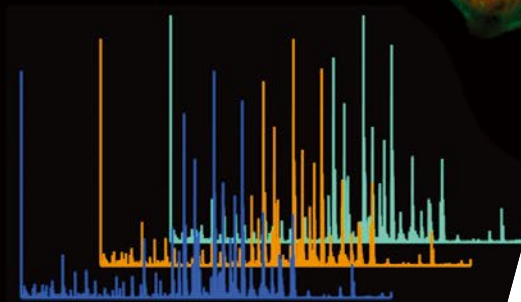
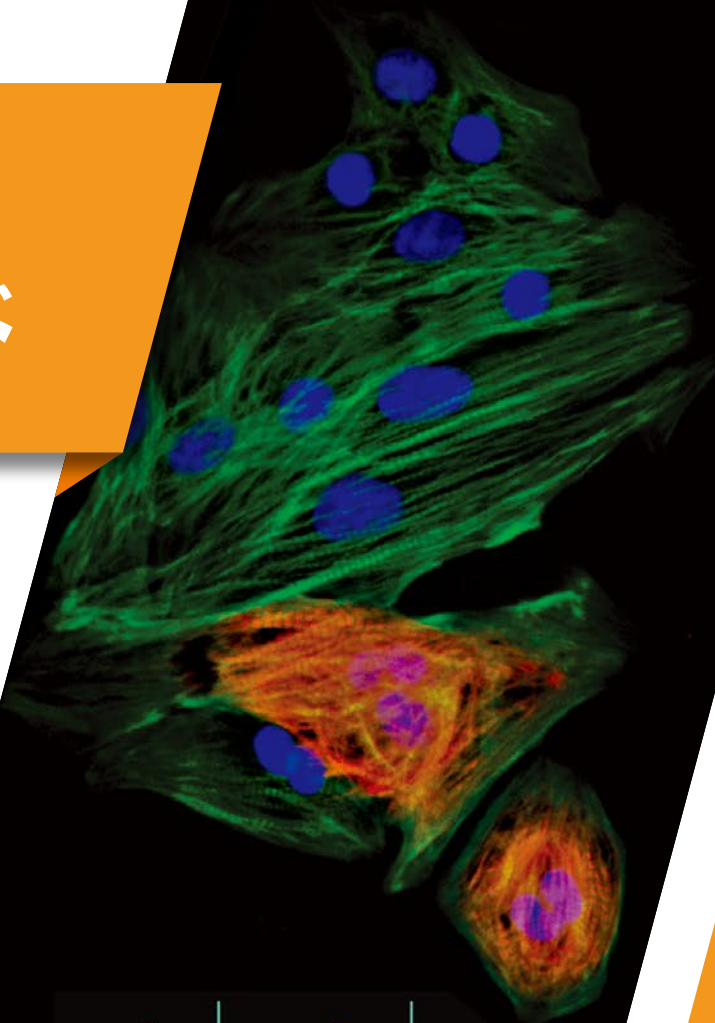


# 安心国内受託 サービスガイド



委託業務実施機関元：  
公益財団法人かずさ DNA 研究所

**KGT**

供給元：  
株式会社かずさゲノムテクノロジーズ

## プロメガ株式会社

# オミックス解析からの仮説創出とセルベース解析による実証サイクルの必要性



公益財団法人かずさ DNA 研究所  
副所長  
ゲノム事業推進部長  
小原 収 先生

近年のライフサイエンスの研究活動ではオミックス解析など仮説創出型のアプローチが多くとられています。しかし、これらの手法から網羅的で大量のデータが得られたとしても生物学的な意味が即座に得られる訳ではなく、細胞など生きた生体システムを用いた仮説検証型のアプローチとの両輪をうまく回転させることが非常に重要です。

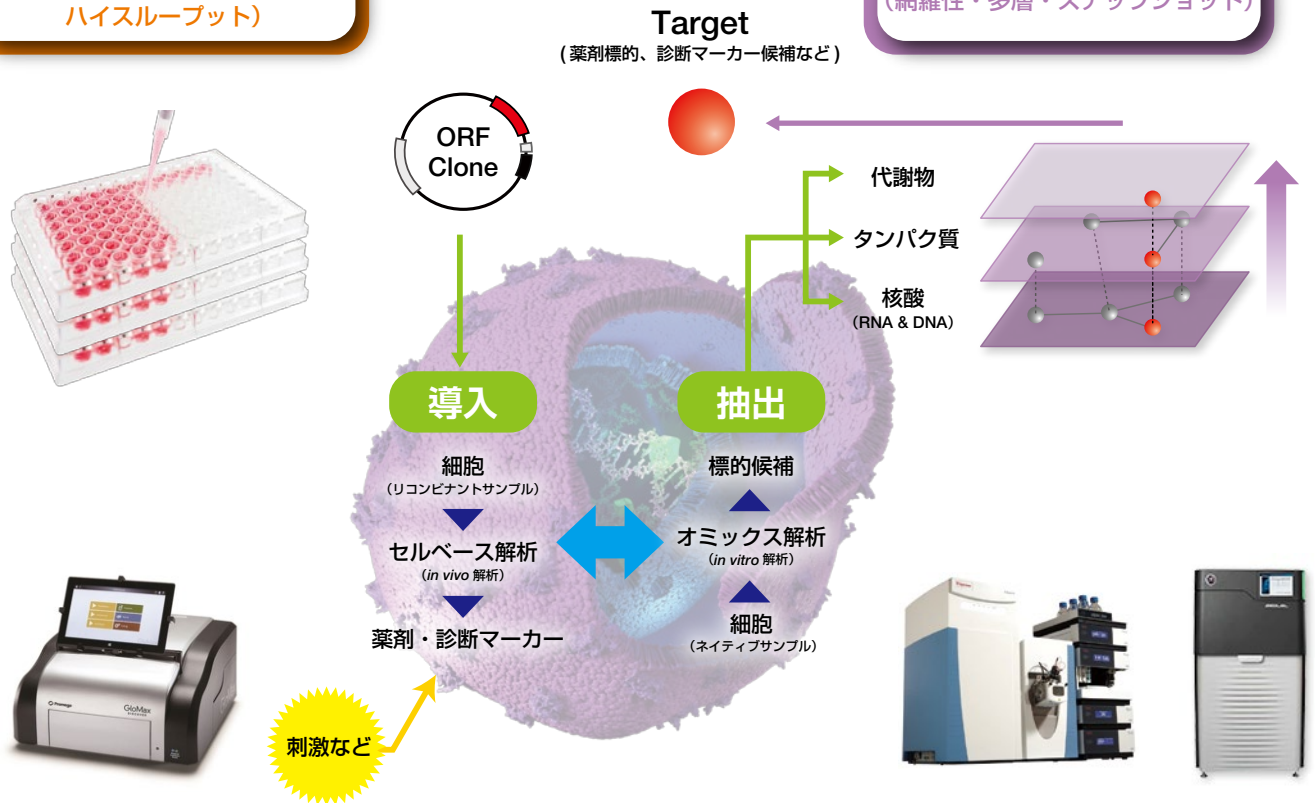
現在汎用されている次世代シーケンサーや質量分析装置によるオミックス解析は、技術の進歩による恩恵を受け、従来個々の「点」を深く探る解析から「面」としてとらえる解析へとシフトし、生成される情報量も桁違いに増加し、多くの新しい知見を得ることができるようになりました。しかし、これらの手法は細胞を破壊し、その時点での生体分子を網羅的にプロファイリングできるという利点がある一方で、それぞれの系の「スナップショット」しか得られないという致命的な弱点もあります。こうしたオミックス解析の知見を細胞内の動的な反応と結びつけて仮説検証を進める上で、セルベース解析は一つの重要なツールとなります。プロメガは発光・蛍光タンパク質をレポーターとした様々な革新的な測定技術を保有されており、特にそのレポーターをなるべく内在性に近い状態で測定できるようにしたセルベース解析サービスを開始されました。これにより、細胞のターゲットを絞った動的挙動を発光・蛍光レポーターで測定し、細胞内でどのような生体分子の量的プロファイルの変化が生じているかをオミックス解析するという一つのサイクルが完結します。これら実験サイクルを回す上で多くの研究者の方がこれまで大きなフラストレーションを感じてこられた様々なギャップ（マンパワー、一時的に必要な機器、高額装置と運用スキル、専門的な解析技術）を埋める、様々なサービスをプロメガが創出し、日本の研究者の皆様にお届けしていただくことに期待したいと思います。

## セルベース解析

(生体応答性、フェノタイプ検証、ハイスループット)

## オミックス解析

(網羅性・多層・スナップショット)



プロメガの受託サービスの概要

## プロメガが提案する安心国内受託サービス

安心国内受託サービスは研究者のみなさまのお困りごとを解決するオミックス解析、セルベース解析受託、ならびにクローンの分譲・改変サービスです。最新のNGS装置および質量分析装置を駆使したオミックス解析からそれらのデータを実証するための培養細胞を用いた各種解析サービスを幅広く提供いたします。

# NGS 解析受託

## 概要

- DNA を冠した日本初の研究所 “かずさ DNA 研究所” による NGS 受託解析サービス
- 日本初の PacBio Sequel® の認証サービスプロバイダーによる Sequel® (ロングリード) シーケンシング堂々開始
- 日本の研究者にきめ細かい事前コンサルティングおよびアフターフォロー

## イントロダクション

第3世代シーケンサーと呼ばれる PacBio Sequel® は、DNA 一分子をシーケンスします。連続した 60 kb 以上の塩基配列も読み取ることができ、全ゲノムシーケンス、アイソフォーム検出、完全長転写産物解読、融合遺伝子検出、ロングアンプリコン解析に用いられています。かずさ DNA 研究所は 2018 年 6 月に、PacBio Sequel® を用いた解析で高品質データを所得できる機関として、開発元のパシフィック・バイオサイエンス社から国内第一号の認証サービスプロバイダーの認定を受けました。

