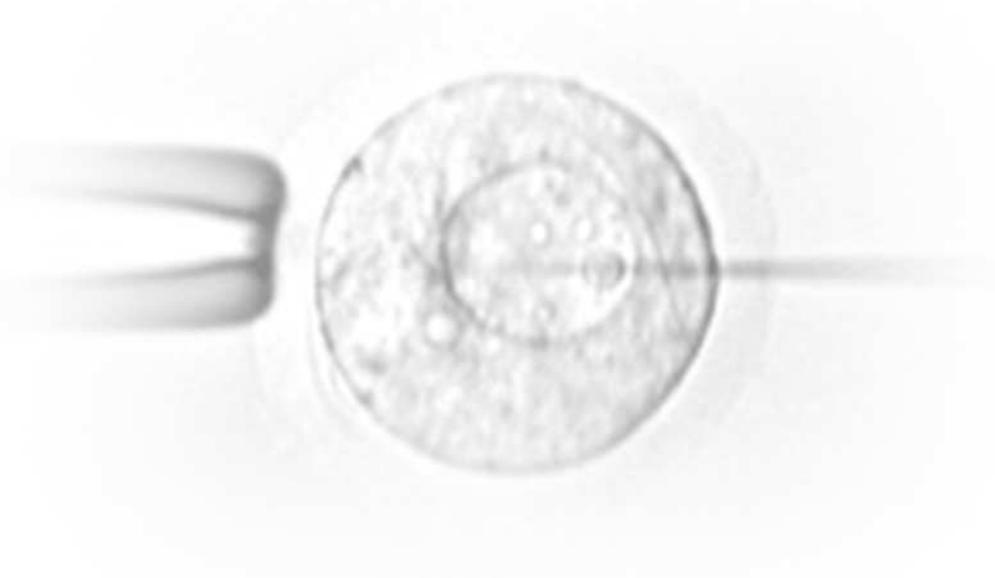


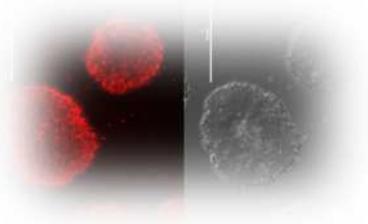


研究支援受託サービス



特殊免疫研究所 宇都宮事業所

ALB事業



ALB事業



ワイエスニューテクノロジー研究所、フェニックスバイオより受け継いだ高い遺伝子改変動物作製技術を基盤とした当受託サービスは、「研究者支援のため、ライフサイエンスの発展のため」をモットーにご依頼者様にご提供させていただいております。

遺伝子改変ラット・マウス編

メニュー

1) トランスジェニック/KO作製

BAC、plasmid Tgマウス・ラット

KO/KI/cKOマウス

2) ゲノム編集（マウス・ラット）

CRISPR/Cas9、TALEN

3) 遺伝子改変マウス・ラットの生産

系統化

維持飼育

繁殖（生産供給）

系統保存（配偶子の凍結保存）

個体復元（顕微授精）

遺伝型解析、サンプリング等

トランスジェニック/KO作製

ALB事業では、特定の遺伝子を導入したトランスジェニック (Tg) マウス・ラットを作製する技術支援サービスをご提供しています。本サービスでは、ベクターのデザインからも承っております。マウス・ラットの基準系統を含む様々な系統、そしてお手持ちの遺伝子改変動物や突然変異動物等を用いたマイクロインジェクション作業にご対応いたします。また、BACクローンをを用いた巨大な遺伝子組換え体を構築し作製するBAC Tg動物作製サービスも行っております (plasmidベクター作製も承ります)。

トランスジェニック作製サービス

対応動物、および系統

ラット

Outbred
Wistar系、SD系、Long-Evans系
Inbred
F344系統、Lew系統、WKY系統
ほか特殊系統も対応可能です。

マウス

C57BL/6系統
BALB/c系統
DBA系統
ほか特殊系統も対応可能です。



以下の作業工程でトランスジェニック動物を作製いたします。
ご予算に合わせた作業工程を計画し作業プランをご提案させていただきます。

作業工程	内容	作業期間	価格 (ラット)	価格 (マウス)
1	高純度DNAフラグメント調製_plasmid _BAC	2週間 前後	15 万円 30 万円	
2	DNAマイクロインジェクション 胚移植 (レシピエント動物作製)	2週間 前後	90万円 _200個処理	90万円 _300個処理
3	ファウンダー候補産仔の出産、維持 産仔の離乳、およびTail Biopsy	6週間 前後	30 万円	
4	PCR解析によるスクリーニング#	3週間	15 万円	

