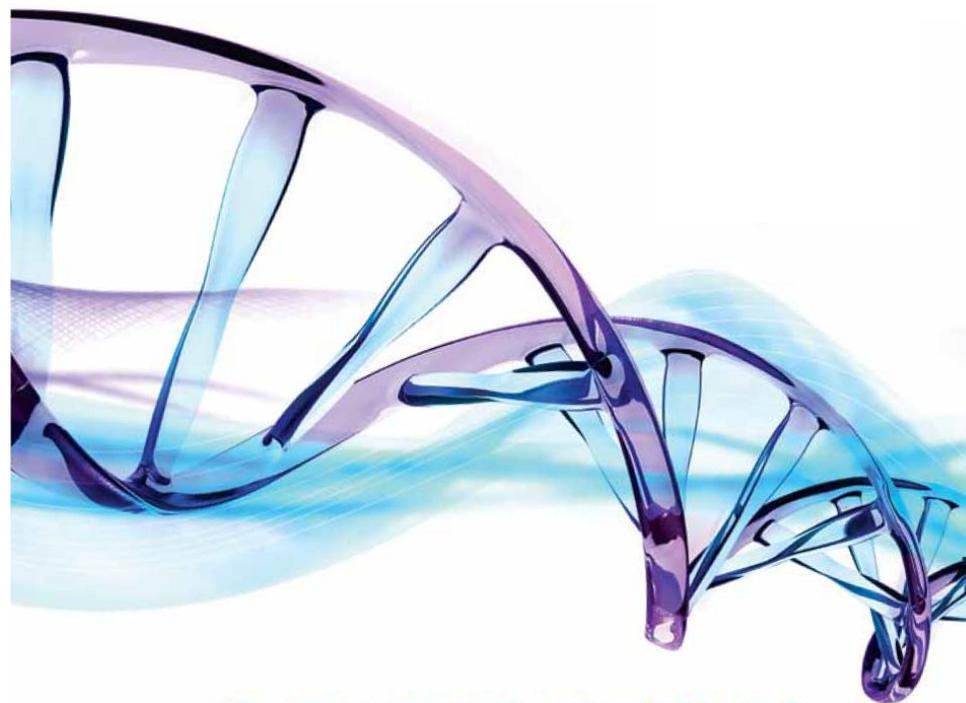


アジレント遺伝子発現マイクロアレイ

高感度・微量対応で広がるRNA解析

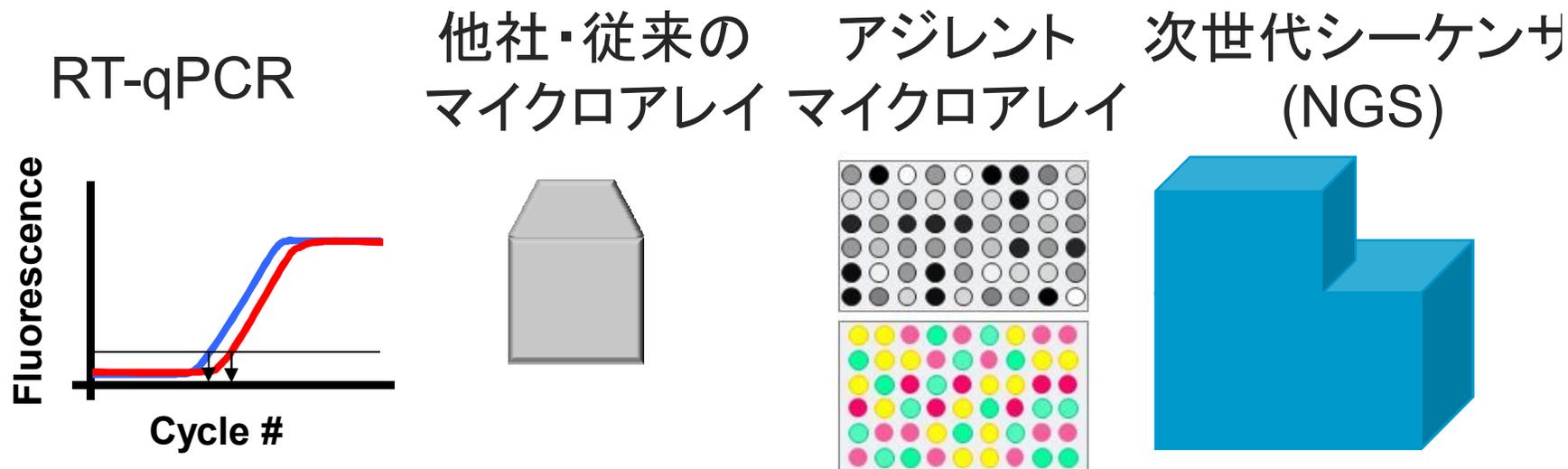


内容

- 次世代シーケンサ (NGS) とアレイの使い分け
- 微量スタートの遺伝子発現プロトコル及びラベル化試薬LIQAの紹介
- アジレント遺伝子発現アレイデータの特徴及び他社比較データ
- LincRNAを搭載したアジレント遺伝子発現マイクロアレイ 8x60K
- 遺伝子発現マイクロアレイラインナップおよびカスタムアレイ
- 新製品アジレントExonマイクロアレイおよびLIQA WT kitの紹介
- GeneSpring GX紹介及び遺伝子発現データ解析例



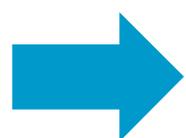
各実験手法の特徴



	RT-qPCR	他社・従来のマイクロアレイ	アジレントマイクロアレイ	NGS
遺伝子の網羅性	低	高	高	高
未知の遺伝子	配列情報があれば実験可能			前情報必要なし
遺伝子のアノテーション	アノテーション付がなされている			既知の情報にアライメント
データ量	~KB		~MB	~TB

各実験手法の特徴

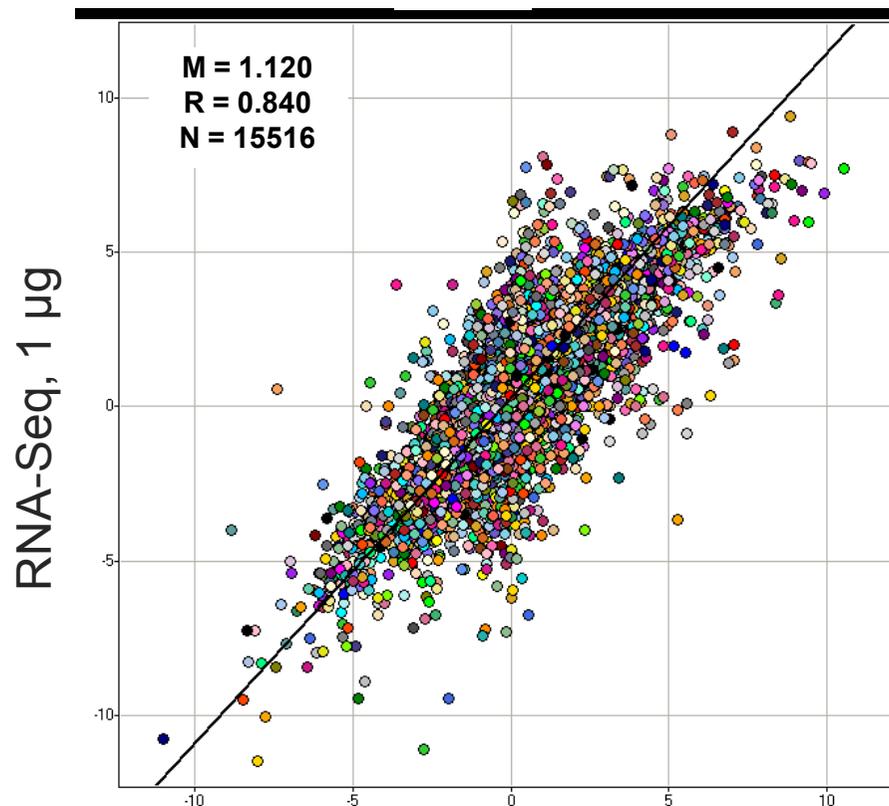
	RT-qPCR	他社・従来の マイクロアレイ	アジレント マイクロアレイ	NGS
スタートRNA量	数pg~数ng	50ng~	10ng~ (Low Input Quick Amp Labeling Kit)	100ng~ (TruSeq™ RNA Sample Prep kit)
実験時間	数時間	2~3日	1.5日	1週間程度
操作の煩雑性	低	中	低	高
感度	高	低	高 (1 in 6.9 million transcripts)	高
ダイナミックレ ンジ	10 log (PCRの希釈系列)	3 log	5 log	5 log
コスト	数百円/サンプル /遺伝子		2~4万円/サンプル	必要な読み取り深 度による



アジレントマイクロアレイは、少ないサンプル量、簡便な実験、低コストでより早くNGSと遜色ないデータが得られる

アジレントマイクロアレイとNGSの高い相関性

Agilent Array vs RNA-Seq
Log₂ Ratios (B/A)



遺伝子発現8x60K, 25 ng, 1-color

なぜ高感度・5 logのシグナルレンジが重要なのか？

・シグナル伝達・転写関連遺伝子なども発現が変動する

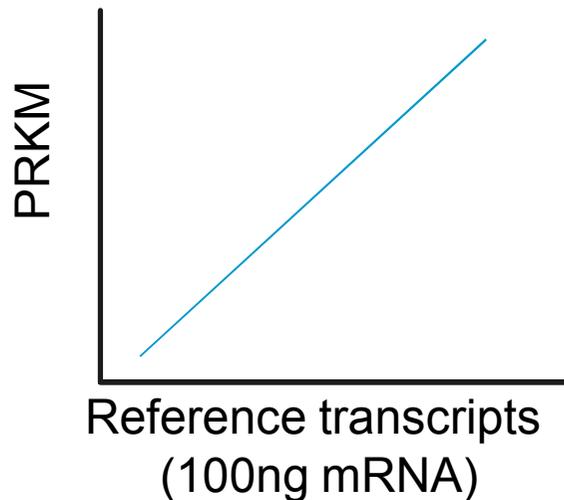
- ・ケモカイン受容体や細胞間シグナル関連遺伝子
- ・Auxin関連遺伝子

低発現遺伝子をきちんと検出
する必要がある

Ogawa, et al., *The Journal of urology* 183.1206-1212 2010

Hoshi, et al., *PNAS* 106. 6416-6421 2009

・次世代シーケンサを利用した発現解析のダイナミックレンジは、5 log



全遺伝子の発現を捉えるには
5logは必須

Ali, et al., *Nature Method* 5. 621-628 2008

まとめ ーマイクロアレイとNGS

- 新規情報を得るためには、NGSが有効。
- 既知情報の実験の場合、マイクロアレイ実験はより短時間・低コストで実験可能。
- マイクロアレイはデータ取得後、既知情報へのアライメントは不必要。
- アジレントマイクロアレイなら、NGSと同様、5logのシグナルレンジを持ち低発現遺伝子も検出することが可能。
- アジレントマイクロアレイデータは、NGSデータと高い相関をもち、NGSデータのバリデーションツールとしても有用。



Agilent 遺伝子発現マイクロアレイ 製品紹介

- ・ラベル化キット
- ・遺伝子発現マイクロアレイ
- ・カスタムアレイ



遺伝子発現アレイ実験フロー

精度良いデータを簡単なプロトコルで



Total RNA
抽出

ラベル化

約6時間

ハイブリダイ
ゼーション

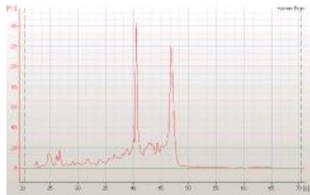
17時間/65°C

アレイ洗浄

約5分

スキャン & 数値化

1枚 8分または15分
全自動



NanoDropで
濃度・純度測定

・バイオアナライザ
でRNA品質(RIN)を
チェック



・Agilentラベル化キット

1回の増幅でラベル化
cRNAを調製
totalRNA最低必要量:
10ng(推奨25ng以上)

・Agilentハイブリダイ
ゼーションキット

・ハイブリチャンバ
・ガセットスライド
初めてでも失敗なく
確実にハイブリダイ
ゼーション

・Agilent GE/miRNA
Wash buffer set

洗浄液の調製
必要なし

8枚のスライドグラス
を同時に洗浄可能

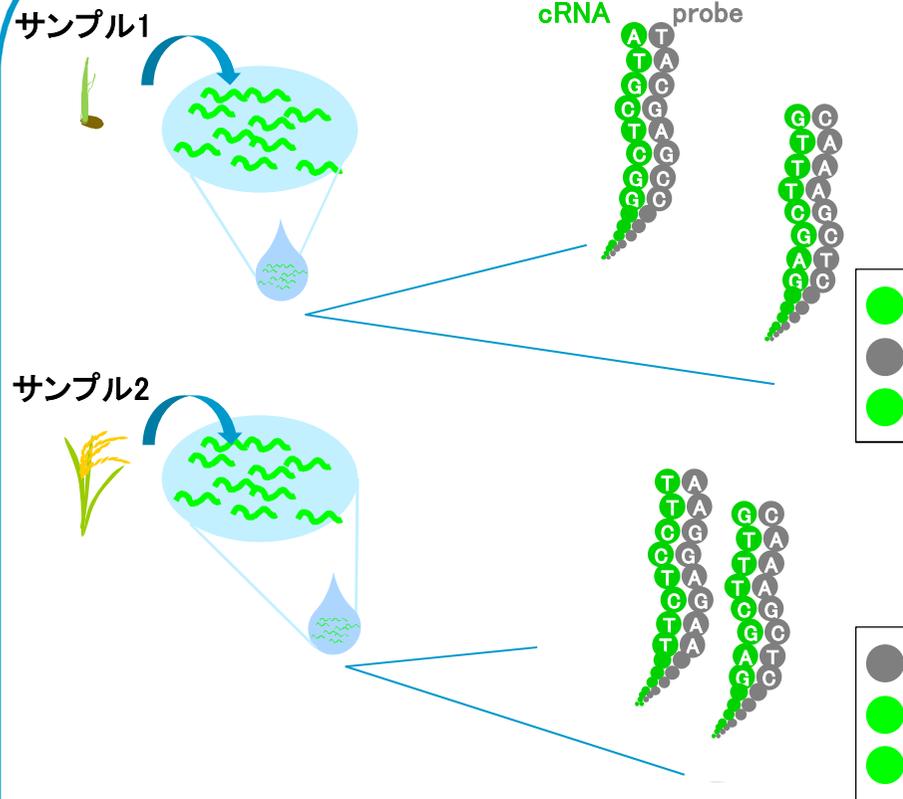
・Agilent スキャナ
・Feature Extraction

全自動スキャン
全自動数値化
QCレポートを自動作成

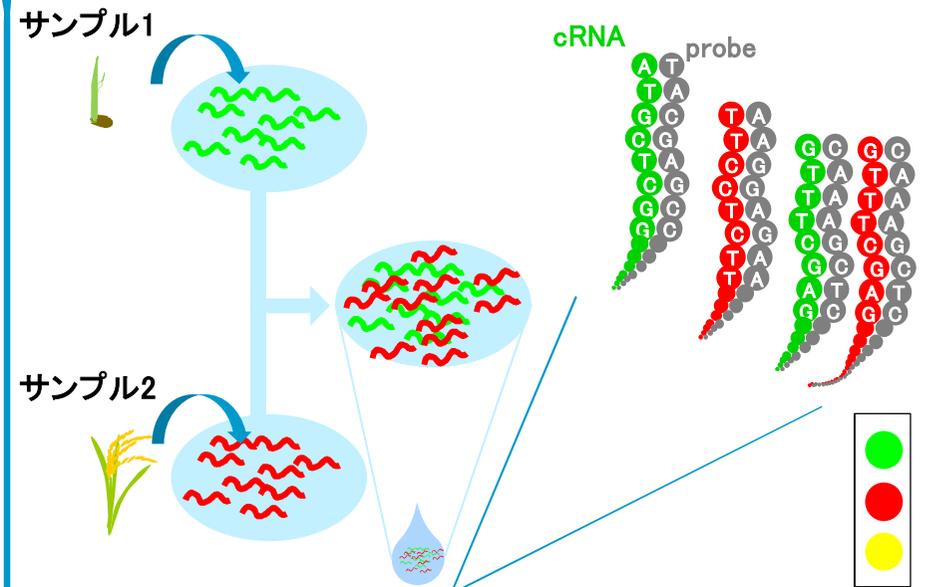
真核生物用。
1色法および2色法に対応しています。

アジレント遺伝子発現アレイは1色法・2色法に対応

1色法

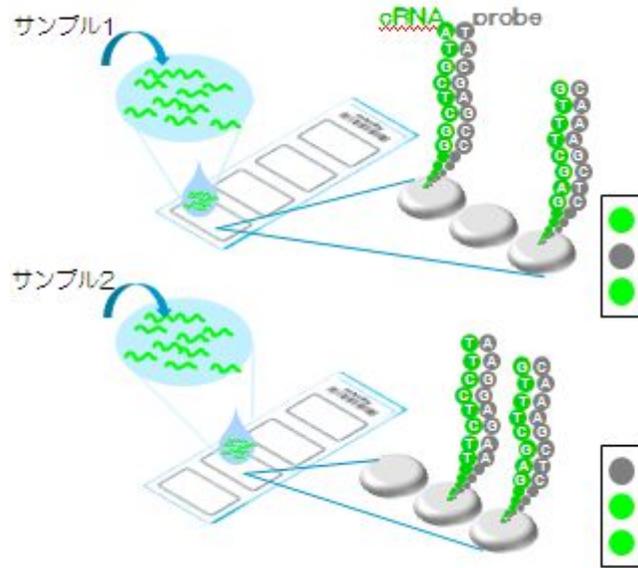


2色法

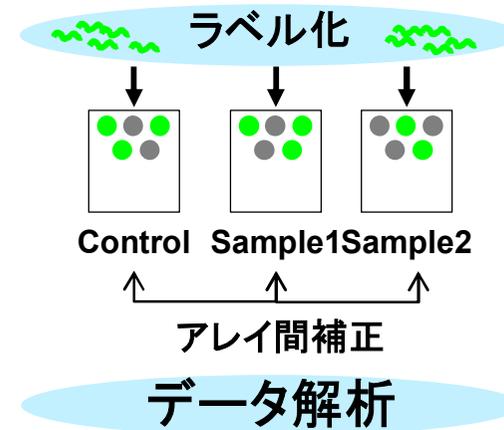


1色法の特徴

1色法: 複数のサンプルをCyanine3でラベル化し、1サンプル1アレイにハイブリダイズする。
具体的な仮説がない、数多くのサンプルを比較する場合など。



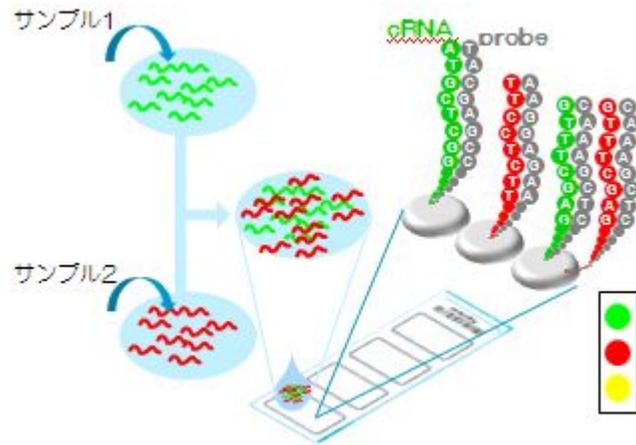
メリット: 追加解析可能
デメリット: アレイ間補正法が必要



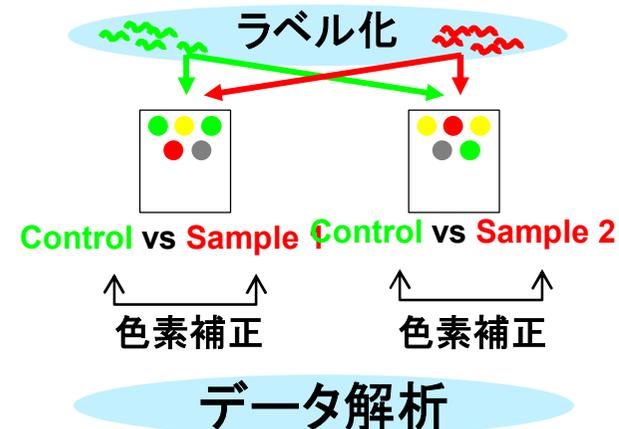
アレイ内の各スポットのシグナル強度を測定

2色法の特徴

2色法: 2サンプルをそれぞれCyanine3あるいはCyanine5でラベル化し、1アレイにハイブリダイズする。
2サンプルを直接比較する際に適している。



メリット: 2サンプル間の僅かな差を検出しやすい
デメリット: データの追加解析は難しい
しっかりした実験デザイン・目的が必要



アレイ内の各スポットのシグナル比を測定

アジレント遺伝子発現マイクロアレイラベル化キット

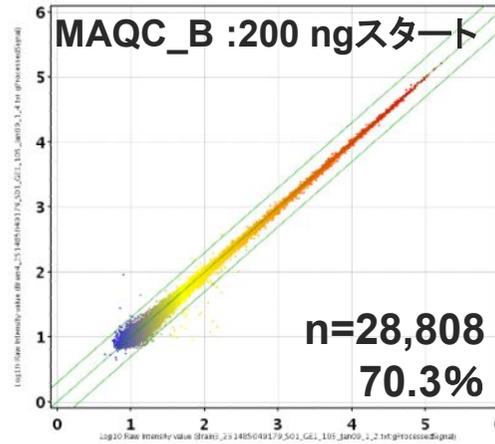
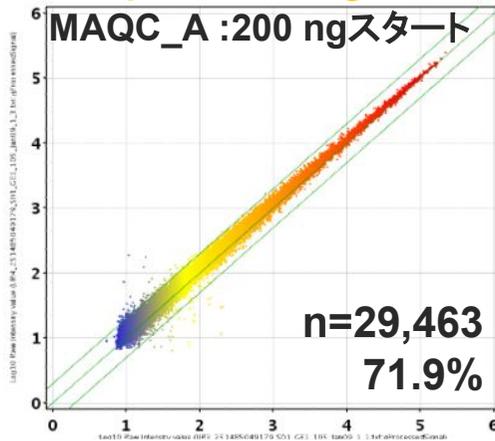
- Low Input Quick Amp Labeling Kit(LIQA)
- 最少わずか**10ng**のtotal RNAからラベル化可能。
- 1回増幅で、十分量のラベル化cRNAを合成。
- ラベル化反応に必要な試薬は全て含まれています。
- 1色法および2色法に対応しています。

