

トランスクリプトームの全長解析 Iso-seq解析

対象生物	真核生物のみ cDNA 合成に oligo dT を用いているので、polyA を持たない生物はライブラリー調製できず解析不可となります。		
価格(税別)とデータ量	100 万リード 200 万リード 500 万リード程度 (1 セル占有)※5	420,000 円/サンプル 525,000 円/サンプル 800,000 円/セル	2024.09 相乗りプラン 登場 取得データ量は全遺伝子数の 20-50 倍が目安です。
納期	30営業日 ※3 セル以上の場合には要相談		
作業内容	<ul style="list-style-type: none"> 送付サンプル(トータルRNA)の品質確認 オリゴdTプライマーでcDNA合成 シーケンスライブラリー作製 シーケンシング解析(PacBio Revio Iso-seq解析) データ解析 リードの振り分けおよびIndex配列の除去を行った後、完全長リードのノイズを除去します。Iso-Seq3を用いて、フィルタリングした完全長リードをクラスターリングします。その後、参照配列がある場合は、pbmm2を用いてクラスターリングしたhq.fastaを参照配列にマッピングを行います。Iso-Seq3を用いて、固有のアイソフォームに分類します。参照gtfもある場合は、SQANTI3を用いて、統合したアイソフォームをアノテーションします。 		
ご提供サンプル	トータル RNA 1 ug 以上 /1 セル (>50 ng/ul, >20 ul) ※RNase-free water に溶解した状態で冷凍便を使用して送付ください。		
納品物	以下のデータをDVDやUSB等の記録媒体に保存して納品します。 <ul style="list-style-type: none"> シーケンス生データ (fastq & bam形式) クラスターリングの結果 (エクセルファイルとfasta形式) DDBJのデータベース登録に必要なデータ → 参照配列がなければ納品物はこの3点のみです <ul style="list-style-type: none"> 固有のアイソフォームの分類データ(gff形式など) Mappingの結果(bam形式) 参照配列 (fasta&fasta.fai形式) → 参照配列があるが、参照gtfがなければ、上記3点に加え、この3点も納品します <ul style="list-style-type: none"> Annotation結果 (エクセルファイル) 参照遺伝子アノテーション (gtf形式) → 参照配列とgtfともがあれば、上記6点に加え、この2点も納品します		
ご依頼の流れ	まずは弊社HPのお問合せフォームからお見積りをご依頼ください。		

※5 サンプルに依存するため、データ量の保証はできません。また、1 サンプル分のライブラリー調製費用は上記に含まれています。複数サンプルご依頼の場合は、2 サンプル目以降からライブラリー調製費用 100,000 円 / サンプルが別途必要です。

オプション(RNA抽出&データ解析)

項目	備考	価格(税別)	追加納期
RNA抽出	QIAGEN社のRNeasy等を使用して、トータルRNAを抽出します。 ▼ご提供サンプル量の目安 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 ▼保管温度 ◇核酸保存液を添加する場合 核酸保存液を添加した後、一晩は冷蔵保管(4℃)し、翌日に冷凍保管(-20℃)。 ◇核酸保存液を添加しない場合 採取後すぐに-80℃保管。	20,000円/サンプル	5営業日
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	比較数の数え方 例えば、A群・B群・C群があり、A群 VS B群とA群 VS C群の発現比較解析をする場合は2比較、総当たりで行う場合は3比較となります。
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)	1比較目 50,000円 追加1比較ごと +10,000円	

ロングリードシーケンサーを用いた遺伝子解析のハードルを下げます！



これまでは、コスト的にも、DNA 量的にも高い壁を越えなければならなかった。

もっと気軽にロングリードの解析を！
ショートリードでは見えなかった世界が見えてくる。

- 生物技研の解析サービス
- ゲノム解析 → 本チラシ
 - Iso-seq 解析 → 本チラシ裏面
 - ロングアンズリコン解析 → 別チラシ
 - メチル化解析 → ホームページ

コストを大幅ダウン

2023 年登場の最新機種 Revio を早速導入しました。Revio はランニングコストを抑えられるため、解析費用を下げることが可能になりました！

ゲノム解析に必要な DNA 量が 4 μg から 200 ng に！

PCR を行う微量 DNA 用のライブラリー調製方法が、生物技研のゲノム解析の標準になりました(2023 年 9 月より)。それまで微量 DNA 対応は有償のオプションでしたので、原核生物で 40,000 円、真核生物 50,000 円の追加費用が不要となり、実質的な大幅値下げです。もちろん、PCR フリーの対応も可能です(追加料金不要、減額もありません)。

