

マイクロアレイ実験  
サンプル調整・データQC  
に関する注意事項



# 内容

## 1. サンプル抽出と品質チェック

—mRNA / miRNA / gDNA

## 2. アジレントアレイ 実験のポイント

## 3. アレイデータの品質チェックと性能評価法

— アジレントQCレポートとGX9の活用法

# 1. サンプル抽出と品質チェック

- サンプル抽出法の選択

- 抽出サンプルの確認法

- サンプル品質のアレイデータへの影響

## サンプル抽出方法の選択

- 本当に必要な物質が取れて、不要なもの除去できる方法ですか？
- 比較対象サンプル群で、抽出方法は統一されていますか？

# サンプル抽出方法の選択

## Agilentで実績のある核酸抽出法

### aCGH用gDNA

- Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (69504または69506)


### miRNAアレイ用Total RNA

- Invitrogen TRIzol Reagent (15596-026)
- Qiagen miRNeasy Mini kit (217004)
- Applied Biosystem mirVana RNA Isolation kit (AM1560)

※Total RNAの抽出プロトコールを使用し、  
small RNAの濃縮、精製は行わないで下さい

# サンプル抽出方法の選択

## ULSラベル化aCGH用プロトコル



**Agilent  
Oligonucleotide  
Array-Based CGH for  
Genomic DNA Analysis  
(ULS Labeling for Blood,  
Cells, Tissues or FFPE)**

**Protocol**

Version 2.0, February 2008

血液・培養細胞・組織・  
FFPEサンプルに対応した  
DNA抽出法までカバー

# 核酸濃度・純度の確認

## UV吸光度測定

測定する波長: 230nm, 260nm, 280nm, 320nm

- **A230**      様々なコンタミネーションの確認
- **A260**      核酸濃度測定  
1 = 40 ug/ml (RNA) ・ 1 = 50 ug/ml (DNA)
- **A280**      タンパク質、フェノールの混入を確認  
 $A260/A280 = 1.8 \sim 2.0$   
1.8 以下 : タンパク質、フェノールの混入  
2.0 以上 : その他の混入
- **A320**      異常な吸光がないか確認  
粒子等の混入

# 核酸濃度・純度の確認

## RNAのUV吸収スペクトル

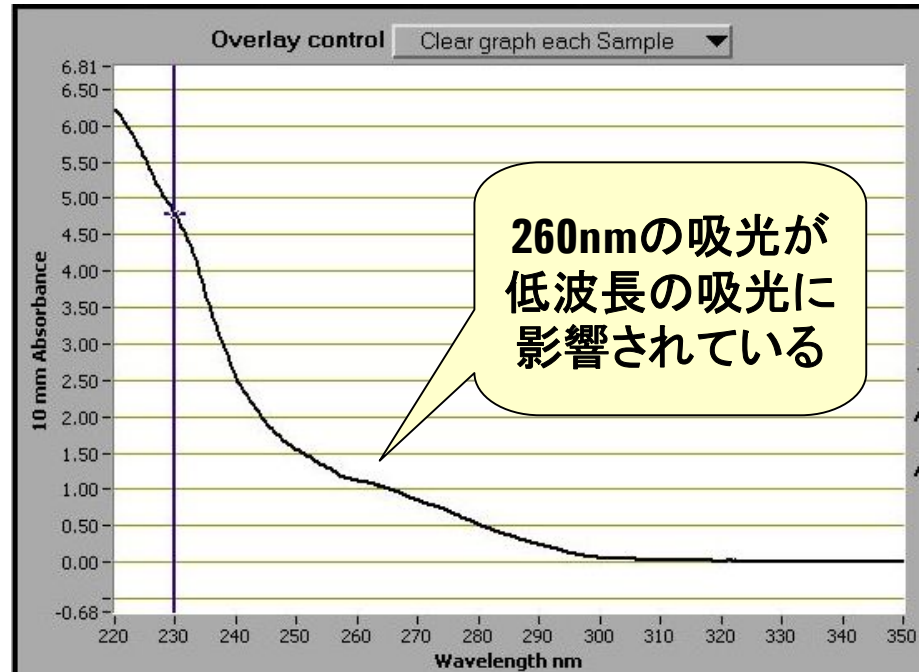
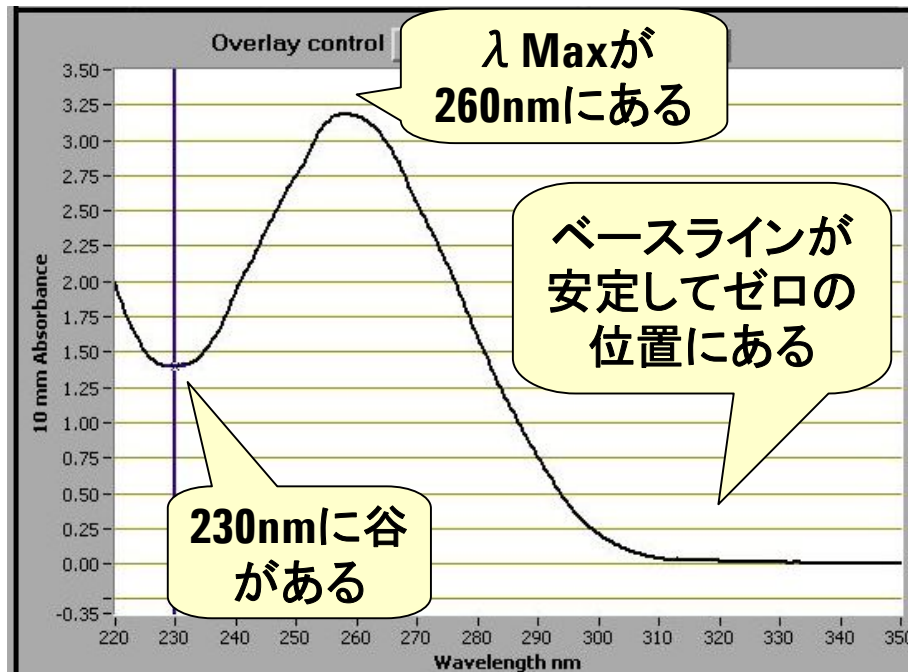
### チェック項目

