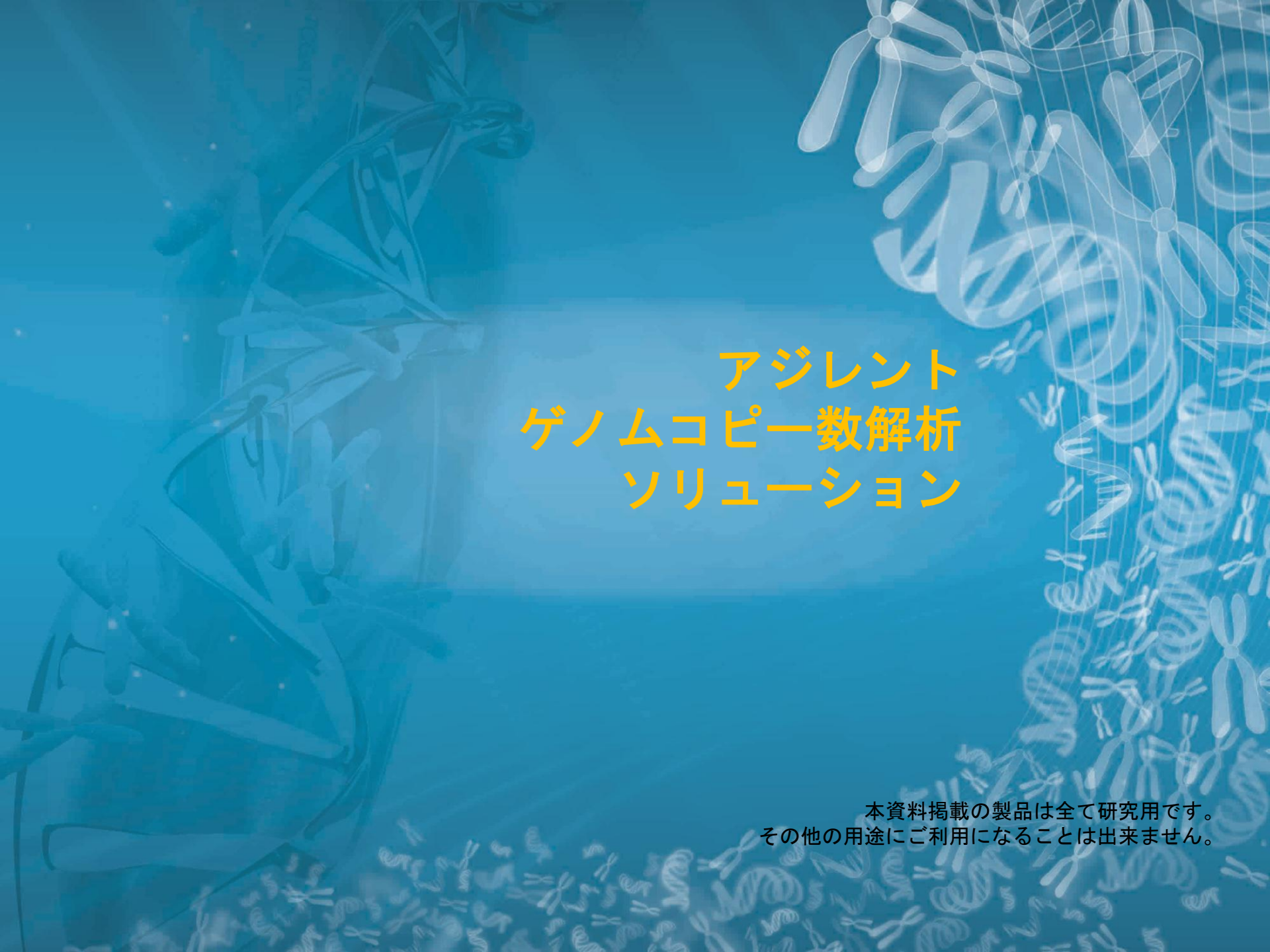
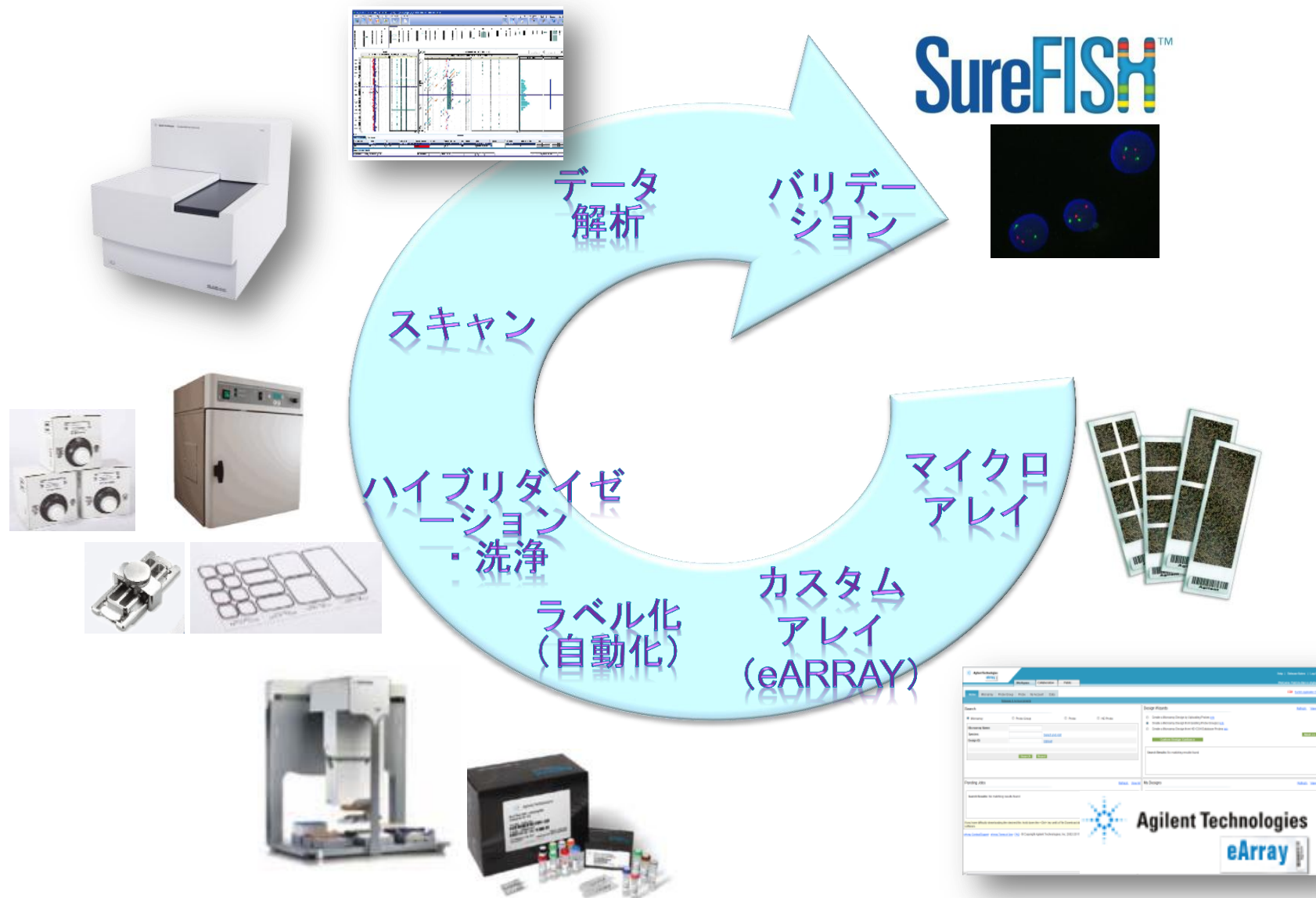




アジレント ゲノムコピー数解析 ソリューション

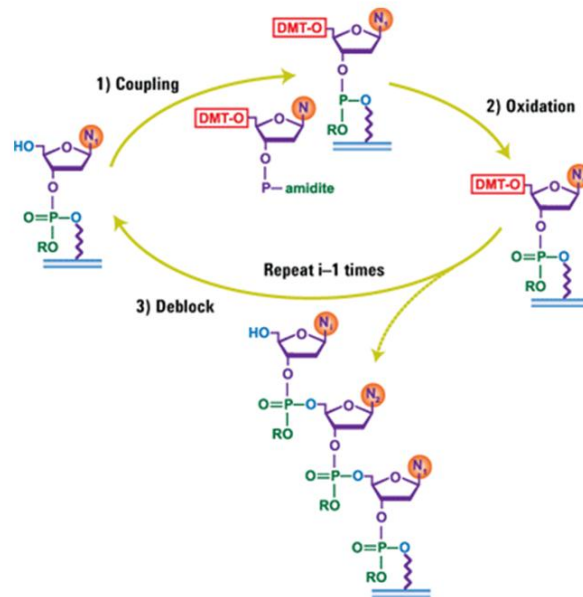
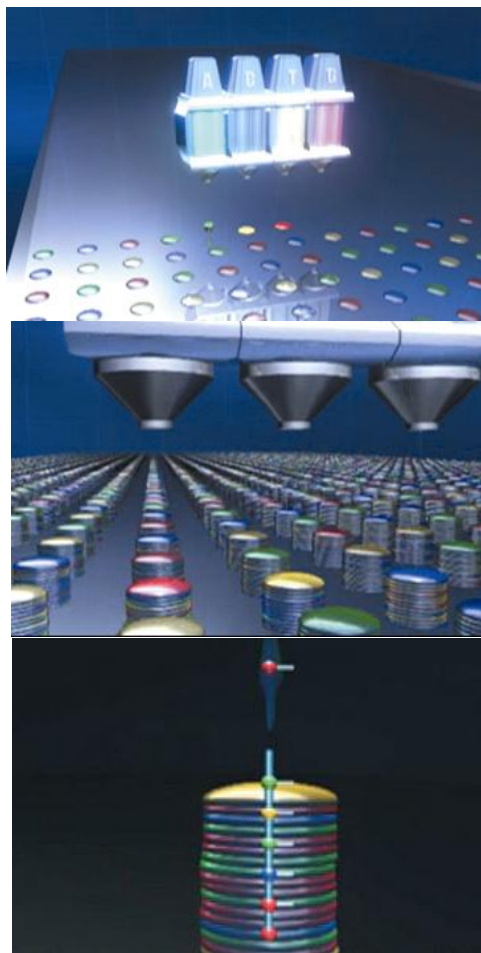
本資料掲載の製品は全て研究用です。
その他の用途にご利用になることは出来ません。

分子細胞遺伝学的検査における Agilent マイクロアレイ + FISH ソリューション



CGH マイクロアレイ原理

アジレントのオリゴライブラリー合成技術



高精度インクジェットプリント技術と
各合成ステップにおけるリアルタイムなQCにより
合成効率をさらに向上

ロングオリゴライブラリー合成技術による製品群

オリゴヌクレオチドを
ガラススライド上に
In-situ 合成

オリゴライブラリー合成



オリゴマイクロアレイ

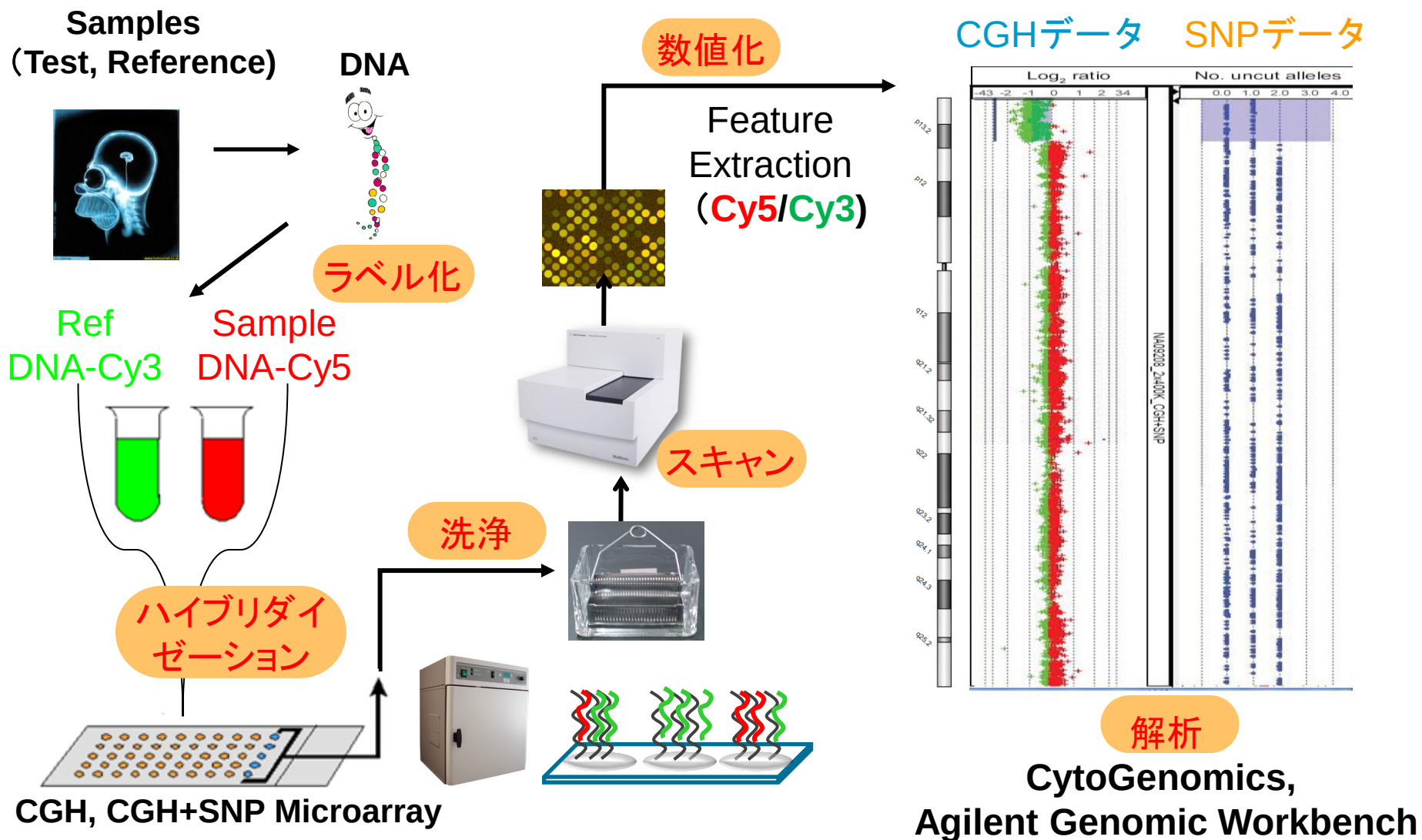


SureFISH



NGSターゲット
シーケンス試薬

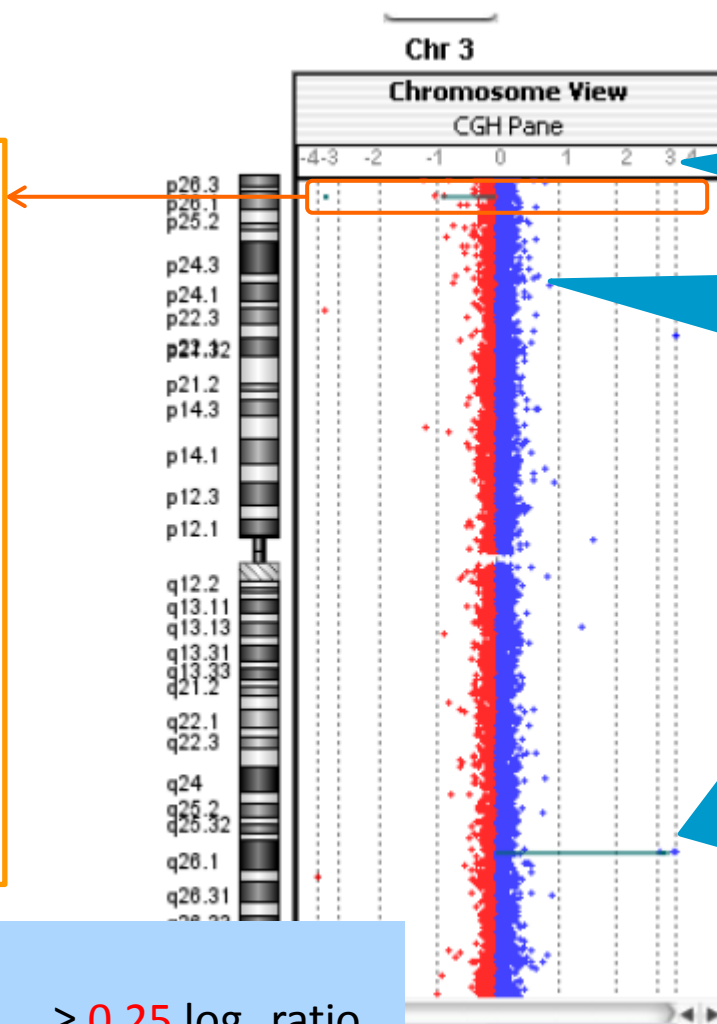
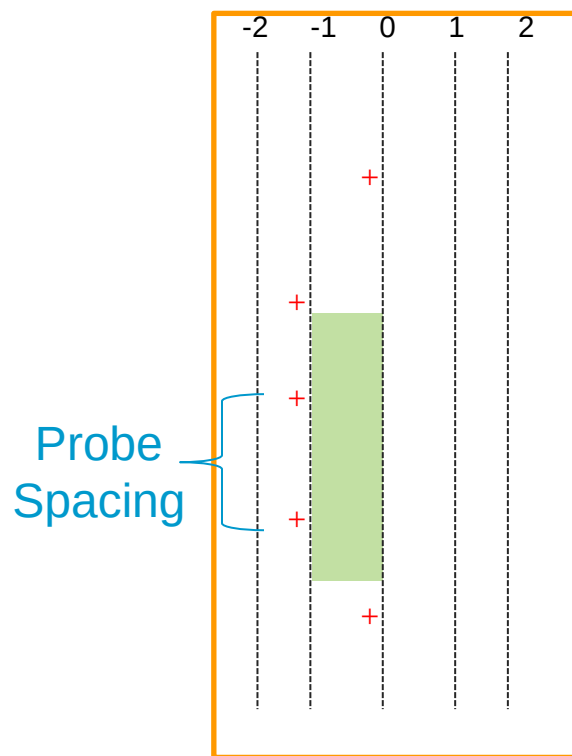
アジレントCGH, CGH+SNP 実験から解析まで



