OKADAI BIOBANK

バイオバンク
受託解析紹介

2016.3.22版

OKAYAMA UNIV.

Clinical Study Core Hospital

受託内容一覧

岡山大学病院バイオバンクでは，以下の受託解析を実施しております。

No		サービス内容
1	核酸	核酸精製　核酸濃度測定
2		gDNA断片化チェック
3		RNA断片化チェック
4		核酸分析電気泳動
5		超音波DNA断片化
6		DNA断片ゲル抽出
7	次世代シーケンサ関連	ライブラリ作製
8		ライブラリ定量
9		ライブラリ精製
10		シーケンス
11		二次、三次解析
12	定量	デジタルPCR
13		リアルタイムPCRによる体細胞変異検出 (QIAGEN qBiomarker Somatic Mutation PCR Arrays)
14	病理	パラフィンブロック作製 (PAXgene固定組織のみ受託、金曜午後開始、月曜午前完成)
15		HE染色(火曜午前実施)
16		バーチャルスライド
17	生体分子マルチプレックスアッセイ	
18	初代培養	

核酸抽出：概要

自動抽出装置（QIAcube, QIAsymphony）を用いて核酸抽出を行います

QIAcube

QIAsymphony

（QIAGENより）

注：濃度測定等は含まれていません

組織、血漿、血清、全血、バフィーコートなどからの核酸抽出が可能です。

ディスポーザブルのチップやローターアダプタの使用により機械の本体が試薬やサンプルに触れることなく、よりコンタミの可能性が少ない環境で抽出を行います。

核酸抽出：対応可能抽出キット

血漿からの核酸精製
QIAamp Circulating Nucleic Acid kit
DNA精製
DNeasy Blood and Tissue Kit
PAXgene Tissue DNA Kit
QIAamp DNA Blood Mini Kit
QIAamp DNA Investigator Kit
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit
QIAamp DNA Microbiome Kit
QIAamp DNA Micro Kit
QIAamp DNA Mini Kit
QIAsymphony DSP DNA Mini Kit
RNA核酸精製
PAXgene Blood RNA Kit
RNeasy Mini Kit
RNeasy FFPE Kit
miRNeasy Mini Kit
PAXgene Tissue RNA Kit
PAXgene Tissue miRNA Kit

＊＊＊これら以外のキット (QIAGEN社製に限る）を使用しての抽出については要相談＊＊＊

核酸濃度測定：概要

QubitもしくはLabChip DSを用いて核酸濃度を測定します

Qubit

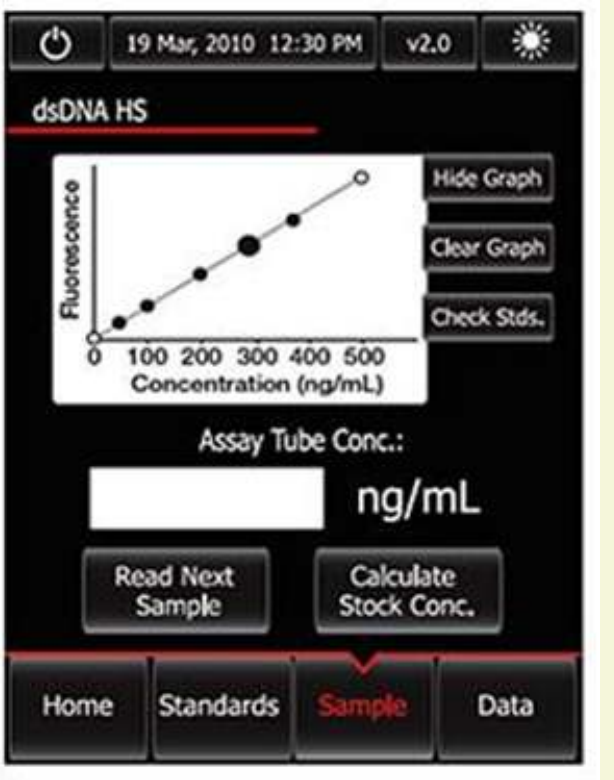
LabChip DS

(Life Technologies, PerkinElmerより)

dsDNA:Qubitを用いて測定します。蛍光強度による測定です。
RNA:LabChip DSを用いて測定します。吸光度による測定です。

Life Thechnologies Qubit：概要

Qubitを用いることで正確なDNAの濃度測定が可能です



(Life Technologiesより)

蛍光色素を使用してdsDNAの正確な定量を行う蛍光分析装置。（現在はdsDNAのアッセイキットのみを購入しています。）

Perkin Elmer LabChip DS：概要

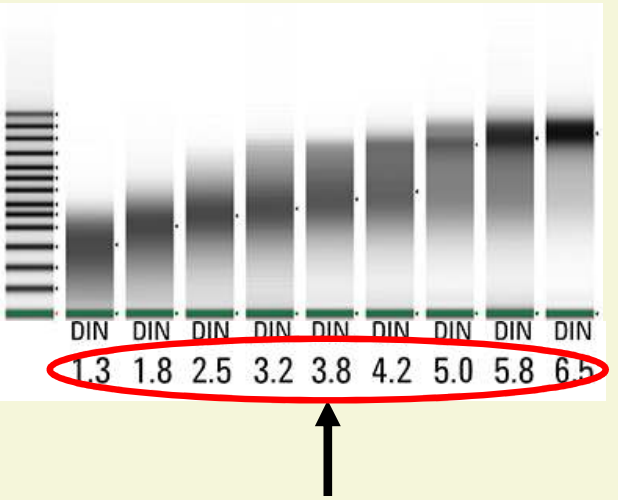
LabChip DSを用いることでハイスループットな吸光度ベースの濃度測定が可能

(PerkinElmerより)