#### 純度の高いRNA

260/280	1.9
260/230	2.3

#### 純度の低いRNA

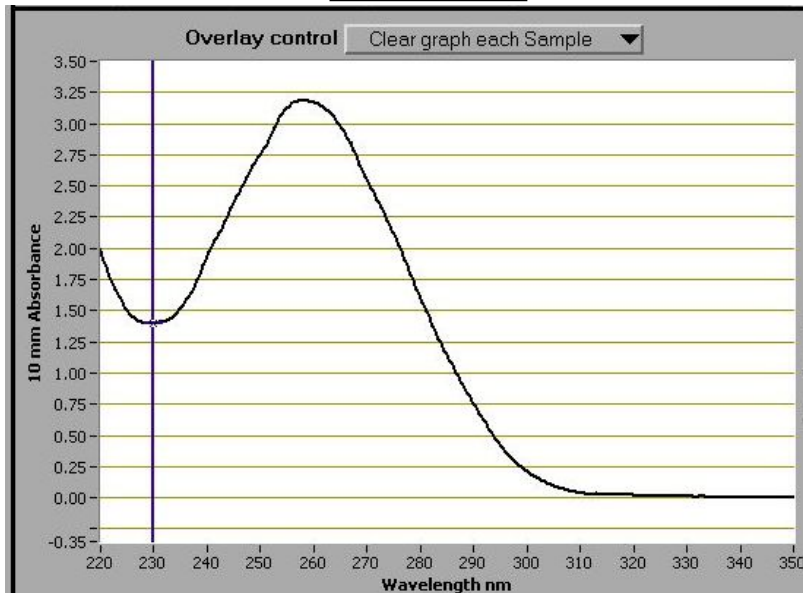
260/280	2.1
260/230	0.2



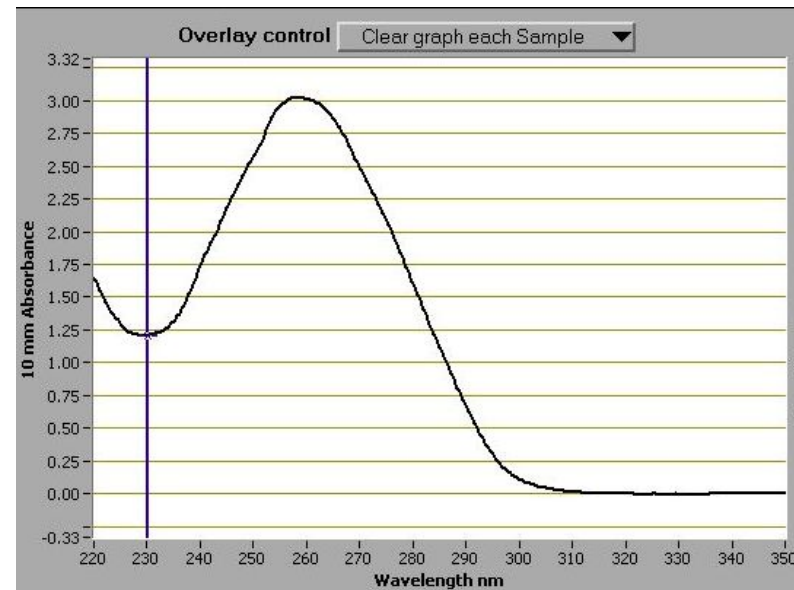
# 核酸濃度・純度の確認

## RNAとDNAのUV吸収スペクトル

**RNA**



**DNA**



UV吸収だけでは、RNAとDNAは区別して検出できません！

# 核酸濃度・純度の確認

## 選択的な核酸の検出方法

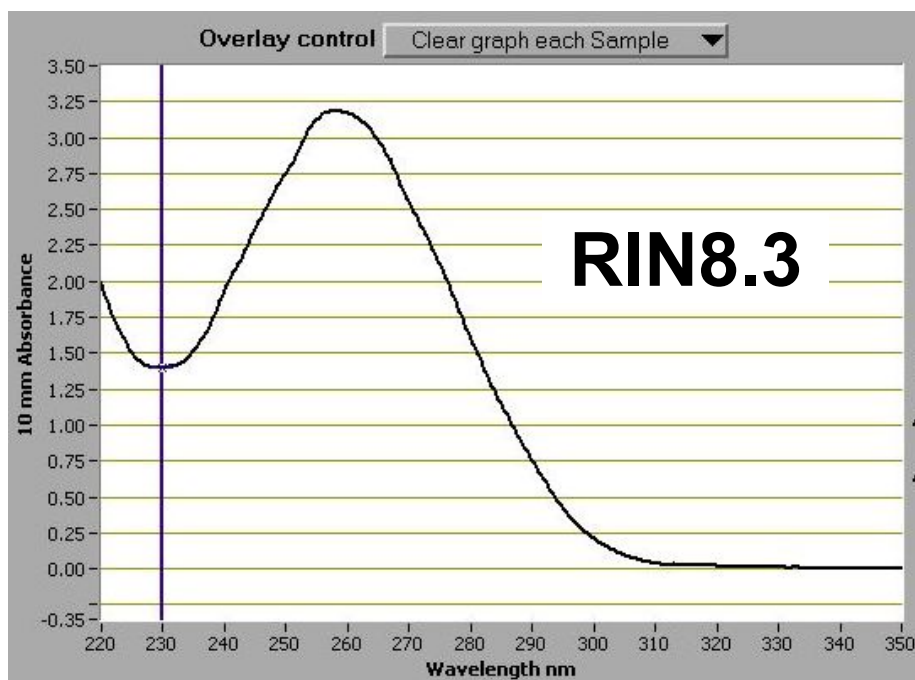
gDNAを定量する場合、**Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit**などの二本鎖DNA選択的検出法を使うと、RNAのコンタミネーションのDNA定量値への影響を軽減することができます

Sample	Intactness	ND-1000 readings (ng/ $\mu$ L)	PicoGreen readings (ng/ $\mu$ L)
Male	Good	109	139
HCT-116	Good	364	338
KG-1	Partially degraded	110	46
Detroit 529 Fibroblast	Severely degraded	241	102

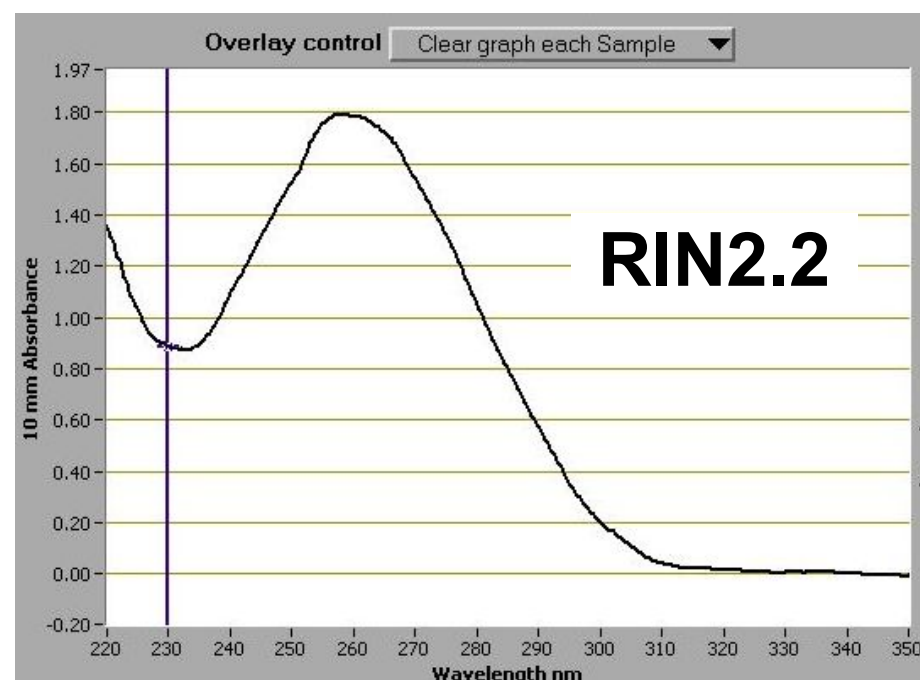
※分解が進んだDNAを定量する際  
二本鎖DNAの濃度を正確に測れない傾向がある

# Total RNAの分解度合いの確認

## 分解されていないTotal RNA



## 分解の進んだTotal RNA



吸光度は、核酸の分解具合についての情報を持ちません！

➡ 電気泳動による長さのチェックが必須

# BioanalyzerによるTotal RNAの分解度合いの確認

## Bioanalyzerを使ったのワークフロー

### 1. サンプルアプライ



- 1 チップ調製とサンプルアプライ (5分)
- 2 12/11サンプルの分析 (30分)
- 3 データの定性・定量

### 2. 分析開始



### 3. データ解析



Exchangeable cartridge  
for electrophoresis

16 pin electrodes  
connected to High Voltage source

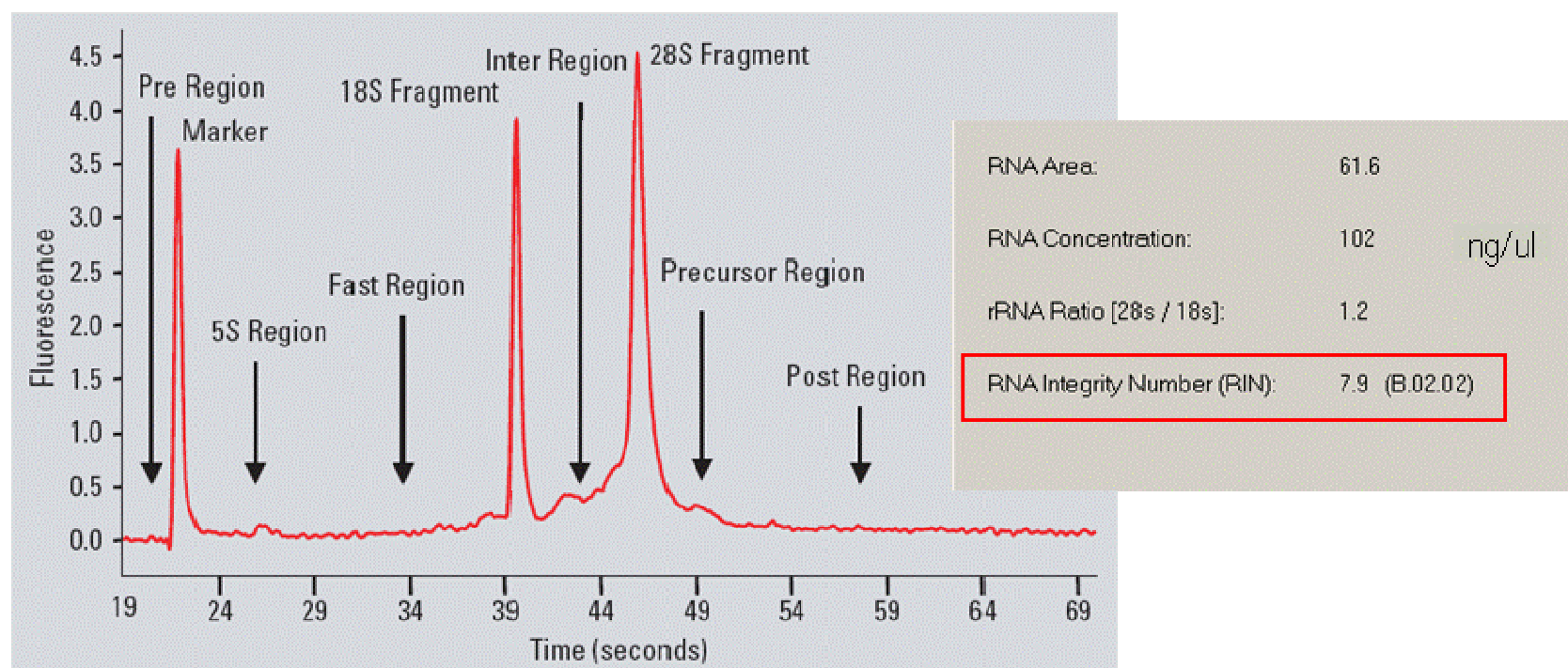


Chip holder with  
heater plate

# BioanalyzerによるTotal RNAの分解度合いの確認

## RIN ... RNA品質確認のためのツール

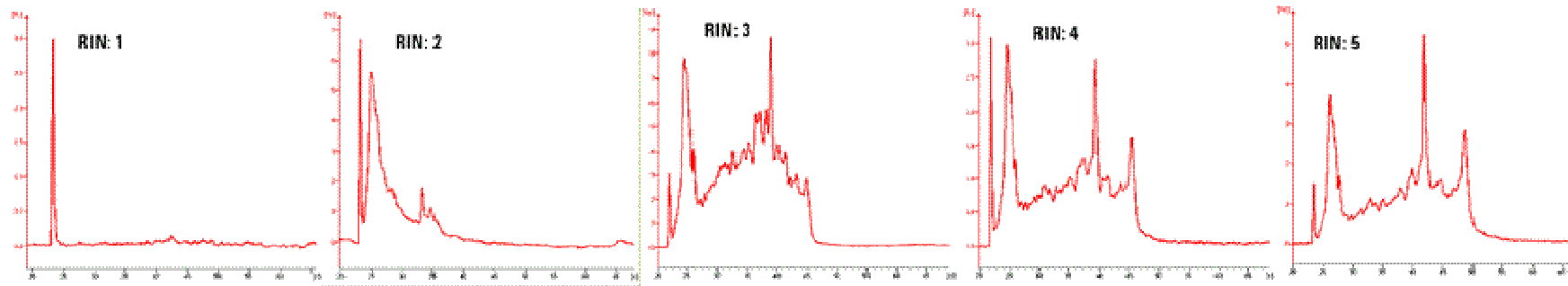
**RNA Integrity Number** ソフトウェアのアルゴリズムは  
エレクトロフェログラム全体から自動的に品質を分類