## ロングリードシーケンスでゲノムのより深淵な秘密を解読

私たちは ORF クローンの分譲やベクターコンストラクション、質量分析などの受託解析から基礎医学発展のためのマーカー開発や機能性食品の開発などの共同研究まで幅広い研究支援を行っています。弊所の中心的技術であるシーケンシングに関しては次世代シーケンシング (New Generation Sequencing, NGS) マシンであるイルミナ社の HiSeq、NextSeq、MiSeq を保有しており、これらを用いた受託解析サービスの提供を行っています。全ゲノムシーケンス、Exome-Seq、Target-Seq、MBD-Seq、RNA-Seq、miRNA-Seq 等各種解析に対応しており、通常受託では難しい微量のサンプルや分解サンプルにも可能な限り対応します。さらに、1 細胞 RNA-Seq、1 細胞 TCR 解析も受託可能となりました。

さらに、2017 年 10 月にパシフィック・バイオサイエンス社の PacBio Sequel® を導入し、一分子シーケンスの受託解析を開始しました。今回導入された Sequel は同社 RSII に比べて 6~7 倍のデータ量 (Cell あたり) を得ることができますので、より短期間に解析を進めることができます。

PacBio を用いたロングリードと、他のショートリード解析との最大の違いはもちろリード長が長いことですが、これまで NGS の主戦場であったショートリードではソフトウェアや解析手法の助けがあってもカバーできない不可能な解析も多々あり、一度に長く解読できるロングリードシーケンシングでより複雑な生命暗号をさらに深く解読できるようになります。最近では同社のロングリードシーケンサーでコアアアホロートル (ウーパールーパー) のゲノム解読が行われたように、複雑なゲノムをもつ生物種のゲノム解析に活躍が期待できるほか、ガンに代表されるような構造多型に由来する疾患研究でも有用です。

## ロングリードシーケンシングのできること:

- Iso-Seq (アイソフォームシーケンス): スプライスされて生じる転写産物のアイソフォームは、ショートリードのデータから完全にカバーすることができません。
- 構造多型・変異の解析: 様々な疾患の原因となるゲノムの構造多型や変異 (欠失・挿入・増幅・逆位・転座 etc.) の構造は、SNP (一塩基多型) よりもはるかに長く、複雑で、ショートリードで検出することが困難。
- ハプロタイプの解析: SNP の場合も、それが相同染色体のうちのどちらに生じているか (フェージング) は、ショートリードでは見分けられません。
- リピート配列の解析: ゲノムには、機能が未知のものも含め様々な高頻



PacBio Sequel®



公益財団法人  
かずさ DNA 研究所  
遺伝子分析チーム  
チーム長  
長谷川嘉則 先生

かずさ DNA 研究所は 1994 年に世界初の DNA 専門研究機関として千葉県の支援を受けスタートし、植物やヒトの遺伝子研究を中心に成果を上げて参りました。臨床オミックス解析グループ遺伝子分析チームは、開所以来 20 年余にわたり培った DNA シーケンシング技術 (DNA 塩基配列の読み取り技術) を中心とする各種ノウハウの継承ならびに、次々と公開される新しい技術の整備や独自の開発を担っています。そして、医療や農業を含めた幅広い分野に関わる産学官の皆様のご依頼に応じてこれらの技術を有償で提供することにより、サポート事業を継続的に維持する仕組みを作り上げています。

度反復配列があります。これらは、ショートリードではマッピングができず、解析結果から削除されてしまう対象です。

- リファレンス配列の存在しない未解析の生物、非モデル生物の新規ゲノム配列決定

ロングリードシーケンサーは様々な新発見をもたらす機器である一方、誰もが高品質のデータを取得できるわけではありません。この機器ではこれまで必要であったサンプル DNA の増幅は行わなくて済む代わりに、質の良い DNA、すなわちインタクトで不純物を含まない DNA がマイクログラム単位で必要になります。私たちは長年培われた “かずさ DNA 研究所メソッド” を活かし、厳密なサンプル調製からデータ解析を行い高品質なデータの取得が可能です。パシフィック・バイオサイエンス社は、シーケンス解析だけでなく各プロセスを厳格に評価し、高品質データを取得できる施設を認証サービスプロバイダーとして認定しており、我々認証サービスプロバイダーはパシフィック・バイオサイエンス社との強い結びつきにより最新かつ正確な情報を共有しており、ご依頼いただいた解析に反映させることができます。

さらに網羅的解析としてトランスクリプトーム解析 (発現解析 RNA-seq) とプロテオーム解析を組合わせたマルチオミックス解析も開始しました。

ショート & ロングシーケンスだけでなく所内プロテオーム解析チームと連動したマルチオミックス解析についてのご質問などいつでもお寄せください。



臨床オミックス解析グループ遺伝子分析チーム

# DIA プロテオーム解析受託・マルチオミックス解析受託

## 概要

- DIA プロテオミクス技術によるプロテオーム解析を開始 (8,000 タンパク質の網羅的、比較可能な解析)
- 真のプロテオーム解析とトランスクリプトーム解析 (RNAseq) を組み合わせたリーズナブルなオミックス解析を提案
- フェノールグアニジン系の試薬に漬けたサンプルを送るだけでデータを取得

## イントロダクション

DNA シーケンシングの黎明期だった 1970 年後半から 1980 年代始めに大学院で生命科学の研究をされていたシニア世代にとっては当時の「シーケンシング」と言えば、タンパク質のアミノ酸配列決定だったという生命科学の歴史を思い出されることもあると思います。生体システムの機能を司る主役は、間違いなくタンパク質です。タンパク質の定性的・定量的な計測データから生体システムの機能的な「状態」を記載することは王道中の王道です。しかし、これまで多くの方は圧倒的にトランスクリプトーム解析を生体システムの網羅的な記載に用いてきましたが、転写はタンパク質翻訳への過程に過ぎず、タンパク質解析への回帰が不可欠であることは明らかです。

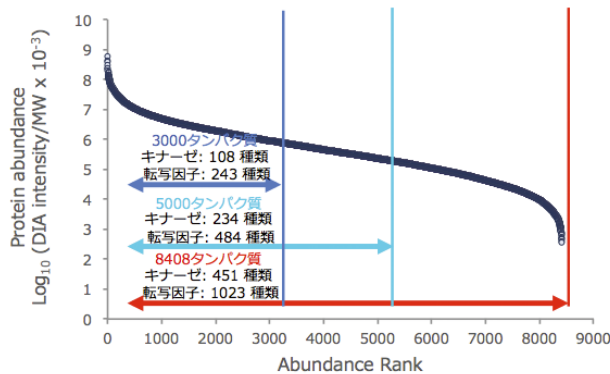


図 1. DIA プロテオーム解析による分析深度の飛躍的進歩

HEK293 細胞を用いて高深度 DIA プロテオーム解析で観測されたタンパク質のダイナミックレンジを示す。本解析では HEK293 細胞から約 8400 種類のタンパク質が観測された (同定の閾値: Protein FDR < 1%, Peptide FDR < 1%)。一般的なプロテオーム解析を想定して、発現量の多い 3000 タンパク質からキナーゼならびに転写因子の数を調べるとキナーゼが 108 種類、転写因子が 243 種類であった。それに対して観測された全タンパク質ではキナーゼが 451 種類、転写因子が 1023 種類と格段に増加した。このことから、キナーゼや転写因子を含めた微量タンパク質を対象とする場合に高深度 DIA プロテオーム解析を行うことに大きなアドバンテージがある。

## 次世代プロテオミクス解析

タンパク質に関する網羅的な解析が主役になりきれなかった原因は、トランスクリプトーム解析などと比較すると分析深度が低く、一般的なプロテオーム解析では約 3000 種類のタンパク質を同定・比較定量できる程度にとどまっていたことです。これでは様々な分野で着目されることの多いキナーゼや転写因子などの微量タンパク質を観測するには不十分であり、さらなる分析深度の拡大が期待され続けてきました (図 1)。かずさ DNA 研究所では次世代プロテオミクスと称されている分析深度、定量性に優れた DIA プロテオミクス技術を取り入れ、さらに最新鋭の質量分析計 (Q-Exactive™ HF-X, Thermo Fisher Scientific 社) で測定することにより、最大 8000 種類のタンパク質を同定・比較定量 (HEK293 細胞を用いた系で行った場合。観測できるタンパク数はサンプルの種類に依存) を行えるシステムを構築しています。私たちは同じ検体からこうした網羅的解析のための RNA とタンパク質を同時に調製できる系も確立しており、更により微量タンパク質からの高感度検出に向けての開発研究を実施しており、正当な「オミックス解析」と呼ぶにふさわしい解析メニューを開発中です。当受託ではここで構築した最先端のプロテオーム解析サービスを提供します。また、この技術をベースにした高深度リン酸化プロテオーム解析なども対応しておりますので、ご興味があればお問い合わせください。



公益財団法人かずさ DNA 研究所  
臨床オミックスユニット  
研究員  
川島祐介 研究員

プロテオーム解析技術の開発を主な研究テーマとして取り組んでおり、開発した技術や培ってきたノウハウをもとに様々な研究室と共同研究を行い、それぞれのニーズに対応しながら多種多様なサンプルのプロテオーム解析をしてまいりました。プロテオミクスという言葉ができてから 20 年以上経ちますが、残念ながらだれもが簡単にプロテオーム解析が行えるわけではなく、同じ質量分析計を持っていても使い手によって観測できるタンパク質数が倍近く変わることもしばしばあります。高度なプロテオーム解析を実現させるためには、サンプルの種類ごとに適切な前処理、目的に合わせた適切な質量分析計のセッティング、パフォーマンスを維持するための質量分析計の適切な管理が必要不可欠です。本受託解析ではこれまでの経験をもとに以上の点を押さえた高度なプロテオーム解析を提供できればと思っています。

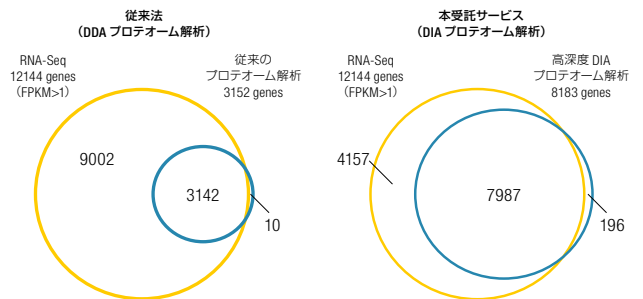


図 2. RNA-Seq とプロテオーム解析で観測された mRNA とタンパク質をコードする遺伝子の重複

RNA-Seq と Q-Exactive HF-X 導入以前のデータ依存型分析法 (DDA) によるプロテオーム解析 (左図) と RNA-Seq と本受託サービスの Q-Exactive HF-X を用いた高深度 DIA プロテオーム解析 (右図) との比較を示す。分析したサンプルは HEK293F 細胞を用い、RNA-Seq とプロテオーム解析のそれぞれの解析で用いたデータベースに共通して存在した遺伝子のみを対象とした。以前のプロテオーム解析では RNA-Seq で観測できる遺伝子数との差が大きかったが、本受託サービスの高深度 DIA プロテオーム解析ではその差が大きく改善され、マルチオミックス解析を行う上で対象となる分子が大幅に増加した。