マイクロアレイフォーマット	最低必要total RNA量
8x60K, 8x15K	10ng (推奨25ng以上)
4x180K, 4x44K	25ng
2x105K, 2x400K, 1x244K, 1x1M	50ng



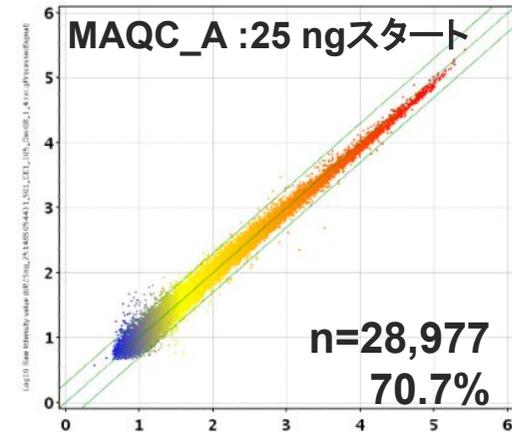
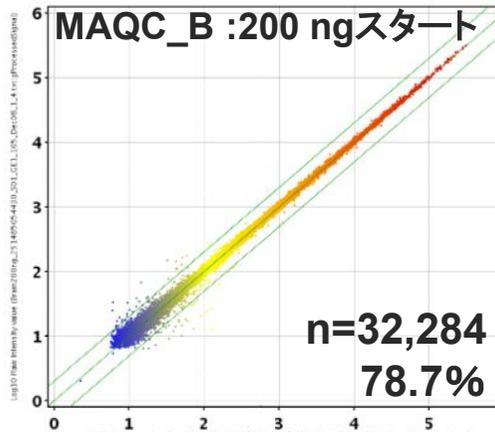
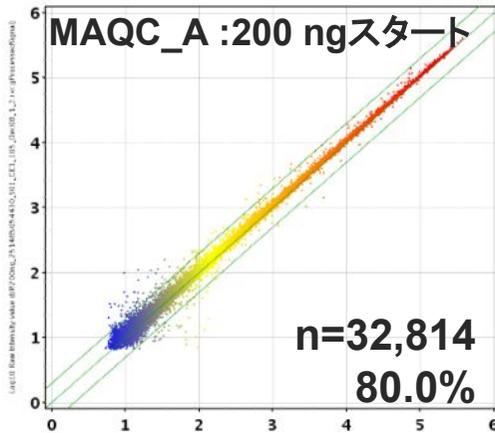
各キット内、同じスタート量同士の比較

Quick Amp Labeling kit



- 2アレイでWell Above
- No normalization
- 4x44Kフォーマット

LIQA

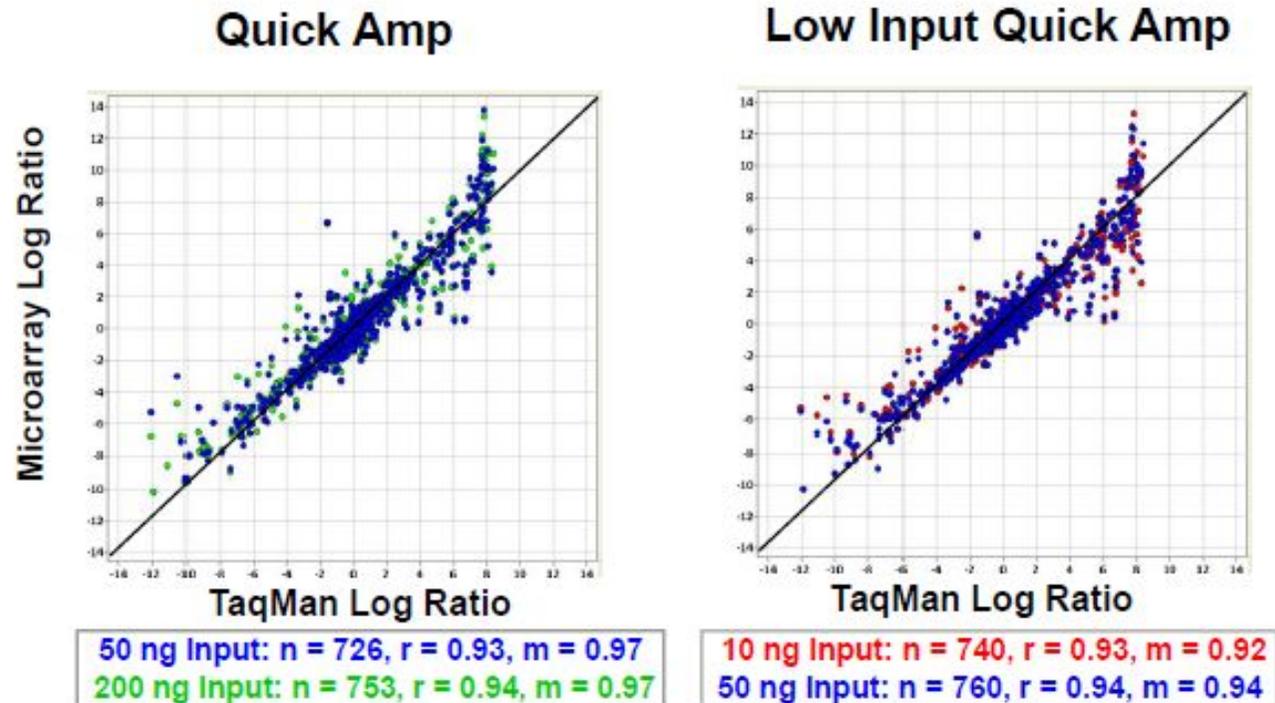


新製品LIQAを用いた方が、より少量のtotalRNAから
従来品Quick Amp Labeling kitと同等の遺伝子数を検出できる

Log10



定量PCRデータとの相関



- 各スタートRNA量で3回繰り返し実験
- 各アレイデータセットでWellAboveの遺伝子と比較
アジレント米国ラボデータ

- ・新製品LIQAデータとTaqManデータの相関は良好
- ・新製品を用いるとTaqManデータと比較できる遺伝子(WellAbove)がさらに増える

まとめ ー 遺伝子発現ラベル化プロトコル

- 簡便なプロトコルで、1.5日でラベルから数値化まで可能。
- 1色法・2色法のどちらか、実験系に適した手法を選択可能。
- Spike In Mixを用いることで実験の成否を評価可能。
- 新製品Low Input Quick Amp Labeling Kit(LIQA)は従来品Quick Amp Labeling Kitよりも少ないtotal RNA(最少10ng)から十分量のcRNA量を合成可能
- LIQAを用いたデータは従来品Quick Amp Labeling Kitと同等の高い再現性、5logのダイナミックレンジをもつ

Quick Amp Labeling KitからLIQAへの移行について

弊社従来品Quick Amp Labeling Kitを用いたデータと、LIQAを用いたデータを比較した場合、全体的な相関は良好ですが、若干の違いがみられます。この為、データの相互比較が必要な同一プロジェクト内では、両者を混在させて解析することはお奨めできません。



遺伝子発現マイクロアレイのフォーマット Human, Mouse, Rat

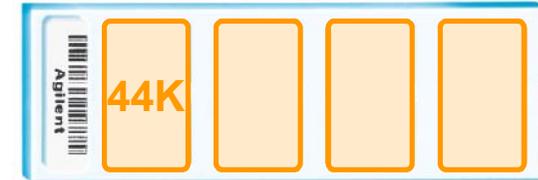


SurePrint G3

version2+lincRNA※

※Human, Mouseのみ

Whole Genome 遺伝子発現アレイ 4x44K v2 Human, Mouse, Rat(v3)



- より新しい情報に基づき、プローブを再設計
- 弊社従来品に比べ、コーディング領域のカバー率が大幅アップ
- non-coding RNAにもプローブを設計

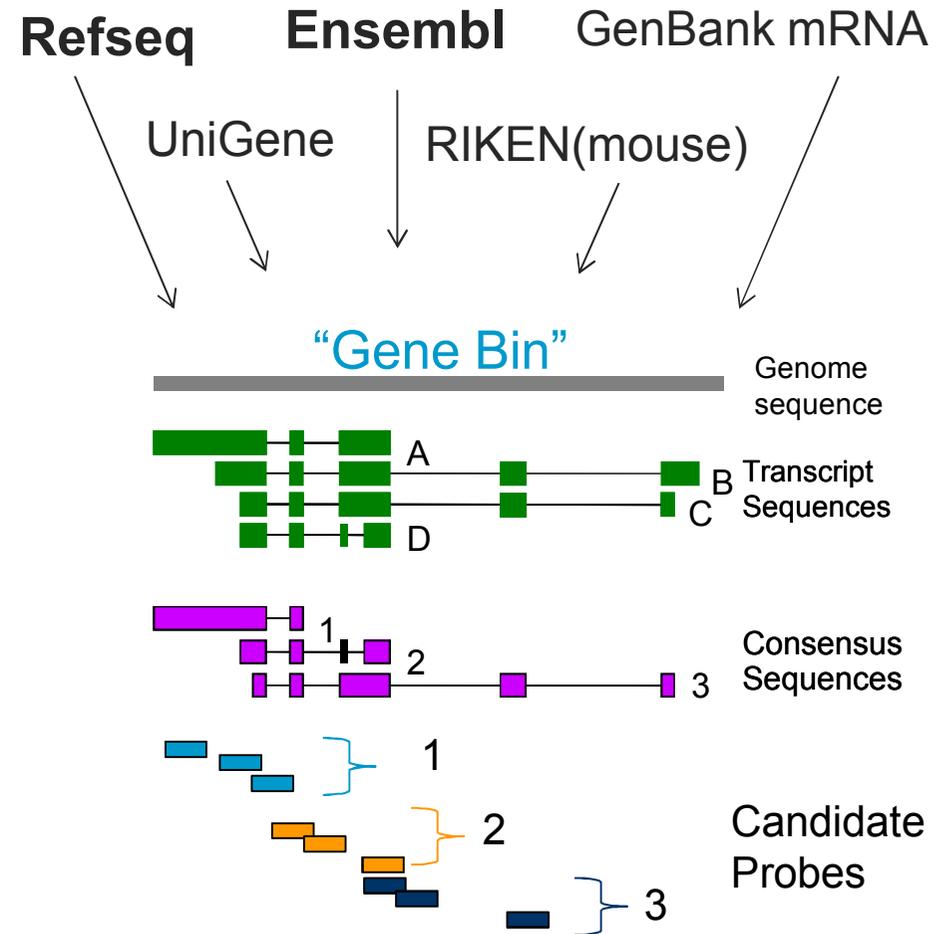
プローブ設計時の参照データベース

Human	Mouse	Rat
<ul style="list-style-type: none">•Refseq Build 36.3•Ensembl Release 52•Unigene Build 216 (April 2009)•mRNA from UCSC (April 2009)	<ul style="list-style-type: none">•Refseq Build 37•Ensembl Release 55•Unigene Build 176 (April 2009)•mRNA from UCSC (April 2009)	<ul style="list-style-type: none">•Refseq Build 36.2•Ensembl Release 55•Unigene Build 177 (October 2008)•mRNA from UCSC (January 2009)



プローブ設計の流れ

1. 公的データベースからの配列情報をゲノムにアラインし、“Gene Bin”を決定
2. 各“Gene Bin”のコンセンサス配列を決定
3. コンセンサス配列ごとに3個の候補プローブを作成
4. プローブの検証実験
5. 最適なプローブを選択



Whole Genome 遺伝子発現アレイ 4x44K v2

各生物種カバー率

Entrez Gene type	Human		Mouse		Rat(v3)	
	Covered	% Coverage	Covered	% Coverage	Covered	% Coverage
Protein coding	23,530	96.8	29,412	79.8	23,978	87.7
snoRNA	65	17.9	3	15.8	-	-
tRNA	0	0	0	0	0	0
pseudo	2,414	23	3,197	30	2,840	35.6
rRNA	5	18.5	4	14.3	0	0
miscRNA	810	59	308	35	15	100
snRNA	13	17.3	8	34.8	0	0
scRNA	0	0	1	50	-	-
other	57	8.4	95	3.4	17	3.6
unknown	1,064	37.5	989	9.3	80	7.9
Total	27,958		34,017		26,930	

Whole Genome マイクロアレイv1との比較 —プローブコンテンツ

総プローブ種数(v2)		Probeレベルの比較			GeneSymbolレベルの比較			
		v2のみ	共通プローブ	v1のみ	v2のみ	共通		v1のみ
		Human	34,127	15,566(45.6%)	18561(54.4%)	22,439	4,025	25,415
						ProbeIDが同じ	ProbeIDが異なる	
						17,811	7,604	
Mouse	39,429	27,341(69.3%)	12,088(30.7%)	29,086	7,573	27,204		1,097
						ProbeIDが同じ	ProbeIDが異なる	
						11,419	15,785	

それぞれhg18, mm9での比較

弊社従来品、Whole Genome microarray v1とプローブのコンテンツが異なり、データの相互比較が必要な同一プロジェクト内では、両者を混在させて解析することはお奨めできません。

生物種	V1(4x44K)	V2(4x44K)	V3(4x44K)
Human	014850	026652	-
Mouse	014868	026655	-
Rat	014879	-	028282

※各マイクロアレイのデザインID
オーダー時や実験前に、バーコード番号とデザインIDをご確認の上、お間違えないようご使用ください。

Whole Genome 遺伝子アレイ v2

ご利用上の注意点

- Whole Genome 遺伝子発現アレイ4x44k v2は、弊社ラベル化キット Low Input Quick Amp Labeling kit(実験プロトコルv6.0以降)をご利用ください。
- Whole Genome 遺伝子発現アレイ 4x44K v1は、今後も販売していきます。
- Whole Genome 遺伝子発現アレイ4x44k v2にはlincRNAは含まれていません。
v1をお使いでv2のご使用を希望の方は、8x60Kフォーマットへの切り替えをお勧めいたします。

8x60K遺伝子発現マイクロアレイ



- より新しい公的データベースに基づき、プローブを再設計
(Whole Genome 遺伝子発現アレイ4x44k v2のプローブをすべて含みます)
- 最少10ngのtotal RNAからスタート可能(推奨25ng以上)

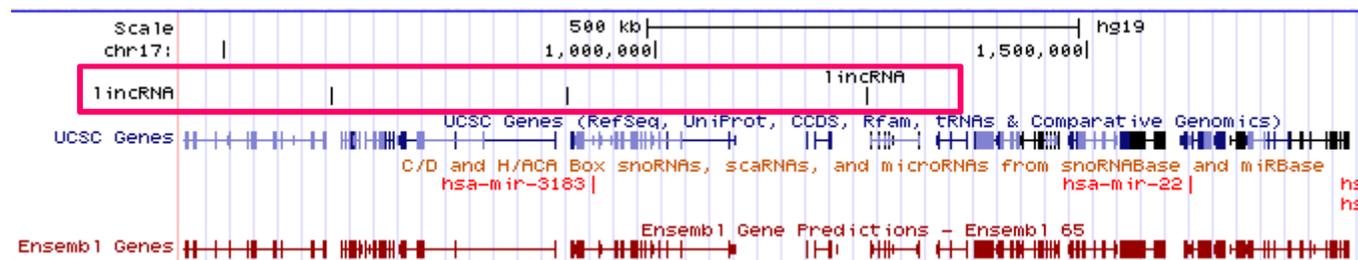
- 今話題のlincRNAを搭載(HumanおよびMouse) !