**\* サンプルの客観的な基準を設けることができる**

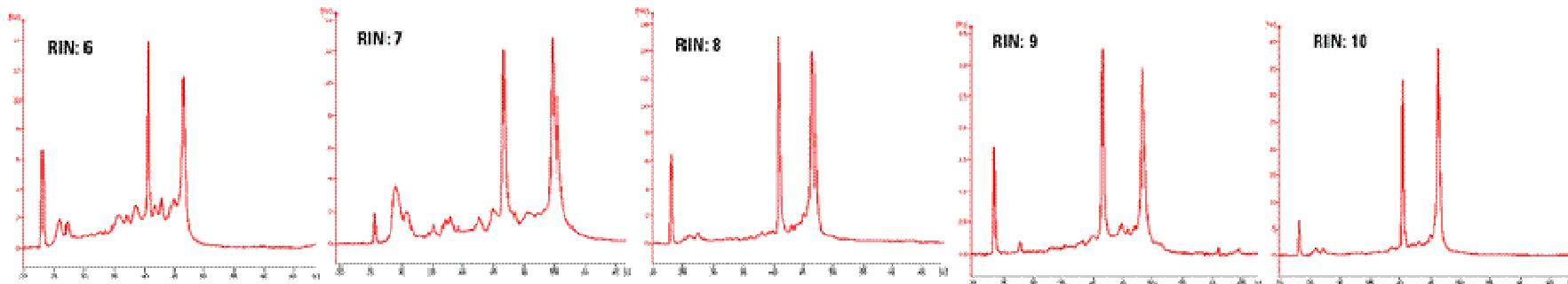
# BioanalyzerによるTotal RNAの分解度合いの確認

## RIN ... RNAの分解の進行に応じて1~10に分類



RIN: 1      RIN: 2      RIN: 3      RIN: 4      RIN: 5

**Degraded** ←



RIN: 6      RIN: 7      RIN: 8      RIN: 9      RIN: 10

→ **Intact**

# RINを使ったTotal RNAの分解度合いの確認 参考文献1

## BMC Molecular Biology



Methodology article

Open Access

### RNA quality in frozen breast cancer samples and the influence on gene expression analysis – a comparison of three evaluation methods using microcapillary electrophoresis traces

Carina Strand, Johan Enell, Ingrid Hedenfalk and Mårten Fernö\*

Address: Lund University, Department of Oncology, Clinical Sciences, Lund, SE 221 85 Lund, Sweden

Email: Carina Strand - [carina.strand@med.lu.se](mailto:carina.strand@med.lu.se); Johan Enell - [johan.enell@med.lu.se](mailto:johan.enell@med.lu.se); Ingrid Hedenfalk - [ingrid.hedenfalk@med.lu.se](mailto:ingrid.hedenfalk@med.lu.se); Mårten Fernö\* - [marten.ferno@med.lu.se](mailto:marten.ferno@med.lu.se)

\* Corresponding author

Published: 22 May 2007

Received: 22 December 2006

*BMC Molecular Biology* 2007, 8:38 doi:10.1186/1471-2199-8-38

Accepted: 22 May 2007

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2199/8/38>

© 2007 Strand et al; licensee BioMed Central Ltd.

-Electropherogramを目で見る/rRNAの比/RINの3つの判断法を比較

-さらにマイクロアレイの結果とそれぞれの結果も比較

# RINを使ったTotal RNAの分解度合いの確認

## 参考文献2

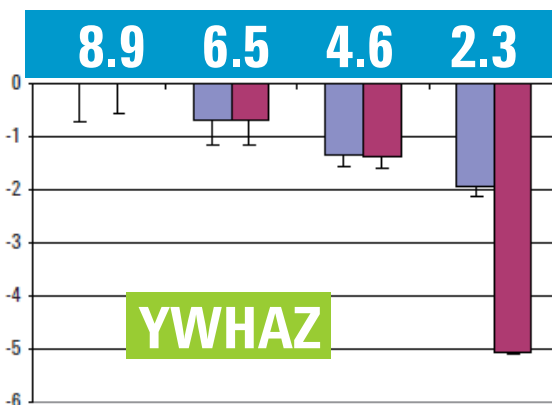
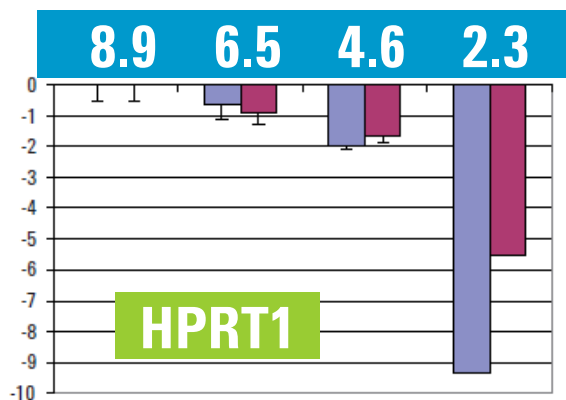
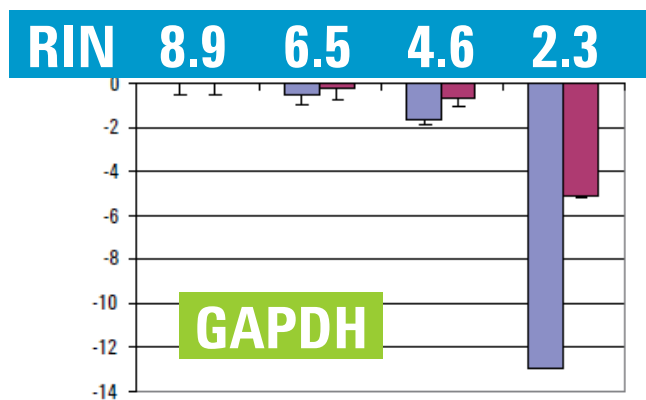


### Optimizing real-time quantitative PCR experiments with the Agilent 2100 bioanalyzer

Application Note

Steffen Mueller

-RIN4.6以下で、相対量の大幅な減少が見られたが、その程度は遺伝子によって異なる



■ mRNAの3'側  
■ mRNAの5'側

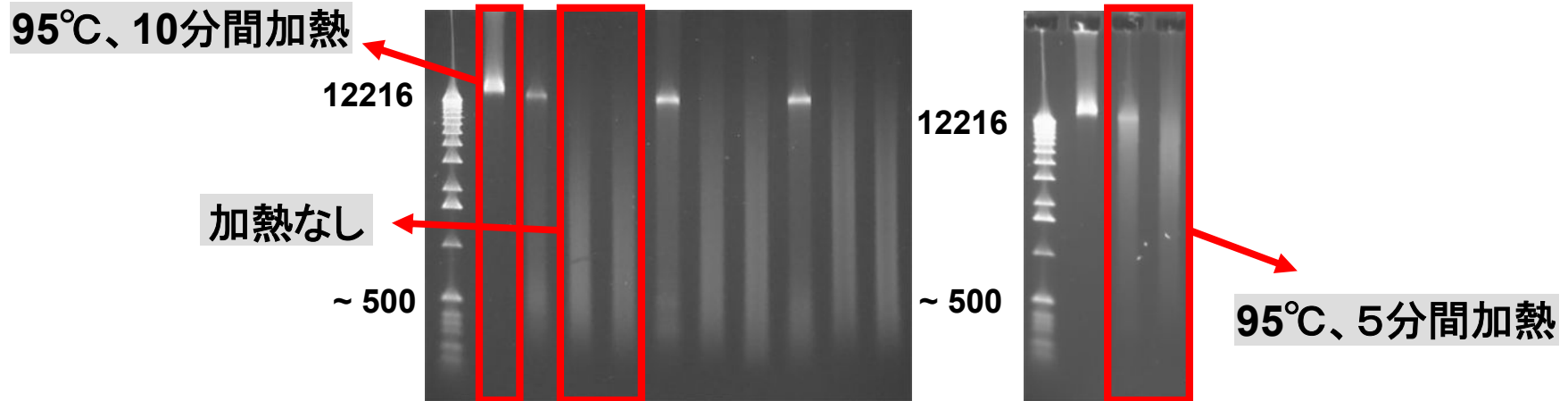
# アガロースゲル電気泳動によるgDNA分解の確認 ULS Labelingの場合

➡ 実験の前に、gDNAの分解具合を知ることが必要

## Agilent CGH ULS labeling protocol v.2.0

gDNA平均塩基長  
10kb以上  
7kb以上  
7kbより短い

断片化時間  
10分間 加熱  
5分間 加熱  
加熱なし



1.2% agarose gel, 20 ng DNA, Sybr Gold stain

# アガロースゲル電気泳動によるgDNA分解の確認 Enzymatic Labelingの場合

Agilent CGH Enzymatic labeling protocol v.5.0

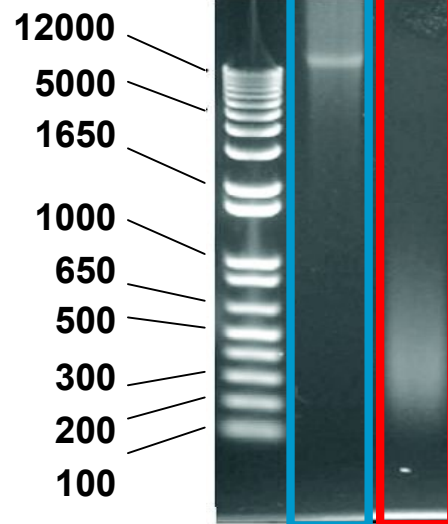
増幅をしないDirect法では、多少の分解は  
アレイデータに影響しない

WGAを使った増幅法では、500bp以上の長さが必要

## 増幅法におけるgDNAの分解具合の影響

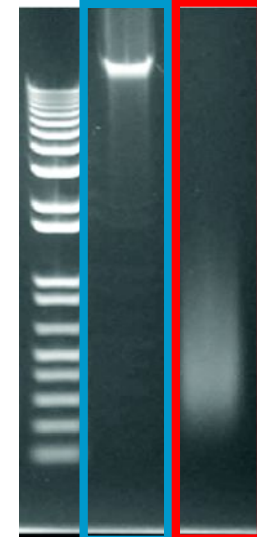
control DNA (Female)