CGHデータの原理：アジレントのマイクロアレイは3プローブでコピー数変化を検出

【拡大模式図】

Ratio: 1/4 1/2 1 2 4



Log₂(Test/Reference)

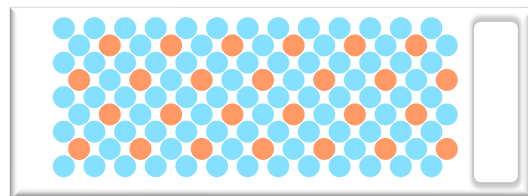
各プローブデータの
Log₂(Test/Reference)
比を配置・表示

アルゴリズムにより
コピー数変化領域を
検出・表示。
Log₂比 > 0 は gain、
Log₂比 < 0 は loss

検出条件

- minimum of 3 probes、 $\geq 0.25 \log_2$ ratio
- minimum of 5 probes、 $\geq 0.15 \log_2$ ratio

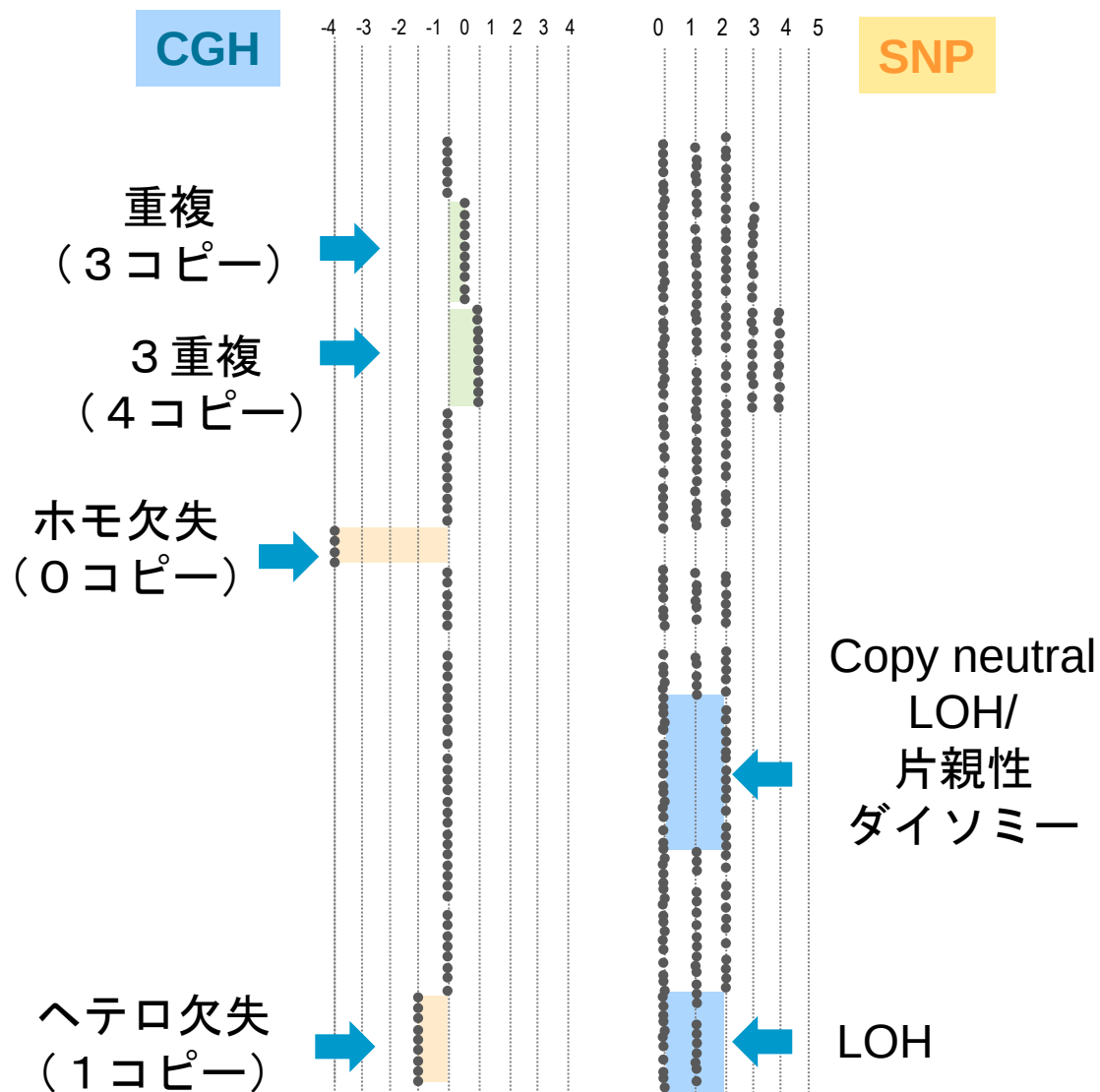
CGH+SNP データの原理



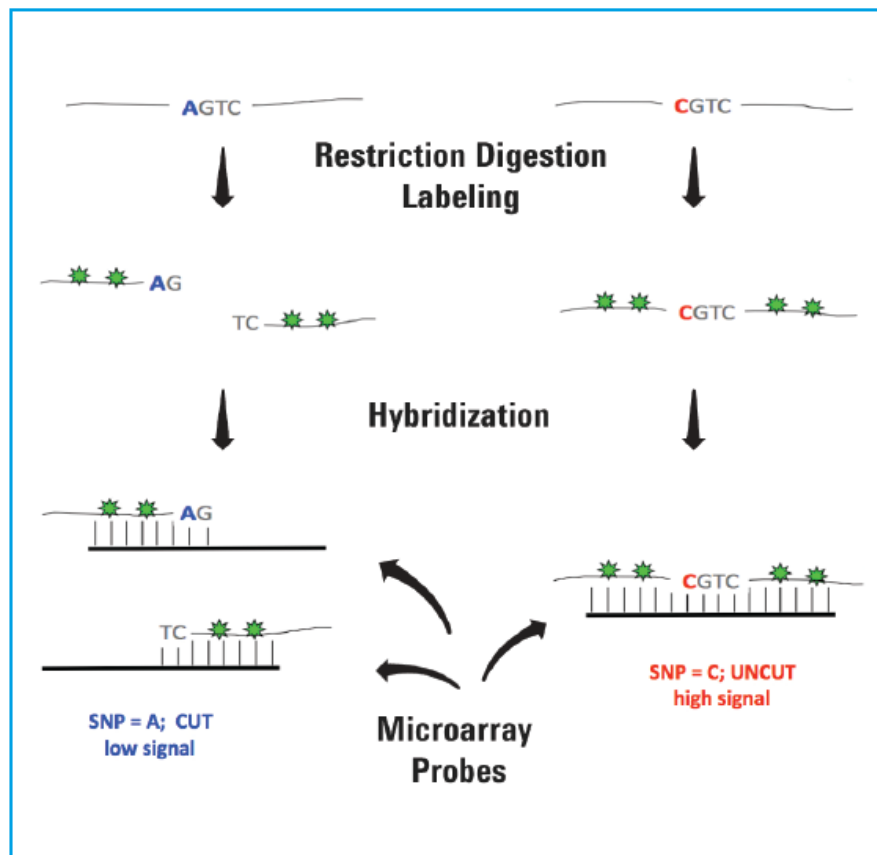
- : CGHプローブ
- : SNP領域 プローブ

イメージ図

- CGHプローブとSNPプローブの両方を搭載。
- 染色体全体から選ばれた約60,000 SNP 領域にSNPプローブを設計。
- 各SNPの片方のアレルのコピー数の情報を取得し、(copy neutral) LOHや片親性ダイソミーの領域を検出します。



制限酵素によりSNPの検出



- 制限酵素(Alu/Rsa)による切断により SNPs を検出
- 各SNPの片方のアレルについて、genotype 既知のリファレンスに対するコピー数を算出
- heterozygous call が統計的有意に失われている領域をLOH領域として検出
- 全ゲノムで ~5-10 Mb LOH/UPD 検出解像度

プローブ設計コンセプト 最適なプローブの選択

基本コンセプト：解析に適したプローブの選択

高い合成効率による
長鎖オリゴプローブ

- (45~) 60mer
- 剛健なハイブリダイゼーション

プローブ設計の基準

- 特異性 (ホモロジー)
- T_m
- 二次構造

遺伝子発現 (Gene Expression)	DNAコピー数解析 (CGH)	Location Analysis (ChIP on Chip)
• 各々の生物種の転写産物に対して特異性をもつ • 3'側にバイアス	• 公的データベースのreferenceゲノム配列に対して特異性をもつ • 繰り返し配列領域を排除 • Alu・RsaI 認識領域を排除 (SNPプローブはAlu・RsaI 認識部位に配置)	• 公的データベースのreferenceゲノム配列に対して特異性をもつ • 繰り返し配列領域を排除 • ChIP法に合わせて平均解像度を設定

各種アプリケーション資料をウェブで公開しています

- 血液がん
 - FFPE試料
 - 1細胞によるCGH解析
- など

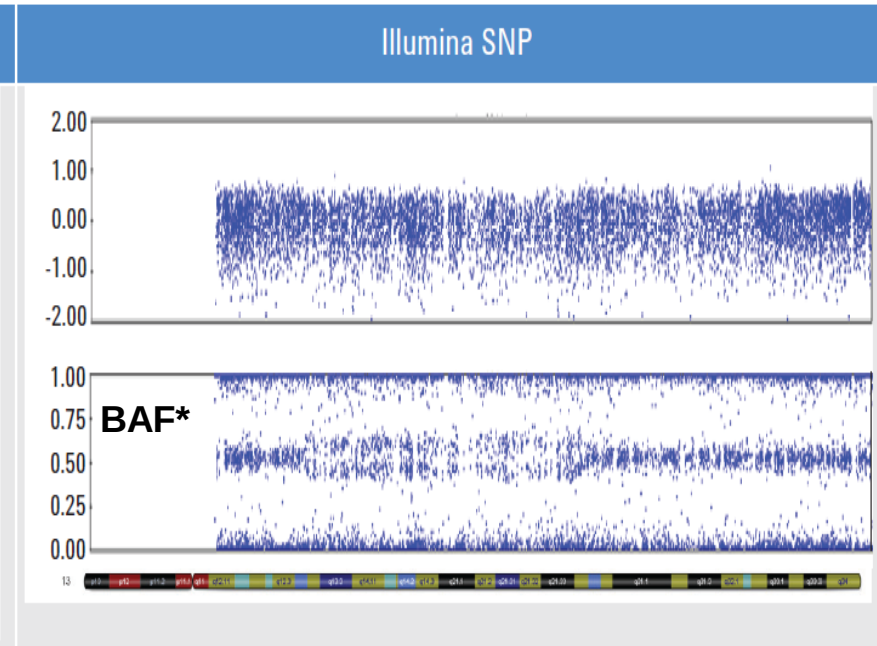
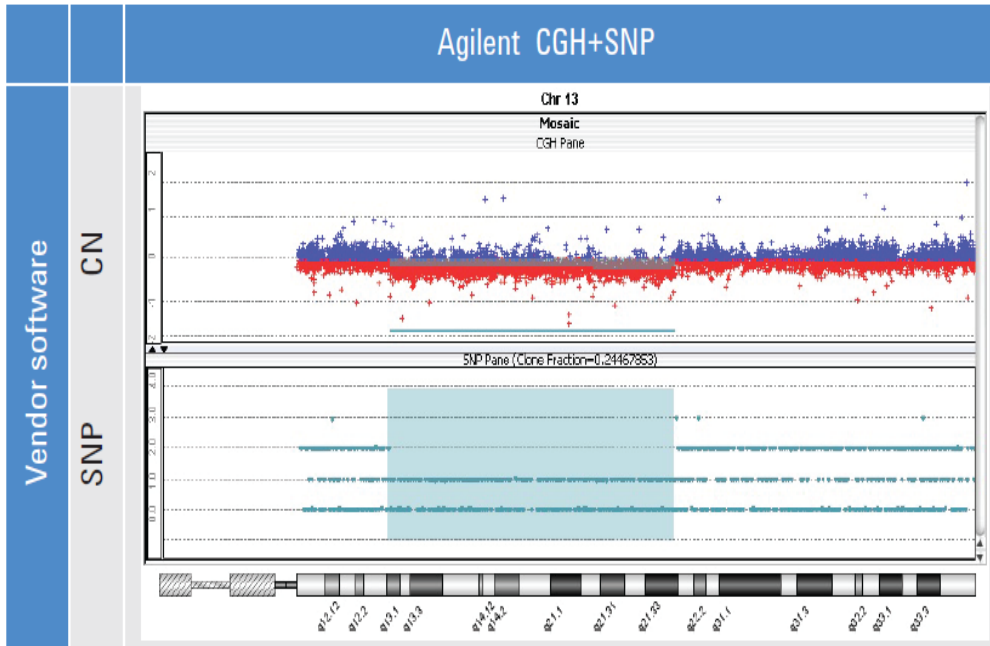
<http://agilentgenomics.com/>

アプリケーションノート	
5990-6274EN	CGH+SNP : Simultaneous Detection of Copy Number and Copy-Neutral LOH Using a Single Microarray SurePrint G3 CGH+SNP マイクロアレイ 2 x 400K および SurePrint G3 CGH+SNP マイクロアレイ 4 x 180K の仕様およびLOH検出例を紹介。SNP callの精度や SNP データ解析基本原理もあわせて紹介
5990-9183EN	CGH+SNP : Detecting copy-neutral LOH in cancer using Agilent SurePrint G3 Cancer CGH+SNP Microarrays SurePrint G3 Cancer CGH+SNP マイクロアレイ 4 x 180Kの仕様および aneuploid chronic lymphocytic leukemia (CLL) における copy neutral LOH を含む構造異常を検出した例。34% 正常細胞が混入した CLL 試料における構造異常の検出例も紹介。
5991-0409JAJP	CGH+SNP : 血液がんの細胞遺伝学的プロファイリングにおけるAgilent の CGH+SNP マイクロアレイの優れたコピー数検出力。 慢性リンパ性白血病 (CLL) と多発性骨髄腫 (MM) サンプルから精製した DNA を使い Agilent CGH+SNP マイクロアレイから得られたコピー数解析と LOH データの品質を Illumina 社の SNP マイクロアレイのものと比較しました。
5991-0643JAJP	CGH : 単一細胞を用いた高解像度オリゴ aCGH 解析を 24 時間で 1細胞からの DNA を全ゲノム増幅し CGH マイクロアレイ解析を行うプロトコルを紹介。胚からの単一細胞について Agilent SurePrint G3 Human Catalog 8x60K CGH マイクロアレイにより、既知および新規のゲノムコピー数変化を検出。
5989-6624JAJP	CGH : Agilent アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH)解析のための堅牢な全ゲノム増幅法 50ng のゲノムDNAからアレイCGH解析を実現するプロトコルを紹介。ヒト結腸がん細胞株 HT29 由来 ゲノムDNA 10ngを用いCGH解析を行い、増幅のないCGH解析結果との高い一貫性、同程度の低ノイズレベルを確認。断片化した同DNA 50ng でも良好な結果を取得。
5989-7120EN	CGH : FFPE 試料でも高い成功率でアレイ CGH 解析が可能 正常および乳がん試料からの DNA を用いた CGH マイクロアレイ解析例を ULS法ラベル化プロトコルの概要とともに紹介。乳がん試料では新鮮凍結試料による結果と高い一貫性をもち、かつ 1年、4年、10年保存された乳がん FFPE試料では HER-2 遺伝子領域の増幅を確認。

75%正常細胞が混入したMultiple Myeloma細胞によるLOH (deletion) 検出比較例

Agilent SurePrint G3 CGH+SNP 2x400K

Illumina HumanCytoSNP-12v1



BAF*: B-allele frequency

intensity of B allele /
(intensity of A allele + intensity of B allele)

	Diploid	Hemizygous deletion	Trisomy	cnLOH
1	—	—	—	—
0.75	—	—	—	—
0.50	—	—	—	—
0.25	—	—	—	—
0	—	—	—	—

SNPアレイでは欠失領域を検出していない
(cn LOHか1コピー欠失か判断が困難)

