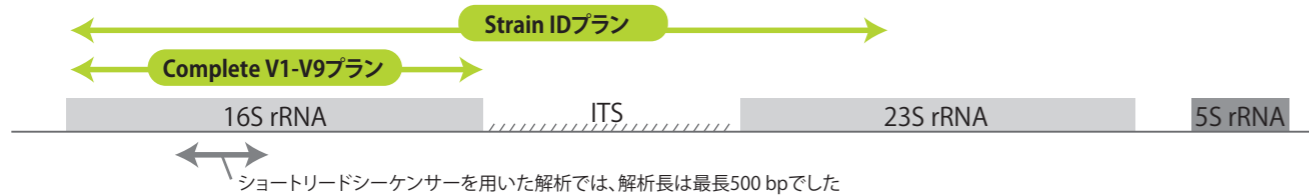


# HiFiリードを用いた細菌叢解析

ショートリードを用いた従来法では、属レベルの細菌叢解析が限界でした。一方、PacBio Sequel IIe の HiFi リードを用いると、種レベルや株レベルの細菌叢解析が可能です。

プラン	解析領域	取得リード数	価格 (税別)	納期
Strain ID	16S rRNA+ITS+23S rRNAの約2,500 bpを解析します。	30,000リード程度	70,000円/サンプル	30営業日
Complete V1-V9	16S rRNAのほぼ全長(約1,500 bp)を解析します。			



## ? 全部「Strain IDプラン」で解析したらいいのでは?

「Strain IDプラン」は、変異が大きいITSも解析対象となるので、株レベルでの識別が可能です。但し、16S rRNAと23S rRNAがリンクしていない(1,500 bp以上離れている)バクテリアは解析できません。環境サンプルでは、10-40%程度の種が解析できない可能性があり、「Complete V1-V9プラン」のほうが網羅的に解析できます。ヒトのマイクロバイオームは「Strain IDプラン」での解析で問題ありません。

作業内容	<ul style="list-style-type: none"> <li>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を行います</li> <li>シーケンスライブラリー作製 Shoreline Complete StrainID Kit または Shoreline Complete V1-V9 Kit (Shoreline Biome) を用います</li> <li>シーケンシング解析 PacBio Sequel IIe を用いてHiFiリードを取得します</li> <li>系統解析 SBAnalyzerを用いて、Athenaデータベースを使用して系統推定します</li> </ul>
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"> <li>報告書</li> <li>シーケンス生データ (fastq形式)</li> <li>系統解析結果</li> <li>DDBJのデータベース登録に必要なデータ</li> </ul>
ご提供情報	<ul style="list-style-type: none"> <li>サンプル情報提供用紙</li> <li>オーダーシート</li> </ul> お見積時にこれらのファイルをメール添付でお送りしますので、ご記入の上、サンプル送付時に送信ください。
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 2.5 kb 以上の DNA 断片が確認できていること

## 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。	10,000円/サンプル	5営業日
群間比較解析	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。	50,000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20,000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(PCA)を行います。	10,000円/解析	なし

# 生物技研がついに PacBio® Sequel IIe の 受託解析サービスを開始



原核生物の場合  
HiFi リードを用いたゲノム解析 **14万円/サンプル**  
(アSEMBル込み)  
納期: 30 営業日

HiFi リードを用いた細菌叢解析 **7万円/サンプル**  
納期: 30 営業日

HiFi リードは、長くて(10-15 kb)、美しい(精度が99%以上)!!

