

Guidance notes

SeqSNP service guidance notes

本製品は研究用です。
診断あるいは治療等の臨床用途に使用することはできません。

Guidance notes

SeqSNP service

目次

1. はじめに.....	2
2. プロジェクトの流れ.....	3
3. サンプルの提出方法.....	3
3.1. 組織サンプルの提出方法.....	3
3.2. DNAサンプルの提出方法.....	3
4. シーケンス情報の提出方法.....	4
4.1. リファレンスゲノム配列.....	4
4.2. 多型の位置情報に関するファイル.....	4
4.3. 隣接する多型の位置情報に関するファイル(オプション).....	5
5. データの解析と結果.....	5
6. サンプルの保存と返却.....	5
7. 便利なリンクと連絡先.....	5
付録A：サービスのフォーム.....	6
付録B：DNAの提出要件.....	7
付録C：組織の提出要件.....	8

1. はじめに

このガイダンスノートはSeqSNPプロジェクトを行うにあたってLGC, Biosearch Technologies社にサンプルや補足情報を送るための手引きとして作成されました。

SeqSNPはシーケンシングによるターゲットジェノタイピング(ターゲットGBS) サービスであり、mid-plex次世代シーケンシング(NGS)ジェノタイピングプラットフォームを使用してSNP及び小さな挿入/欠失(InDels) のジェノタイピングを可能にします。SeqSNPはマーカー選択の柔軟性が向上し大規模に実現可能となるので、固定アレイによるスクリーニングの代替手段となります。

SeqSNPは包括的なサービスで、DNAの抽出（お客様が抽出したDNAを提出いただくことも可能です）、アッセイの設計とプローブの合成、DNAライブラリー構築、Illuminaでのシーケンシング、そして最後にバイオインフォマティクスにより対立遺伝子のコーリングが可能です。