出典 Agilent Technology Application Note
5991-0409EN

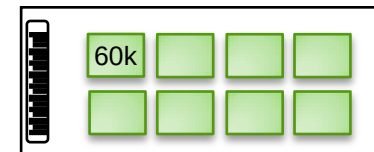
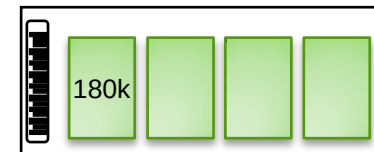
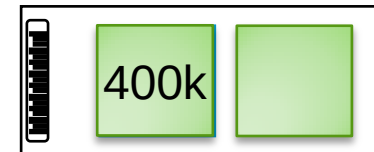
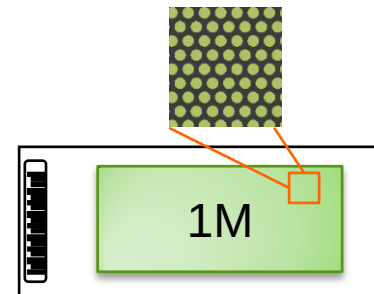
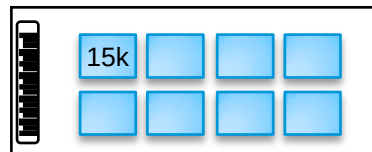
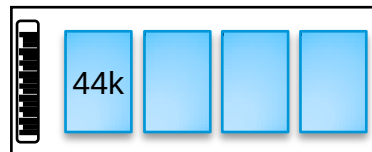
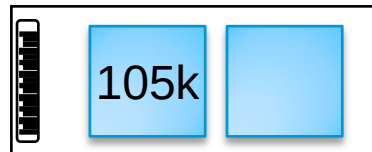
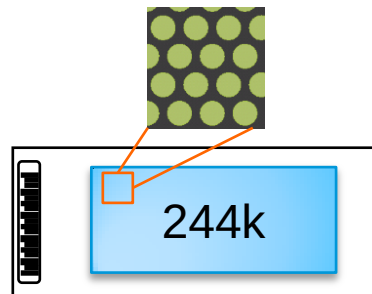
マイクロアレイ ラインナップ

アジレント マイクロアレイ フォーマット



B, Cスキャナ
SureScan

“HD”
(スポット径 ~65 μ m) “G3”
(スポット径 ~30 μ m)



Cスキャナ
SureScan

ゲノム構造解析のマイクロアレイの種類

カタログマイクロアレイ

CGH+SNP

コピー数変化 と コピー数変化を伴わない構造変化である LOH・UPD を同時に高解像検出

Exon領域フォーカス・コンソーシアムデザイン

CGH

高品質なコピー数変化の解析データを取得
(ヒト・マウス・ラット・その他モデル生物)

遺伝子領域フォーカス・コンソーシアムデザイン

CNV

Database of Genomic Variant 登録のCopy number variant (CNV) や
Segmental Duplication の領域によりフォーカスしたデザイン

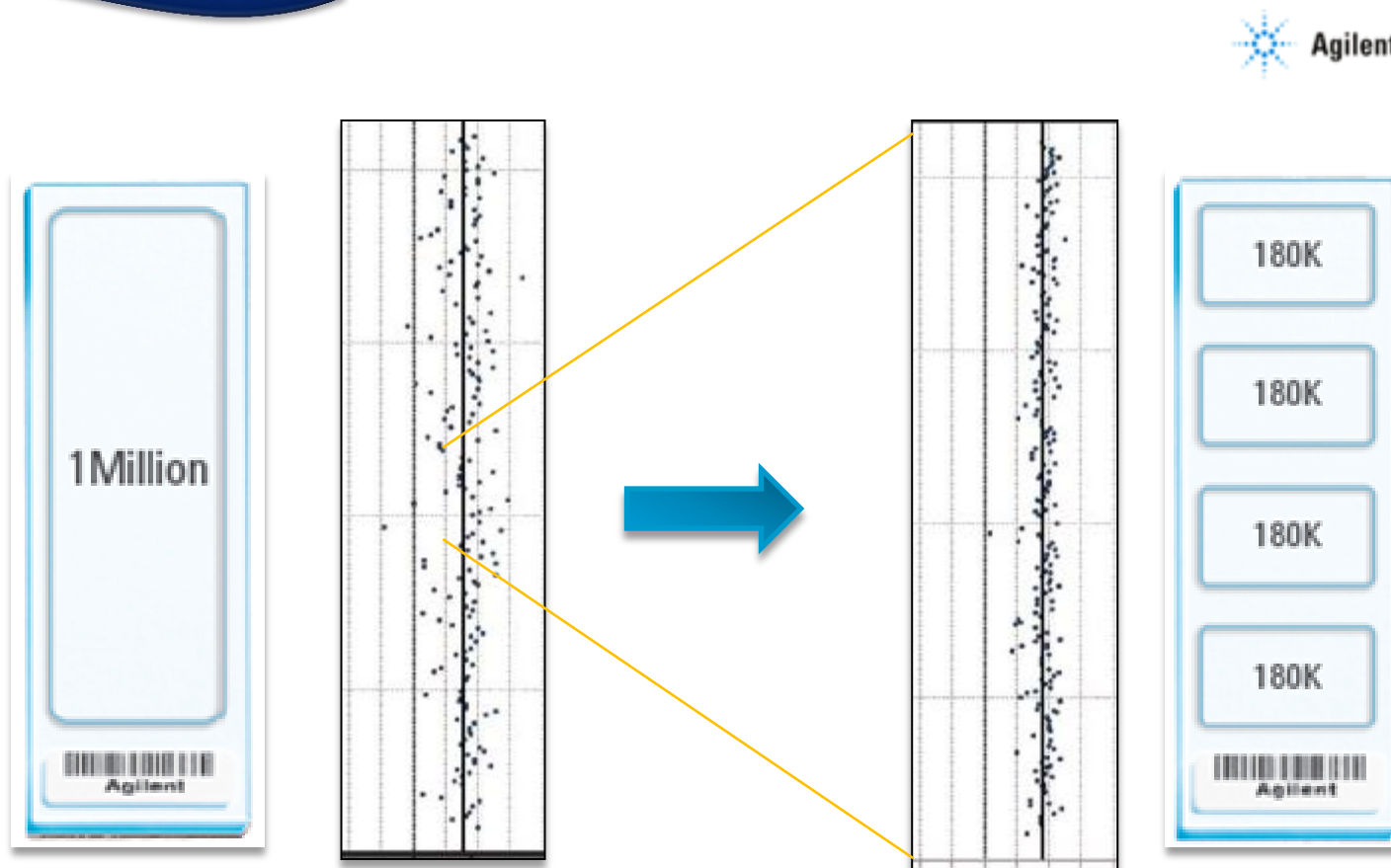
DGV登録CNV領域フォーカス・バイアスなしデザイン

ゲノム構造解析のマイクロアレイの種類

カスタムマイクロアレイ

カスタム

フォーカス領域・解像度・アレイフォーマットを自由に設定作成し、1枚からオーダー可能



臨床研究に重要な領域の染色体構造変化を効率的に検出

癌や既知ハプロ不全遺伝子、X連鎖性精神疾患関連領域などに
CGH プローブを高密度に配置し
微細なコピー数変化も検出する一方、
その他の領域にもまんべんなくプローブを配置し
新規の大きな構造変化も検出可能なようにデザイン

SurePrint G3 Cancer CGH+SNP 4x180K

Cancer Cytogenomics Microarray Consortium によるデザイン

SurePrint G3 CGH+SNP 4x180K

ISCA (The International Standards for Cytogenomic Arrays) consortium によるデザイン



遺伝子領域の網羅的な解析に

エクソン領域にCGH プローブをより高密度に配置し
遺伝子領域に生じる微細なコピー数変化を検出。
網羅的解析・新規構造変化検出に。

SurePrint G3 CGH+SNP 2x400K

いずれもゲノムワイドにSNPプローブを配置し
ゲノムワイドにLOH・UPDを検出



		Cancer CGH+SNP 4x180K	CGH+SNP 4x180K	CGH+SNP 2x400K
CGH	ターゲット領域	癌関連領域 - Sanger 癌遺伝子: 427 - その他癌関連遺伝子: ~100 - 既知癌関連領域, サブテロメア領域: ~130 - 各遺伝子の15 kb 近傍領域	ISCA領域 (~500) - テロメア・ユニークセントロメアFISHクローン領域 - 微細欠失/重複領域 - ハプロ不全が報告されている遺伝子 - X連鎖性精神疾患の関連領域	- 遺伝子・exon 領域 - RefSeq Gene 領域を広くカバー
	Refseq 遺伝子 (26,855) coverage (1 probe $\leq$)		20,847	25,245
	median probe spacing	癌関連領域: 1 probe/0.5–1 kb (min. 1 probe/exon, max. 200 probes/gene) Overall: 25 kb	ISCA領域: 5kb Intragenic: ~21kb Intergenic: ~21kb Overall: ~25 Kb	Intragenic: ~4kb Intergenic: ~16kb Overall: ~7 Kb
SNP	SNP数	~60,000	~60,000	~65,000
	LOH/UPD 解像度	5-10Mb	5-10Mb	5-10Mb

1. AluI & RsaI Cut Sites in Genome:
17,838,944

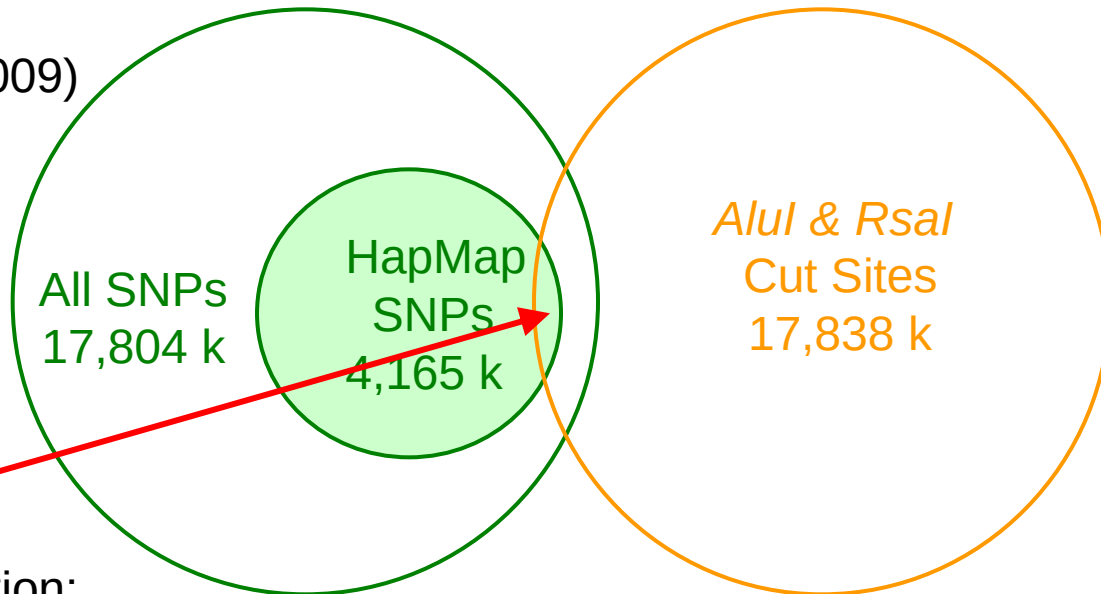
2. # SNPs in genome:
~17,804,034 (Sep 3rd 2009)

3. Overlap between 1 and 2:
800,000 SNPs

4. # polymorphic HapMap SNPs:
~4,165,774

5. Overlap between 3 and 4:
~124,000 SNPs

6. MAF > 5% and empirical validation:
~**65,000 SNPs**



Corresponds to ~5-10 Mb LOH resolution

臨床研究に重要な領域の染色体構造変化を効率的に検出

ISCA 標的領域* にCGH プローブを高密度に配置し
微細なコピー数変化も検出する一方、
その他の領域にもまんべんなくプローブを配置し
新規の大きな構造変化も検出可能なようにデザイン。

SurePrint G3 CGH ISCA (4x180K, 2x105K, 8x60K, 4x44K)

ISCA (The International Standards for Cytogenomic Arrays) consortium
によるデザイン

*ISCA では、原因不明の発達遅延・intellectual disability・自閉症・その他発達障害を含む小児疾患の clinical genetic testing のためのマイクロアレイ標準デザインを目指し、世界中の参加施設よりデータを収集・評価しています。
(2012年10月にInternational collaboration for Clinical Genomicsに名称を変更)



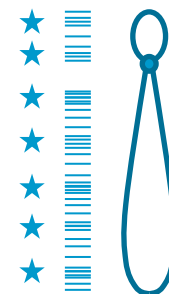
★ : ISCA標的領域

遺伝子領域の網羅的な解析に

エクソン領域にCGH プローブをより高密度に配置し
遺伝子領域に生じる微細なコピー数変化を検出。
網羅的解析・新規構造変化検出に。

SurePrint G3 CGH (1x1M, 2x400K, 4x180K, 8x60K)

HD CGH (1x244K, 2x105K, 4x44K, 8x15K)



★ : 遺伝子領域

		CGH 1x1M	CGH 2x400K	CGH 4x180K	CGH 8x60K
					
Total features		974,016	420,288	180,880	62,976
Genome build		hg18	hg18	hg18	hg18
Exonic probes		5.3%	8.70%	14.1%	25.9%
Intragenic probes		53.4%	53.0%	55.0%	67.2%
Intergenic probes		46.6%	47.0%	45.0%	32.8%
Median probe spacing	Intragenic	1.8 kb	4.6 kb	11.2 kb	33.3 kb
	Intergenic	2.8 kb	6.9 kb	17.7 kb	78.9 kb
	CNV	2.1 kb	5.2 kb	12.7 kb	26.7 kb
	Overall	2.1 kb	5.3 kb	13.1 kb	41.4 kb
Average probe spacing	Overall	3.1 kb	7.3 kb	17.6 kb	54.5 kb
RefSeq coverage (% of 18,698 genes)	At least 1 probe	93.9%	92.1%	88.8%	83.2%
	>=3	81.2%	67.0%	46.4%	24.5%
Cancer gene coverage (% of 362 genes)	At least 1 probe	98.9%	98.9%	98.1%	97.0%
	>=3	95.0%	87.3%	77.3%	62.4%

		CGH 1x244K 	CGH 2x105K 	CGH 4x44K 
Total features		243,504	105,072	45,220
Genome build		hg18	hg18	hg18
Exonic probes		14.3%	22.7%	37.0%
Intragenic probes		55.9%	61.0%	77.0%
Intergenic probes		44.1%	39.0%	22.3%
Median probe spacing	Intragenic	7.4 kb	18.9 kb	24 kb
	Intergenic	13.4 kb	39.4 kb	148.7 kb
	CNV			
Overall		8.9 kb	21.7 kb	43 kb
Average probe spacing	Overall	12.7 kb	30.3 kb	70.4 kb
RefSeq coverage (% of 18,698 genes)	At least 1 probe	92.8%	90.7%	85.5%

Mouse/Rat CGHマイクロアレイ 仕様

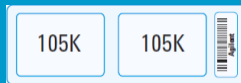
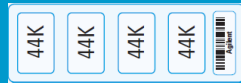
CGH

		CGH SurePrint G3				CGH HD			
		Mouse		Rat		Mouse			Rat
		1x1M	4x180K	1x1M	4x180K	1x244K	2x105K	4x44K	1x244K 2x105K
AMADID		027414	027411	027065	027064	014695	014699	014868	015223 015235
Genome build		mm9	mm9	rn4	rn4	mm8	mm8	mm6	rn4 rn4
Intragenic probes		55.3%	50.9%	43.0%	38.8%	68.4%	69.6%	73.3%	48.8% 50.5%
Intergenic probes		43.5%	43.1%	55.8%	55.1%	31.6%	30.4%	26.7%	51.2% 49.5%
Median probe spacing	Intragenic	1.5kb	9.1 kb	1.3 kb	8.0 kb	6.2 kb	15.7 kb		4.7 kb 11.4 kb
	Intergenic	2.5 kb	14.0 kb	2.4 kb	14.5 kb	15.2 kb	36.8 kb		14.9 kb 37.1 kb
	Overall	1.8 kb	10.9 kb	1.7 kb	10.7 kb	7.8 kb	19.3 kb		8.0 kb 19.1 kb
Average probe spacing	Overall	2.7 kb	15.1kb	2.8 kb	16.0 kb	12.7 kb	30.3 kb	70.4 kb	
RefSeq* coverage	At least 1 probe	87.9%	73.9%	89.9%	73.8 %	98.3%	98.3%		99.6% 99.6%
RefSeq* coverage (+/- 5kb)	At least 1 probe	96.1%	94.8%	98.0%	97.4 %				

*25,767 mouse genes
16,168 rat genes

ISCA 標的領域

- テロメア・ユニークセントロメアFISHクローン領域
 - 微細欠失/重複領域
 - ハプロ不全が報告されている遺伝子
 - X連鎖性精神疾患の関連領域
- など

	SurePrint G3 human CGH ISCA v.2 4×180K	SurePrint G3 human CGH ISCA v.2 8×60K	Human Genome CGH ISCA v.2 2×105K	Human Genome CGH ISCA v.2 4×44K
				
ISCAターゲット 領域数	~500	~500	~500	~230
ISCAターゲット領 域 probe spacing* (max)	5kb	5kb	5kb	5kb
Backbone probe spacing (median)	25Kb	60Kb	35Kb	75Kb

*at least 10-20 probes/region

■ 既知CNV領域に検出

Database of Genomic Variant 登録のCopy number variant (CNV) や Segmental Duplication の領域によりフォーカスしたデザイン