- ・納期はベクターを頂いてから3ヶ月前後となります。
- ・作製されたTg動物の微生物学的グレードは弊社SPFとなります。
- ・動物の輸送費、および微生物検査費用は含まれておりません。
- # サザン解析による遺伝型解析作業もご提供しております。

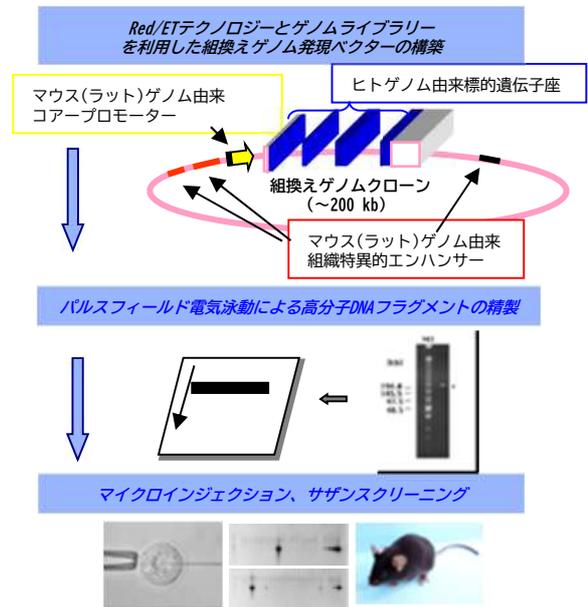
F1系統化、および維持飼育

体外受精 (繁殖作業ご参照) による最短での系統化作業をご提供します。
自然交配による系統化も承っております。
F1 系統化作業は2から3ヶ月を要します。

トランスジェニック/KO作製

BAC トランスジェニック作製サービス

BACクローンとRed/ET技術を用いて作製する組換えBAC トランスジェニック (Tg) マウス・ラットは、200kbにおよぶ巨大なゲノムDNA配列の組換え体を直接導入されたTg動物です。コアプロモーターに加えて、組織特異的エンハンサーを含む発現ユニットを全て導入できるため、BACクローンライブラリーを準備することで、発現制御領域の情報が不足している遺伝子を標的としたTg動物を作出することが可能となります。また、イントロン等のエキソン以外の配列もバクターの一部として全て組み込むことができるTg動物です。



利用事例 ヒト化モデル動物作製

KO動物との掛け合わせによるヒト化動物の作出

ゲノムレベルでのヒト化、in vivoでのヒト遺伝子の機能を評価

BAC タイプ		塩基置換	レポーター遺伝子挿入	プロモーター置換	BAC連結	作業期間
構築	希望納入価格	128万円	174万円	235万円	330万円以上	1.5ヶ月以上
精製作業	希望納入価格	30万円				0.5ヶ月
MI	希望納入価格	120万円 (ラット_200個 / マウス_300個)				1.5ヶ月
遺伝型解析	希望納入価格	30万円				0.5ヶ月
合計		308万円	354万円	415万円	510万円以上	

- ・ 作製されたTg動物の微生物学的グレードは弊社SPFとなります。
- ・ 動物の輸送費、および微生物検査費用は含まれておりません。

F1系統化、および維持飼育

体外受精（繁殖作業ご参照）による最短での系統化作業をご提供します。
自然交配による系統化も承っております。
F1 系統化作業は2から3ヶ月を要します。

作出実施例

弊社では様々なラット、マウス系統を用いたTg作出経験を有しております。
ご希望の系統がございましたら、お気軽にご相談ください。

表、トランスジェニックラット作出実施例

系統	タイプ	Tg取得件数	出産率	Tg作出率	Tgのタイプ
Wistar	outbred	37/37	36.4%	8.7%	BAC Tg
		10/10	24.5%	11.9%	plasmid Tg
SD	outbred	8/8	36.8%	9.8%	BAC Tg
Long-Evans	outbred	25/26	36.3%	9.5%	BAC Tg
LEW/CrI	inbred	2/2	15.5%	3.7%	BAC Tg
		10/10	21.7%	8.1%	plasmid Tg
F344/Jcl	inbred	6/6	22.9%	16.8%	plasmid Tg