専用のDropPlateを用いることにより、わずか
1～2.5 uL のRNAを解析することができます。
96サンプルを5分で解析します。

gDNA断片化チェック：概要

TapeStationを用いてgDNAのクオリティを数値で評価します



gDNAの断片化度合いを数値で評価

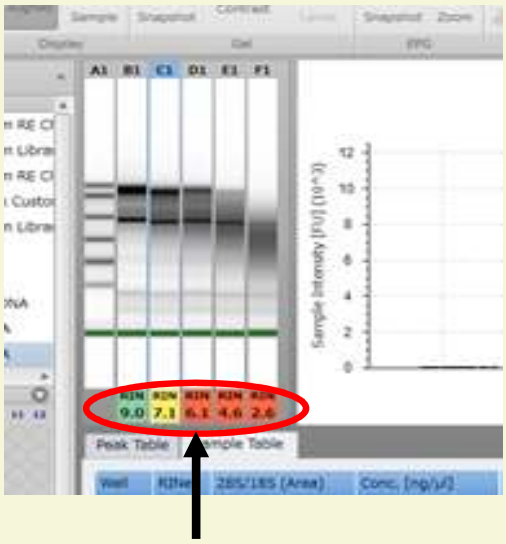
(Agilentより)

200bp - 60,000bp の範囲のgDNA の品質確認を行います。gDNA の分解度を、DNA Integrity Numberとして1～10 のスコアで計算されます。

Intact のゲノム DNA や FFPE から抽出されたゲノム DNA まで、様々なゲノム DNA の分解度を客観的に数値で評価することができます。

RNA断片化チェック：概要

TapeStationを用いてRNAのクオリティを数値で評価します



RNAの断片化度合いを数値で評価

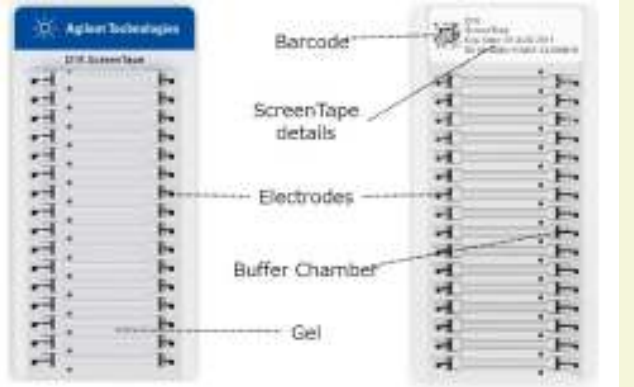
(Agilentより)

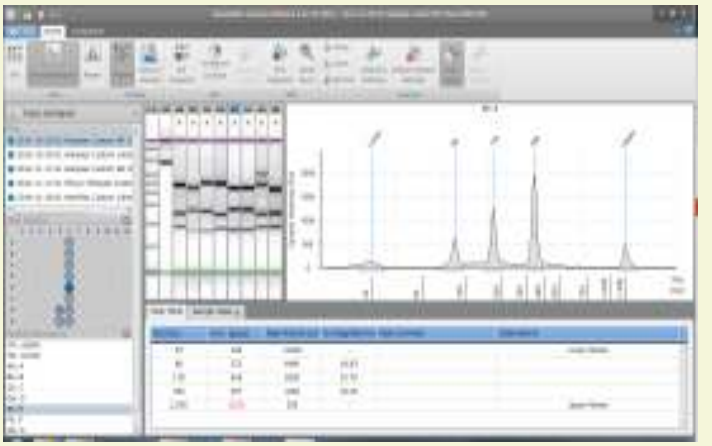
total RNAの品質評価を効率的に行うことができます。RNA Integrity Number equivalent (RINe) として、真核生物と原核生物の total RNA の分解度を客観的に数値で評価します

分離能の向上により rRNA ピークを確実に検出し、また、定量性も向上したので分解度の検証と定量を一度に行うことが可能となりました。

核酸分析電気泳動：概要

TapeStationを用いてDNA/RNA サンプルの品質確認を行います





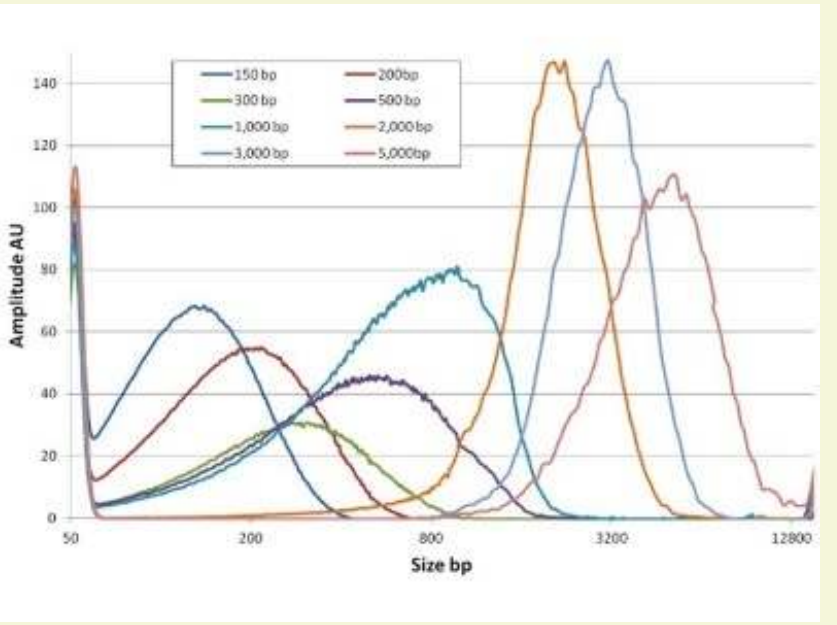
(Agilentより)

多検体のDNAおよびRNAサンプルを全自動でハイスループットに分析する電気泳動システムです。

マイクロアレイ、qPCR等における多検体のDNA/RNA サンプルの品質確認に最適です。

超音波DNA断片化：概要

CovarisM220を用いて任意のサイズのDNA断片が作製します



(MS機器より)