型番	製品名	参照データベース	デザイン内容
G4851A	SurePrint G3 Human 遺伝子発現 マイクロアレイキット 8×60K	Refseq Build 36.3 Ensembl Release 52 Unigene Build 216 (April 2009) mRNA from UCSC (April 2009)	Entrezgene targets : 27,958 lincRNA : 7,419 snoRNA, rRNA, miscRNA, snRNA, pseudo対応プローブ搭載
G4852A	SurePrint G3 Mouse 遺伝子発現 マイクロアレイキット 8×60K	Refseq Build 37 Ensembl Release 55 Unigene Build 176 (April 2009) mRNA from UCSC (April 2009)	Entrezgene targets : 34,017 lincRNA : 4,623 snoRNA, scRNA, rRNA, miscRNA, snRNA, pseudo対応プローブ搭載
G4853A	SurePrint G3 Rat 遺伝子発現 マイクロアレイキット 8×60K	Refseq Build 36.2 Ensembl Release 55 Unigene Build 177 (October 2008) mRNA from UCSC (January 2009)	Entrez gene targets : 26,930 miscRNA, pseudo対応プローブ搭載

8x60Kフォーマット発現アレイの特別コンテンツ lincRNA を追加 (ヒト/マウス)

large intervening non-coding RNA

- 200 nt以上、多くは1 kb ~ 10 kb
 - 遺伝子間に存在
 - mRNAと同様に
 - RNA polymerase IIにより転写される
 - 5'キャッピング、ポリA付加される
- ➡ Low Input Quick Amp kit使用可能、mRNAと同時検出！
- 哺乳類によく保存されている→機能の保持



Guttman M et al., *Nature*, 458, 223-227 (2009)

徐々に明らかになるlincRNA

•ゲノム上にどのくらいコードされているのか？

→ヒト: ~3,300、マウス: ~1,600
今後報告数が増える可能性あり。

•どんな現象に関わっている？

→ES細胞の増殖、細胞周期、免疫関連など
具体的に報告されているのは
-X染色体の不活化(Xist, Tsix)
-インプリンティング(H19, Air)
-核導入の制御(Nron)



GuttmanM et.al., *Nature Biotech.*, 28, 503-510 (2010)

徐々に明らかになるlincRNA

•その機能は？

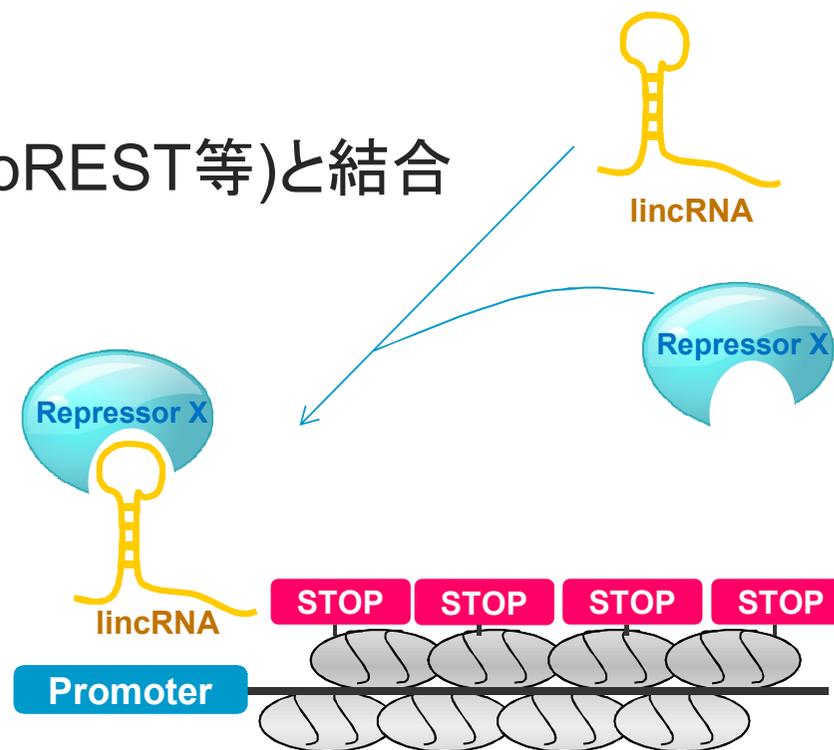
→遺伝子発現の調節に関与

多くは染色体修飾複合体(PRC2,CoREST等)と結合

PRC2:H3K27me3 メチラーゼ。

遺伝子のプロモーター領域に結合し、
その発現を抑制する。癌の進行に関与

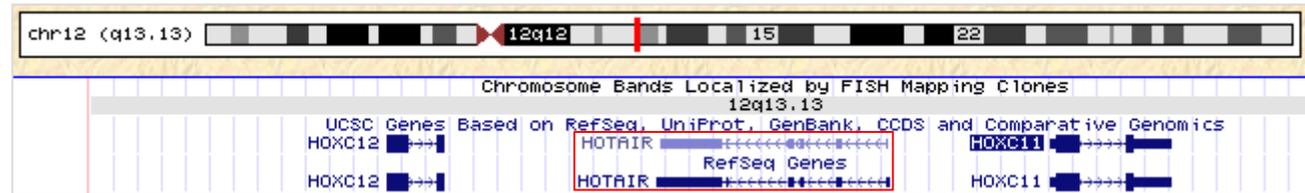
CoREST:ヒストンの脱メチル化



p53, Oct4やNanogがlincRNAのプロモーターに結合

Guttman M et al., *Nature*, 464, 1071-1076 (2010)
Khalil et al., *PNAS*, 106, 11667-11672 (2009)
E. Pennisi *Science* 324, 1252-b -1253-b (2009)

エピジェネティックな発現制御に関わるlincRNA



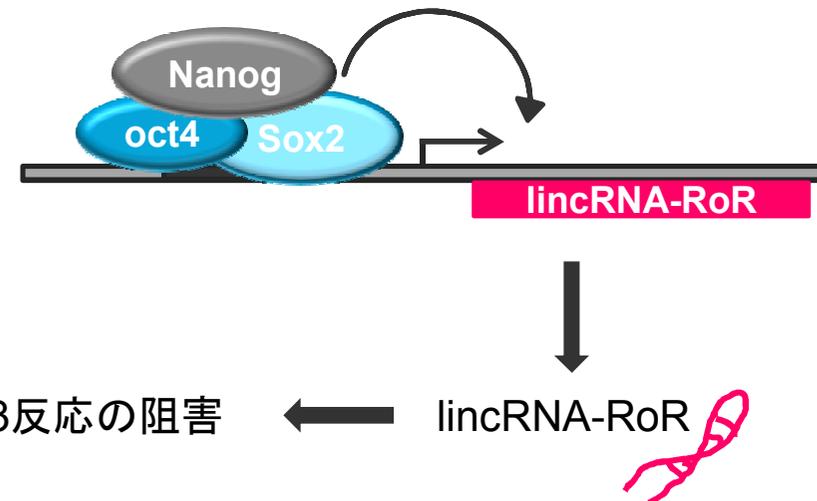
HOTAIR

- HOX Cのアンチセンスにコード
- PRC2と相互作用し、乳がんの転移に関与。
- HOTAIRの発現と乳がんの転移・予後に相関がみられる。

Guttman M et al., *Nature*, 464, 1071-1076 (2010)

lincRNA-RoR(lincRNA-ST8SLA3)

- P53を介し、iPSの再プログラム化に関与
- OCT4/NANOG/SOX2によって転写制御



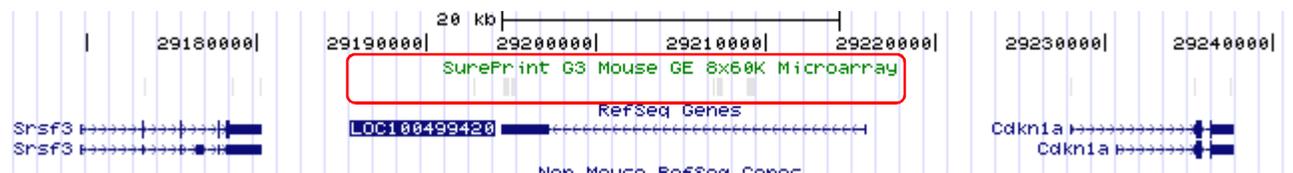
Nature genetics 42,1113–1117(2010)

p53の発現制御に関わるlincRNA-p21

- lincRNA-p21 : p21の近傍にあるlincRNA
- hnRNP-K (heterogeneous ribonucleoprotein K)と結合し、様々な遺伝子の発現を抑制しアポトーシスに導く。

Cell 142, August 6, 2010

SurePrint G3 マウス遺伝子発現8x60Kフォーマットに対応プローブが搭載。



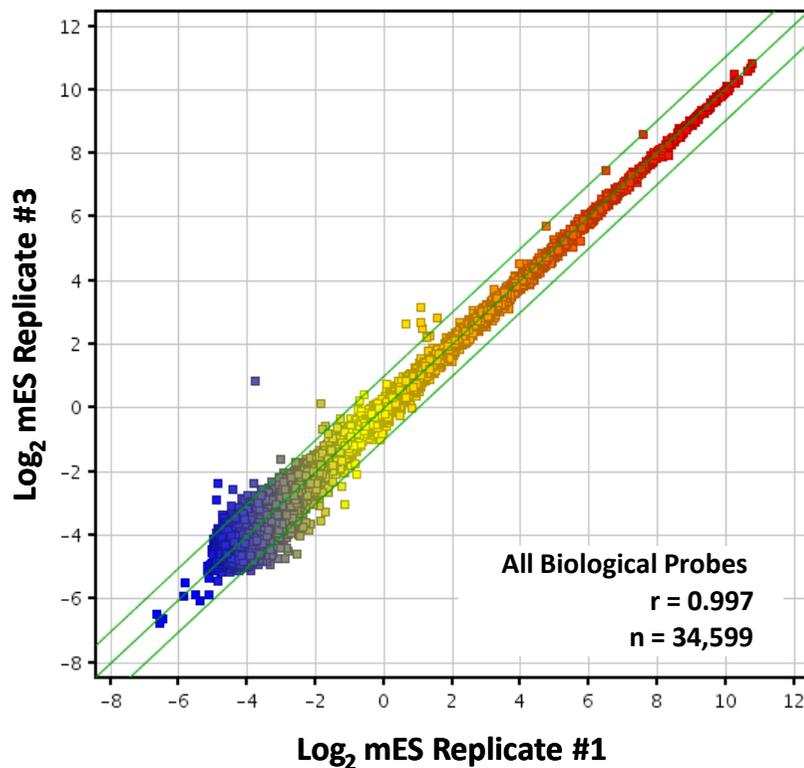
LOC100499420:lincRNA-p21に対応

Huarte et al., Cell 142, 409–419, August 6, 2010

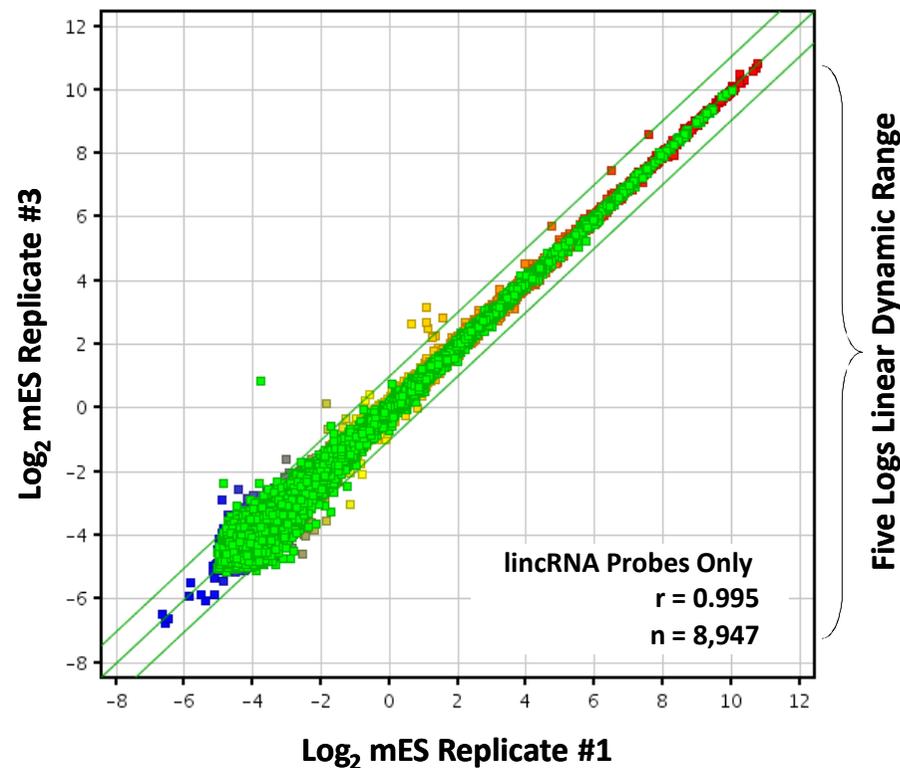
lincRNAも5logにわたって検出



2アレイで検出されたプローブ



緑:lincRNA対応のプローブ



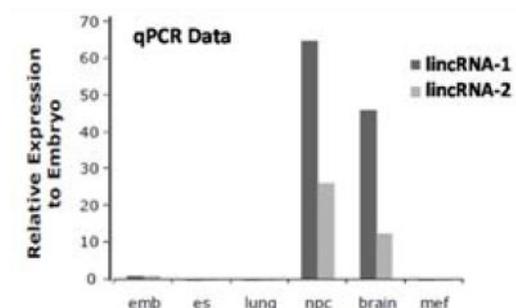
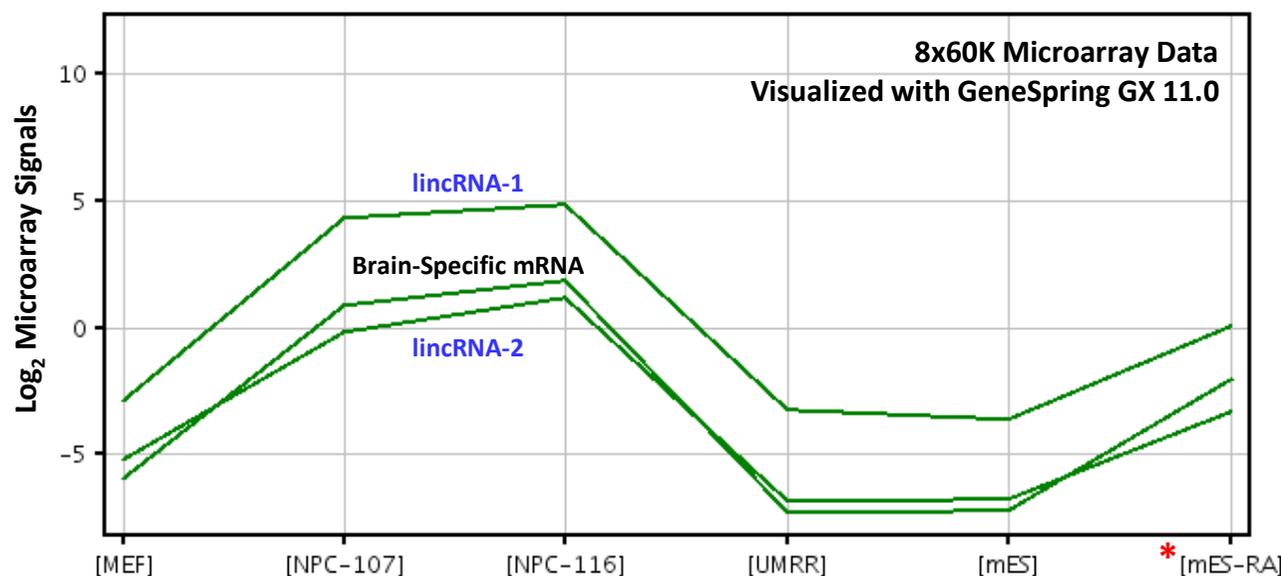
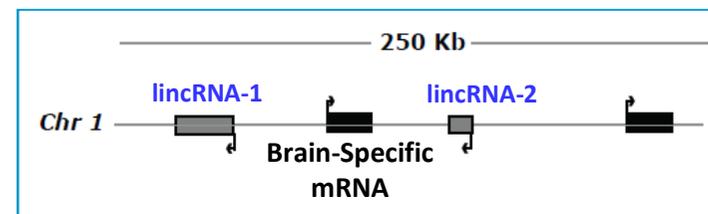
• サンプル：マウスES細胞

• lincRNAも5logにわたり、高い再現性で検出

組織特異的に発現するlincRNA



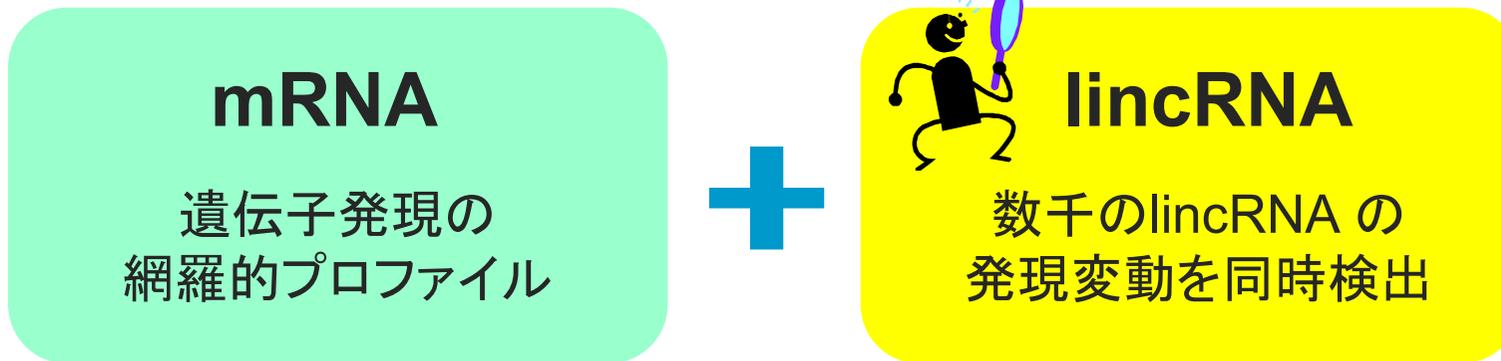
- 6種のマウスcell lineを使用。
- 2つのlincRNAが、脳特異的に発現する遺伝子と同じ挙動を示す。



Unpublished data courtesy of Guttman et al

遺伝子発現の実験を行うと、lincRNAのデータも同時に取得できます

- Total RNA抽出法は今まで通り
- LIQAでラベル化

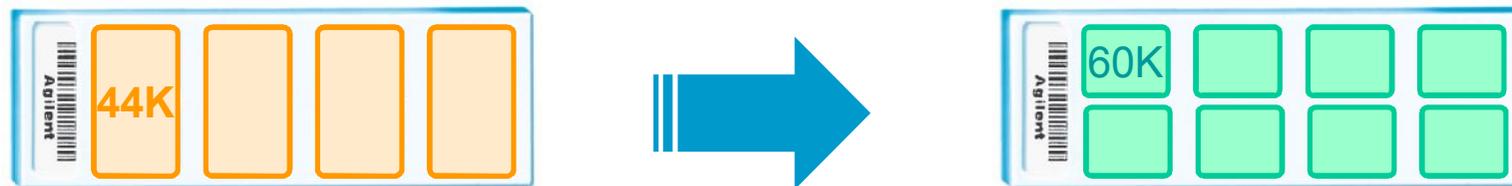


- 新規発見で論文に！



SurePrint G3遺伝子発現 8x60Kのデータ紹介

4x44Kのデータ精度を保ったまま
より高密度に、より使いやすい価格に、よりハイスループットに

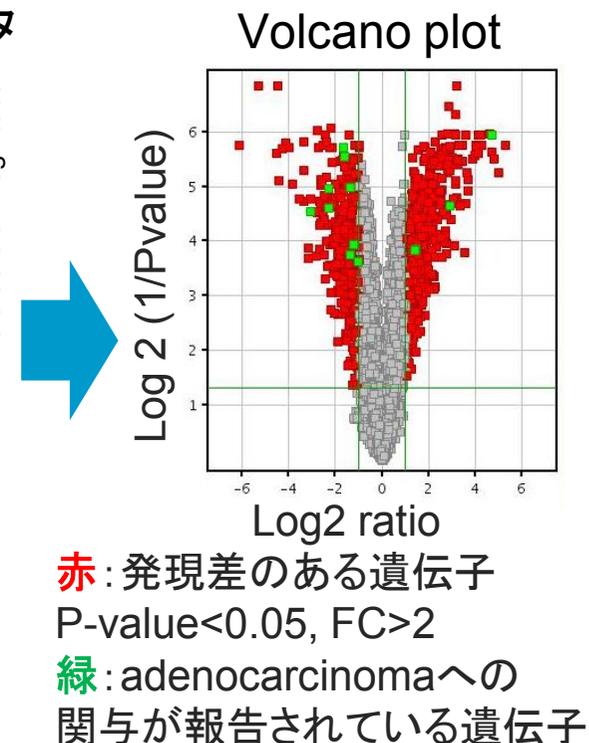
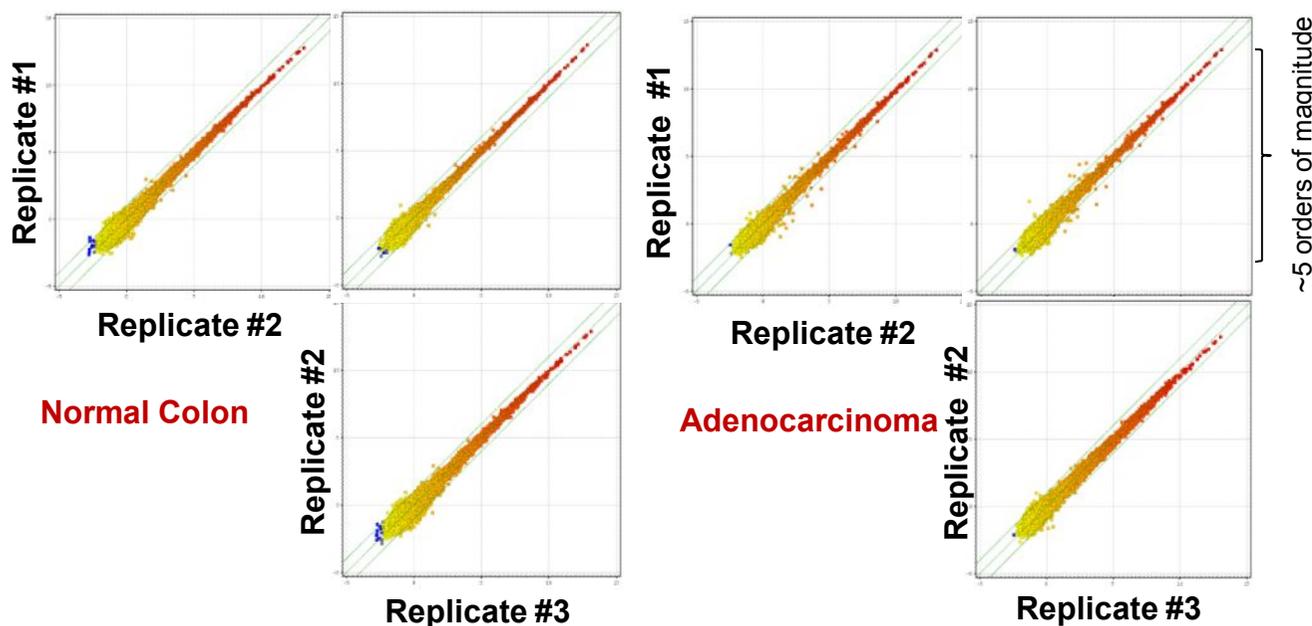


