# 微生物タイピングサービス
# （NGS MLST解析サービス）

## ゲノム配列決定と一緒にタイピングしてみませんか。

**ファスマック次世代シーケンス解析サービスに微生物タイピング解析をラインナップしました。**

### MLST (Multi locus sequencing typing) 解析とは

複数の遺伝子領域（通常７領域以上）の変異をパターン化して、菌のタイピングを行う方法です。16srRNA遺伝子解析では判別できなかった詳細な株の情報が得られます。従来のMLST解析は7つの遺伝子領域をPCR増幅して、サンガーシークエンスにより遺伝子領域ごとに配列決定を行い、パターンを決定する方法であり、各遺伝子領域のプライマー設計、PCRバイアス、サンプル数の増加による膨大な数のPCRなど煩雑な作業を含んでいました。これに対してNGSを利用したMLST解析はショットガンゲノムシークエンスにより得られた配列データを近縁種のゲノムにマッピングすることによって7つの遺伝子領域を同時に同定し菌のタイピングを行う方法であり、従来の方法に比べて迅速かつ高精度に行うことができると考えられます。

### 解析事例 ※自社データ

単離株のゲノムと環境中の菌同定を想定した試料（単離株のゲノムに環境DNAに混合したもの）を用意し、タイピングを行いました。用意した株は*Bacillus subtilis* subsp.*subtilis* str. 168（グラム陽性菌）、*Pseudomonas protegens* Pf-5（グラム陰性菌）で、これらのサンプルについてMiseqでゲノムシークエンス、タイピングを行いました。

*1: Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168
*2: Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 + soil DNA
*3: Pseudomonas protegens* Pf-5
*4: Pseudomonas protegens* Pf-5 + soi DNA

### 表1. アセンブル結果

| Name | N50 (bp) | Minimum(bp) | Maximum (bp) | Average (bp) | Count | Total |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 887484 | 200 | 1046547 | 23092 | 183 | 4225831 |
| 2 | 579 | 200 | 1016147 | 545 | 31877 | 17387652 |
| 3 | 781409 | 200 | 2199573 | 10551 | 688 | 7259413 |
| 4 | 712 | 200 | 1141065 | 644 | 27654 | 17798799 |

### 解析のワークフロー

※CLC Microbial Genomics Moduleのツールを使用した

Sample Sequence Reads
↓
クオリティフィルタリング
↓
K-mer分布を用いた最近縁種の推定
↓
近縁種へのマッピング
↓
MLST解析のための遺伝子領域の同定
↓
MLSTデータベースを用いたMLST解析
↓
K-mer 系統樹の作成　SNP系統樹　※オプション解析

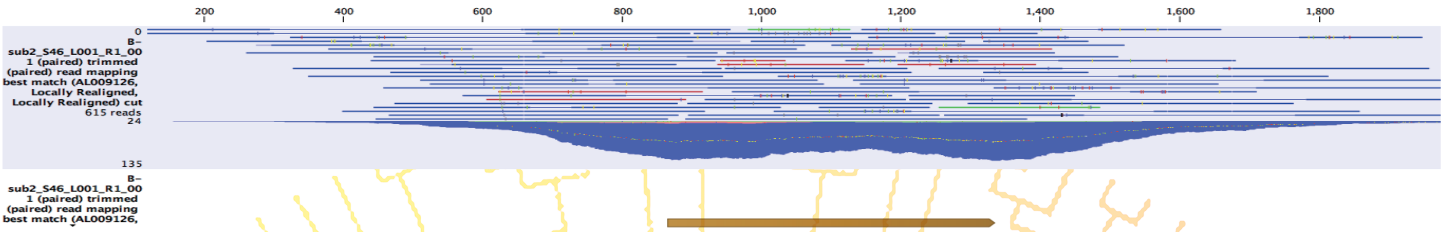
### 表2. マッピング結果

サンプル2と4に対してK-mer分布を用いて最も近縁な種を同定し、これらのゲノムをリファレンスとして、マッピングを行いました

| Name | Reference | Reads mapped to ref. | Percentage of ref. covered | Average coverage* | Genome Length (bp) | Description |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | AL009126 | 88.70% | 100.00% | 256.26 | 4215606 | *Bacillus subtilis subsp. subtilis* str. 168 complete genome. |
| | Unmapped | 11.30% | - | - | - | - |
| 4 | CP000076 | 88.20% | 100.00% | 141.07 | 7074893 | *Pseudomonas protegens* Pf-5, complete genome. |
| | Unmapped | 11.80% | - | - | - | - |