# 高網羅的脂質メタボローム解析受託

## 概要

- 先進的な研究ノウハウを技術展開した医科学向けの次世代メタボローム受託解析サービス
- 脂質のエキスパートの独自開発の先端技術によるや“高精度かつ高網羅的な”ノンバイアス解析
- コンサルティングを含めた充実したフォローアップ体制

## イントロダクション

メタボロミクスは、ゲノム情報の発現過程の最下流に位置しているオミックス解析の一つの分野で、生体内に存在する代謝物を解析して、代謝変化の背後に関わる分子の探索を行い、表現型や生体機能との関連性を明らかにする研究です。近年、メタボロミクス技術は、医療・食品・環境など様々な分野で応用されている一方で、未だ技術的なハードルの高さが問題となっています。その理由として、それぞれの代謝物に物性の違いがあり（主には親水性と脂溶性に大別される）、生体内での濃度域も大きく異なるために、最先端の分析機器のみならず、それぞれの代謝物の性質に関する知識や経験に裏付けられた方法論が必要となるためです。

本受託サービスでは、“難しいと感じられる”メタボロミクスの先進的な分析・解析技術を“より身近と感じられる”ように情報提供できると考えております。中でも、本受託サービスの特徴として、技術的なハードルが非常に高いとされてきた脂質のノンバイアス解析について、脂質のエキスパートの独自開発技術によって、従来にはない“高精度かつ高網羅的に”探索が可能になっており、新しい研究展開も期待されます。

次世代メタボロミクスの“次世代”の所以は、マルチオミックス解析に向けたプラットフォームの位置づけと捉えているため、他にはないハイレベルでの生命現象などの理解に向けて、今後サービス提供を予定しております。

## 高網羅的脂質メタボローム解析サービス内容

生体内に多種多様に存在する代謝物は、ゲノム情報を有しておらず、増幅させることができないため、液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS)は高感度で一斉的に捉える重要な基盤技術となります。本受託サービスの次世代メタボロミクス技術は、主にフォーカシング(ターゲット)法もしくはノンバイアス(ノンターゲット)法という2つのアプローチに分類され、対象となる代謝物や研究目的に合わせて選択する必要があります。

## フォーカシング(ターゲット)法とは？

現在広く普及しているメタボロミクス技術であり、三連四重極型(Triple-Q型)MSを用いた Multiple Reaction Monitoring (MRM) と呼ばれる分析法が適用されることが多いです(概略図・右部および注①参照)。このフォーカシング法は、このような対象分子の選択性の高い分析法や最適化された前処理法を組み合わせることによって、生体中に極微量(数nMあるいはそれ以下)に存在する代謝物の検出や標的パスウェイの代謝物群の“高深度な”探索に適しています。

本受託サービスでは、GC-MSによる遊離脂肪酸の相対定量解析メニューだけでなく、探索可能なパスウェイを広げた“ワイド”フォーカシング法と呼ばれるGC-MSとLC-MSを組み合わせたアプローチによって、“より包括的な”親水性代謝物の相対定量解析メニューにも対応しております。また、生体機能の恒常維持や病態との関連性で注目されている酸化脂肪酸(エイコサノイド・ドコサノイドなど)やコレステロール代謝物(胆汁酸・ステロール・性ホルモン・副腎皮質ホルモンなど)の解析メニューについても、来年よりサービス展開する予定です。

## ノンバイアス(ノンターゲット)法とは？

高分解能な四重極飛行時間型(QTOF)MSなどを用いた“高網羅的な”メタボロミクス技術であり、近年注目されています。その背景の一つとして、フォーカシング法は分析前に予め設定した代謝物のみが解析対象となり探索範囲に限られるために、“高網羅的な”代謝変化を探索する目的にはマッチングしないことが挙げられます。このノンバイアス法は、



公益財団法人  
かずさDNA研究所  
臨床オミックスユニット  
ユニットリーダー  
池田和貴 研究員

我々はメタボロミクスの黎明期から技術開発や応用研究に取り組んでおり、医学や薬学領域を中心に数多くの実績を積み重ねてきました。一方で、メタボロミクスの研究展開には、代謝物の性質に関する知識やLC-MS分析・解析などの幅広い専門的な技術が必要のため、未だハードルが高く普及の障壁となっているのが現状です。

本受託サービスでは、このようなハードルのためにメタボロミクスに馴染みがない方々にも安心してお試し頂けるように、解析前後でのコンサルティング制度も取り入れております。この取り組みにより、専門的視点から目的に合わせた最適な前処理法・分析法・解析法を選び出し、できるだけ多くの分子の検出や着目する対象を捉えて、研究進展に貢献できるように努めたいと考えております。

また、本受託サービスの技術的な特徴として、メタボロミクスを「オミックス研究」としても位置づけを重視した網羅性の高い“ワイド”フォーカシング解析(親水性代謝物)やノンバイアス解析(脂質代謝物)のメニューがあり、予想外の代謝変動やマーカー分子の発見に繋がることも期待されます。かずさゲノムテクノロジーズ(KGT)との連携によりプロテオミクスなどを含めたマルチオミックス解析のサービスを提供しており、他にはない広範囲かつ高深度な代謝解析プラットフォームを開発展開したいと考えております。

フォーカシング法とは異なって予め対象分子を絞り込まず、代謝物の定性および定量的なデータを同時に取得可能な Data Dependent Acquisition (DDA) モードと呼ばれる分析を駆使して、未知を含めた代謝の変動や標的分子のスクリーニング適しています(概略図・左部および注②参照)。この DDA モード分析では、膨大な定量情報および定性情報を入手可能ですが、これらのデータ処理の効率性や代謝物の同定精度などの高いデータオリティが非常に重要となります。このために、高度なインフォマティクス技術が不可欠であり、これまでボトルネックとなっていました。

本受託サービスでは、かずさDNA研究所独自の高精度な in-house 同定ソフトウェアや高分離分析技術などを組み合わせた先進的なノンバイアス解析技術を通じて、脂質代謝物の“高精度かつ高網羅的な”同定・相対定量解析メニューを提供することが可能です。特に、多種多様な脂質は、エネルギー源や生体膜の構成成分として細胞の形成・恒常性維持や、メディエーターとして細胞内や細胞間の情報伝達を担うなど様々な働きや疾患との関連性で注目されておりますので、他にはない脂質のエキスパートによる日本初サービスをご活用下さい。

※注①

MRM 分析:

三連四重極型 MS の最初の四重極 (Q1) で、分析対象の分子量のイオンを選択的に通過させ、次の四重極 (Q2) で Collision-Induced Dissociation (CID) により生じたフラグメントイオンのうち、その中から特定の部分構造を持つイオンを最後の四重極 (Q3) で選択的に通過させ検出することで、その分子構造特異的な検出を行うことが可能です。

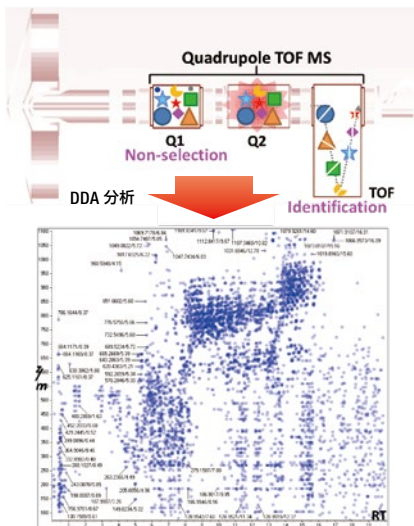
※注②

DDA 分析:

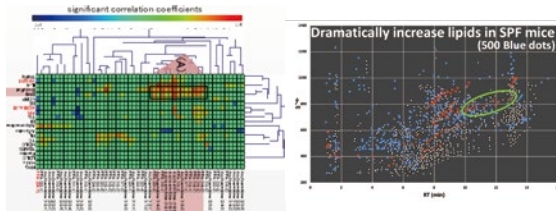
高分解能な四重極飛行時間型 MS などにおいて、最初にサンプル中に含まれる脂質分子の網羅的な検出を行い (MS スキャンニング)、次に設定した強度閾値を越えたものについて自動的に構造解析を行う (MS/MS) モードが適用されます。



### ノンバイアス解析 (ノンターゲット)



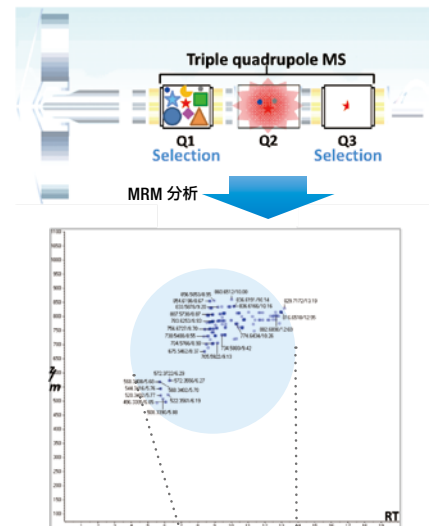
独自の先端的 in-house 同定  
ソフトウェアや分離分析技術



脂質代謝物を中心とした  
変動や標的スクリーニング

“高網羅的な” 代謝物の  
同定・相対定量解析

### フォーカシング解析 (ターゲット)



#### (親水性代謝物)

アミノ酸および誘導体、  
有機酸 (解糖系・TCA 回路  
関連物質、短鎖ヒドロキシ  
脂肪酸など)、核酸、  
糖・糖リン酸、水溶性ビタミン、  
補酵素など