miRNAアレイと同様、8パックのフォーマットになったことで
遺伝子発現とmiRNAアレイと同じデザインで実験可能。

幅広いレンジで信頼の高い発現差解析が可能

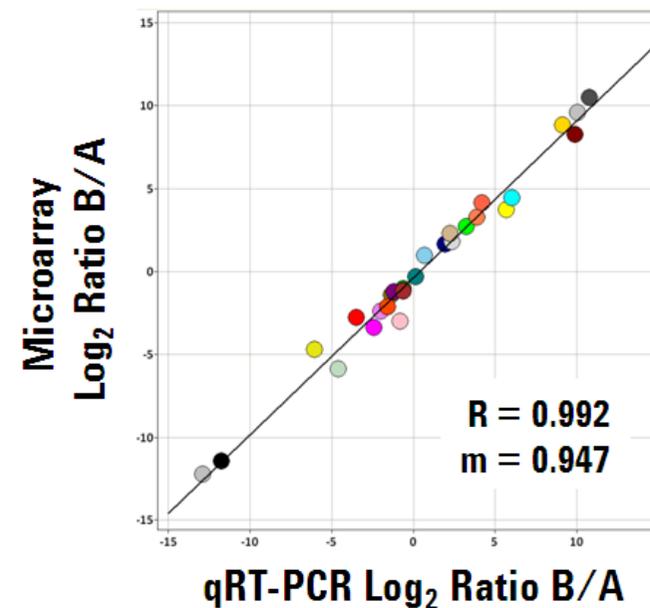
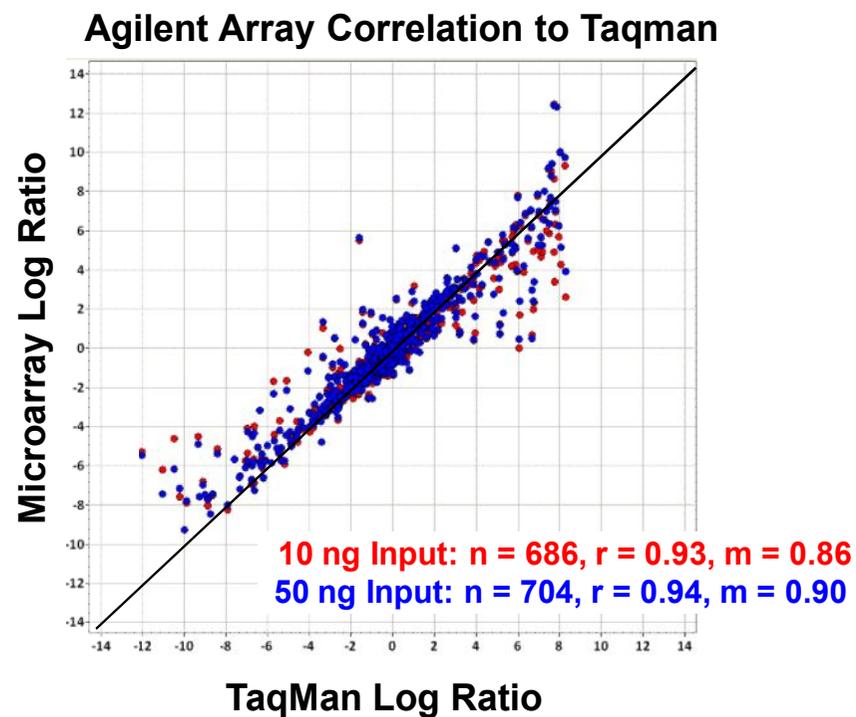


ヒトNormal ColonおよびAdenocarcinomaの繰り返し実験データ



- 再現良く繰り返し実験のデータが得られる
- 実験誤差が小さく、信頼性の高い発現差解析結果が得られる

SurePrint G3アレイは定量PCRと高い相関を持つ



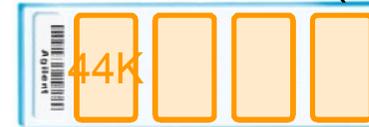
- AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit
- Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix

10ngあるいは50ngスタート時でも定量PCRと高い相関をもつ

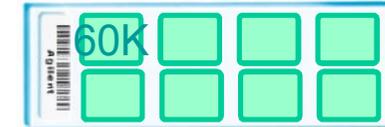
遺伝子発現マイクロアレイ 製品ラインナップ

ヒト、マウスおよびラット

4x44K v1&v2(v3)



G3 8x60K



Whole Genomeマイクロアレイ



Whole Human Genome v1& v2, G3



Whole Mouse Genome v1 & v2, G3



Whole Rat Genome v1&v3, G3

4x44k v1:5スライドキット・2スライドキット

4x44k v2(v3):5スライドキット・1スライド～受注製造

8x60K:3スライドキット・1スライド～受注製造



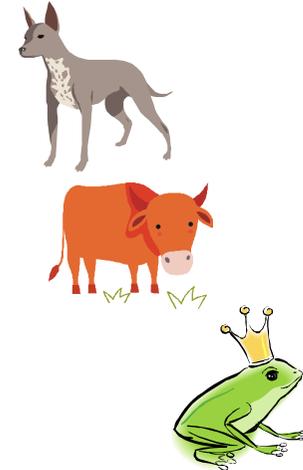
遺伝子発現マイクロアレイ 製品ラインナップ 受注製造品

• 4x44Kフォーマット

アカゲザル v1&v2
イヌ v1&v2
ウシ v1&v2
ウサギ
ウマ
カエル v1&v2
サケ
ゼブラフィッシュ ~v3
ニワトリ v1&v2
ブタ v1&v2

イネ
イネいもち病菌v2
オオムギ
コムギ
セイヨウアブラナ
シロイヌナズナ ~v4
ダイズ
タバコ
タルウマゴヤシ
トマト
ワタ

蚊
ハエ
酵母v1
線虫v1&v2



• 8x15Kフォーマット

ヒツジ
酵母v2
大腸菌



より新しいデータベースをもとにプローブの再設計を行った場合は、同じ生物種名でバージョンが異なります。同じ生物種でもバージョンが異なるとデータの直接比較はできませんのでご注意ください。

1スライドグラスから発注いただけます。

遺伝子発現カスタムアレイ

eArray 7.8

製造費のみで自由にカスタムアレイの作成が可能。
8種のフォーマットを目的に応じて自由に選択可。

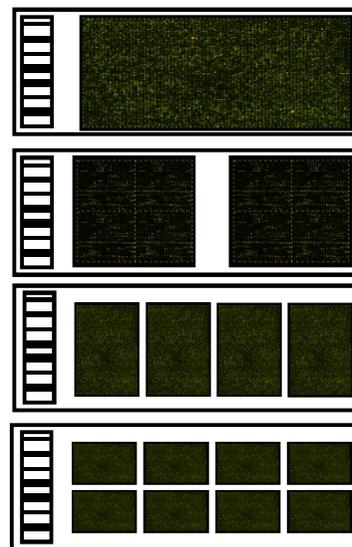
- ・トランスクリプト配列から
プローブ設計可能
- ・デザイン費は無償
- ・1スライドガラスから発注可能



eArrayでのカスタムアレイ作成フロー ログインからオーダーまで



- ・Probe database
- Gene Expression
- miRNA
- CGH/CNV
- ChIP- on- chip
- ・Probe Design(GEのみ)



ユーザー登録無料！
ご利用約款への同意が必要です。

アジレントが設計した
プローブを無料で利用可能！
新規シーケンスから
プローブデザイン可能！

**1枚から
オーダー可能！**

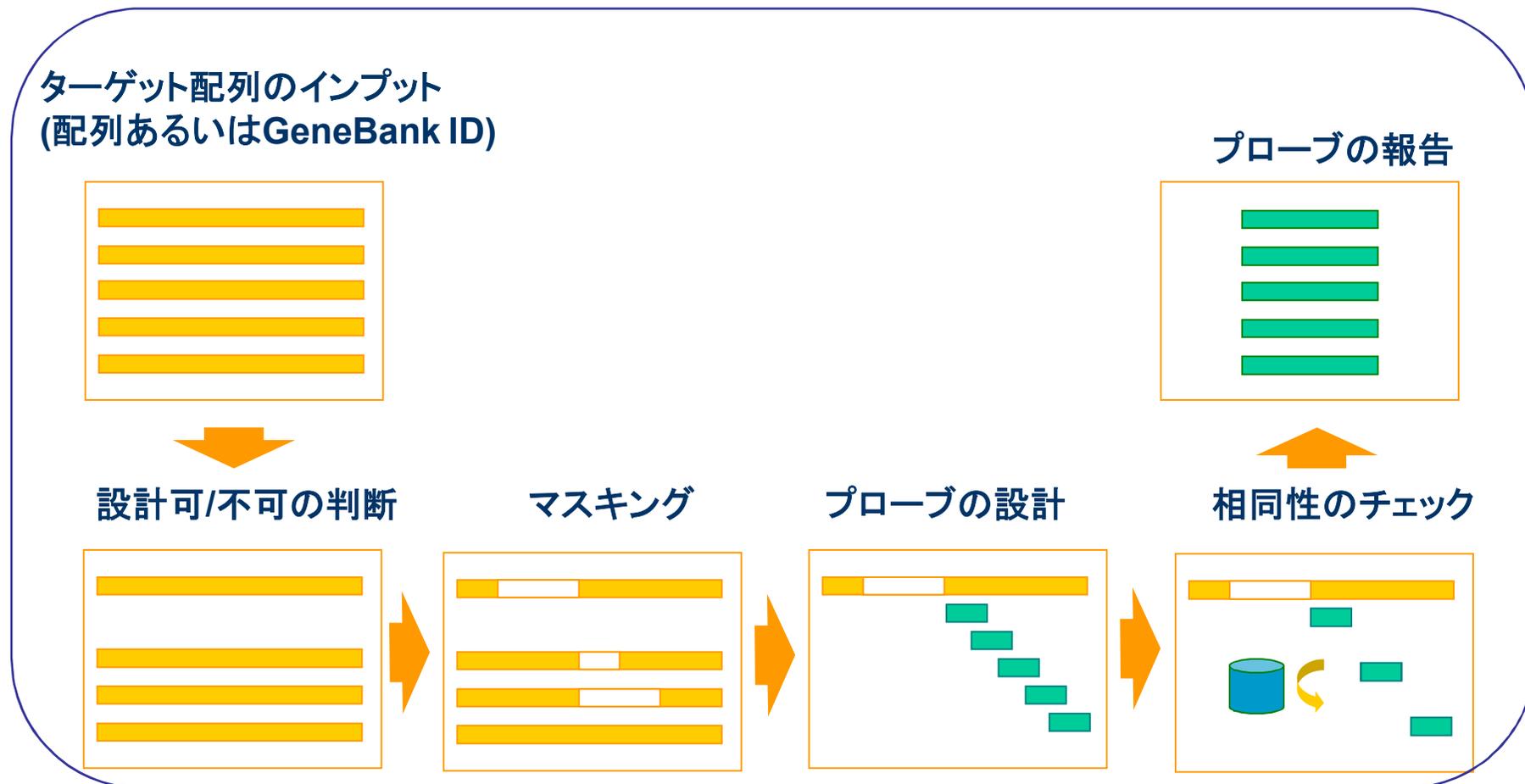
ご利用可能なアレイアプリケーション：
Gene Expression, miRNA ,CGH,ChIP-on-chip

遺伝子発現カスタムマイクロアレイ

- ・**100種以上**の生物種に関して、設計済みプローブから搭載プローブを選択可
(遺伝子名、AccessionID、ロケーション、GO term等でプローブ検索可能)
- ・トランスクリプト情報(配列あるいはGeneBankID)があれば、**プローブ設計**可能
(カタログアレイに目的生物種がない、新たに配列が報告された場合など)
- ・**Exon用プローブ**を含めカタログアレイに搭載されているプローブを使用可能
(アレイフォーマットを変えたい場合など)
- ・設計済みプローブの配列をアップロードし、カスタムアレイに搭載可能

The screenshot shows the search interface of the Agilent Microarray Design Center. The navigation bar includes links for Home, Microarray, Probe Group, Probe (selected), My Functions, My Account, Site Maintenance, and Data. There are also links for Expression and Switch Application Type. Below the navigation bar, there are search options: Search, Upload, Simple Tiling, GE Probe Design, GE Probe Check, Reannotate, and GeneSpring Download. The search type is set to Search Standard Probes. The search form includes fields for Search Type (All), Search Term(s), Species (Select), and Used in Array Designs. There are also checkboxes for Exact Search and Include subfolders, and a Folder info dropdown. Search and Reset buttons are at the bottom.

プローブ設計の流れ — 遺伝子発現



データ量や込み具合により数時間～数日かかることがあります。

プローブ設計法 — 遺伝子発現

真核生物・原核生物ともプローブ設計可能

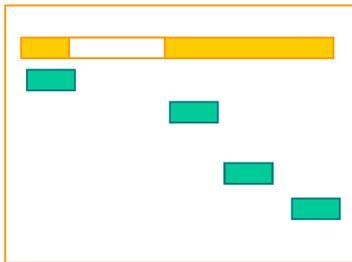
真核生物の場合: Base Composition Methodology



Design with 3' Bias [Info](#)

- ・オリゴdTプライマーを用いたラベル化
- ・3'末端1,000bp以内にプローブを設計

原核生物の場合: Tm Matching Methodology



Design with 3' Bias [Info](#)

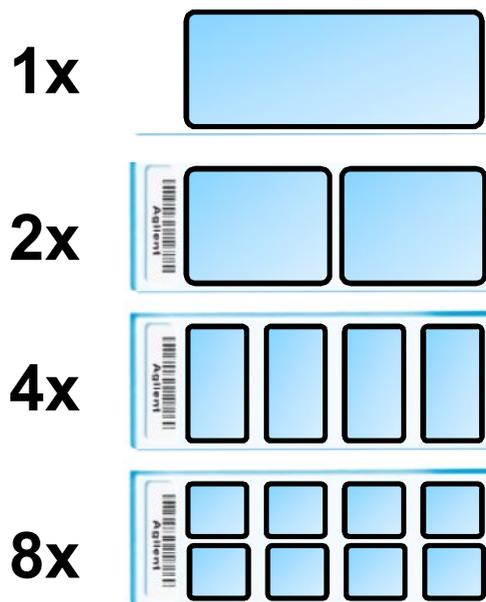
- ・ランダムプライマーを用いたラベル化
- ・ターゲット配列全体がプローブ設計対象

遺伝子発現マイクロアレイおよび対応スキャナ

高密度スポットのマイクロアレイ

↓
スポット径が小さい

↓
より高解像度なスキャンが必要



Cスキャナ/SureScan

Bスキャナ

5umスキャン



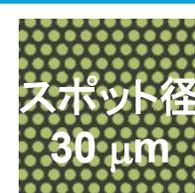
1x244K

2x105K

4x44K

8x15K

3umスキャン



1x1M

2x400K

4x180K

8x60K

注意：
標準仕様のCスキャナおよびSureScanは最高解像度が5umです。

まとめ ー最新の遺伝子発現マイクロアレイ

- Human, MouseおよびRatのマイクロアレイは、2009年のデータベースをもとに設計したプローブを搭載。4x44Kおよび8x60Kフォーマットから選択。
- 8x60KフォーマットのHumanおよびMouseのマイクロアレイには、遺伝子発現制御に関わる、話題のlincRNA(large intervening non coding RNA)を搭載。
- 8x60Kおよび8x15Kフォーマットは、最少10ngのtotal RNAからラベル化可能。
- 5logのダイナミックレンジ、高い再現性があり、定量PCRとの相関も良好。
- Human, Mouse,Rat以外の生物種も受注製造アレイで多数用意。
- 8種のフォーマットからお好みのものを選び、カスタムアレイも作成可能。



FDA MAQCプロジェクト



MicroArray Quality Control (MAQC) Project

- 2005年2月にスタートした、マイクロアレイの品質管理を目的としたプロジェクト
- 使用マイクロアレイプラットフォーム：市販マイクロアレイ 6社
- Nature Biotechnologyに5編の論文 (Free Access)

<http://www.nature.com/nbt/focus/maqc/index.html>

Total RNAサンプル

- Stratagene **Universal Human Reference** RNA
Catalog #740000 total RNA from 10 Human Cell Line
- Ambion FirstChoice™ Human **Brain**
Catalog #6050

データおよびサンプル

発現データ :

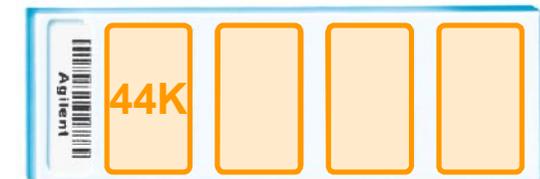
各プラットフォーム: MAQCで公開されたデータ

GEO (GSE5350)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi>



アジレント: 4x44K Whole Human Genome v1
Agilent one color protocol Ver.5



Total RNAサンプル:

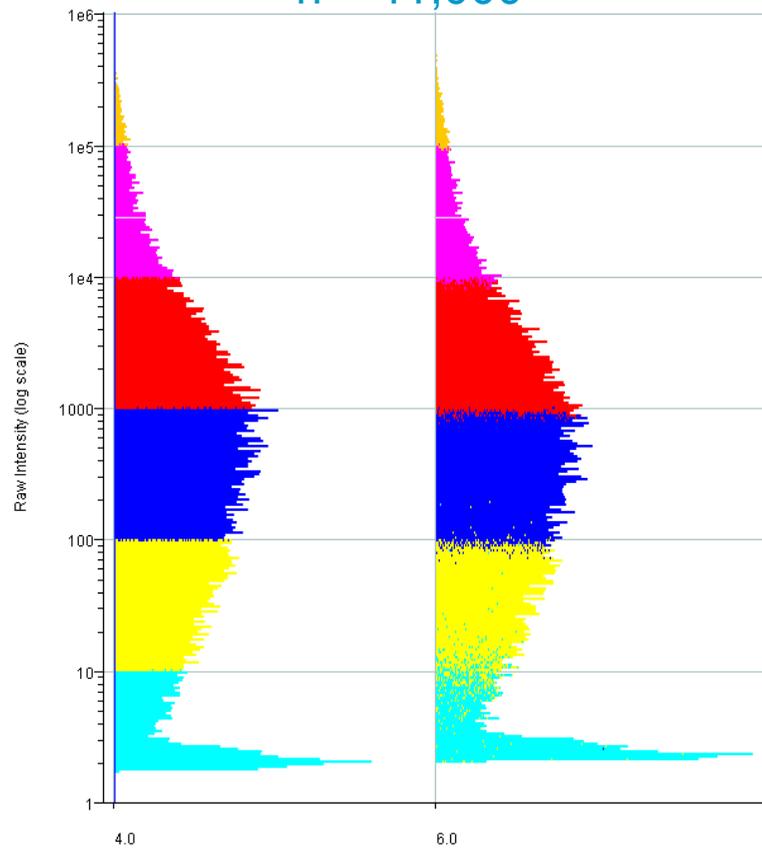
Stratagene Universal Human Reference RNA