PacBio® Revio / Sequel IIe ゲノム解析の新価格

微量 DNA 用の
ライブラリー調製
(PCRあり)が標準です！

解析対象の目安 or プラン	取得データ量	価格(税別)	納期	納品形態	
原核生物	ゲノムサイズ 10 Mb 以下	200 Mb	1~3 サンプル ご依頼の場合 120,000 円 / サンプル	原核生物の ゲノム解析のみ アセンブルまで 含まれます※1	ダウンロード (4GB を超える 場合は記録媒体 に変更となります)
	ゲノムサイズ 50 Mb 以下	1 Gb	4~7 サンプル ご依頼の場合 110,000 円 / サンプル		
	ゲノムサイズ 100 Mb 以下	2 Gb	8 サンプル以上 ご依頼の場合 100,000 円 / サンプル		
真核生物	ゲノムサイズ 100 Mb 以下	2 Gb	35 営業日	記録媒体	
	ゲノムサイズ 100-300 Mb	6 Gb			375,000 円 / サンプル
	ゲノムサイズ 300 Mb-1Gb	20 Gb			525,000 円 / サンプル
1 セル占有プラン※2	50 Gb 程度※3	800,000 円 / セル	2セルまで 35 営業日		

※1 取得データ量 1 Gb 以上でも適用されます。

※2 取得データ量は、ゲノムサイズの 20 倍が目安です。ゲノムサイズに応じて複数セルでのシーケンシング解析が必要になります。

※3 サンプルに依存するため、データ保証はできません。

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

HiFiリードを用いた ゲノム解析

ショートリードを用いた従来法に比べ、コンティグの数は圧倒的に少なく、ギャップが生まれにくい。そのため、完全長ゲノム DNA を目指す場合に非常に有効な手段です。原核生物の場合、ほぼ環状化できています。

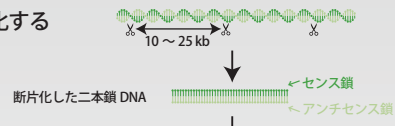
作業内容	<ul style="list-style-type: none"> 送付DNAの品質確認 (蛍光法による2本鎖DNAの定量・吸光度によるDNAの定量・純度測定・電気泳動) シーケンスライブラリー作製 (Ultra-Lowのマニュアルに従いPCR増幅してライブラリー作製) シーケンシング解析 (PacBio Revioまたは Sequel IIe を用いてHiFiリードを取得) アセンブル (オートアノテーション含む) ※原核生物のゲノム解析の場合のみ <p>PCR フリーのライブラリー調製も可能です。お見積り依頼時にその旨お知らせください。</p>
納品物	<ul style="list-style-type: 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 アセンブルおよびオートアノテーションデータ ※原核生物のゲノム解析の場合のみ <p>納品形態はダウンロードまたは記録媒体です。表紙の表をご参照ください。</p>
ご提供サンプル	<p>1. DNA量 濃度 5 ng/ul 以上、総量 200 ng 以上</p> <p>PCR フリーのライブラリー調製をご希望の場合は、濃度 50 ng/ul 以上、総量 4 ug 以上</p> <p>※複数セル占有でご依頼の場合は、1セルごとに上記の DNA 量が必要です。</p> <p>2. DNAの品質 受け入れ後の電気泳動装置 (Fragment Analyzer) を用いた品質確認で以下すべてを満たすこと</p> <ul style="list-style-type: none"> GQN が 5 以上 平均長 15 kb 以上 低分子が見られないこと <p><お客様で事前に確認する場合> A260/230 は 2.0 以上、A260/280 は 1.8 以上であること。また、電気泳動で 20 kb 以上にバンドが見えていることが望ましいです。</p> <p>3.バッファー ヌクレアーゼ活性を抑えて DNA 分解を抑えられる TE buffer がお勧めです。TE buffer 以外を使用される場合は、吸光度による純度測定の際のブランク用に溶出バッファー 100 ul 程度をサンプルと一緒に送付ください。</p> <p>4.送付方法 保管時と同じ温度帯 (冷蔵または冷凍) でお送りください。また、輸送中の大きな揺れによる物理的なせん断を避けるために、梱包の際はサンプルチューブを緩衝材で包んで送付ください。</p> <p>長いリードを得るためには断片化されていないDNAが必要ってことらしい</p>
ご提供情報	まずはお見積りを依頼ください。弊社HPにお見積り依頼フォームをご用意しています。



PacBioのゲノム解析はショートリードでの解析とどう違う？

ライブラリー調製とシーケンシング解析の流れ

① DNA を 10 ~ 25 kb に断片化する



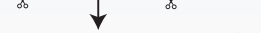
② アダプターを付加する



③ 環状構造になった SMRTbell の DNA 配列をシーケンシングで複数回読む



④ サブリード間のコンセンサスをとる



⑤ 平均品質値が 20 以上のリードを HiFi リードとする



Point! 01 長い!

最終的に 10-25 kb のリードが得られます。ショートリードシーケンサーの場合の解析長は最長 500 bp 程度なので、桁違いに長い!