断片化範囲
150～800 bp (microTUBE AFA Fiber Screw-Cap)
150～1500 bp (microTUBE AFA Fiber Snap-Cap)

DNA総量:100 ng to 5 ugの10 kb以上のgDNA（厳守）
溶液量：Fiber Screw-Cap 50 uL
　　Snap-Cap 130 uL （厳守）
Buffer：Tris-EDTA, pH8.0 （厳守）

高出力で安定した超音波をサンプルに集中的に照射し、短時間で DNA をさまざまなサイズに断片化することができます。

DNA断片ゲル抽出：概要

BluePippinを用いて、自動でDNA断片の抽出を行います

(日本ジェネティクスより)

最大抽出数：1ラン当たり5レーン

抽出範囲
2.0% アガロース　　：100bp - 600bp
0.75% アガロース　　：2.0kb - 27kb

より狭い分布のDNA断片の抽出が可能です。低分子DNAのコンタミを減少させることで、無駄なリードや不明瞭な判定を減らし、シークエンス効率がアップします。ゲルカセットの各レーンが独立しているため、泳動中の拡散によるサンプル間のコンタミリスクが発生しません。

次世代シーケンサー解析：概要

サンプルと試薬を準備下さい
シーケンス結果をお返しします

DNA, RNAの抽出、濃度測定

↓

DNA, RNAのQuality check

↓

ライブラリーの作製、サイズ測定、定量

↓

MiSeqによるシーケンス (一次解析)

↓

二次解析

↓

三次解析

次世代シーケンサー解析に関しては、核酸の抽出、濃度測定、クオリティチェック、ライブラリの作製、定量、シーケンス (一次解析)、二次および三次解析まですべて受託で行うことが出来ます。

解析をお考えの方は、サンプルと個別に必要な試薬類を準備していただくだけで、あとはデータになって帰ってくるのを待つだけになります。

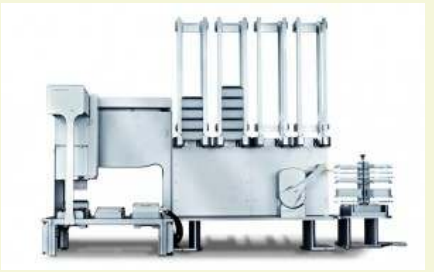
ライブラリ作製：概要

次世代シーケンサーのライブラリ作製に
最適な環境を準備

QIAcube

Qubit

CovarisM220



Bravo

TapeStation

(QIAGEN、Life Technologies、MS機器、Agilentより)

DNA抽出からライブラリ作製に関しては、QubitやTapeStationをはじめ必要な周辺機器を完備しており、ライブラリ作製に最適な環境を準備しております。

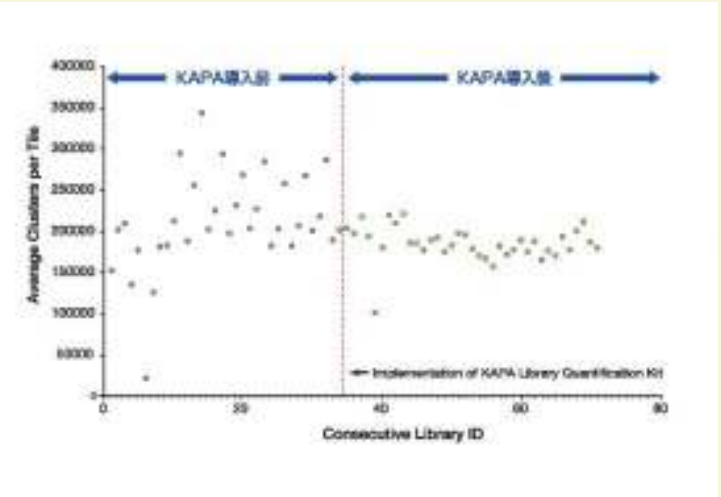
また、 自動分注装置によりAgilentライブラリ作製キットHaloPlexおよびSureSelectのライブラリ作製を自動で行うことも可能です。

ライブラリ作製：作製実績

対象	キット名
DNA-seq	Illumina, TruSightOne
	QIAGEN, GeneRead DNAseq
	Agilent, HaloPlex
	Illumina, Nextera XT DNA
	Agilent, HaloPlex HS
RNA-seq	Agilent, SureSelect XT RNA
	Illumina, TruSeq Targeted RNA Expression

ライブラリ定量：概要

KAPA Library Quantification Kitを使用し、ライブラリーを定量します。

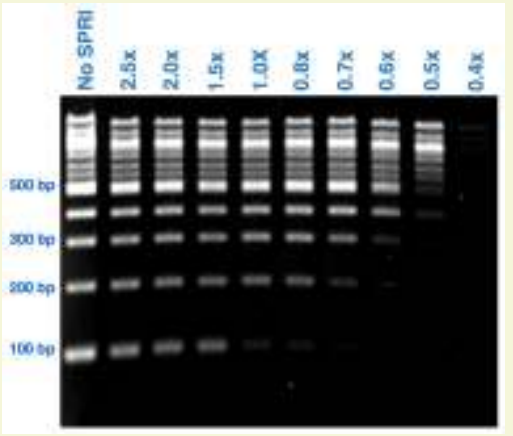


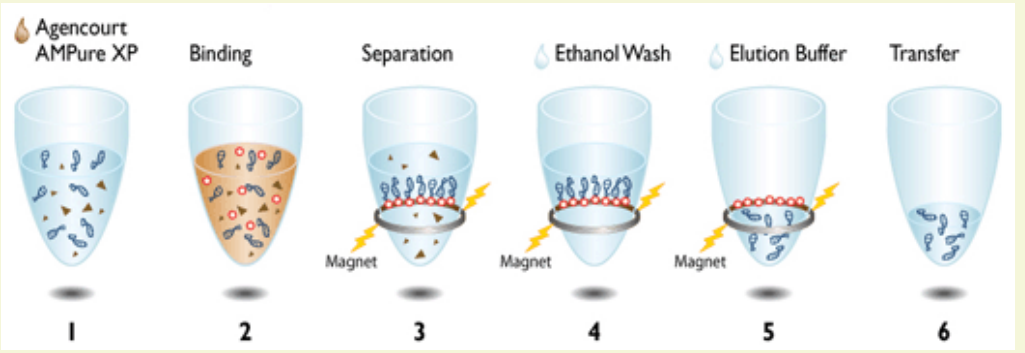
(ABI、日本ジェネティクスより)