## 図1. MLST解析対象の遺伝子領域へのマッピング結果

図は*ilvD*: バリン、ロイシン、イソロイシンの合成経路に関わる遺伝子 (2,111 bp) へのマッピング結果を示しています。




MLST解析に必要な7つの遺伝子領域を同定しました。(*glpF, ilvD, pta, purH, pycA, rpoD, tpiA*)

## 図2. NGS MLSTの解析結果

### NGS Multilocus sequence typing Typing results

#### サンプル 2

This report uses the MLST Scheme "*Bacillus subtilis* (2017-11-20)".

#### Summary: ST 1

The analysis was completed. Result: ST 1.

#### Allelic Profile and Sequence Type

| Gene | Allele sequence | Status & Allelic profile | Minimum coverage |
|---|---|---|---|
| *glpF* | [illegible] | Match: 1 | 240 |
| *ilvD* | [illegible] | Match: 1 | 127 |
| *pta* | [illegible] | Match: 1 | 257 |
| *purH* | [illegible] | Match: 1 | 216 |
| *pycA* | [illegible] | Match: 1 | 196 |
| *rpoD* | [illegible] | Match: 1 | 165 |
| *tpiA* | [illegible] | Match: 1 | 228 |

| *glpF* | *ilvD* | *pta* | *purH* | *pycA* | *rpoD* | *tpiA* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Match: 1 | Match: 1 | Match: 1 | Match: 1 | Match: 1 | Match: 1 | Match: 1 |

Sequence Type: 1.

### NGS Multilocus sequence typing Typing results

#### サンプル 4

This report uses the MLST Scheme "*Pseudomonas fluorescens* (2017-11-20)"

#### Summary: ST 3

The analysis was completed. Result: ST 3.

#### Allelic Profile and Sequence Type

| Gene | Allele sequence | Status & Allelic profile | Minimum coverage |
|---|---|---|---|
| *glnS* | [illegible] | Match: 3 | 82 |
| *gyrB* | [illegible] | Match: 3 | 154 |
| *ileS* | [illegible] | Match: 3 | 141 |
| *nuoD* | [illegible] | Match: 3 | 125 |
| *recA* | [illegible] | Match: 3 | 137 |
| *rpoB* | [illegible] | Match: 3 | 156 |
| *rpoD* | [illegible] | Match: 3 | 147 |

| *glpS* | *gyrB* | *ileS* | *nuoD* | *recA* | *rpoB* | *rpoD* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Match: 3 | Match: 3 | Match: 3 | Match: 3 | Match: 3 | Match: 3 | Match: 3 |

Sequence Type: 3.

本手法での解析により、環境DNAに混在した株を同定することができました。このように優占種が大部分を占める環境には限定されますが、メタゲノムのような環境に対しても近縁種を推定してMLST解析を行うことが可能であるといえます。NGSを用いた本手法は今後、様々な分野で幅広く利用されることが期待されると考えられます。

## サービスと価格

| MLST解析はゲノムドラフト解析のオプションサービスとして承ります。 | **ゲノムドラフト解析：250,000円**<br>**Sequence Typeのタイピング：+ 40,000円** |
|---|---|

FASMAC
株式会社ファスマック

〒243-0021 神奈川県厚木市岡田3088 ケーオービルA棟　4階
株式会社ファスマックバイオ研究支援事業部
次世代シーケンス解析サービス担当

TEL:046-281-9909
Email ご注文／お問い合わせ用‥ngs@fasmac.co.jp
http//fasmac.co.jp