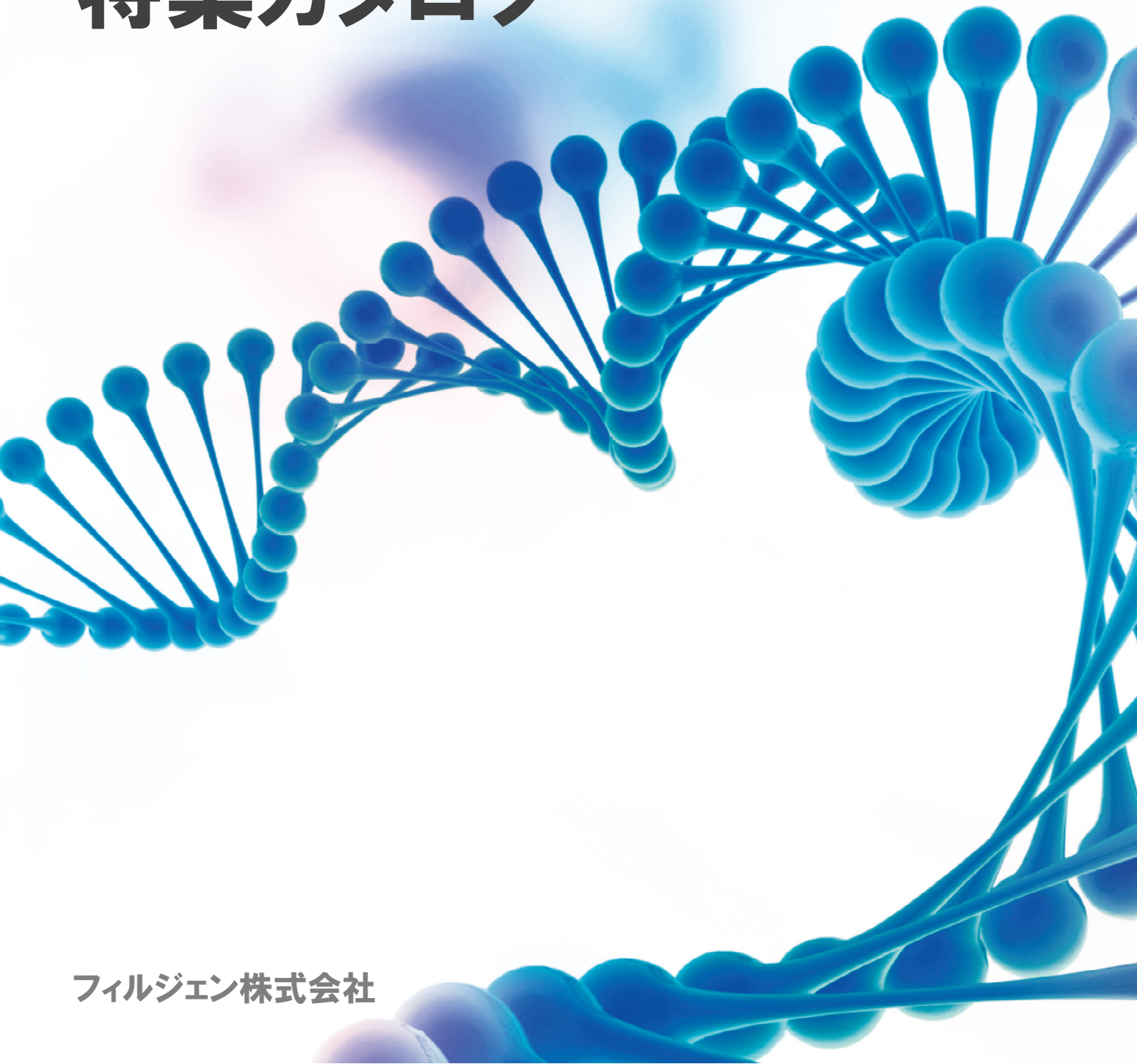
Filgen®
biosciences & nanosciences

エピゲノム
エピトランスクリプトーム
特集カタログ



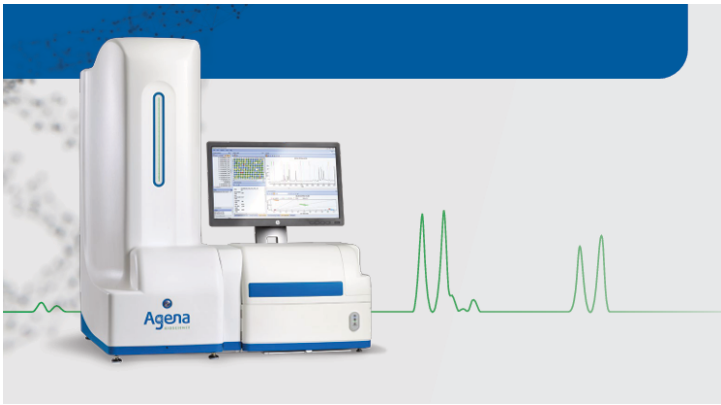
フィルジェン株式会社

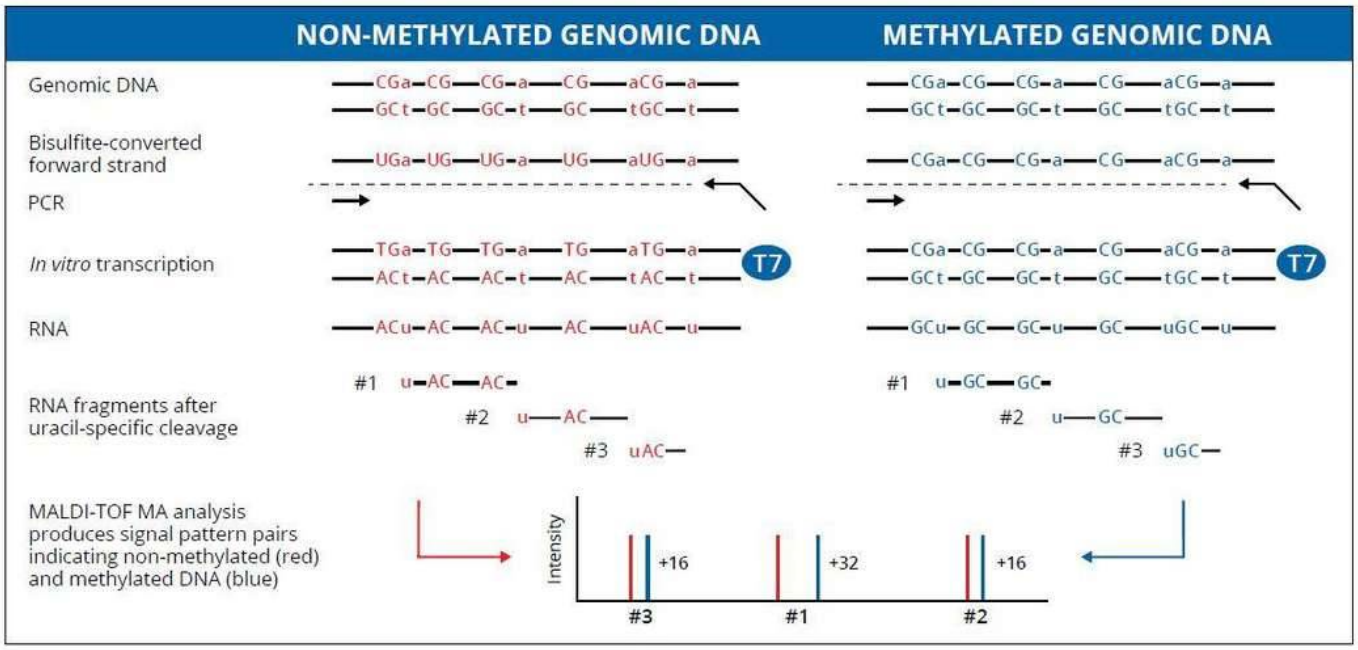
EpiTYPER® DNA Methylation 受託解析サービス

EpiTYPERは、MALDI-TOF質量分析ベースのバイサルファイトシーケンシング法であり、領域特異的なDNAメチル化を定量的かつハイスループットで解析することができます。この技術は、200～600 bpのアンプリコンで10～100個のサンプルとCpG部位を調べ、メチル化の5%の差を検出します。特に、候補領域を研究したり、ゲノムワイドなDNAメチル化研究から領域を検証したりするための大規模な取り組みに適しています。

アッセイデザインからデータ解析までのフルサービスを提供！

EpiTYPERのバイオケミストリーは、ゲノムDNAのバイサルファイト処理から始まり、続いて標的領域のPCR増幅が行われます。この際、T7プロモータータグを含むリバースプライマーを使用します。次に、in vitro RNA転写が行われ、続いて塩基特異的RNA切断が行われます。最後に、MALDI-TOF質量分析計（MassARRAY Analyzer）を用いて切断生成物を分析します。元のゲノムDNAのメチル化および非メチル化シトシン残基は、EpiTYPERソフトウェアを使用して用意に区別できます。





STEP 1 ：アッセイデザイン

EpiDesignerは、MassARRAYシステムでのDNAメチル化実験のためのオンライン自動設計ツールです。ターゲット配列を入力するだけで、ソフトウェアが最も完全な DNA カバレッジのためのプライマーデザインを決定します。最適化されたプライマー配列に加えて、EpiDesignerは、ターゲット領域上に設計されたアンプリコンの読みやすいグラフィカルな解釈を提供し、アッセイでカバーされる個別のCpG部位に注釈を付けます。

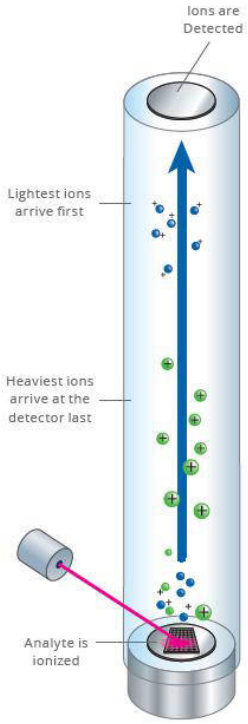
STEP 2 ：バイサルファイト処理

ゲノムDNA（gDNA）は亜硫酸水素塩で処理します。メチル化シトシンは影響を受けない一方、全ての非メチル化シトシンはウラシルに変換されます。

STEP 3 ：PCR、In vitro転写、RNA切断設計

EpiTYPERアッセイは、T7プロモータータグ付きリバースプライマーを使用したPCRから始まります。バイサルファイト誘発された配列変化を維持したままターゲット領域を増幅します。

Shrimp Alkaline Phosphatase処理後、in vitro転写を行い、取り込まれなかったDNAヌクレオチドを廃棄します。PCRの際に付加されたT7プロモーターを使用してPCR産物を逆鎖から転写し、一本鎖RNA産物を生成します。このRNA産物は、ウラシル残基のRNase Aで特異的に切断されます。



STEP４：データ取得および解析

EpiTYPER反応生成物はSpectroCHIP®アレイ（チップ）に分注されます。その後、チップはMALDI-TOF（Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight）質量分析計にセットされ、通常15～60分でデータが取得されます。結果は自動的にデータベースにロードされ、EpiTYPERソフトウェアでデータ解析が行われます。

SpectroCHIP上のマトリックスは、レーザーのエネルギーを吸収し、それをRNAフラグメントに伝達し、その後イオン化します。イオン化されたフラグメントは、電場の影響下で質量分析計のフライトチューブの端にある検出器に到達するまでにかかる時間によって分離されます。質量が大きいほど飛行時間が長くなります。1つ以上のCpGジヌクレオチドを含むフラグメントは、CpGユニットと呼ばれます。CpGジヌクレオチドがメチル化され、バイサルファイト変換から保護された場合、対応するRNAフラグメントであるCpGユニットは質量が16Da重くなり、その結果質量スペクトルが16Daシフトします。質量分析計で検出されるシグナルは、フラグメントの数に比例します。フラグメントの数は、マススペクトル内の対応するピークの表面積によって定量化されます。特定のCpGのDNAメチル化率は、メチル化フラグメントを表すピークの表面積を、メチル化フラグメントと非メチル化フラグメントの両方のピークの合計表面積で割ることによって計算されます。

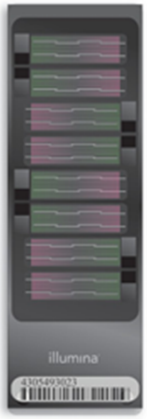
特長と利点

効率性	・最大600bpのアンプリコンで複数のCpGをカバー ・ホルマリン固定パラフィン包埋組織サンプルにも対応
精密性&正確性	・高精度（5% CV） ・高い研究室間再現性
感度	・メチル化レベルの変化を5%まで検出
費用対効果	・24、96、384ウェルフォーマットをご用意 ・200-600bpのアンプリコンから、1回のシンプルな反応で複数のCpGを解析可能。
シンプルなワークフロー	・CpG特異的プライマーの設計が不要 ・PCR産物の精製不要 ・数個から数百個のターゲット領域の調査に最適 ・サンプル間の比較に便利なソフトウェアソリューション