qPCRベースのKAPA Library Quantification Kitを用いて定量することで、最適なライブラリー濃度を得ることができ、クラスター密度のバラツキを抑えます。

ライブラリ精製：概要

AMPure XPを用いてライブラリを精製します





(BECKMAN COULTERより)

磁気ビーズ核酸精製キット AMPure XP Kitを用いて、フリーのdNTPやPCRプライマー、プライマーダイマー、塩を効率的に除去し、100塩基以上のDNA断片を高回収します。

gDNAのクリーンアップにも対応可能です。

シーケンス：概要

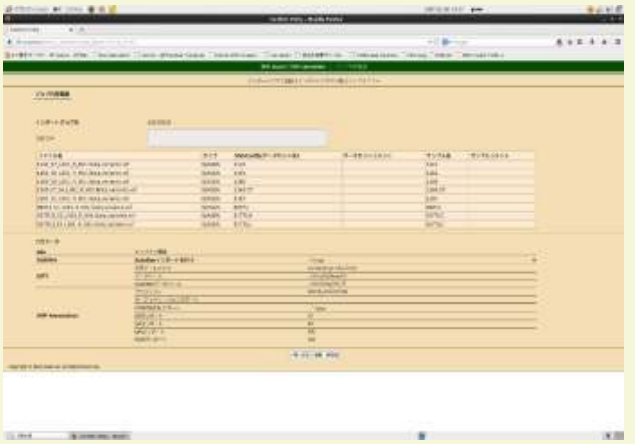
MiSeqを導入し、ターゲットリシーケンス、RNA-seq、メタゲノム解析、ChIP-seqなど様々な解析に対応しています

(ILLUMINAより)

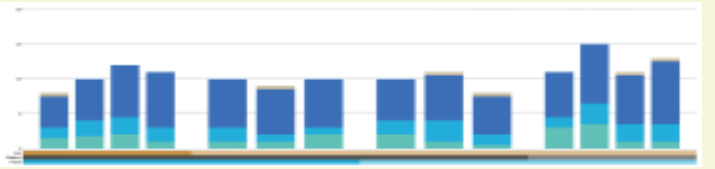
使いやすさとクオリティを追求した、デスクトップ型のコンパクトな次世代シーケンサーです。サンプルから解析までの時間を短縮し、迅速に解析結果を作成します。

二次、三次解析 ：概要

変異の検出、発現量の算出などの二次解析を行え、グループ間比較、発現量比較も可能です

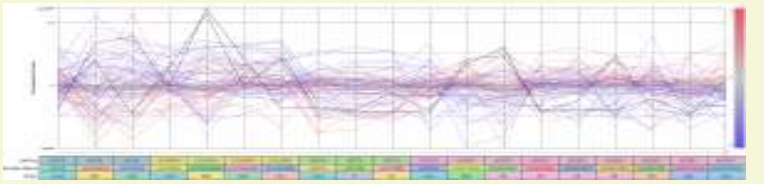


MAZE



Subdive

CLC Genomic Workbench

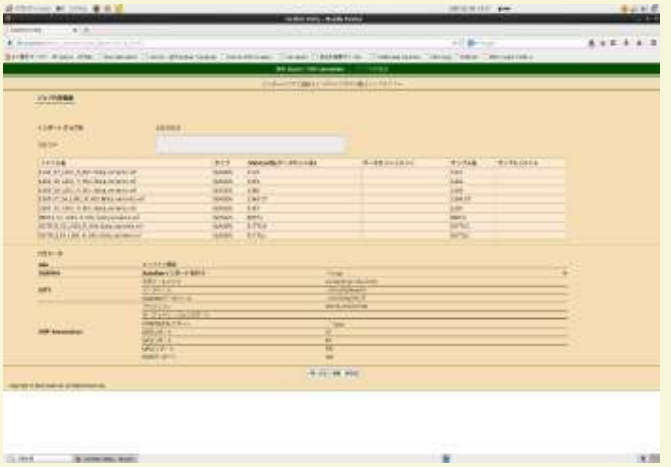


Subio Platform

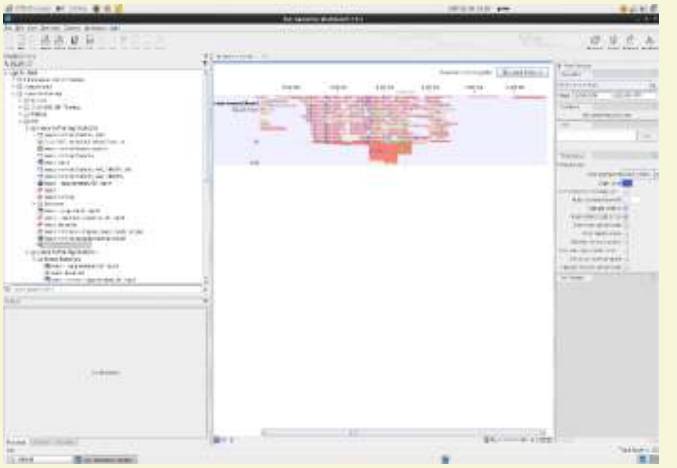
(MAZE, QIAGENより)

