Service Report

ご所属名

ご依頼者名

日付

Project ID: **TST88**

（弊社ID）

受入サンプル種:	グリセロールストック	1	枚	全解析枚数	1	枚

受入名称	→	弊社ID	受入名称	→	弊社ID
TTH	→	TST88A01NGRM0001			

SAMPLE FLOW

Incoming Plate

Glycerol (GR) ↓

Amplify Plate

TempliPhi(TM) ↓

Reaction/Purify

Reaction(SQ) ↓

Sequencing

ABI3730xl(AX2)

サンプル情報

DNA with Vectorの場合

vector	pUC118.fna
insertion site	HincII/BAP
insert size (bp)	300-800
由来生物	TTH(16SrRNA)、S. cerevisiae（ITS1）

シーケンスプライマー情報

☑ ユニバーサルプライマー使用
☐ カスタムプライマー使用

☐ サンプル名称ファイル提供
☐ 作業配置図（弊社ID_配置図.xls）

F　弊社設計プライマーM13-47B

納品データ名称

☐ サンプル名称 + ウェル番号 → ☐ 「.f 」or「.r 」区別
☐ プレート名称 + ウェル番号 → ☐ 「.f 」or「.r 」区別
☑ ご指定名称 → ☑ 「.f 」or「.r 」区別
☐ ご指定名称(サンプル名_プライマー名)
☐ その他

オプション

☑ BLASTn
☑ BLASTx
☑ DDBJ
☐ その他

担当者コメント

例：概ね良好な結果が得られました。

担当者:　担当者名
確認者:　確認者名

タカラバイオ㈱ドラゴンジェノミクスセンター
〒512-1211　三重県四日市市桜町7870-15
TEL　059-329-8560
FAX　059-329-8556
E-mail　bio-seq@takara-bio.co.jp

作業概要及び、納品データの説明

1.サンプル管理
　本解析にあたり、個別にプロジェクトIDを発行し全てのプレートを弊社サンプル管理システムでバーコード管理して作業を行った。

2.鋳型の調製
　ご提供サンプルがPCR産物の場合はアガロースゲル電気泳動を行い[*1]、酵素反応処理により精製しシーケンス用テンプレートを調製した。
　その他サンプルの場合はRolling Circle Amplification（RCA）法によりシーケンス用テンプレートを調製した。

3.シーケンス反応
　調製したテンプレートDNAを鋳型として、指定のプライマーを用いてDye Terminator法によりシーケンス反応を行った。

4.シーケンス
　シーケンス反応産物はゲルろ過法または市販のキットを用いて精製し、キャピラリー型シーケンサーを用いてシーケンス解析を実施した。

5.データ処理
　得られた波形データについてシーケンサー付属のベースコーラーを用いて波形データに変換し、Quality値を得た。
Quality値が15以上である塩基が300塩基以上のリードを有効とした（配列長が短いPCR産物の場合はその限りではない）。

　得られた全シーケンスデータについて、弊社独自のIDからご指示いただいた指定の名称へrename作業を行った。
その後、PFP（Paracel Filtering Package：パラセル社）により、Quality値が15未満の両端低Quality塩基のマスキング
およびベクター配列の除去（PCR産物除く）作業を行った。

6.納品データ
　次項に納品データを示す。

納品データ

シーケンサー付属のベースコーラーを用いてベースコールしたデータ

◎SCF＊2

シーケンサー付属のベースコーラーを用いて波形配列データに変換したSCF形式クロマトデータ

◎AB1＊2

シーケンサー付属のベースコーラーを用いて波形配列データに変換したAB1形式クロマトデータ

◎FASTA

シーケンサー付属のベースコーラーを用いて波形配列データに変換したFASTA形式テキストデータ

◎TRIM_FASTA

塩基配列のFASTA形式テキストデータから両端低Quality塩基およびベクター配列を機械的に取り除いたデータ
※取り除きはコンピュータで機械的に行なっているため、ベクター：インサート境界のQualityによっては、完全に取り除けていないデータも存在する。