Intact分解



HT29

Intact分解



# サンプル抽出と品質チェック まとめ

- アレイ実験の目的に沿った、適切な核酸抽出方法を選択する
- 抽出してきたサンプルの、純度・品質をチェックし、それらがアレイデータに与える影響を理解する必要がある

## 2. アジレントアレイ 実験のポイント

-Washのアーティファクトについて

-アレイデータに与えるオゾンの影響について

# Agilentが提供する、マイクロアレイ実験プロトコル

✿ One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Quick Amp Labeling)	Ver. 5.7
✿ Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Quick Amp Labeling)	Ver. 5.7
Agilent Mammalian ChIP-on-chip Protocol	Ver. 10.0
Agilent Yeast ChIP-on-chip Protocol	Ver. 9.2
✿ Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis Protocol	Ver. 5.0
Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis (ULS Labeling for Blood, Cells, Tissues or FFPE)	Ver. 2.0
✿ miRNA Microarray System Protocol	Ver. 1.5
Agilent Microarray Analysis of Methylated DNA Immunoprecipitation	Ver. 1.0

✿ のマークが  
付いているものは  
日本語プロトコル対応

# Wetの実験を、成功から遠ざける要因は・・・？

サンプルのQualityの問題

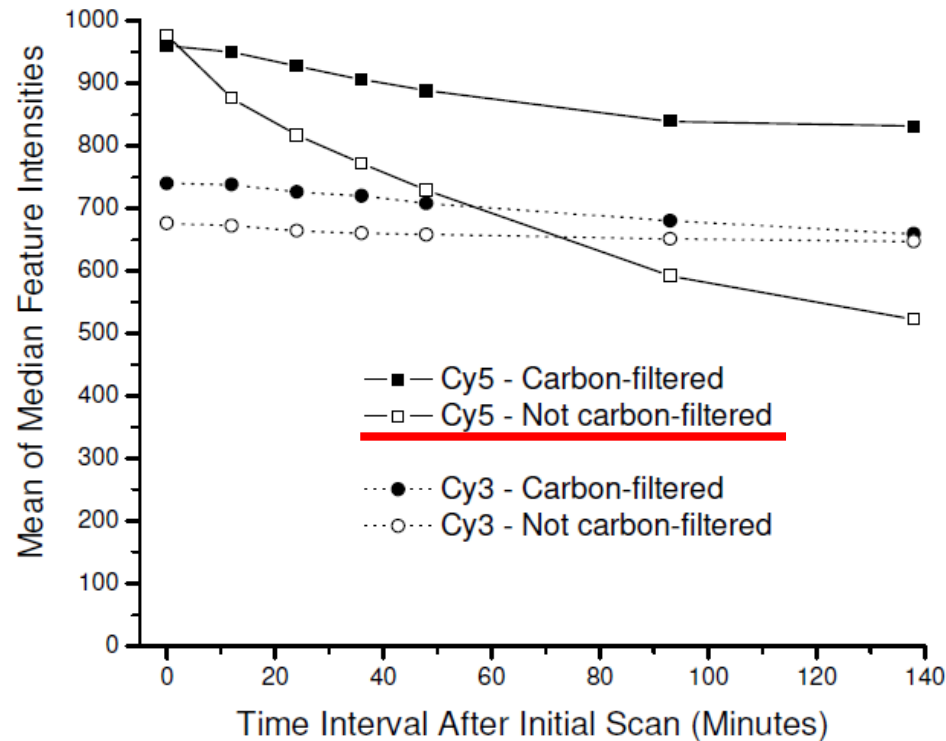
バックグラウンドによるS/N比の低下

実験環境中のオゾンによる褪色

▪  
▪  
▪



# オゾン暴露による Cy-Dye の選択的分解



Ozone: ~2-4 ppb

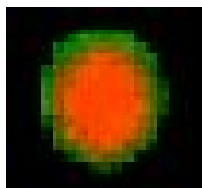
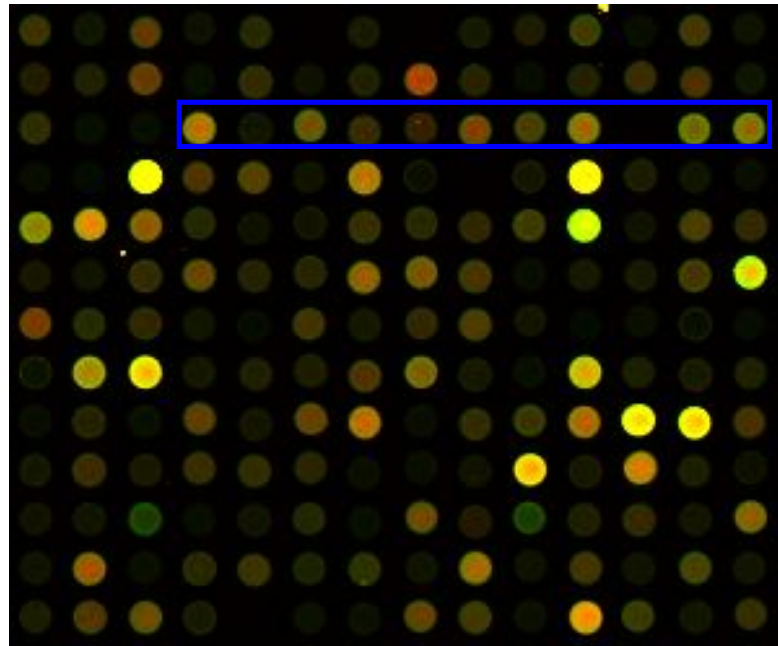
*Branham et al.,*

*BMC Biotechnology* 2007 Feb 12;7:8.

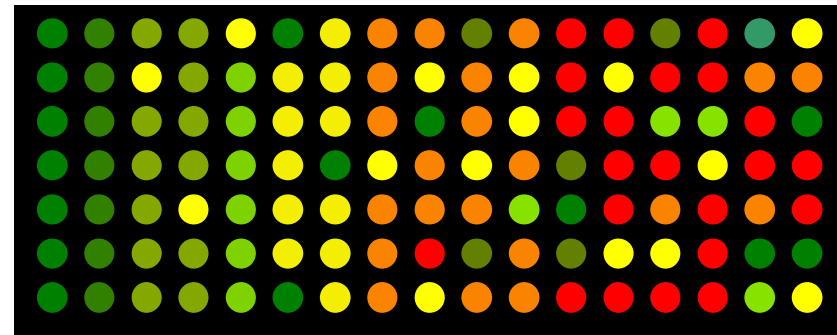
- **Cy5**のシグナルは、経過時間に応じて減衰していった
- このオゾン濃度では、**Cy3**のシグナルは有意には変化しなかった

# オゾンによる色素の分解がアレイデータに与える影響

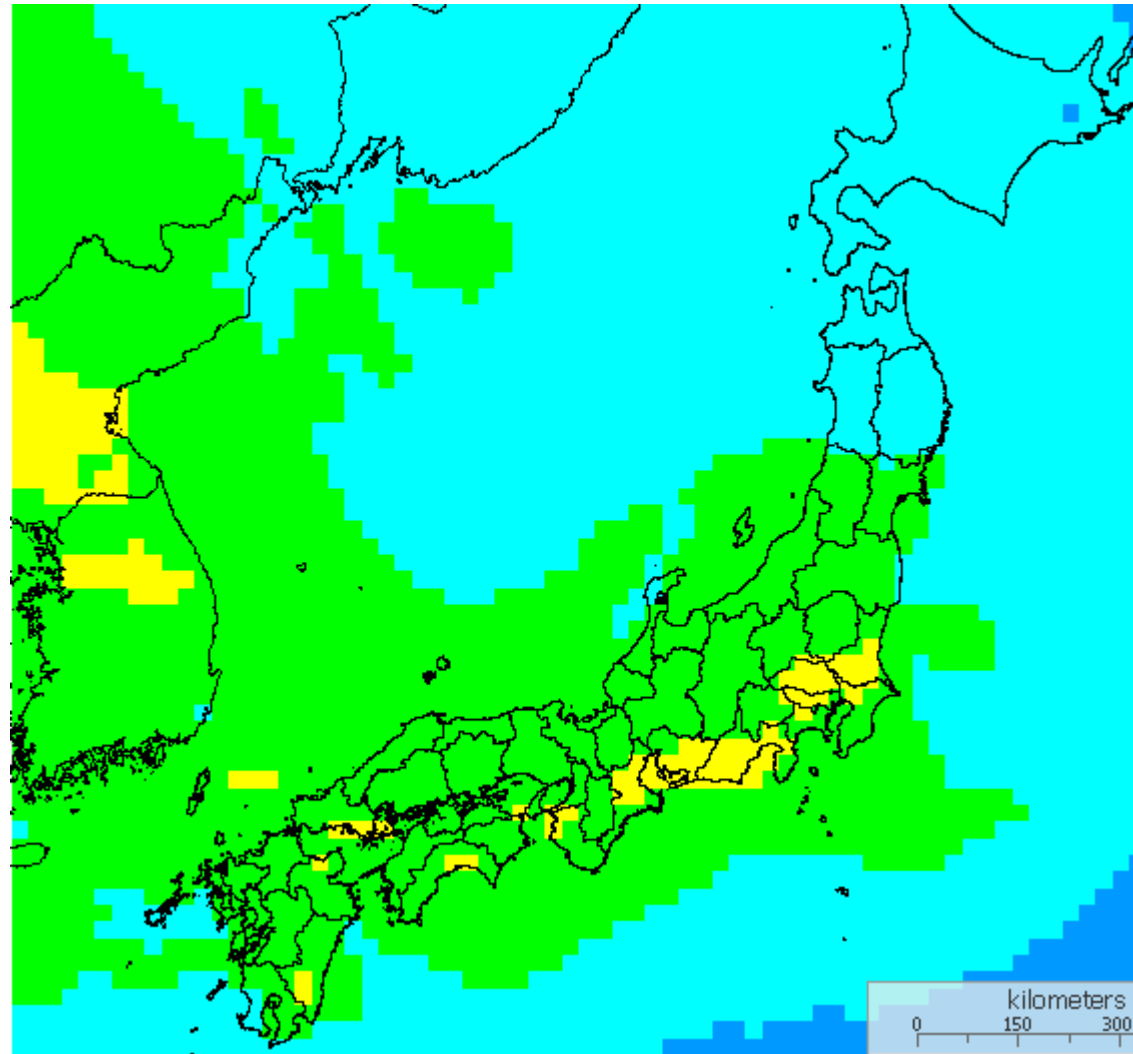
スポット内のシグナル不均一



スライド内のシグナル不均一



# 環境中の光化学オキシダントが100ppbを超えることも



環境GIS <http://www-gis5.nies.go.jp/osenyosoku/map.php>

# Agilentが推奨するオゾン対策

## 『活性炭フィルターで、実験環境からオゾンを除去する』

オゾンクリーンブース内で、洗浄と乾燥、スキャンを行う



**アズワン株式会社**

製品番号 : 2-M005-01B  
(1760 × 710 × 1000mm)

