

## 解析事例

### 事例① HTLV-1クロナリティ解析

※データ提供: 国立感染症研究所 斎藤 益満 先生 長崎大学病院 検査部 長谷川 寛雄 先生

HTLV-1 (ヒトT細胞白血病ウイルス) は主にCD4陽性T細胞に感染し、そのプロウイルスが宿主ゲノムにランダムに挿入します。このプロウイルス挿入が癌遺伝子の近傍あるいは癌抑制遺伝子内で引き起こされた場合、成人T細胞白血病発症の原因となることが報告されております (Nicolas Rosewick et al., *Nature communications*, 2017)。現在、成人T細胞白血病の診断にはサザンブロット法 (HTLV-1クロナリティ解析) を

用いたHTLV-1感染細胞の白血病化 (モノクローナル増殖) の検出が必須とされておりますが、大量のDNA (血液) を要する、長時間で複雑な工程を必要とする、検出感度は十分ではないなど種々の問題を抱えています。RAISING法は、これらの問題を全て克服した方法であり、HTLV-1クロナリティ解析においては高感度かつ非常に再現性が高いデータが得られております。

Fig.1 RAISING法によるHTLV-1クロナリティ解析 (サンガーシーケンス)

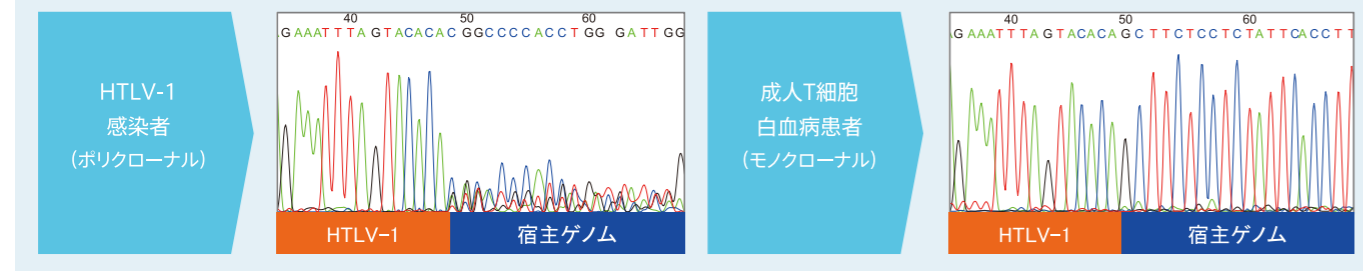


Fig.2 RAISING法の検出感度

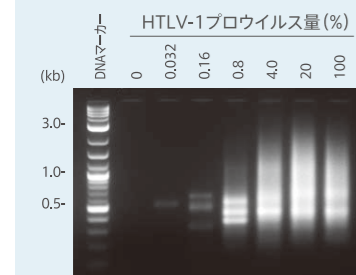
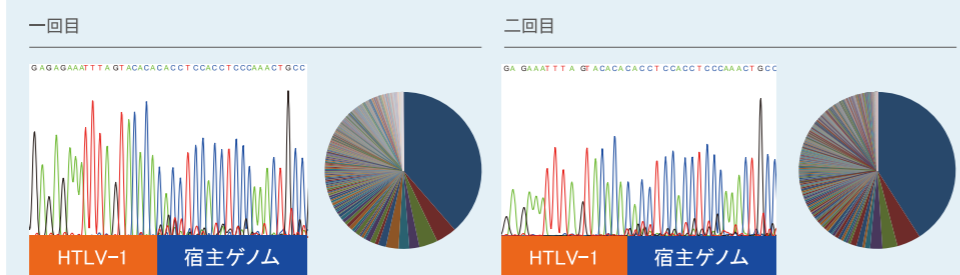


Fig.3 RAISING法の再現性 ※円グラフはNGSによる解析結果



HTLV-1クロナリティ解析※4 (サンガーシーケンスプラン) は

すでに外来DNA特異的なプライマー配列を保有しておりますので、右記の価格で承ります。

※4 弊社でのクロナリティ解析の結果判定は実施いたしません。装置より得られたデータをそのまま納品いたしますので、予めご了承ください。また、NGSによる解析も「NGSプラン」にて受付可能です。

価格: 8検体あたり85,000円  
納期: 5-10営業日

### 事例② ゲノム編集におけるノックインのオフターゲット検出

※サンプル提供: 株式会社KAC様

Fig.4 ノックイン効率

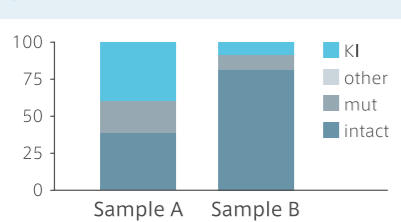


Table.1 インテグレーションサイトの同定 ※5

Sample A	
chr9	21,***,***
chr14	34,***,***
Sample B	
chr9	21,***,***
chr15	102,***,***