この他の近交系ラットを用いたTg作製実績あり
SHR, OLET, ACI等

表、BALB/c系統マウスを用いたトランスジェニックマウス作出作業実施例

タイプ	Tg取得件数	出産率	Tg作出率	Tgのタイプ
ヒトゲノム導入マウス (BAC Tgマウス)	8/8	10.6%	7.3%	ダブルTgまたはトリプルTg

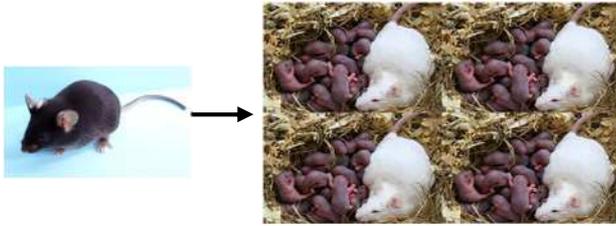
表、B6系統マウスを用いたトランスジェニックマウス作出作業実施例

タイプ	Tg取得件数	出産率	Tg作出率	期間
plasmid Tgマウス	51/51	20.1%	7.0%	2010 ~ 2021
BAC Tgマウス	139/140	17.1%	10.7%	2011 ~ 2021
DNAフラグメント Tgマウス	11/11	18.0%	15.8%	2014 ~ 2021

生産&系統維持、系統保存

マウス・ラットの系統維持、個体生産をご検討されている方におすすめのサービスです。特に、ラットは、マウスより大きなその体格ゆえ、系統維持や繁殖に要する飼育スペースと労力は大きく、弊社がご提供する本サービスはそれら問題を解決できるかと存じます。体外受精や凍結保存の難しいラットでも対応いたします。

体外受精による個体作製



必要な個体数を7週間後に準備できる
(計画的かつ、短期間でかつ大量の動物作製が可能)

自然交配による個体作製



出産時期、産仔数のコントロールは難しい

体外受精対応可能なラット系統

非近交系	近交系
Wistar系	LEW系統
SD系	WKY系統
Long-Evans系	F344系統
	ほかmutant系統

マウス系統は全系統で体外受精対応可能

系統	方法	受精卵数	受精率(%)	移植胚数	産子数	産子率(%)
WI	旧法	1819	91.7	900	415	46.1
SD	旧法	1000	96.1	420	175	41.7
LE	旧法	691	97.2	450	224	49.8
WKY	旧法	557	97.9	556	61	11.0
LEW	改変法	764	84.8	60	26	43.3
F344	改変法	180	91.4	90	37	41.1

	作業内容	価格 (ラット)	価格 (マウス)
自然交配による生産	同系統の個体と同居させ自然交配による産仔を取得します(1交配_遺伝型解析含)。	15万円から	10万円から
体外受精による生産	体外受精による産仔作出を行います(30匹前後取得の作業規模_遺伝型解析含)。	80万円から	50万円から
体外受精技術	過排卵処置メス個体より卵子を取得し精子との体外受精を行います。(1回_複数系統同時可)	35万円から	55万円から
受精卵凍結作業	200個の受精卵を凍結します(1ラインあたり)。	5万円	

ゲノム編集

2013年に登場した「CRISPR/Cas9システム」により、これまで遺伝子改変動物の樹立が困難とされてきた動物種、または系統で次々と遺伝子改変動物が誕生、動物実験の様相が大きく変化しました。宇都宮事業所は、この革新的技術の「CRISPR/Cas9システム」-ゲノム編集の使用許諾をBroad Instituteより得て、本サービスをご提供しております。

作製可能な変異体タイプ

遺伝子導入 (変異)