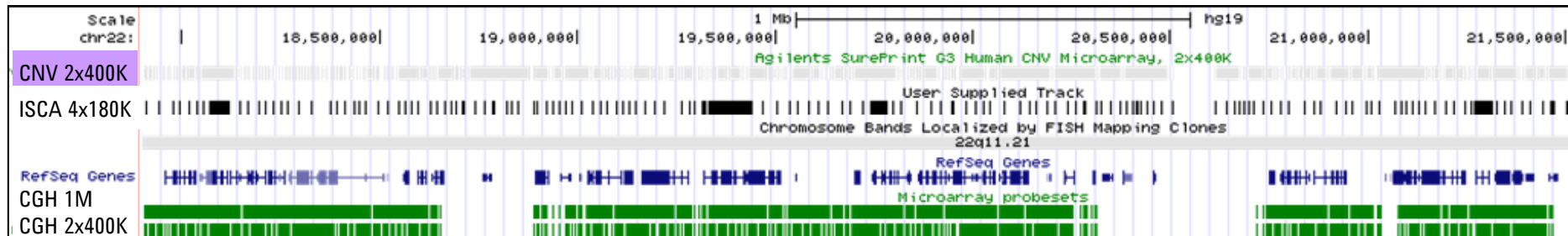
★ 最新のDGV登録CNV領域にフォーカスしたデザインについては
カスタムアレイの作成をお勧めいたします。

SurePrint G3 2x400K CNV

■ 新規CNV Discovery などに

領域にバイアスをかけないでゲノム全体にプローブを配置
(平均 probe spacing 3.1kb)

SurePrint G3 Human High-Resolution Discovery 1x1M



		CNV 2x400K 	Human High-Resolution Discovery 1x1M 
Total features		420,288	974,016
Genome build		hg18	hg18
Exonic probes		17,588 (4.3%)	
Intragenic probes		207,876 (50.3%)	
Intergenic probes		205,016 (49.7%)	
Median probe spacing	Intragenic	920	
	Intergenic	1,077	
	CNV	1,130	
	Overall	1,056	2,628
Average probe spacing	Overall	6,630	3,056
RefSeq coverage (18,698 genes)	At least 1 probe	11,752 (62.9%)	
	>=3	6,799 (36.4%)	
Cancer gene coverage (362 genes)	At least 1 probe	274 (75.7%)	
	>=3	156 (43.1%)	
CNV coverage (CNVs < 10 kb size) from DGV v5	At least 1 probe	5,495/6,481 (84.8%)	CNV coverage (DGV ver 7) >=1: 18,824 (88.8%) >=5: 11,333 (53.5%)
	>=4	3,270/6,481 (50.5%)	
CNV coverage (CNVs > 10 kb size) from DGV v5	At least 1 probe	10,706/11,159 (95.9%)	
	>=4	10,190/11,159 (95.9%)	

その他モデル生物を含めた カタログCGH+SNP / CGH / CNV マイクロアレイ 一覧

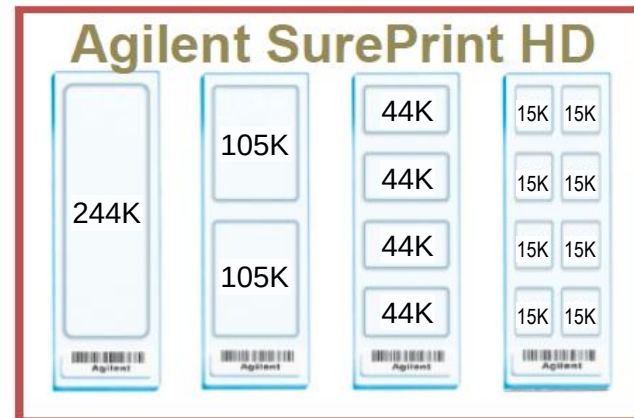
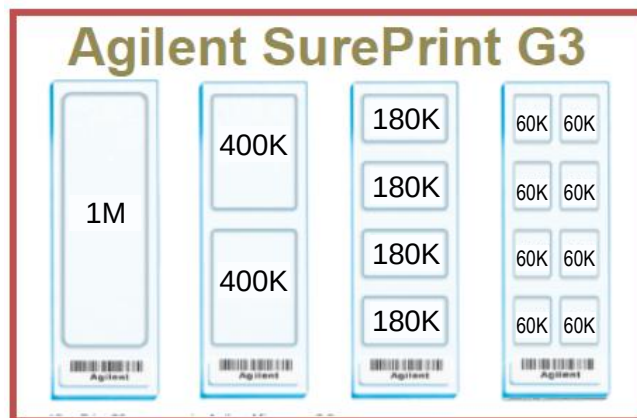
		G3	HD
Human	CGH	• SurePrint G3 Human CGH 1x1M • SurePrint G3 Human CGH 2x400K • SurePrint G3 Human CGH 4x180K • SurePrint G3 Human CGH 8x60K	• Human Genome CGH 244K • Human Genome CGH 2x105K • Human Genome CGH 4 × 44K
	CGH+SNP	• SurePrint G3 CGH+SNP 2x400K • SurePrint G3 CGH+SNP 4x180K	
	ISCA	• SurePrint G3 human CGH ISCA v.2, 4 × 180K* • SurePrint G3 human CGH ISCA v.2, 8 × 60K*	• Human Genome CGH ISCA v.2, 2 × 105K* • Human Genome CGH ISCA v.2, 4 × 44K*
	CNV	SurePrint G3 Human CNV 2x400K	Human CNV 2x105K
	Discovery	SurePrint G3 Human High-Resolution Discovery 1x1M	
Mouse	CGH	• SurePrint G3 Mouse CGH 1x1M • SurePrint G3 Mouse CGH 4x180K	• Mouse Genome CGH 244K • Mouse Genome CGH 2x105K • Mouse Genome CGH 4x44K *
Rat	CGH	SurePrint G3 Rat CGH 1x1M SurePrint G3 Rat CGH 4x180K	Rat Genome CGH 244K Rat Genome CGH 2x105K
Chicken	CGH		Chicken Genome CGH 244K *
Chimpanzee	CGH	SurePrint G3 Chimpanzee CGH 4x180K *	
Rhesus Macaque	CGH	SurePrint G3 Rhesus Macaque CGH 4x180K *	
Bovine	CGH	SurePrint G3 Bovine CGH 4x180K *	
Canine	CGH	SurePrint G3 Canine CGH 4x180K *	
Rice	CGH	SurePrint G3 Rice CGH 4x180K *	

* 受注製造マイクロアレイ

カスタムマイクロアレイ

(CGH+SNP・CGH)

eArray で自由にカスタムアレイをデザイン、1枚からオーダー可能
(<https://earray.chem.agilent.com/earray/>)



ログイン

ユーザー登録無料
(ご利用約款への
同意が必要です)



プローブ選択

アジレント設計
プローブ
データベース
から検索・選択



フォーマット選択

マイクロアレイの
フォーマットを選択
(CGH+SNP
カスタムアレイは
SurePrint G3 のみ)

アレイの注文

1枚から
オーダー可能

recommend
more than 150 to 200 bp spacing

eArrayの CGH, SNP プローブ データベースコンテンツ

カスタム

Species	CGH カスタムアレ イ対応生物種	CGH+SNP カスタムアレ イ対応生物種	# CGH probes	# SNP probes
Human (<i>Homo sapiens</i>)	○	○	~28.7 M	~120,000 (corresponding to ~65,000 SNPs)
mouse (<i>Mus musculus</i>)	○		~19.1M	
rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	○		~18.5M	
Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	○			
Nematodes (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	○		~1.2M	
Chicken (<i>Gallus gallus</i>)	○		~4.1M	
Cow (<i>Bos Taurus</i>)	○		~4.1M	
dog (<i>Canis familiaris</i>)	○		~4.4M	
Rice (<i>Oryza sativa</i>)	○			
Chimpanzee (<i>Pan troglodytes</i>)	○		~4.7M	
rhesus macaque (<i>Macaca mulatta</i>)	○		~5.7M	

CCMC・ISCA マイクロアレイコンテンツ+ 標的領域のカスタムマイクロアレイも

カスタム

Design Your Custom ISCA Microarray

Use the ISCA targeted regions probe groups and add your own content in eArray, Agilent's free, web-based tool to create custom array designs.

例：

4x180K CGH+SNP Cancer
癌関連領域プローブ：~20,000

4x180K ISCA CGH

ISCA focus 領域プローブ：~21,000

☐	Probe Group Name ▲	No. of Probes
☐	ISCA CGH 105K backbone	80757
☒	ISCA CGH 105K targeted regions v2	19647
☐	ISCA CGH 180K backbone	125061
☒	ISCA CGH 180K targeted regions v2	21445
☐	ISCA CGH 44K backbone	40161
☒	ISCA CGH 44K targeted regions v2	2934
☐	ISCA CGH 60K backbone	40208
☒	ISCA CGH 60K targeted regions v2	18851
☐	ISCA CGHplusSNP 180K backbone	91834
☒	ISCA CGHplusSNP 180K targeted regions v2	18878
Share Compare Create Microarray Move		

Visit: <https://www.agilent.com/genomics/earray>

プローブがデータベースにないとき CGH Genomic tilling 機能によりProbe をデザイン

カスタム

Agilent Technologies eArray

Workspace Collaboration Public

Home Microarray Probe Group **Probe** My Account Data

Search | Upload | **Genomic Tiling** | Reannotate | Score Custom Probes | DNA Analytics Download

Application Type CGH

Welcome Yuko S.

Probe Details

Job Name

Probe Length bp

☒ Average Probe Spacing

☐ Number of Probes per Sequence

☐ Total Number of Probes

Target File Details

Species

Genome Build

Genomic Intervals

☒ Avoid Standard Masked Regions

☐ Allow Probes to be Trimmed

☒ Avoid Restriction Sites

Preferred Probe Tm °C

対応生物種

Arabidopsis thaliana

Cow (Bos Taurus)

*Nematodes
(Caenorhabditis elegans)*

dog (Canis familiaris)

Drosophila melanogaster

Danio rerio

Chicken (Gallus gallus)

Human (Homo sapiens)

mouse (Mus musculus)

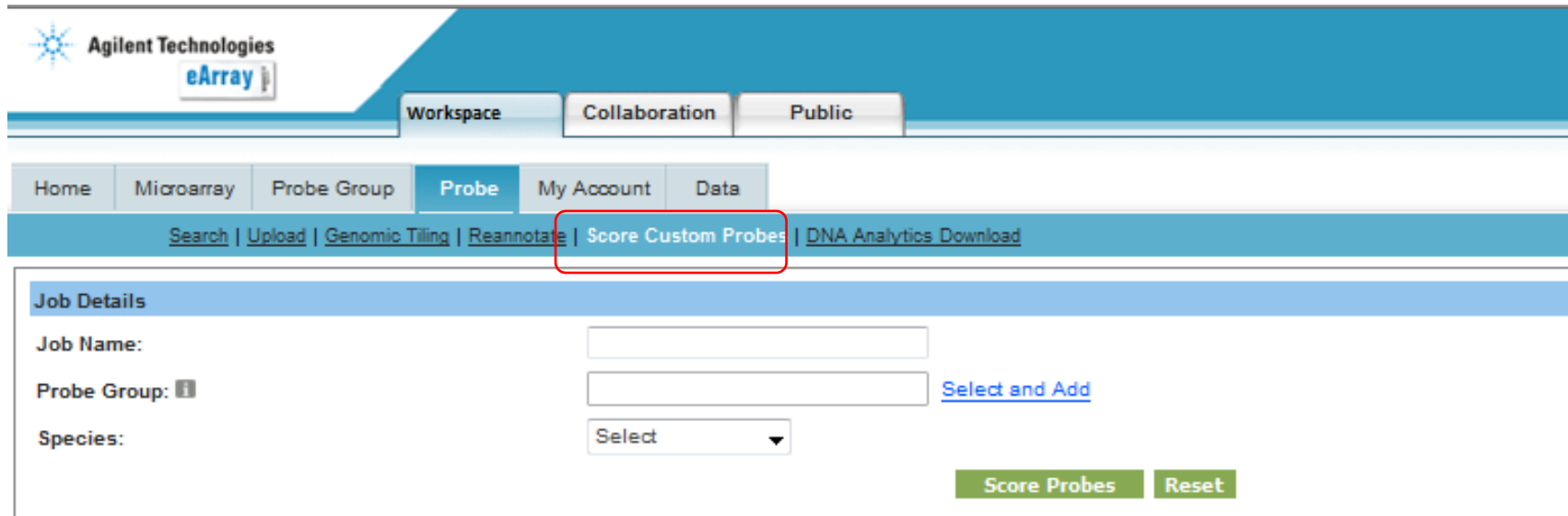
rat (Rattus norvegicus)

Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces pombe

Probe Scoring 機能にて作成したプローブの scoring が可能

カスタム



The screenshot shows the Agilent Technologies eArray web interface. The top navigation bar includes 'Workspace', 'Collaboration', and 'Public'. Below this, a secondary navigation bar has 'Home', 'Microarray', 'Probe Group', 'Probe', 'My Account', and 'Data'. The 'Probe' tab is selected. A red box highlights the 'Score Custom Probes' link in the 'Probe' tab's sub-menu. Other links in the sub-menu include 'Search', 'Upload', 'Genomic Tiling', 'Reannotate', and 'DNA Analytics Download'. The 'Job Details' section contains input fields for 'Job Name', 'Probe Group' (with a help icon), and 'Species' (a dropdown menu). A 'Select and Add' link is next to the 'Probe Group' field. At the bottom right of the 'Job Details' section are 'Score Probes' and 'Reset' buttons.

- T_m
- GC content
- a hairpin ΔG
- sequence complexity
- リファレンスゲノム配列の他領域とのhomologyを計算するメトリクスなどを考慮

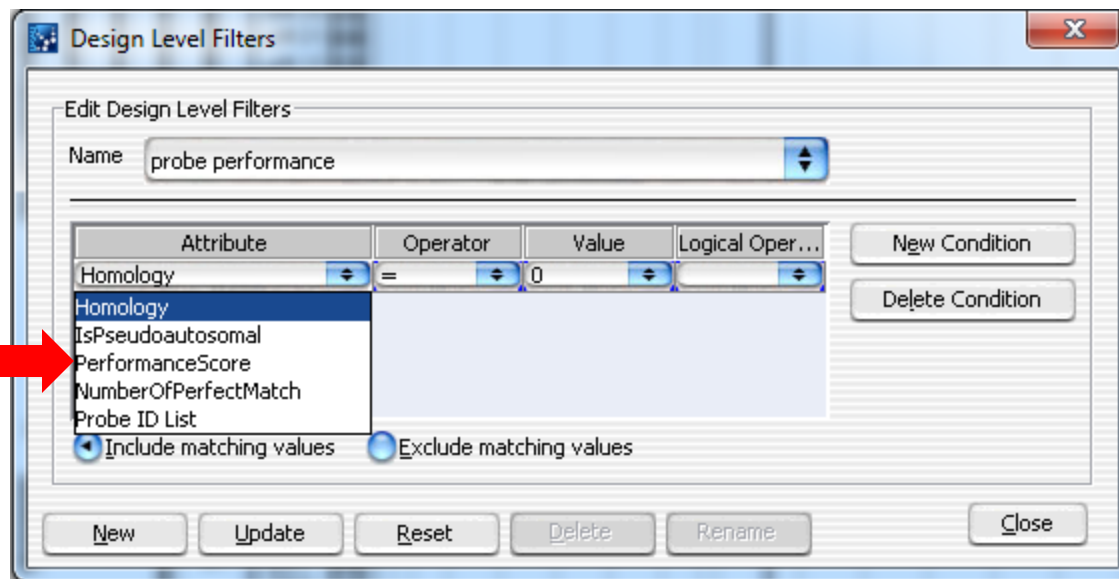
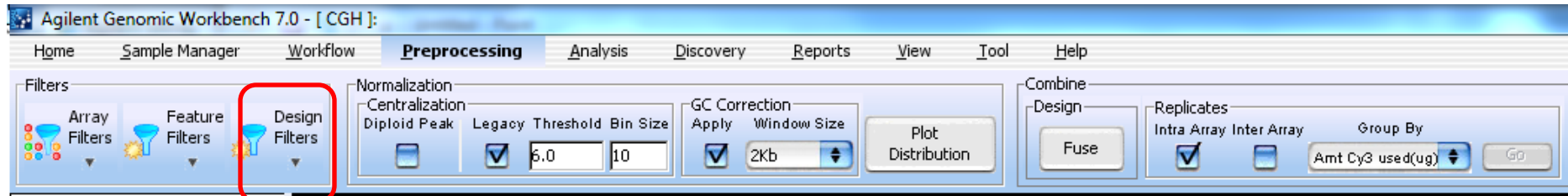
平均 probe score

HD database の全プローブ : 0.759

Agilent SurePrint G3 Human CGH Microarray 1x1 M : 0.917

解析時にProbe Performance Scoreで 解析データを選択することが可能

カスタム



※Probe Score機能によりスコアリングされたprobeを用いたアレイにのみ有効

サンプル：血液・唾液

CGH+SNP:

- CGH+SNP ISCA マイクロアレイ, 4x180K
- CGH+SNP 2x400K
- CGH+SNP カスタムマイクロアレイ: 1x1M, 2x400K, 4x180K, 8x60K

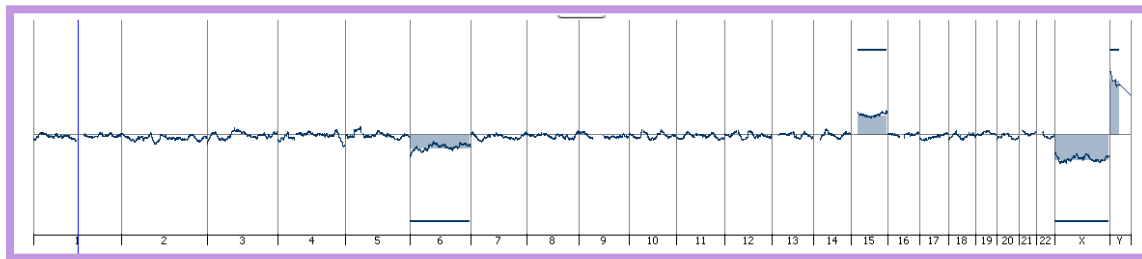
CGH:

- G3 CGHマイクロアレイ: 1x1M, 2x400K, 4x180K, 8x60K
- G3 カスタムマイクロアレイ: 1x1M, 2x400K, 4x180K, 8x60K
- HD カタログ・カスタムマイクロアレイ
- CGH ISCA マイクロアレイ: 4x180k, 8x60k, 2x105k, 4x44k

疾患研究（発生学研究, がん研究）アプリケーション： 1 細胞

サンプル：1 細胞

CGH-only Gene-biased Catalog array, 8x60K



約24時間でCGH解析が可能



サンプル：血液, 骨髄, 凍結組織, FFPE

CGH+SNP:

- CGH+SNP Cancer, 4x180K
- CGH+SNP 2x400K
- CGH+SNP カスタムマイクロアレイ: 1x1M, 2x400K, 4x180K, 8x60K

CGH:

- G3 CGHマイクロアレイ: 1x1M, 2x400K, 4x180K, 8x60K
- G3 カスタムマイクロアレイ: 1x1M, 2x400K, 4x180K, 8x60K
- HD カタログ・カスタムマイクロアレイ

試薬、 解析ソフトウェア

DNAのラベル化試薬

細胞・組織・血液からのゲノムDNAに

SureTag Complete DNA Labeling Kit [5190-4240]
Purification Columns [5190-3391]

- ラベル化に必要な試薬類がすべて1キットに
(制限酵素・ラベル化試薬・ラベル化DNA精製カラム)
- リファレンス用のゲノムDNAも付属*
(human Male・Female 各25μgずつ)
- 弊社従来品よりさらにラベル化・ハイブリダイゼーション性能が向上

*付属していないものも販売 型番：5190-3440



ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）試料からのゲノムDNAに

Genomic DNA ULS Labeling Kit [5190-0410]

SureTag Complete DNA Labeling Kitの Reference DNA 内容

■高品質なゲノムDNA

- ゲノムコピー数変化の少ない、individual male、female 由来の細胞株から調製
- ゲノム安定性はカリオタイプで確認。

■Agilent CGH・CGH+SNP マイクロアレイ実験に使用可能

- Nanodrop と Qubit で定量し、200ng/ul の濃度で提供
- Genotype・sequenceずみ。CGH+SNPマイクロアレイのreferenceとして使用可能

■Agilent から安定して提供

- マイクロアレイハイブリダイゼーション時に使用
非特異的なハイブリダイゼーションを防ぐ目的で、
繰り返し配列をブロックするために用いられます。
- Agilent CGH、CGH+SNP マイクロアレイ実験に最適化

型番	内容量	
5190-3393	625 ug	1x1M, 1x244K: 12 マイクロアレイ 2x400K, 2x105K: 25 マイクロアレイ 4x180K, 4x44K: 125 マイクロアレイ 8x60K, 8x15K: 312 マイクロアレイ

ハイブリダイゼーション・洗浄に必要な装置・試薬

ハイブリダイゼーション

試薬



Agilent Oligo
aCGH/ChIP-on-Chip
hybridization kit

機器



ハイブリダイゼーション
チャンバ

消耗品



バスケットスライド



ハイブリダイゼーション
オーブン

洗浄

試薬



Agilent Oligo
aCGH/ChIP-on-Chip
Wash Buffer 1 and 2

機器



洗浄容器

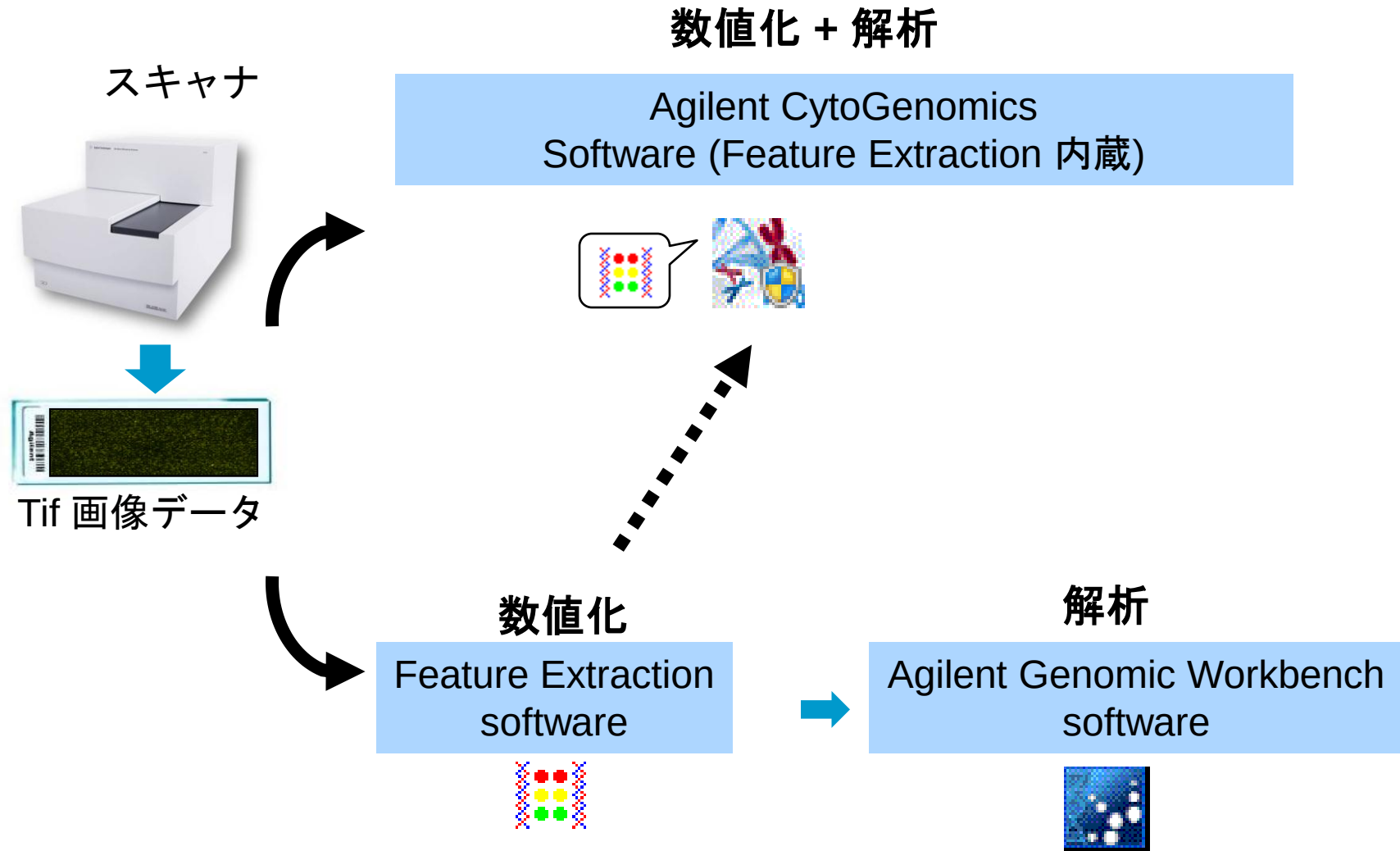
SureScan

より確かな結果を生む 高性能スキャナ

- 自動でスライドを連続スキャン
- スキャナのロットをランダムな順番にスキャン可能
- スキャン中にもスライドを追加可能
- Feature Extraction softwareと自動連動
- スキャンと連動したデータ解析も可能
- 高感度
- 広いダイナミックレンジ
- 高解像度 (10, 5, 3, 2 ミクロン スキャン可能)
- Ozone protection システム (定期的なフィルタの交換が必要)
- ISO 13485 certified の製造プロセス
- よりコンパクトな設計



スキャナで取得した画像データを解析するために 必要なソフトウェア（数値化と解析）



データ解析ソフトウェア

Agilent CytoGenomics

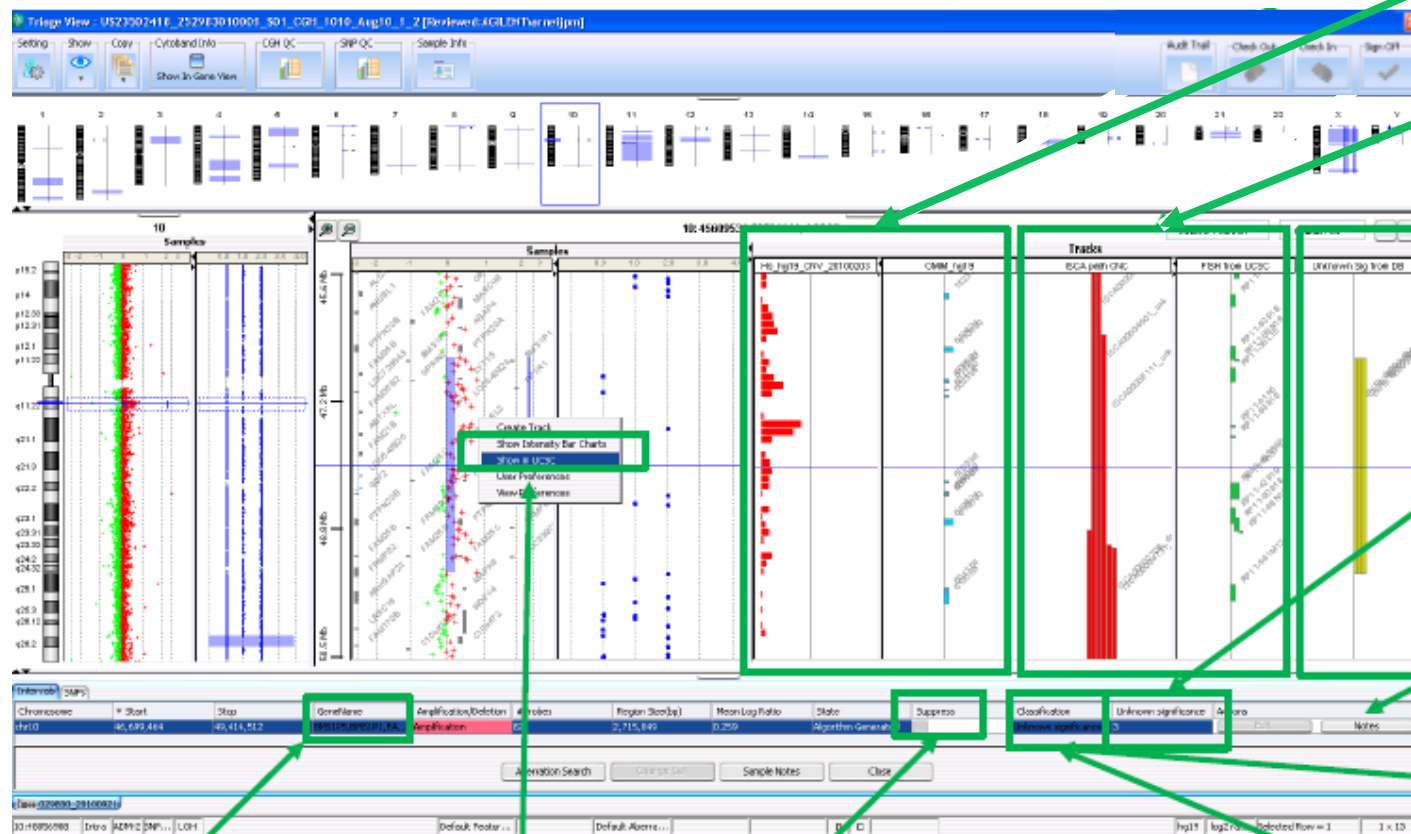
- シンプルな操作でスキャン画像から直接レポート出力可能。効率的な解析ワークフロー
- コピー数変化 と LOH のデータを簡単に可視化
- 3倍体・不均衡 4倍体 の解析も可能
- UCSC や ISCA など公的データベースに基づくTrackをインポート可能(予めソフトウェアにインポート済みのデータベースもあります)
- CYtoGenomicsソフトウェアの画面から直接SureFISH のプロブの検索が可能
- Clonal fraction を自動計算 (CGH+SNP使用時)



データのトリージ画面



CytoGenomics



DBG (Database of Genomic Variants)や OMIMのtrackを予めソフトに内蔵

自分で作成したトラックを表示

CytoGenomicsで解析したデータに基づくトラック (例 Pathogenic, Benign, Uncertain) を作成・表示

検出された構造変化領域がこれまでの解析データの何サンプルで検出されているかを表示

検出された構造変化領域にコメント入力

検出領域を自由に分類 (例Pathogenic, Benign, Uncertain)

検出領域中に含まれる遺伝子を表示。DBGやOMIM、Entrezなどの公的データベースにリンク

変化領域をUCSC genome browser上に表示

検出領域をレポートから消去

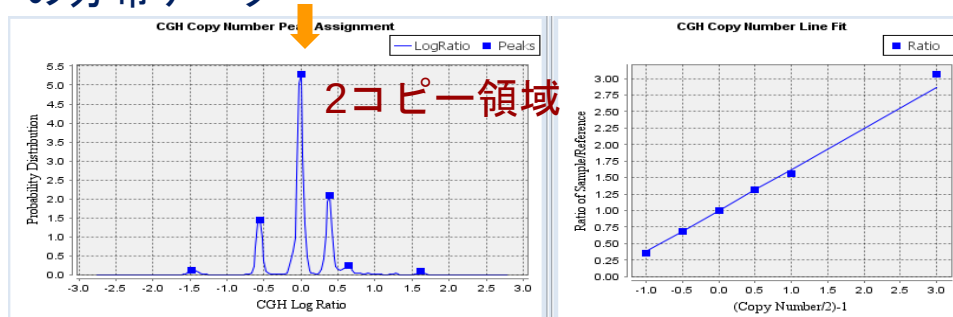
検出領域について、これまでに解析したデータ中に重なる領域があるか検索可能。新しいTrackとして表示。

ゲノムの大部分の領域がコピー数変化を生じている場合に有用な機能



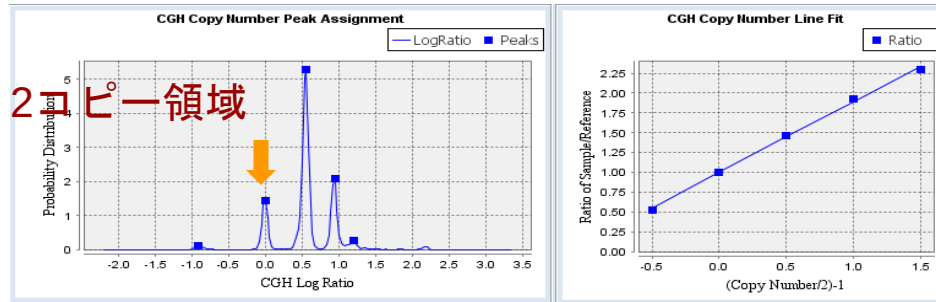
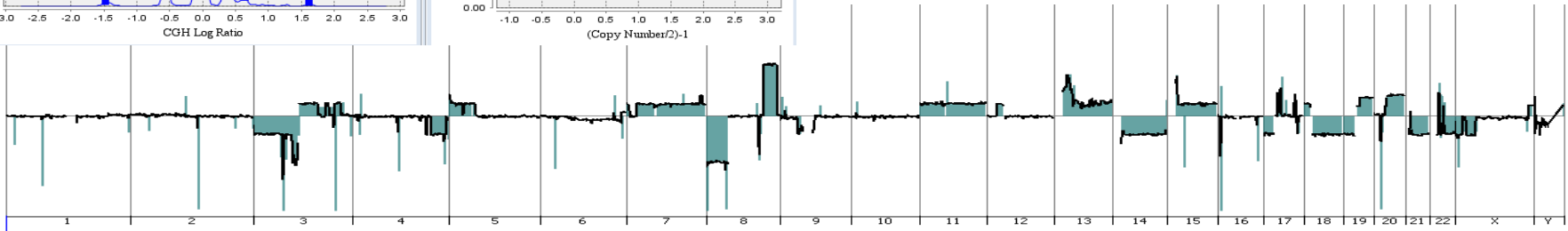
CytoGenomics

CGHの $\text{Log}_2(\text{Test/Reference})$ 比の分布データ

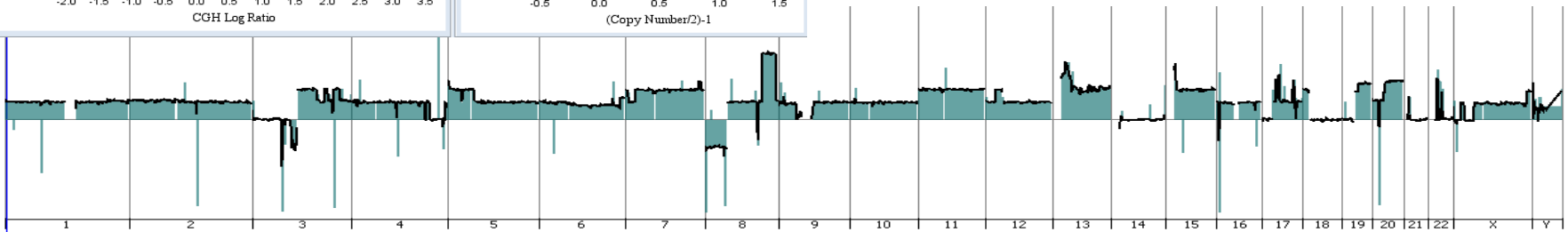


デフォルトではCGHの $\text{Log}_2(\text{Test/Reference})$ Ratioの分布で最も高いピークが2コピーとして検出

Sample: HT29



自分で2コピーの領域を変更可能



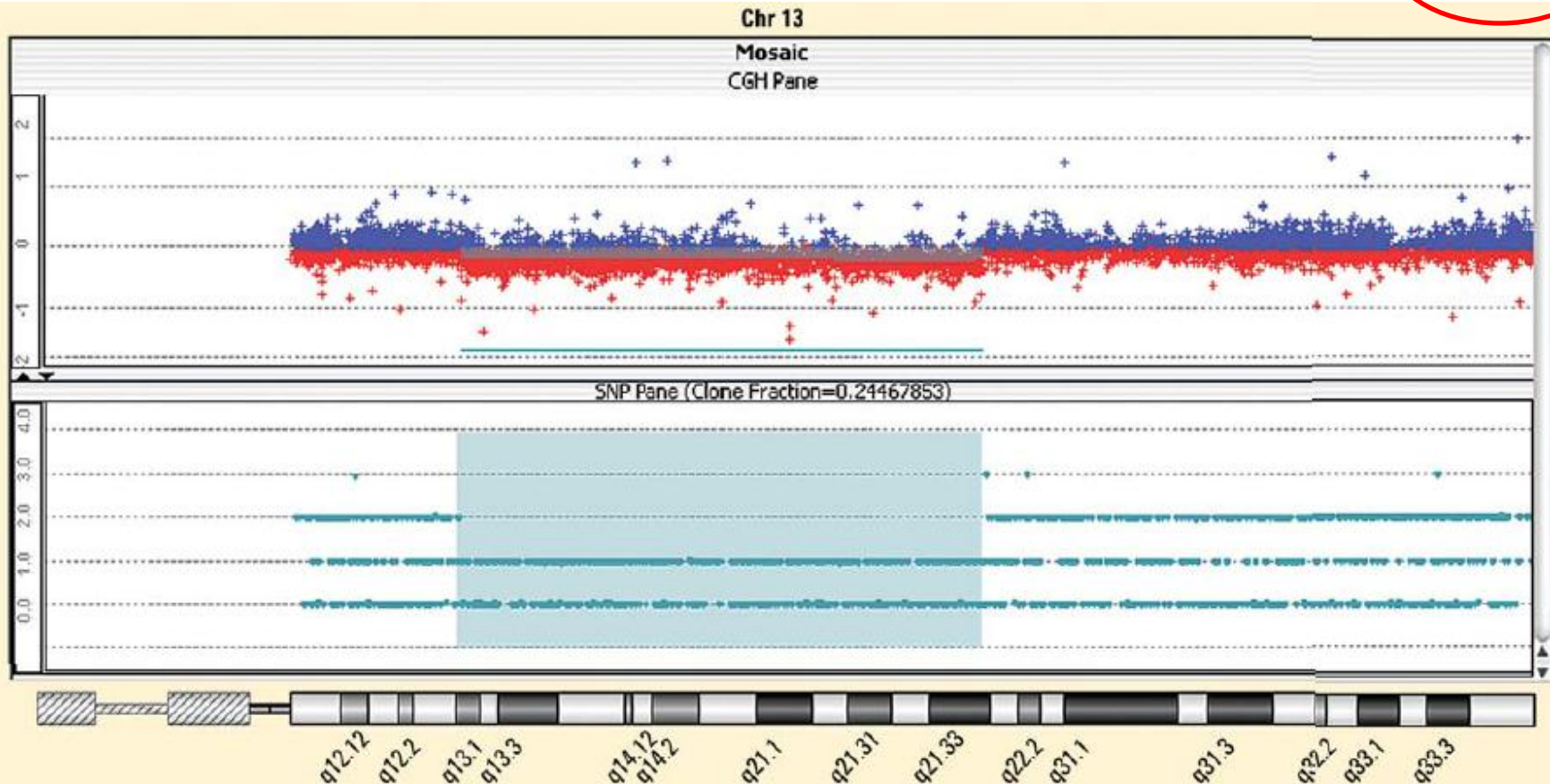
Clonal fractionを自動算出 (CGH+SNPマイクロアレイ使用時)



CytoGenomics

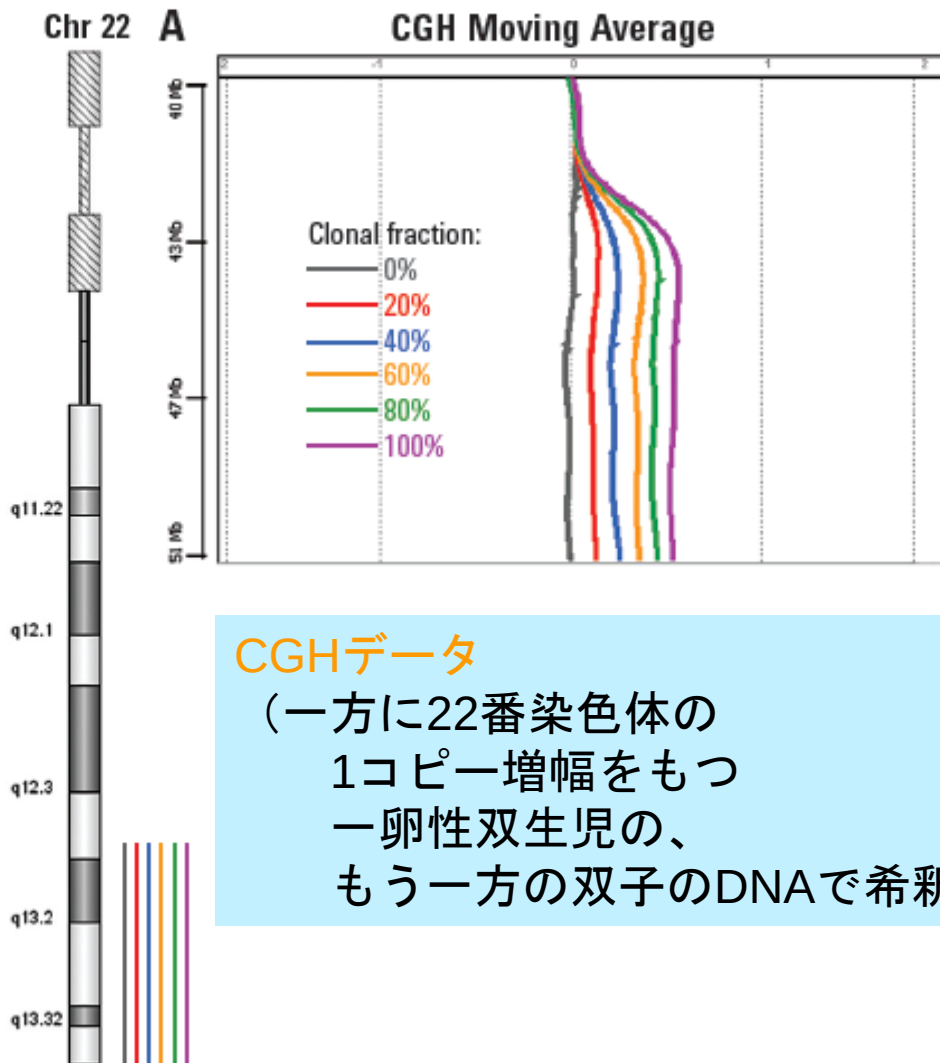
SNP CN QC Metrics Table

DerivativeLR_Spread	RestrictionControl	Reference Correct	SNP Call Rate	Heterozygosity	Goodness of Fit (Diploid Region)	Separability	Call Ambiguity	Clone Fraction
0.135203	NA	1.000000	0.978912	0.211469	0.015586	0.898561	0.001000	0.244679



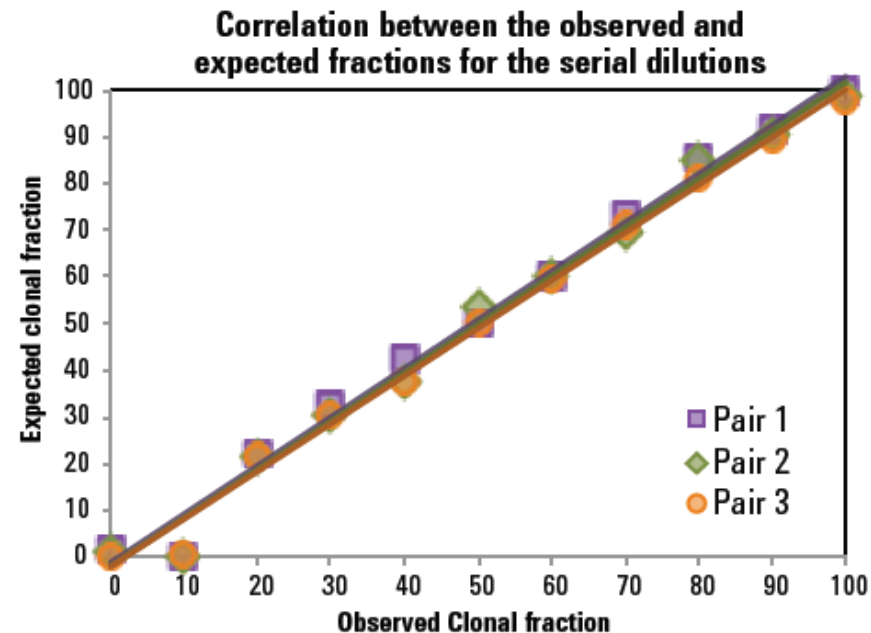
SNPデータはClonal Fractionを考慮して計算されるため
低ノイズのデータが得られます

Clonal Fraction 20%まで正確に検出



CGHデータ

(一方に22番染色体の
1コピー増幅をもつ
一卵性双生児の、
もう一方の双子のDNAで希釈)



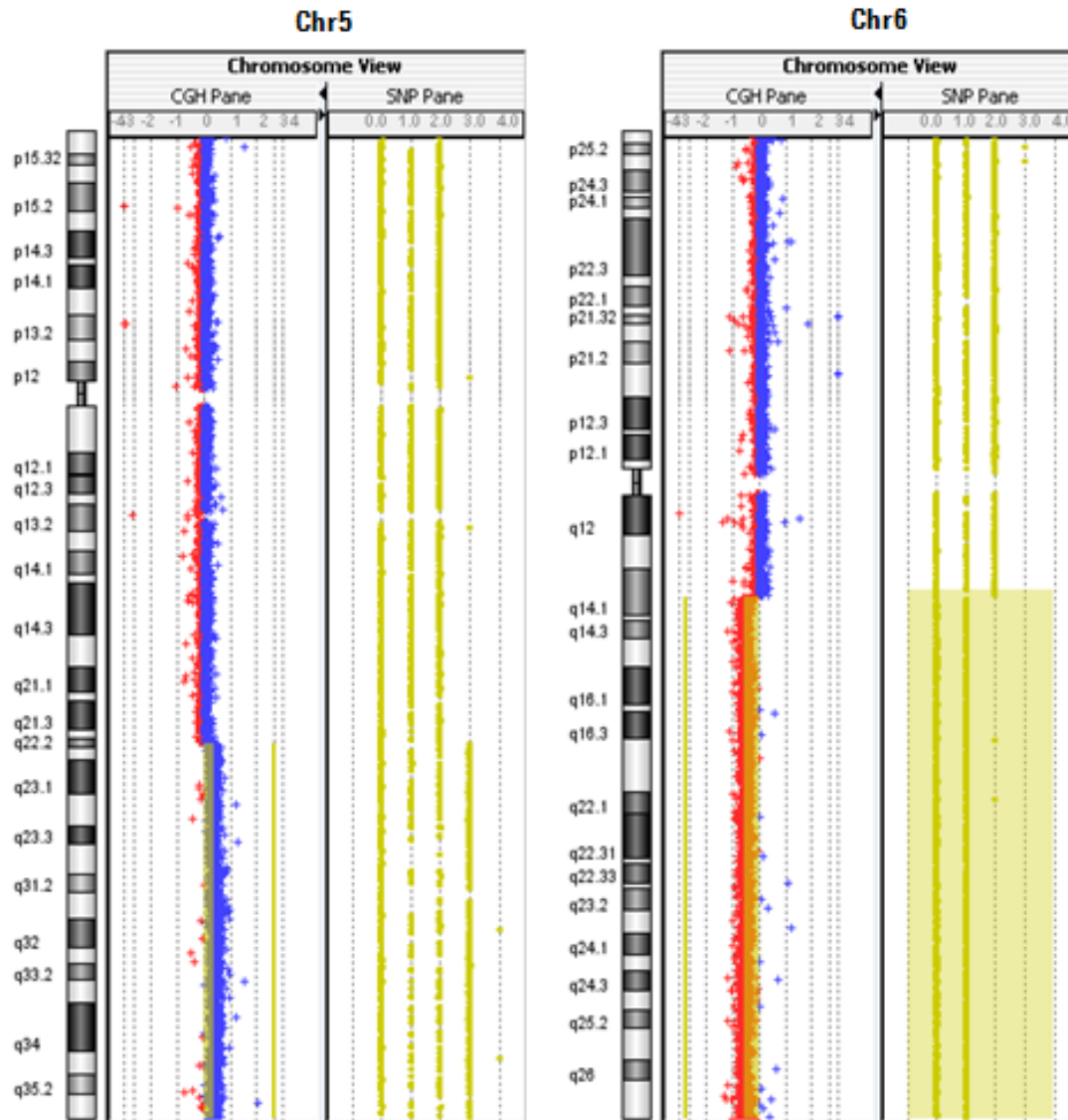
SNPデータ

SNPのclonal fraction
20%の混合率まで正確に検出。
(3 pair で検証したデータ)

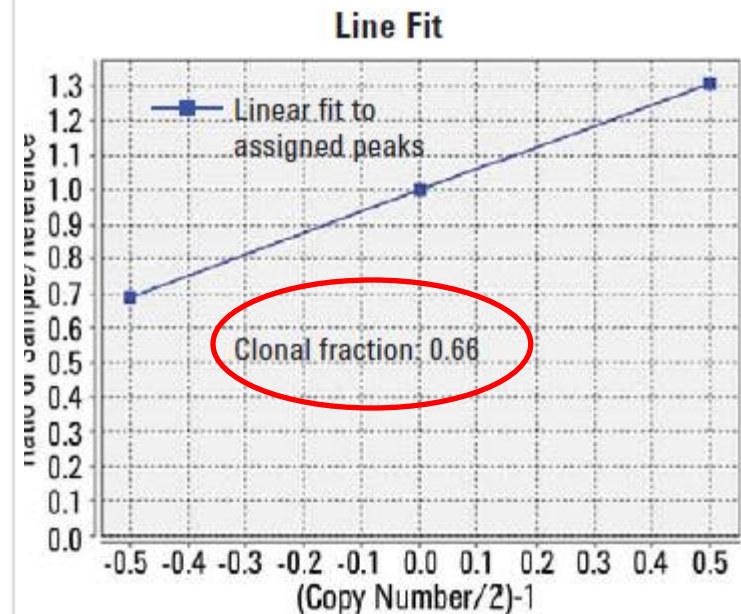
正常細胞が混入した試料でも 低ノイズのSNPデータを出力



CytoGenomics



chronic lymphocytic leukemia
(CLL) 細胞に正常細胞を約66%
混入し、解析



CGH、CGH+SNPマイクロアレイデータ解析ソフトウェア Agilent Genomic WorkbenchとCytoGenomics比較

	Agilent Genomic Workbench	CytoGenomics
特徴	頻繁に解析条件を変えて の結果比較に最適	ルーチン解析に最適
Feature Extraction* を内蔵 *CGH+SNPは10.10以降対応	✕ (6.5 Standardを除く)	○
CGH+SNPマイクロアレイ解析	○ (6.5以降)	○
CGHマイクロアレイ解析	○	○ (human のみ)
ChIP-on-Chip、メチレーション マイクロアレイ解析	○ (ライセンスが必要)	✕
ゲノムの大部分にコピー数変化を 生じる試料のCGH解析	○ (7.0以降対応)	○
モザイク性のある試料の CGH+SNP 解析	○ (7.0以降対応)	○
3倍体・4倍体の解析	✕	○ (2.5以降)



ラベル化に必要なDNA量 と 各種ラベル化プロトコルの紹介

現在のラベル化プロトコル

サンプルの種類		Blood, tissue, cells			FFPE : ホルマリン固定 パラフィン包埋	
プロトコル		酵素法			ULSラベル化法	
		ダイレクト法	増幅法	1細胞プロトコル		
増幅 ステップ		なし	GenomePlex Complete Whole Genome Amplification Kit [Sigma]	PicoPlex WGA Kit for Single-Cell [Rubicon Genomics]	なし	
ラベル化ス テップ		SureTag (Complete) DNA Labeling Kit			Genomic DNA ULS Labeling Kit	
DNA 量	1M, 244K	0.5 – 3 µg (20.2 µl)	50 – 100 ng (10 µl)	非対応	1.5 µg (16.5 µl)	2 µg (16 µl)
	2x400K, 2x105K	0.5 – 1.5 µg (20.2 µl)		非対応	1 µg (17 µl)	1 µg (17 µl)
	4x180K, 4x44K	0.5 – 1.5 µg (20.2 µl)		非対応	0.5 µg (8 µl)	0.5 µg (8 µl)
	8x60K, 8x15K	0.2 – 0.5 µg (10.1 µl)		1細胞	0.25 µg (8 µl)	0.25 µg (8 µl)
ゲノムの品質		Intact	500 bp <	Intact	Intact/degraded/damaged	

※CGH+SNPマイクロアレイには
増幅法・1細胞プロトコル・ULSラベル化法は使用不可

酵素法(ダイレクト法) 概要

ゲノムDNA (Cy3側 : reference)

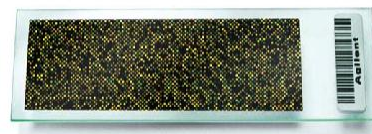
ゲノムDNA (Cy5側 : Test)

断片化 : 制限酵素
(Alu I, Rsa I)
または熱

Random primerを
アニーリング

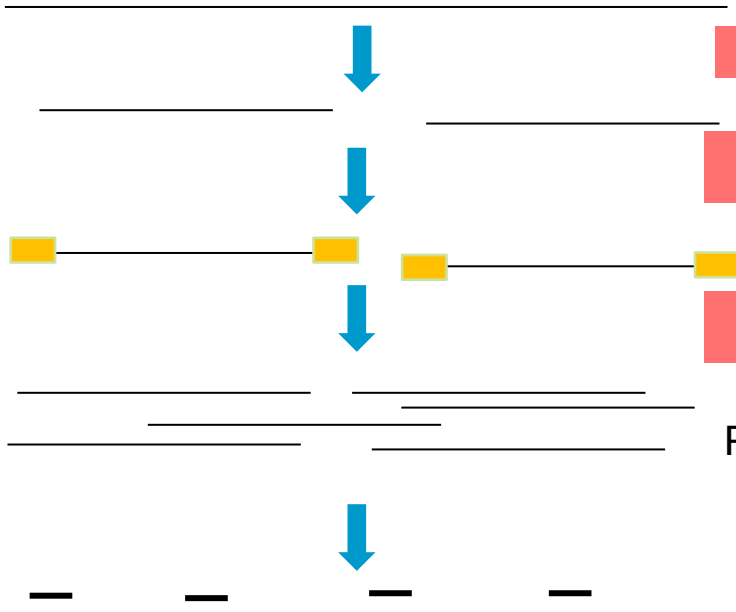
Cy3(Cy5)-dUTP
存在下で
Exo-Klenow
Fragment 反応

ラベル化DNA精製
マイクロアレイにハイ
ブリダイゼーション



酵素法(増幅法) 概要

ゲノムDNA (Cy3側 : reference)



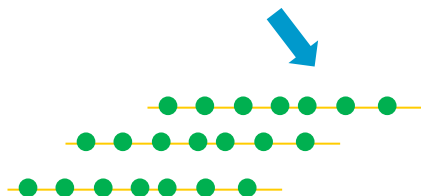
断片化 : 熱

リンカー付与

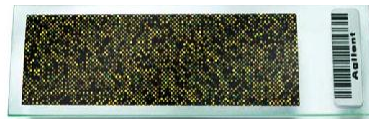
PCRによる増幅

Random primerを
アニーリング

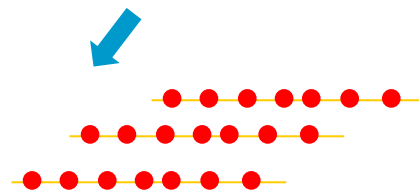
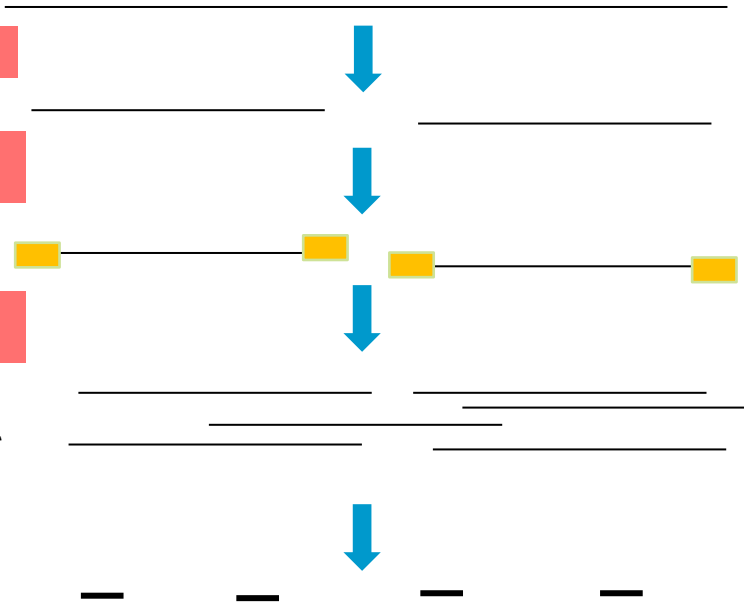
Cy3(Cy5)-dUTP
存在下で
Exo-Klenow
Fragment 反応



ラベル化DNA精製
マイクロアレイにハイ
ブリダイゼーション



ゲノムDNA (Cy5側 : Test)



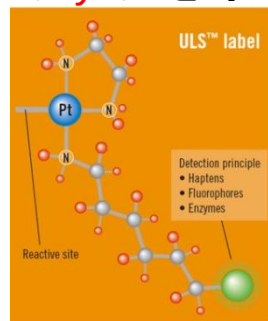
ULSラベル化法 概要

ゲノムDNA (Cy3側 : reference)

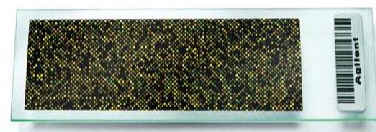
ゲノムDNA (Cy5側 : Test)

断片化 : 熱

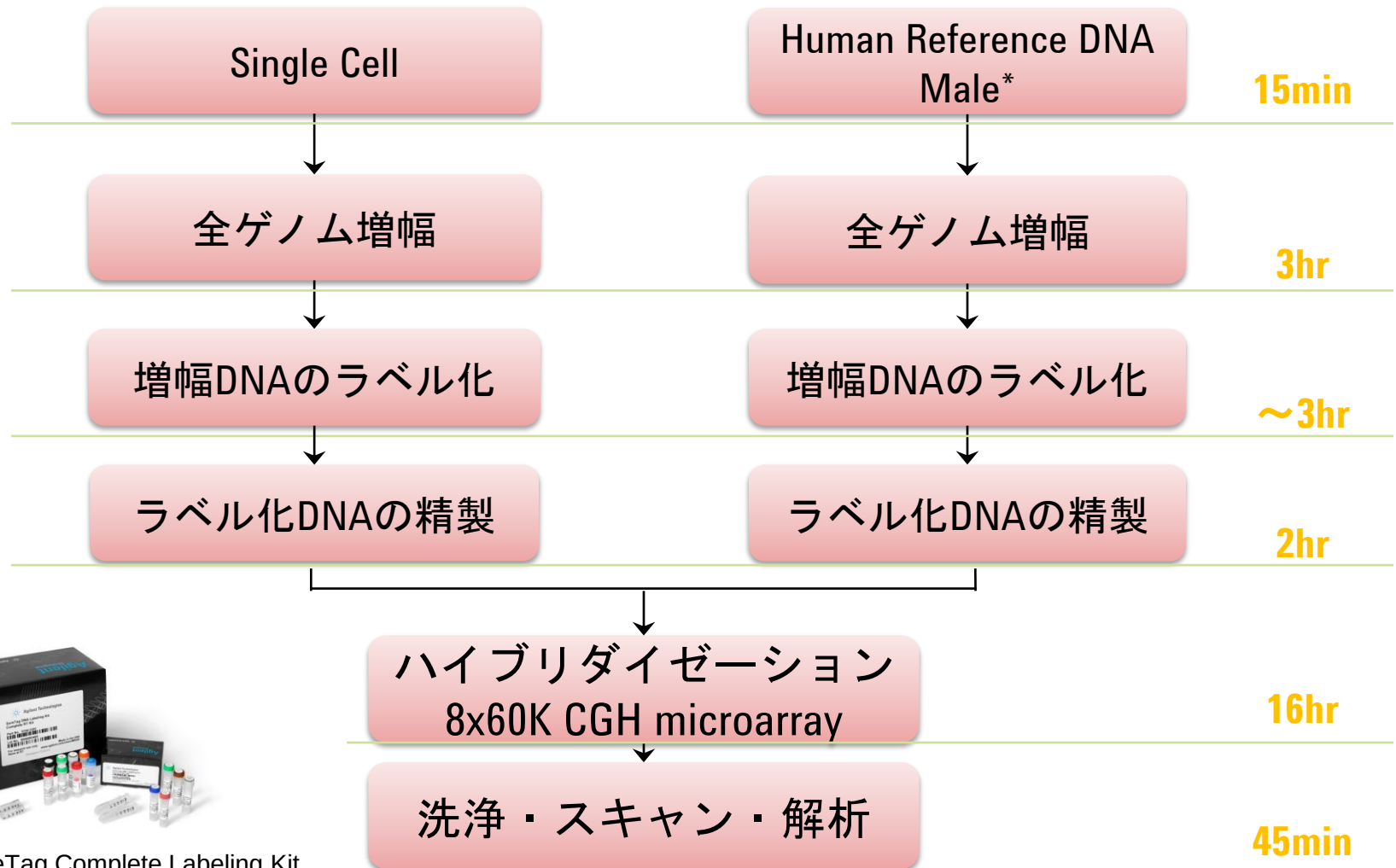
化学的反應によりゲノムにCy3 (Cy5) を導入



ラベル化DNA精製
マイクロアレイにハイブリダイゼーション

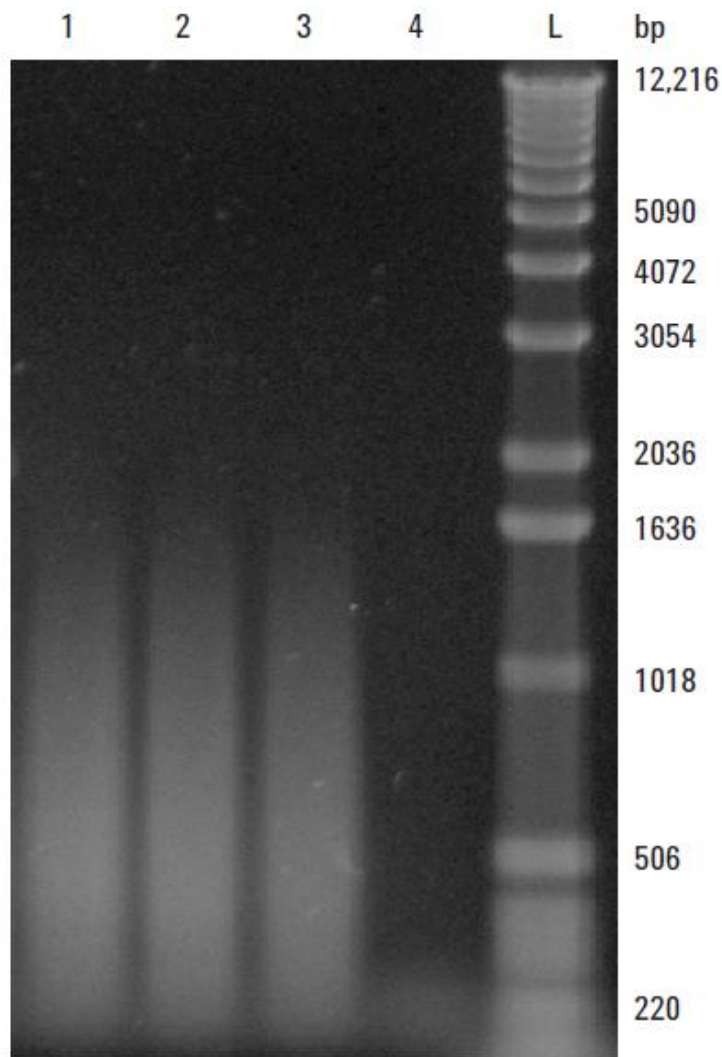


1細胞プロトコル： 1細胞の染色体構造変化を約24時間で検出



* Agilent SureTag Complete Labeling Kit

PicoPlex Single Cell WGA Kit により 全ゲノムを増幅するプロトコル



増幅ゲノムDNAの電気泳動像

1. Agilent Reference Genome Male (30 pg)
2. gDNA from NA03226 (15 pg)
3. Single cell (biopsied from embryo)
4. Non template control

かつ通常のCGHプロトコルに比べ
短時間のハイブリダイゼーション

65°C、24 時間、20rpm

↓

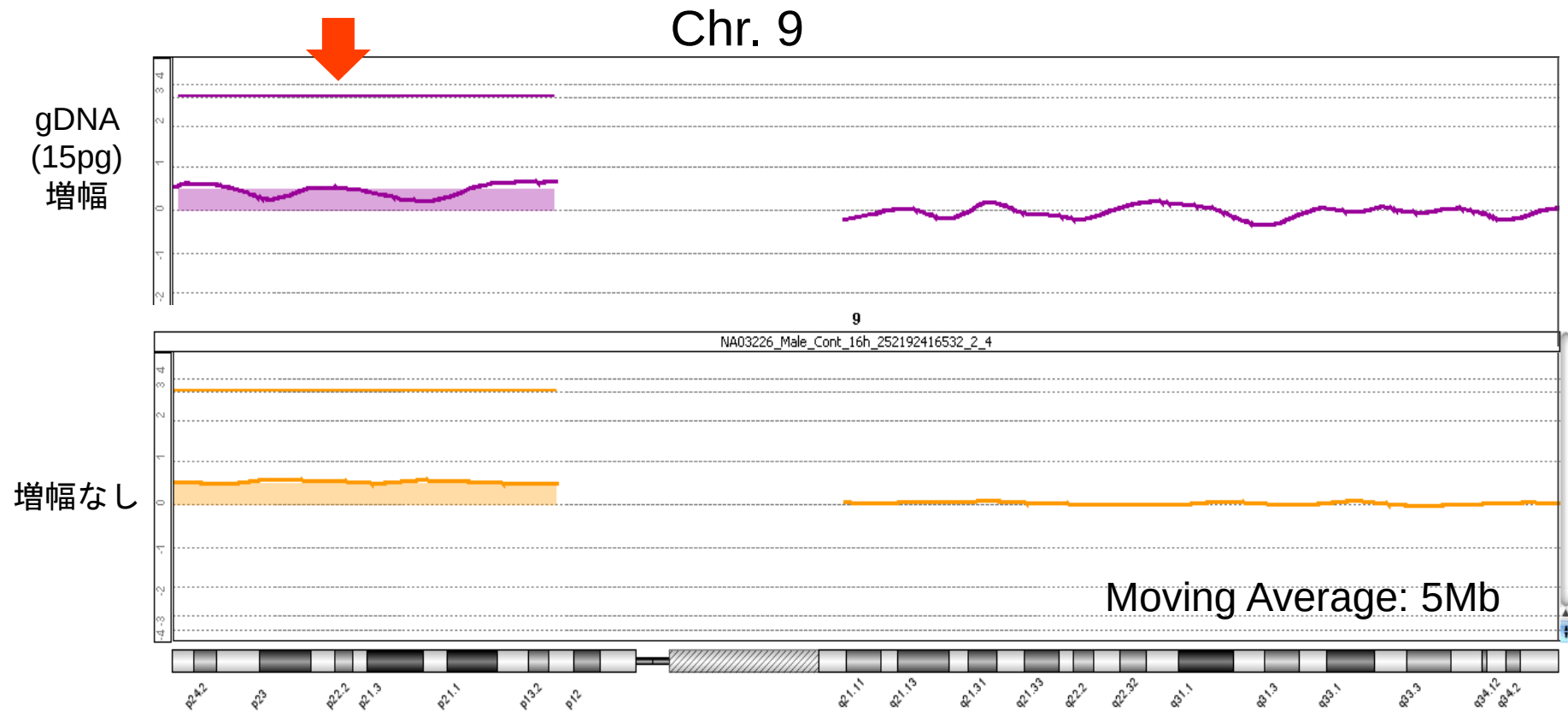
65°C、**16** 時間、20rpm

Single cellレベルに希釈したゲノムDNAでの例 既知構造変化を検出

検出条件 : ADM2, threshold 6,
minimum of 5 Mb aberrations,
Amp: ≥ 0.3 log ratio, Del: ≥ 0.55 log ratio

Sample: gDNA from NA03226 (15 pg)

(Reference: Agilent Reference Genome, 30pg を増幅後プール)