Agilent vs. 他メーカーA社

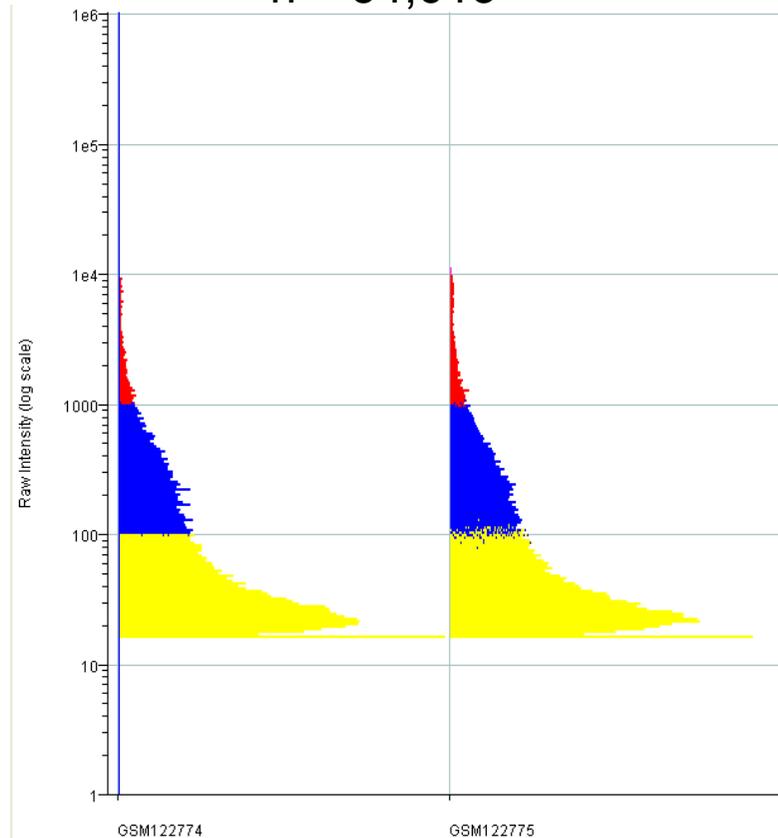
Universal Referenceでのシグナル強度分布の比較

サンプル: Universal Reference 色分けはそれぞれのPlatformに従う

Agilent WHG 4x44K v1
n = 41,000



他メーカー A社
n = 54,613

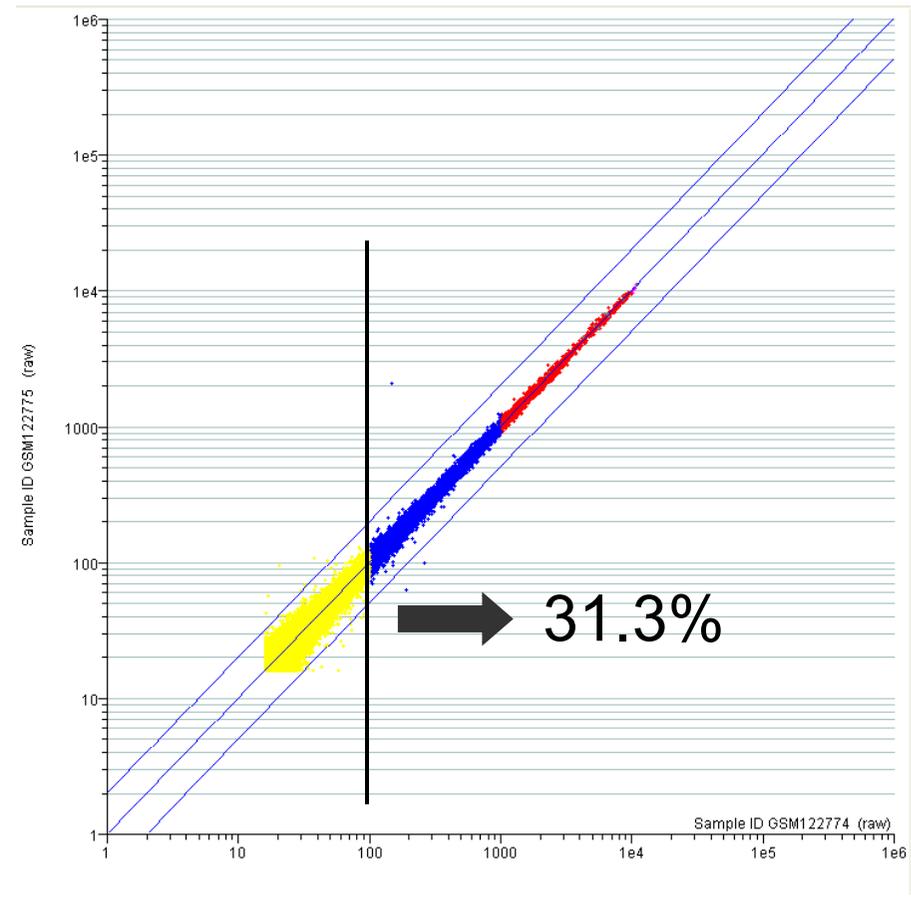
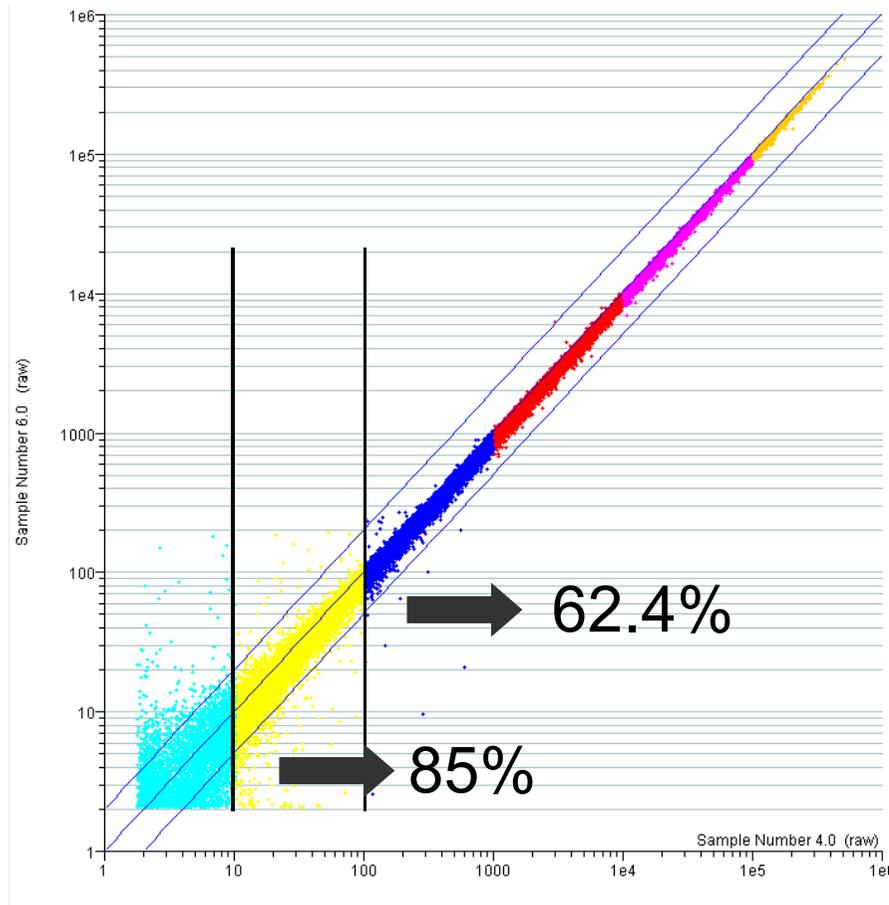


Agilent vs. 他メーカーA社 スキャタープロット

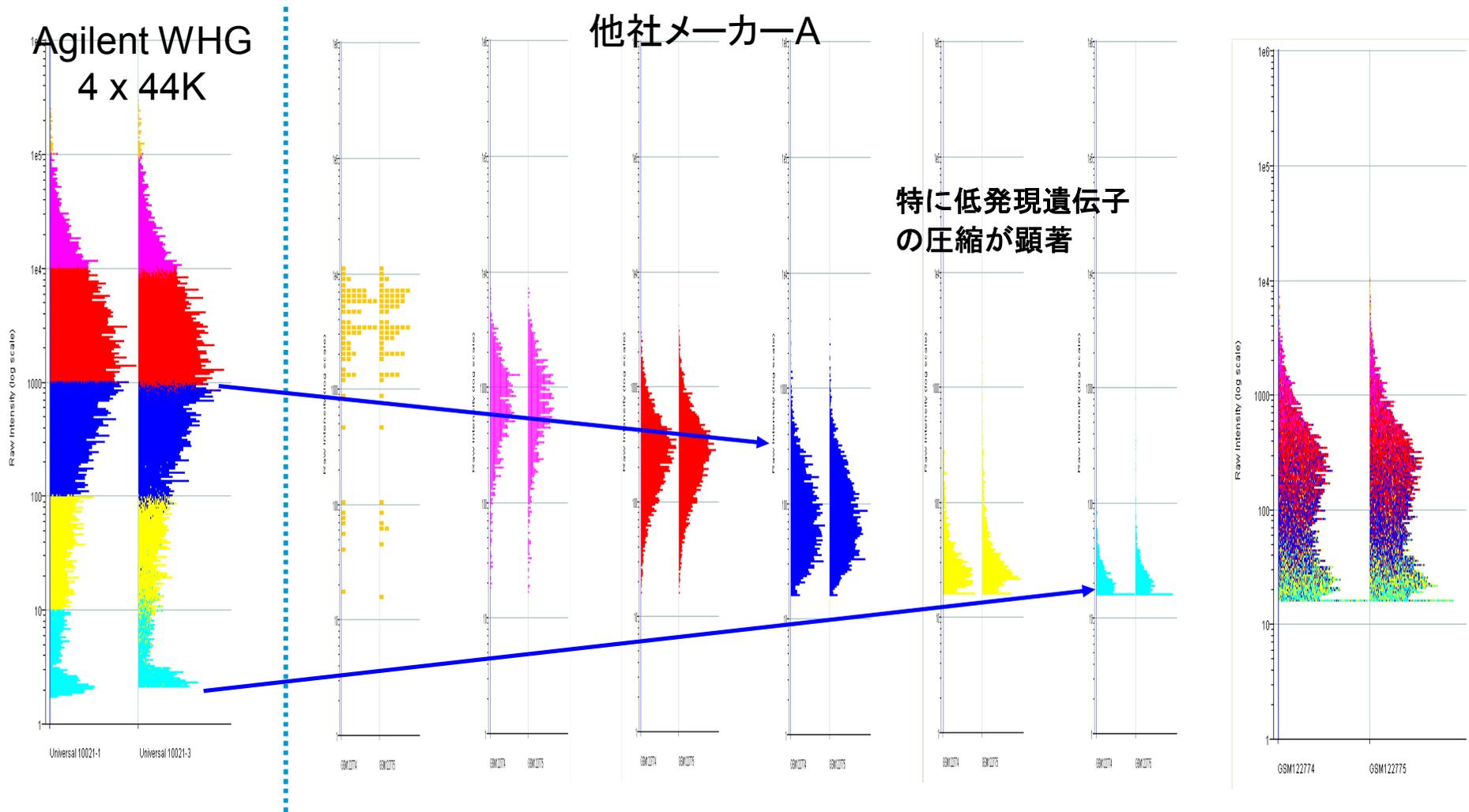
サンプル: Universal Reference 色分けはそれぞれのPlatformに従う

Agilent WHG 4x44K v1
n = 41,000

他メーカー A社
n = 54,613

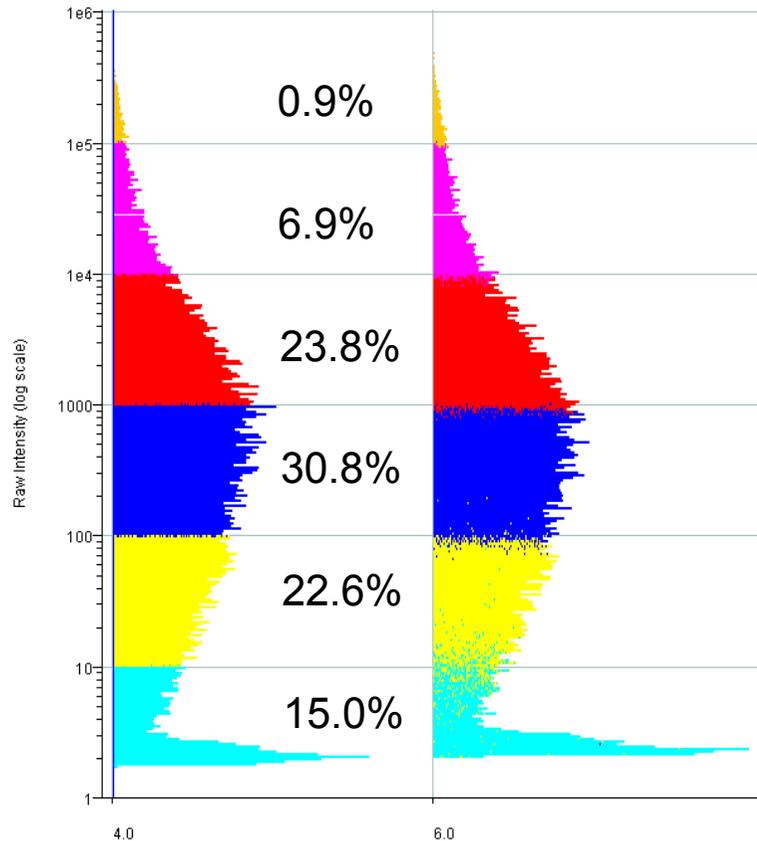


プラットフォーム間共通遺伝子の発現比較 MAQC one-to-one probes (12091 common genes)