SNPsモデル
tag挿入
数十bpの塩基配列挿入タイプ

遺伝子破壊

フレームシフト体タイプ
終止codon挿入タイプ
コーディング領域欠失タイプ

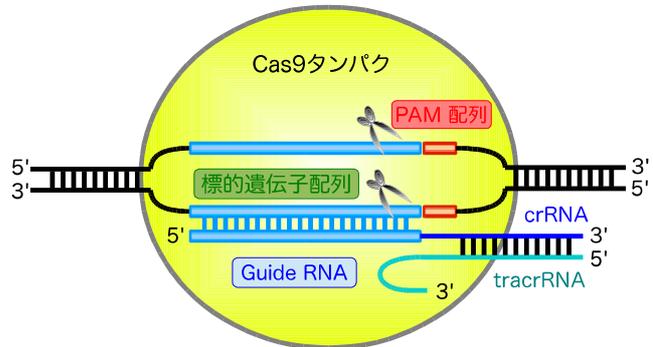
ノックイン

ヒトcDNA
レポーター遺伝子
Cre遺伝子

コンディショナルノックアウト

flox個体

コンディショナル変異



対応可能な動物種、および系統

本作業の標準系統は、マウスではC57BL/6系統、ラットではoutbred 3系統 (Wistar、SD、およびLong-Evans) となりますが、受精卵を採取し、体外での胚操作が可能なマウス、ラットの系統であれば、対応可能です。

マウス

C57BL/6系統
BALB/c系統
DBA系統
C3H系統
ほか特殊系統も対応可能です。

ラット

Outbred
Wistar、SD、Long-Evans
Inbred
F344系統、Lew系統、WKY系統
ほか特殊系統も対応可能です。

遺伝子変異 indel & ssODN挿入 (SNPsモデル) タイプ作製

作業工程	内容	希望納入価格 (マウス)	希望納入価格 (ラット)
1	受精卵への注入物質の準備 gRNA、ssODN配列設計 (使用系統の配列確認) Cas9 mRNA (or タンパク) の準備 Cas9 mRNA (or タンパク)、gRNA、ssODNの調製	45万円	
2	Cas9、gRNA (およびssODN) 導入作業 100個処理	40万円から	50万円から
3	胚移植 (レシピエント動物作製) から産仔離乳 胚移植 産仔の出産、7週齢まで維持、離乳およびTail Biopsy	40万円から	50万円から
4	遺伝型解析 PCR、surveyor解析等による変異体検出 シーケンス解析 (3検体まで)	40万円	
	総額	165万から	185万から

納期：3ヶ月前後 (作業工程1から4まで)

遺伝子変異 ノックイン (LssDNA & dsDNA) タイプ作製

作業工程	内容	希望納入価格 (マウス)	希望納入価格 (ラット)
1	受精卵への注入物質の準備 gRNA、ドナーDNA配列設計 (使用系統の配列確認) Cas9 mRNA (or タンパク) の準備 (切断活性試験含) Cas9 mRNA (or タンパク)、gRNA、ドナーDNAの調製	60万円	
2	Cas9、gRNA (およびssODN) 導入作業 200個処理	60万円から	70万円から
3	胚移植 (レシピエント動物作製) から産仔離乳 胚移植 産仔の出産、7週齢まで維持、離乳およびTail Biopsy	65万円から	85万円から
4	遺伝型解析 PCR-RFLP解析による変異体検出 シーケンス解析 (3検体まで)	45万円	
	総額	230万から	260万から

納期：4~5ヶ月 (作業工程1から4まで)

- 作業工程2は、最低個数での作業となっております。この作業規模をベースに、100個あたりマウスで15万、ラットで25万の価格を積み上げていく形となります。
- 作業工程3は、最低個数での作業となっております。この作業規模をベースに、マウスとラットでそれぞれ発生する費用が追加されていきます (お問い合わせください)。

実施例：CRISPR/Cas9システムを用いたROSA KIラット作製

作業条件

ラット系統： Long-Evans系、Wistar系、SD系、
 標的遺伝子： ROSA遺伝子座
 注入条件： Cas9mRNA/gRNA/plasmid
 遺伝型解析： PCRスクリーニング、および蛍光確認