## 完全長ゲノム DNA の決定や株レベルの細菌叢解析ができる!



わくわくMAX

### PacBio Sequel IIe のライブラリー調製とシーケンシング解析の流れ

- DNA を 10 ~ 20 kb に断片化する
  - アダプターをライゲーションし、環状構造の SMRTbell ライブラリーを作製する
  - SMRTbell ライブラリーをシーケンシング解析する
  - CCS (circular consensus sequencing) モードで HiFi リードを作成する
- Point! 01 ショートリードシーケンサーの場合の解析長は最大 500 bp 程度なので、桁違いに長い!
- Point! 02 PCR 増幅しないから、増幅時のエラーや GC バイアスの影響を受けない。
- Point! 03 ここが最大のポイント! 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SEMBル可能!
- 得られたリードからアダプター配列を取り除き、サブリードを形成する  
そのサブリードをアライメントしたコンセンサス配列 (CCS) を作成した後、Q20 以下の CCS リードを除去し、HiFi リードとする
- HiFi リード >99% Accuracy (>Q20)

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



# 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です。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。

原核生物のゲノム解析のみアセンブルまで含まれます

解析対象の目安		取得データ量	価格 (税別)	納期
原核生物	ゲノムサイズ 10 Mb 以下	200 Mb	140,000円/サンプル	30 営業日
真核生物	ゲノムサイズ 100 Mb 以下	2 Gb	300,000円/サンプル	
	ゲノムサイズ 100-300 Mb	6 Gb	500,000円/サンプル	
	ゲノムサイズ 300 Mb 以上	要相談※1	700,000円/フローセル※1	要相談

※1 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フローセルでのシーケンシング解析が必要になります。1 フローセルあたりのデータ量は 15 Gb 程度です (サンプルに依存するため、データ保証はできません)。

## ゲノム解析の内容

作業内容	<ul style="list-style-type: none"> <li>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・電気泳動)</li> <li>シーケンスライブラリー作製</li> <li>シーケンシング解析 (PacBio Sequel IIe を用いてHiFiリードを取得)</li> <li>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</li> </ul>
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"> <li>報告書</li> <li>シーケンス生データ (fastq形式)</li> <li>DDBJのデータベース登録に必要なデータ</li> <li>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</li> </ul>
ご提供情報	<ul style="list-style-type: none"> <li>サンプル情報提供用紙</li> <li>オーダーシート</li> </ul> } お見積時にこれらのファイルをメール添付でお送りしますので、ご記入の上、サンプル送付時に送信ください。



**ご提供いただく DNA の量と品質がとても重要です。**

### 1. DNA量

濃度 50 ng/ul 以上、総量 4ug 以上

※ゲノムサイズ 300 Mb 以上の真核生物の場合は、濃度 50 ng/ul 以上で、1 フローセルごとに 4 ug 以上の DNA が必要です。

### 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 GQN が 5 以上であること  
 <お客様で事前に確認する場合> 260/230 は 2.0 以上、260/280 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。

### 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。

### 4.送付方法

冷凍便でお送りください。  
 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ご送付ください。

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



**DNA 抽出からご依頼いただくことも可能です。右のオプションをご覧ください。**



## 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。ご提供いただくサンプル量の目安は、細胞数 5×10 <sup>8</sup> 以上、湿重量 100 mg 以上です。凍結融解を避けるため冷蔵便でお送りください。	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。	100,000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。	20,000円/サンプル	なし
	アノテーション解析 (抗生物質耐性)	ABRicate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。	20,000円/サンプル	なし
	ANI ※2 (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
	MLST ※2 (Multilocus sequencing typing)	複数の特定遺伝子配列をMLSTデータベースと比較して遺伝子型の判定をします。よく研究されている細菌の遺伝子型を迅速に判別したいときに有効な解析です。	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
wgMLST ※2 (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。MLSTより精度が高い解析です。	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	価格と納期はゲノムサイズによって変わります。	ゲノムサイズ300 Mb未満 30,000円/サンプル ゲノムサイズ300 Mb以上 要相談	5営業日 要相談
	Exonerateを用いた Evidence-baseの遺伝子予測	遺伝子モデルに使用する遺伝子配列を送付いただく必要があります。	50,000円/サンプル	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。	100,000円/サンプル	5営業日
マッピングとORFの変異点解析	参照配列に遺伝子アノテーションがある必要があります。	5サンプルまで一律 100,000円 6サンプル以上の場合、 1サンプルあたり +10,000円	10営業日	
メタゲノム解析	アセンブル・マッピング	Flye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。	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	10営業日
	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。	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	20営業日

※2 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。MLSTと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。