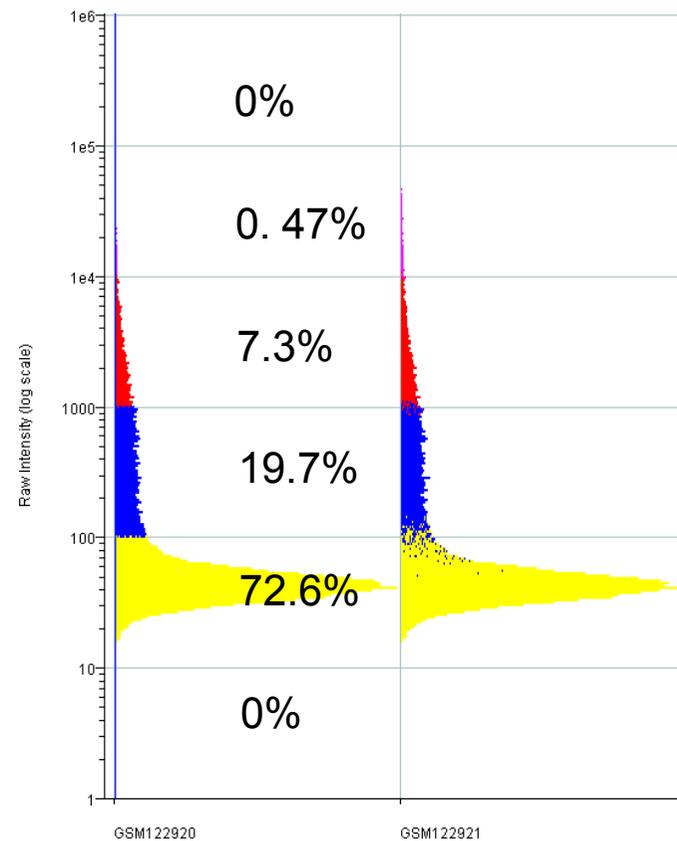


Agilent vs. 他メーカーB社 Universal Referenceでのシグナル強度分布の比較

Agilent WHG 4x44K
n = 41,000



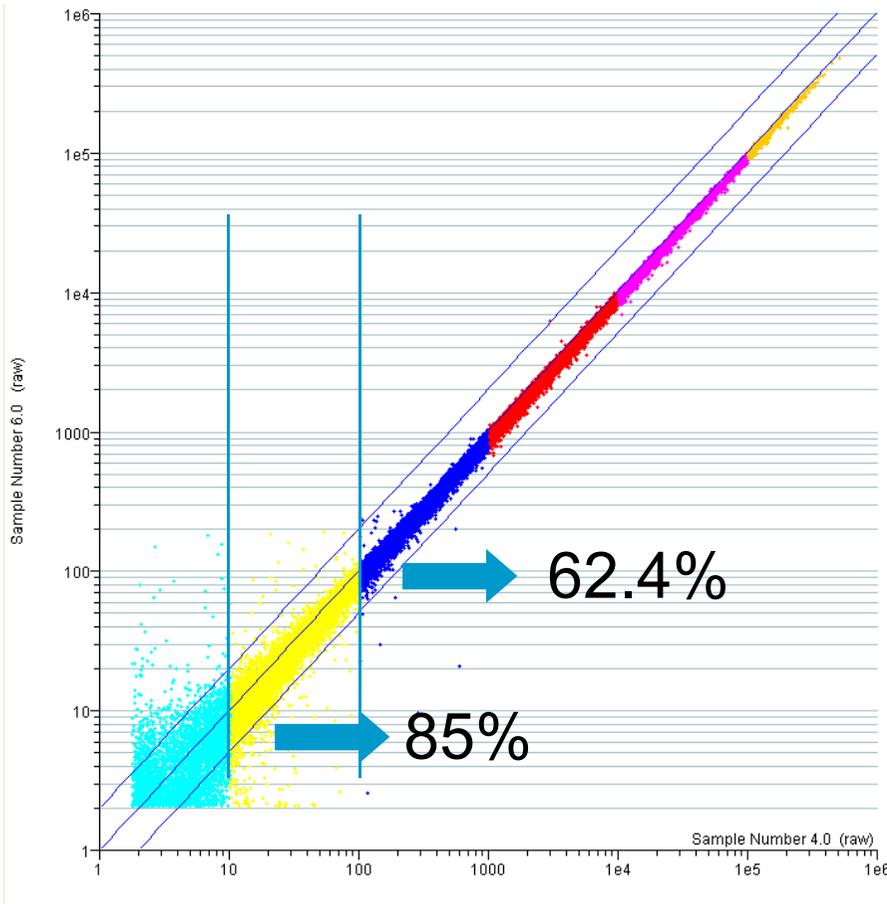
他社メーカーB
n = 47,289



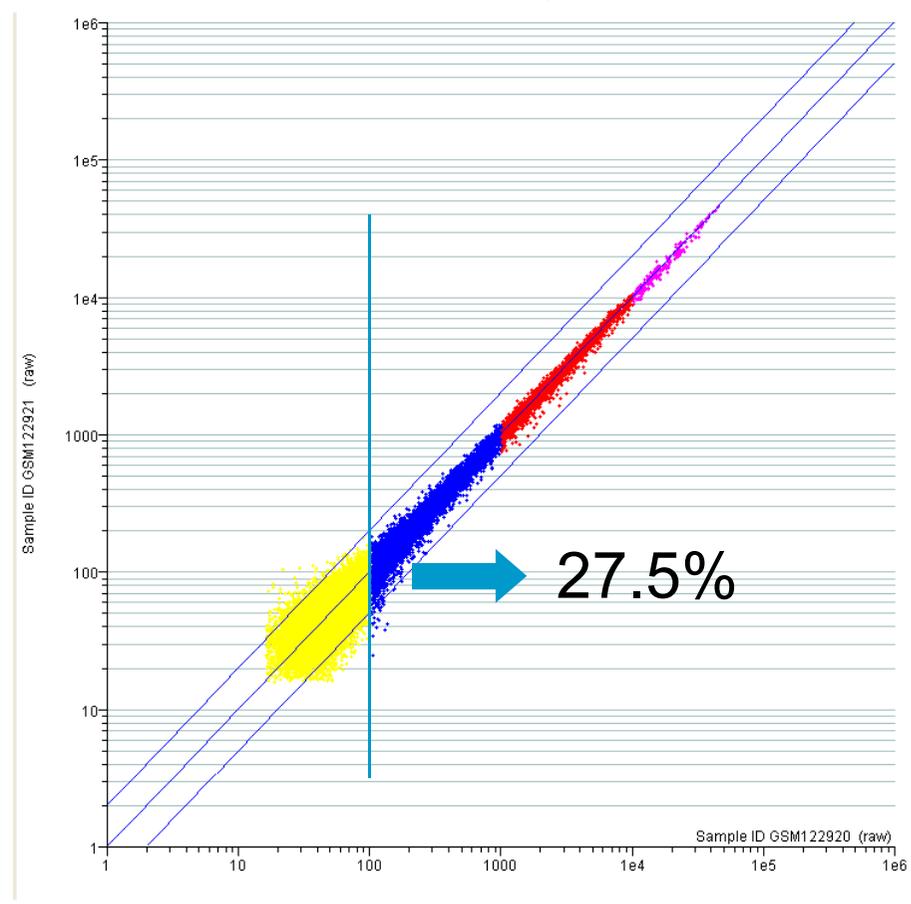
Agilent vs. 他メーカーB社

スキャタープロット

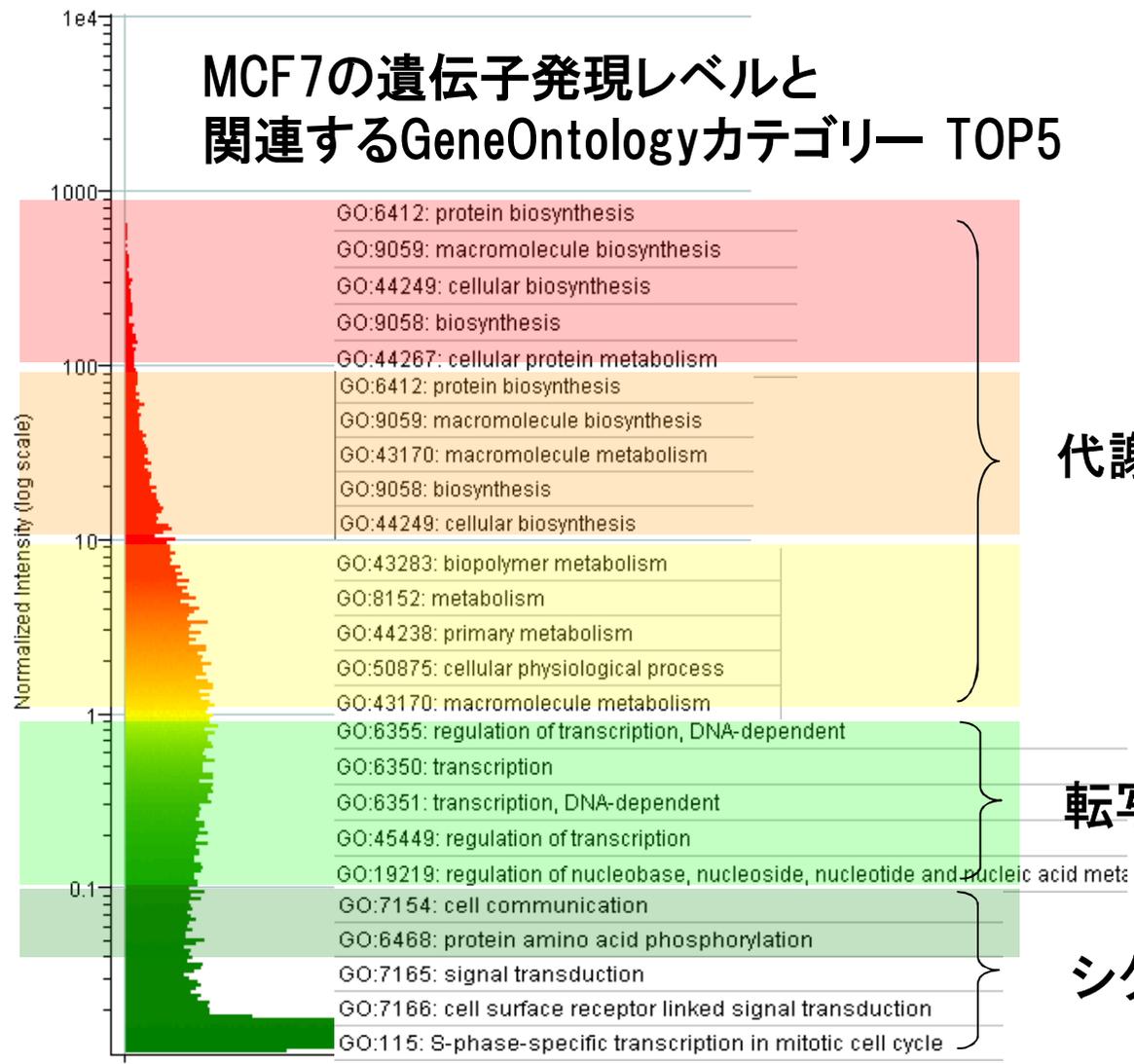
Agilent WHG 4x44K
n = 41,000



他社メーカーB
n = 47,289



アジレント遺伝子発現マイクロアレイの特長



- 5ケタ超にわたるダイナミックレンジ
- 低発現領域をノイズと区別して検出

代謝や生合成関連

転写制御関連

シグナル伝達関連

まとめ –アジレント遺伝子発現アレイデータの特長

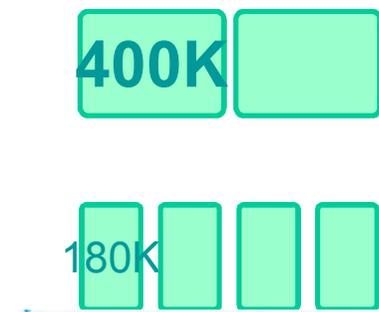
- ・ 5logのダイナミックレンジがあり、低発現遺伝子・高発現遺伝子を網羅的にとらえることが可能。
- ・ 低発現遺伝子とノイズを区別して検出でき、パスウェイ解析に重要な遺伝子を検出できる。
- ・ 低発現遺伝子でも信頼度高く発現差解析が可能。
- ・ 高い再現性があり、信頼の高いデータを得ることができる。
- ・ 低発現遺伝子でもマイクロアレイデータのバリデーションによく用いられる定量PCRとの相関も良好。



アジレント Exon array 新登場！ 遺伝子発現 + Exon 同時解析が可能

Very
NEW!

- 4x180K および、より網羅性の高い 2x400K フォーマット
- Human, Mouse および Rat 対応
- 各 Exon あたり 1 プローブを設計
- 遺伝子発現アレイと共通プローブも搭載
- ランダムプライマーおよびオリゴdTプライマーを用いて逆転写

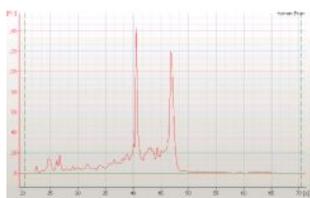
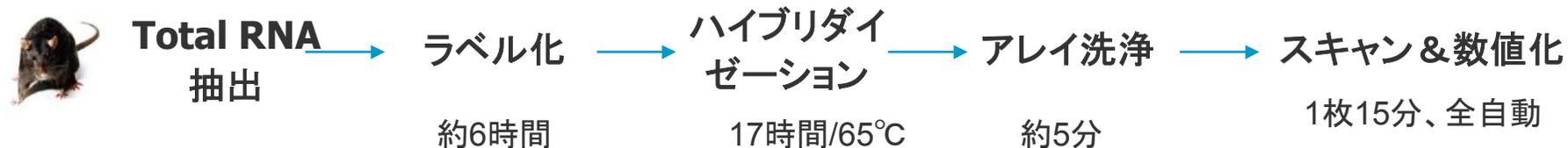


プローブ設計時の参照データベース

Human	Mouse	Rat
<ul style="list-style-type: none"> • Refseq Build 36.3 • Ensembl Release 52 • Unigene Build 216 (April 2009) • mRNA from UCSC (April 2009) 	<ul style="list-style-type: none"> • Refseq Build 37 • Ensembl Release 55 • Unigene Build 176 (April 2009) • mRNA from UCSC (April 2009) 	<ul style="list-style-type: none"> • Refseq Build 36.2 • Ensembl Release 55 • Unigene Build 177 (October 2008) • mRNA from UCSC (January 2009)



アジレントExonアレイ実験フロー



NanoDropで
濃度・純度測定

・**バイオアナライザ**
でRNA品質(RIN)を
チェック



・**LIQA WT kit**

1回の増幅でラベル化
cRNAを調製
totalRNA最低必要量:
25ng(推奨50ng以上)

・**Agilentハイブリダイ
ゼーションキット**
・**ハイブリチャンバ**
・**バスケットスライド**
初めてでも失敗なく
確実にハイブリダイ
ゼーション

・**Agilent GE/miRNA
Wash buffer set**

洗浄液の調製
必要なし。

8枚のスライドグラス
を同時に洗浄可能

・**Agilent スキャナ**
・**Feature Extraction**

全自動スキャン
全自動数値化
QCレポートを自動作成

真核生物用。
1色法および2色法に対応しています。

Low Input Quick Amp WT labeling kit

Very
NEW!

微量スタートが好評なLIQA(Low Input Quick Amp Labeling kit)が
Exonアレイにも対応。

- トランスクリプト全体を逆転写できるよう、WTプライマーを使用
- 遺伝子発現アレイ使用時とほとんど変わらない操作でラベル化可能
- 1色法および2色法に対応
- 最少25ngのtotal RNAからラベル化可能

マイクロアレイフォーマット	最低必要total RNA量
8x60K, 4x180K, 2x400K	25ng (推奨50ng以上)
1x1M	100ng (1色法は50ng)

アジレントExonアレイデータ解析 GeneSpring GX 11.5

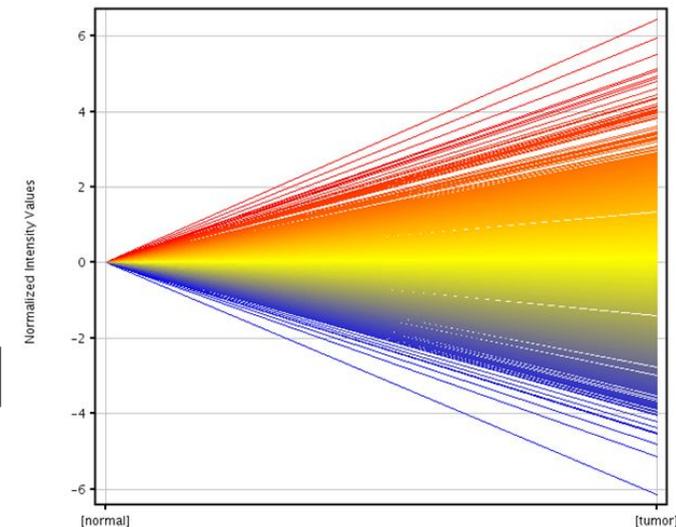
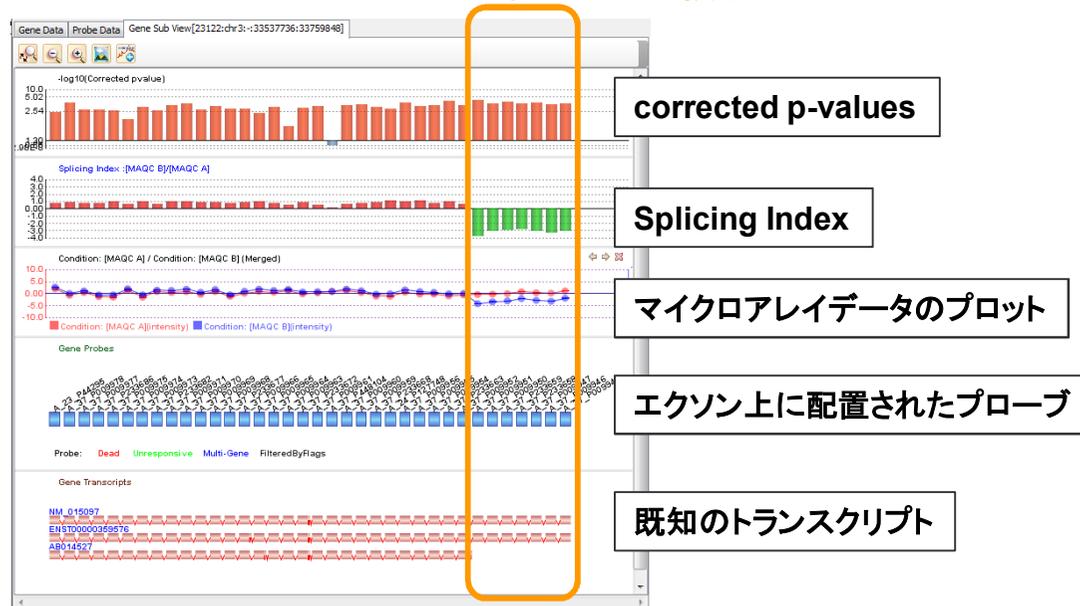
Exonレベルでのフィルター活用

- Splicing index
- Exonレベルでのt-test p-value

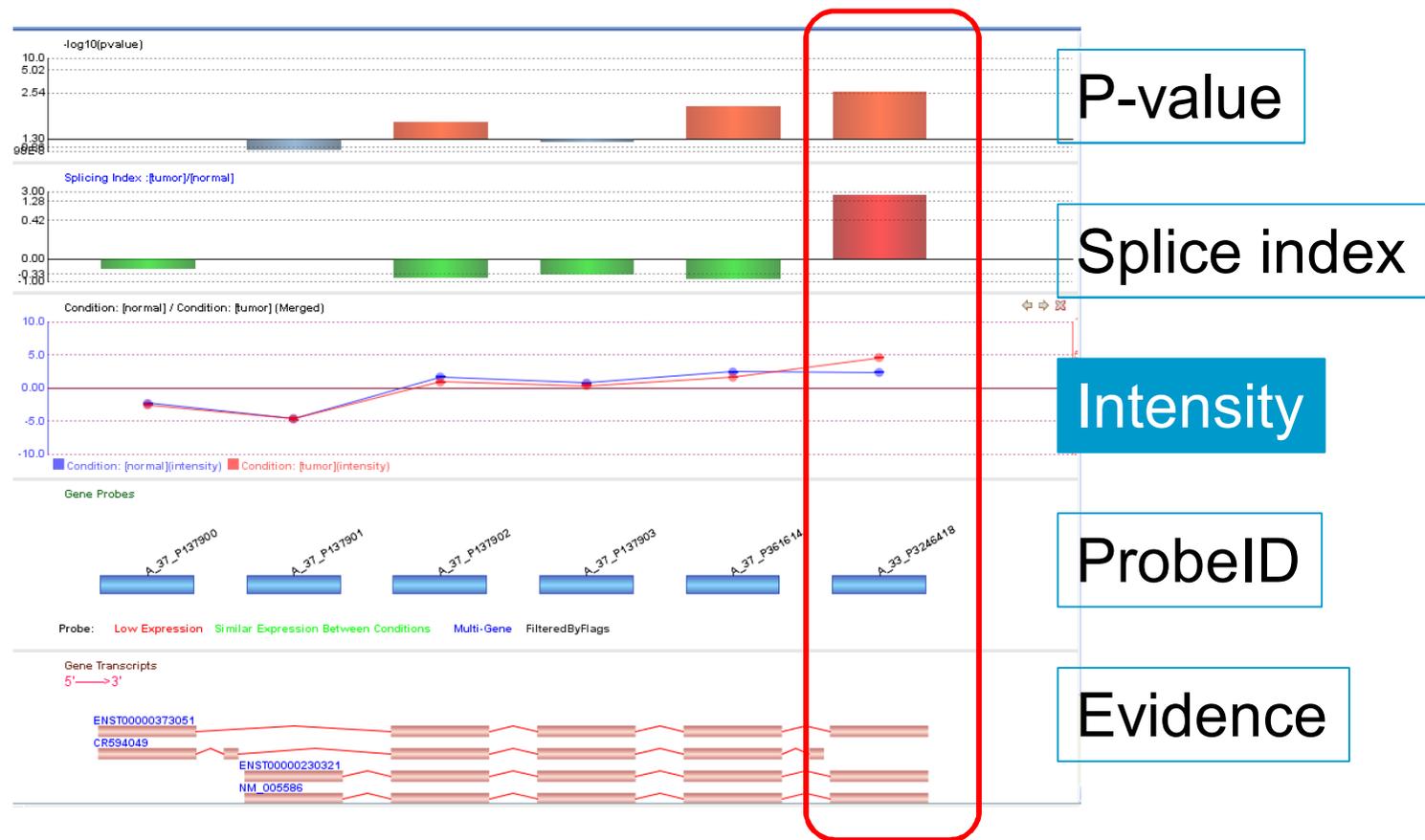
遺伝子レベルの発現差解析

- 統計処理
- Fold change

バリエーションが検出された領域



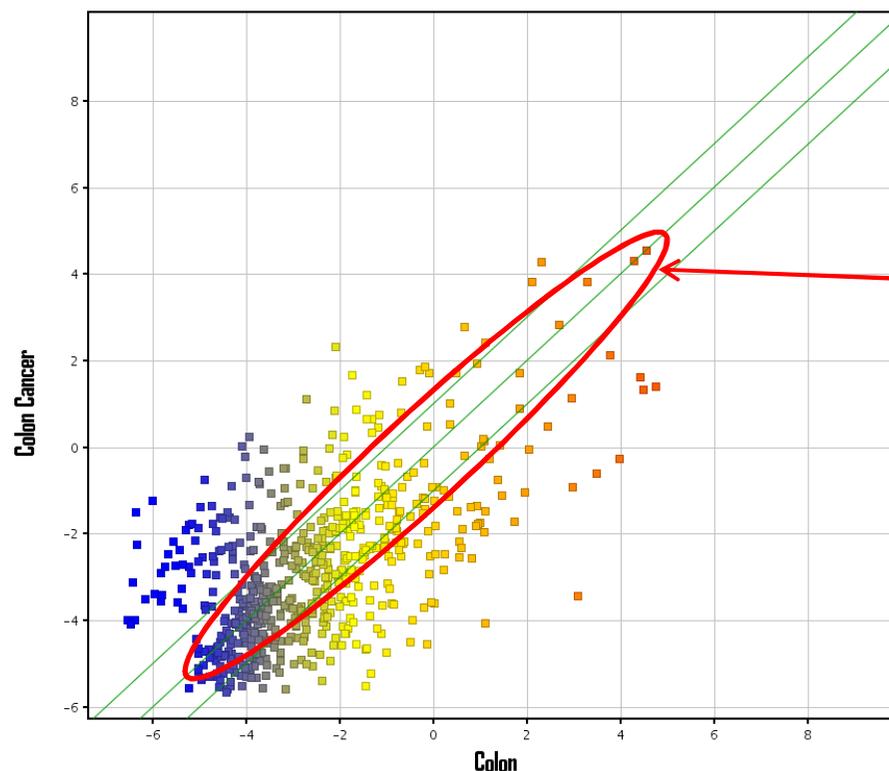
発現差？スプライスバリエント？



検出された遺伝子発現差が、スプライシングの違いであることがある
(遺伝子発現アレイは3'端側の身にプローブが搭載されている)