二次、三次解析 ： MAZE, CLC Genomics Workbench

SNV解析、mRNA-seq解析、ChIP-seq解析、de novoシーケンスなど各種解析を行え、集合演算なども行えます。



MAZE



CLC Genomic Workbench

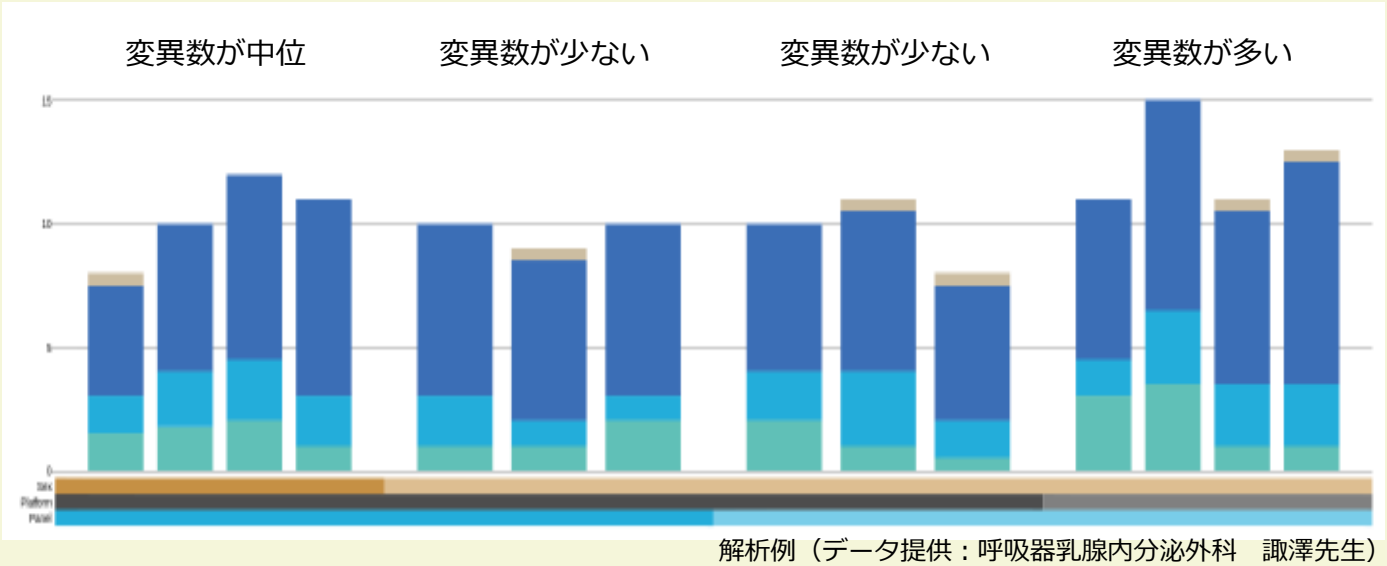
(MAZE, QIAGENより)