製品名 : オゾンフリーブース

フィルターは定期的に交換が必要です。

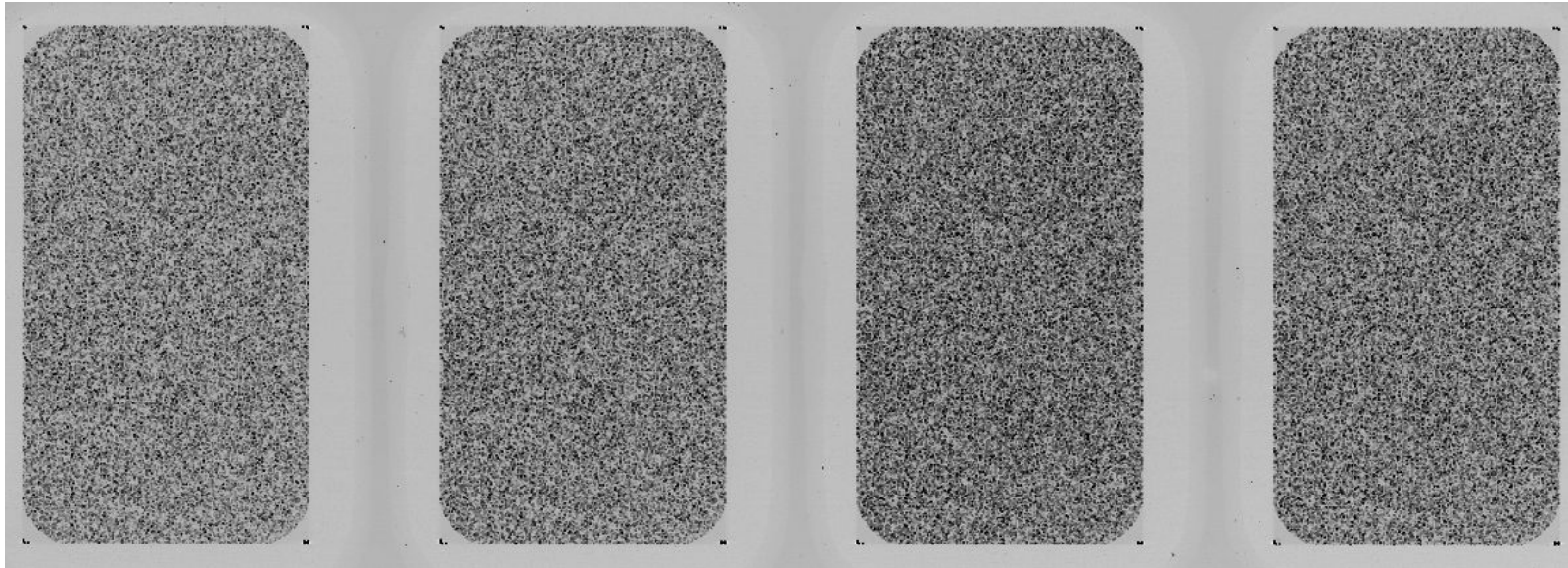
アレイ実験の規模・実験室環境によっては、空調にフィルターを組み込み、  
部屋全体をオゾンフリーにする選択肢も

# アジレントアレイ 実験のポイント まとめ

- TritonX-102をWash Bufferに添加することで、バックグラウンドを低く抑えることができる
- 2カラー実験を行なう場合、オゾンの対策を取る必要がある
- Agilentアレイユーザー向けに『Agilent DNAマイクロアレイカスタムニュース』で最新サポートニュースを配信中

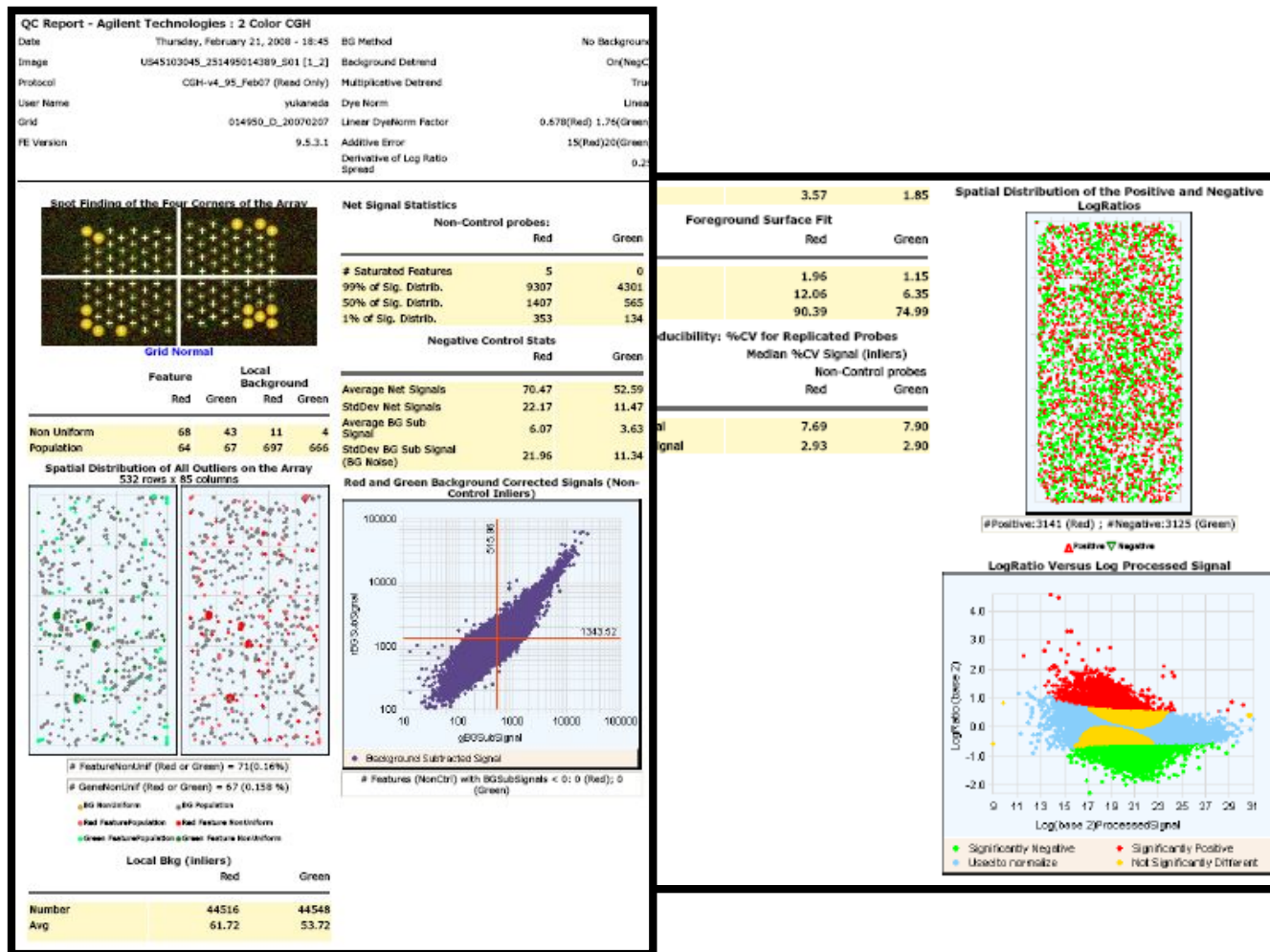
### 3. アレイデータの品質チェックと性能評価法

アレイデータの品質をどのように確認しますか？



# Agilentが提供する、実験データの品質確認材料

## QC report



# QC report 主なチェックポイント1

## グリッドのチェック

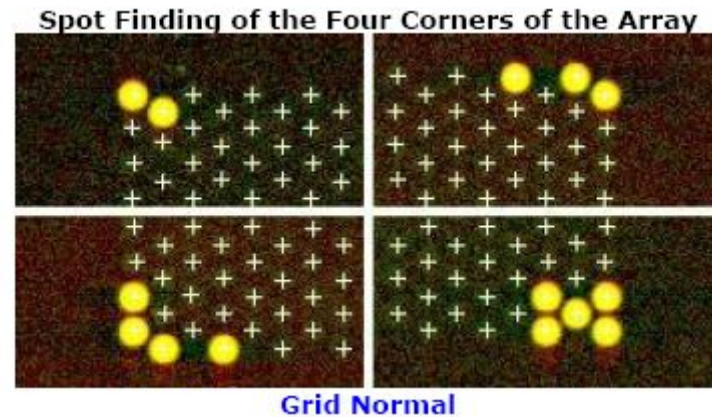


お使いのグリッドファイルは、アレイのデザインに合致していますか？

QC Report - Agilent Technologies : 1 Color Gene Expression			
Date	Wednesday, April 23, 2008 - 11:20	Grid	014850_D_20070820
Image	US45103045_2514850_25855_S01_H [1_2]	BG Method	No Background
Protocol	GE1-v5_95_Feb07 (Read Only)	Background Detrend	On(FeatNCRRange, LoPass)



