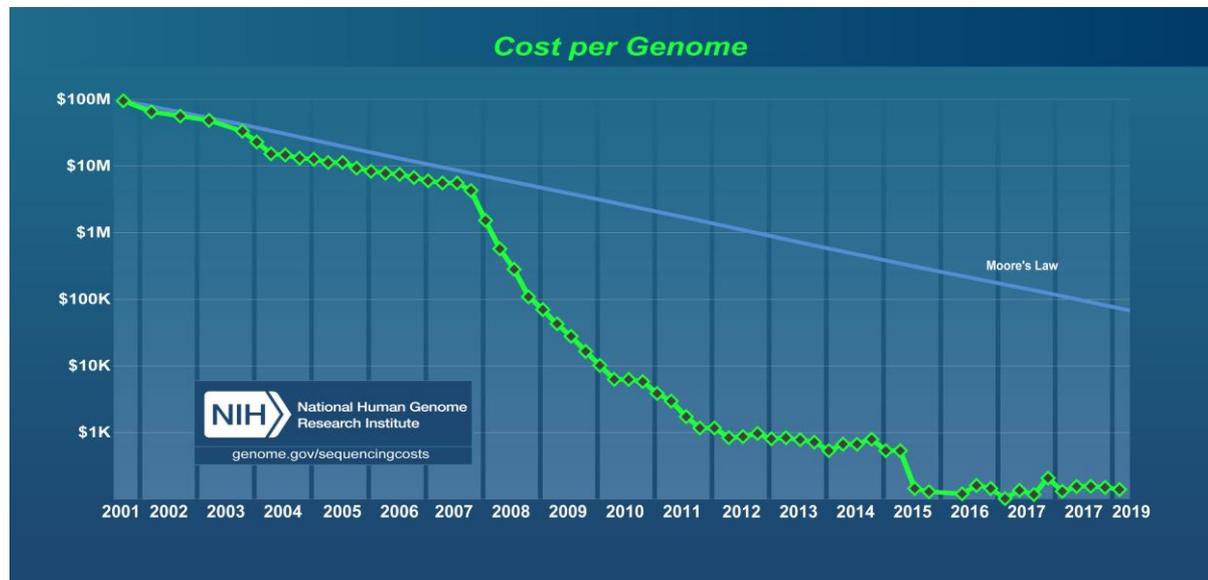


『次世代シーケンサーを中心とした遺伝子解析』

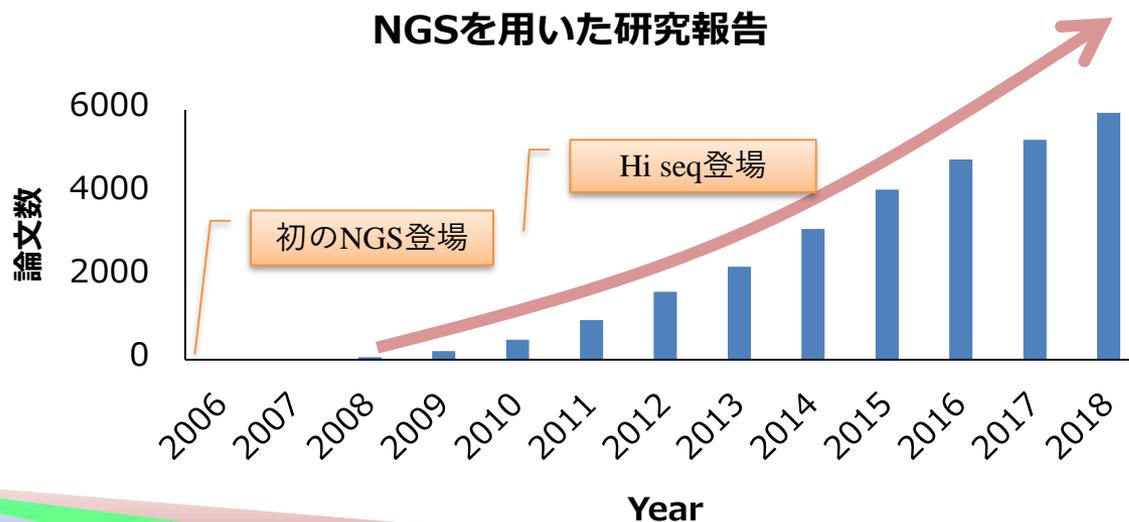
はじめての方へ、NGSの超基礎の紹介

九州プロサーチ有限責任事業組合

次世代シーケンサーの普及



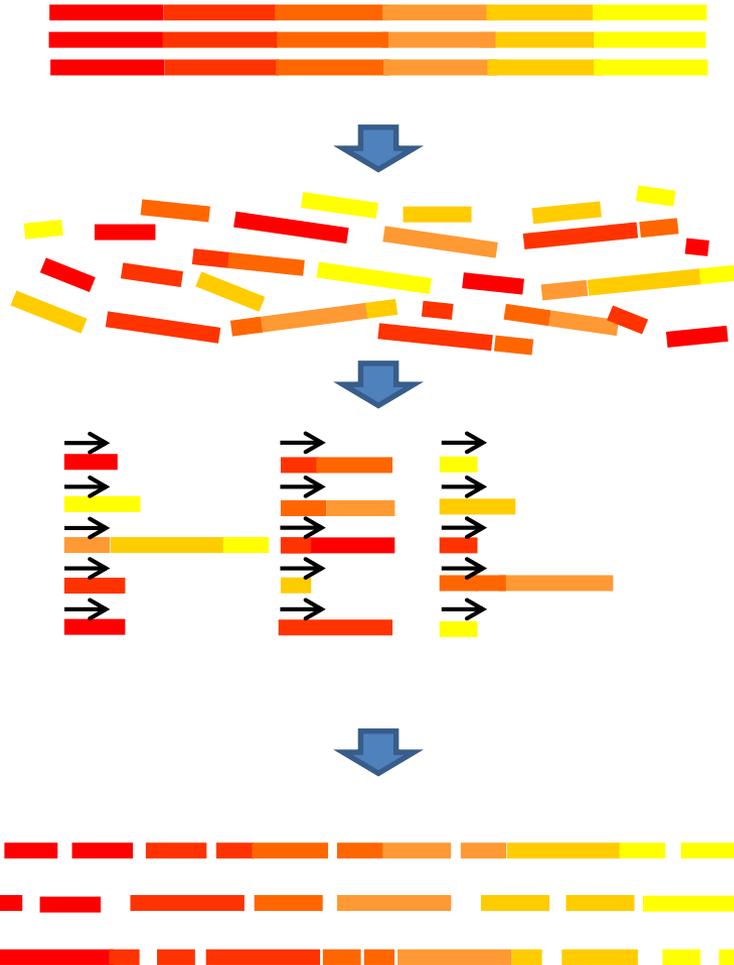
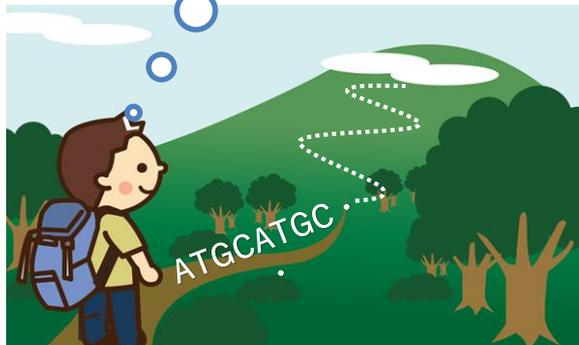
NHGNI 「The Cost of Sequencing a Human Genome」より引用



「PubMed」で”next-generation sequencing”または”microarray”で検索した数 当社調べ

NGSの簡単なイメージ

長い配列を解読するのは
時間かかるし難しいなあ



短い配列なら短時間で
沢山解読出来る。細
切れにしてまず読もう！



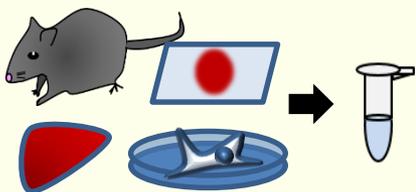
読んだ短い配列を後で
つなげばいいよね！

代表的な手法

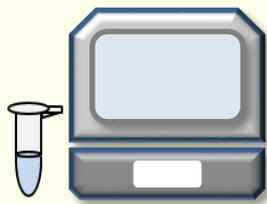
手法	目的
Whole Genome-seq	変異の探索 疾患原因遺伝子の特定 ゲノム多様性の解析
Exome-seq	
RNA-seq	網羅的発現量解析 新規転写産物同定
Small/micro RNA-seq	Small RNA, microRNAの定量解析
ChIP-seq	タンパク質結合領域の同定 ヒストン修飾状態解析
Bisulfite-seq	CpG領域のメチル化の網羅解析
Hi-C	ゲノム立体構造解析
16S rRNA amplicon-seq	細菌種の同定 メタゲノム解析