SNV解析、mRNA-seq解析、ChIP-seq解析、de novoシーケンスなど各種解析を行えます。

集合演算も行え、特定のグループのみに検出された変異などの抽出することもできます。

二次、三次解析 ：Subdive

Subdiveを用いることでグループ間の特徴や傾向を視覚的に捉えることが可能です

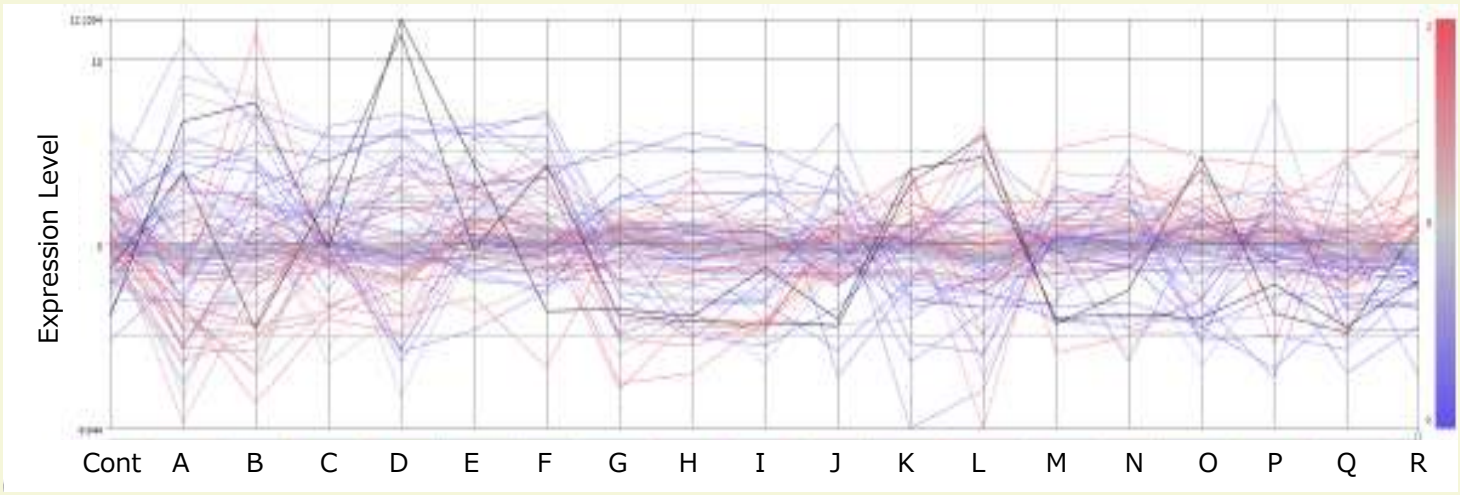


解析例（データ提供：呼吸器乳腺内分泌外科　諏澤先生）

多型の数がポピュレーション間でどのように違うかを比較したり、特定の絞り込みを行わずに、多型全体で大まかに比較することも可能です。

二次、三次解析 ：Subio Platform

Subio Platformを用いることでサンプル間の発現量の違いを直感的に捉えることが可能です



サンプル間やグループ間の発現量の違いを視覚的に捉えることができます。発現量の変動から候補遺伝子の絞込みを行えます。

BIO-RAD QX200 Droplet Digital PCR：概要

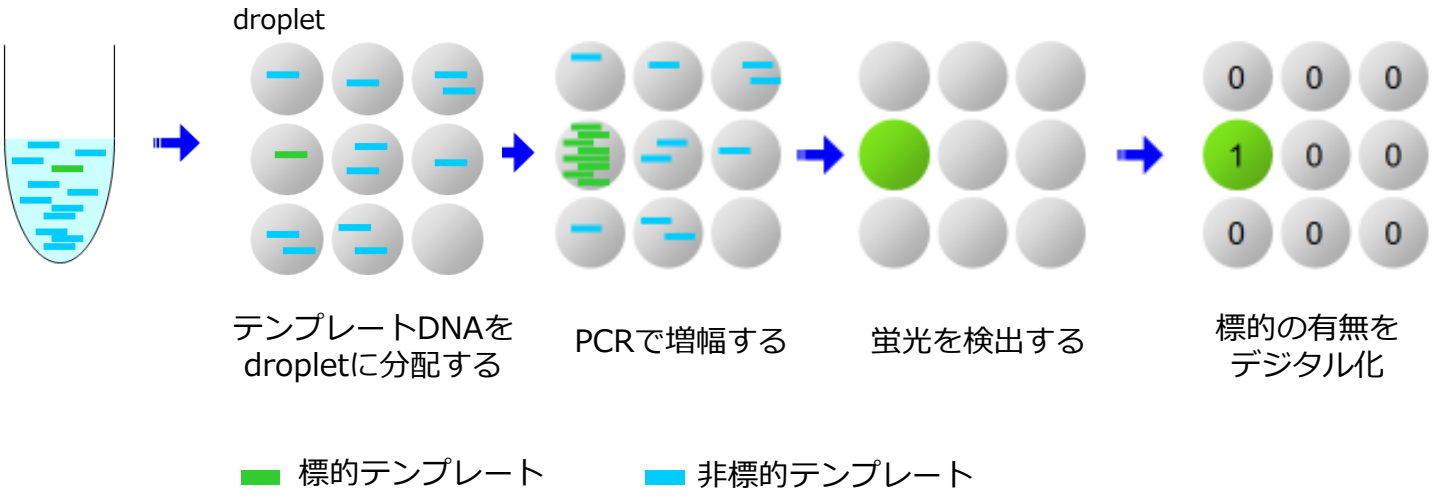
QX200 ddPCRを用いて絶対定量を行います

(Bio-Radより)

EvaGreen または TaqMan プローブを使用したターゲット DNA または RNA 分子の絶対定量を実現します。感度と精度に優れ、さまざまな用途に用いることができます。

BIO-RAD QX200 Droplet Digital PCR：原理

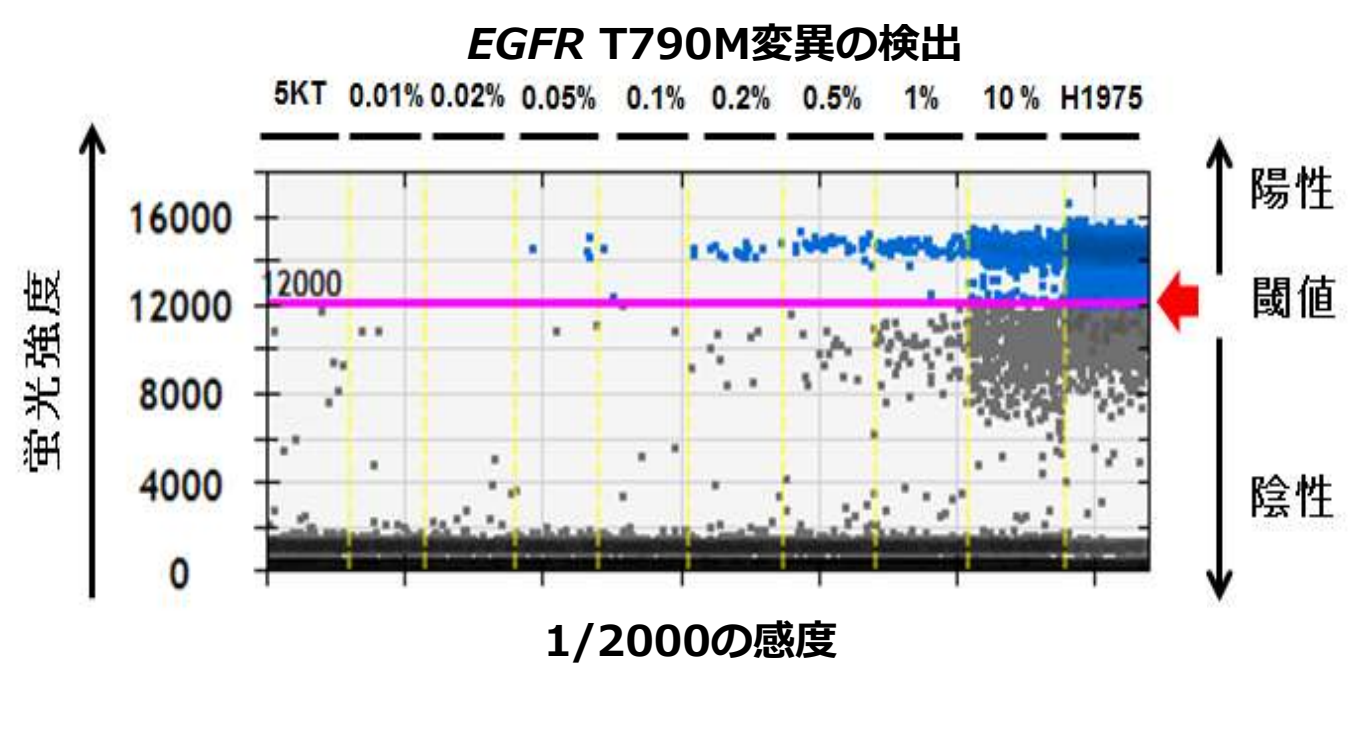
QX200 ddPCRはdroplet内でPCRを行い標的の有無をデジタル化して絶対定量を行う