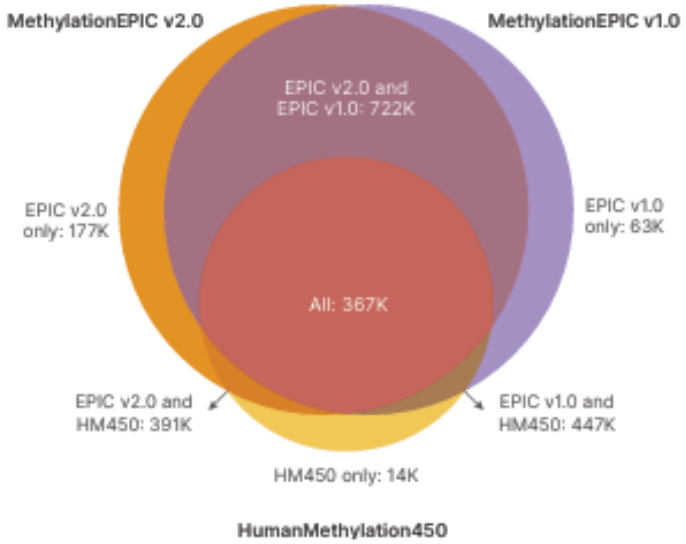
Infinium™ MethylationEPIC BeadChip 受託解析サービス

本サービスは、illumina社のDNAメチル化ビーズアレイ「Infinium™ MethylationEPIC v2.0 BeadChip」を用いた受託解析サービスです。エピジェネティクス関連研究において広く使用され、がん研究、遺伝性疾患、老化、分子疫学などの分野でメチル化に基づくバイオマーカーの発見と応用を可能してきたInfinium HumanMethylation450そしてInfinium MethylationEPIC v1.0 BeadChipに続く、新バージョンのアレイです。信頼性の高いInfiniumケミストリーの基盤の上に構築され、また、エピジェネティクス研究の新時代においてより多くの生物学的発見を可能にするため、専門的にキュレーションされたコンテンツをゲノムワイドにカバーしています。

Infinium™ MethylationEPIC v2.0 BeadChipの特長



- ✓ **93万以上のメチル化サイトをターゲット**
- ✓ **単一CpG部位レベルでの定量的メチル化測定**
- ✓ **高精度で正確なメチル化データ**
- ✓ **高い後方互換性を維持しつつ、最先端の機能的コンテンツを新たに搭載**
- ✓ **FFPEサンプルにも対応**



2種類のInfiniumケミストリー

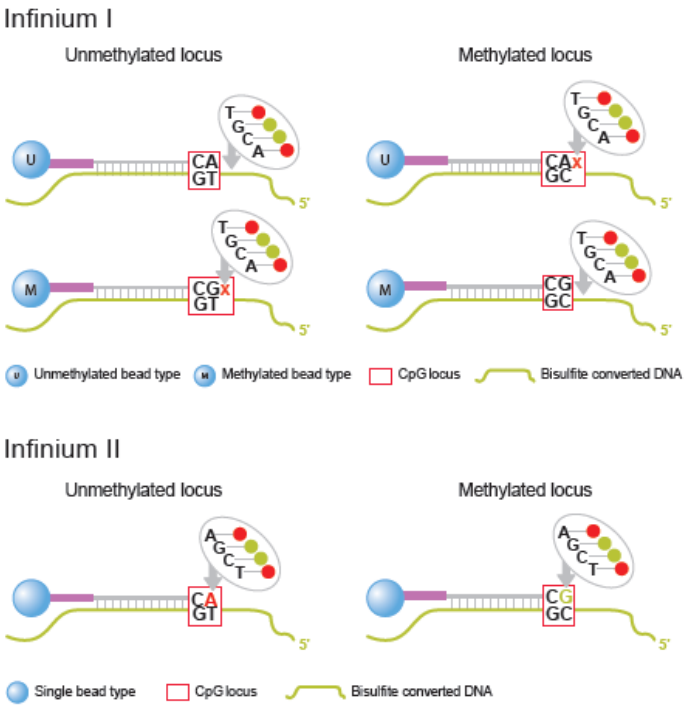
Infinium™ MethylationEPIC BeadChipは、業界で最も信頼性が高く、実績あるDNA解析プラットフォームであるillumina社のInfiniumアッセイを使用しています。Infiniumメチル化アッセイは、DNAサンプル内の個々のCpGサイトを調べるためにデザインされた、ターゲット特異的な長鎖プローブが結合したビーズを採用し、DNAメチル化は、バイサルファイト処理したゲノムDNAの定量的ジェノタイピングにより測定されます。Infinium I アッセイ、およびInfinium II アッセイが、お互いに補完的に働くことにより、広いターゲット領域をカバーします。

Infinium I アッセイ

1つのCpGサイトに対して、1個の「非メチル化」DNA検出プローブ及び1個の「メチル化」DNA検出用プローブの合わせて2個のプローブが利用されます。各プローブの3'末端は、保護されたシトシン（メチル化デザイン）、またはバイサルファイトによる変換と全ゲノムの増幅によって生成するチミン塩基（非メチル化デザイン）のいずれかにマッチする様にデザインされています。

Infinium II アッセイ

1つのターゲットサイトに対して、1個のプローブのみを使用する様にデザインされています。プローブの3'末端は、検出サイトのすぐ上流の塩基に相補的で、1塩基伸長の結果、「メチル化」Cまたは「非メチル化」Tに相補的な、標識されたGまたはAの塩基がそれぞれ付加されます。また縮重オリゴヌクレオチドプローブを用いることにより、50merの配列内に別のCpGサイトが存在したとしても、最大3箇所まで存在しても、データに影響を及ぼさず、ターゲットに隣接するCpGサイトのメチル化状態とは関係なく、検出サイトでのメチル化状態を評価することが可能です。



Broader Coverage Using Infinium I and II Assay Designs—
The MethylationEPIC BeadChip employs both Infinium I and Infinium II assays. Infinium I assay design employs 2 bead types per CpG locus, 1 each for the methylated and unmethylated states. The Infinium II design uses 1 bead type, with the methylated state determined at the single base extension step after hybridization.

エピゲノムゲノムワイド関連解析に最適なメチル化プロファイルマイクロアレイ
CpGアイランド、遺伝子、エンハンサーを広範囲にカバー

【改良点①】
Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChipは、バージョン1.0のゲノムワイドなバックボーンを基に構築されており、高い後方互換性を維持しながら、専門家のフィードバックとヒトがんおよび細胞サンプルのエピジェネティック評価に基づいて得られた新しいコンテンツを追加しています（表2、表3）。新バージョンのBeadChipでは、非機能性プローブを削除し、エピジェネティクス コミュニティによって特定されたより多くの機能的コンテンツを搭載しました。186,000以上の新しいプローブが、ATAC-SeqおよびChIP-Seq 実験によって同定された原発性腫瘍に関連する既知のエンハンサー、スーパーエンハンサー、CTCF結合ドメイン、クロマチンのオープン領域をターゲットとしてデザインされました。
これらは、主要なエピジェネティック研究者および最近の科学出版物によってアドバイスされた新しいコンテンツです。

【改良点②】
バージョン1.0ではカバーが不十分であったCpGアイランドとエクソンが、追加プローブによって徹底的にカバーされています。さらに、新バージョンでは450以上のがんドライバー変異が照会され、がん研究のためのマルチオミクスツールとなりました。あらゆる研究者は、将来のエピジェネティックな発見のための新しい最先端のコンテンツを活用できます。

Infinium MethylationEPIC v1.0 と v2.0 BeadChipのレガシーコンテンツ:
- ◆ CpGアイランド
- ◆ ヒト幹細胞で同定された非CpGサイトのメチル化領域(CHHサイト)
- ◆ ENCODEオープンクロマチンとエンハンサー
- ◆ FAMTOM5エンハンサー
- ◆ DNase高感受性部位
- ◆ miRNAプロモーター領域
- ◆ Human Methylation450 BeadChipに搭載されているコンテンツの約85%

Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChipの新コンテンツ:
- ◆ 複数のがんにおける、腫瘍サンプルと正常サンプル同定された異なるメチル化部位
- ◆ ChIP-seqにより同定されたがんおよび細胞株サンプル中のエンハンサーおよびスーパーエンハンサー
- ◆ ATAC-seqによって特定された原発性ヒトがんにおいて識別的にアクセス可能なクロマチン領域
- ◆ CpGアイランドのカバレッジ拡大
- ◆ 正確なコピー数多型（CNV）検出のための強化されたエクソンカバレッジ
- ◆ 一般的ながんドライバー変異

Table 2: Dense coverage of CpG islands

Feature	No. covered	% covered	Avg no. of loci/feature
Island	25,381	91%	5.4
North shore	25,115	90%	3.5
South shore	24,870	89%	3.6
North shelf	21,719	78%	2.1
South shelf	21,677	78%	2.1

Table 3: Infinium MethylationEPIC v2.0 coverage of genomic regions

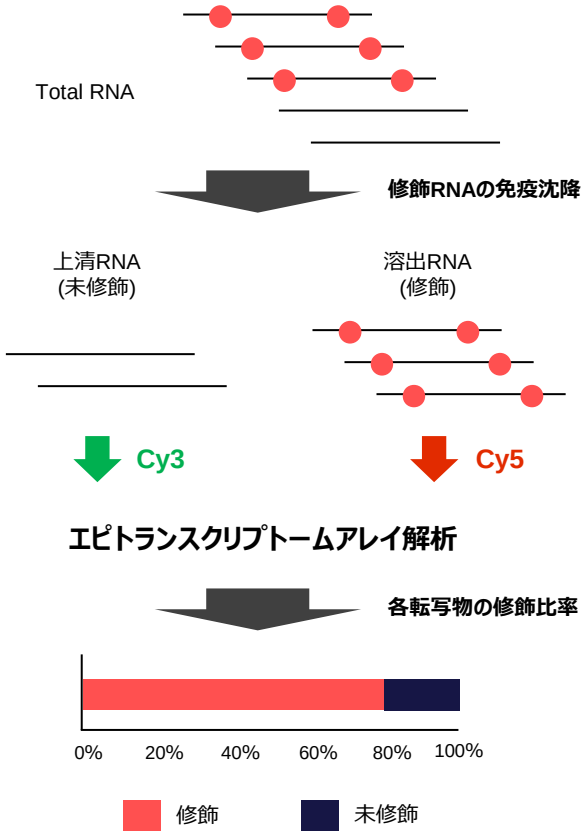
Feature type	No. of features mapped	% features covered	Avg no. of loci/ feature
RefSeq			
NM_TSS200[a]	51,688	82%	2.8
NM_TSS1500	59,981	96%	5.6
NM_5' UTR	42,051	67%	1.7
NM_1stExon	44,471	71%	1.8
NM_3' UTR	39,407	63%	1.3
NM_Exonic	207,398	28%	0.5
NR_TSS200	12,706	68%	2.0
NR_TSS1500	15,961	86%	3.9
NR_1stExon	9810	53%	1.4
NR_Exonic	30,211	25%	0.5
GenCode Basic v41			
TSS200	160,572	79%	1.7
TSS1500	197,603	80%	3.9
5' UTR	61,823	59%	1.4
First Exon	118,516	47%	1.1
3' UTR	41,659	53%	1.2
Exonic	417,055	26%	0.5
Enhancers			
DNase hypersensitivity sites[b]	432,393	16%	0.2
FANTOM5 Enhancers[c]	23,852	84%	1.0
CisReg Site Evid 40-50[d]	19,159	70%	1.3
CisReg Site Evid 50-60	21,609	67%	1.2
CisReg Site Evid 60-70	30,152	61%	1.1
CisReg Site Evid 70-80	66,446	47%	0.8
CisReg Site Evid > 80	153,712	19%	0.3
Cancer driver mutations			
Cancer driver mutations[e]	473	81%	0.8

a. Distance in base pairs from transcriptional start site (TSS).
b. From ENCODE v5: 2745580 DNase hypersensitivity sites genome-wide.
c. Genomic regions identified as enhancers by the FANTOM5 project.
d. From ENCODE v5: 87 studies with full data annotation.
e. From: Bailey MH, Tokheim C, Porta-Pardo E, et al. Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. Cell. 2018;173(2):371-385.e18.