基本フローの大枠は共通である

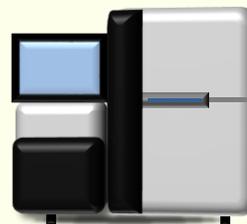
核酸抽出・前処理



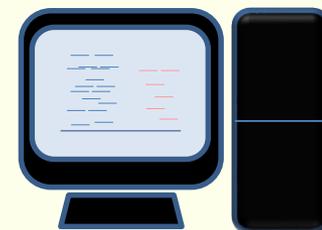
ライブラリー調製



シーケンス



解析



NGSワークフロー

ライブラリー調製 (例 : RNA-seq)

Total RNA



リボソームRNA除去

or

PolyA mRNA精製



断片化



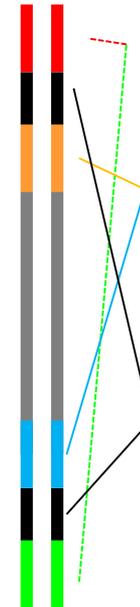
cDNA増幅



Adapterライゲーション
PCR増幅



アダプターに含まれるもの
(Illumina社を例に)

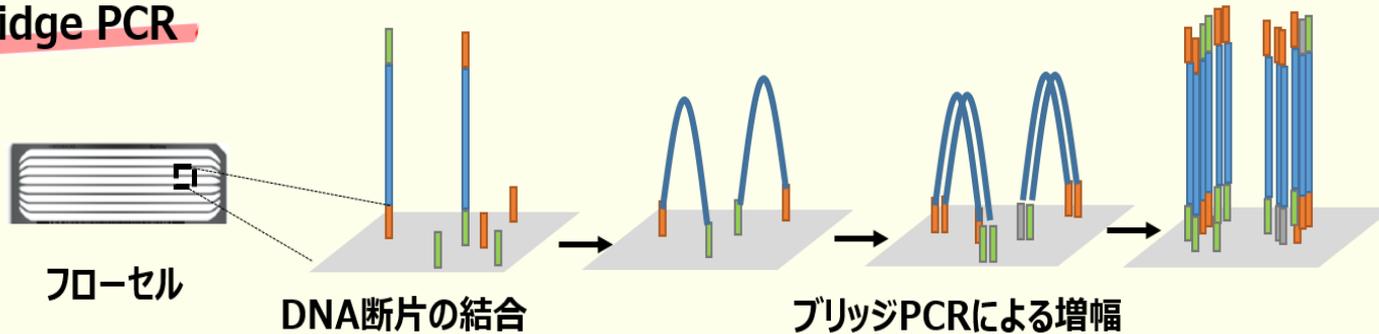


フローセルへの結合部位

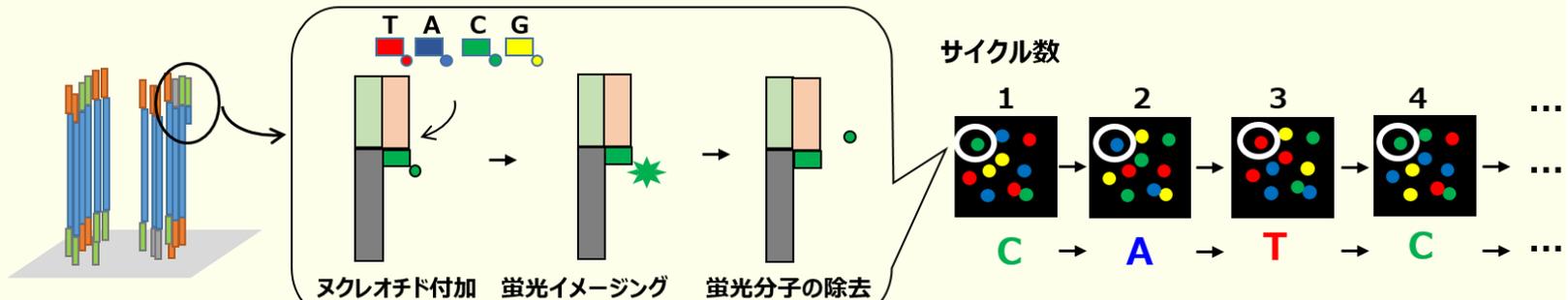
シーケンスプライマー
結合部位

複数サンプル解析用
バーコード(Index)