(Bio-Radより)

BIO-RAD QX200 Droplet Digital PCR：感度

QX200 ddPCRで
1/2000の感度で変異を検出



（呼吸器・乳腺内分泌外科　橋田様より提供）

BIO-RAD QX200 Droplet Digital PCR：実験例

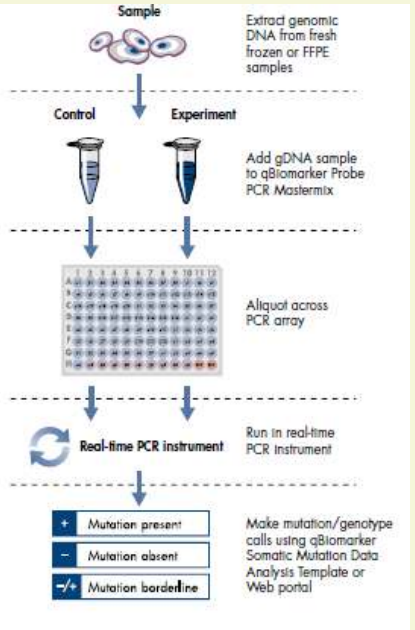
QX200 ddPCRを使えば
リアルタイムPCRより高精度・高感度な
解析が可能

癌変異の測定
希な DNA ターゲットのコピー数の検出
CNV の測定
病原体検出
遺伝子定量解析

(Bio-Radより)

リアルタイムPCRによる体細胞変異検出：概要

qBiomarker Somatic Mutation PCR Arrayを用いて体細胞DNA変異を正確にプロファイリングします



(QIAGENより)

生物学的パスウェイあるいは疾病に関連する重要な遺伝子の体細胞変異状態のプロファイリングを迅速かつ正確に行ないます。

変異は、臨床または機能的関連性および出現頻度に基づいて、広範な体細胞突然変異のデータベース（例：COSMIC）と査読済み科学文献から選択されています。

パラフィンブロック作製：概要

エクセルシアASを用いてパラフィンブロックを作製します

(ThermoFisherより)

試薬モニタリングシステムや試薬ローテーションシステムによって適切な試薬交換が自動で行われ、良質な検体作成を可能にします。

PAXgene固定組織のみ受託

HE染色：概要

ジェミニASを用いて組織切片のHE染色を行います。

(ThermoFisherより)

1ランで最大20枚のスライドを染色します。
染色工程は全て自動で行われ、均一な条件で染色を行えます。

薄切およびスライドの作成は行いません

バーチャルスライド：概要

Axio Scan.Z1を用いてスライド上の切片の全領域を撮影します

(Carl Zeissより)

スライドが取り込まれると、自動的に撮影領域を認識設定し、撮影を行います。（現在、明視野画像のみ撮影可能です）

無償のソフトウェアで自分のパソコンでも閲覧可能です。

生体分子マルチプレックスアッセイ：概要

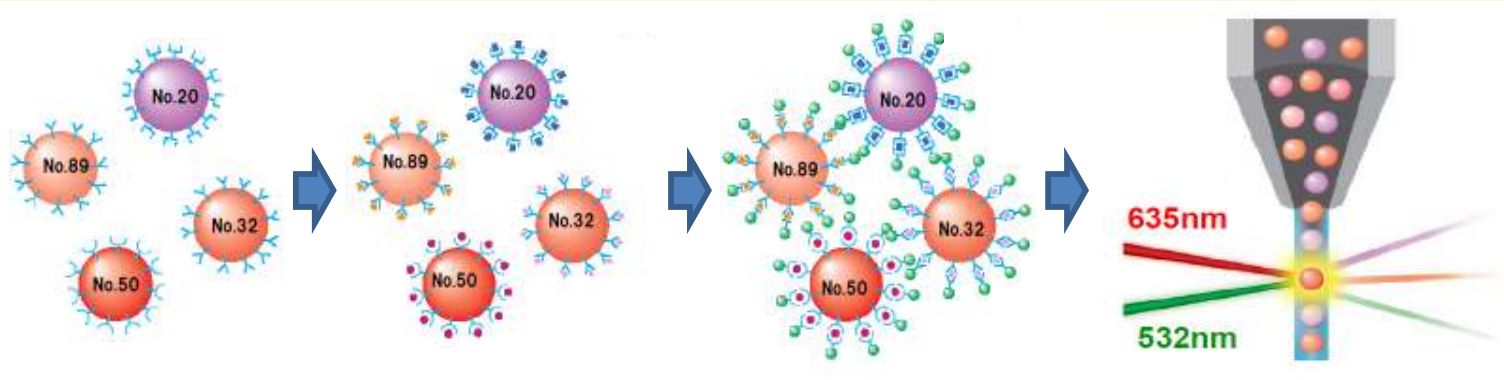
Bio-Plex200を用いてマルチプレックスアッセイを行います

(Bio-Radより)

1ウェル最大100項目の生体分子のマルチプレックスアッセイを行い、検出・定量できるバイオアッセイシステム。

生体分子マルチプレックスアッセイ：原理

Bio-Plex200はターゲット固有の蛍光を元に検出定量を行う



抗体などが
ビーズ上に固定

ターゲット分子が結合

検出抗体が結合

フローサイトの原理で送液し、
レーザーで蛍光を検出

(Bio-Radより)