#### (脂質代謝物)

脂肪酸・酸化脂肪酸・コレステロール代謝物など

標的代謝物やパスウェイの  
“高深度な” 相対定量解析

# オミックス解析メニュー

## NGS 解析受託

- サンプル量および品質が下記リスト記載の量に満たない場合でも、解析可能な場合がございます。予めご相談ください。
- 1細胞 NGS 解析 (RNA-seq、TCR、BCR) も承っております。詳細はお問い合わせください

## 第3世代シーケンスサービス

解析メニュー	作業内容	取得データ目安	必要サンプル量	納期
<b>ロングリードシーケンス (PacBio Sequel)</b>				
RNA		40万 - 60万リード	Total RNA : 4 µg 以上 (100 ng/µl 以上)	8週間
DNA	クオリティチェック + ライブラリ調製 + シーケンサーラン	4 Gb - 7 Gb (DNAの品質による)	DNA : 10 µg 以上 (40 ~ 50 kb 以上) で4セルまで5セル以上の場合は4セルごとに10 µgを追加してご送付ください。 QC結果によりDNAに分解が見られた場合は10 µg以上必要な場合もあります。	8週間

## 次世代シーケンスサービス サンプルは1個からでも承ります。

解析メニュー	作業内容	取得データ目安	必要サンプル量	納期
<b>ゲノム解析</b>				
全ゲノムシーケンシング		ご依頼内容ごとに設定	DNA : 2 µg 以上 (100 ng/µL 以上)	4週間~
Human Exome-Seq (100 bp Paired-End)	ライブラリ調製 + シーケンサーラン	8,000万リード、8 Gb	DNA : 2 µg 以上 (100 ng/µL 以上)	8週間
<b>発現解析</b>				
真核生物 mRNA-Seq (TypeA : 50 bp Single-Read)		1,500万リード、750 Mb	total RNA : 2 µg 以上 (40 ng/µL 以上)	4週間
真核生物 mRNA-Seq (TypeB : 100 bp Paired-End)	クオリティチェック + ライブラリ調製 + シーケンサーラン	3,000万リード、3 Gb	total RNA : 2 µg 以上 (40 ng/µL 以上)	8週間
miRNA-Seq (50 bp Single-Read)		1,500万リード、750 Mb	total RNA : 4 µg 以上 (200 ng/µL 以上)	2 - 4週間
3'RNA-Seq		100万リード、200 Mb	total RNA : 2 µg 以上 (40 ng/µL 以上)	8週間
<b>エピジェネティクス関連</b>				
Human Bisulfite-Seq (100 bp Paired-End)		3,000万リード、3 Gb	DNA : 4 µg 以上 (100 ng/µL 以上)	8週間~
MBD-Seq (100 bp Paired-End)	ライブラリ調製 + シーケンサーラン	3,000万リード、3 Gb	DNA : 4 µg 以上 (100 ng/µL 以上)	8週間~
ChIP-Seq (50 bp Single-Read)		ご依頼内容ごとに設定	クロマチン免疫沈降後 DNA : 100 ng 以上 (10 ng/µL 以上)	お問い合わせ
<b>ライブラリ調製</b>				
mRNA-Seq 用			total RNA : 2 µg 以上 (40 ng/µL 以上)	3週間
Total RNA-Seq 用			total RNA : 2 µg 以上 (40 ng/µL 以上)	3週間
Human Exome-Seq 用	ライブラリ調製	n/a	DNA : 2 µg 以上 (100 ng/µL 以上)	3週間
全ゲノム、Target-Seq 用			DNA : 2 µg 以上 (100 ng/µL 以上)	3週間
<b>シーケンサーラン (レーン貸切)</b>				
NextSeq	75 bp Single-Read	4億リード、最大30 Gb		4週間
	75 bp Paired-End Mid	2.6億リード、最大19.5 Gb		
	150 bp Paired-End Mid	2.6億リード、最大39 Gb		
	75 bp Paired-End	8億リード、最大60 Gb		
MiSeq	150 bp Paired-End	8億リード、最大120 Gb		4週間
	150 bp Paired-End	2700万リード、4 Gb		
	250 bp Paired-End	2700万リード、6.7 Gb		
	300 bp Paired-End	4,700万リード、14.1 Gb		
	150 bp Paired-End Nano	200万リード、300 Mb		
HiSeq	250 bp Paired-End Nano	200万リード、500 Mb		4週間
	50 bp Single-Read	1.86億リード、9.3 GB		
	3億リード、15 GB		8週間	
	3.74億リード、37.4 GB		8週間	
	100 bp Paired-End	6億リード、60 GB		4週間
<b>オプションメニュー</b>				
クオリティチェック (バイオアナライザー)				1週間
濃度測定 (定量 PCR)				1週間

## 抗体の可変領域解析

解析メニュー	納期
基本解析	3 - 4週間
CDR 同定	1 - 2週間

5'-RACE 法により5'UTRから定常領域までの塩基配列を取得し、シグナル配列部分の開始メチオニンから可変領域の末端部分までの配列を報告します。かずさ DNA 研究所では大規模 cDNA プロジェクトでの経験を生かし、抗体産生細胞から RNA 抽出を行い、迅速な可変領域配列の決定を行います。

\* 多検体解析のためのボリュームディスカウントなどご用意しております。

\* 解析についても別途お見積りいたします。お問い合わせフォームにてご相談ください。

# オミックス解析メニュー

## DIA プロテオーム解析

本サービスはタンパク質配列が解析されている生物種を対象としたものです。

解析メニュー	作業内容	取得データ目安	必要サンプル量	納期
<b>発現タンパク質の同定と相対定量解析</b>				
簡易 DIA プロテオーム解析 LC-MS/MS (DIA)		2000 - 4000 タンパク質 (他社受託サービスレベル)	タンパク質: 40 µg 以上 目安: 細胞 $5 \times 10^6$ 以上、 組織 10 mg 以上、 血清 / 血漿 1 µL 以上、 尿 200 µL 以上	4 週間
標準 DIA プロテオーム解析 LC-MS/MS (DIA)	タンパク質抽出* + トリプシン消化 + 質量分析	4000 - 6000 タンパク質		
高深度 DIA プロテオーム解析 GPF+LC-MS/MS (ライブラリ作製用) LC-MS/MS (DIA)	(同定ならびに相対定量解析)	6000 - 8000 タンパク質	脂肪細胞や脳組織など 脂質を多く含むサンプルは 20 mg 以上	
<b>リン酸化タンパク質の同定と相対定量解析</b>				
標準 DIA リン酸化プロテオーム解析 LC-MS/MS (DDA, ライブラリ作製用) LC-MS/MS (DIA, 相対定量解析用)	タンパク質抽出* + トリプシン消化 + リン酸化ペプチド濃縮 + 質量分析	4000 - 8000 リン酸化ペプチド断片	タンパク質: 1 mg 以上 目安: 細胞 $1 \times 10^7$ 以上、 組織 50 mg 以上	4 週間
高深度 DIA リン酸化プロテオーム解析 GPF+LC-MS/MS (DDA, ライブラリ作製用) LC-MS/MS (DIA, 相対定量解析用)		8000 - 15000 リン酸化ペプチド断片		
<b>ゲルバンド中のタンパク質同定</b>				
ゲルバンド中のタンパク質同定 LC-MS/MS (DDA)	ゲル内消化 (トリプシン消化) + 質量分析	—	タンパク質バンドが 検出できていれば可能	4 週間
<b>オプションメニュー</b>				
クリーナップ処理 (タンパク抽出物、体液、培養上清などの液体状の サンプルの場合は必須)	サンプルの溶液の種類、液量、 濃度により、有機溶媒沈殿法、 TCA 沈殿法、順相系ビーズを使用	—	—	
ヒト血清 / 血漿高存在量タンパク質 14 種類除去 & クリーナップ処理	カラムによる 14 種類のタンパク 質除去 + クリーナップ処理	—	血清 / 血漿 10 µL 以上	納期に 影響せず
マウス・ラット血清 / 血漿アルブミン・IgG 除去 & クリーナップ処理	カラムによるアルブミン・IgG の 除去 + クリーナップ処理	—		
ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織から のタンパク質抽出	ホルマリンによる分子架橋の除去 + タンパク質抽出		ホルマリン固定パラフィン包埋組織 (固定が 48 時間以下のもの) 厚さ: 10 ~ 20 µm 表面: 50 mm <sup>2</sup> 以上	
解析アップグレード データ納品後、 同じサンプルを 使用して 高深度解析を実施	簡易 → 標準 DIA 標準 DIA → 高深度 DIA 標準 DIA リン酸化 → 高深度 DIA リン酸化	2000 - 4000 → 4000 - 6000 (タンパク質) 4000 - 6000 → 6000 - 8000 (タンパク質) 4000 - 8000 → 8000 - 15000 (リン酸化ペプチド断片)	追加のサンプルは不要 (データ納品後、2 週間以内に お申込み、4 週間以内に発注を 行ってください。)	4 週間
同一サンプル繰り返し測定 (一度 DIA プロテオーム 解析で測定したサンプルを、再度測定)		—	追加のサンプルは不要	納期に 影響せず