作業結果

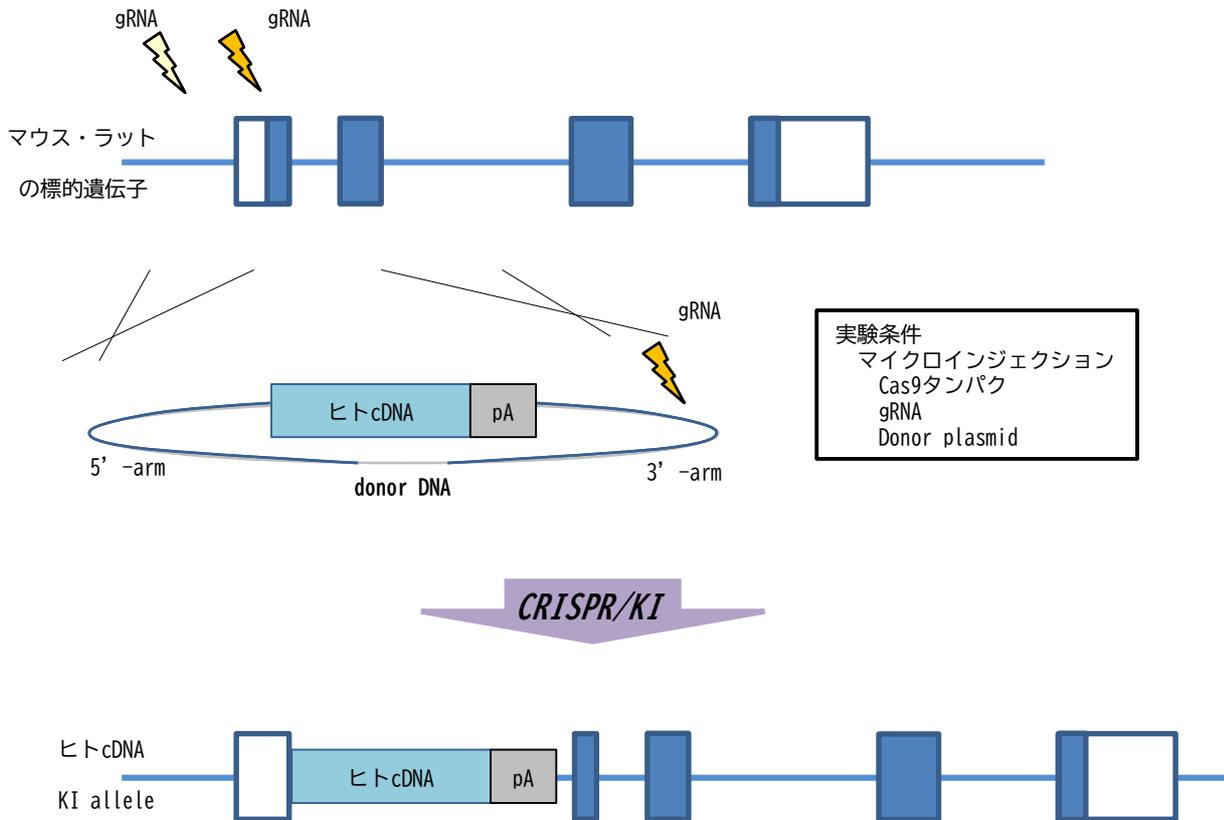
系統	産仔数 (匹)	陽性数 (匹)	陽性率 (%)
Long-Evans	8	2	25
Wistar	16	9	56
SD	35	25	71



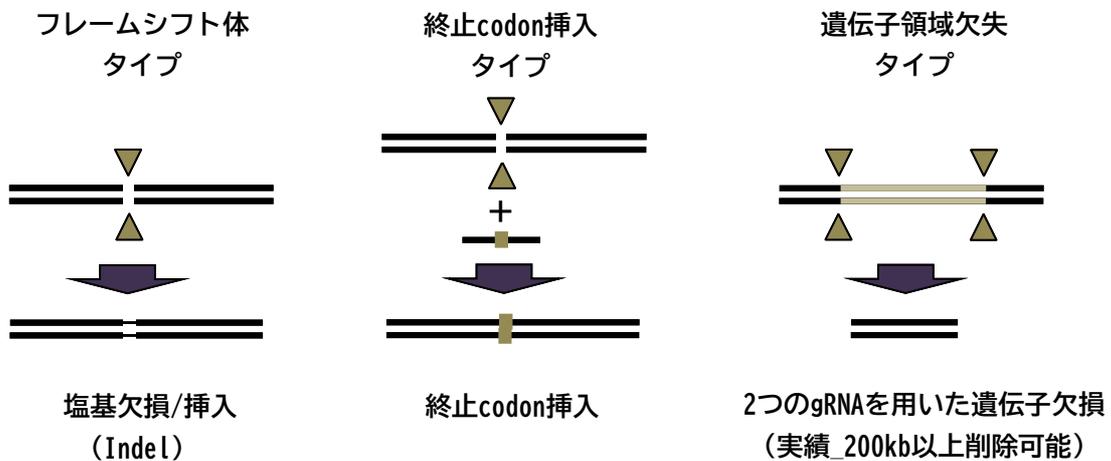
ノックインラット・マウス作製実績

	サイズ	用途	導入方法	実績
一本鎖DNA ssODN	200bp以下	SNPsモデル Tagや終止codon挿入 loxP導入	マイクロインジェクション エレクトロポレーション	いずれも ◎
長鎖一本鎖DNA LssDNA	200bp ~ 1kb前後	Cre遺伝子 レポーター遺伝子 エクソン	マイクロインジェクション エレクトロポレーション	○ △
二本鎖 DNA dsDNA	2kb以上	ヒトcDNA等	マイクロインジェクション エレクトロポレーション	◎ X