Epitranscriptomic Array 受託解析サービス

N6-メチルアデノシン（m6A）および5-メチルシチジン（m5C）などのRNA修飾は転写後の遺伝子制御、つまりエピトランスクリプトームおよび遺伝子発現制御に深く関係しています。この2つのメチル化はmRNAやLncRNAにおいて豊富な内部修飾となっており、転写後mRNA/LncRNA代謝および機能のあらゆる局面に影響を与えます。さらに、m6Aは、キャップに依存しないcircRNAの翻訳開始やPrimary microRNA（pri-miRNA）のプロセシングなど、他の多くのncRNAの機能にも関与しています。

本解析では、メチル化RNA免疫沈降法(MeRIP)と2色チャンネルマイクロアレイ技術を組み合わせ、修飾および未修飾のRNAを比較することができ、転写産物をアイソフォーム特異的にRNAの修飾レベルを定量化します。2種類のアレイスライドをご用意しており、mRNAとLncRNA、またはcircRNAのトランスクリプトームワイドなRNA修飾プロファイリングをご提供いたします。



coding / non-codingなエピトランスクリプトームのカバレッジ

上記2つのアレイでは、MeRIP-Seqでは検出が難しいLncRNAやcircRNAなどを高い感度および精度で検出可能です。サンプル中のLncRNA / circRNAジャンクション部位の存在量は非常に低く、シークエンスによって正確に定量することはできません。IPエンリッチなLncRNA / circRNAジャンクションについても同様です。

また、circRNA Epitranscriptomic Microarrayでは、mRNA&LncRNA Epitranscriptomic Microarrayとは異なり、作業工程の中でRNase R処理によりLinear RNAを除去することで、より正確なcircRNAの修飾の定量化が可能です。

MeRIP-seqよりも優れたRNAメチル化プロファイル

本解析は、MeRIP-Seqでは検出の難しいLncRNAやcircRNAの高精度な検出および各転写物の修飾比率を単一アレイ上で検出可能です。さらにrRNAの除去が不要でMeRIP-Seqよりも迅速かつ簡単に解析が行えること、MeRIP-seqでは最低120μgのTotal RNAが必要であるのに対し、本解析は少量のサンプルでの解析が可能であり、希少サンプルでのRNAメチル化解析に適しているという利点があります。

Epitranscriptomic ArrayとMeRIP-Seqとの比較

	Epitranscriptomic Array	MeRIP-Seq
各転写物の修飾比率	単一アレイ上で同時検出可能	1度のRunでは困難
Lnc-RNA、circRNAのプロファイル	高い感度・精度で解析可	困難
mRNAまたはrRNAの除去	不要	必要

アレイの種類と仕様

mRNA&LncRNA Epitranscriptomic Microarray

mRNA、LncRNAおよび中サイズのnon-coding RNAクラス(pre-miRNA、pri-miRNA、snoRNA、snRNA)を同一アレイ上でプロファイル

プローブ総数	Human: 60,491 Mouse: 60,491 Rat: 38,352
プローブ長	60 nt
プローブ選択領域	転写物の全長に沿った特異的エクソンまたはスプライスジャンクション
プローブ特異性	転写物特異的
ラベリング法	少量の分解RNAでも、cRNAは3'バイアスなしで全長に沿って標識される
mRNA数	Human: 21,174 Mouse: 30,924 Rat: 27,770
LncRNA数	Human: 40,173 Mouse: 37,949 Rat: 10,582

circRNA Epitranscriptomic Microarray

miRNAの競合内在性RNAであるcircRNAのRNA修飾をカバー

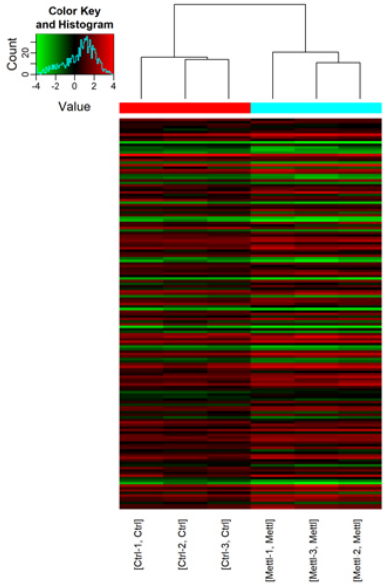
プローブ総数	Human: 13,617 Mouse: 14,236 Rat: 14145
プローブ長	60 nt
プローブ選択領域	CircRNA-specific junctionを標的とするプローブ
プローブ特異性	転写物特異的
ラベリング法	ランダムプライマー標識とRNase前処理を組み合わせた、環状RNA特異的かつ効率的な標識

バイオインフォマティクス解析例

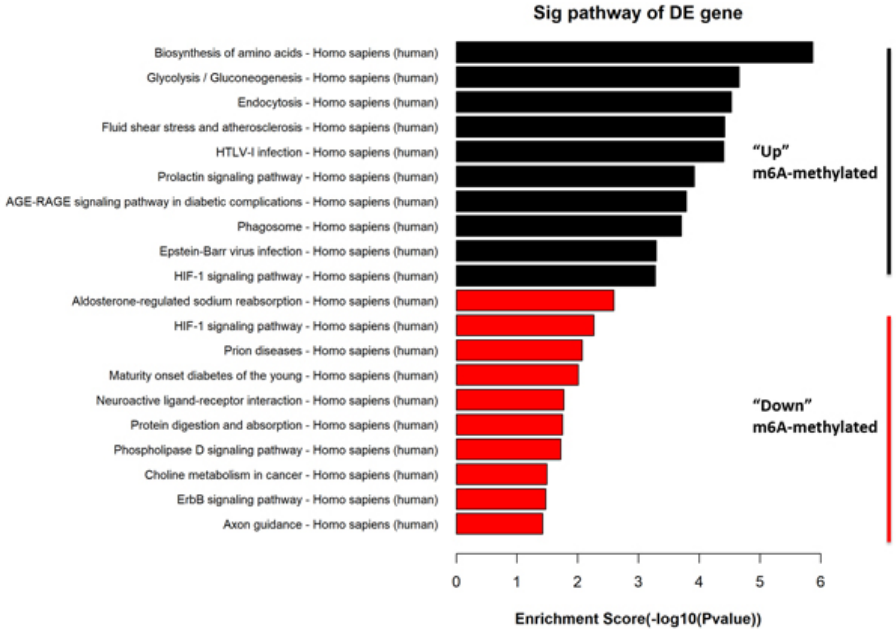
データ例1: 差次的に修飾された転写産物（mRNA、LncRNA、およびmid-size ncRNA）

Comparison (Group 1 vs. Group 2)											
	Differential			Group normalized intensity		Percentage of m6A-methylated transcript		Annotations			
Modified RNA Transcript	p-value (≤ 0.05)	|FC| (≥ 2.0)	Regulation	Group1	Group2	Group1	Group2	Type	Tier	Gene symbol	Source
ENST00000377548	0.0016	3.55	UP	12.43	10.6	15%	18%	mRNA		RP11-160N1.10	GENCODE
NM_003128	0.0023	4.72	Up	6.70	4.46	6%	6%	mRNA		SPTBN1	RefSeq
NR_110004	0.0082	2.72	Up	9.15	7.71	15%	17%	lncRNA	Gold	LOC101927159	RefSeq
T110862	0.0067	2.49	Down	11.52	12.83	27%	29%	lncRNA	Reliable	G026239	RNA-seq

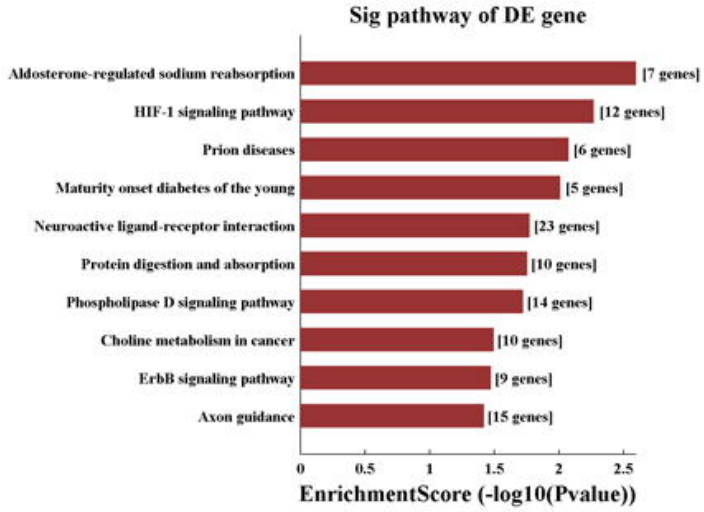
データ例2: 差次的に修飾されたRNAの階層的クラスタリングヒートマップ



データ例3: 差次的に修飾されたmRNAのGOエンリッチメント解析



データ例4: 差次的に修飾されたmRNAのパスウェイ解析



m6A Single Nucleotide Array 受託解析サービス

6-メチルアデノシン（m6A）は哺乳類のmRNAおよびLong non-coding RNAにおいて最も豊富なRNA修飾であり、転写産物ごとに平均して3～5部位で発生します。Arraystar社が開発したm6A Single Nucleotide Array解析は、一塩基分解能で正確にm6A部位を特定し、修飾の割合を定量化することができます。従来の他の技術では実現できない解像度、特異性と感度、m6A修飾比率の定量化を可能にする本サービスは、m6Aの分子メカニズムや生化学的機能、疾患の関連性に関する研究の強化につながります。

m6A/MeRIP-seqよりも優れたパフォーマンス

m6A抗体は他の関連修飾（m6Amなど）と交差性があるため、m6A修飾に対するアッセイの特異性は限られています。本解析は、メチル化感受性MazF RNaseに基づく技術を採用しており、MeRIPやmiCLIPのようなm6A抗体免疫沈降に基づくアプローチに依存しないm6Aプロファイリングを可能にします。

RNase MazFは、一本鎖RNA 5'の非メチル化（ACA）配列を切断する酵素特性を持ちますが、メチル化（m6ACA）配列は切断しません（図1）。

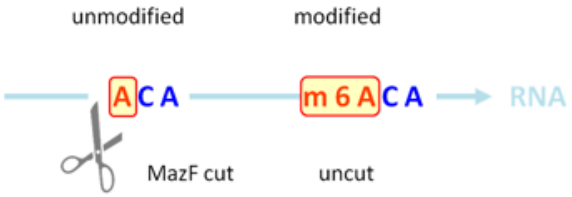
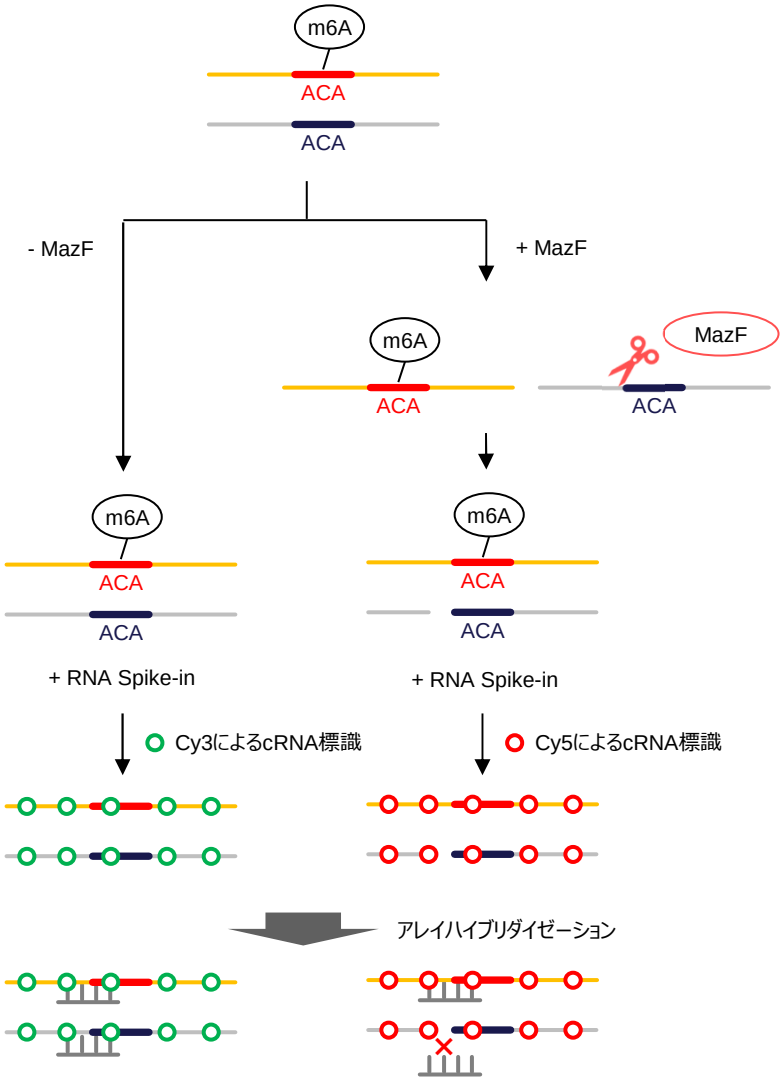


図1. MazF酵素のACA配列およびメチル化感受性

MazF消化に基づいて、切断されていないm6ACAを含むRNAフラグメントとMazF消化されていない input RNAを2色で標識し、ハイブリダイズすると、一塩基分解能でm6Aレベルの定量値が得られます（図2）。この方法では、半定量的なm6A抗体免疫沈降を使用しないため、正確に定量化することができます。

図2. m6A Single Nucleotide Array解析のワークフロー



アレイの仕様

本解析では、アレイプローブで定量化可能なすべてのm6ACA部位を検出するためのパイプラインを確立しました。標準解析では、m6ACA部位の大部分を構成しているSingle-ACAを対象とした解析を行います（8ページ：バイオインフォマティクス解析例参照）。オプションの高度解析をご利用いただくことで、Single-ACAに加え、Poly-ACA、Cluster-ACAについても高解像度でプロファイリング可能です。

プローブ総数	Human: 14,321 Mouse: 14,319 Rat: 14,581
プローブ長	60 nt
Single-ACA部位	Human: 11,237 Mouse: 11,120 Rat: 11,499
Poly-ACA部位	Human: 3,084 Mouse: 3,199 Rat: 3,082
Cluster-ACA部位	Human: 693 Mouse: 279 Rat: 2,614
m6ACA部位ソース	HumanおよびMouse ・miCLIP dataset ・RMbase database Rat ・Mouse M6ACA site homologs ・RMbase database

Single-ACA部位
近接ACAが少なくとも40nt離れているACA部位

Poly-ACA部位
20nt以内に複数のACA部位が含まれている配列領域

Cluster-ACA部位
500nt以内に複数のSingle-またはPoly-ACA部位が含まれており、それらの間の距離が100nt未満の領域

バイオインフォマティクス解析例

本解析では、m6A修飾化学量論、m6A存在レベル、単一ヌクレオチド分解能でのm6A位置、転写モデル領域などの豊富なバイオインフォマティクス解析およびアノテーションをご提供いたします。

データ例1: 差次的なm6Aメチル化情報

比較条件/グループ間の差次的なm6A部位のメチル化化学量論およびm6A部位の存在量に関する情報をご提供いたします。

m6A Site on the Transcript			Differential				m6A Site Methylation Stoichiometry	
TransID	m6A_Transcript Location	Gene Symbol	Regulation	FC	p-value	FDR	Test Group (mean)	Control Group (mean)
NM_080598	547	DDX39B	hyper	5.6977	0.021	0.448	95%	16.6%
NM_213589	3952	RAPH1	hyper	2.9699	0.032	0.479	77%	26%

m6A Site on the Transcript			Differential				m6A Site Abundance	
TransID	m6A_Transcript _Location	Gene Symbol	Regulation	FC	p-value	FDR	Test Group (mean)	Control Group (mean)
NM_018085	3563	IPO9	hyper	20.193	0.009	0.219	1.970402858	-2.36539351
NM_152705	754	POLR1D	hyper	26.472	0.020	0.231	2.377749776	-2.34866785