※5 挿入位置の下6桁は“\*\*\*,\*\*\*”としております。

CRISPR/Casにより作製したノックインマウスについて、RAISING法およびNGSの組み合わせによりノックイン効率およびオフターゲットサイトの検出を試みました。ノックインに用いたドナーDNAが目的とした9番染色体 (chr9) に加えて、別の染色体へも挿入されていることが示唆されました。

**【注意事項】** ※ご連絡いただく外来DNAの配列中に予期せぬ変異が入っていた場合、解析結果が得られない場合があります。※本サービスでは一度の解析で複数の挿入部位を検出することが可能ですが、存在する挿入部位全ての検出を保証するものではありません。※解析結果には偽陽性が含まれる可能性もあります。必要に応じて別途確認実験を行ってください。

株式会社ファスマック

神奈川県厚木市岡田3088ケーオービルA棟 Mail: dnacraft@fasmac.co.jp URL: http://fasmac.co.jp/

## FASMAC

# RAISING法による ランダムインテグレーション 解析サービス

国立感染症研究所とファスマックの共同研究により開発した“RAISING法 (Rapid Amplification of Integration Site without Interference by Genomic DNA contamination)”により、外来DNAの挿入位置を決定いたします。

## サービス内容

### ■サンガーシーケンスプラン

価格: 8検体あたり: 12万円 (1サンプルあたりの参考価格: 15,000円)

納期: 5-10営業日

利用例: ウイルスゲノム、融合遺伝子のクロナリティ解析 など…

### ■次世代シーケンス (NGS) プラン

価格: 8検体あたり25万円 (1サンプルあたりの参考価格: 31,250円)

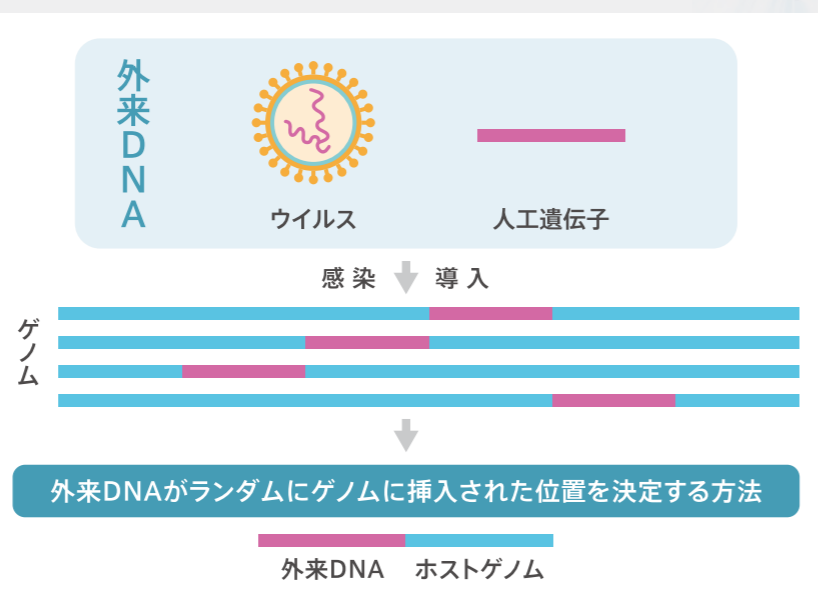
納期: 20営業日

オプション: リファレンスマッピングによる挿入位置の決定 (+20,000円/ターゲット)