遺伝子挿入 - ヒト化動物 -



遺伝子破壊のいろいろ



*標的とする遺伝子の構造 (バリエント、ドメイン等) を考慮したノックアウトラット・マウスの作製

細胞編

メニュー

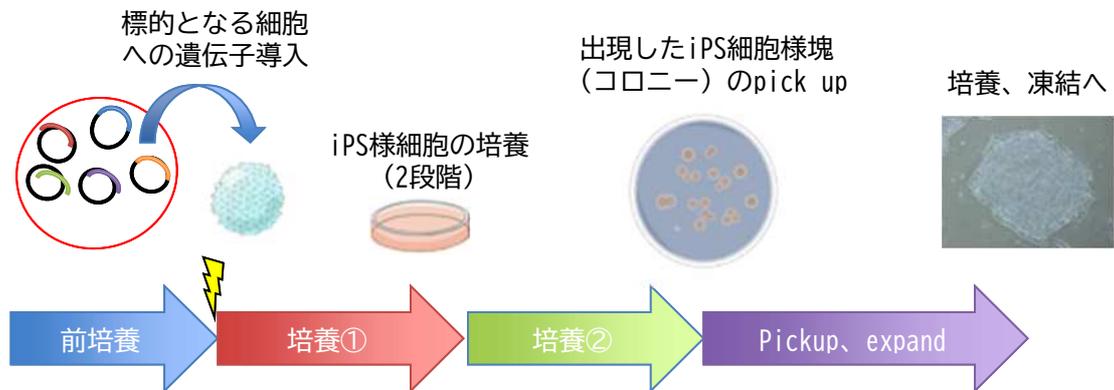
ヒトiPS細胞樹立作業

- ・ iPS細胞 / 株化細胞の遺伝子改変作業

ヒトiPS細胞樹立作業

ヒト末梢血単核球からiPS細胞誘導因子をエピソーマルベクターに挿入しヒトiPS細胞を樹立するサービスです。ウイルスフリーの樹立方法を用いているため樹立後の細胞のハンドリングが容易になります。ご依頼者様のご利用用途（分化誘導細胞の樹立等）に合わせて最適な樹立クローン数、品質試験項目等をご提案いたします。

iPS細胞樹立の作業工程



基本作業条件

細胞	ヒト末梢血単核球 (PBMC) 等
遺伝子導入方法	Nucleofector 4D
導入遺伝子形状	エピソーマルベクター5種 (環状DNA) Epi5™ Episomal iPSC Reprograming Kit
培地、試薬等	エッセンシャル8培地等 フィーダーフリー_コーティング (iMatrix-511)

価 格

iPS細胞樹立作業	希望納入価格
<p>お客様からの提供物：PBMC</p> <p>基本作業</p> <ul style="list-style-type: none"> 提供された細胞株のプレ培養 エピゾーマルベクターによる初期化 コンロニーピックアップ 継代培養 品質検定1（顕微鏡下での形態確認、ALP染色、レクチン染色） 品質検定2（Mycoplasma試験） 凍結保存 <p>納品物：3クローン_2バイアル（1バイアルあたり1~5 x 10⁵個）</p> <p>納期：4ヶ月前後</p>	<p>180万円 （品質検定込み）</p>
オプション1 核型解析	20万円前後

