

次世代シーケンス受託解析の利用手引き

オープンファシリティセンター ゲノム解析室

ver.8

目次

1. 利用の手順	2
2. 提出サンプルについて	3
3. 受託解析の内容について	3-4
4. データ納品について	4
5. 受託解析の料金と支払方法	4-5
6. 免責事項・注意事項	5
7. 研究相談	5

1. 利用の手順

次世代シーケンサーを用いた受託解析を OFC ゲノム解析室にて実施します。受託解析項目はヒト全エクソンシーケンス(WES)と RNA シーケンス(RNA-Seq)及び各々のデータ解析、シングルセル解析ライブラリー作製受託、シーケンスランになります。ご依頼には下記手順にてお願いします。

- ① 受託解析内容の打ち合わせ
- ② 受託解析依頼書への記入と提出
- ③ サンプルの準備と提出
- ④ 結果報告
- ⑤ データ納品

① 受託解析内容の打ち合わせ

事前に受託解析の詳細を打ち合わせるためにメール(lab-genome@fujita-hu.ac.jp)にてご連絡ください。折り返し日時調整のご連絡をします。その際、サンプルの種類、サンプル数、希望データ納品時期についてなるべく具体的にお話し頂けるよう、ご準備ください。

② 受託解析依頼書への記入と提出

オープンファシリティセンター受託解析サイト (<https://www.fujita-hu.ac.jp/~kyoriken/jyutaku/index.html>) にある次世代シーケンス受託解析依頼書 (excel ファイル) に必要事項をご記入頂き、メールに添付してお送り下さい。

③ サンプルの準備と提出

核酸サンプルは冷蔵以下、シングルセル解析用サンプルは打ち合わせで決めた保存状態でゲノム解析室へお持ちください。RNA は冷蔵ですと品質が下がる可能性があります。

④ 結果報告

シーケンス結果をメールにてご報告します。データ解析もご依頼の方は解析後にご報告致します。ライブラリー作製時にサンプル不良がある際は事前にご連絡致します。

⑤ データ納品

解析データを USB メモリに入れて納品します。直接受領して頂くか、学内便による納品かご依頼ください。また、その他シーケンスファイルが必要でしたら別途 HDD や SSD をお持ち頂ければコピーさせていただきます。

2. 提出サンプルについて

核酸サンプルの要件は下記になります。要件以下の微量の場合は一度ご相談ください。

シングルセル解析用サンプルは詳細について打ち合わせをお願いします。

DNA

総量	1 µg以上
濃度	20 ng/µl以上
液量	50 µL以上
懸濁溶液	純水, EBバッファー(10 mM Tris-Cl, pH 8.5), TE不可 *
OD260/280	1.6以上
OD260/230	1.6以上

RNA

総量	1 µg以上
濃度	20 ng/µl以上
液量	50 µL以上
懸濁溶液	純水(RNase free)
OD260/280	1.8以上
OD260/230	1.8以上

* EDTA 含有の **TE バッファーは原則不可**。難しい場合はご相談ください。

* DNA, RNA サンプルはライブラリー作成前に品質チェックとして TapeStation にて DIN 値、RIN 値測定します。**DIN 値 3 未満、RIN 値 7 未満**の品質基準に満たないサンプルはデータの品質が低くなります。その場合はご相談させていただきます。

シーケンスラン依頼：持ち込みライブラリー

濃度	2 nM以上
液量	15 µL以上

3. 受託解析の内容について

解析項目に応じて下記キット等を使用してライブラリー作製とシーケンスを実施します。

■ WES

ライブラリー作製：Twist Library Preparation EF Kit 2.0 (Twist Bio 社)

xGen Exome Hyb Panel ver 2 (IDT 社)

シーケンス：NextSeq 2000 P1/P2 Reagents (200 または 300 cycle)

100 bp または 150 bp ペアエンドシーケンス

■ RNA-Seq

ライブラリー作製：・NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEB 社)

・NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB 社)

・SMART-Seq Kit (Takara 社) 微量検体用

シーケンス：NextSeq 2000 XLEAP Reagents (100 cycle)

50 bp ペアエンドシーケンス

■ シングルセル解析ライブラリー作製受託（要事前相談）

事前に下記シングルセル RNA-seq 解析試薬キットを購入頂き、シングルセル化した細胞から Chromium X によるシングルセルバーコード付加とライブラリー作製、QC の作業を行います。

- ・GEM-X Universal 3' Gene Expression (10xGenomics 社)
- ・GEM-X Flex v2 Human or Mouse (10xGenomics 社)

* シングルセル化までは依頼者に実施頂きます。

* シーケンスには別途、カートリッジ代とシーケンスラン代がかかります。

■ データ解析

WES: CLC Genomics Workbench (QIAGEN 社) で NGS データの基礎解析、VarSeq (Golden Helix 社) で変異解析を実施します。

RNA-Seq: CLC Genomics Workbench で NGS データ基礎解析を実施し、遺伝子発現量、変動遺伝子発現解析、クラスタリング解析、PCA 解析などを実施します。

■ シーケンスラン

ライブラリー作製はご自身でされる場合、NextSeq 2000 のランのみ代行します。別途シーケンスのカートリッジ試薬をご購入頂く必要がございます。カートリッジ試薬の種類や価格、注文方法についてはお尋ねください。

4. データ納品について

シーケンスのみの依頼の場合は **Fastq ファイル** を HDD（ご依頼者所有）にコピーしてお渡しします。データ解析まで依頼される場合はデータ解析で出力される下記ファイルを **USB メモリ** に入れてお渡しします。**受領方法は事前にご相談ください。**

■ WES

Excel ファイル（遺伝子変異及びアノテーション情報等を記載）

■ RNA-Seq

Excel ファイル（遺伝子発現数値や比較差異データ）、パワーポイントファイル（遺伝子発現クラスタリング及び PCA 解析グラフなど）

* 上記以外 BAM、VCF ファイル等もお渡し可能です。ご希望の方はお知らせ下さい。

5. 受託解析の料金と支払方法

① 受託解析料金

全エクソンシーケンス（WES）	49,000 円/サンプル
WES データ解析	5,000 円/サンプル

RNA シーケンス (RNA-seq)	28,500 円/サンプル
RNA-seq データ解析	2,500 円/サンプル
シングルセル解析ライブラリー作製受託	5,000 円/サンプル
シーケンスラン	20,000 円/回

② 支払方法

月末締めで翌月に利用料金の請求を行います。納品後の翌月上旬ごろに、研究支援推進本部事務部の研究支援課から所属室へ請求依頼をお送りします。請求をお急ぎの際はご相談ください。本学研究費、公的研究費などでの支払いが可能です。お問い合わせは、研究支援課までお願いいたします。

6. 免責事項・注意事項

本受託解析は、解析結果を保証するものではありません。提出したサンプルの品質などにより、解析結果が得られないことがあった場合、当解析室は一切の責任を負いません。その場合、利用料金は請求となりますので予めご了承ください。ただしシーケンスに進めず、ライブラリー作製までで終了した場合は半額料金を検討させていただきます。

ヒト臨床検体（細胞株以外）の解析は**事前に倫理審査委員会の承認**を得る必要があります。承認を得ていない検体は解析し兼ねますのでご了承ください。

7. 研究相談

受託解析のご依頼や次世代シーケンサーを使用した研究や解析、具体的な方法については下記までお気軽にご相談ください。

研究推進本部 オープンファシリティセンター ゲノム解析室

大学 1 号館 3 階 303 室

E-mail: lab-genome@fujita-hu.ac.jp

内線番号 : 9372

担当教員 : 杉原 英志, 岡崎 章悟, 技術員 : 秦 優子