\* サンプルが凍結培養細胞、凍結組織の場合。その他のサンプルはご相談ください。

## 高網羅的脂質メタボローム解析

本サービスはヒトやマウス、微生物 (腸内細菌を含む) 由来のサンプルを対象としたサービスです。その他の生物種に関してはお問合せください。

解析メニュー	作業内容	取得データ目安	必要サンプル量	納期
<b>脂質代謝物</b>				
<b>網羅的代謝物の同定・相対定量解析</b>				
ノンバイアス (ノンターゲット) スクリーニングによる高網羅的な 脂質代謝物の同定・相対定量解析	コンサルティング + 代謝物抽出 + 分離分析 (LC-MS/MS (DDA)) + 解析レポート (統計解析を含む)	独自の先端的な in-house 同定ソフトウェアや分離 分析技術による脂質の網羅的なスクリーニング (500-1000 分子程度を検出想定) <b>対象:</b> 遊離脂肪酸 (中鎖~極長鎖型)、リン脂質類、 リン脂質類、スフィンゴイド類 (S1P を含む)、セラ ミド類、糖セラミド類 (ガングリオシドなど)、グリ セロ脂質類 (中性脂質など)、グリセロ糖脂質類 (MGDG など)、ステロールエステル類 (コレステロ ールエステルなど)、脂肪酸代謝物 (アシルカルニチン ・CoA など)、リポアミノ類 (アナンダミドなど) 等	<b>目安:</b> 細胞 $1 \times 10^8$ 以上 組織 50 mg 以上 血清 / 血漿 50 µL 以上 * 少ない場合は要相談	4 ~ 8 週間
<b>標的代謝物の高深度な相対定量解析</b>				
フォーカシング (ターゲット) 解析: 遊離脂肪酸の相対定量解析	コンサルティング + 代謝物抽出 + 分離分析 (GC-MS or LC-MS) + 解析レポート (統計解析を含む)	C2 ~ C24 程度の遊離脂肪酸の高分離分析 (20-40 分子程度を検出想定) <b>対象:</b> 飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸	<b>目安:</b> 細胞 $1 \times 10^8$ 以上 凍結組織 50 mg 以上 血清 / 血漿 50 µL 以上 * 少ない場合は要相談	4 ~ 8 週間
<b>Coming Soon!</b> フォーカシング分析解析: 酸化脂肪酸の相対定量解析	コンサルティング + 代謝物抽出 + 分離分析 (LC-MS/MS (MRM)) + 解析レポート (統計解析を含む)	$\omega$ -3 と $\omega$ -6 系脂肪酸 (C18, 20, 22) 由来の 酸化代謝物の一斉分析 (100-200 分子程度を検出想定) <b>対象:</b> リノール酸由来、リノレン酸由来、アラキドン酸由 来、EPA 由来、DHA 由来など	<b>目安:</b> 細胞 $1 \times 10^8$ 以上 凍結組織 100 mg 以上 血清 / 血漿 100 µL 以上 * 少ない場合は要相談	4 ~ 8 週間
<b>Coming Soon!</b> フォーカシング分析解析: コレステロール代謝物の相対定量解 析	コンサルティング + 代謝物抽出 + 分離分析 (LC-MS/MS (MRM)) + 解析レポート (統計解析を含む)	コレステロール由来の代謝物の一斉分析 (30-50 分子程度を検出想定) <b>対象:</b> 胆汁酸、ステロール (動物・植物由来)、 性ホルモン、副腎皮質ホルモンなど	<b>目安:</b> 細胞 $1 \times 10^8$ 以上 凍結組織 200 mg 以上 血清 / 血漿 100 µL 以上 * 少ない場合は要相談	4 ~ 8 週間



解析メニュー	作業内容	取得データ目安	必要サンプル量	納期
<b>親水性代謝物</b>				
<b>標的代謝物の高深度な相対定量解析</b>				
“ワイド”フォーカシング解析： 包括的な親水性代謝物の 相対定量解析	コンサルティング + 代謝物抽出 + 分離分析 (GC-MS/MS & LC-MS/MS) + 解析レポート (統計解析を含む)	GC-MS と LC-MS を組み合わせによる 包括性の高い親水性代謝物の一斉分析 (100-200 分子程度を検出想定) <b>対象：</b> アミノ酸および誘導体、有機酸（解糖系・TCA 回路 関連物質、短鎖ヒドロキシ脂肪酸等）、核酸、糖・ 糖リン酸、水溶性ビタミン、補酵素など	<b>目安：</b> 細胞 $1 \times 10^8$ 以上 凍結組織 200 mg 以上 血清 / 血漿 100 $\mu$ L 以上 * 少ない場合は要相談	4 ~ 8 週間
<b>オプション</b>				
解析アップグレード： 取得データの高深度なデータ解析 および解釈・説明	データ再解析や学術調査 (論文等) などを実施の上で コンサルティング	—	—	4 週間
同一サンプル 繰り返し測定 (一度測定した サンプルを再度 測定)	ノンバイアス分析 スクリーニング  質量分析  スクリーニング	—  (一度測定したサンプルを再度測定するサービスのため、追加のサンプルは不要です)	—	納期に 影響せず

## マルチオミックス解析受託

本サービスはタンパク質配列が解析されている生物種を対象としたものです。フェノールグアニジン系の試薬、もしくは RNA 保護試薬に細胞や組織を浸してお送りください。RNA/ タンパク質抽出以降を弊社で実施いたします。

解析内容はトランスクリプトーム解析、プロテオーム解析、メタボローム解析メニューからご希望の項目を選択し組み合わせることができます。ゲノム解析の追加をご希望の場合はお問合せください。

### < トランスクリプトーム解析 >

- 3' RNA-Seq
- miRNA-Seq
- 真核生物 mRNA-Seq (TypeA; 50 bp Single-Read)
- 真核生物 mRNA-Seq (TypeB; 100 bp Paired-End)  
(メニュー内容については 5 ページをご覧ください)

### < プロテオーム解析 >

- 標準 DIA プロテオーム解析によるタンパク質発現・相対定量解析
- 高深度 DIA プロテオーム解析によるタンパク質発現・相対定量解析

### < リン酸化プロテオーム解析 >

- 標準 DIA リン酸化プロテオーム解析によるタンパク質発現・相対定量解析
- 高深度 DIA リン酸化プロテオーム解析によるタンパク質発現・相対定量解析

### < メタボローム解析【脂質代謝物】 >

- ノンバイアス (ノンターゲット) スクリーニングによる高網羅的な脂質代謝物の同定・相対定量解析
- フォーカシング (ターゲット) 解析：遊離脂肪酸の相対定量解析

### < メタボローム解析【親水性代謝物】 >

- “ワイド”フォーカシング解析：包括的な親水性代謝物の相対定量解析

- 作業内容 RNA / タンパク質\* / 代謝物抽出 + 次世代シーケンシング + 質量分析 + 簡易データ解析 \*\*

\* サンプルが凍結培養細胞、凍結組織の場合。その他のサンプルはご相談ください。

\*\* ヒト、マウス由来サンプルの場合

- 納期目安 5 ~ 9 週間

- 必要サンプル量 (目安) 細胞  $1 \times 10^7$  以上、組織 50 mg 以上、血清 / 血漿 1  $\mu$ L 以上、尿 200  $\mu$ L 以上  
メニュー、サンプル種により必要サンプル量は増減します。お問合せの上ご確認ください。

# オミックス解析受託サービスご利用案内

## NGS 解析受託サービス

**使用機器** PacBio Sequel (PacBio 社)、HiSeq 1500、HiSeq 2500、NextSeq 500、MiSeq (イルミナ社)

**納品物** ロングリード、ゲノム解析、発現解析、エピジェネティクス関連およびランのみ (レーン貸切) は、Fastq ファイルと作業報告書の入った DVD または HDD

### サンプル送付方法

サンプル	調製方法	送付方法
ゲノム DNA	TE または市販の DNA 抽出キットの溶出液	保冷剤を同梱し冷凍便
RNA	RNase フリー水または市販の RNA 抽出キットの溶出液	ドライアイスと同梱し冷凍便
ライブラリー	市販のライブラリー調整キットのプロトコールに従って溶解	保冷剤を同梱し冷凍便
抗体産生細胞 (ハイブリドーマ)	ハイブリドーマを PBS 中で 2 回遠心し、上清を除いて速やかに冷凍したもの	ドライアイスと同梱し冷凍便

- 送付サンプルは必ず抽出した DNA または RNA または調製済みライブラリーの状態にしてお送りください。細胞・組織などの状態でのサンプル受け取りはできません。
- データ解析のみのご依頼の場合：依頼書記載のサンプル名称と、データにご登録されている名称は統一してください。ヒトサンプルの場合は匿名化をお願いいたします。作業内容ならびにお見積もり内容の確定後にデータをご送付ください。

## プロテオーム解析受託サービス

**使用機器** Q-Exactive HF-X (Thermo Fisher Scientific 社)

**納品物** MS 測定データ (.raw ファイル)、タンパク質同定・相対定量解析データ (専用の Viewer で閲覧可能)、観測されたタンパク質名、タンパク質の定量値などを記載したリスト (Excel ファイル) を HDD、DVD-R または USB メモリスティックに収納して納品いたします。

### サンプル送付方法

サンプル	調製方法	送付方法
培養細胞	培地を除去後、PBS にて 2 回洗浄し、チューブに入れて液体窒素で凍結*	ドライアイスと同梱し冷凍便
組織	取り出した組織を PBS にて血液を除去し、チューブに入れて液体窒素で凍結*	ドライアイスと同梱し冷凍便
タンパク質抽出物	チューブに入れて液体窒素で凍結*	ドライアイスと同梱し冷凍便
血漿・血清、その他体液	スクリータイプをしっかりとし密閉できるチューブに入れて液体窒素で凍結*	ドライアイスと同梱し冷凍便
培養上清	500 xg、5 分程度の弱い遠心で細胞を除去し、さらに 15,000 xg、10 分程度の遠心で細胞片などを除去した上清をスクリータイプをしっかりとし密閉できるチューブに入れて液体窒素で凍結*	ドライアイスと同梱し冷凍便
ゲル片 (CBB 染色、質量分析用銀染色、他)	切り出したゲルをチューブに入れてパラフィルムを巻く	保冷剤を同梱し冷蔵便
ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織	弊社から送付いたしますエッペンドルフ社のセーフロックチューブに入れてパラフィルムを巻く (ホルマリン固定時間が 48 時間以下のサンプルのみ受託を引き受けることが可能)	常温便

\* 長期保存の場合はスクリータイプをしっかりとし密閉できるチューブを推奨

\* 液体窒素がない場合は速やかに -80℃ で凍結 (金属ブロックなどがあれば、事前に -80℃ に入れ、そこにサンプルを置いて急速に凍結させることを推奨)

- 必要サンプル量は各メニューの記載をご参照ください。
- サンプル必要量以下の場合でも分析をお引き受けすることは可能ですが、サンプル量が少量になるに伴って観測できるタンパク質も減少します。また、1 回分の分析量しか得られなかった場合にマシントラブル等で十分な測定結果が得られなかったときは無償で再測定は行いますが、サンプルの補償はできません。サンプルが必要量あるかどうか分からない場合でも、こちらでタンパク定量を行い、必要量以下のときはお客様にご連絡するようにしております。
- サンプルチューブは弊社から送付いたしますエッペンドルフ社のセーフロックチューブを推奨します (特に微量サンプルの場合は強く推奨)。チューブはオートクレープしていないものをご使用ください。
- ゲルサンプルの場合はケラチンなどのコンタミネーションが確認される場合が多くあります。電気泳動、染色、切り出しなど必ず手袋をして実験者由来のコンタミネーションが起らないように注意してください。また、ゲルの切り出しはバンド以外のゲルが極力入らないように切り出してください。ゲル体積が増えると非特異的吸着も増え、損失を招くことになります。