品質確認

樹立されたiPS細胞は、下記の各種品質試験を行っております。

・ALP染色

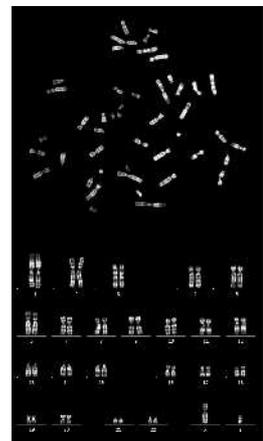


継代6回目、培養6日目

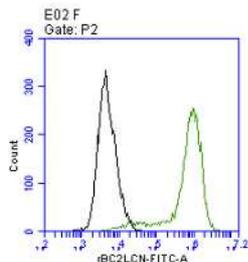


ALPで染色確認

検体名：150513 1-7-2-4
Image: CHR-1505-AY269_1.225.A and K
核型：46,XY



・rBC2LCN陽性確認



rBC2LCNによる
FACS解析結果（継代8回目）
継代数_6



StemSure 凍結保存
溶液にて凍結1週間
後のvialを融解、増
殖を確認（写真は培
養5日目）

凍結融解後の細胞の状況を確認することで、
ご依頼者様に細胞株の維持に関する情報をご
提供します。

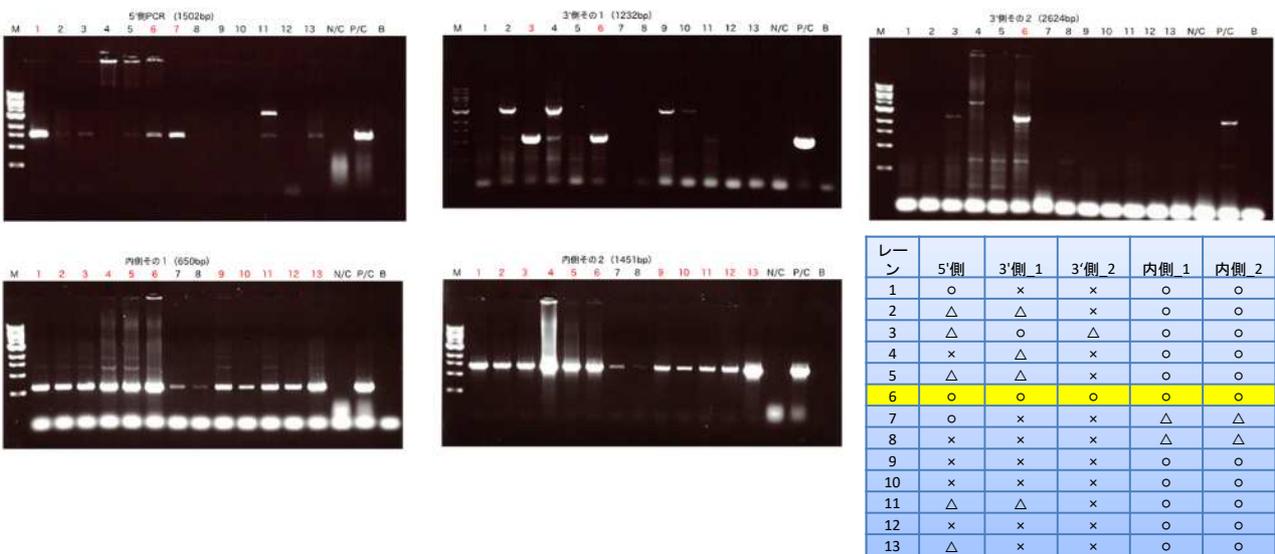
継代数_13

iPS細胞株 品質規格
ALP染色確認、rBC2LCN陽性確認
核型正常確認
継代数、凍結融解による増殖への影響のチェック

実施例

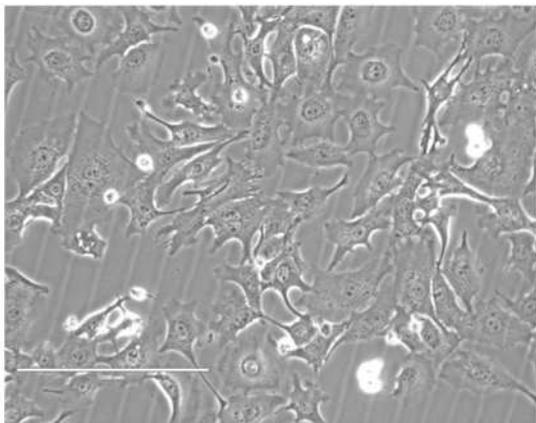
マウスがん細胞レポーター遺伝子のノックイン

細胞	マウスがん細胞
標的遺伝子名	ROSA26領域
遺伝子導入方法	エレクトロポレーション(EP)法
EP機器	4D-Nucleofector(Lonza)
使用細胞数	0.5×10^6 cells/EP
導入	Cas9 Nuclease protein NLS(ニッポンジーン)+ crRNA-tracrRNA + plasmid KIベクター
電気条件(プログラム)	EN-150
バッファー等EP調製キット	P3初代細胞4D-Nucleofector XキットS(Lonza, キュベットは16穴タイプを使用)
セレクション方法	限界希釈
薬剤選抜有無	無