Bridge PCR



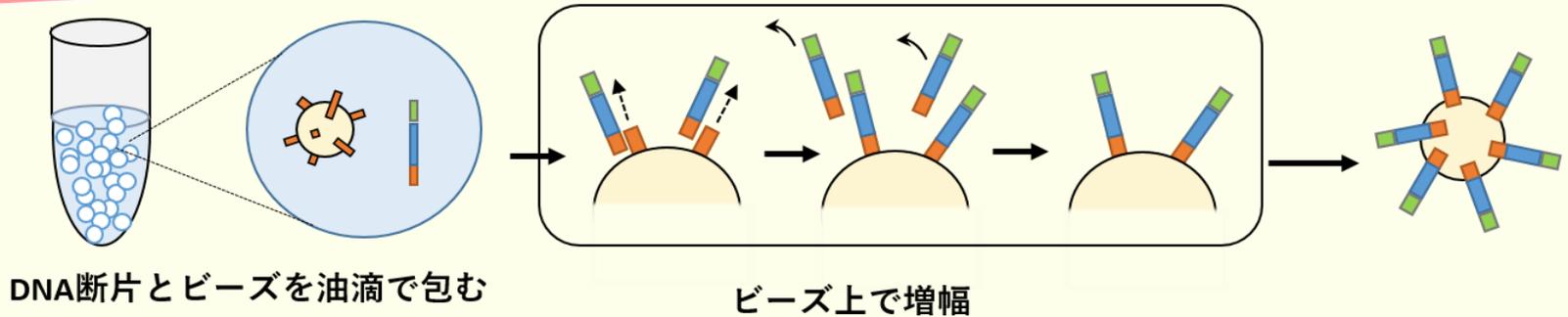
Sequencing by synthesis (SBS)法



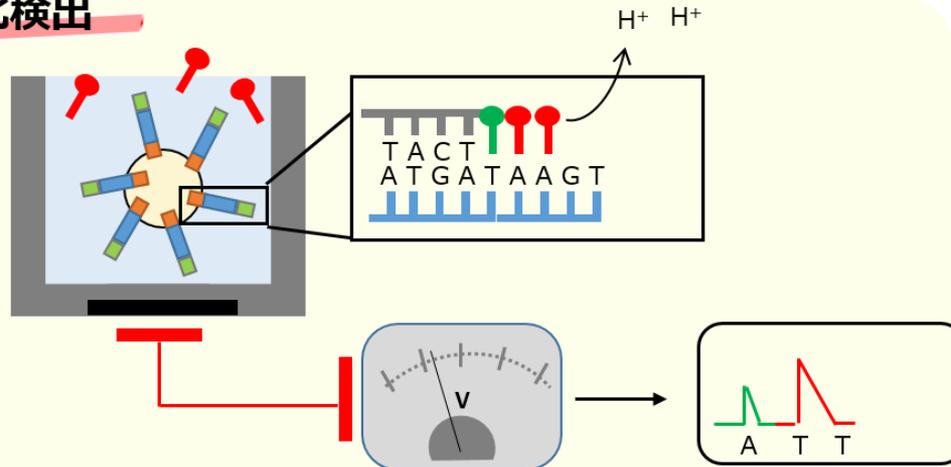
1塩基伸長反応と蛍光シグナルの取込み・検出のサイクル

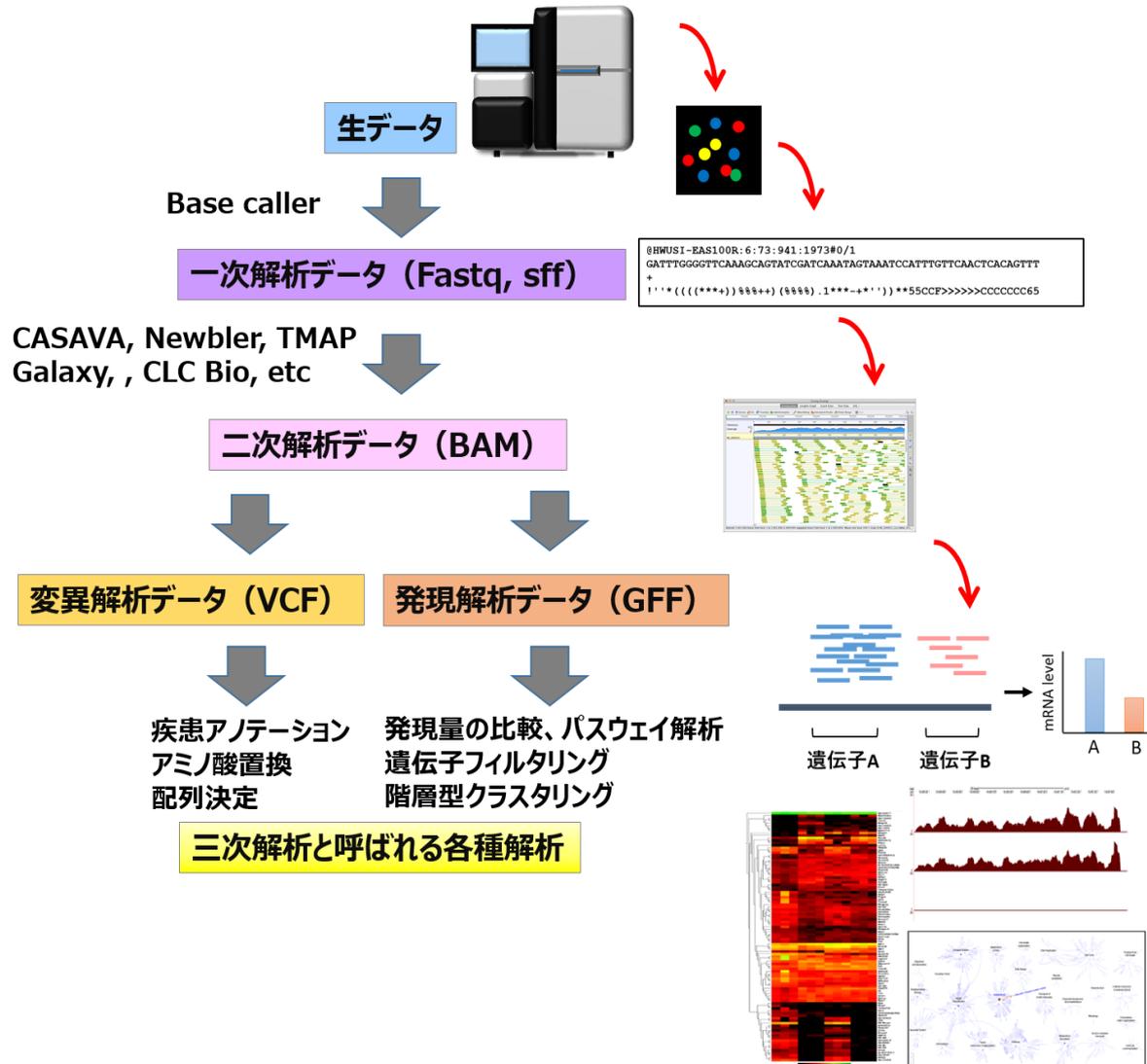
1塩基伸長反応 (標識dNPT1分子取込み)
未反応塩基の除去
蛍光シグナルの取り込み
蛍光と3'ブロッカーを除去

emulsion PCR



pH変化検出





各NGSプラットフォームのスペック

アプリケーションごとに必要なデータ量は異なる

	Mi seq	Next seq	Hi seq	Hi seq X	Nova seq	Ion Torrent
最大出力	15 Gb	120 Gb	1500 Gb	1800 Gb	6000 Gb	0.5-25Gb
ランあたり最大リード数	2,500万	4億	50億	60億	200億	300万-1.3億
最大リード長	300bp x 2	150bp x 2	150bp x 2	150bp x 2	150bp x 2	200-600bp
全ゲノムシーケンス (ヒト) 90Gb~	×	△	○	○	○	×
全ゲノムシーケンス (微生物)	○	○	○	×	○	○
エクソームシーケンス 5Gb~	×	○	○	×	○	○
RNA-seq	×	○	○	×	○	○
ターゲットリシーケンス、 パネル	○	○	○	×	○	○

1本のリード塩基数が10Kb以上のシーケンサー

分類	プラットフォーム	原理	リード長 (bp)	リード数 (M)	データ量 (Gb)
ショートリード	illumina	超並列	~600	20~6000	20~1500
ロングリード	Pacific Bioscience	1分子リアルタイム	10k~50k	1~35	5~10
	Oxford Nanopore technologies	ナノポア	~数百k	0.1~5	0.5~10



Long-read NGSで可能になること

- GC/ATリッチな領域やリピート配列の解析
- 構造多型・変異の解析
- ハプロタイプの解析
- 非モデル生物の新規ゲノム配列決定



Long-read NGSが苦手なこと

- 遺伝子発現などの定量解析
- カバレッジが必要だとコスト高