## ご注文の流れ

お問合せ・お見積りフォームに必要事項を記入し送信



お打合せ、お見積り兼発注書・解析依頼書の受け取り



・販売店に発注書提出  
・解析依頼書にサンプル情報を記入し送付 (Email)



- サンプル送付前にサンプル情報を記載した解析依頼書 (Excel ファイル) をメールにてお送りください。
- サンプル送付時にはプリントアウトした解析依頼書を同梱してください。

## 高網羅的脂質メタボローム解析受託サービス

**使用機器** ノンバイアス解析 Nexera LC (SHIMADZU) / TT6600 (SCIEX) フォーカシング解析 Nexera LC / TQ8050 (SHIMADZU)、GC / TQ8040 (SHIMADZU)

**納品物** MS 測定データ (Raw ファイル)、代謝物同定・相対定量解析データ (Excel ファイル) を HDD、DVD-R または USB メモリスティックに収納して納品いたします。

### サンプル送付方法

サンプル	調製方法	送付方法
細胞	培地を除去後、PBS にて 2 回洗浄し、チューブに入れて液体窒素で凍結*	ドライアイスと同梱し冷凍便
組織	取り出した組織を PBS にて血液を除去し、チューブに入れて液体窒素で凍結*	ドライアイスと同梱し冷凍便
血清・血漿	チューブに入れて液体窒素で凍結*	ドライアイスと同梱し冷凍便

\* 長期保存の場合はスクリュタイプをしっかり閉鎖できるチューブを推奨します。

\* 液体窒素がない場合は速やかに -80℃ で凍結してください (金属ブロックなどがあれば、事前に -80℃ に入れ、そこにサンプルを置いて急速に凍結させることを推奨)

- 必要サンプル量は各メニューの記載をご参照ください。
- サンプルが必要量以下の場合、分析をお引き受けすることは可能ですが、サンプル量が少量になるに伴って観測できる代謝物も減少します。また、1 回分の分析量しか得られなかった場合にマシントラブル等で十分な測定結果が得られなかったときは無償で再測定は行いますが、サンプルの補償はできません。サンプルが必要量以下のときは、お客様にご連絡するようにしております。
- 微量なサンプルや静電気等でチューブ内で失われやすいサンプル (髪の毛など) は、弊社から送付いたします専用チューブで送付いただくようお願いする場合があります。

## マルチオミックス解析受託サービス

**納品物** 作業報告書、fastq ファイル、MS データ、Scaffold DI、最終的な解析結果\* を記載したファイルの入った DVD または USB メモリスティック

\* ①プロテオームの最終的な解析結果、②簡易データ解析による RNA の発現量リスト、③プロテオームと 3'RNA-Seq の発現量対応リストを含みます (②と③はヒト、マウス検体のみ)

### サンプル送付方法

サンプル	調製方法	送付方法
培養細胞	培地を除去後、PBS にて 2 回洗浄し、フェノールグアニジン系などの試薬を加えチューブに入れて液体窒素で凍結	ドライアイスと同梱し冷凍便
組織	取り出した組織を PBS にて血液を除去し、フェノールグアニジン系などの試薬が入ったチューブに入れて液体窒素で凍結	ドライアイスと同梱し冷凍便

- 細胞、組織にフェノールグアニジン系の試薬\*、もしくは RNA 保護試薬\*\* を加えた状態でお送りください。ホモジナイズは不要です。その他のサンプルはご相談ください。

\* ISOGEN (ニッポンジーン社)、TRIzol (ThermoFisher 社)、QIAzol (QIAGEN 社) など \*\* RNA later (ThermoFisher 社) など

- 必要サンプル量は各メニューの記載をご参照ください。
- サンプルチューブはエッペンドルフ社のセーフロックチューブを推奨します (特に微量サンプルの場合は強く推奨)。チューブはオートクレープしていないものをご使用ください。

お問合せ・お見積りフォームは各サービスホームページから

NGS 解析受託 [www.promega.co.jp/NGS/](http://www.promega.co.jp/NGS/)

DIA プロテオーム解析受託 [www.promega.co.jp/proteome\\_jutaku/](http://www.promega.co.jp/proteome_jutaku/)

高網羅的脂質メタボローム解析受託 [www.promega.co.jp/metabolome\\_jutaku/](http://www.promega.co.jp/metabolome_jutaku/)

マルチオミックス解析受託 [www.promega.co.jp/multiomics/](http://www.promega.co.jp/multiomics/)

サンプル・解析依頼書送付先

〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足 2-6-7

株式会社かずさゲノムテクノロジーズ

Tel : 0438-52-2001 Mail : otoiawase@kazusagt.com

\*注意 : サンプルは平日に到着するようご指定ください

サンプル送付  
(印刷した解析依頼書を同梱)



**KGT**  
kazusaga genome  
テクノロジーズ社

# TrueSTABLE Cell ～ HAC を用いた安定発現細胞作製～

## 概要

- かずさ DNA 研究所の HAC および新規 lox テクノロジーを利用した新しい安定発現細胞 TrueSTABLE Cell 作成サービスを開始
- ゲノムを傷つけない人工染色体 (HAC) 技術でコピー数、発現量もコントロール可、新規組換え技術によるシステムチックな構築作業
- プロメガのルシフェラーゼ & タグ技術を導入でき、セルベース解析も受託可能

これまで一般的に作成されていた安定性発現細胞は、用時トランスフェクションの問題点を解決するものの、宿主ゲノム DNA に傷をつけ、また取り込まれる宿主 DNA の部位、個数が多種多様で、さまざまなクローンが作られ、同じものを作ることは困難です。かずさゲノムテクノロジーでは、HAC にかずさ DNA 研究所の新規部位特異的組換え酵素システム (VloxP-SloxP テクノロジー) およびプロメガの HiBIT 技術を応用して、これらの問題を解決しました。

## 真の安定発現細胞を求めて

### これまでの安定発現細胞

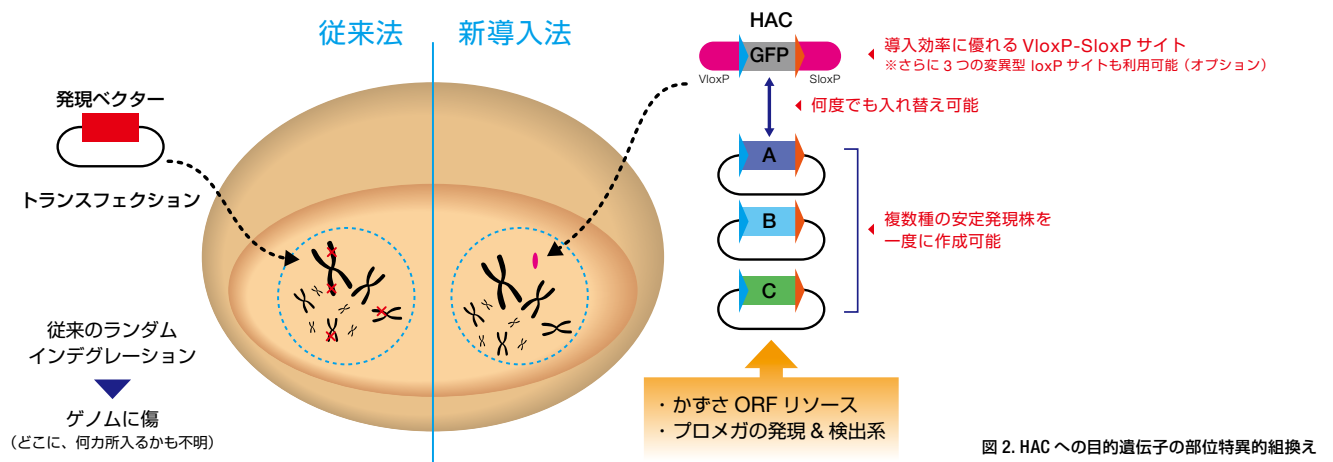
遺伝子組換え安定発現細胞はタンパク質の大量生産、長期的なタンパク質の機能解析、薬理学的研究、遺伝子治療の道具として、生命科学において非常に高い需要があります。従来の安定発現細胞株の作製には①目的遺伝子のトランスフェクション、②薬剤選別、③クローニング、④増殖、⑤発現解析といったステップを要し、多大な時間と労力を要します。また従来法の問題点として、宿主のゲノム DNA を傷つけることによるアーティファクトが懸念されます。また、導入コピー数の厳密な制御は不可能であり、さらに長期培養により発現量が減少するなど、発現量のコントロールは困難を極めます。そのため同一クローンを用いた解析でも培養を重ねることで再現性が低下する場合や、クローン間の表現型の比較 (例えば目的遺伝子の野生型と変異型) が単に発現量の差を反映した結果であることなどが懸念されます。



図 1. HEK293 細胞に導入した HAC

### HAC とは

HAC とは人工的に作られた 47 本目のヒト染色体です。細胞に導入すると、細胞分裂時に宿主細胞の染色体と同様に複製、分配され、長期に渡り安定に保持されます。宿主細胞の染色体とは独立に存在し、宿主細胞のゲノム DNA を傷つけることはありません (図 2、表 1)。



特長	従来法 (プラスミドベクターを使用する場合)	新導入法 (TrueSTABLE Cell)
導入先	ゲノム (ランダムに挿入される)	HAC (HAC 上の定位位置に挿入 [挿入カセット])
導入	導入コピー数 (細胞あたり 1 種類の遺伝子について) ● コピー数の制御は困難 (各クローンによりバラバラ) ● ※過剰発現で細胞毒性を持つタンパク質の場合、発現株が得られない可能性もある。	1 コピー
導入可能サイズ	10 Kb 程度	数 100 kb 程度 (移動元に依存: プラスミド・BAC クローン)
作業効率	形質転換効率が低い (薬剤選択、大量のスクリーニングが必要)	新規 loxP によりシステムチック (複数種の安定発現株作成も容易)
発現量	コピー数・挿入部位に依存	一定 (プロモーターに依存)
発現の安定性	低い (低下する場合あり) ● ※クロマチン構造変化による発現抑制を受ける場合がある	安定 (プロモーターの性質を維持) ● ※ HAC が宿主染色体と同程度に細胞中で安定である。
樹立に要する時間	3 ~ 4 ヶ月程度	1.5 ヶ月程度