ご相談やご質問等ございましたらreagents@primetech.co.jpまでご連絡下さい。

Guidance notes

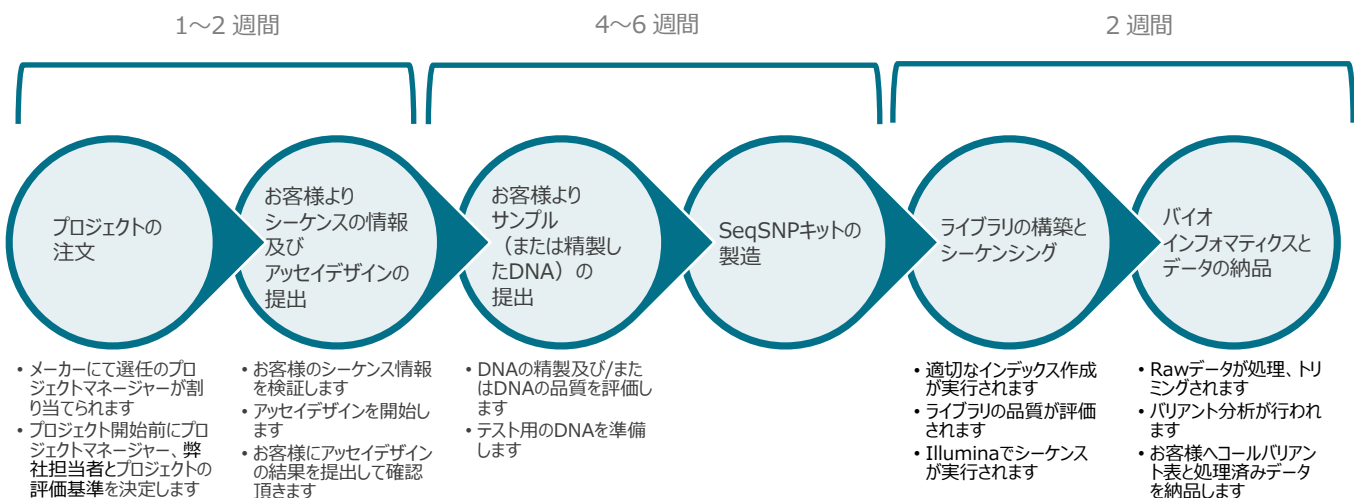
SeqSNP service

2. プロジェクトの流れ

SeqSNPプロジェクトを実施する前に、お客様は担当者と解析に必要な全てのドキュメント、サンプル、サンプル発送の要件が満たされているかを確認します。

以下にSeqSNPサービスに関するプロセスの詳細を記載しております：

3. サンプルの提出方法



DNA及び組織サンプルの提出方法については、付録A,B,及びCの表を参照してください。

3.1. 組織サンプルの提出方法

精製用にサンプルを提出する前に、[抽出サービスのサンプル提出フォーム](#)を記入し、弊社担当者へ提出してください。

- **植物サンプルを提出する場合**、次の情報を提出してください：
 - 種と倍数性

3.2. DNAサンプルの提出方法

- **全てのDNAサンプルについて** 各サンプルにて次の情報を提出してください：
 - 使用したDNA精製方法及び/又は精製キット e.g. Biosearch Technologies [sbeadex™ chemistry](#) (推奨)
 - DNA濃度(ng/μL)
- **植物サンプルを提出する場合**、次の情報を提出してください：
 - 種と倍数性

Guidance notes

SeqSNP service

4. シーケンス情報の提出

各SeqSNPプロジェクトには以下が必要です:

- リファレンスゲノム配列(セクション4.1を参照)
- 多型の位置情報に関するファイル(セクション4.2を参照)

受け入れることができるシーケンスの形式詳細については[SeqSNP assay design factsheet](#)をご覧ください。

4.1. リファレンスゲノム配列

リファレンスゲノム配列は次のように提出することが可能です:

- 公開されている配列のリンク 例: [human genome assembly](#) (推奨)
- FASTA形式のリファレンスゲノム配列(推奨)
- 多型の上流と下流の両方に隣接する少なくとも75ヌクレオチドの配列を含む、短い参照配列(プロジェクトマネージャーへ事前に申し伝えた場合にのみ可能です)
- トランスクリプトームシーケンス (プロジェクトマネージャーへ要相談となります)

4.2. 多型の位置情報に関するファイル

多型の位置情報に関するファイルはSeqSNPプロジェクトに含まれるSNPs/InDelsの位置を定めている情報です(リファレンスゲノム配列を比較して)。

次の形式を受け入れることが可能です。:

- VCF (Variant Calling Format) (v4.0 以降) – 次の [VCF file 例](#) を参照(推奨)
- Microsoft Excel スプレッドシート – 次の [Excel file 例](#) を参照(推奨)
- BED (ブラウザ拡張データ) – 次の[BED file 例](#) を参照(受け入れ可能)

注意:

- VCFまたはExcel ファイル(推奨) を提出頂くと、識別された多型が参照ゲノムに存在するかを確認することができます。これはBEDファイルの提出では確認することはできませんが、VCF,Excelファイルの形式であれば可能です。
- 合成キットの規模により、最低でも48の多型(受け入れ可能)や96の多型(推奨)をお勧めします。
- アッセイ設計数を維持するために、プロジェクトで実施したい数より20-50%多い多型を提出することをお勧めします。全てのアッセイは実際に解析を行う前に、in silicoでの設計可否を確認してお客様にご連絡します。
- 全てのシーケンスデータ(リファレンスゲノム及び多型の位置情報に関するファイル)が正しいことが重要となります。Biosearch Technologies社は誤って提出されたシーケンス情報によって得られた結果については、責任を負うことはできません。

Guidance notes

SeqSNP service

4.3.隣接する多型の位置情報に関するファイル (オプション)

このファイルは関心領域に隣接する既知の多型に関する情報を提供します。これはオリゴヌクレオチドプローブの設計と、ターゲットエンリッチメントを損なう可能性がある回避すべき領域を特定するのに役立ちます。

隣接する多型の位置情報に関するファイルを提出する場合は、多型の位置情報に関するファイル (4.2)と同じファイル形式を使用して下さい。

5. データの解析と結果

- シーケンスが完了するとデータの分析が実行され、遺伝子型を特定するコールバリエーション表が作成されます。
- お客様自身で解析ができるように、Rawデータ、アダプタークリップリード、高品質のトリミングされたリードデータを納品します。
- 追加でバイオインフォマティクスが必要な場合は、弊社担当者にご相談下さい。

6. サンプルの保存と返却

- プロジェクトに関する全てのもの (サンプル、DNA、データ) はプロジェクト完了後1年間ベルリンのラボに保管されます。
- 長期間の保管が必要な場合や、返却が必要な場合は弊社担当者にご相談下さい。
- SeqSNPサービス以外の追加のサービスを利用できます。ご希望の際は弊社担当者にご相談下さい。

7. Useful links and contacts

- サンプルの発送については、お客様からベルリンラボに直送頂くか弊社より代行輸送 (別途送料頂戴いたします) が可能です。直送の場合は発送先と必要な添付書類を担当者よりお伝え致します。
- SeqSNPに関する問い合わせ全般はreagents@primetech.co.jpまたは弊社担当者にご直接お問合せ下さい。