データ例2: m6A部位の体系的なアノテーション情報

TransID	m6A_Transcript_Location	Gene Symbol	Trans_Biotype	m6A_Site_Locus	m6A Location
NM_080598	547	DDX39B	protein_coding	chr1:201845569-201845570_+	3'UTR
NM_213589	3952	RAPH1	protein_coding	chr6:31508289-31508290_-	CDS

m6A Conservation	Transcript Length	Transcript Sequence
No	11416	1...3527aggagCGCAGGAAGTCACTACCATTTATATTCTAAACAGACCTATCTATGTTCATAGGACTTCTgatgt 3598...11416
Yes	2030	1...509cgctCTCCCTGTTTAGTTATGGCAGAGAACGATGTGGACAATGAGCTCTTGGACTATGAAGATGatgag 580...2030

ProbeID: プローブ ID.
TransID: m6A が修正された転写産物のデータベース登録
Trans_biotype: 転写物のタイプ。non-coding RNAの場合は「ncRNA」、またはmRNAの場合は「protein_coding」
Gene_Symbol:転写ホスト遺伝子の公式遺伝子シンボル
m6A_transcript_location: 転写におけるm6Aの位置
m6A_site_Locus: m6A 部位のゲノム座標
m6A_location: m6A部位が位置する転写モデル領域(5'UTR、CDS、または3'UTR)
m6A_conservation: m6A部位がヒトとマウスの種間で保存された相同m6A部位である場合
Transcript_Length: 転写物の全長
Transcript_Sequence: 転写物の配列。オレンジ = m6Aモチーフ、オレンジと下線 = m6A部位、大文字 = プローブ配列

small RNA Modification Array 受託解析サービス

small RNAにおける8-オキソグアニン（o8G）、7-メチルグアノシン（m7G）、N6-メチルアデノシン（m6A）、シュードウリジン（Ψ）および5-メチルシチジン（m5C）などの修飾は、miRNAの生合成、標的mRNAとの二重鎖形成、tRNAの安定性、および疾患のバイオマーカーとして機能します。例えば、miRNAにおけるm6A修飾は正常組織と比較して、腫瘍組織で著しく増加することが報告されており、血清中のm6A修飾miR-17-5pレベルは、極めて高い感度と特異性で早期膵臓癌を検出します。そのため、small RNAにおける修飾の解析は生物学的プロセスおよび疾患理解に非常に重要です。

本サービスは、遺伝子発現制御に関与するmiRNA、miRNA前駆体であるpre-miRNA、tRNA由来のsmall RNA（tsRNA、tRNA-derived fragments（tRFs）、tRNA halves（tiRNAs）など)におけるo8G、m7C、m6A、Ψ、m5Cの修飾を免疫沈降法とマイクロアレイ技術によって網羅的に解析することができます。

修飾されたsmall RNA をより正確に解析

RNA-seqでは、ライブラリー調製の際にRNAの修飾によってcDNAの逆転写反応が阻害されることが知られています。例えば、tRNAのTΨC loopにm1Aの修飾が存在する場合、逆転写酵素の進行が阻害されるため、small RNA、特にその修飾の正確な定量化は不可能です。しかし、本解析はRNA-seqとは異なり、RNA末端を直接ラベリングするため、修飾によるcDNA合成阻害を受けることが無く、修飾RNAを特異的かつ正確に解析することを可能にしています。

small RNA の転写後修飾を定量化する技術

small RNA修飾プロファイリング技術（図1）は、マイクロアレイとRNA免疫沈降（RIP）を組み合わせて、同じアレイ上で修飾されたsmall RNAと修飾されていないsmall RNAのレベルを同時に測定し、miRNA、pre-miRNA、tsRNA（tRF / tiRNA）などのsmall RNAの修飾による制御への影響を研究するための重要な情報を提供します。

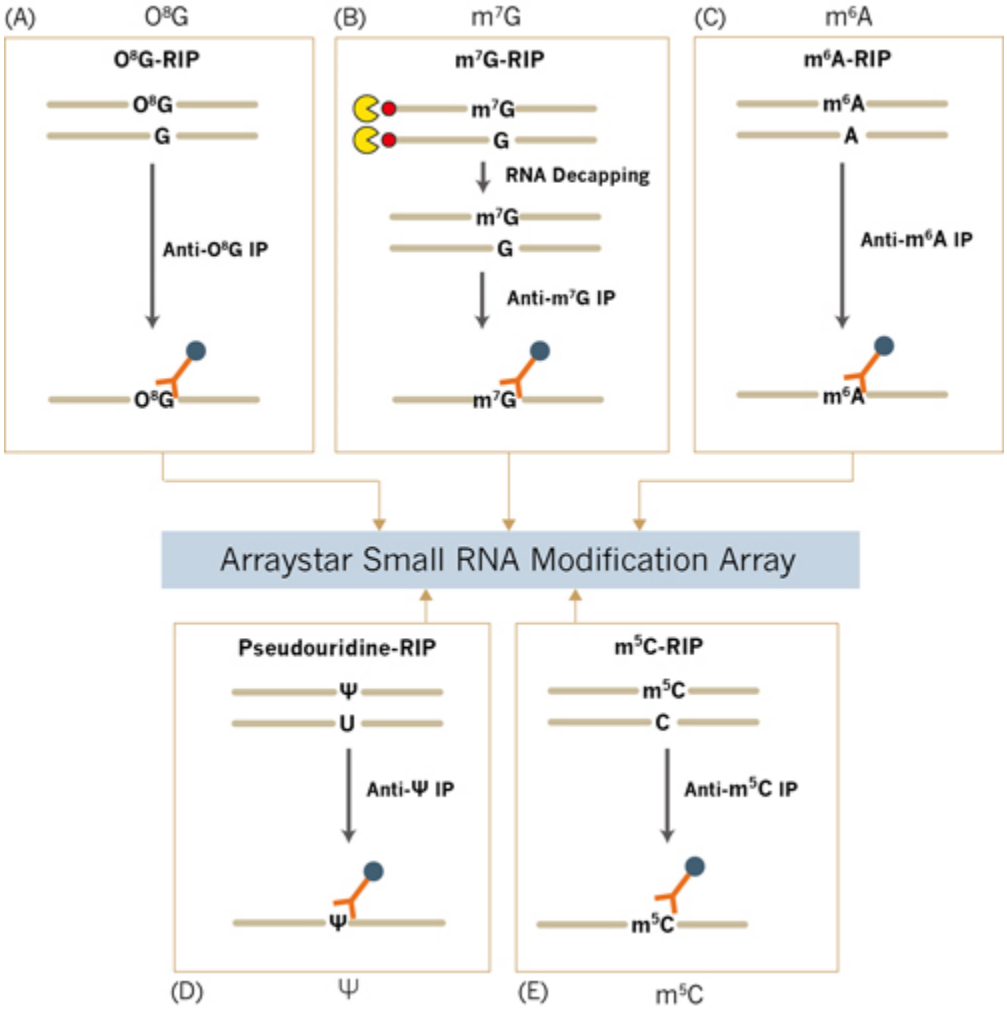


図1. small RNA修飾プロファイリング技術により、small RNAの転写後修飾（それぞれ o8G、m7G、m6A、シュードウリジン、m5C）を同定・定量化します。修飾されたsmall RNAは、特定の抗体を使用した免疫沈降によって濃縮され、その後、マイクロアレイにより同定および定量化を行います。

アレイの仕様

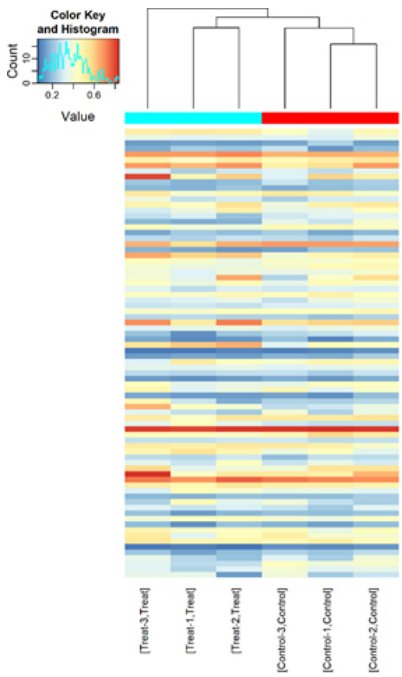
プローブ総数	Human: 14,706 Mouse: 14,895
プローブデザイン	5' キャップ断片、small RNA特異的、および 3' リンカー配列から構成されています。
プローブの結合部位	5-p-miRNAと5' tsRNA: small RNAの3' 領域 3-p-miRNAと3' tsRNA: small RNAの5' 領域 pre-miRNA: pre-miRNAのループ領域
プローブの特異性	small RNA特異的
miRNAのカバレッジ	Human: 2,628 (1,319の5-p-miRNAと1,309の3-p-miRNA) Mouse: 1,949 (966の5-p-miRNAと983の3-p-miRNA)
Pre-miRNAのカバレッジ	Human: 1,745 Mouse: 1,122
tsRNAのカバレッジ	Human: 5,128 Mouse: 1,809
small RNAのソース	miRNA: miRBase (v22) pre-miRNA: miRBase (v22) tsRNA: tRFdb, GtRNADb (Updated to 18.1 2019.08) Literatures: Scientific publications up to 2019 [1-40]

バイオインフォマティクス解析例

データ例1: 修飾されたsmall RNAのサンプル間の比較例（m7G）

Comparison (Treated vs. Control)									
	Group m7G miRNA level (log2)		Differential			Group m7G %modified miRNA		Annotations	
MatureID	Treated	Control	FC	p	Regulation	Treated	Control	miRNA_family	m7G_motif
hsa-let-7b-5p	5.07	4.01	2.062	0.034	up	20.30%	18.59%	hsa-let-7a-5p/hsa-let-7b-5p/hsa-let-7c-5p...	GAGGT
hsa-let-7c-5p	6.64	5.62	2.08	0.005	up	35.63%	27.49%	hsa-let-7a-5p/hsa-let-7b-5p/hsa-let-7c-5p...	GAGGT

Mature ID : 成熟miRNAのmiRbase ID
Group m7G miRNA level（normalized, log2）: log2変換および正規化されたm7G修飾miRNAレベル
TreatedおよびControl: グループ名
FC: Fold Change
P: t-testを基に算出されたp値
Regulation: グループ間における正または負の制御の結果
Group m7G %modified miRNA: m7G修飾miRNAのグループ平均割合
miRNA_Family: 同じシード配列を持つmiRNAファミリーメンバー
m7G_motif: m7G部位の "RAm7GGT" モチーフ配列 (RはGまたはAを表す)



データ例2: 修飾miRNA、pre-miRNA、tsRNA（tRFとtiRNA）の階層的クラスタリングヒートマップ

右図は、修飾small RNAの階層的クラスタリングヒートマップです。修飾small RNAのレベルは、左上のカラーキーを参照した赤-青のカラースケールで表されています。上の系統樹は、サンプル間の修飾プロファイルの相対的な近さを示しています。ヒートマップ上部のカラーバーは、それぞれサンプルグループを示しています。

(h)MeDIP-seq with LncRNA Promoter 受託解析サービス

本解析は、メチル化DNA免疫沈降法（methylated DNA immunoprecipitation：MeDIP）またはヒドロキシメチル化DNA免疫沈降法（hydroxymethylated DNA immunoprecipitation：hMeDIP）と、NGS技術の組み合わせによるMeDIP / hMeDIPシーケンシングサービスです。本サービスでは、LncRNAプロモーター解析も含めており、mRNAとLncRNA遺伝子プロモーターの両方について、5mCまたは5hmC修飾の詳細なデータ解析およびアノテーションを取得するという利点が付加されています。

LncRNAプロモーター解析の概要

LncRNAの転写は、タンパク質コード遺伝子の転写と比較して、細胞種、組織、疾患特異的に厳密に制御されています。LncRNAの発現異常の背後に何があるのか、上流の制御機構を理解することは、LncRNA研究の重要な部分であり、この転写制御に関するエピジェネティックな研究は、ゲノムの観点から重要な手段となります。

転写に重要なプロモーター領域におけるDNAメチル化やヒドロキシメチル化は、遺伝子発現を制御する作用があります。例えば、LncRNA-MEG3プロモーター領域のメチル基修飾は、肝臓がんや統合失調症患者において異常な変化を示しています。食道がんでは、LncRNAプロモーターのメチル化シグネチャーが、mRNAプロモーターよりも高い腫瘍細胞・非腫瘍細胞間の分類能力を示しています。LncRNAプロモーターのメチル化調節異常は一般的で、乳がん検体では最大57%に見られます。LncRNAプロモーターのメチル化レベルとLncRNA遺伝子発現は、当然のことながら有意に相関しています。

(h)MeDIP-seqとLncRNAプロモーター解析の組み合わせにより、mRNAとLncRNA遺伝子の両プロモーター上の5mCまたは5hmC修飾の詳細なデータ解析およびアノテーションを得ることができます（図1）。さらに、本解析サービスはArraystar社のLncRNA ArrayによるLncRNAおよびmRNAの遺伝子発現プロファイリングとシームレスに統合し、生体系や疾患におけるエピジェネティック制御と遺伝子発現を系統的に解析することが可能です。