3'側の解析だけでは把握できない スプライスバリエーションが見えてくる

スプライスバリエーションがある遺伝子の
遺伝子レベルのプロット



2サンプル間で
発現差がない遺伝子

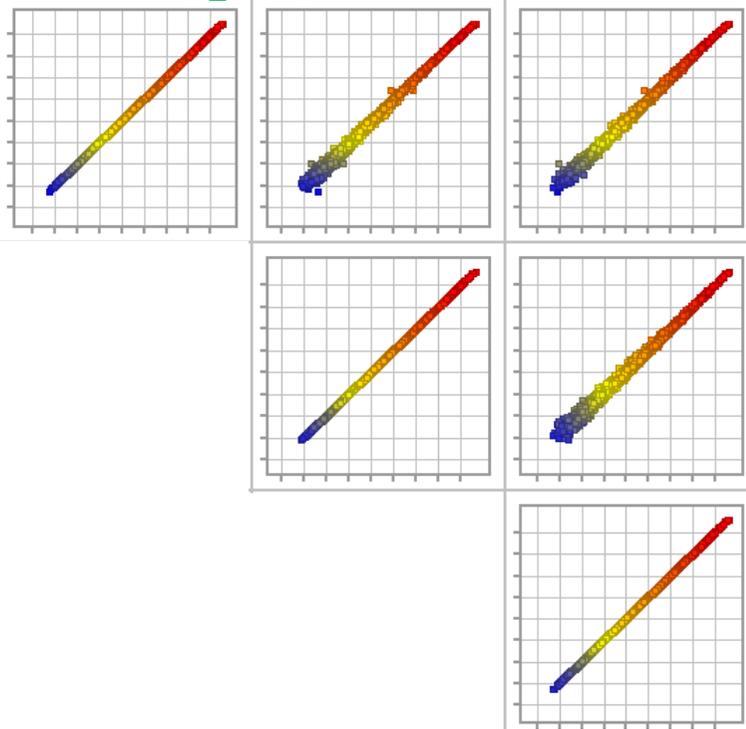
遺伝子発現が変わっていてもエクソンレベルで変わっていることがある

Exonアレイの再現性 -テクニカルレプリケート

SurePrint G3 2x400K

50 ng input

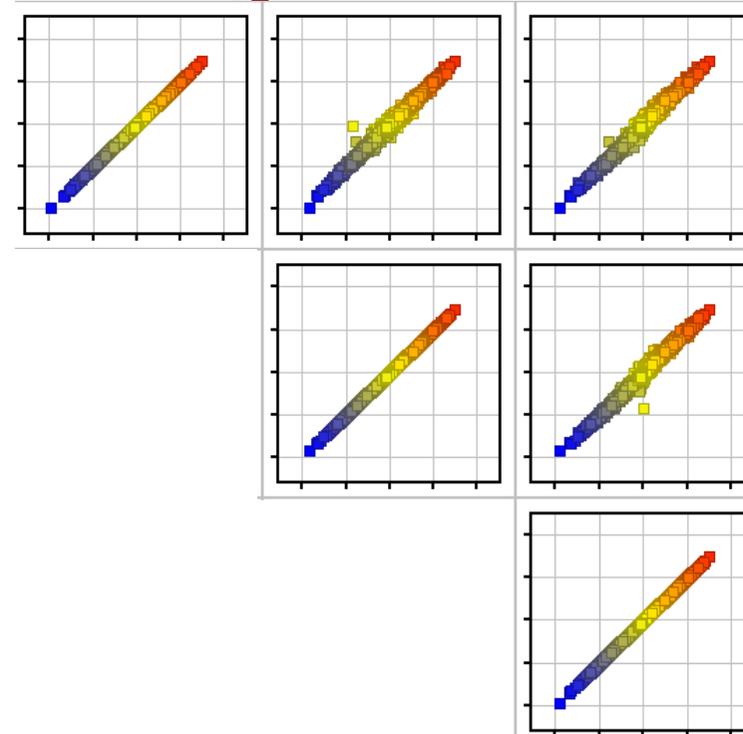
Log₂ Signals, 1-color



SurePrint G3 2x400K

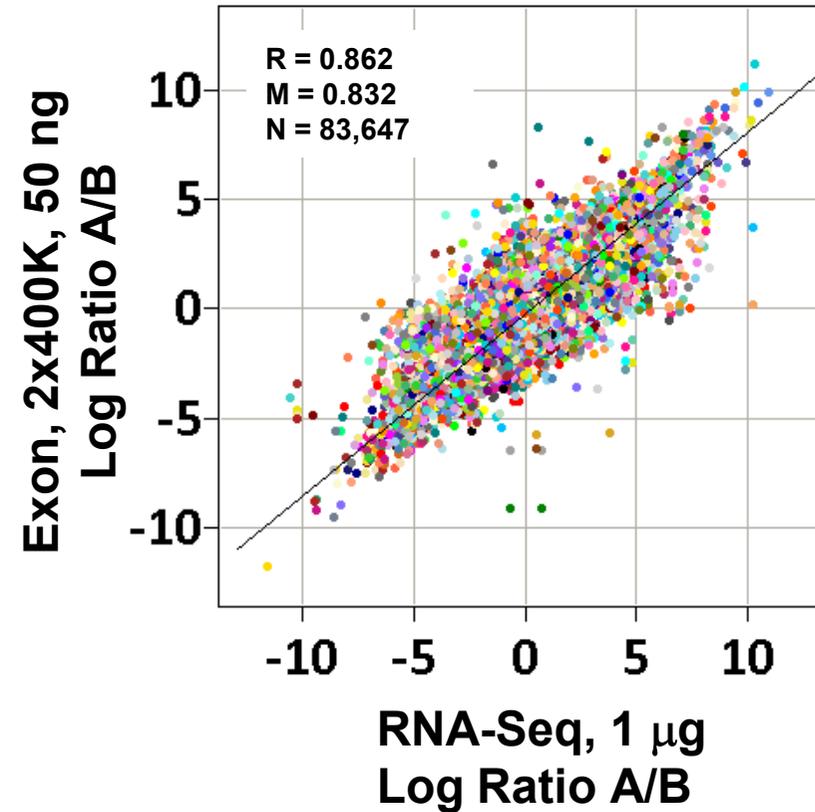
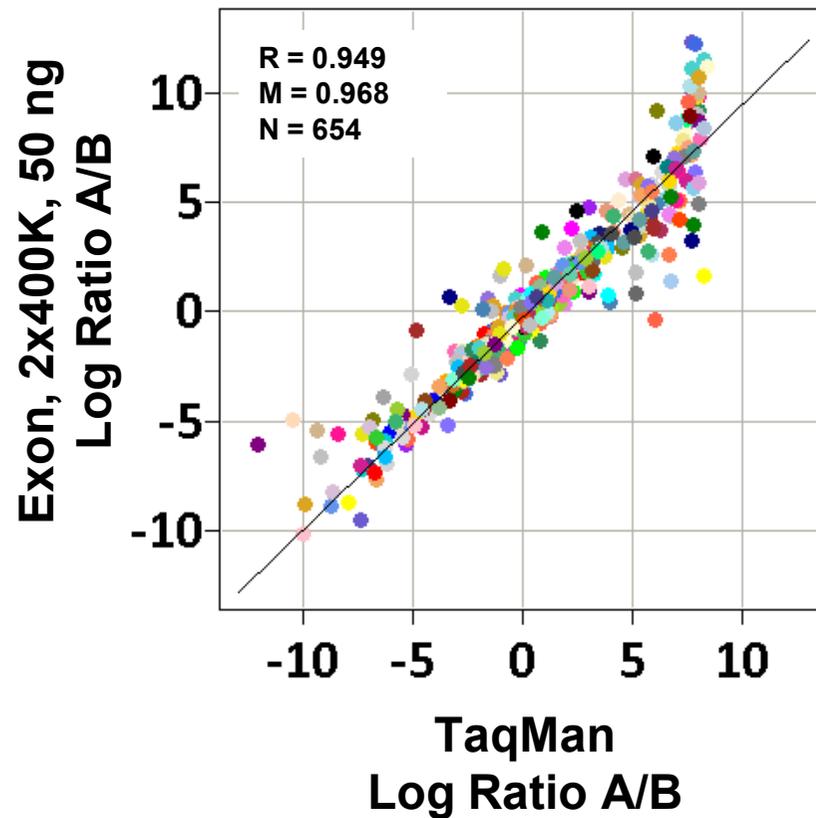
50 ng input

Log₂ Ratios, 2-color



1色法(シグナル強度)、2色法(Ratio)共に高い再現性がある

SurePrint G3 Exon マイクロアレイ



qRT-PCRやRNA-Seqとも高い相関をもつ

アジレントExon マイクロアレイ 4x180Kおよび2x400Kフォーマットの違い

Species	Array Format	Genes Targeted	Exons Probes	Probes from 8x60K	Databases Used for Design
Human	4x180K	20,411	174,458	19,128 (56%)	Refseq Build 36.3, RSNM only*
	2x400K	27,696	233,164	26,873 (78%)	Refseq Build 36.3 Ensembl Release 52 Unigene Build 216 (Apr 2009) GenBank mRNA (Apr 2009)
Mouse	4x180K	23,215	165,984	19,203 (49%)	Refseq Build 37, RSNM only*
	2x400K	33,795	235,714	31,608 (80%)	Refseq Build 37 Ensembl Release 55 Unigene Build 176 (Apr 2009) GenBank mRNA (Apr 2009) RIKEN 3
Rat	4x180K	20,483	160,141	23,444 (50%)	Refseq Build 36.2, RSNM only*
	2x400K	26,276	214,270	31,948 (72%)	Refseq Build 36.2 Ensembl Release 55 Unigene Build 177 (Oct 2008) GenBank mRNA (Jan 2009)

*RSNM:RefseqでAccession IDがNMで始まる遺伝子

2x400Kは4x180Kに比べ、より多くの遺伝子・エクソンをカバー
5'および3'UTRにもプローブを配置/35~60 bのエクソンにもプローブを配置

アジレント遺伝子発現アレイおよびExonアレイの プローブコンテンツ比較

Species	Array Format	Entrez Gene Targets	Exon Probes	lincRNA Targets
Human	GE 8x60K	27,958	∅	7,419
	Exon 4x180K	20,411	174,458	∅
	Exon 2x400K	27,696	233,164	∅
Mouse	GE 8x60K	34,017	∅	4,623
	Exon 4x180K	23,215	165,984	∅
	Exon 2x400K	33,795	235,714	∅
Rat	GE 8x60K	26,930	∅	∅
	Exon 4x180K	20,483	160,141	∅
	Exon 2x400K	26,276	214,270	∅

lincRNAの解析には遺伝子発現アレイ、スプライスバリエーション解析にはExonアレイ

遺伝子発現アレイ・Exonアレイ システムは共通



Non-coding RNAも解析したい: 遺伝子発現マイクロアレイ
スプライスバリエーションを検出したい: Exon マイクロアレイ

まとめ – アジレント Exon マイクロアレイ

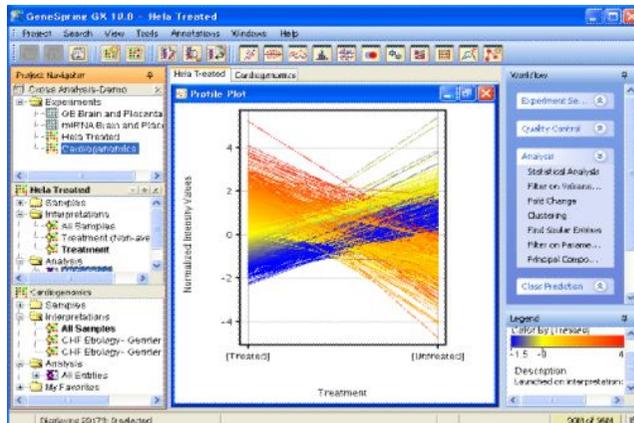
- コストを抑えた4x180Kおよび網羅性の高い2x400Kフォーマット
- Low Input Quick Amp WT labeling kitを用い、トランスクリプト全体を逆転写・増幅およびラベル化
- 遺伝子発現アレイで実現した高感度とダイナミックレンジはそのままにスプライシングバリエーションの解析が可能
- GeneSpring GX 11.5以降を用い、Exonレベルでも遺伝子レベルでも解析可能
- 高い再現性、qRT-PCRおよびRNA-Seqとも高い相関をもつ



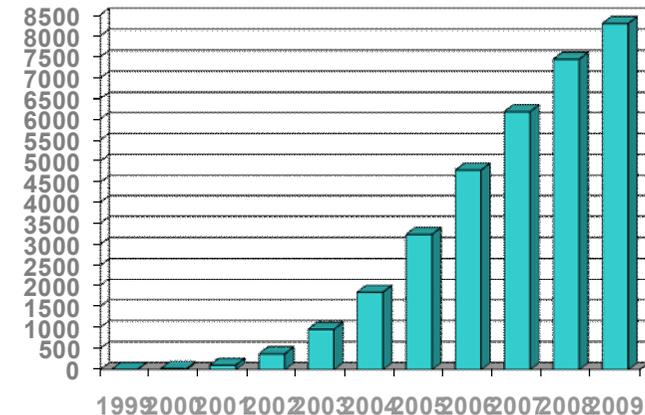
Gene Spring

遺伝子発現データ解析ソフトのゴールドスタンダード

- 遺伝子発現の他、miRNAアレイデータやExonアレイデータ(v11.5以降)も解析可能。
- eArrayで作成したカスタムアレイの情報もeArrayから直接アップデート
- 発現差解析の他、Gene Ontology解析やPathway解析が可能。
- 新しいアノテーション情報をデータベースからアップデート可能。



Google Scholarによる論文数検索(累積論文数)
*検索ワード: "Gene Expression" & "GeneSpring"



GeneSpring

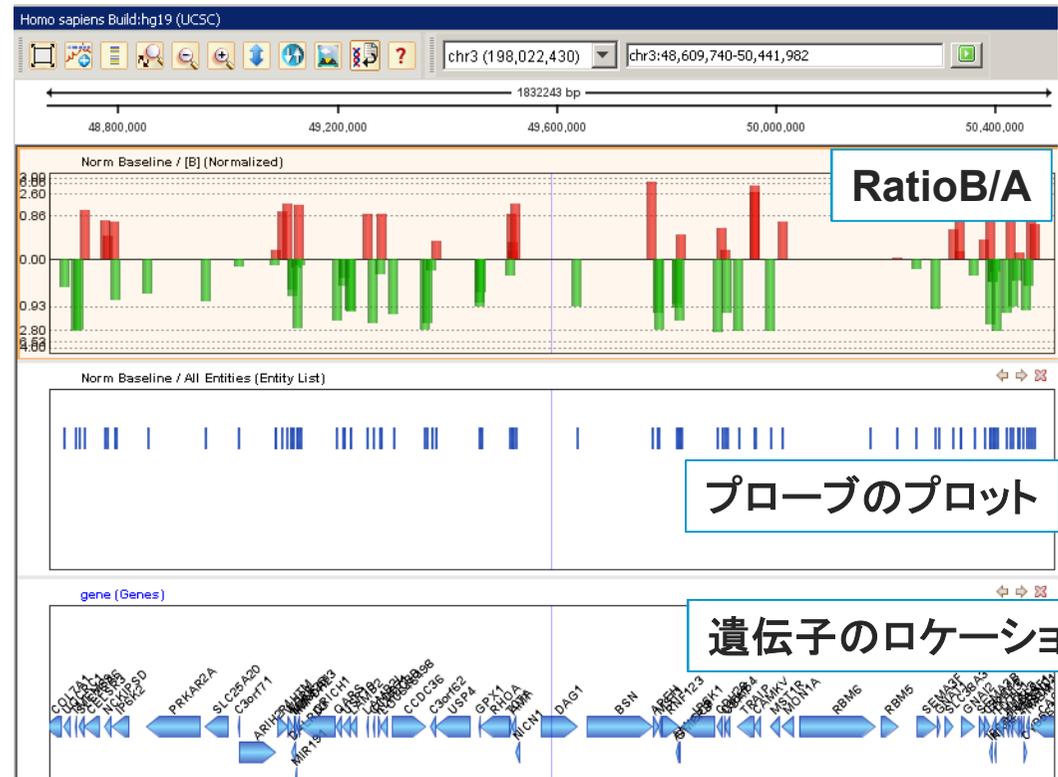
New!

-RNAアレイデータの解析ツール

- アジレントエクソンアレイを解析可能
- 遺伝子発現・miRNA発現などの統合解析が可能
- lincRNA解析に重要なブラウザ機能搭載
- miRNAデータの