Point! 02 リードの精度がよい! イルミナ社のショートリード以上

繰り返し読んだ配列を比較・補正して出力される HiFi リードの精度が高い。イルミナ社のショートリード以上の精度なので、ロングリードのみでアセンブルが可能! リードが長くて精度がよいから、驚くほど短時間でアセンブルが完了します。

HiFi は High Fidelity (高忠実度、高再現性) の略語だって



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 (ロングリード用)	Genomic-tip (QIAGEN) 等の長鎖 DNA 用抽出キットを用いて、DNA 抽出を行います。 ●菌体の場合 ご提供いただくサンプル量の目安は、細胞数 5×10^9 以上、湿重量 100 mg 以上です。ただし、菌種によっては DNA 抽出効率が悪いものもありますので、多めに送付していただくのがよいです。また、死菌が増えてくると DNA が断片化されてしまいますので、死菌の少ない対数増殖期に集菌をお願いします。菌体ペレットを -80°C 保管後、ドライアイスと同梱して、冷凍便でお送りください。 ●菌体以外の場合 菌体と同様、多めに送付ください。採取後速やかに -80°C 保管後、ドライアイスと同梱して、冷凍便でお送り下さい。	30,000円/サンプル	5営業日	
原核生物のゲノム解析	マニュアルアノテーション	オートアノテーションから得られた予測遺伝子をKEGGやGOデータベースに登録されている配列と比較することで、得られた予測遺伝子にKEGG_IDやGO_IDを対応させます。	70,000円/サンプル	5営業日
	アノテーション解析 (二次代謝)	antiSMASHを使ってゲノム配列から二次代謝系遺伝子のアノテーションを行います。	10,000円/サンプル	なし
	アノテーション解析 (抗生物質耐性)	AMRFinderPlusとResFinderを使ってゲノム配列から抗生物質耐性遺伝子のアノテーションを行います。	10,000円/サンプル	なし
	ANI ^{*4} (Average nucleotide identity)	アセンブル後の配列同士をアライメントし、類似度を計算します。比較する菌株が同種であるか確認するのに有効な解析です。	10,000円/解析	なし
wgMLST ^{*4} (Whole genome multilocus sequence typing)	アセンブル後の配列を使って、ゲノムワイドに遺伝子型の判定をします。	10サンプルまで一律 40,000円 11サンプル以上の場合、+2,000円/サンプル	5営業日	
真核生物のゲノム解析	アセンブル	対象生物が真菌はIPA、それ以外の真核生物はHiFiasmlによるアセンブルを行います。その後、BUSCOを使ってeukaryotaをモデルにアセンブルされたゲノムデータの完全性を確認します。	30,000円/サンプル	5営業日
	AUGUSTUSを用いた遺伝子予測	アセンブル配列から遺伝子領域を予測し、アノテーションを行います。	20,000円/サンプル ※別途アセンブル費用が必要	5営業日
	RNA-seqを用いた遺伝子予測	サンプル送付時にトータルRNAも送付いただく必要があります。	40,000円/サンプル	5営業日
SNP/InDel解析	SNPsと短いInDelを検出する解析です。DeepVariantを用いて検出された変異部位をvcf形式で納品します。gff形式(遺伝子位置情報)がある場合は、snpEffを用いて、vcfに対してアノテーションした結果も納品します。	20,000円/サンプル	5営業日 ※総取得データ量が15Gb超の場合は、15Gbあたり+5営業日	
構造変異 (Structural variant) 解析	挿入や欠失、逆位、重複、転座を検出する解析です。pbsvを用いて構造多型を検出したvcf形式で納品します。	20,000円/サンプル		
2024.05 New! ヒトタンデムリピート解析	HiFiリードとタンデムリピートジェノタイピングツール (TRGT) を用い、vcfとその情報をまとめた表を納品します。 *現在、ヒトゲノムの参照配列hg38のみ対応で、Y染色体の同定には対応していません。ご依頼する際にサンプルの性別情報をご提供ください (標準は女性として解析を行います)。	20,000円/サンプル	5営業日	
ショットガンメタゲノム解析	特定生物由来のリードの除去	取得したリードから特定の生物のリードを除去します。 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 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	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: 5営業日 21-40サンプル #5: 5営業日 41サンプル #~: 要相談
	アセンブル・MAGの構築	metaMDBGによるアセンブルとポリッシングを行い、Pacbio社が開発したHiFi-MAG-Pipelineを用いて、MAG (Metagenome Assembled Genome) を構築します。	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: 5営業日 21-40サンプル #20: 5営業日 41サンプル #~: 要相談
	アセンブル・MAGの構築・遺伝子予測・機能解析	構築されたMAGに対して、prokka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。	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: 5営業日 21-40サンプル #40: 5営業日 41サンプル #~: 要相談
	KEGG pathway classification chart	各サンプルに対して、分類されたKEGGカテゴリーに関連する遺伝子の割合を可視化します。また、機能pathwayの視点でサンプル間の違いを比較することができます。	10,000円	なし

※4 データベースに登録されているゲノム配列を含めて解析することが可能です。ご希望の場合は、配列のURLをお送りください。ANIは最大10配列までご指定可能です。wgMLSTはご指定配列数がサンプル数としてカウントされます。