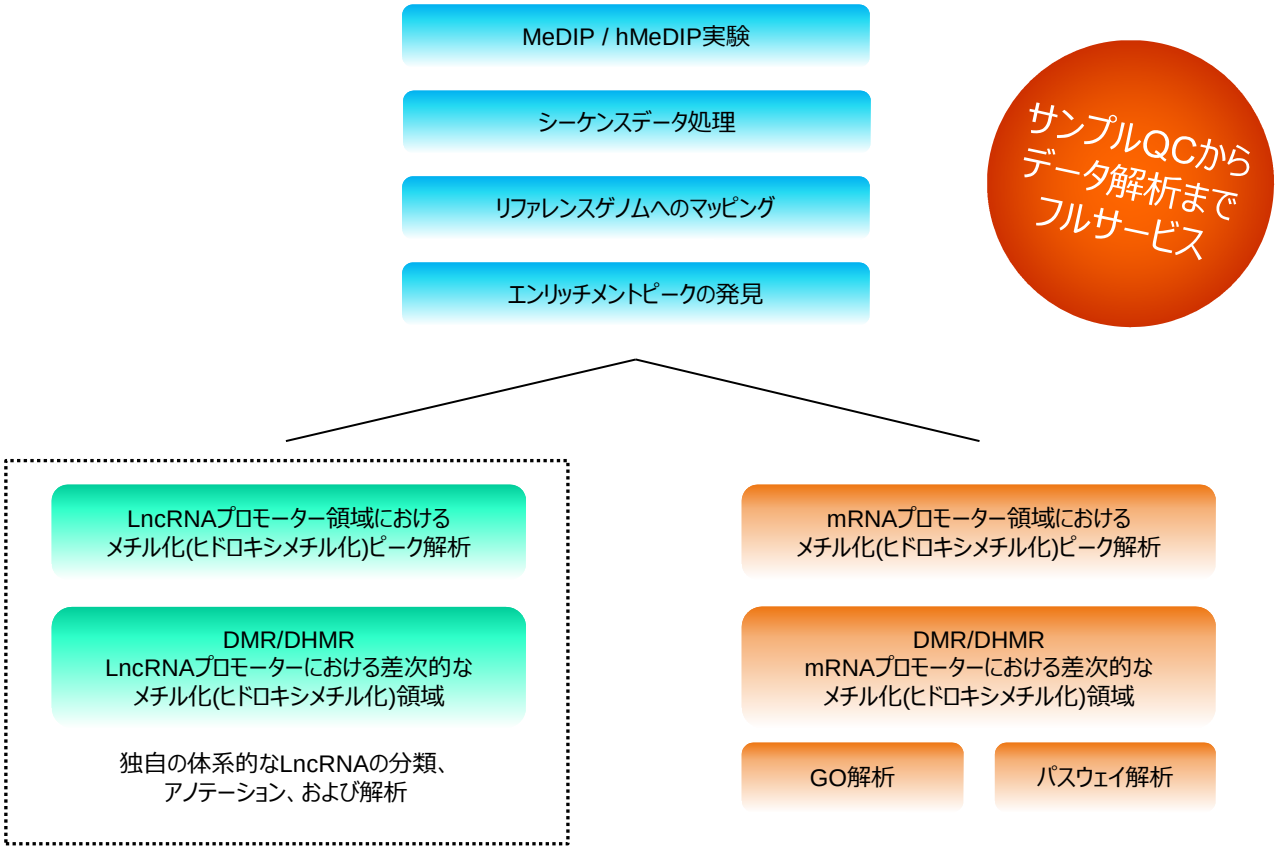


図1. mRNAプロモーターに加えてLncRNAプロモーター解析も特徴とするMeDIP/hMeDIP-seqのワークフロー

バイオインフォマティクス解析例

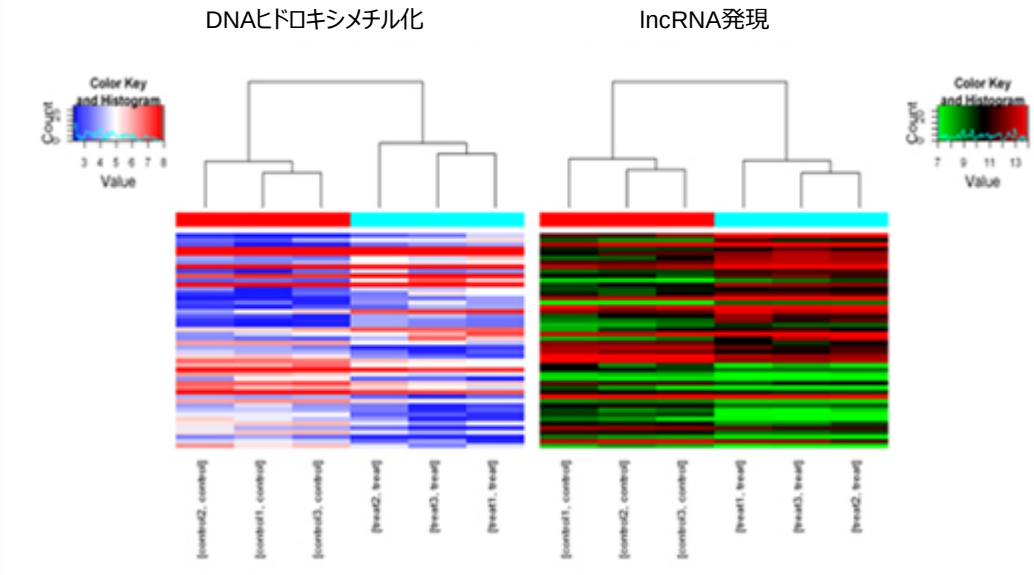
データ例1: サンプル間またはグループ間のLncRNAプロモーター領域におけるメチル化/ヒドロキシメチル化変動

LncRNAプロモーター領域（/- 2000 bp of TSS）におけるメチル化（ヒドロキシメチル化）変動領域は、fold change、統計的有意性のためのp値とq値、およびゲノムアノテーションとともに表にまとめられます。

GeneName	DMR_To_TSS	DMR_Locus	DMR_Length	Group1_Count	Group2_Count	log2FC	p-value	q-value	Accession
ANKDD1A	-705	chr15:65213261-65213580	319	3.35	22.71	-2.76	5.88E-05	0.000749	ENST00000487867
AK123891	-986	chr22:32899261-32899540	279	1.67	33.47	-4.32	2.89E-09	5.32E-07	uc003amv.1
LOC284412	82	chr19:37759681-37759980	299	53.79	17.57	1.61	1.14E-05	0.000274	NR_029390
RP11-616M22.3	1114	chr16:1255861-1256160	299	10.04	34.66	-1.79	0.000152	0.001803	ENST00000564700
RP11-354I13.2	-355	chr16:60393281-60393500	219	4.18	29.88	-2.84	2.95E-06	0.000111	ENST00000565506
FAM231D	1280	chr1:149288621-14928884	219	16.73	49	-1.55	4.74E-05	0.000675	NR_111934
MLLT1	1579	chr19:6215121-6215680	559	83.67	11.71	2.84	5.22E-15	5.97E-12	ENST00000585588
AK055324	1653	chr19:47140581-47140940	359	19.24	54.98	-1.51	2.28E-05	0.000425	AK055324

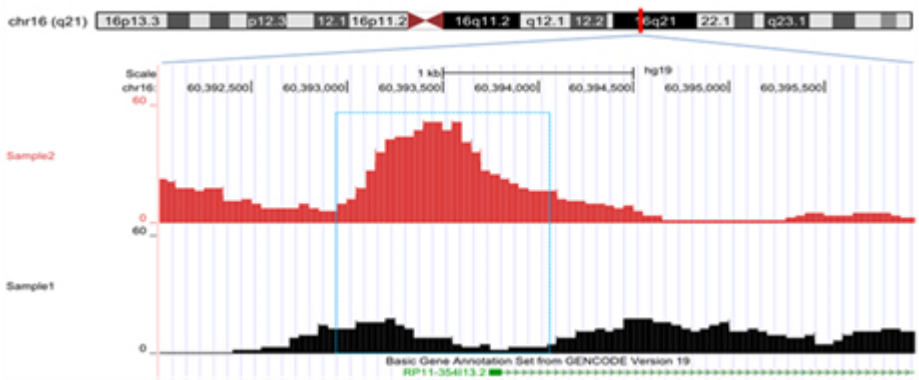
データ例2: LncRNAプロモーターのMeDIP/hMeDIP-seqとLncRNA発現の組み合わせ解析

MeDIP/hMeDIP-seq からのエピジェネティックな修飾データと遺伝子発現プロファイルを統合的に解析します。5mC、5hmCまたは6mAの特異的な修飾遺伝子と発現変動遺伝子は、ヒートマップ上で階層的にクラスター化され、変化の相関をとることができます。



データ例3: LncRNAプロモーターのメチル化(ヒドロキシメチル化)の視覚化

MeDIP/hMeDIP-seqデータには、UCSC Genome Browserなどのゲノムブラウザーへのアップロードに互換性のあるWIG形式ファイルが含まれます。MeDIP/hMeDIPシグナルは、ゲノムの特徴や他の多くのソースからの遺伝子発現、遺伝子制御、表現型のトラックと併せて視覚化することができます。



エピトランスクリプトームシークエンス受託解析サービス

mRNAにおける顕著な内部エピトランスクリプトーム修飾として最も研究されているm6Aに加え、m1A、m5C、ac4C、m7G、およびΨなどの他のエピトランスクリプトーム修飾の、生物学的または臨床的な新たな役割が発見されてきています。本サービスでは、mRNAに対するこれらのエピトランスクリプトーム修飾のプロファイリングと探索が可能です。なお、m6A修飾においては、m6A抗体免疫沈降によるMeRIP法とm6AリーダーGST-YTH法によるプルダウンの2つのm6A-RNA濃縮法をご用意しています。

特長

- ✓ サイトカバレッジ：観察されたモチーフの適合性に限らず、転写産物中のあらゆる部位で修飾を検出
- ✓ 高分解能：m6A部位の100塩基以内の正確なピーク位置
- ✓ 高精度：input コントロールの転写産物の存在量に基づいて修飾レベルを較正
- ✓ 厳格なQC：MeRIP-PCRにより検証された高いMeRIP効率
- ✓ パブリケーション対応： メチル化変動解析、m6A ピーク分布、およびモチーフの同定

GST-YTH法

GST-HTHはm6A RNA濃縮用のGSTタグを備えた、YTH-DF2 m6Aリーダードメイン（a.a385-579）の組換え融合タンパク質です。YTHは進化的に保存された構造ドメインであり、コンセンサスRRACHモチーフ内のm6Aを選択的に「読み取り」、結合します。構造的には、YTHドメインには2～3個のトリプトファン残基があり、m6Aに対して芳香族ケージと結合ポケットを形成し、さらにm6Aの前後のヌクレオチドとも相互作用することで、RRACHモチーフに配列優先性を与えています（図1）。すなわち、GST-YTHはm6A構造およびRRACH配列モチーフに依存的にm6Aを含むRNAと結合しますが、そのいずれもm6Amや他の類似のRNA修飾とは異なります。したがって、GST-YTHのプルダウン法は、m6A抗体MeRIPによるような他の構造的に類似したRNA修飾、特にm6Amとの交差反応性を示すことなく、m6Aに対して高度に特異的です。

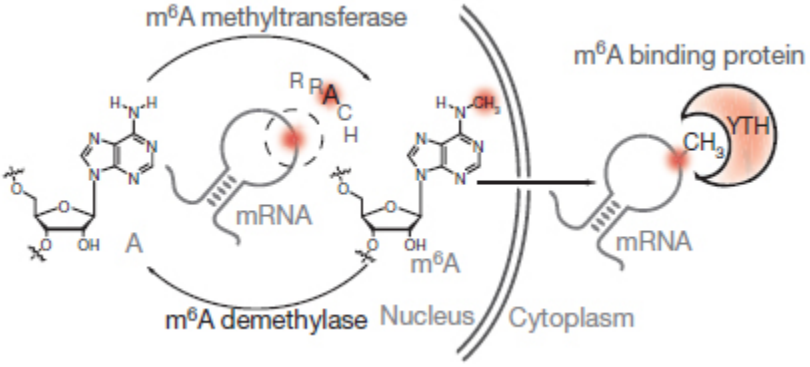


図1. YTHは、m6A構造およびRRACH配列モチーフ依存的にm6A修飾RNAに結合し、m6Amなどの他の類似のRNA修飾に対する交差反応性なしに、m6Aに対してより高い特異性を示します。

バイオインフォマティクス解析例

本サービスは、mRNAにおけるm6A、m1A、m5C、ac4C、m7G、Ψ（いずれか1種類/解析）のエピトランスクリプトーム修飾を網羅的にプロファイルします。

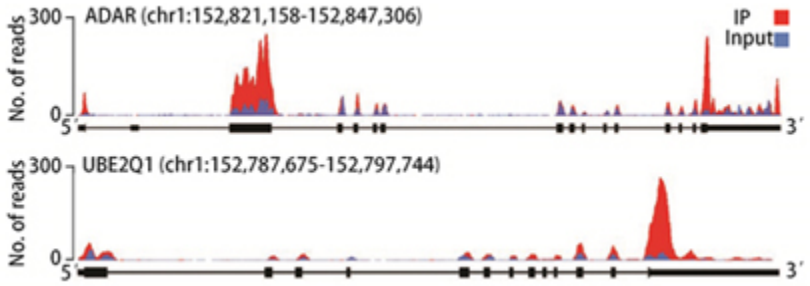
- ◆ RNA修飾ピークのアノテーション
- ◆ RNA修飾ピークの変動解析、ボルケーノプロット図
- ◆ 有意差のあるピークを含む遺伝子のGO解析およびパスウェイ解析
- ◆ モチーフの同定