グリッドがずれていませんか？



# QC report 主なチェックポイント2

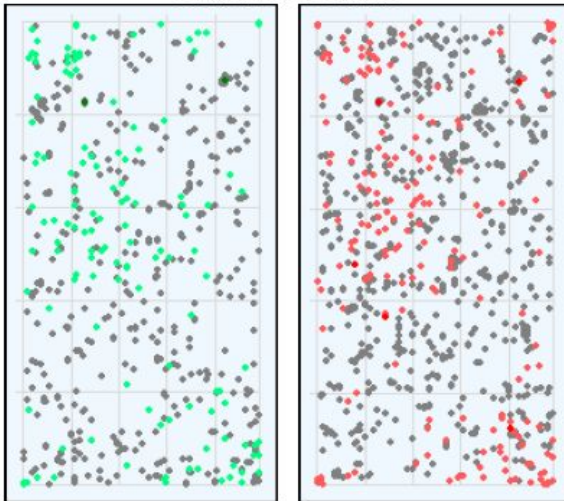
## アレイ上の分布のチェック



Outlier(外れ値)はどの程度？  
 極端な分布をしていませんか？

	Feature		Local Background	
	Red	Green	Red	Green
Non Uniform	5	2	20	12
Population	184	131	755	449

Spatial Distribution of All Outliers on the Array  
 532 rows x 85 columns

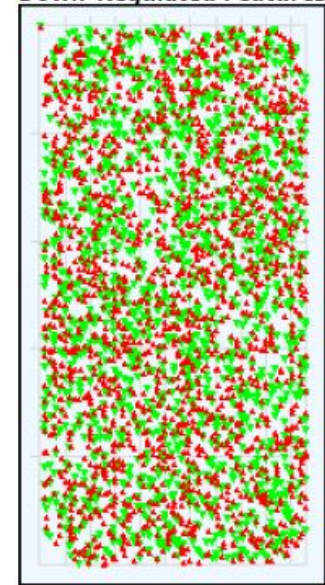
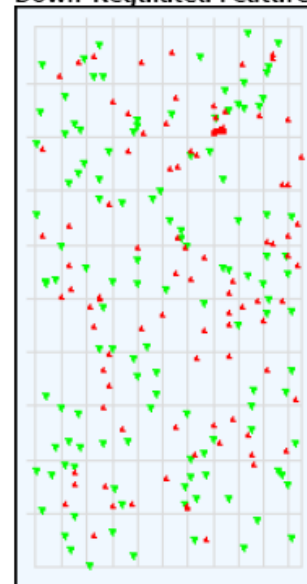


# FeatureNonUnif (Red or Green) = 6(0.01%)  
 # GeneNonUnif (Red or Green) = 6 (0.015 %)  
 ● BG NonUniform      ● BG Population  
 ● Red FeaturePopulation      ● Red Feature NonUniform



Up regulatedとDown regulatedの  
 Featureが、特徴的な分布を  
 していませんか？(2colorのみ)

Spatial Distribution of Significantly Up-Regulated and  
 Down-Regulated Features

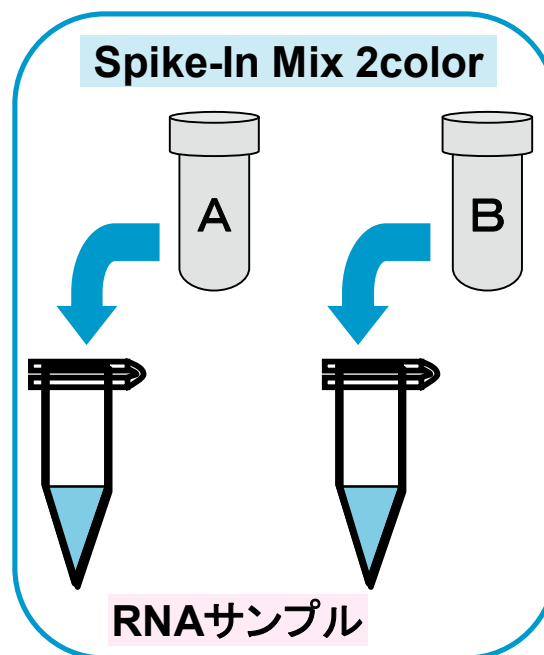
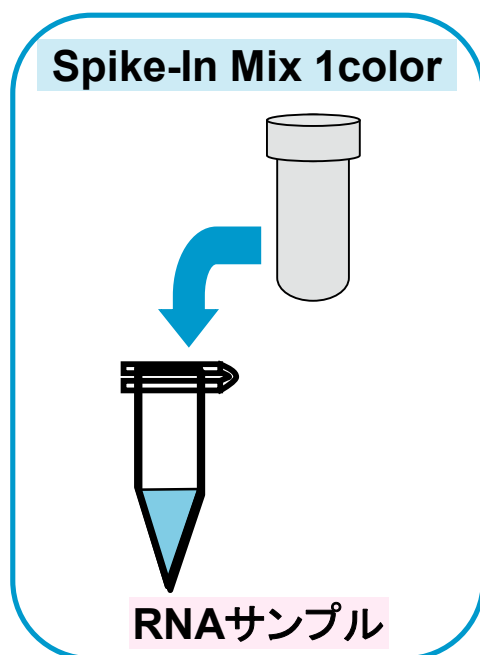


#Up-Regulated:100 (Red) ; #Down-Regulated:122 (Green)



# Agilent Spike-In Mix (遺伝子発現アレイ用 Option)

- 10種類の異なる配列のポリA付加 人工RNAが、  
6桁のダイナミックレンジに渡る濃度範囲で含まれる
- アレイ実験データの直線性・感度・正確性を評価



Probe Name	Log (Relative Conc.)
(+)E1A_r60_3	0.30
(+)E1A_r60_a104	1.30
(+)E1A_r60_a107	2.30
(+)E1A_r60_a135	3.30
(+)E1A_r60_a20	3.83
(+)E1A_r60_a22	4.30
(+)E1A_r60_a97	4.82
(+)E1A_r60_n11	5.30
(+)E1A_r60_n9	5.82
(+)E1A_r60_1	6.30

1color spike-mixの例

ラベル化・  
ハイブリ

# QC report 主なチェックポイント3

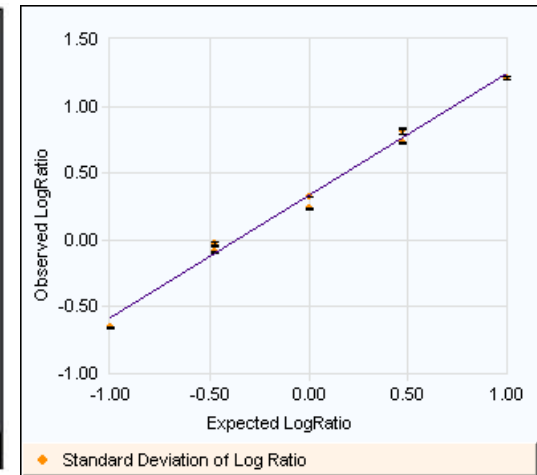
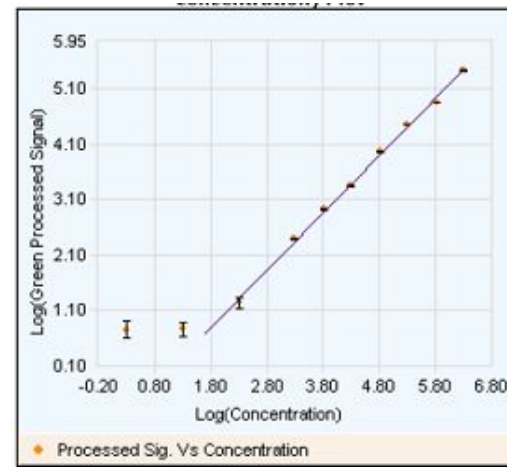
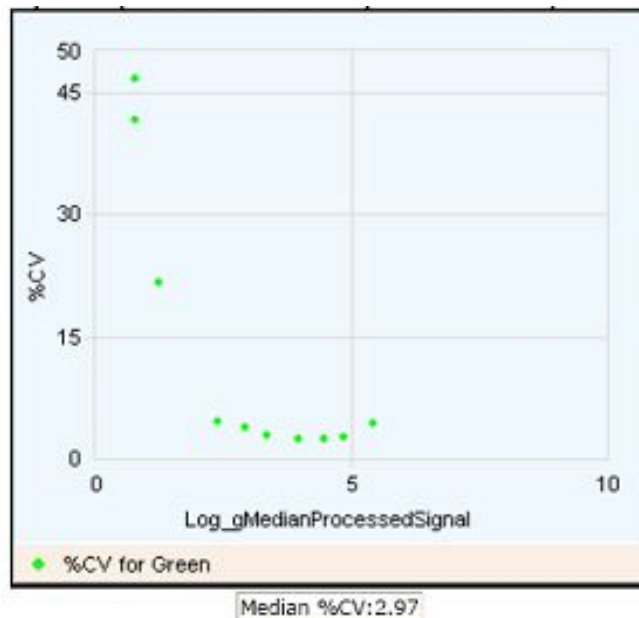
## Spike-In Mixの結果のチェック