鋳型がPCR産物の場合は両端低Quality塩基除去のみを行なっている。

◎MULTI_FASTA

FASTAおよびTRIM_FASTAの各ファイルをマルチ形式にしたファイル（FASTA→all.fasta、TIRM_FASTA→trim.fasta）

◎Phdcount.csv

各リードのQuality値が15以上の塩基数を示すcsvファイル
<Phdcountファイルについて>参照

◎TXT

シーケンサー付属のベースコーラーを用いて波形配列データに変換したplain塩基配列テキストデータ

◎TRIM_TXT

TXTデータから両端の低Quality塩基を機械的に取り除いたデータ
※取り除きはコンピュータで機械的に行なっているため、ベクター：インサート境界のQualityによっては、完全に取り除けていないデータも存在する。

○BLAST＊3

テキストデータを検索クエリーとして、相同性検索を行っている。
検索データベースには、GenBank　Non-redundantデータベース(検索時点で最新のデータベース)を使用した。
ddbj-*についてはDDBJデータベース(検索時点で最新のデータベース)を使用した。
＜相同性検索について＞参照

PCR産物の電気泳動写真データ

○EPQC＊1

＜電気泳動写真について＞参照

^^

＊1　ご提供サンプルがPCR産物の場合のみ納品

＊2　クロマトデータ（波形データ）を閲覧するには波形閲覧ソフトが必要となります。

波形データを閲覧するには波形閲覧ソフトが必要となります。
インターネットからダウンロード可能なフリーソフトをご案内いたします。

- Sequence Scanner ソフトウェア ver1.0 -
このソフトは波形の生データとベースコールデータの閲覧が出来ます。
波形の印刷が可能です。
Sequence Scanner ソフトウェア ver1.0ダウンロードアドレス
http://www.appliedbiosystems.co.jp/website/jp/product/modelpage.jsp?MODELCD=97746

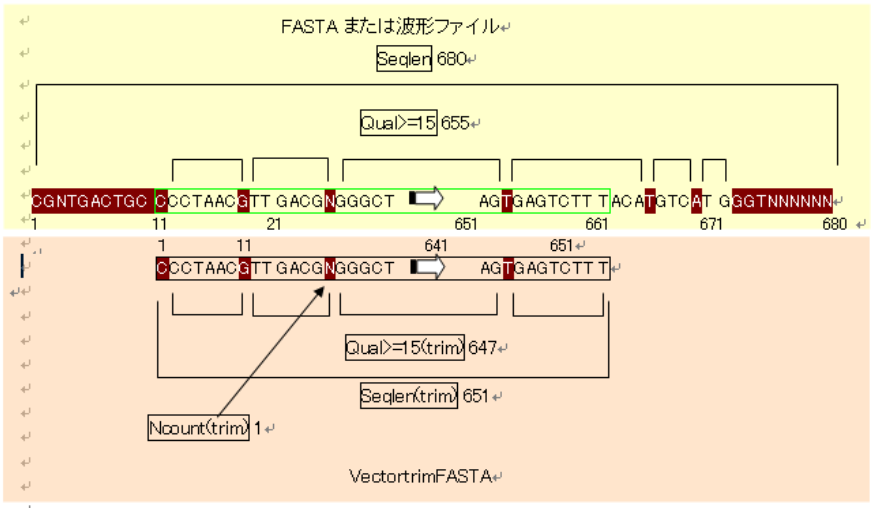
－Sequencher－
このソフトは波形閲覧とアセンブルを両方できる機能を備えています。
SequencherのDemo版でしたら無償でインターネットからダウンロード可能です。
ただしdemo版ですので印刷や保存が出来ません。
Sequencher demo版ダウンロードアドレス
http://genecodes.com/demo-download
（ご購入いただけます）タカラバイオHP>製品情報>解析機器>解析ソフトウエア
http://catalog.takara-bio.co.jp/index.asp