データ例1: トランスクリプトームにおけるRNA修飾のピーク分布

Peak information								Peak annotation	
Chromosome	Peak_start	Peak_end	Trans_id	Gene_name	Strand	P_value	fold_enrichment	RNA_length	Peak_region
chr20	479923	489122	ENST00000400227.3	CSNK2A1	-	3.1E-06	2.45	1483	cds
chr2	178095776	178095923	ENST00000449627.1	NFE2L2	-	1.8E-05	5.03	909	cds
chr19	19103355	19103476	ENST00000601879.1	SUGP2	-	4.2E-05	10.7	5546	utr3
chr12	95688078	95689995	ENST00000261219.6	VEZT	+	6.1659	3.21	2951	cds
chr1	67874959	67875139	ENST00000370994.4	SERBP1	-	1.3E-04	2.8	6676	utr3
chr16	31091071	31091192	ENST00000300850.5	ZNF646	+	4.5E-04	4.06	6892	cds

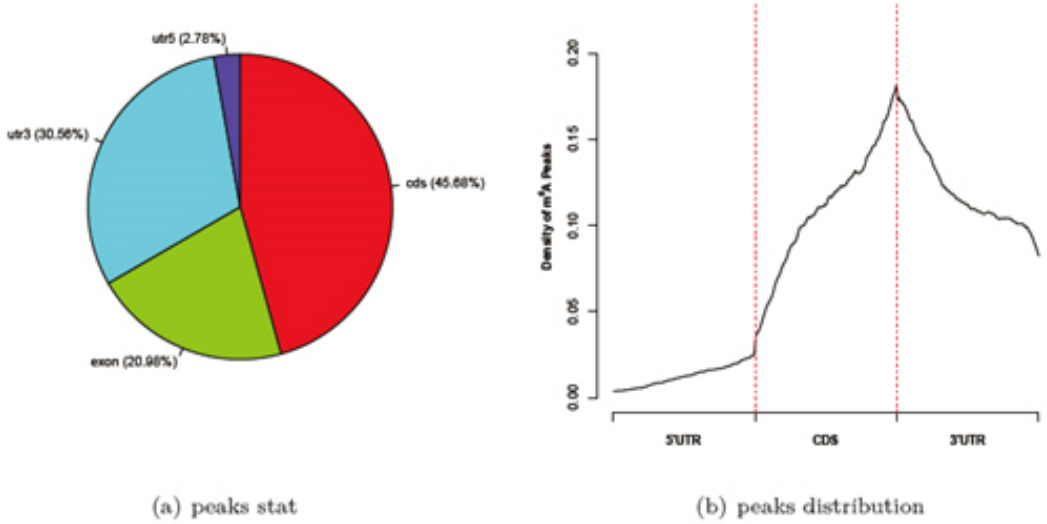
データ例2: RNA修飾ピークの視覚化

ヒトADAR1およびUBE2Q1 mRNAのm6Aピークを、提供されたトラックファイルをゲノムブラウザにロードすることによって視覚化



データ例3: mRNA領域全体の修飾ピークリードの分布

mRNAの5'UTR、CDS、および3'UTR領域における修飾ピークのピーク統計（a）および密度分布（b）



(a) peaks stat　　(b) peaks distribution

データ例④：修飾ピーク配列のモチーフ解析

RNA修飾ピークの配列モチーフは、DREMEアルゴリズムで同定され、配列ロゴ表現で表示

R-loop profiling 受託解析サービス

R-loop profilingでは、ゲノムにおけるLncRNA/mRNAの組織化された R-loopの分布をプロファイルします。本サービスのバイオインフォマティクス解析では、生物学的および機能的な知見が得られます。R-loop profilingでは、S9.6抗体を用いて、R-loopを特異的に免疫沈降させます。R-loopのRNA鎖を配列決定し、解析します。

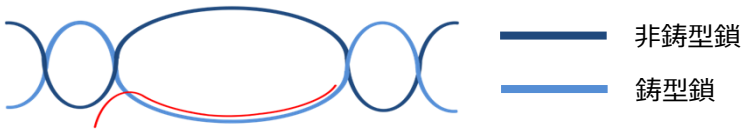
特長

- ✓ 免疫沈降法を用いたR-loop構造特異的なシークエンシング解析
- ✓ 強力なプロファイリング：ゲノム上の遺伝子制御における新たな担い手としてのR-loop研究
- ✓ ストランド特異性：どのLncRNAまたはmRNAがR-loopを形成するかを特定
- ✓ 高い信頼性：確立された最適な実験手順による最良の結果
- ✓ 柔軟性：DRIPc-Seqは、参照ゲノムを持つ任意の種に対して実行
- ✓ 厳格な品質：ポジティブおよびネガティブコントロールによるDRIPc-Seqライブラリの品質の保証
- ✓ 視覚化：豊富なアノテーション、ゲノムブラウザートラック、および論文に利用可能な図の提供

サンプルQCから
データ解析まで
フルサービス

R-loopとは

R-loopは、転写された RNA鎖と鋳型DNA鎖が塩基対を形成したRNA-DNAハイブリッドと、非鋳型一本鎖DNAから成る三本鎖構造です。R-loopは広く分布しており、哺乳類ゲノムの5%に存在しています。R-loopは多くの場合、プロモーター領域のCpGアイランドや転写停止部位に存在しています。R-loopの形成には、高GCスキュー（転写開始点非テンプレート鎖の下流においてCよりもGが豊富）、G-quadruplex、DNAギャップ、DNA/RNA修飾が寄与しています。R-loopは、遺伝子制御、DNA複製、DNA/ヒストン修飾など、生物学的に重要な機能を有しています。

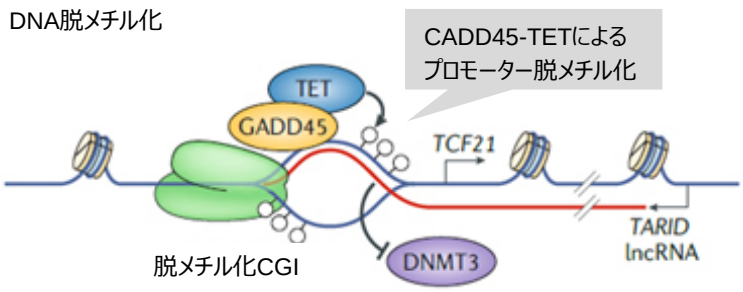


R-loop構造

R-loopと疾患関与

通常、BAMBI（TGFbのネガティブレギュレーター）遺伝子プロモーターのR-loopは転写を促進します（下右図）。しかし、筋萎縮性側索硬化症（ALS4）では、senataxinの変異によりR-loop形成およびBAMBIプロモーターでのDNAメチル化が増加し、BAMBI転写を抑制し、TGFbシグナル伝達上昇、ALS進行へつながることが報告されています（下左図）。

アンチセンスLncRNA R-loopによる転写制御



R-loopは、アンチセンスRNA鎖とループ内のDNAとの間に形成されます。TCF21は多くのがんの腫瘍抑制因子です。TARID (脱メチル化を誘導するTCF21アンチセンスRNA)は、TCF21遺伝子の一対一のアンチセンスLncRNAであり、プロモーター領域にR-loopを形成しています。このR-loopは、GADD45aによって認識され、脱メチル化酵素TET1を起用してDNAメチル化を除去し、TCF21 mRNA転写を増加させ、細胞周期を制御します。

バイオインフォマティクス解析例

データ例1: ピークコールとアノテーション

統計的に優位なDRIP濃縮領域（R-loopピーク）は、MACS2によりp値の閾値を0.001としてコールされます。

Peak_Information								Adjacent_Gene_Information		
Peak_Name	Peak_Locus	Peak_ Direction	Source_of_RNA _in_R-loop	RNA_ type	Peak_ Width	log_2FC	p-value	Adjacent_ Gene_Name	Gene_type	Peak_ Classification
peak_8976	chr3:128466976-128467472	+	DNAJB5-AS1	lncRNA	497	3.15	0.015	DNAJB5	protein_ coding	Promoter
peak_8976	chr3:128466976-128467472	+	DNAJB5-AS1	lncRNA	497	3.15	0.015	DNAJB5-AS1	lncRNA	GeneBody
peak_7653	chr10:80085261-80085955	+	TMEM254	protein_ coding	695	1.69	0.047	TMEM254	protein_ coding	GeneBody
peak_4563	chrX:73836453-73836927	-	XIST	lncRNA	475	2.18	0.035	XIST	lncRNA	GeneBody
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

データ例2: R-loopピークの分類

R-loopピークは、UCSC RefSeqアノテーションに基づく直近の遺伝子特徴（プロモーター、遺伝子本体、ターミネーター、遺伝子間）により分類されます。R-loopの分類分布のサマリー統計が提供されます。

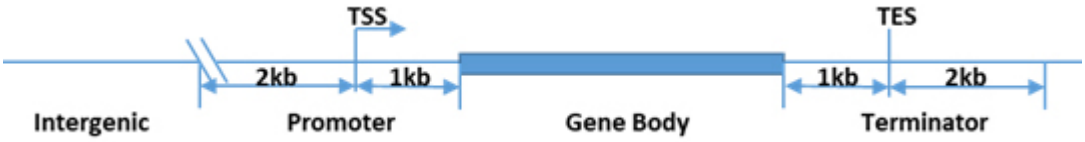


図1.
4種類の遺伝子特性のうちの1つにおけるR-loopピークの分類

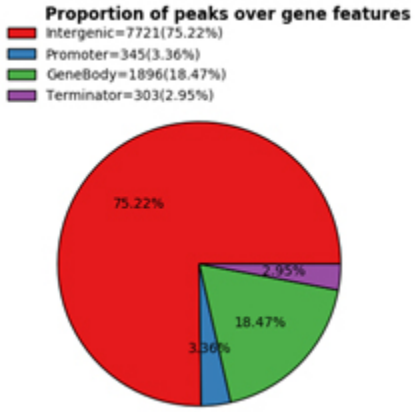


図2.
遺伝子特徴分類におけるR-loopピークの割合

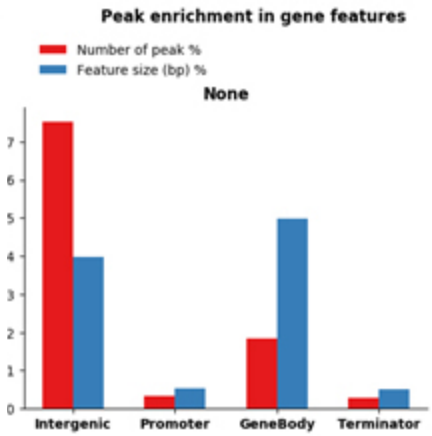


図3.
遺伝子特徴におけるR-loopピークの濃縮度と、機能サイズに対して正規化されたランダム偶数分布の比較

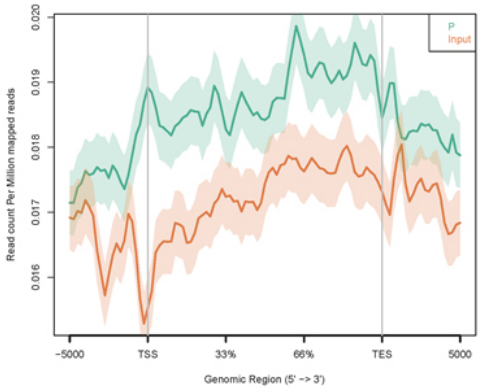


図4.
遺伝子本体上の R-loop ピーク分布
X軸は転写開始点と転写終了点間の遺伝子本体を表します。Y軸はマッピングされた100万リードあたりのリードカウントを示します。

クロマチン構造の謎を解き明かす

Hi-C解析用ライブラリー調製キット

Phase Genomics社のProximo™ Hi-Cテクノロジーは、クロマチンの空間配置を研究するために考案された一連の染色体立体配座捕捉(または近接ライゲーション)技術の1つです。in vivoでDNAをクロスリンクすることで、細胞内のすべてのDNAの近接情報を保持したライブラリー（Hi-Cライブラリー）を作製します。3次元空間において同じ場所にあるゲノム遺伝子座間の相互作用の特定を可能とし、これによりヒト（および様々な生物種の）ゲノムアセンブリ、ならびに構造変異およびエピジェネティクス解析を大幅に改善します。

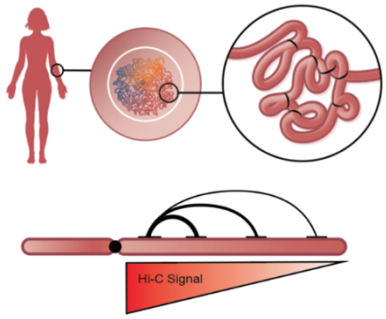
特長

- ✓ 高分子量DNA抽出は不要
- ✓ イルミナシーケンサーと互換性のあるデュアルインデックスライブラリ
- ✓ 所要時間：2日間（作業時間はわずか3時間）
- ✓ ゲノム構造変異

超長距離ゲノムシークエンシングを可能する近接ライゲーションライブラリー調製キット！

インタクトな細胞・組織を用いてin vivoでDNAを架橋し、細胞内に含まれるクロマチンを固定します。架橋したクロマチンをエンドヌクレアーゼにより断片化、末端をライゲーションすることにより近接する配列間にキメラ接合部が形成され、近接情報を保持したライブラリーが得られます。