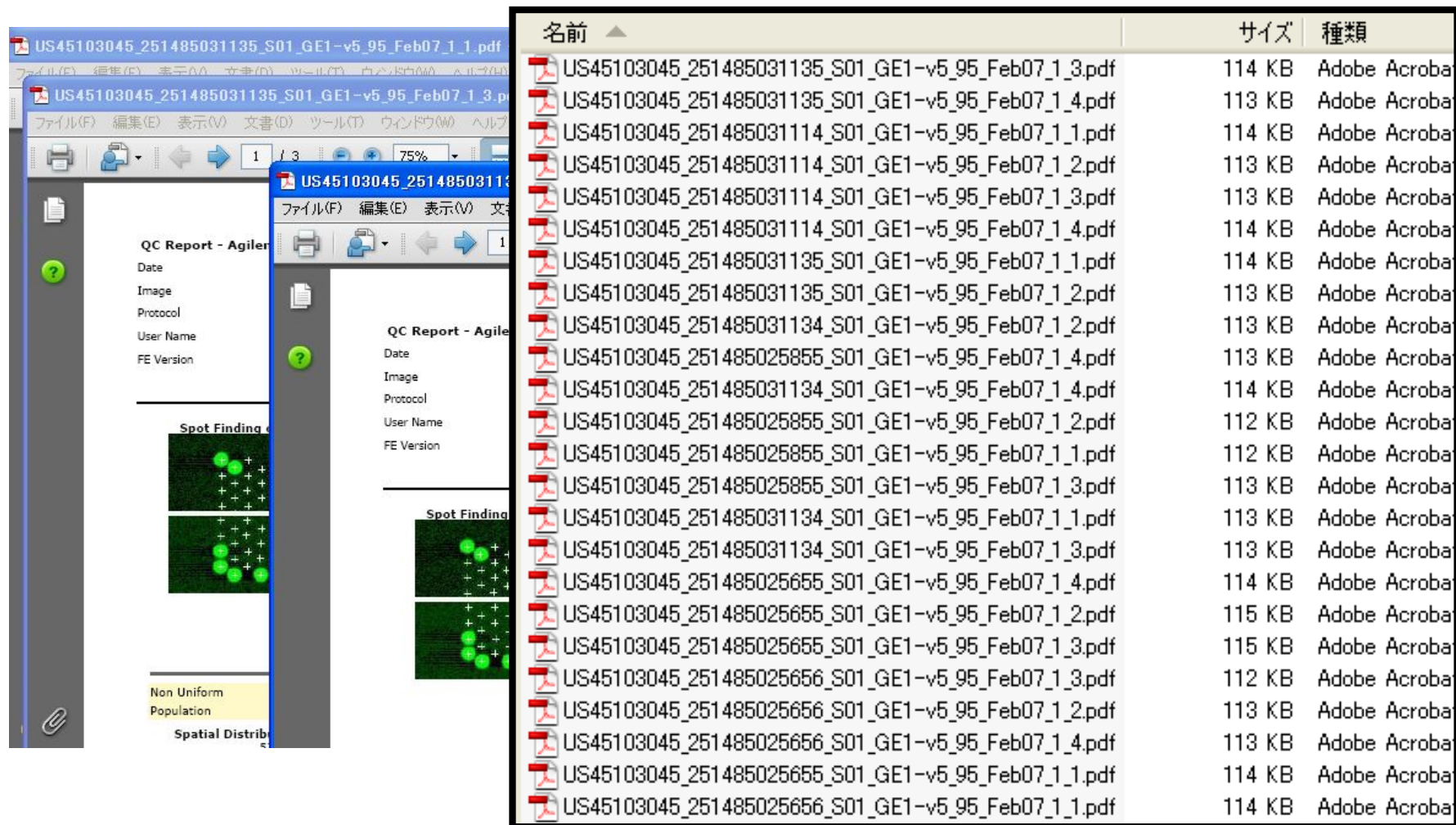
繰り返しスポットの再現性は？



シグナルの正確性は？



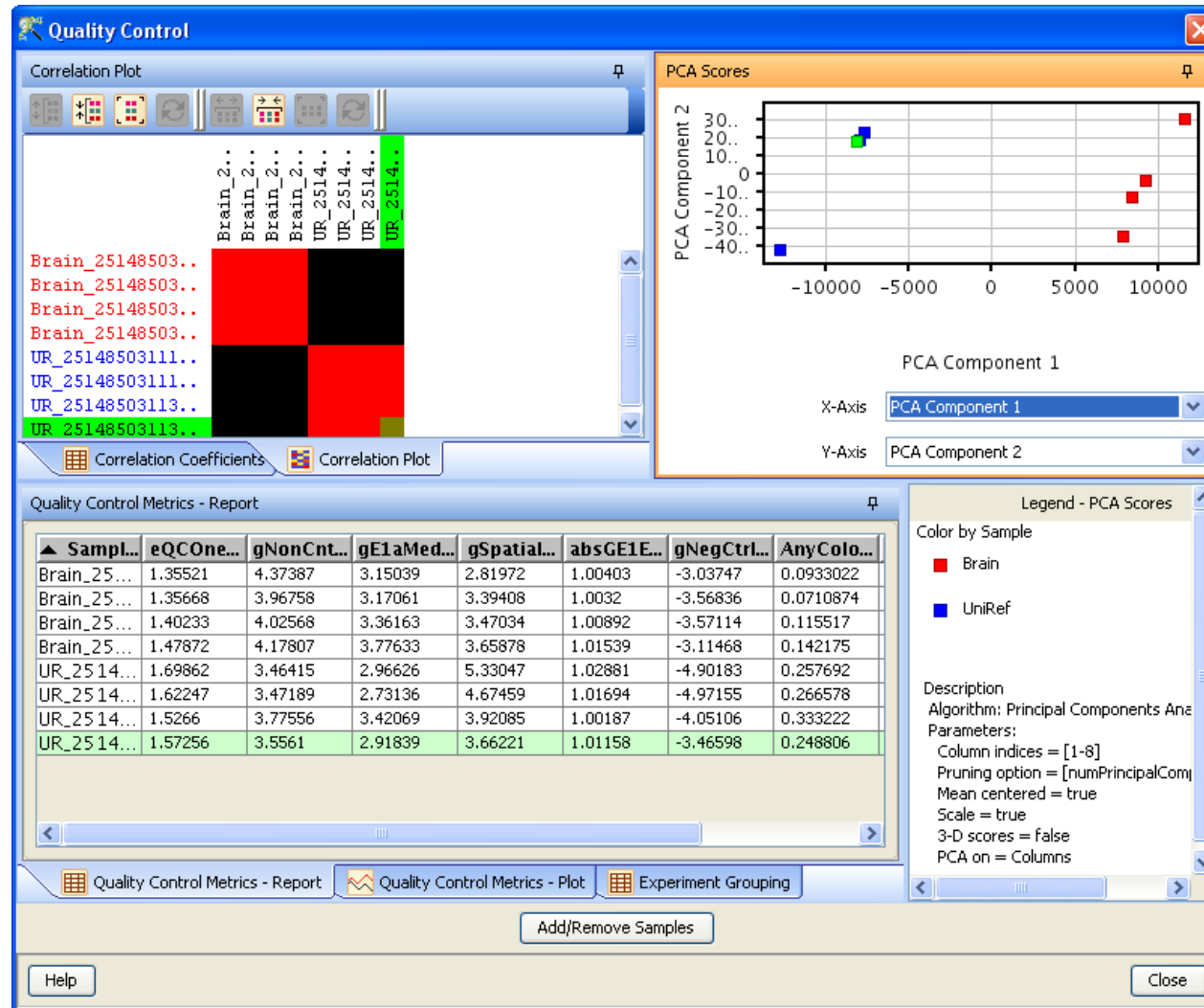
でも、1回の実験でもQCレポートはたくさんできる。  
全部相互比較するのは大変だ...



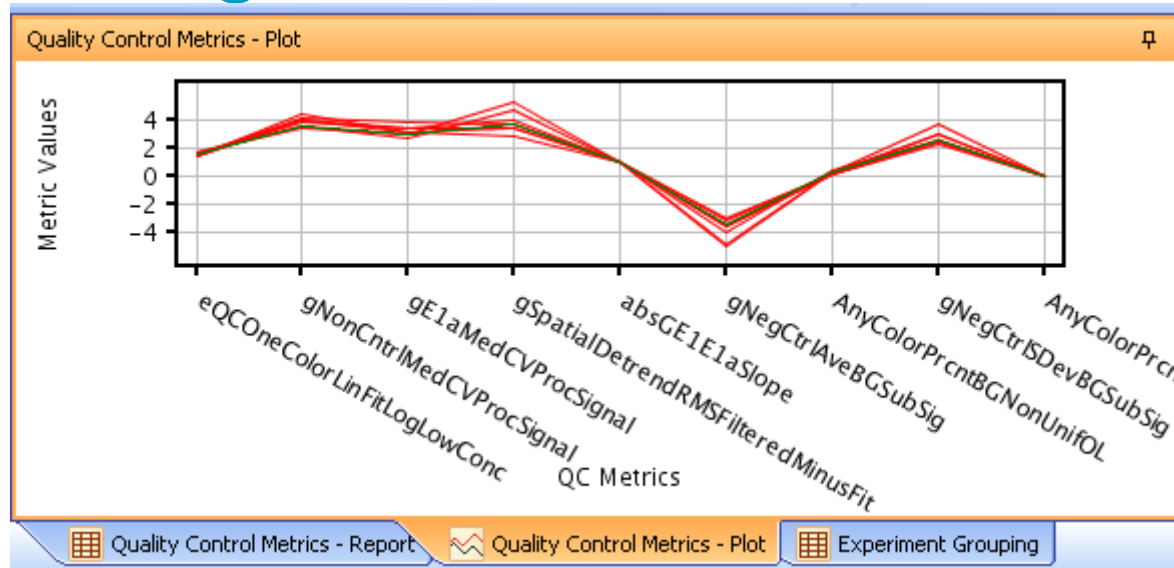
The image displays a software interface for QC reports. On the left, a window titled 'QC Report - Agile' shows a 'Spot Finding' visualization with green spots on a dark background. Below the visualization, there are labels for 'Non Uniform Population' and 'Spatial Distrib'. On the right, a file explorer window lists 25 PDF files, each with a name, size, and type.