利用例: ゲノム編集やウイルスベクターによるノックインのオフターゲット検出、など…

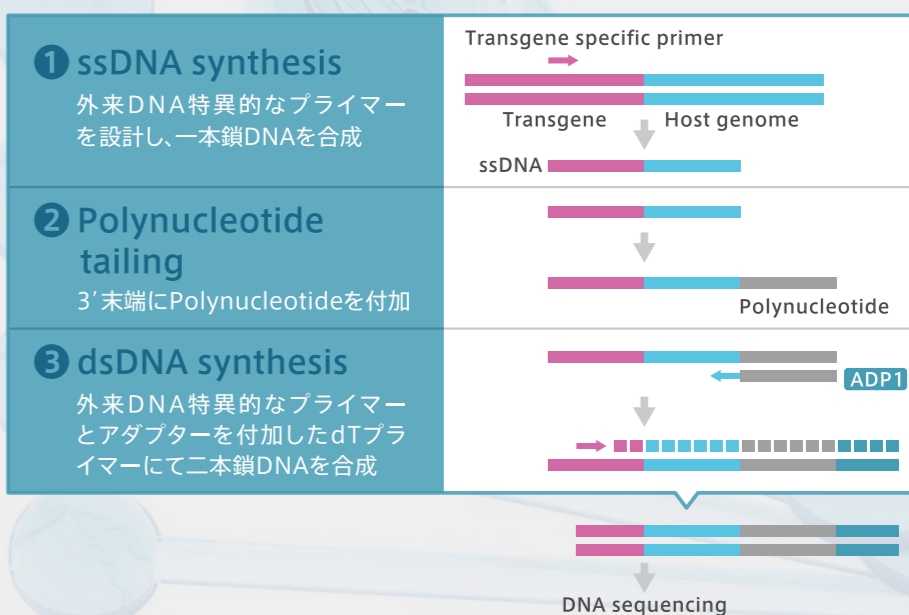
## RAISING法とは…

外来DNAが目的位置も含め、ランダムに宿主ゲノムへ挿入(ランダムインテグレーション)された位置を決定するための方法です。ウイルスゲノム挿入部位、ウイルスベクター挿入部位、創薬ターゲットとなりうる融合遺伝子の検索、ゲノム編集におけるオフターゲットノックインなど、外来DNAの宿主ゲノム上の挿入位置を同定することが可能です。またその原理から、従来のトランスジーン挿入位置決定法に比べて、短時間、簡便、高感度、低コストでの解析を実現できます。



## 原理

RAISING法は、トランスジーン特異的なプライマーを設計して、PCRベースでサンプル調製することができます。煩雑な作業を要しないためサンプル調製において人為的間差がなく、また独自の技術により、再現性の高い結果が得られます。目的やターゲットに応じて解析のアレンジが可能です(NGS、サンガーシーケンスいずれも可能)。



## ご依頼の流れ

### ① サンプル準備

精製済みのゲノムDNA (RNase処理をお願いします)を1サンプルあたり200ng/μl以上、10μl以上を目安にお送りください。ゲノムの品質が解析結果に影響することがございますので、クオリティチェックを実施いただきますようお願いいたします。※1

### ② サンプル送付

専用のオーダーシートをHPよりダウンロードしていただきます。必要事項をご記入いただき、[dnacraft@fasmac.co.jp](mailto:dnacraft@fasmac.co.jp)まで送付をお願いします。またオーダーシートの印刷物ならびに電気泳動写真をサンプルに同梱の上、以下の宛先まで冷蔵便でお送りください。

#### 送付先

〒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  
ランダムインテグレーション解析担当 宛  
TEL:046-281-9909

### ③ 解析受注

サンプルを受領いたしましたら、解析受注のご報告メールをお送りいたします。また初めてご依頼されるお客様は、以下のサイトからユーザー登録をお願いします。

<https://www.bio.fasmac.co.jp/FasmacWebSystem/ja-JP/UserInfo/AddNew.mvc>

### ④ サンプルのクオリティチェック

蛍光定量装置にて濃度測定を行います。明らかに基準に満たない場合には、お客様へ連絡し、以降の作業について進めるかどうかご連絡差し上げます。

### ⑤ プライマー設計

ご連絡いただいた外来DNAの配列情報からin silicoにてプライマーを設計いたします。

### ⑥ サンプル調製

RAISING法にてサンプル調製を行います。蛍光定量装置にて濃度測定を行い、キャピラリー電気泳動でサイズ確認を行います。不良の場合には再度サンプル調製からやり直し、それでも不良の場合にはご相談の上、解析を中止とさせていただきます。この場合、料金はサンプル調製までの費用をいただきます(50,000円)。

### ⑦ シーケンス

ご選択いただいたプランに基づき、シーケンスを実施いたします。※2

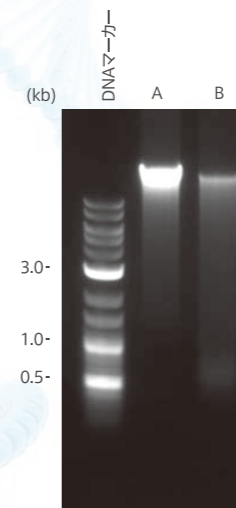
### ⑧ データ納品

データは生データでご提供いたします。サンガーシーケンスプランの場合は専用Webサイトへのアップロードを行い、NGSプランの場合には、USBメモリにて納品いたします。

#### 納品物

サンガーシーケンスプラン:  
波形データ(ab1ファイル)、  
配列データ(txtファイル)

NGSプラン:  
品質値付きのMiseq出力配列  
(fastqファイル) ※3



※1 以下の方法を参考にクオリティチェックをお願いします。  
・吸光度計により、A260/A280 $\geq$ 1.6、A260/A230 $\geq$ 1.6であることを確認  
・アガロース電気泳動により、分解がないことを確認。左図のゲル画像を例にした場合、Aはクオリティに問題なく、Bは分解が見られておりクオリティに問題があると判断。  
※2 解読長はそれぞれ以下の通りです(参考)。  
・サンガーシーケンスプラン: 600-700bp ・NGSプラン: 300bp  
※3 解析オプションを選択した場合には、外来DNAの挿入位置情報を示したファイルを併せてお送りいたします。