します。
- **変異点解析（10,000円/各参照配列）**：参照配列に対する変異箇所を同定し、得られた変異点をサンプル間で比較します。

ご提供サンプル

抽出 DNA（濃度 1 ng/ul 以上 で液量 20 ul 以上、かつ 対象領域の長さ以上の DNA 断片が確認できていること）

カスタムロングアンプリコンをご依頼の方
PCR 条件をご提供いただく場合・・・その PCR 条件で 2-3 回調製可能な DNA 量を送付ください。
PCR 条件検討をご依頼いただく場合・・多めに（可能であれば濃度 5 ng/ul 以上 で液量 40 ul 以上）ご送付ください。

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。

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。

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　FAX 042-780-8334
＜見積り依頼・お問合せ＞ dna@gikenbio.com

オプション（DNA抽出&データ解析）

項目	備考	価格（税別）	追加納期
DNA抽出	試料を送付いただき、弊社で DNA 抽出を行います。 ご提供いただくサンプル量の目安は、湿土壌の場合 200-500 mg 程度、マウス糞便の場合 米粒 2-3 粒程度です。	1~2サンプル 10,000円/サンプル 3~7サンプル　※サンプル数に限らず一律価格 24,000円/式 8サンプル~ 3,000円/サンプル	5営業日
群間比較解析 ※細菌16Sと真菌ITS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。	30,000円/解析 ※グループ分けのパターンが複数ある場合は追加1パターンごと10,000円	なし
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。	10,000円/解析	なし
┗ 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。	20,000円/解析	なし
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分けをご指示いただくことで、グループ単位での比較が可能です。	30,000円/解析	なし
┗ 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。	30,000円/解析 ※グループ分けのパターンが複数ある場合は追加1パターンごと10,000円	なし

生物技研のロングアンプリコン解析についてのギモン・シツモン

Q1. PCR条件検討を自分で行う場合、注意すべきことはある?

A1. 平滑末端となるPCR酵素を使用してください。

PacBioでは平滑末端のPCR産物のみシーケンシング解析が可能です。
そのため、PCR条件検討の際も、平滑末端となるPCR酵素を使用してください。

＜平滑末端となるPCR酵素の例＞

- KAPA HiFi HS ReadyMix [日本ジェネティクス]
- TaKaRa Ex Premier DNA Polymerase [TaKaRa]
- KOD FX Neo [TOYOBO]
- Q5 High-Fidelity DNA Polymerase [NEB]
- Phusion Hot Start II DNA Polymerase [Thermo Fisher Scientific]

※Taqポリメラーゼは、不適です。

Taq は増幅しやすいけど、
PacBio の解析では、
ダメなんか…

Q2. PCR条件検討で増幅が確認できました。何を伝えればよい?

A2. 反応条件・反応組成・使用酵素をご連絡ください。

Q3. 1 kbp未満のアンプリコンは解析依頼できない?

A3. サンプル数やシーケンシング解析の相乗りサンプルによりますので、ご相談ください。

シーケンシング解析時、短いリードほど多く読まれます。例えば、600 bpのアンプリコンと3 kbpのアンプリコンを相乗りでシーケンシング解析すると、データ出力に極端なバラツキが出てしまいます。そのため、通常受け入れ可能なアンプリコンサイズとして1 kbp以上を目安とさせていただいております。
1 kbp未満のアンプリコンでも、同程度の長さでサンプル数が集まれば、シーケンシング可能ですので、ご相談ください。