Guidance notes

SeqSNP service

付録A: サービスのフォーム

アプリケーション	Biosearch Technologies サービス	プロジェクト実施に当たり記入・提出するフォーム		その他お役立ち情報集
		組織サンプルを提出する場合	DNAサンプルを提出する場合	
次世代シーケンシング (NGS) (DNAの精製有り/無し)	SeqSNP (targeted GBS)	NGS sample submission form	NGS sample submission form	<ul style="list-style-type: none">• SeqSNP guidance notes• SeqSNP assay design factsheet• Plant species list• Guidelines for sample shipment

Guidance notes

SeqSNP service

付録 B: DNAの提出要件

アプリケーション	Biosearch Technologies サービス	DNAの最小要件					輸送に使用可能・推奨されたプラスチック容器			輸送の要件	
		バッチあたりの最小サンプル数	濃度 (サンプルあたり)	ボリューム (サンプルあたり)	希釈液の条件	推奨・受け入れ可能な核酸の評価	プレート・チューブのタイプ	プレートシール	プレート・チューブのラベリング	梱包と発送の条件	その他情報
次世代シーケンシング (NGS)	SeqSNP (targeted GBS)	96	30 ng/μL	20 μL	Tris/TE (5 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.5)	RNAを含まない 蛍光で確認された HMW(> 10 Kb)	96-well plate	プレートヒートシール (推奨)	プレートごとに異なる名前でのラベリングして下さい。	お客様から発送される場合、通関に必要な書類とProject IDを伝票に記載下さい。 DNAの場合はドライアイスで冷凍、葉サンプルの場合は乾燥させて常温で輸送下さい。	プロジェクトごとに輸送する全てのサンプルについて 最小要件を満たしていないサンプルは受け入れを拒否される場合がございます。低品質のサンプルについては、実験環境によって解析できる可能性がありますので、弊社担当者にご相談下さい。

*ヒトゲノムサイズに基づいています。より大きなゲノムの場合、さらに高いDNA濃度が必要なので、ガイダンスノートを参照してください。

**SNP数が多い場合は、より大きなボリュームが必要になる場合がございます。

gDNA = genomic DNA; HMW = High Molecular Weight (高分子量)

Guidance notes

SeqSNP service

付録C: 組織の提出要件

以下の重要な情報に注意してください:

- 生物サンプル(いかなるタイプであっても) は 0.2 mLチューブまたはプレートでの輸送はできません。
- BSL-IIIの試料は、どのBiosearch Technologiesサイトでも受け入れられません。
- GMOシードやBSL-IIの材料を処理したい場合は弊社担当者にご相談下さい。代替のオプションを提案致します。実施できないGMP素材（葉など）を受け入れられます。
- ジェノタイピングの全体的な品質と成功率は、サンプルの状態によって影響を受ける可能性があります。サンプル中にポリフェノールや多糖類、二次代謝産物などが含まれる場合、酵素反応が阻害され、結果に悪影響を及ぼす恐れがあり、一方で植物種によっては古い葉より若い葉を用いると阻害剤の影響を受けづらく高品質で高収量のDNAが得られる傾向にあります。低品質なサンプルが解析へ悪影響を及ぼした場合、Biosearch Technologiesの社では責任を負いかねます。
- 標準のサンプル輸送ガイドラインから逸脱すると、(Biosearch Technologiesとの事前の協議なしに) サンプルの受け取りが拒否されたり、追加費用が発生する可能性があります。

アプリケーション	サンプルタイプ	サンプルの最小要件			輸送に使用可能・推奨されたプラスチック容器				輸送の要件	
		バッチあたりの最小サンプル数	ボリュウム/数量	クオリティ	サンプルの推奨採取チューブ/プレート	プレート/チューブのタイプ	プレートシール	サンプルの取り扱い	梱包と発送の条件	その他情報
シーケンシング (サンガーシーケンス** または 次世代シーケンス)	葉	サンプルのサイズやプロジェクトの規模によります (弊社担当者にご相談ください)	直径6mmのリーフディスクを4-9枚***	若い葉の組織、L3/L4ステージ、midrib(中肋)、axillary vein(腋芽の葉脈)を避け、植物全体で一貫した位置	BioArk Leaf Kit (推奨)	BioArk Leaf Kit (Biosearch Technologies KBS-9370-001-L) (推奨) 96-well, 1.2 mL プレート (推奨) 96-well, 2.2 mL プレート (使用可能)	BioArk Leaf Kit (推奨)	BioArk Leaf Kitを使用しない場合、サンプルは凍結乾燥して保管するか96-99%無水エタノールで保管する必要があります	サンプルをプロジェクトごとに区別するために、発送時にプロジェクトIDが含まれている必要があります BioArk Leaf Kit 常温 Freeze-dried 常温 -20 °C 冷凍 エタノール 常温	チューブで送られるサンプルは、96ウェルプレートフォーマットへの移し替えに追加費用がかかる場合があります。 お客様のサンプルの種類が下記の場合: a) LGCで抽出実績のある植物種のリストにない b) 貴重/限定的なサンプル これらの場合、パイロット試験/プロトコルの最適化が必要になる場合があるので、弊社担当者にご相談ください
シーケンシング (サンガーシーケンス** または 次世代シーケンス)	種	サンプルのサイズやプロジェクトの規模によります (弊社担当者にご相談ください)	サンプルのサイズやプロジェクトの規模によります (弊社担当者にご相談ください)	n/a	BioArk Seed Kit (推奨)	BioArk Seed Kit (Biosearch Technologies KBS-9370-001-S) (推奨) 96-well, 2.2 mL Porvair plates (推奨) 96-well, 1.2 mL プレート (使用可能)	BioArk Seed Kit (推奨)	特別な取り扱いは必要ありません	サンプルをプロジェクトごとに区別するために、発送時にプロジェクトIDが含まれている必要があります BioArk Seed Kit 常温	チューブで送られるサンプルは、96ウェルプレートフォーマットへの移し替えに追加費用がかかる場合があります。 お客様のサンプルの種類が下記の場合: a) LGCで抽出実績のある植物種のリストにない b) 貴重/限定的なサンプル これらの場合、パイロット試験/プロトコルの最適化が必要になる場合があるので、弊社担当者にご相談ください

Guidance notes

SeqSNP service
組織の提出要件

アプリケーション	サンプルタイプ	サンプルの最小要件			輸送に使用可能・推奨されたプラスチック容器				輸送の要件	
		バッチあたりの最小サンプル数	ポリウム/数量	クオリティ	サンプルの推奨採取チューブ/プレート	プレート/チューブのタイプ	プレートシール	サンプルの取り扱い	梱包と発送の条件	その他情報
シーケンシング (サンガーシーケンス** または 次世代シーケンス)	血液	サンプルのサイズやプロジェクトの規模によります (弊社担当者にご相談ください)	200 µL- 500 µL	新鮮な状態で凍結EDTA、クエン酸塩またはヘパリン	PAXgene RNA Blood Tube (BDBioscience 762165) PAXgene DNA Blood Tube (BDBioscience 761165)	96-well, 2.2 mL プレート (Porvair Sciences 219030) (推奨) 96-well, 1.2 mL プレート(使用可能)	ヒートシーリング (推奨) キャップマットシーリング (推奨)	特別な取り扱いはありません	サンプルをプロジェクトごとに区別するために、発送時にプロジェクトIDが含まれている必要があります -20 °C ドライアイスで冷凍	チューブで送られるサンプルは、96ウェルプレートフォーマットへの移し替えに追加費用がかかる場合があります お客様のサンプルが貴重/限定的な場合、プロトコルの最適化が必要になる可能性があるため、弊社担当者にご相談ください
シーケンシング (サンガーシーケンス** または 次世代シーケンス)	口腔スワブ	サンプルのサイズやプロジェクトの規模によります (弊社担当者にご相談ください)	1つ スワブ/サンプル	n/a	DNA Buccal Swabs (Isohelix SK-1S) 適切な口腔スワブ DNA collection kit	スワブ 箱または袋に入れられたもの (10綿棒/箱または袋) チューブ 箱に入れられたもの	n/a	特別な取り扱いはありません	サンプルをプロジェクトごとに区別するために、発送時にプロジェクトIDが含まれている必要があります 常温	チューブで送られるサンプルは、96ウェルプレートフォーマットへの移し替えに追加費用がかかる場合があります お客様のサンプルが貴重/限定的な場合、プロトコルの最適化が必要になる可能性があるため、弊社担当者にご相談ください
シーケンシング (サンガーシーケンス** または 次世代シーケンス)	唾液	サンプルのサイズやプロジェクトの規模によります (弊社担当者にご相談ください)	1チューブまたは 1枚/サンプル	n/a	Genotek Collection Kit (Oragene OG-500)	チューブ 箱に入れられたもの ディスク 袋に入れられたもの (10枚/袋)	n/a	特別な取り扱いはありません	サンプルをプロジェクトごとに区別するために、発送時にプロジェクトIDが含まれている必要があります 常温	チューブで送られるサンプルは、96ウェルプレートフォーマットへの移し替えに追加費用がかかる場合があります お客様のサンプルが貴重/限定的な場合、プロトコルの最適化が必要になる可能性があるため、弊社担当者にご相談ください