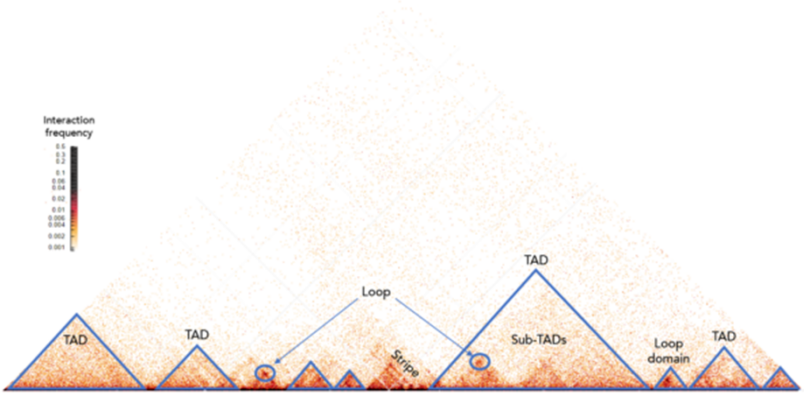
本ライブラリーから得られる各シークエンスリードは、ゲノム上の2点間の物理的な接続を表しているため、各リードを参照ゲノムにマッピングすることで、任意の2点間のゲノム上の距離（全ての遺伝子座間の物理的近接性）を得ることができます。ゲノム上の全遺伝子座間の物理的近接性の測定により、各サンプルに固有のゲノムマップが作成され、広範囲の染色体異常の検出を可能にします。



バイオインフォマティクス解析付きパッケージもご用意！

バイオインフォマティクス解析付きパッケージでは、Hi-Cライブラリーから取得したHi-Cリードデータ（FASTQ）を用いたデータ解析を行います。

TAD (topologically associating domain)解析例



Hi-Cマップで観察されたクロマチン構造要素

このヒートマップはヒト1番染色体の4Mbの領域を示しています。各ピクセルは2つの遺伝子座間の相互作用を示します。色の濃さは遺伝子座の各ペア間の相互作用の頻度を表します。色が濃いほど相互作用の頻度が高いことを意味します。三角形の領域は、クロマチン相互作用が発生するゲノム内の領域を表します。ほとんどのTADは青い三角形で指定されています。一部のTADには、より小さなサブTADが含まれています。三角形の頂点にある暗い点は、通常、クロマチンループに対応します。ストライプ（またはトラック）は、クロマチンから個々のCCCTC結合因子分子が放出されたときに形成され得る動的構造を表します。

製品ラインアップ

Proximo Hi-C Human Kitは、各種組織、細胞、血液サンプルに対応しています。また、Proximo™ Hi-Cシークエンス受託解析サービスも提供していますので、ご興味ございましたらお問い合わせください。

品名	サイズ	品番
Proximo™ Hi-C Human Kit (v4.0)	4反応/キット	KT4040
Proximo™ Hi-C Human Kit (v4.0) バイオインフォマティクス解析付	4反応+1解析/キット	KT4040A

限りなく低いライブラリー調製時バイアスを実現

miRNAライブラリー調製キット

RealSeq Biosciences社は、次世代シークエンス解析用のsmall RNAライブラリー調製時のバイアスを最小限に抑える独自の技術を開発しました。多くのmiRNAの検出不足につながる、シークエンスライブラリー調製時のアダプターライゲーションに起因するバイアスの問題を解決します。

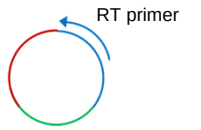
特長

- ✓ ライブラリー調製時のバイアスを大幅に軽減
- ✓ Empty adapter / Adapter dimerを大幅に抑制
- ✓ 少量のRNAライブラリーをゲルフリーで精製することが可能
- ✓ 多種多様なmiRNA、その他低分子RNAの検出が可能
- ✓ 堅牢なmiRNAの定量が可能

単一アダプターとの環状化ライゲーション法でライブラリー調製時のバイアスを大幅に軽減

独自技術

small-RNAシークエンスライブラリーを調製する過程におけるほとんどのバイアスは、アダプターをmiRNA/small-RNAの3'および5'末端に接続することに起因します。RealSeq®は、単一アダプターとの環状化ライゲーション法を用いた独自技術で、ライブラリー調製時のバイアスを大幅に軽減させます。



エピジェネティクス分野における使用文献

以下の文献では、本製品を使用し得られたSmall RNA配列データにより、Pol IV依存性24nt small RNAが、局在しているCEN180部位でのDNAメチル化に関与していることが確認されています。

【参考文献】

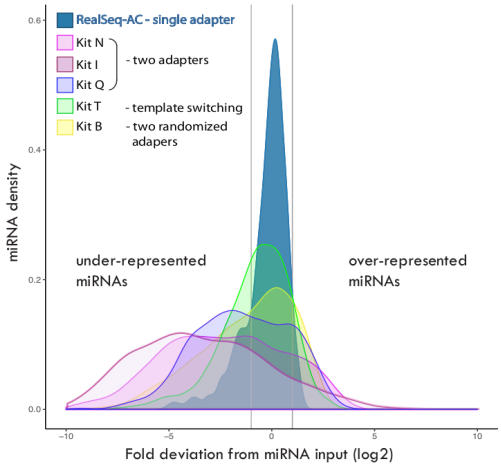
Zhang-Wei Liu, et al. Depositing centromere repeats induces heritable intragenic heterochromatin establishment and spreading in Arabidopsis, Nucleic Acids Research, 2023;, gkad306, https://doi.org/10.1093/nar/gkad306

他社製ライブラリー調製キットとのバイアス比較

右図は、1pmoleのmiRXPloreユニバーサルリファレンスプール(Miltenyi Biotec)を使用して、5つの異なる市販のライブラリー調製キットとのバイアスを比較した結果です。本キットを使用した場合、他のキットよりもバイアスが大幅に低く、71.8%を正確に定量できます。各キットで検出されたmiRNAの総数やRT-qPCRで定量した結果との比較などの様々なデータについては、下記参考文献からご確認いただけます。

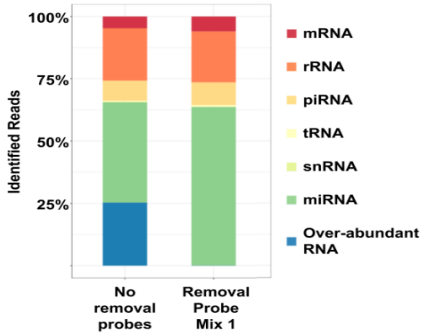
【参考文献】

Barberán-Soler S, et al. Decreasing miRNA sequencing bias using a single adapter and circularization approach. Genome Biol. 2018 Sep 3;19(1):105. doi: 10.1186/s13059-018-1488-z. PMID: 30173660; PMCID: PMC6120088.



選択的RNA除去プローブ カスタム作製サービス

本メーカーは、RNAサンプルから過度に豊富なRNAを選択的に除去するためのSelective Suppression Probe (SSP™)を開発しました。RealSeq®シリーズのアダプターライゲーション時に作製したSSP™パネルを1μL添加するだけなため、非常に簡便にご使用いただけます。SSP™パネルを使用することで、不要なRNAのリード数を総リード数の約0.1%に削減し、miRNAのリード数を約50%増加させることができるため、miRNAのシークエンスを強化し、大幅なコスト削減を実現することが可能です。



製品ラインアップ

品名	品番 12反応分	品番 48反応分
【細胞、組織サンプル用】 RealSeq®-AC miRNA Library Kit	500-00012	500-00048
【血漿などの液体生検サンプル用】 RealSeq®-Biofluids Plasma/Serum miRNA Library Kit	600-00012	600-00048
【デュアルインデックス ライブラリー用】 RealSeq®-Dual miRNA Library Kit	700-00012	700-00048
【選択的 RNA 除去プローブ】 Selective Suppression Probes- SSP™ Custom Panel	800-00000	

メチル化CpG領域を濃縮し、コストを大幅に削減！

メチル化解析用ライブラリー調製キット

BioDynami

本製品は、バイサルファイト処理したサンプルを用いたメチル化解析用ライブラリー調製キットです。メチル化CpG領域を濃縮することで、シークエンスコストを大幅削減します。本製品のほかに、全ゲノムバイサルファイトシークエンス用やクロマチン免疫沈降シークエンス用などの、エピジェネティック修飾解析に有用なライブラリー調製キットもご用意しています。

特長

- ✓ バイサルファイト処理DNAサンプルを使用
- ✓ メチル化CpG領域を濃縮することで、シークエンスコストを大幅削減
- ✓ 一塩基レベルでの解析
- ✓ シークエンスライブラリーへの高い変換効率

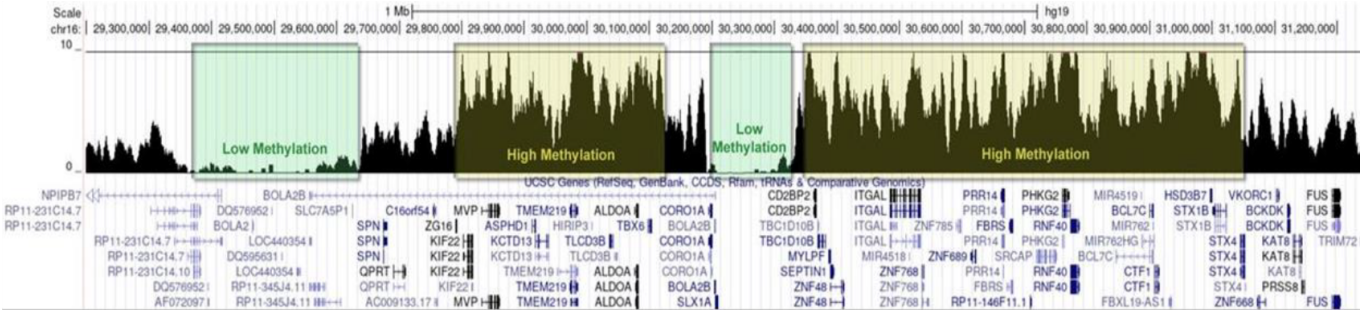
メチル化CpG領域を濃縮することで、シークエンスコストを大幅削減

バイサルファイト処理したDNAサンプル（20ng-500ng）を使用し、メチル化CpG領域のNGSライブラリーを構築します。メチル化されたCpG領域を濃縮してシークエンシングするため、シークエンスコストを大幅に削減できます。バイサルファイトシークエンステクノロジーにより、一塩基レベルでメチル化パターンを推定することが可能です。

手法	【本製品】メチル化バイサルファイトSeq（MSBS）	全ゲノムバイサルファイトSeq（WGBS）	縮小表現バイサルファイトSeq（RRBS）	メチル化DNA免疫沈降Seq（MeDIP-Seq）
テクノロジー	メチル化CpG領域の濃縮	非メチル化領域を含む全ゲノムシークエンス	制限酵素を使用したDNAフラグメント解析	5-メチルシトシンに対する抗体ベース解析
バイサルファイトシークエンス	○	○	○	-
単一塩基の解像度	○	○	○	150-200塩基
コスト	低	高	低	低
全メチル化CpGカバレッジ	○	○	およそ10%のみ	○

ヒトゲノムの高メチル化領域と低メチル化領域の解析例

シークエンス設定：豊富なメチル化CpG領域が主にRead1の先頭付近に位置しているため、シングルエンド35サイクルで実施。



製品ラインアップ

品名	インデックス	容量	品番
【メチル化CpG領域ライブラリー調製キット】 Methylation Specific Bisulfite Seq Library Prep Kit	Index	24, 48 反応	30102
	Unique Dual index	96, 192 反応	30103
▼ 関連製品			
【全ゲノムバイサルファイトシークエンス用ライブラリー調製キット】 Bisulfite Sequencing Library Prep Kit	Index	24, 48 反応	30092
	Unique Dual index	96, 192 反応	30093
【クロマチン免疫沈降シークエンス用ライブラリー調製キット】 ChIP-Seq Library Prep Kit	Index	24, 48 反応	30034
	Unique Dual index	96, 192 反応	30036

RNAエピジェネティクス研究に

ncRNAプロファイリング用PCRアレイ

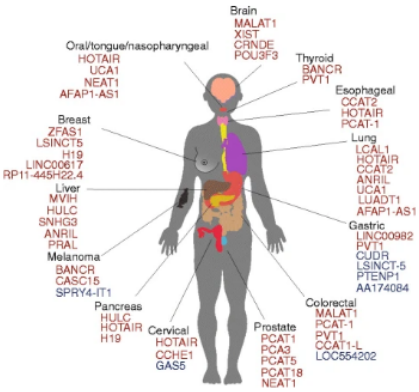
本製品はncRNAの包括的なqPCR解析のための、パネル型定量PCRアレイです。重要性の高いncRNAをパネルに採用しており、LncRNA、tRNA、tRF&tiRNA、snoRNA、microRNAなどのncRNAの発現プロファイリングが可能です。多数の培養細胞株や組織で検証され、高い正確性と特異性が確認されています。LncRNA、tRNA、tRF&tiRNAのパネルでは、プライマー単品での提供も可能です。

特長

- ✓ プライマーは様々なサンプルタイプで検証済
- ✓ 転写産物固有のPCRプライマーにより、個々のncRNAアイソフォームを明確かつ正確に検出
- ✓ 多くの引用文献あり
- ✓ シンプルで正確なプロファイリング

ncRNAとエピジェネティクス研究

ncRNA(ノンコーディングRNA)とは、DNAから転写された後、翻訳はされずに機能的な働きをするRNA分子のことを指します。遺伝子発現を調節するための重要な因子で、エピジェネティクス研究においてホットな研究分野となっています。中でも、LncRNA (Long ncRNA)とmiRNA (microRNA)は、がんなどの疾患や生物的機能と深い関連があるとされてきました。しかし、未だ多くのncRNAの機能的役割が明らかにされていません。Arraystar社のPCRアレイキットを用いることでヒト/マウスの88~372個の各ncRNAをqPCRによってプロファイリングすることが可能となり、その機能と分子機構、疾患との関連を解き明かす鍵となります。