＊3　オプション（ご希望により無料で納品）

^^

<Phdcountファイルについて> (Phdcount.csv)

■Plate	弊社シーケンスプレートバーコードID
■Well	シーケンスプレートのwellポジション
■Name	ご指定いただいた名称(ベースコールしたデータファイル名と一致)
■Seqlen	ベースコールを行った塩基配列データの配列長
■Qual>=15	Seqlenに含まれるQuality値が15以上の塩基数
■Seqlen(trim)	Seqlenから両端低Quality塩基を機械的に取り除き残った配列の配列長
■Qual>=15(trim)	Seqlen(trim)に含まれるQuality値が15以上の塩基数
■Ncount(trim)	Seqlen(trim)に含まれるN(ベースコール不可塩基)数
■Qual-view	塩基配列データ精度を視覚的に示した図 ・ハイフンまたは( )を1領域(20base)として表示。 ・ハイフンの場合は、その領域の20塩基はすべてQual値15 以上であり、高精度領域であることを意味する。 ・( )内数字の場合は、その領域(20塩基)のうちQuality値15未満の塩基数を表し、 数値が大きいほど低精度領域であることを意味する。 ・上記Seqlen(trim)の配列長の始めを#S、終わりをF#で示した。



■ 領域はQualityValue15未満の塩基を示す

〈相同性検索について〉 (blastn.csv、またはblastx.csv)

blast検索結果をcsv形式（カンマ区切りのテキストファイル）で格納している。
Microsoft EXCELやテキストエディターで閲覧することが可能。各カラムの説明は下表を参照のこと。

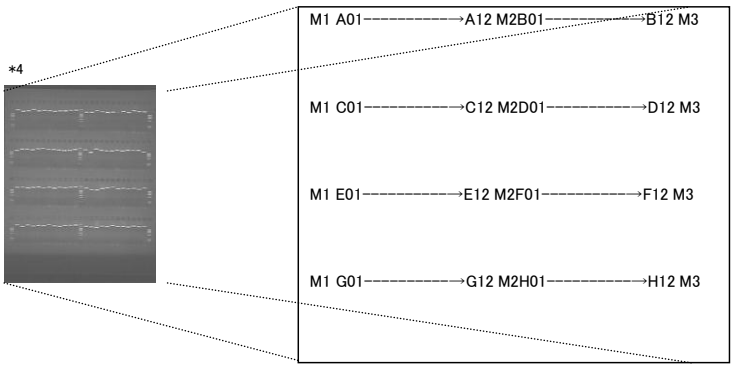
■No	Hit(ヒット)毎につく連番
■QueryNo	各query毎につく番号
■Query	検索に用いた配列名
■Plate	弊社シーケンスプレートID
■Well	シーケンスプレートのwellポジション
■QUERY_SIZE	queryの配列長
■Database	BLAST検索に用いたデータベース
■QUERY_HIT	1つのquery内で複数ヒットした場合にクエリ内でつく連番 top hitは1となる
■Comment	ヒットした配列のID
■ ORG	Commentより生物種名を抽出(ただしコンピュータで機械的に抽出しているため実際は種名でない場合も含まれる)
■ Kind	BLASTnの場合： Commentより「16S」「18S」「chromosome」「mRNA」「cDNA」「STS」「Vector」「gene」のキーワードを抽出 BLASTxの場合： Commentより「ase」「hypothetical」「inhibitor」「ribos omal」「receptor」「subunit」のキーワードを抽出
■Comment2	ヒットした配列のAccession ID
■Length	ヒットした配列の配列長
■HitPosNo	queryが1つのsubjectの複数個所にヒットした場合にsubjectの位置毎に付与される連番□ （プレート単位塩基配列解析の場合には1と表示）
■Score	検索結果の相同性スコア
■Expect	検索結果の期待値
■Identities_1	同一残基(塩基)数　一致した塩基数
■Identities_2	同一残基(塩基)数　アライメントされた塩基数
■Positives_1	アミノ酸の場合のみ表示　同一残基数　類似したアミノ酸残基
■Positives_2	アミノ酸の場合のみ表示　同一残基数　アライメントされたアミノ酸残基数
■Frame	翻訳のフレーム
■Gaps	アライメント中でギャップとなった残基数
■Strand	queryとsubjectのアライメントの際の方向
■QUERY_START	query上でのアライメントの開始位置
■QUERY_END	query上でのアライメントの終了位置
■SUBJECT_START	subject上でのアライメントの開始位置
■SUBJECT_END	subject上でのアライメントの終了位置
■QUERY_STRING	アライメントされた部位のqueryの配列
■SUBJECT_STRING	アライメントされた部位のsubjectの配列
■Linkadless	ヒットしたsubjectのリンク情報(URL) *4
■P	空欄

