

RRBS 受託サービスガイドライン

サンプルは高品質のゲノム DNA が得られる方法で精製し、日本ジェネティクス株式会社に送付してください。

詳細な手順については「RRBS 受託サービスサンプル提出ガイドライン」をご参照ください。

RRBS 受託サービスワークフロー

1. ゲノム DNA の QC

- Qubit (Thermo Fisher Scientific 社) を使用した DNA 濃度測定
- Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies 社) を使用した DNA クオリティ評価

2. RRBS ライブラリー調製

- MspI 消化
- ライブラリー調製 (末端調製、アダプターライゲーション)
- サイズの選択
- サンプルプーリング
- バイサルファイト変換
- ライブラリーの増幅とクリーンアップ
- RRBS ライブラリーの QC (DNA 濃度、フラグメント解析)

詳細な手順については Diagenode 社 「Premium RRBS kit」 のマニュアル (<https://www.diagenode.com/documents/premium-rrbs-kit-manual-24rxns>) をご参照ください。

3. ディープシーケンス

- イルミナーシーケンサー (PE50)
- 10 サンプルをプールした場合、1 サンプルあたり平均 40,000,000 リードを取得

4. バイオインフォマティクス解析

クオリティチェック、バイサルファイトシーケンスデータのリファレンスゲノムへのアライメント、CpGヌクレオチドのメチル化状態の決定（メチル化コール）を含みます。

納品データ

- シーケンスと CpG メチル化統計のレポート
- オリジナルリードを含む FASTQ ファイル
- シーケンスされたリードのクオリティに関する FastQC およびトリミングレポート
- BAM 形式のアライメントファイル
- アライメントおよびメチル化レポート
- bedGraph 形式のシトシンメチル化ファイル

5. ご要望に応じた追加のバイオインフォマティクス解析

- **Differential methylation analysis:** サンプルグループ間におけるメチル化変動領域 (DMR) の同定とアノテーション(ヒト、マウス、ラット、ショウジョウバエ)
 - メチル化変動解析の Summary とプロットを含むファイル
 - CpG 部位のメチル化変動とその領域分析 (CpG アイランド、shelf、shore、open sea) における内訳を含むファイルおよびヒト、マウス、ラット、ショウジョウバエにおけるアノテーションファイル (エクソン、イントロン、プロモーター、遺伝子間領域における CpG 部位)
 - メチル化変動領域 (DMR) を含むファイル
- **Annotation with genomic regions:** ヒト、マウス、ラット、ショウジョウバエのイントロン、エクソン、プロモーター、遺伝子間領域および CpG アイランド、shelf、shore、open sea における領域分析およびメチル化 CpG のアノテーション

- **Gene ontology terms analysis:** 遺伝子セットのエンリッチメント解析。メチル化 CpG で過剰に発現している遺伝子オントロジー（GO） terms は、その根底にある生物学的プロセスを示している可能性があります。
- **Pathway analysis:** 過剰発現している可能性のあるメチル化 CpG に関連する遺伝子の生化学的経路を同定します。

6. その他の注意事項

サンプル調製・送付については必ず Diagenode 社のガイドラインに従ってください。ご提供いただいたサンプルの QC が基準に満たない場合、再度新しいサンプルをご提供いただき追加の QC を行います。ただし、再提供および品質確認にかかる追加料金はお客様負担となります。サンプル提供が遅れますと、納期に影響する可能性があります。

解析結果データは、Diagenode WEB サイトよりダウンロード可能です。解析終了後、Diagenode SA (ベルギー) よりログイン及びダウンロード方法についてご連絡いたしますので、1 ヶ月以内にダウンロードをお願いいたします。また、予備期間として 3 ヶ月間はサーバー上に保存されていますが、それ以降は削除されますので、長期間の保存を希望される場合は早めにご連絡ください。

お客様からお預かりしたサンプルは、Diagenode 施設にて解析終了から 4 ヶ月間保管した後、順次廃棄いたします。お客様のご要望に応じて、サンプルのご返却も可能です。ただし、ご返却には追加費用が必要となります。

ご依頼いただいた内容の範囲外となる追加サービスの料金はお客様負担となります。