生体分子マルチプレックスアッセイ：アッセイキット

Bio-Plex200では様々なアッセイキットが販売
目的に合わせたカスタムオーダーも可能

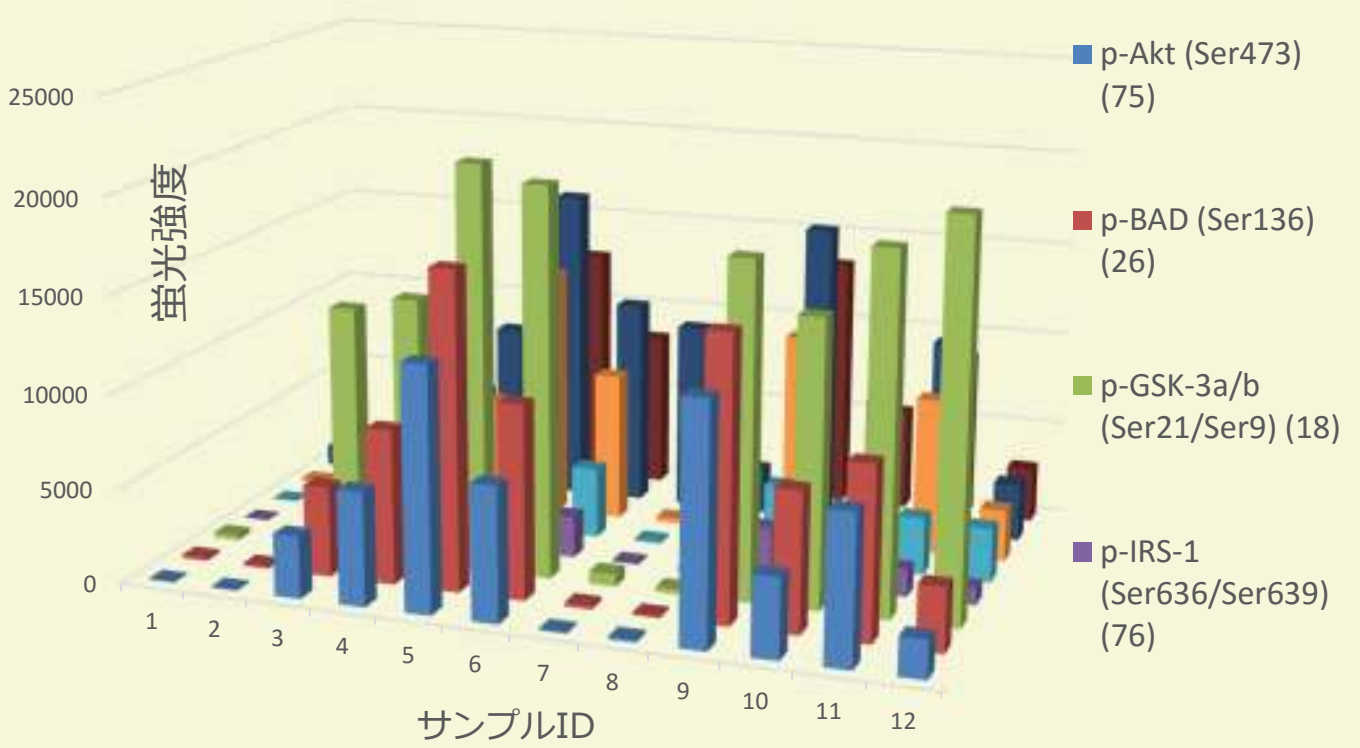
炎症関連アッセイ
MMP関連アッセイ
TIMP関連アッセイ
サイトカイン/ケモカイン/成長因子関連アッセイ
細胞内シグナル関連アッセイ
Apoptosis 関連アッセイ
糖尿病関連アッセイ
代謝、ホルモン関連アッセイ
腎毒性関連アッセイ
疾患関連アッセイ

(Bio-Radより)

生体分子マルチプレックスアッセイ：実験例

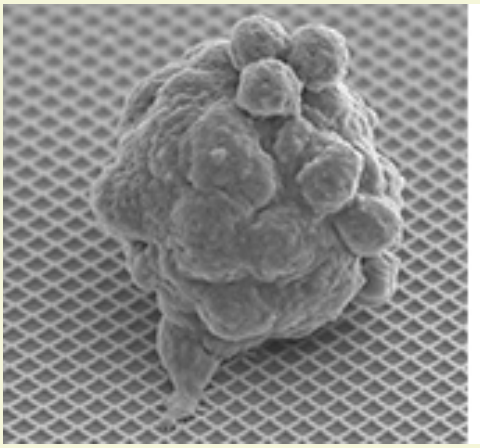
Bio-Plex200を使えば、
1回の実験で複数項目の定量が可能です

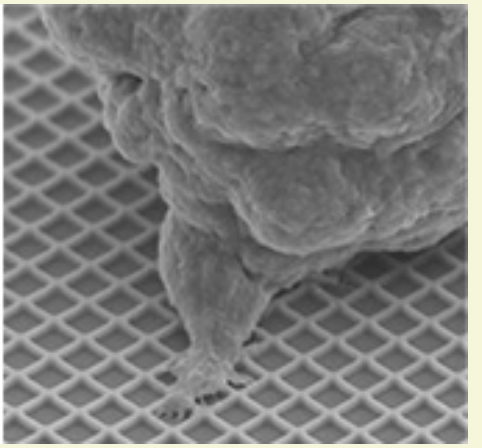
細胞のlysateをサンプルに、8種類のリン酸化タンパク質を検出（免疫学　榮川様より提供）



初代培養：概要

市販のキットを用いて初代培養を行います





(Miltenyi Biotc, SCIVAXより)

Miltneyi Biotech gentle MACS Dissociator、Dissociation Kit、SCIVAX NanoCluture Plateなどを使用して、組織からの初代培養を行います。