表 1. TrueSTABLE Cell と従来の安定発現細胞株との比較

## 新規安定発現細胞 TrueSTABLE Cell 作成システムの利点

弊社がご提供する HAC を用いた TrueSTABLE Cell では従来の安定発現細胞と比較して、以下の利点があります。かずさ DNA 研究所が開発した部位特異的相同組換え手法を用いることで、①1細胞当たり1コピーの遺伝子を決まった位置に挿入することが可能、②宿主のゲノム DNA を傷つけない、③ HAC 上の決まった位置に挿入され、細胞内で一定量保持されるため同じプロモーターを用いた場合発現量を一定に調節可能、④サイレンシング等の影響を受けず、長期に安定した発現が可能、⑤単一 HAC 内の複数の異なる部位特異的組換え領域を用いることで異なるプロモーター調節下での複数の遺伝子の安定発現細胞株の樹立も可能になります。以上の特徴により、長期に渡る表現型解析やクローン間の比較を常に一定の発現量の下で行うことが可能になります。また、HAC では挿入可能な DNA の長さに制限がないため、転写調節領域等の非翻訳領域を含めた配列やポリシストロニックな配列も挿入可能といった利点があります。加えて、薬剤選別も不要であり、薬剤耐性株単離に要する時間や選別によるバイアスを回避できます。

## 迅速な構築

従来の安定発現細胞株作製では細胞を十分量増やしたのち qRT-PCR や western blotting 等による発現解析が行われています。弊社では発現解析にプロメガ株式会社が開発した高感度の検出系を用いることで、発現解析のための細胞増殖に要する時間を大幅に短縮することが可能になりました。さらに、弊社のシステムでは複数の遺伝子を同時に細胞にトランスフェクションした場合、1細胞当たり1種の遺伝子のみ挿入されるため、目的遺伝子が多種にわたる場合でも同時に作製が可能であり迅速に構築できます。

## 目的遺伝子の作製から発現解析までサポート

目的遺伝子を持つプラスミドベクターの構築に関して、かずさ DNA 研究所が持つ豊富な遺伝子資源をもとに、プロメガ株式会社が開発したフレキシクローニング技術を用いて迅速な構築が可能です。また、各種タグ、シグナル配列の融合などにも対応しております。さらに、安定発現細胞作製後の発現解析、タグに応じた解析も提供可能です(10-11 ページ)。

## 価格とお問い合わせ先

受託サービス名	細胞	参考価格(¥)	
		アカデミア	企業
TrueSTABLE Cell 作成サービス (Target Insertion)	(A) HEK293	600,000 ~	1,000,000 ~
	(B) お客様ご提供の細胞 (汎用培養細胞の場合)	1,400,000 ~	1,800,000 ~
安定発現細胞作成サービス (Random integration : 従来の安定発現株作成法による)	(C) HEK293	800,000 ~	1,200,000 ~
	(D) お客様ご提供の細胞 (汎用培養細胞の場合)	お問い合わせ	お問い合わせ

### HEK 293 を用いた TrueSTABLE Cell 作成サービスに含まれる受託内容例 (A : ① + ② + 納品物③)

- ① 目的遺伝子の HEK293 (HAC を含む) への導入  
※目的遺伝子 (ORF) は材料としてご提供ください (Flexi ORF Clone より別途購入も可能)。
- ② HEK293 (HAC を含む) での目的遺伝子発現の確認  
※ HiBiT、NanoLuc<sup>®</sup>、HaloTag<sup>®</sup> などプロメガの検出タグによる発現確認の場合は作業、試薬代は料金に含まれる。  
[注意] 上記以外のタンパク質検出法による発現確認については別途お見積りいたします。
- ③ 納品物は目的遺伝子を導入した HEK293 最低 3 クローン (各 10<sup>6</sup> 個細胞)、発現確認データ  
その他 (B) (C) (D) については別途お見積りいたします。

・納期 : 2 か月 ~ (TrueSTABLE Cell HEK293 の場合)、3.5 か月 ~ (お客様ご提供の細胞または Random integration の場合 [B、C、D])

**クローン :** プロメガの HiBiT、NanoLuc<sup>®</sup>、HaloTag<sup>®</sup> などの検出、精製タグを付加した ORF クローン (Flexi ORF Clone) やこれらのタグを利用したタンパク質相互作用解析用クローンセット (8 クローン) などの販売、サブクローニング受託サービスなども承ります。

**セルベース解析 :** プロメガの HiBiT、NanoLuc<sup>®</sup>、HaloTag<sup>®</sup> などのレポーターを定量するアッセイも承ります。

※ 納品された細胞に対する遺伝子改変はライセンス上不可

※ 本サービスで利用する HAC はクロモリサーチ社で開発されたものです。



株式会社かずさゲノム  
テクノロジーズ (KGT)

## KGT のご紹介

株式会社かずさゲノムテクノロジーズ (Kazusa Genome Technologies : KGT) は、2015 年に公益財団法人かずさ DNA 研究所 (KDRI) からスピンオフして設立された会社です。KDRI の所有する遺伝子資源に Promega Corporation の先端テクノロジーを融合した各種クローンをはじめ関連技術受託サービス提供などをコアビジネスとして、様々な連携機関との多方面への事業展開を行い、お客様の広いニーズにマッチしたサービス提供を行っています。

本サービスの詳細、お問合せ、見積依頼は以下をご覧ください。

[www.promega.co.jp/tru stablecell/](http://www.promega.co.jp/tru stablecell/)

# ヒト・マウス遺伝子と miRNA 標的配列クローンの分譲、その改変と新規作製

## 概要

- かずさ DNA 研究所、国内研究機関の遺伝子リソースをクローン化して分譲
- サブクローニングや変異導入、ご希望の遺伝子のクローニングなどのサービス
- クローンを使用した実験受託サービスもご提供

かずさ DNA 研究所をはじめとする国内研究機関が有する各種リソース（主にヒトの ORF、プロモーター、miRNA 結合配列）とプロメガのレポーター/タグ技術（NanoLuc<sup>®</sup>、ホタルルシフェラーゼ [Luc2]、ウミシイタケルシフェラーゼ [Rluc]、HaloTag<sup>®</sup>）を組み合わせたクローンコレクションです。シグナル伝達、細胞内タンパク質イメージング、タンパク質間相互作用、miRNA などの研究、スクリーニング等様々な用途にご利用いただけます。

## クローン

### ヒト・マウス遺伝子クローン かずさ DNA 研究所のクローンリソース

長鎖に特化したかずさ cDNA コレクション (> 4,000 クローン) と幅広いラインナップの OC (The ORFeome Collaboration) ORF コレクションの 2 つのリソースをベースとした独自のクローンリソースを、NanoLuc<sup>®</sup> Flexi<sup>®</sup> ベクター (pFN31K または pFC32K) や HaloTag<sup>®</sup> Flexi<sup>®</sup> ベクター (pFN21A) などに導入したクローンを提供しています。10,000 種以上のヒト ORF から選択可能であり、ORF は他の Flexi<sup>®</sup> Vector へ容易に移し換えることができます。

### miRNA 標的配列クローン MiCheck miRNA Biosensor Clone

microRNA による発現制御の影響をルシフェラーゼアッセイで検討するためのクローンです。各組織や未分化細胞で発現の高い microRNA として疾患（主にがん）と関連性のある microRNA を 189 種類選抜しました。

これらのクローンは、(独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所神経薬理研究部・室長北條浩彦先生が作製されたクローンをプロメガが付託され販売するものです。

## 分譲クローンメニュー

クローンタイプ	ベクター	インサート	容量	参考納期	Product ID (PID)
Flexi <sup>®</sup> Nanoluc <sup>®</sup> Clone	pFN31K または pFC32K Vector (Neo 遺伝子含む)	ヒト ORF (NanoLuc <sup>®</sup> 付加、N 末端か C 末端かを選択可能)	~ 500 ng (50 ng/μlTE)	3 週間~	
Flexi <sup>®</sup> HaloTag <sup>®</sup> Type	pFN21A : 哺乳類発現用 Flexi <sup>®</sup> ベクターで、N 末端に HaloTag <sup>®</sup> を付加	ヒト ORF (N 末端に HaloTag <sup>®</sup> 付加)			FHCxxxxN または FHCxxxxC
Flexi <sup>®</sup> Cloning Type	pF1K-base : 大腸菌発現用 Flexi <sup>®</sup> ベクターを改変	ヒト ORF マウス ORF			FXCxxxx RXCxxxx
Original ORFeome Clone Type	pDONR223、pENTR221 など (Gateway システム)	ヒト ORF (Stop コドンあり)	100 ng / 10 μl	約 2 週間~1 カ月	ORSxxxx
		ヒト ORF (Stop コドンなし)			ORHxxxx
		マウス ORF (Stop コドンあり)			MRSxxxx
		マウス ORF (Stop コドンなし)			MRHxxxx
Original Kazusa Clone Type	pBluescript II SK (+) など	ヒト cDNA (ORF+UTR)			ORKxxxx
MiCheck miRNA Biosensor Clone	psiCHECK <sup>™</sup> -2	microRNA 標的配列 (ヒト 157 種、マウス 32 種)	100 ng / 10 μl	約 2 週間	MICxxxxxx

## クローンの大量調製

クローン各種の標準容量は 100 ng (Flexi<sup>®</sup> NanoLuc<sup>®</sup> Clone は 500 ng 以内) ですが、追加料金にて増量できます。

増量	カタログ番号	追加料金 (¥)
10 μg	EFCSCU	20,000
50 μg	EFCSCU50	30,000
100 μg	EFCSCU100	60,000
上記以上	—	ご相談ください

## クローンブック

Flexi<sup>®</sup> ORF クローンを様々な分野の代表的なパスウェイでカテゴリライズしました。各研究分野カテゴリーの分類分けあるいはフリーワード検索などで目的の ORF を簡便にピックアップし、エクセルファイルとして書き出し & 保存、メールに添付して見積もり依頼することができます。

