

東京大学大学院 工学系研究科  
小林 肇 様

# 作業報告書

(受注番号: 22101302)

2022年11月10日  
株式会社生物技研

## ライブラリー調製とシーケンシング解析

### 1. DNA溶液の定量測定

QuantiFluor dsDNA System と Quantus Fluorometer(Promega)を用いて、DNA溶液の濃度測定を行いました（表1-受入れDNA濃度）。

### 2. DNAの品質確認

5200 Fragment Analyzer SystemとAgilent HS Genomic DNA 50 kb Kit (Agilent Technologies)を用いて電気泳動を行い、品質の確認を行いました(図1)。

### 3. DNA断片化

g-tube (Covaris)を用いてDNAの断片が約10-20 kbp になるように断片化をしました(図2、表1-剪断DNA濃度)。

### 4. ライブラリー調製

SMRTbell Express Template Prep Kit 2.0 (PacBio)を用いて、  
Procedure & Checklist - Preparing HiFi Libraries  
from Low DNA Input Using SMRTbell® Express  
Template Prep Kit 2.0 のマニュアル通りにライブラリー調製  
を行いました。

### 5. シーケンシング解析

Binding kit2.2 (PacBio)を用いてマニュアル通りに作製された  
ライブラリーのポリメラーゼ複合体を形成し、Sequel IIe  
(PacBio)を用いてシーケンシングを行いました。

## データ解析

### 1. HiFiリードの作成

SMRT Link(v.11.0.0.146107)を用いて、シーケンシングで得られた配列からアダプター配列を除去し、サブリードを形成しました。そのサブリードをアライメントしたコンセンサス配列(CCS)を作成した後、1リードあたりの平均品質値が20未満のCCSリードを除去し、HiFiリードとしました。

### 2. 短い配列の除去

Filtlong (ver 0.2.0)を用いて、1,000塩基以下のHiFiリードを削除致しました(表1)。

### 3. ゲノムアセンブル

Flye (ver 2.9)のデフォルト条件で、高品質のHiFiリードをアセンブルしました(表2)。

### 4. アセンブル結果の確認

Bandage (Ver 0.8.1)を用いてアセンブルされたコンティググラフの結果を確認しました(図3)。

### 5. ゲノムデータの確認

CheckM (Ver 1.2.0)を用いて、アセンブルされたゲノムデータの完全性を確認しました(表2)。

### 6. 遺伝子の予測

Prokka (Ver 1.14.5)を用いて、アセンブルされた配列から遺伝子を予測しました(表2)。

### 7. KEGG解析

予測された遺伝子配列とKEGGデータベースの配列をBLASTN (ver. 2.11.0)を用いて比較し、遺伝子配列にKEGG\_IDを割り当てました(E-value < 1e-5)。

### 8. GO解析

予測されたタンパク質配列とGene Ontologyデータベース(geneontology.org/)の配列をBLASTX (ver. 2.11.0)を用いて比較し、登録されていたタンパク質配列にGO termを割り当てました(E-value < 1e-5)。

## 納品データ

出力された配列ファイル等のデータを記録媒体に保存、またはアップロードいたしました。詳細は、納品データ内の「納品データのご説明」をご覧ください。

## 【ライブラリー調製とシーケンシング解析の流れ】