Guidance notes

SeqSNP service 組織の提出要件

アプリケーション	サンプルタイプ	サンプルの最小要件			輸送に使用可能・推奨されたプラスチック容器				輸送の要件	
		バッチあたりの最小サンプル数	ボリューム/数量	クオリティ	サンプルの推奨採取チューブ/プレート	プレート/チューブのタイプ	プレートシール	サンプルの取り扱い	梱包と発送の条件	その他情報
シーケンシング (サンガーシーケンス** または 次世代シーケンス)	家畜の組織	サンプルのサイズやプロジェクトの規模によります (弊社担当者にご相談ください)	4mm (立方体) 固形組織、 600ng DNA	新鮮な状態で凍結	n/a	96-well, 2.2 mL Porvair プレート (推奨) 96, deep-well 1.2 mL プレート (推奨)	ヒート シーリング (推奨) キャップマット シーリング (推奨)	-20 °Cで冷凍、または96-99%の無水エタノールに浸します	サンプルをプロジェクトごとに区別するために、発送時にプロジェクトIDが含まれている必要があります -20 °C 冷凍 無水エタノール 常温	チューブで送られるサンプルは、96ウェルプレートフォーマットへの移し替えに追加費用がかかる場合があります お客様のサンプルが貴重/限定的な場合、プロトコルの最適化が必要になる可能性があるため、弊社担当者にご相談ください
シーケンシング (サンガーシーケンス** または 次世代シーケンス)	水棲生物	サンプルのサイズやプロジェクトの規模によります (弊社担当者にご相談ください)	4mm (立方体) 固形組織、 600ng DNA	n/a	BioArk Fish Kit (推奨)	BioArk Fish Kit (Biosearch Technologies KBS-9370-001-F) (推奨) 96-well, 2.2 mL Porvair プレート (推奨) 96, deep-well 1.2 mL plate (推奨)	BioArk Fish Kit (preferred)	BioArk Fish Kitを使用しない場合は、サンプルを-20°Cで冷凍、または96-99%の無水エタノールに浸す必要があります	サンプルをプロジェクトごとに区別するために、発送時にプロジェクトIDが含まれている必要があります BioArk Fish Kit 常温 -20 °C 冷凍 無水エタノール 常温	The BioArk Fish Kitは魚のヒシの採取で検証されています。別のサンプルタイプの採取が必要な場合は、弊社担当者にご相談ください チューブで送られるサンプルは、96ウェルプレートフォーマットへの移し替えに追加費用がかかる場合があります お客様のサンプルが貴重/限定的な場合、プロトコルの最適化が必要になる可能性があるため、弊社担当者にご相談ください

*ベリリンにサンプルを送送する場合、精製プロジェクトに最低サンプルの最小要件はございません。

**サンガーシーケンスカスタムプロジェクトは、さまざまな種類の組織でも利用できます(サービスには、DNA精製とサンガーシーケンスが含まれます)。カスタムプロジェクトのサンガーシーケンスの再解析は24以上のサンプル数を確保してください。(サンプル数が24に達していない場合、追加の手数料がかかる場合があります。)

***リーフディスクの正確な必要数は様々な要因によって異なります(葉の年齢、プロジェクトのサイズ/スケール、植物種など)。お客様のプロジェクトに必要な正確なリーフディスクの枚数については弊社担当者にご相談ください。

HMW = High Molecular Weight (高分子量)



Integrated tools. Accelerated science.

   @LGCBiosearch | [biosearchtech.com](https://www.biosearchtech.com)

All trademarks and registered trademarks mentioned herein are the property of their respective owners. All other trademarks and registered trademarks are the property of LGC and its subsidiaries. Specifications, terms and pricing are subject to change. Not all products are available in all countries. Please consult your local sales representative for details. No part of this publication may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording or any retrieval system, without the written permission of the copyright holder. © LGC Limited, 2020. All rights reserved. GEN/0241/EK/0220

BIOSEARCH[™]
TECHNOLOGIES
GENOMIC ANALYSIS BY LGC