*4blastn(x).csvファイルを開けて別名保存をすると、リンク情報が失われます。ファイルは閉じた状態でファイルごとコピーを行ってください。
・blastn.csvおよびblastx.csvのBLAST検索についての詳細は、http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

〈電気泳動写真について〉 (弊社ID.jpg)

【PCR産物の場合】
●写真ファイル名（プロジェクト名：DGC01の場合）
DGC01A(またはC)01NPCM####(4ケタ数).jpg

●電気泳動像の96ウェル並びとの対応
マーカーM1:φ 174HaeⅢ　50ng、M2:pHY　100ng、M3: φ 174HaeⅢ　100ng（1uLをアプライ）



*4この写真は説明用です。電気泳動写真は納品物のEPQC内のファイルをご確認ください。

Incoming Plate ID　TST88-A-01-N-GR-M-0001

DATA VIEW

Sequence Plate ID　TST88-A-01-N-AX-M-0003

Quality Value>=15　BaseCaller: KB　Criolity: 15/300 > 70.0%

bp	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	946	965	947	917	963	966	965	943	952	896	927	253
B	924	977	992	968	995	979	970	487	957	946	909	786
C	971	984	898	995	994	987	989	966	960	950	928	899
D	950	988	1009	1002	1003	1001	945	919	967	952	923	893
E	915	740	999	1005	1015	936	978	977	970	949	957	880
F	141	1002	1006	991	1012	987	1004	969	957	935	923	915
G	867	968	920	921	920	977	964	963	958	938	925	476
H	902	968	982	986	904	964	986	917	931	684	930	897

	PhredValue>=15, Morethan 300base	OK clone	94 (98%)
	PhredValue>=15, Morethan 100base	NG clone	2
	PhredValue>=15, Lessthan 100base	average (bp)	923

WORKING PROCESS

Incoming Plate
- Plate ID: TST88-A-01-N-GR-M-0001
- Offset: ALL
- Date:
- Reagent:
- lot:

Accessory:

- Plate ID:
- Offset:
- Date:
- Reagent:
- lot:

Accessory:

- Plate ID:
- Offset:
- Date:
- Reagent:
- lot:

Accessory:

Amplify Plate
- Plate ID: TST88-A-01-N-TM-L-0001
- Offset: A01
- Date: 2012/3/15
- Reagent: TempliPhi(GE Healthcare Biosciences)
- lot: B4670074 E4670075

Accessory:

Reaction/ Purify
- Plate ID: TST88-A-01-N-SQ-L-0001
- Offset: A01
- Date: 2012/3/16
- Reagent: BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
- lot: 10@2@m13-47b@|||bigdye30@0.05ul@50pmol(90202008)@0.3ul(2/21)@0.85ul(1112136)@T106R@offsetA1@@@@@

Accessory:

- Plate ID:
- Offset:
- Date:
- Reagent:
- lot:

Accessory:

Sequencing
- Plate ID: TST88-A-01-N-AX-M-0003
- Offset: ALL
- Date: 2012/3/21
- Reagent:
- lot: X(1108032)@@EDR使用.

Accessory: