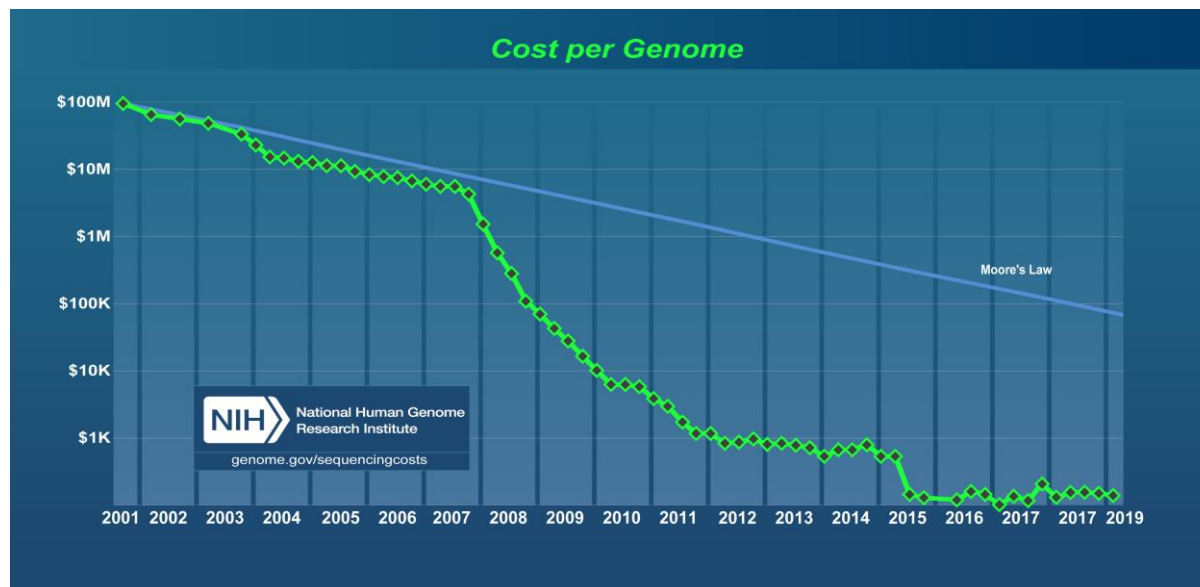


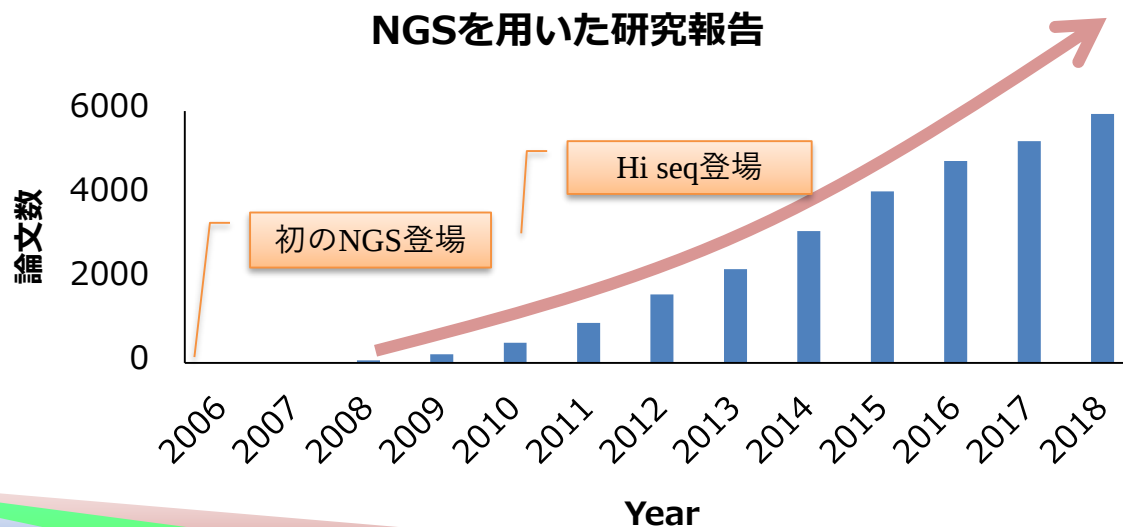
『次世代シーケンサーを中心とした遺伝子解析』

はじめての方へ、NGSの超基礎の紹介

次世代シーケンサーの普及



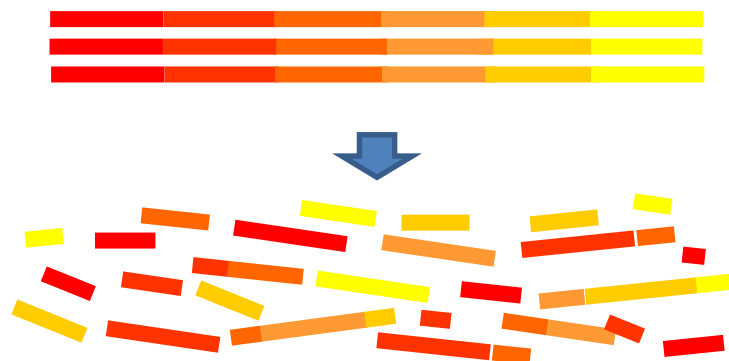
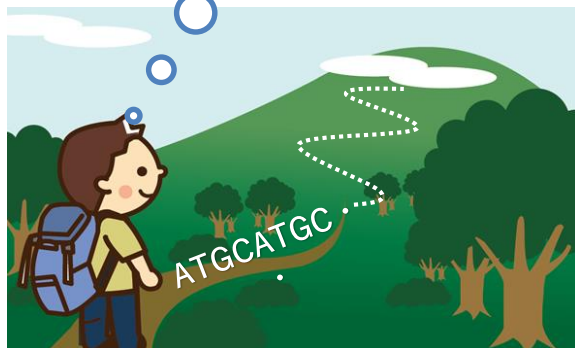
NHGNI 「The Cost of Sequencing a Human Genome」より引用



「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！



NGSで解析できること

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

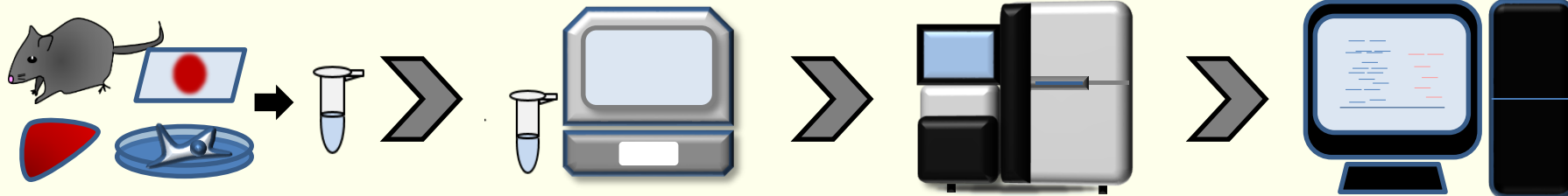
基本フローの大枠は共通である

核酸抽出・前処理

ライブラリー調製

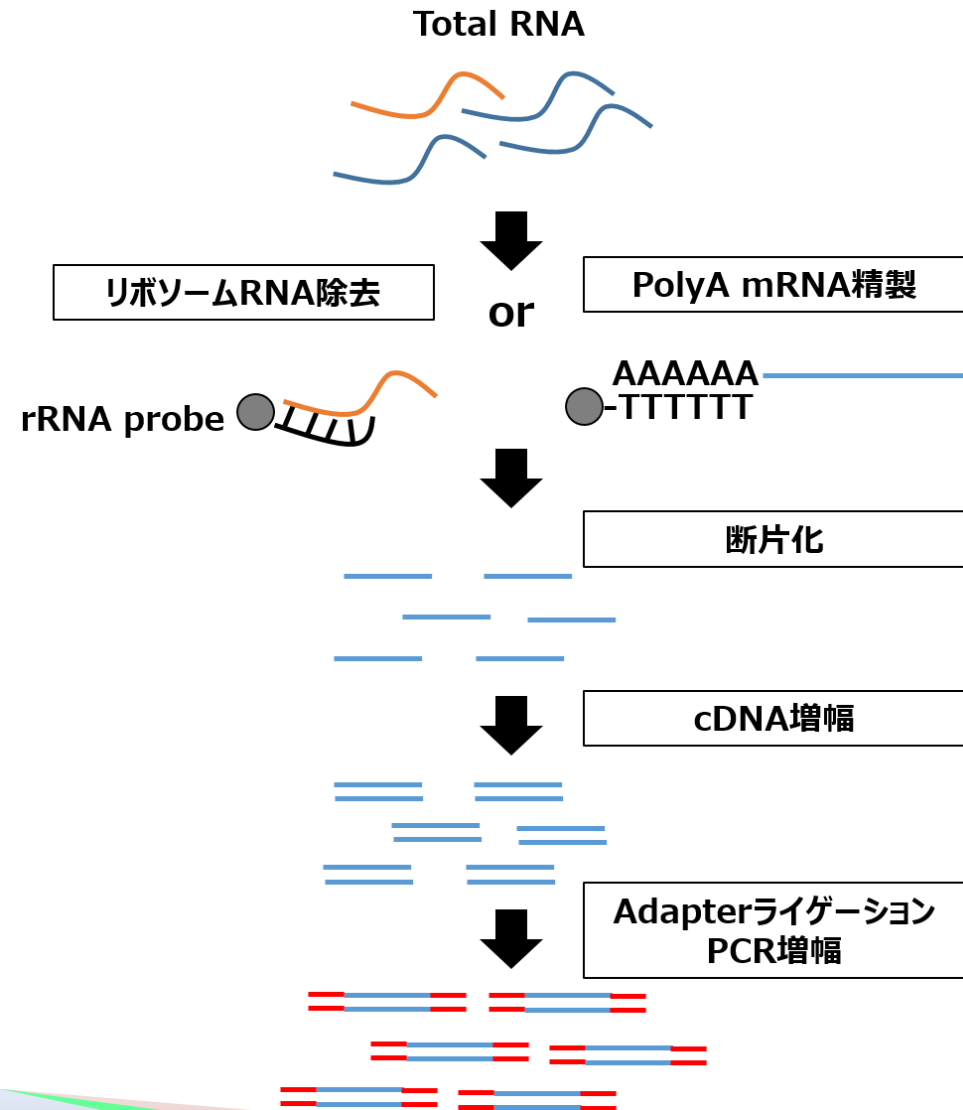
シーケンス

解析

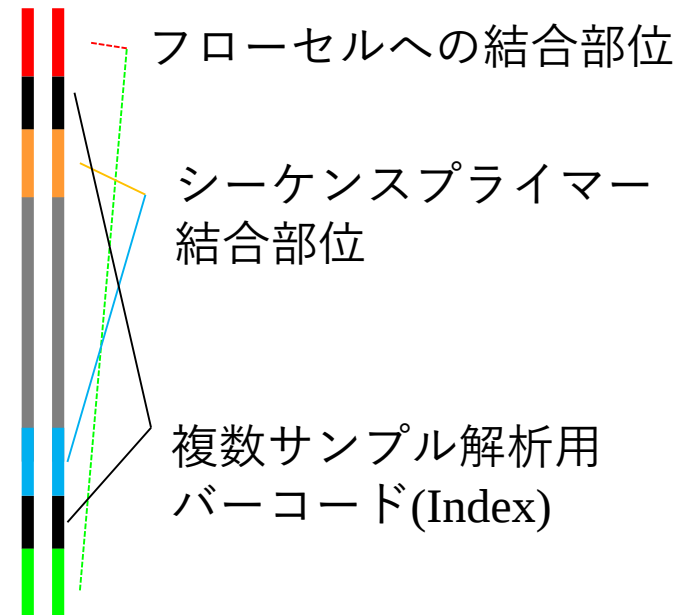


NGSワークフロー

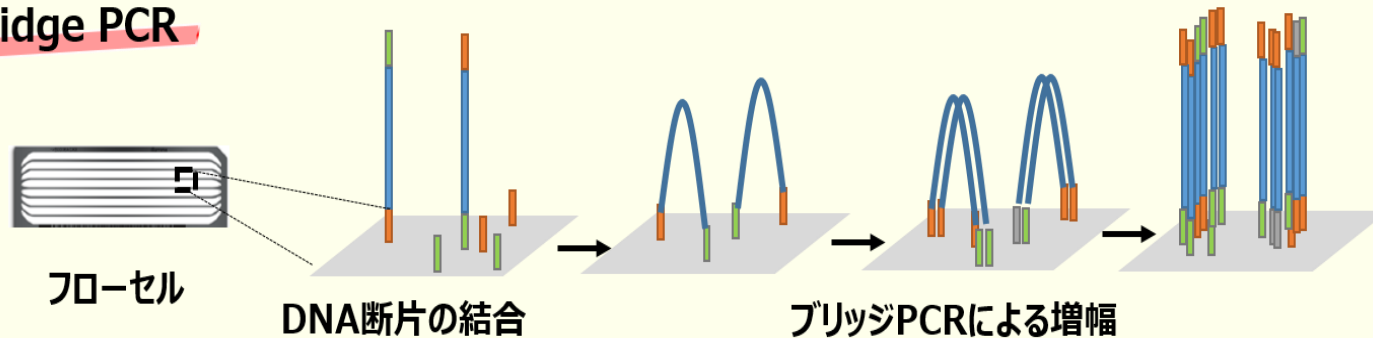
ライブラリー調製（例：RNA-seq）



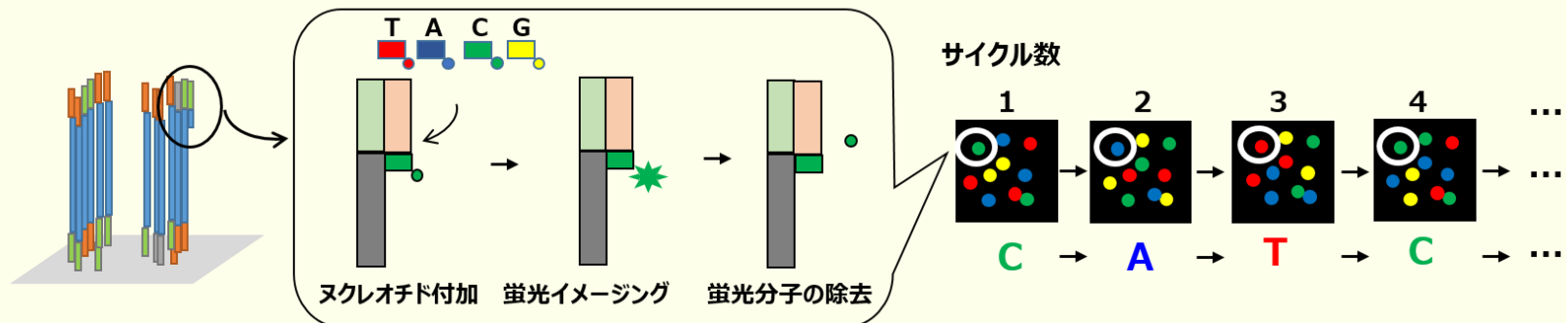
アダプターに含まれるもの
（Illumina社を例に）



Bridge PCR



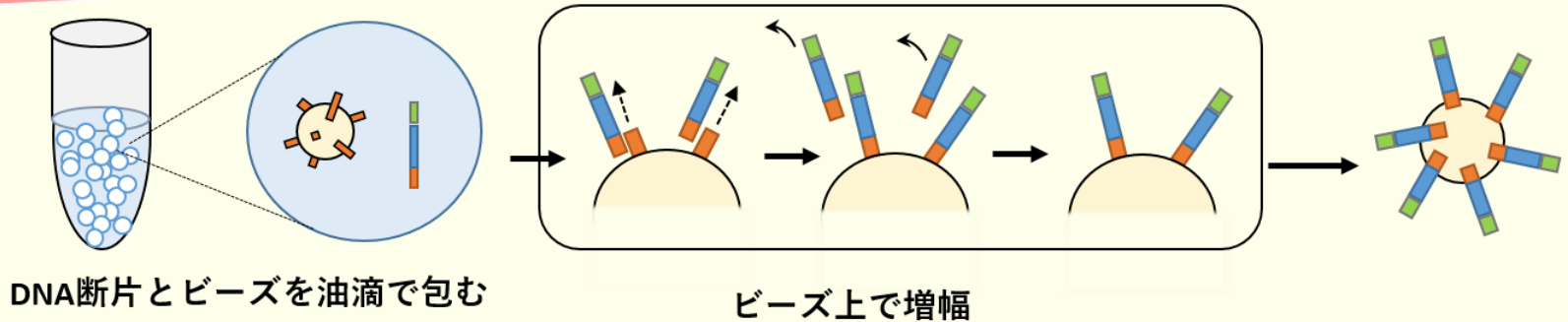
Sequencing by synthesis (SBS)法



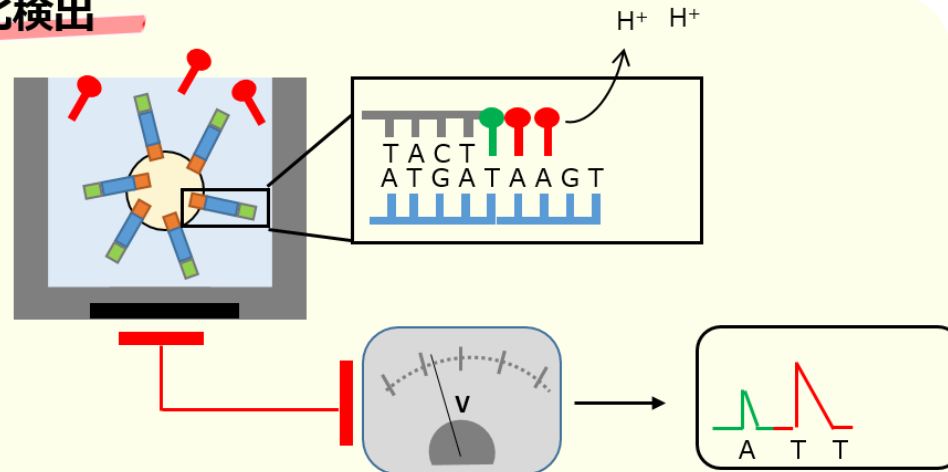
1塩基伸長反応と蛍光シグナルの取込み・検出のサイクル

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

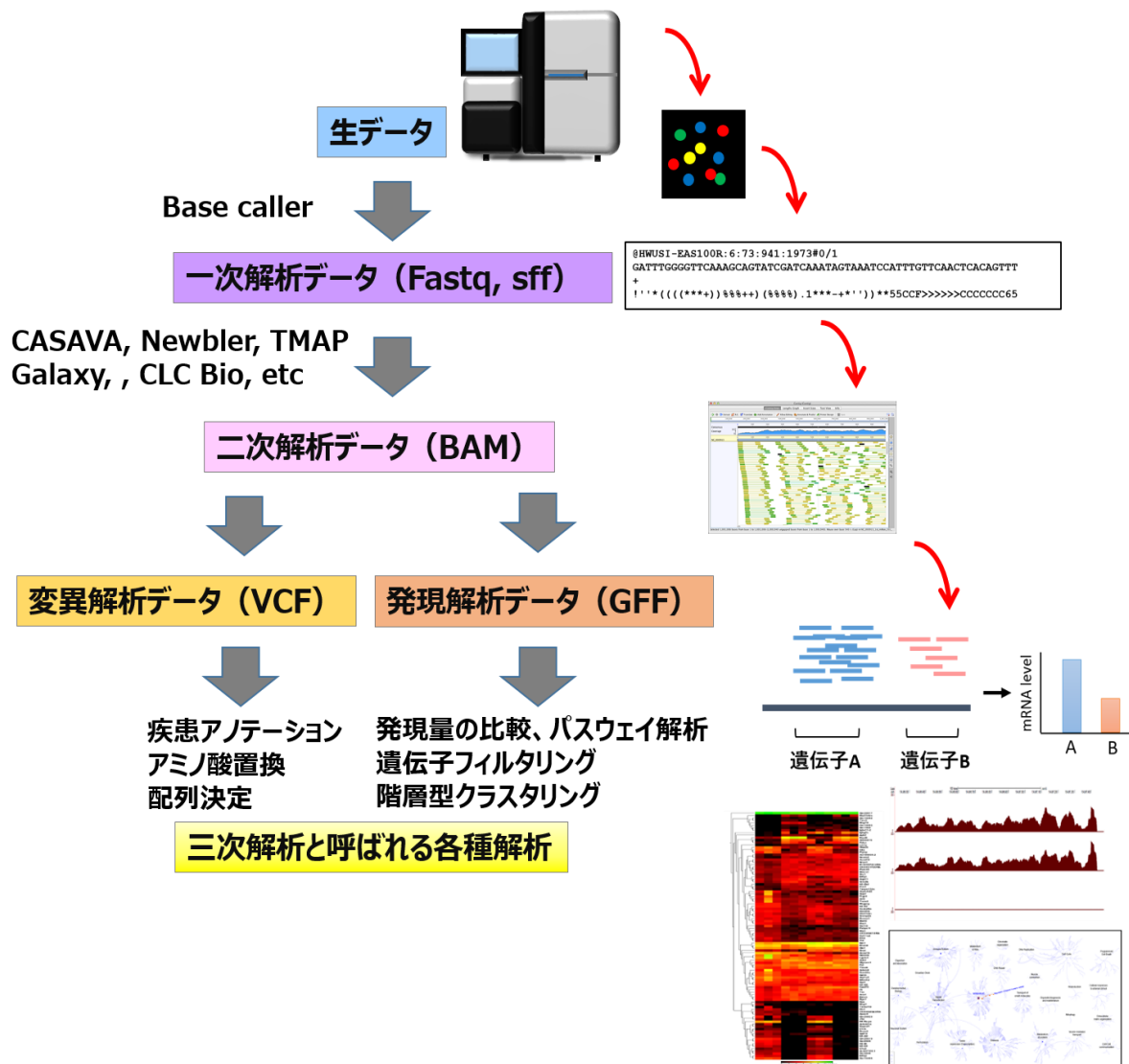
emulsion PCR



pH変化検出



遊離した H^+ の電位変化を検出



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	○	○	○	×	○	○

Long-read NGS

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