名前	サイズ	種類
US45103045_251485031135_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_3.pdf	114 KB	Adobe Acroba
US45103045_251485031135_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_4.pdf	113 KB	Adobe Acroba
US45103045_251485031114_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_1.pdf	114 KB	Adobe Acroba
US45103045_251485031114_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_2.pdf	113 KB	Adobe Acroba
US45103045_251485031114_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_3.pdf	113 KB	Adobe Acroba
US45103045_251485031114_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_4.pdf	114 KB	Adobe Acroba
US45103045_251485031135_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_1.pdf	114 KB	Adobe Acroba
US45103045_251485031135_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_2.pdf	113 KB	Adobe Acroba
US45103045_251485031134_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_2.pdf	113 KB	Adobe Acroba
US45103045_251485025855_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_4.pdf	113 KB	Adobe Acroba
US45103045_251485031134_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_4.pdf	114 KB	Adobe Acroba
US45103045_251485025855_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_2.pdf	112 KB	Adobe Acroba
US45103045_251485025855_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_1.pdf	112 KB	Adobe Acroba
US45103045_251485025855_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_3.pdf	113 KB	Adobe Acroba
US45103045_251485031134_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_1.pdf	113 KB	Adobe Acroba
US45103045_251485031134_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_3.pdf	113 KB	Adobe Acroba
US45103045_251485025655_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_4.pdf	114 KB	Adobe Acroba
US45103045_251485025655_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_2.pdf	115 KB	Adobe Acroba
US45103045_251485025655_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_3.pdf	115 KB	Adobe Acroba
US45103045_251485025656_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_3.pdf	112 KB	Adobe Acroba
US45103045_251485025656_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_2.pdf	113 KB	Adobe Acroba
US45103045_251485025656_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_4.pdf	113 KB	Adobe Acroba
US45103045_251485025655_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_1.pdf	114 KB	Adobe Acroba
US45103045_251485025656_S01_GE1-v5_95_Feb07_1_1.pdf	114 KB	Adobe Acroba

# GeneSpringGX9で、解析前のデータの一括品質チェック Quality Controlウィンドウ



# 複数データの品質を一挙にチェック 例.Agilent 遺伝子発現 1カラー



- Spike-In Controlの直線範囲 下限濃度
- 非コントロール繰り返しプローブの変動係数
- Spike-In Control繰り返しプローブの変動係数
- Spike-Inのシグナル値と濃度のslope値
- Non Uniformity Outlierの割合
- Negative ControlのSD値 ...etc



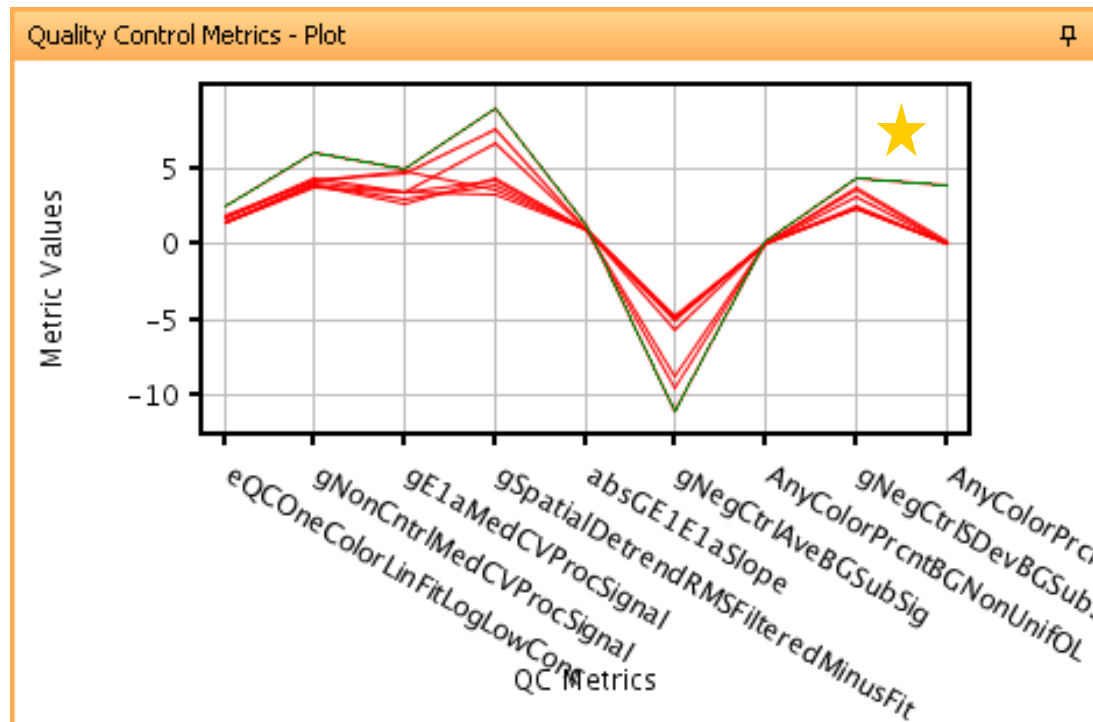
外れデータを  
一括チェック！



# Agilent 遺伝子発現 1カラー用 Quality Control Metrics



“Quality Control Metrics”は、サンプルに依存しない項目を集めているため、プロットがばらつく場合、実験上問題がある可能性がある



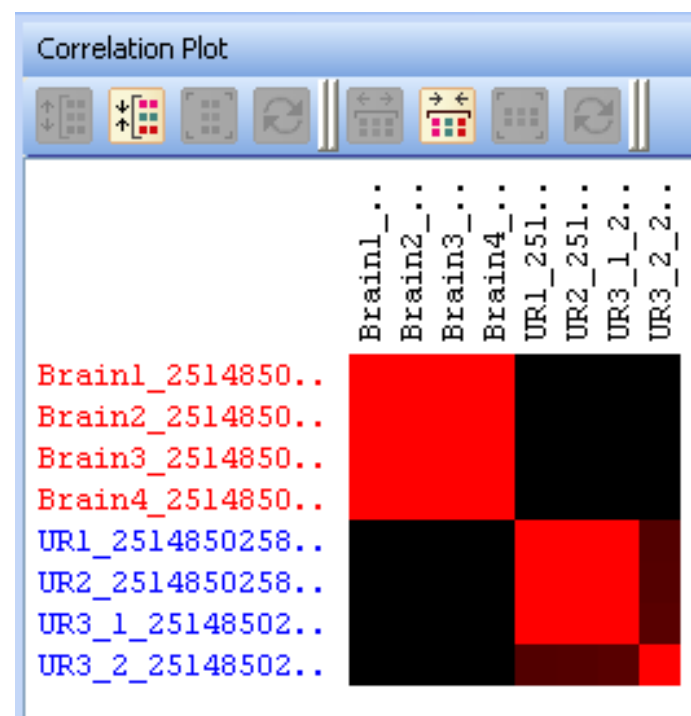
# サンプルの相関・グループ分けなどをチェック



Experiment内のSample間の、  
総当りの相関係数を計算



事前の知見と合致していますか？



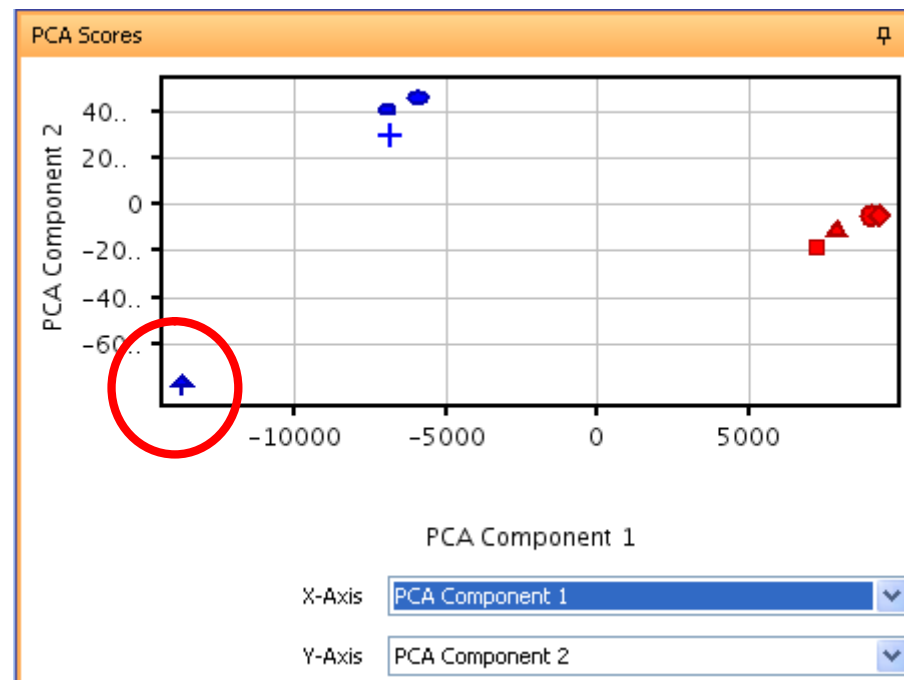
Correlation Coefficients

Array Na...	Brain1_2...	Brain2_2...	Brain3_2...	Brain4_2...	UR1_251...	UR2_251...	UR3_1_2...	UR3_2_2...	Samples_1	Name
Brain1_2...	1.0	0.987012	0.989133	0.988488	0.821373	0.822053	0.822093	0.773703	Brain	Brain1
Brain2_2...	0.987012	1.0	0.991843	0.991543	0.823473	0.825073	0.823683	0.775182	Brain	Brain2
Brain3_2...	0.989133	0.991843	1.0	0.993313	0.824753	0.826223	0.825483	0.776503	Brain	Brain3
Brain4_2...	0.988488	0.991543	0.993313	1.0	0.823313	0.824983	0.824763	0.775783	Brain	Brain4
UR1_251...	0.821373	0.823473	0.824753	0.823313	1.0	0.994693	0.989433	0.916683	UR	UR1
UR2_251...	0.822053	0.825073	0.826223	0.824983	0.994693	1.0	0.989623	0.916903	UR	UR2
UR3_1_2...	0.822093	0.823683	0.825483	0.824763	0.989433	0.989623	1.0	0.918243	UR	UR3
UR3_2_2...	0.773703	0.775182	0.776503	0.775783	0.916683	0.916903	0.918243	1.0	UR	UR4



# 主成分分析(PCA)の結果から外れサンプルを見つける

- ☑ **Biological Replicates**なのにひとつだけ離れている・・・  
など、外れ値の可能性はあるものはありませんか？



# アレイデータの品質チェックと性能評価法 まとめ

- AgilentのQC reportやSpike-In Controlを活用し、アレイデータに異常なことが起こっていないかをチェックする
- データ解析の前に、解析に使えるデータかどうかをチェックする

**Thank you for your attention!**