培養下

BF



ZsGreen

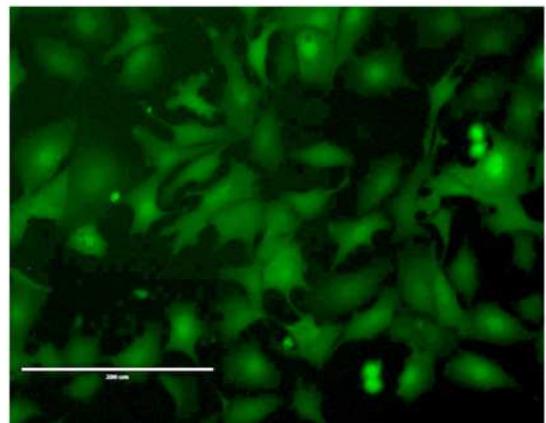


図. マウスがん細胞・ROSA26領域へのレポーター遺伝子導入_陽性候補株の蛍光観察

価 格

工程	作業内容	期間
1	<u>遺伝子導入</u> 細胞をご提供いただきます（融解、培養、増殖、継代） 弊社への細胞導入のための微生物検査 Nucleofector™（ロンザ）による遺伝子導入_Cas9、gRNA（2分子_天然型） （通常2つの条件で遺伝子導入を実施） 播種、細胞培養	4週間前後
2	<u>細胞セレクション</u> エレクトロポレーション後、限外希釈によるサブクローン化作業 培養、増殖、継代 最大100クローンを目標に作業を行います。 *well毎にPCRでの遺伝子変異導入チェックを実施します。	7週間前後
3	<u>解析（ゲノム抽出から遺伝子解析まで）</u> 取得した全クローンからゲノム抽出します 抽出したゲノムDNAを用いてPCRスクリーニングによる遺伝子変異の確認 遺伝子変異を確認できた株のシーケンス解析を行います。	3週間前後
4	<u>エキスパンド作業-凍結保存</u> 選抜されたクローンを培養、継代による細胞の増殖を行います。 細胞の増殖作業を終えた後、バイアル作製 1バイアルあたり、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cell/m	2週間前後
iPS 細胞	iPS細胞_遺伝子変異（欠損等） iPS細胞_遺伝子挿入（ノックイン） *ドナーDNAの構築作業は別料金となります。	¥3,100,000～ ¥3,400,000～
株化 細胞	株化細胞_遺伝子変異（欠損等） 株化細胞_遺伝子挿入（ノックイン） *ドナーDNAの構築作業は別料金となります。	¥2,500,000～ ¥3,150,000～

納期：4ヶ月前後（作業工程1から4まで）

補 限界希釈法による細胞株取得作業が困難と判断した場合、ご依頼者様と協議の上、細胞株の純化作業を行います。

（薬剤耐性遺伝子の使用の有無等）

工程3にて目的の細胞株が得られていないと確認された場合、ご依頼者様と協議の上、作業を再度実施いたします。

ご希望の遺伝型のタイプおよび株数により追加料金が発生する場合がございます（要相談）。

会社概要

会社名	株式会社特殊免疫研究所
会社所在地	本社 〒112-0004 東京都文京区後楽1丁目1番10号 日本生命水道橋ビル TEL 03-3814-4081 FAX 03-3814-5957 栃木工場 〒329-0512 栃木県下野市下石橋170番地 TEL 0285-52-1011 FAX 0285-52-1015 宇都宮事業所 〒321-0973 栃木県宇都宮市岩曾町1198番地4 TEL 028-683-1153 FAX 028-664-2410
代表者	代表取締役社長 伊藤 行夫
事業内容	体外診断薬、モノクローナル抗体、 各種研究用試薬の製造販売・輸入販売 遺伝子改変動物作製、iPS細胞の樹立及び細胞の遺 伝子改変サービス 抗体医薬評価用動物モデルの開発・販売 その他、医療・バイオ領域における研究及び開発



お問い合わせ
宇都宮事業所
〒321-0973 栃木県宇都宮市岩曾町1198-4
TEL(028)683-1153 FAX(028)664-2410
<https://www.tokumen.co.jp>