## クローン分譲サービスの特長

- 購入時の面倒な書類の記入は不要
- オンラインで見積り兼注文用紙を自動発行
- 大学、公的研究機関はもちろん、企業における面倒なライセンス契約も不要

本サービスの詳細、お問合せ、見積り依頼は以下をご覧ください。

[www.promega.co.jp/flexiclone/](http://www.promega.co.jp/flexiclone/)

## クローンの改変・作製

タグの付け換え、遺伝子変異導入、ORFの多種 Flexi® ベクターへのサブクローニング、発現ベクターの構築及びその発現確認（動物細胞、大腸菌、*In Vitro*）など承ります。

### Flexi® ベクターへのサブクローニングについて

Flexi-Flexi サブクローニングでは、既に目的のインサートを含む Flexi® Cloning Type クローンなどの Flexi® ベクターから異なる種類の Flexi® ベクターにサブクローニングいたします。Non-Flexi サブクローニングでは、Flexi® ベクター以外のベクターから Flexi® ベクターへインサートをサブクローニングいたします。

### サブクローニング例：

- Flexi® ORF Clone から他の Flexi® ベクターへの ORF 移し替え
- Flexi® HaloTag® Clone (N 末融合) から Flexi® HaloTag® ベクター (C 末融合) への ORF 移し替え
- Flexi® ベクター以外の他種ベクターから Flexi® ベクターへの移し替え

### クローンを使ったセルベース実験受託

HiBiT、NaoLuc®、HaloTag® を利用した各種実験（レポーターアッセイ、タンパク質精製、プルダウン、発現解析）、ツールの提供などを実施します。

#### [実験例]

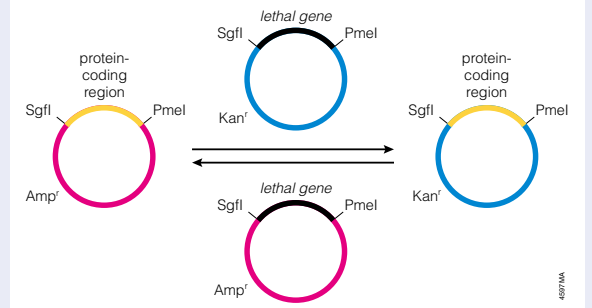
- ▶ 哺乳動物細胞での HaloTag® 融合タンパク質の発現確認、局在解析、相互作用タンパク質の提供および分析など
- ▶ 哺乳動物細胞や大腸菌で発現させた HaloTag® 融合タンパク質の精製ならびに無細胞発現系での発現確認
- ▶ 多種 HaloTag® 融合タンパク質を用いたアレイ実験による相互作用解析や蛋白質修飾の解析（例：SH2 ドメインアレイ）
- ▶ 発現タンパク質による特定転写調節エレメントの応答解析 (ChIP Assay)
- ▶ 発現安定細胞株の作製

### Flexi® システム：方向性、読み枠を維持したサブクローニング

Flexi® ベクターは、低頻度出現の制限酵素（レアカッター）Sgf I、Pme I および EcolCRI を利用することでシンプルなダイレクショナルクローニングを可能にし、広範な機能性ベクターにより様々なタンパク質機能解析に利用することができます。致死遺伝子バーナーゼ (Barnase) および抗生物質耐性遺伝子 (Amp-Kan) によるポジティブセレクションにより効率的なクローニングが行えます。シンプルな工程で迅速にクローニングでき、正確性が高く ORF を移換えた後の配列確認の必要もありません。

※ C 末タグ融合型 Flexi® ベクターに導入したインサートを他の Flexi® ベクターに移すことはできません。インサートをさらに他の Flexi® ベクターに移す可能性がある場合は、N 末タグ融合タイプもしくはタグの融合のない Flexi® ベクターへの事前のクローニングを推奨します。

※ Flexi® クローニングでは、ベクター間の ORF の移し替えに 2 つの抗生物質耐性 (Amp/Kan) を利用しているため、同一の抗生物質耐性を有するベクター間の移し替えはできません。



## クローン改変・作製メニュー

メニュー	内容	サイズ	納期	価格 (¥)
Flexi® ベクターへのサブクローニング	Flexi® -Flexi® サブクローニング：Flexi® ベクター間でのインサート乗せ換え	1 回分		150,000 ~ *
	Non-Flexi® サブクローニング：Flexi® ベクター以外のベクターから Flexi® ベクターへインサートのインサート乗せ換え	1 回分		200,000 ~ *
カスタムクローニング	Flexi® ORF Clone コレクションに無い ORF の Flexi® ベクターへのクローニング（配列確認、発現確認を含む）など	1 クローン		要見積り
遺伝子の完全長化、修復	公共データベースの最新情報をもとに、既存の Flexi® ORF Clone に含まれる遺伝子を完全長化し、アップデートされた ORF クローンとしてご提供	1 クローン		要見積り
その他ベクターを用いたベクター構築	Flexi® Vector 以外のベクターを用いた様々なクローニング及びその発現確認	1 クローン		要見積り
Flexi® HaloTag® クローンへのシグナルペプチド付加	遺伝子由来シグナルペプチド付加：遺伝子本来のシグナルペプチドの直後に HaloTag® を挿入、遺伝子本来の局在が期待される	1 クローン		要見積り
	IL6 シグナルペプチド付加：IL6（インターロイキン 6 遺伝子）シグナルペプチドを N 末端側に付加した HaloTag® ベクターに ORF を導入、強制的な膜への局在が期待される	1 クローン	約 1 ヶ月～	200,000 ~
変異導入	SNP 間あるいはバリエーション間の変更やその他の変異導入、欠失作業など	1 か所		要見積り
マウスクローン受託	かすさ DNA 研究所ではマウスクローンに関しても豊富な資源を有しており、解析の終了した cDNA クローンについては入手可能です（www.kazusa.or.jp/rouge/ 参照）。その他のご要望にお応えできる場合もございます。詳細については別途お問い合わせください。		—	

\* サブクローニング先の Flexi® ベクター料金 (30%OFF [他のキャンペーンとの併用はできません]) も含まれており、お求めやすくなっています。

本サービスの詳細、お問合せ、見積もり依頼を以下をご覧ください。

[www.promega.co.jp/flexisubcloning/](http://www.promega.co.jp/flexisubcloning/)

## タンパク質間相互作用：NanoBRET™、NanoBiT® 検討用ベクターセット作製受託サービス

NanoBRET™、NanoBiT® システムは、生細胞でリアルタイムにタンパク質の相互作用を定量的にモニタリングできる数少ない手法です。

これらのシステムはタンパク質間の相互作用を蛍光あるいは発光シグナルとして検出するため、標的となる2つのタンパク質にそれぞれ蛍光タンパク質タグ(HaloTag®)あるいは発光タンパク質タグ(NanoLuc®, LgBiT、SmBiT)を付加する必要があります。高感度なシステム構築のためには、N末端、C末端、またタグの配向について最適な組み合わせを検討することが推奨され、その場合合計8種類のベクターを用意する必要があります。弊社では豊富なクローンリソースをもとに、これらシステム最適化の検討用ベクターを受託作製し、ご提供いたします。

### 本受託サービスのご利用フロー

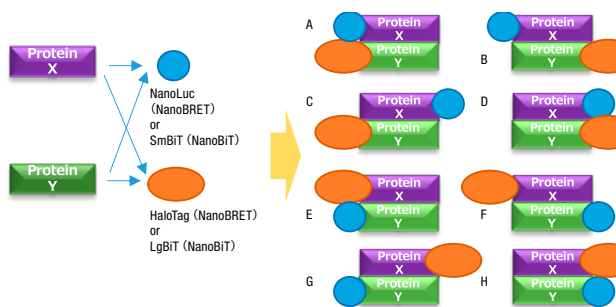
- 1 遺伝子ペア選択
- 2 WEBのサービス申込フォームから申込

### 3 コンストラクトセット作製

### 4 納品

弊社提供サービス

- 5 ベクターを細胞に導入
- 6 NanoBRET™、NanoBiT® 測定



### NanoBRET™、NanoBiT® 検討用ベクターセット作製

メニュー	内容	サイズ	納期	価格(¥)
NanoBRET™ 検討用セット作製	NanoBRET でタンパク質 - タンパク質間相互作用アッセイシステムを構築するための、検討用ベクターセット(8種類)を作製	8クローン	約1ヶ月~	575,000~
NanoBiT® 検討用セット作製	NanoBiT でタンパク質 - タンパク質間相互作用アッセイシステムを構築するための、検討用ベクターセット(8種類)を作製	8クローン	約1ヶ月~	570,000~

・本サービスはサブクローニングのみであり、発現チェックは行っておりません。

お問合せ・お見積りフォーム

[promega.formstack.com/forms/genomics\\_serv](http://promega.formstack.com/forms/genomics_serv)

日本語 Web site : [www.promega.jp](http://www.promega.jp)

テクニカルサービス・Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982 • E-Mail : [prometec@jp.promega.com](mailto:prometec@jp.promega.com)

# プロメガ株式会社

本社 〒103-0011  
東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモトビル  
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

大阪事務所 〒532-0011  
大阪市淀川区西中島6-8-8 花原第8ビル704号室  
Tel. 06-6390-7051 / Fax. 06-6390-7052

※製品の仕様、価格については2019年12月現在のものであり予告なしに変更することがあります。

**NanoBRET™ システムの原理**  
ベクターを導入した細胞内で発現したタンパク質 A: NanoLuc® (青色) 融合タンパク質と HaloTag® (オレンジ色) に低分子蛍光 618 リガンドが結合したタンパク質 B: HaloTag® 融合タンパク質が近接すると BRET が起こる。低分子蛍光 618 リガンドはタンパク質発現後に細胞へ添加する細胞透過性の蛍光試薬。

**NanoBiT® システムの原理**  
ベクターを導入した細胞内で発現したタンパク質 A: LgBiT (青色の大きな断片) 融合タンパク質とタンパク質 B: SmBiT (オレンジ色の小さな断片) 融合タンパク質が結合すると発光酵素が再構成される。

Signal (相対値)

組み合わせパターン

- 各コンストラクトを細胞に導入し、NanoBRET™ または NanoBiT® システムで測定
- 最も BRET Ratio または発光値の高い組み合わせを実験に採用

販売店