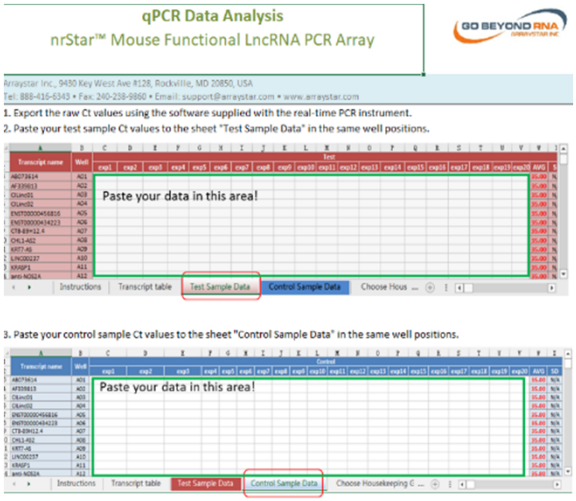


パネルの内容例(LncRNAアレイパネルの場合)

例えばヒトLncRNAパネルでは、7SK、AA174084、CDKN2B-AS1、ABHD11-AS1などのがん、神経変性疾患、心血管疾患、糖尿病などその他の疾患に関連する372個ものLncRNAが収集されています。

プレート上のコントロールには、qPCRノーマライゼーションのための6つのハウスキーピング遺伝子、qPCR反応の全体的な反応効率確認用RNAスパイクイン（外部コントロール）、PCR効率およびプレート間キャリブレーションのための3つのポジティブPCRコントロール、およびゲノムDNAコンタミネーションを判断するのためのゲノムDNAコントロールが含まれます。また、左記のような解析ツールも付属しています。

※アレイの種類によって内容が異なります。詳しくは弊社までお問合せください。



製品ラインアップ

解析パネル	品名	動物種	サイズ（well）	品番
LncRNAパネル	nrStar™ Human Functional LncRNA PCR Array	ヒト	384	AS-NR-004-1
	nrStar™ Mouse Functional LncRNA PCR Array	マウス	384(2*192)	AS-NR-004M-1
miRNAパネル	nrStar™ Human Canonical Conserved miRNA PCR Array	ヒト	384	AS-NR-005H-1
tRNAパネル	nrStar™ Human tRNA PCR Array V2.0	ヒト	384(2*192)	AS-NR-001H-1
	nrStar™ Mouse tRNA PCR Array	マウス		AS-NR-001M-1
tRF&tiRNAパネル	nrStar™ Human tRF&tiRNA PCR Array	ヒト	384(2*192)	AS-NR-002-1
	nrStar™ Mouse tRF&tiRNA PCR Array	マウス	384(4*96)	AS-NR-002M-1
snoRNAパネル	nrStar™ Human snoRNA PCR Array	ヒト	384	AS-NR-003-1
	nrStar™ Mouse snoRNA PCR Array	マウス		AS-NR-003M-1

＊Roche Light Cycler 480用の製品もございます。品番の末尾に-Rを追加してください。(例：AS-NR-004-1-R)

CLC Genomics Workbench
NGSデータ解析ソフトウェア

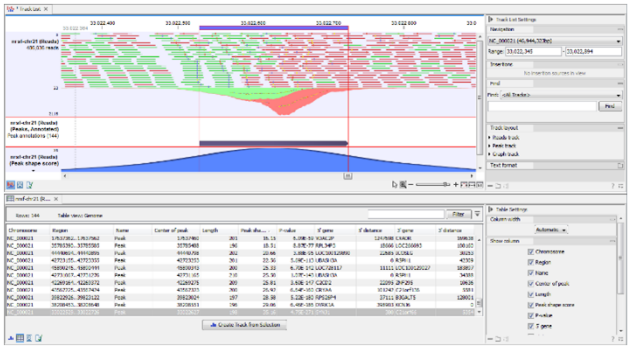
CLC Genomics Workbenchは、次世代シークエンサーから出力される膨大なデータの解析に対応した統合配列解析ソフトウェアです。変異解析やRNA-seq解析をはじめ、ChIP-seq解析やDe novo assemblyなどNGSデータを使用するさまざまな解析にご利用いただけます。

特長

- ✓ IlluminaやMGIをはじめとする様々なシーケンスプラットフォームに対応
- ✓ Fastqファイルを直接インポート可能
- ✓ ChIP-seq（転写因子／ヒストン）およびバイサルファイトシークエンスデータに対応
- ✓ さまざまな生物種に対応可能
- ✓ すべてのプロセスをGUI上で実行可能

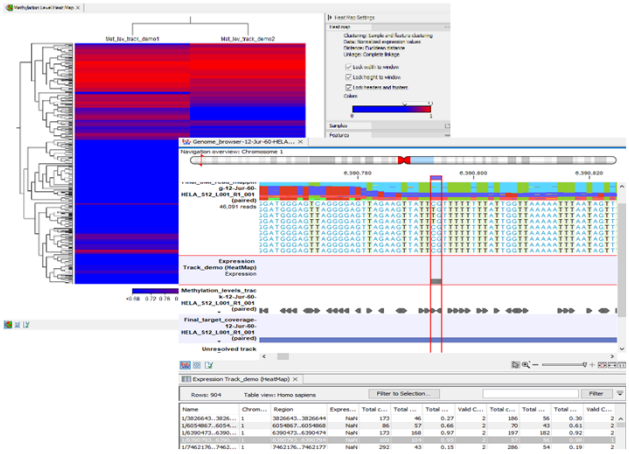
ChIP-seq解析

CLC Genomics Workbenchでは、ChIP-seqデータ専用のアプリケーションを搭載しており、ゲノムへのリードのマッピングからピークの検出、コントロールとの比較、ピーク領域の一覧表の出力が可能です。さらに、この表に対して、アノテーションデータを参照しながら近傍遺伝子の情報を付与することができます。転写因子のChIP-seqのほか、ヒストンChIP-seqデータにも対応しています。



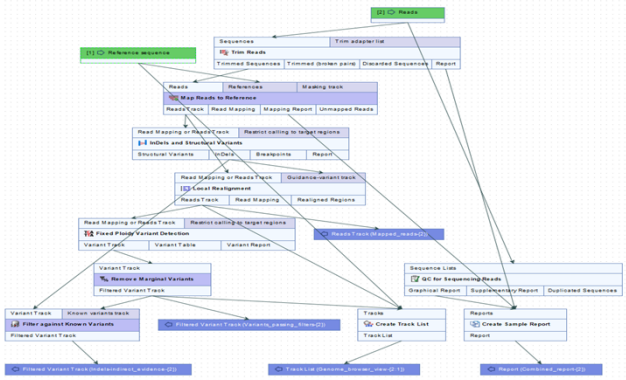
バイサルファイトシークエンス解析

バイサルファイトシークエンス解析用アプリケーションでは、リファレンスゲノム上へバイサルファイト処理済みリードのマッピングおよび、メチル化レベルを計算することができます。また、複数のバイサルファイトシークエンスデータを使用して、各サイトのメチル化レベルの変動を計算したり、コントロール群とのメチル化レベルの差異を検出したりすることが可能です。



大量検体の自動処理機能

CLC Genomics Workbenchでは、バッチ処理機能を利用することで、複数のデータに対して同じ処理を自動で繰り返し適用することができます。また、ワークフロー機能では、さまざまなツールについて、それらを実行する順番やパラメータをあらかじめ登録することで、一連の処理を自動化することができます。

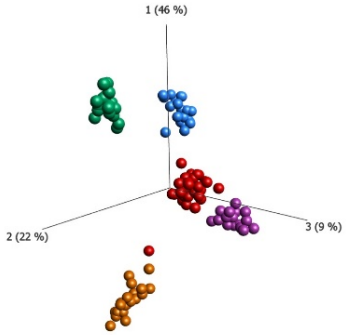


Qlucore Omics Explorer
オミックス解析ソフトウェア

Qlucore Omics Explorerは、DNAマイクロアレイやRNA-Seqをはじめとするオミックスデータをよりスピーディーに解析するための次世代型のバイオインフォマティクスソフトウェアです。多様な種類のグラフに対応したデータの可視化、使いやすいユーザーインターフェース、最高水準の統計解析機能によって、様々な視点からのデータの俯瞰や分類に適しています。

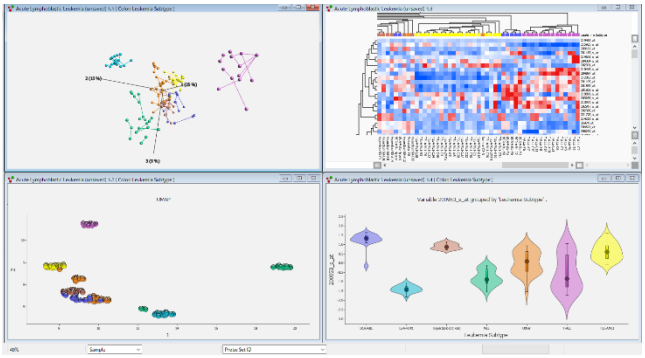
特長

- ✓ マイクロアレイ、RNA-Seqデータの正規化
- ✓ データセット内のノイズフィルタリング
- ✓ 様々な統計手法を利用した発現変動遺伝子抽出
- ✓ ヒートマップやPCA、ボルケーノプロットなどのグラフ表示
- ✓ t-SNE / UMAPによるデータ分類
- ✓ GSEAによる遺伝子セット解析



充実のデータビジュアライゼーション

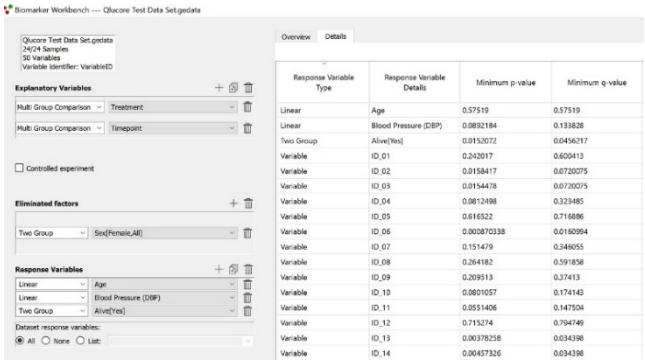
Qlucore Omics Explorerでは、ヒートマップやボルケーノプロット、ヒストグラム、ボックスプロット、バイオリンプロット、さらにPCA、t-SNE/UMAPプロットなどの充実したグラフ作成機能が備えられています。表示させた各種プロットグラフと遺伝子のノイズフィルターが連動しており、スライダーバーでノイズフィルターの閾値を調整すると、プロットグラフの結果もリアルタイムで変化します。またプロット上のクラスターを手動でアノテーション付けすることが可能で、データの手動分類や除外などを、ワンクリックの簡単な操作で行うことが可能です。



発現変動遺伝子解析

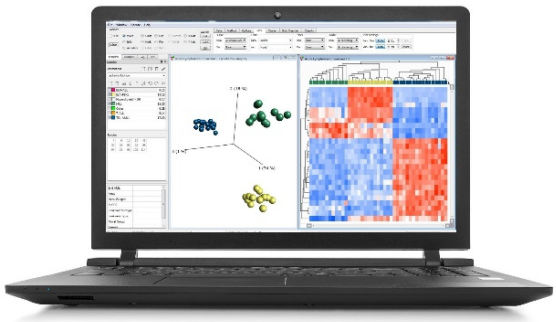
一般的な統計モデルが標準で備えられており、有意差検定による発現変動遺伝子の抽出などを、簡単な操作で行うことが可能です。また複数の統計手法を、バッチで実行することもできます。

- Two group comparison (t-test, Mann-Whitney)
- Paired t-test
- Multi group comparison (ANOVA, Kruskal-Wallis)
- Two-way ANOVA
- Linear regression, Rank regression



DNAメチル化解析

DNAメチル化はDNAの化学的修飾のひとつで、オリジナルのDNA配列を変更することなく、継承されたり除去されたりします。これはエピジェネティックコードの一部であり、また特徴的なエピジェネティックメカニズムでもあります。研究により、DNAメチル化はがんを含む多くの重要な生物学的プロセスやヒトの疾患に現れることがわかっています。 Qlucore Omics Explorerでは、Illuminaメチル化アレイのデータを使い、 PCAプロットによる外れ値のサンプルのチェック、t-testやANOVAによる統計解析とメチル化プローブの検出、PCAプロットやヒートマップによるデータの可視化が可能です。



【ご注意】

◆ 本誌掲載のサービス、製品は医療用ではなく、研究用に限定して販売しています。医療品の製造、品質管理、各種診断、治療には使用しないでください。
◆ 本誌掲載の価格、サービスや製品の名称、仕様、プロトコルなどは改良などの理由から予告なしに変更される場合がありますので、予めご了承ください。
◆ 本誌掲載の商品名などは、各社の商標または、登録商標です。また、各サービス・製品における情報は提携先企業のホームページより引用しています。
◆ お知らせいただいたお客様の個人情報は、弊社事業ににおける商品発送、関連サービスおよび製品の情報提供などに利用させていただきます。

販売元

Filgen®
biosciences & nanosciences

フィルジェン 株式会社

【お問い合わせ】
〒459-8011 愛知県名古屋市緑区定納山1丁目1409番地
TEL：052-624-4388 FAX：052-624-4389
E-mail：support@filgen.jp URL：https://filgen.jp/

代理店

(Sep.,2024)