解析機能強化

- アノテーションを充実
- ブラウザとの連携強化



GeneSpringを使用した解析例

目的: 筋芽細胞から筋管細胞への分化誘導中の発現変動解析

マイクロアレイ: Whole Mouse Genome 4x44K v1

サンプル: C2C12 cell lineを使用



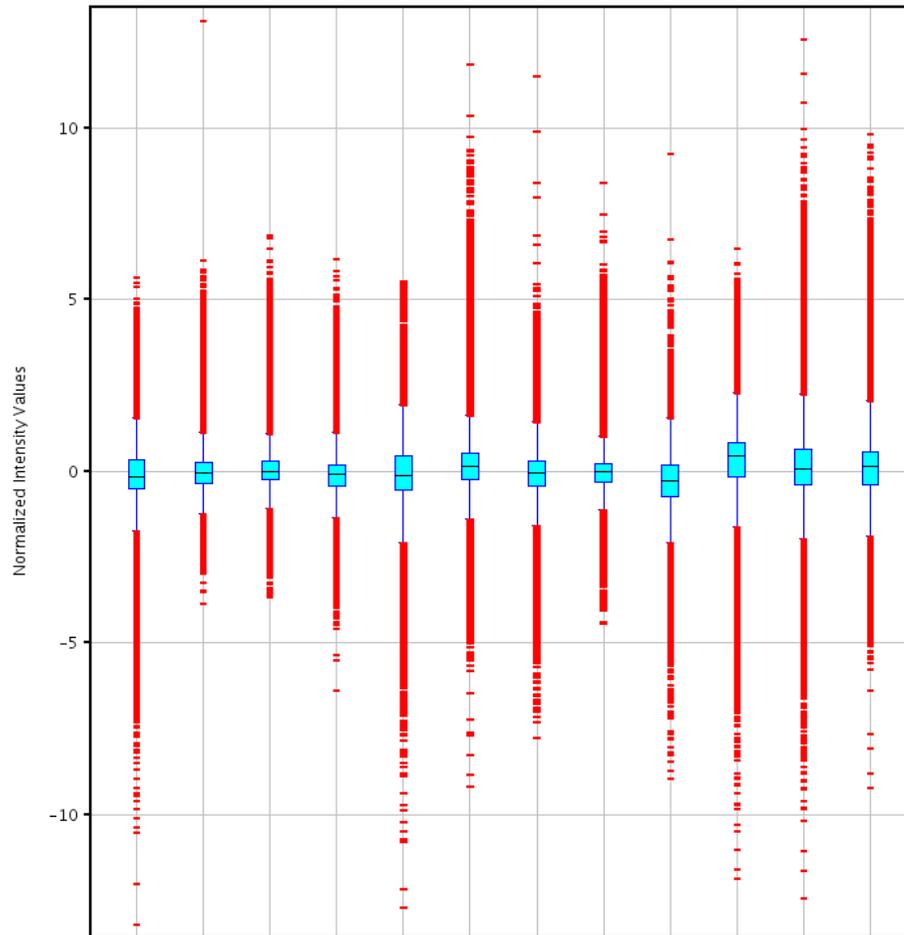
実験デザイン: 各段階でn=3のバイオロジカルトリPLICATE

- Myoblast
- T0(分化誘導後0時間)
- T24(分化誘導後24時間)
- Myotube

GSE19988

GeneSpring を使用した解析例

1. データのインポート

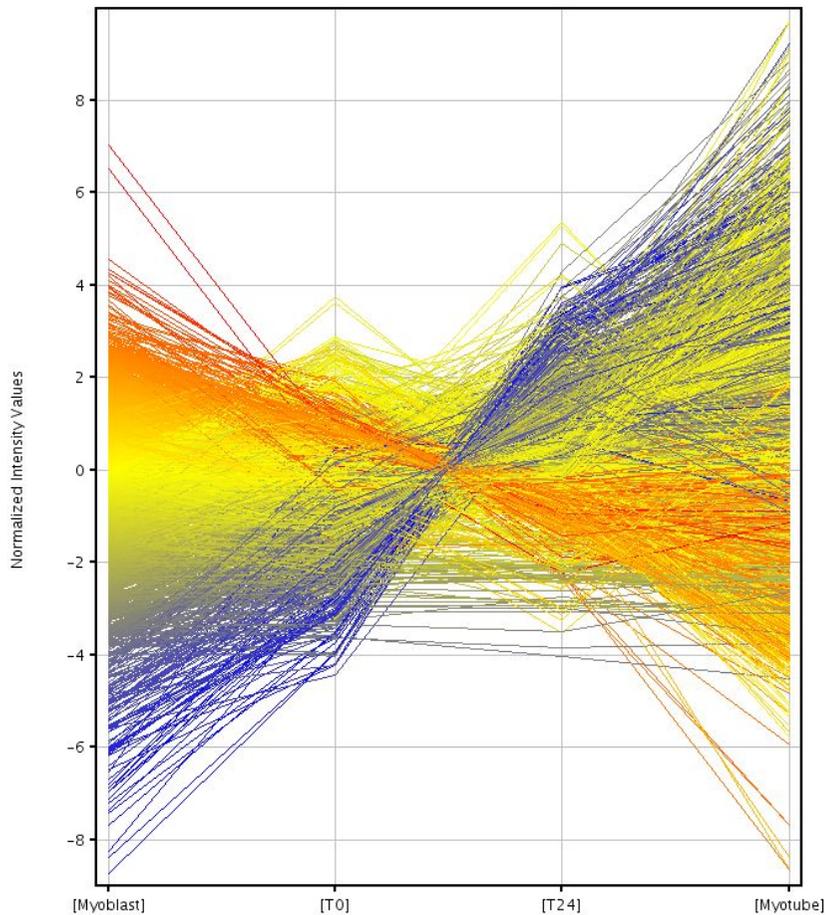


計12アレイデータをインポートした状態

縦軸: 補正後のシグナル強度
各ライン: 1つのアレイデータ

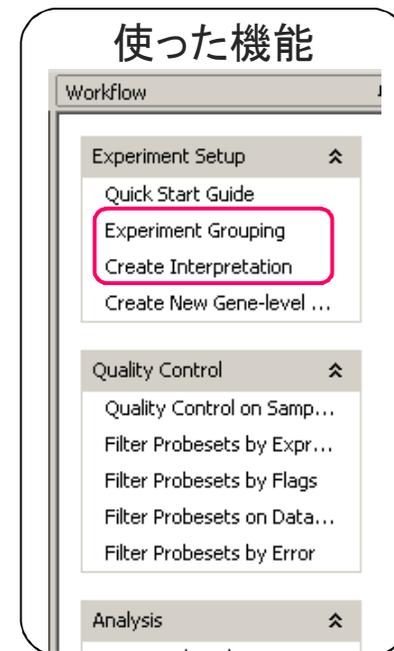
GeneSpring を使用した解析例

2. データのグループ分け



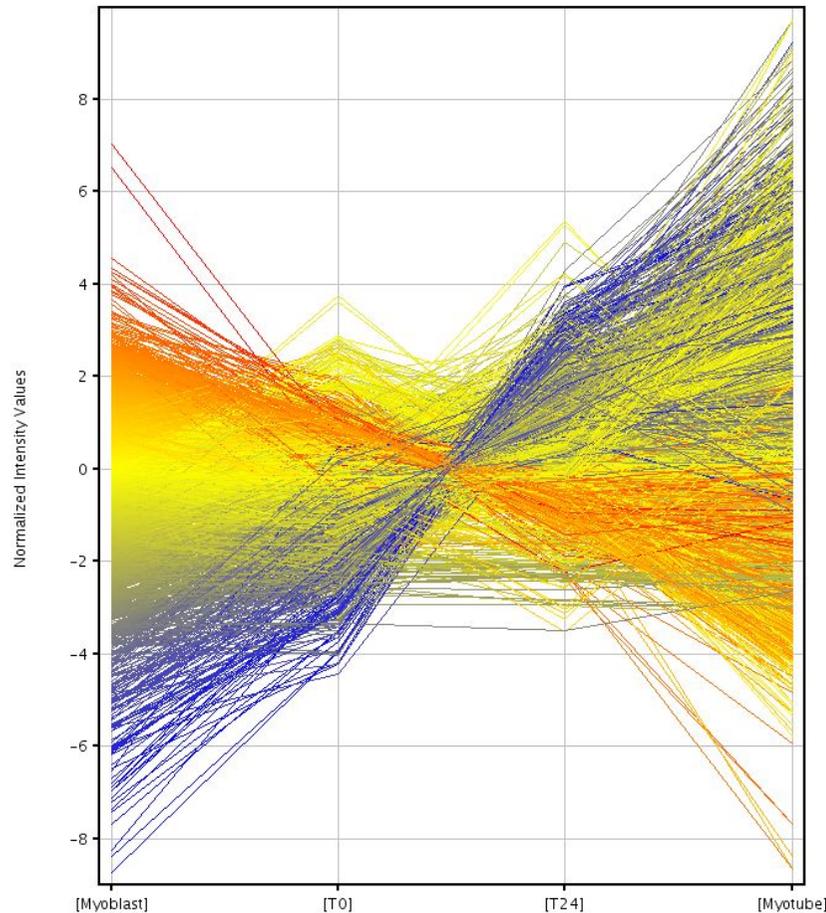
プローブ数: 41,174

- ・4つのグループに分類 (Myoblast, T0, T24, Myotube)
- ・1つの線が1プローブを示す
- ・各グループの値は3アレイデータの平均値



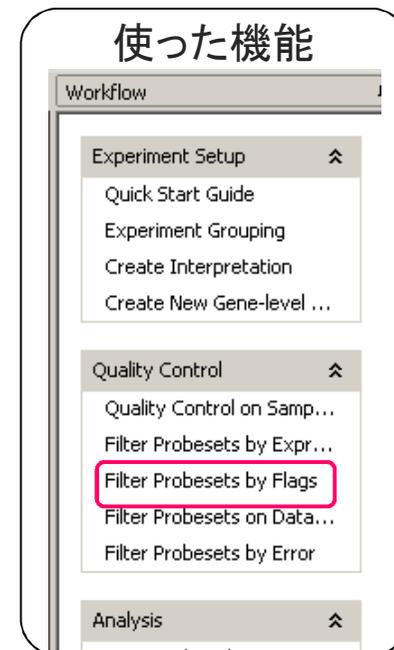
GeneSpring を使用した解析例

3. 発現していない遺伝子などを選別



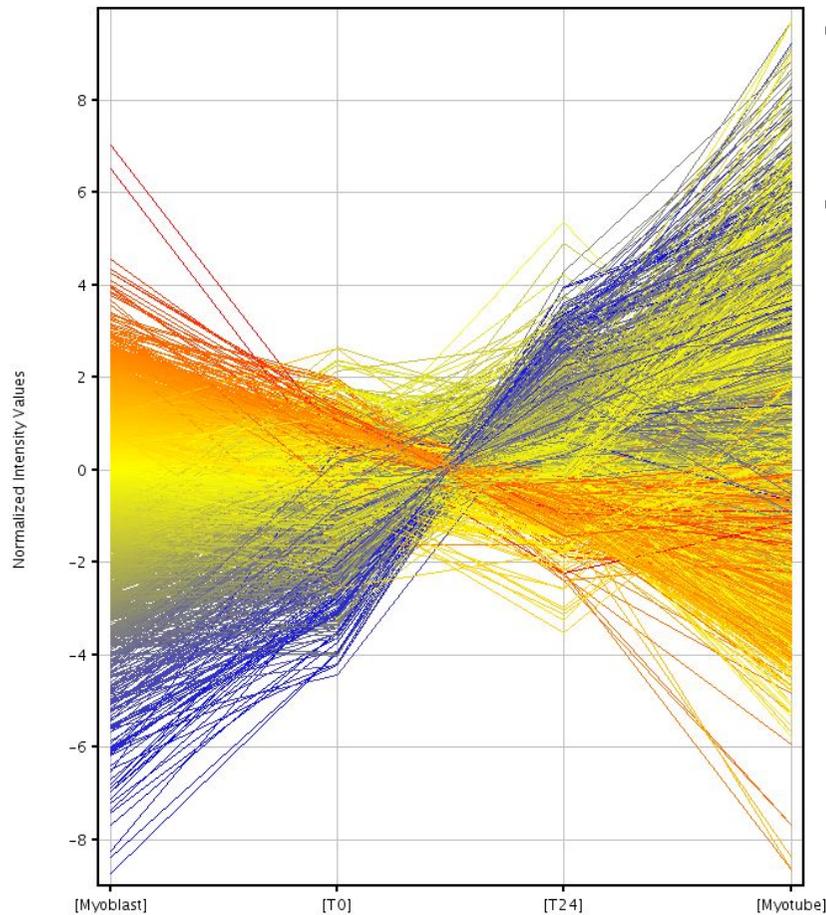
プローブ数: 30,113^{Type}

- ・ 12データ中12データでノイズレベルの遺伝子(発現していない遺伝子)を排除
- ・ 12データ中12データで何らかのフラグが立っている遺伝子(シグナルの信頼度が低い遺伝子)を排除



GeneSpring を使用した解析例

4. 発現差のある遺伝子を抽出



プローブ数: 7,353^{Type}

- ・ Myoblastと比べて、いずれかのグループと2倍以上発現差がある遺伝子を抽出
- ・ 統計解析(ANOVA)でいずれかのグループと有意に差がある遺伝子を抽出

使った機能

Analysis

Statistical Analysis

Filter on Volcano Plot

Fold Change

Clustering

Find Similar Entities

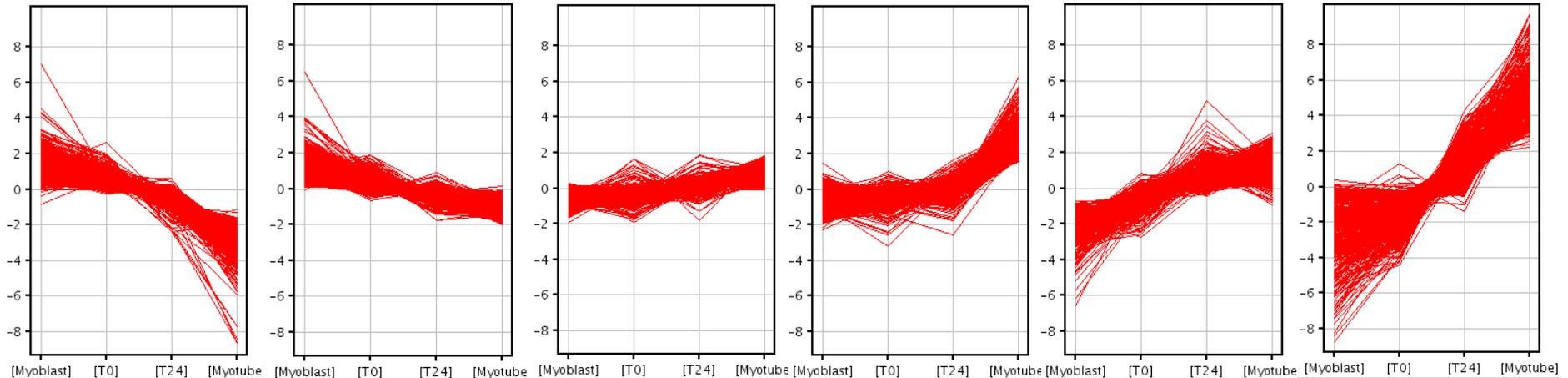
Filter on Parameters

Principal Component An...

※遺伝子の抽出法は複数あります。

GeneSpring を使用した解析例

5. 発現変動パターンをグループ分け



- ・分化するに従って発現が下がる遺伝子、
発現が上がる遺伝子、あまり変わらない遺伝子等に
グループ分け

使った機能

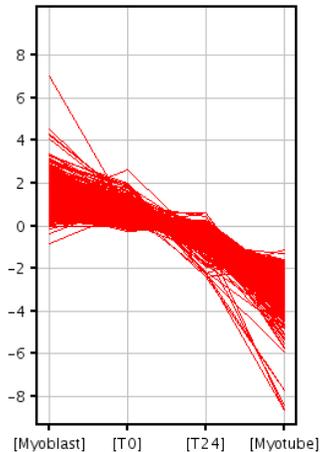
Analysis

- Statistical Analysis
- Filter on Volcano Plot
- Fold Change
- Clustering**
- Find Similar Entities
- Filter on Parameters
- Principal Component An...

※グループ分けの方法は複数あります。

GeneSpring を使用した解析例

6. 各グループの機能解析(Gene Ontology解析)



プローブ数: 698

GO ACCESSION	GO Term
GO:0051301	cell division
GO:0000087	M phase of mitotic cell cycle
GO:0022402	cell cycle process
GO:0048285	organelle fission
GO:0022403	cell cycle phase
GO:0000280	nuclear division
GO:0007049	cell cycle
GO:0000279	M phase
GO:0000278	mitotic cell cycle
GO:0007067	mitosis
GO:0005694	chromosome
GO:0044427	chromosomal part
GO:0000775	chromosome, centromeric region
GO:0006996	organelle organization
GO:0043232	intracellular non-membrane-bounded orga...

- ・分化するに従って顕著に発現が下がる遺伝子もつ機能をリスト化。

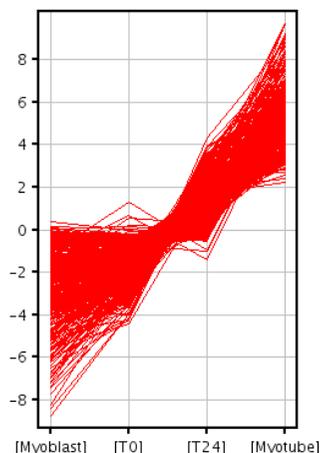
使った機能

Results Interpretations ^

- GO Analysis
- GSEA
- GSA
- Pathway Analysis
- Find Similar Entity Lists
- Find Significant Pathways
- Launch IPA
- Import IPA Entity List
- Extract Relations via NLP
- MeSH Pathway Builder

GeneSpring を使用した解析例

6. 各グループの機能解析(Gene Ontology解析)



プローブ数: 407

GO ACCESSION	GO Term
GO:0043292	contractile fiber
GO:0030016	myofibril
GO:0044449	contractile fiber part
GO:0030017	sarcomere
GO:0015629	actin cytoskeleton
GO:0006936	muscle contraction
GO:0016459	myosin complex
GO:0003012	muscle system process
GO:0031674	I band
GO:0008092	cytoskeletal protein binding
GO:0005856	cytoskeleton
GO:0016529 G...	sarcoplasmic reticulum
GO:0060537	muscle tissue development
GO:0007517	muscle organ development
GO:0014706	striated muscle tissue development

- ・分化するに従って顕著に発現が上がる遺伝子をもつ機能をリスト化。

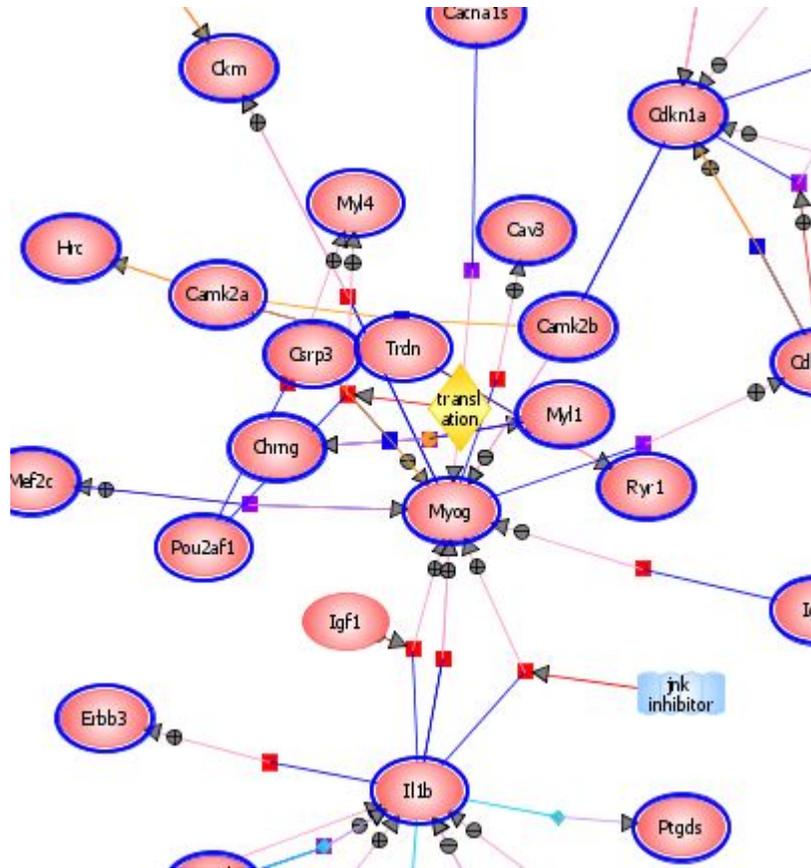
使った機能

Results Interpretations ^

- GO Analysis
- GSEA
- GSA
- Pathway Analysis
- Find Similar Entity Lists
- Find Significant Pathways
- Launch IPA
- Import IPA Entity List
- Extract Relations via NLP
- MeSH Pathway Builder

GeneSpring を使用した解析例

7. Pathway解析



・分化するに従って、に発現が上がる遺伝子が、お互いにどのような関係にあるか？

使った機能

Results Interpretations ^

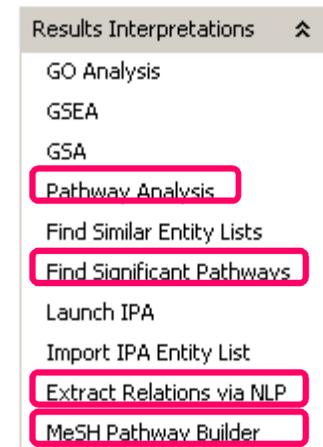
- GO Analysis
- GSEA
- GSA
- Pathway Analysis**
- Find Similar Entity Lists
- Find Significant Pathways
- Launch IPA
- Import IPA Entity List
- Extract Relations via NLP
- MeSH Pathway Builder

GeneSpring Pathway解析手法

•抽出した各遺伝子がどのような関係でつながっているのか？
→Pathway Analysis

•抽出した遺伝子群が、既存のどのPathwayと関連があるのか？
→Find Significance Pathways

•論文のキーワードをもとに構築されたPathwayと関連があるか？
→NLP, Mesh



マイクロアレイ実験を成功させるために アジレントのサポート体制

•各種トレーニング

アジレント八王子ラボにて実施

遺伝子発現 操作実習トレーニング

2日間 月1~2回
有償、ただしアレイ購入者は無料

アレイCGH、miRNAアレイ 操作実習トレーニング

2日間 隔月
有償、ただしアレイ購入者は無料

ラベル化からハイブリ、スキャン、基本的なデータ解析まで実際のサンプルを使用した実習です。

トミーデジタルバイオロジー 上野オフィスにて実施

GeneSpring GX Q&Aセッション

半日 定期開催 無料

GeneSpring GX Presentation

半日 定期開催 無料

GeneSpring GX Middle

1日 定期開催 有償

GeneSpring GX Advanced

半日 定期開催 有償

•サポートメールニュース:アジレントマイクロアレイユーザー対象に配信



まとめ ー遺伝子発現マイクロアレイ

5logのダイナミックレンジ・高い再現性

低発現遺伝子もノイズと区別して検出

スループットが高い8x60Kフォーマット

最少10ngのtotal RNAからラベル化可能

簡便なプロトコルでどなたでもすぐに実験可能

2009年の情報をもとにプローブを設計し、lincRNAも搭載

遺伝子発現の他、Exonアレイもリリース