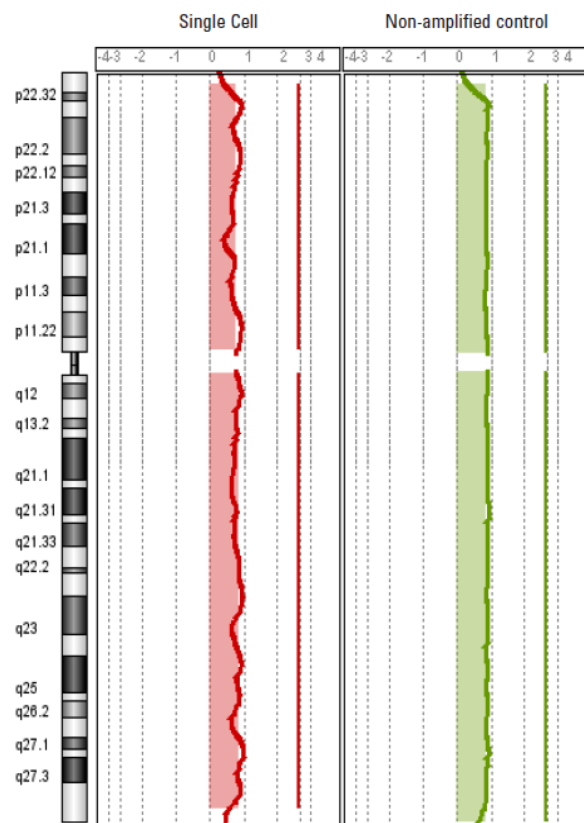
胚生検の1細胞のデータ例

X染色体、その他の領域におけるコピー数変化検出

Chromosome X

1細胞
から増幅

増幅なし

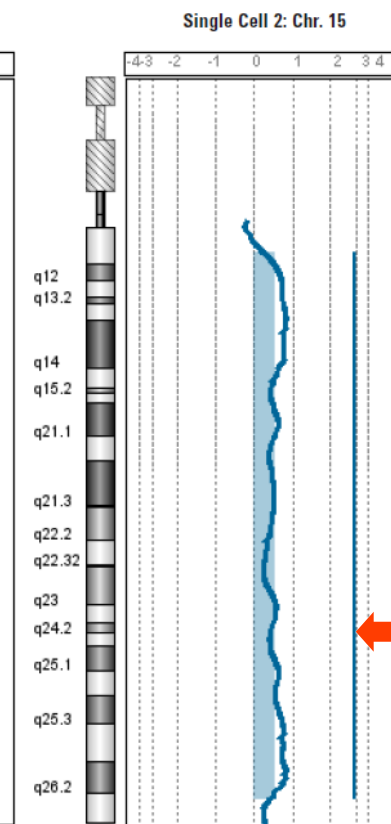
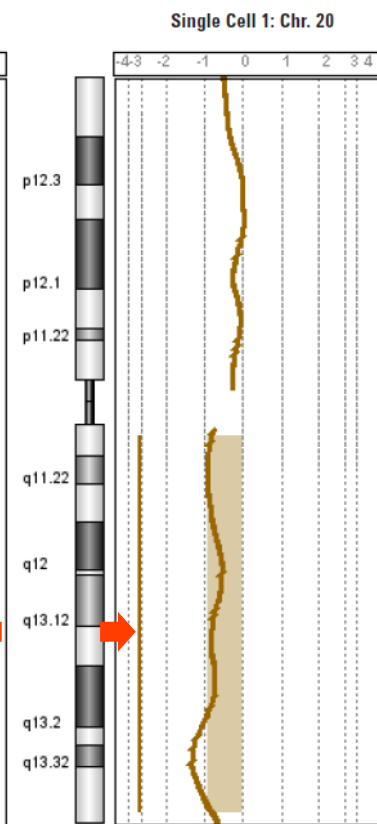
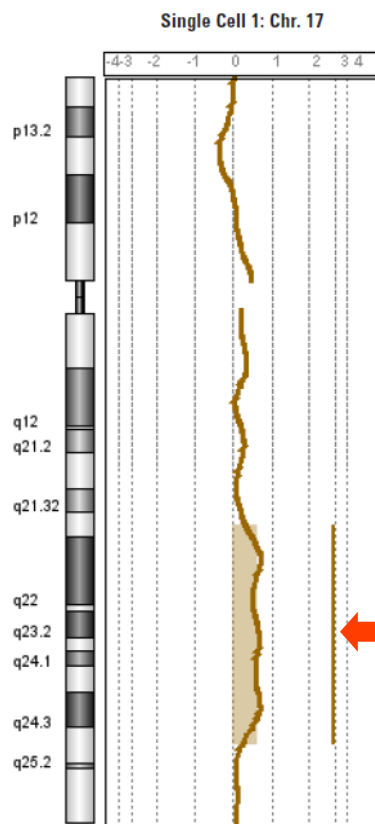


その他の染色体

1細胞
から増幅

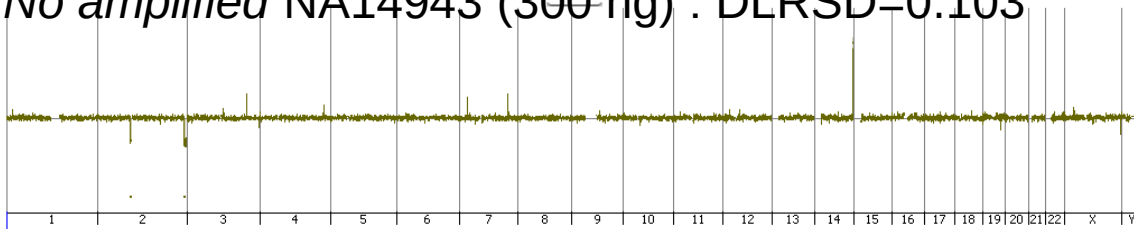
1細胞
から増幅

1細胞
から増幅



60 pg および600 pg DNAのデータ例

No amplified NA14943 (300-ng) : DLRSD=0.103

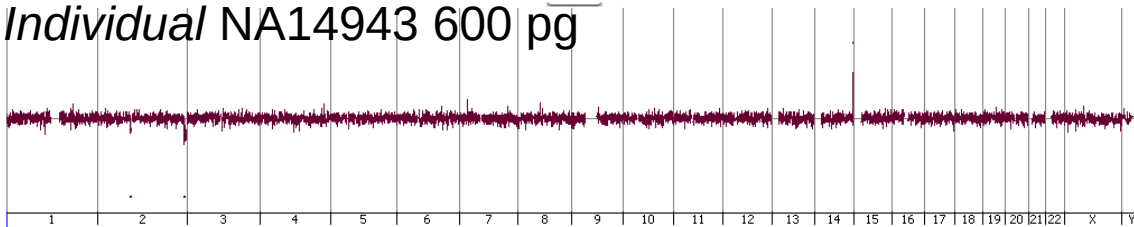


Probe-to-probe noise

DLRSD

~0.10

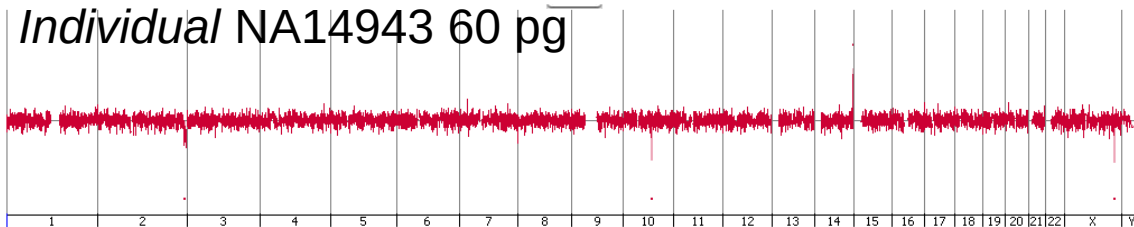
Individual NA14943 600 pg



DLRSD

~0.23

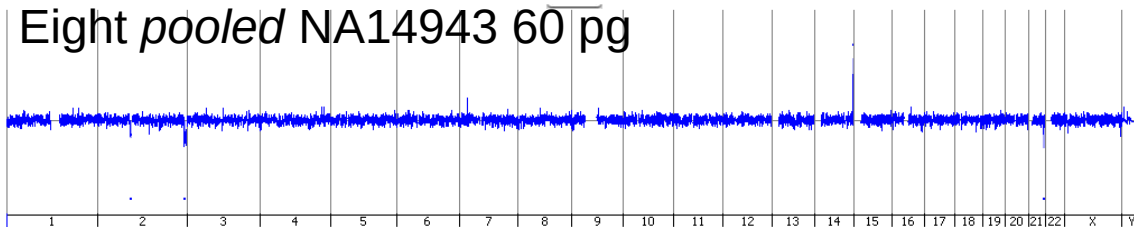
Individual NA14943 60 pg



DLRSD

~0.35

Eight pooled NA14943 60 pg

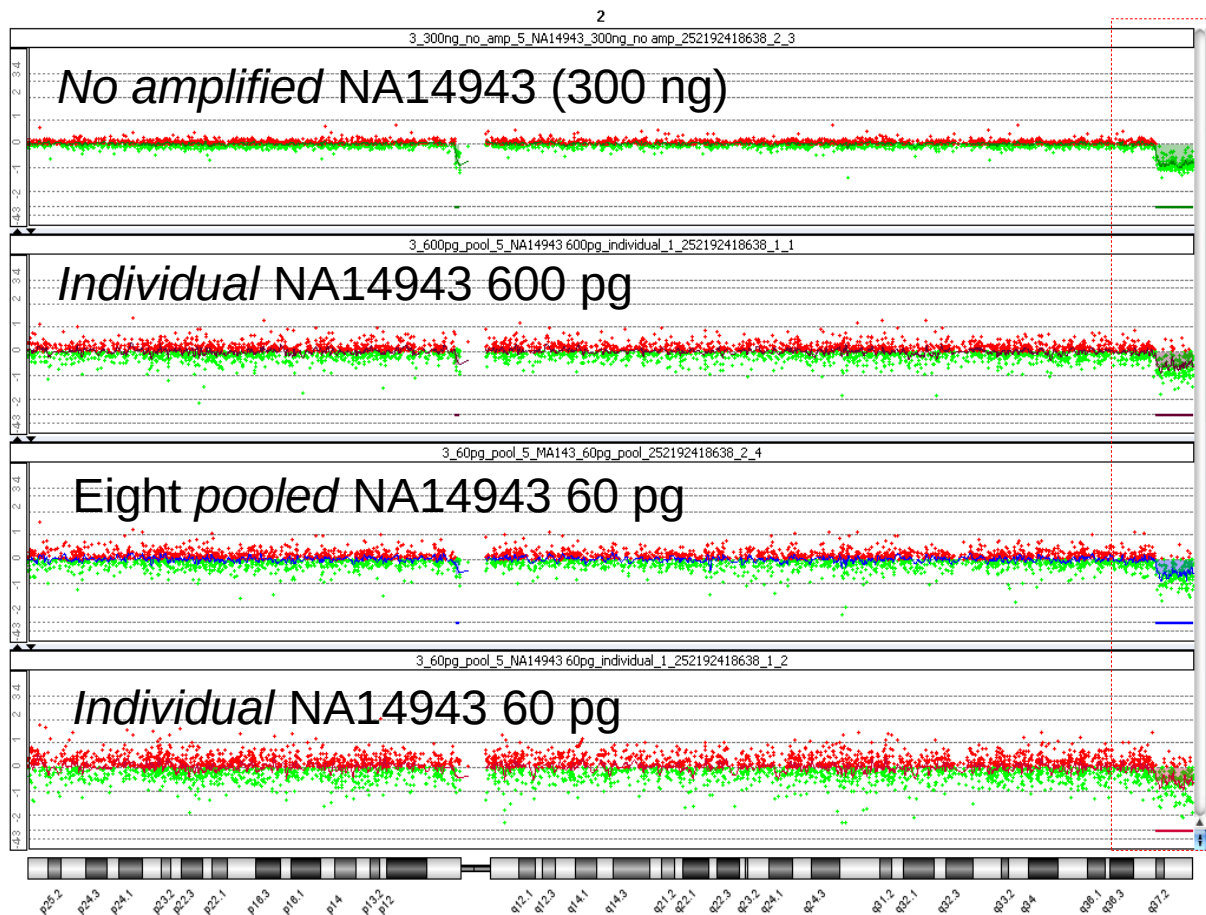


DLRSD

~0.22

(Moving Average 10pt)

既知構造変化領域を同じ検出アルゴリズムで検出





実験の チェックポイント サンプルDNAのQC

実験のチェックポイント

1. サンプルDNAのQC

- 定量（UV分光光度計＋Qubit）
- 断片化が進んでいないか確認（電気泳動）
- RNA・高濃度の塩・たんぱく質などの混入が無いことを確認（UV分光光度計）

2. ラベル化DNAのQC（UV分光光度計）

- 色素取り込み率
- ラベル化DNA収量

3. データのQC

- 数値化後の各種QC Metricsの値

サンプルDNAのQC

DNAの定量

ラベル化反応でゲノムDNAのスタート量がtest とreferenceで同じであることが大切

UV Spectrophotometer（例 NanoDrop）とFluorometer（例：Qubit）*の両方で測定し、Qubitの値をもとに定量することをお勧め

DNAの品質

UV-Vis Spectrophotometry

RNA・炭水化物・タンパク質・有機溶媒などの混入がないもの

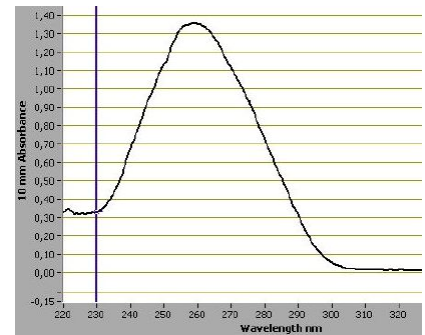
A260/A280とA260/A230を測定

推奨値 **A260/A280 1.8-2.0、A260/A230 >1.0**

Agarose Gel Electrophoresis

断片化の進んでいないゲノムDNAを使用
（増幅法・ダイレクト法）

ULSラベル化法では断片化しているDNAも使用可能



典型的なpure DNA
スペクトル図

DNAの品質確認 Agarose Gel Electrophoresis

断片化の進んでいないゲノムDNA (増幅法・ダイレクト法)

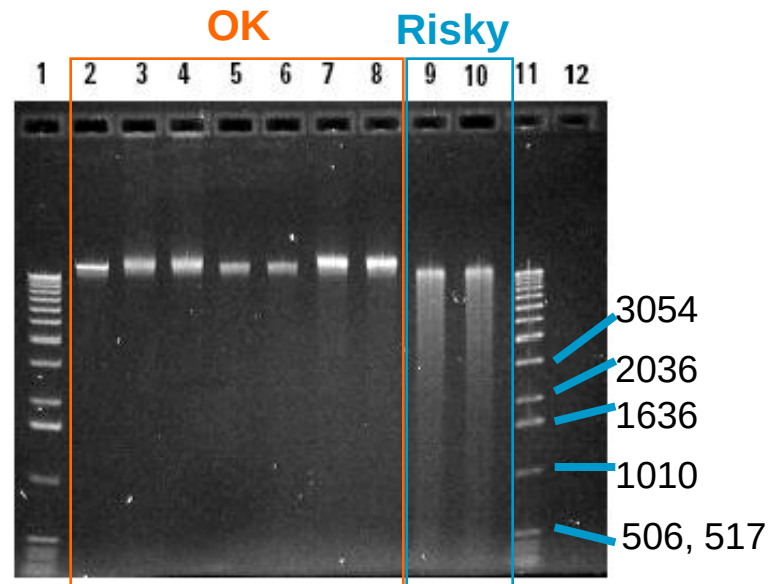
- 断片化の進んでいないDNAを推奨
- 増幅法の場合、サイズ >500bpのDNAも使用可能ですが、十分なラベル化DNAを得るにはスタート量を極力増やすことを推奨します（100ngまで）

DNAのIntactnessを調べるためにアガロースゲル電気泳動を行うことを推奨

例：1.2% Clear E-Gel (20ng DNAを使用)
SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain

ULSラベル化法では断片化しているDNAも使用可能

アガロースゲル電気泳動にてゲノムDNAの平均分子量を見積もる



DNAの品質 Agarose Gel Electrophoresis (補足)

ULSラベル化法では分解の進んだゲノムDNAでもラベル化を行うことができます

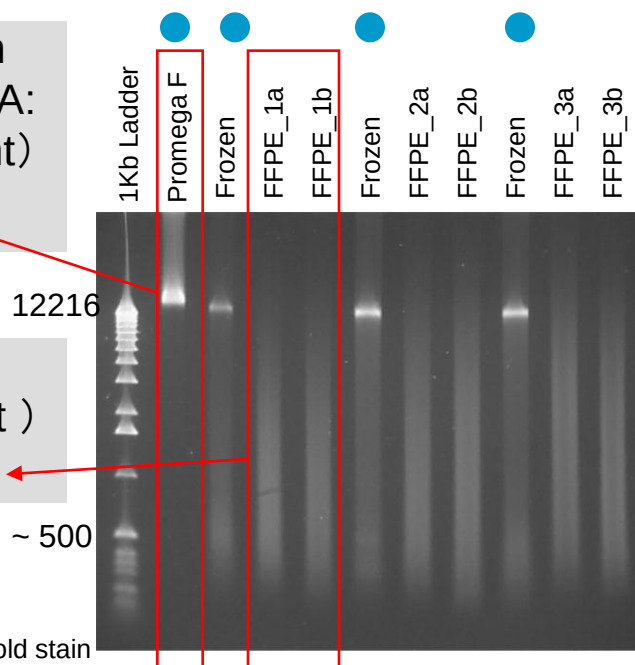
例：血液もしくはfrozen tissuesから調製したDNA:
(High Molecular Weight)

95°C、10分間加熱

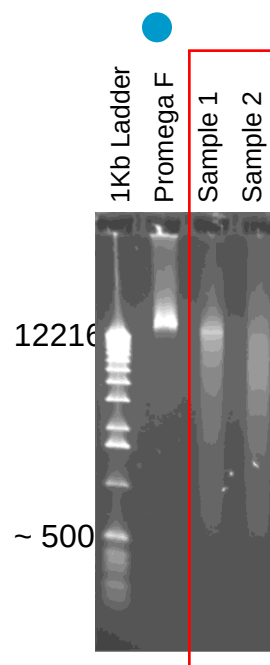
例：FFPEサンプル
(Low Molecular Weight)

加熱なし

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



● ダイレクト法に
使用可能



95°C、
5分間加熱

高速多検体電気泳動システム

Agilent 2200 TapeStation

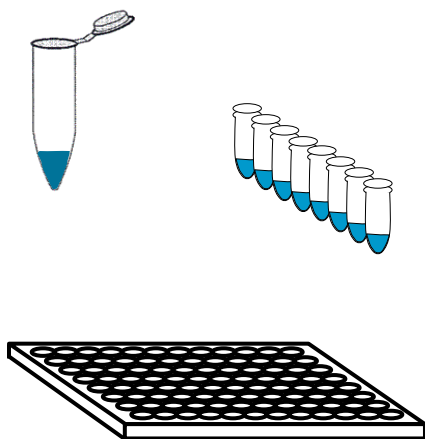


新製品：
Genomic DNA Kit

※ 現在のCGH プロトコルのQC stepへの導入は準備中です

ScreenTape System

1 サンプル調製



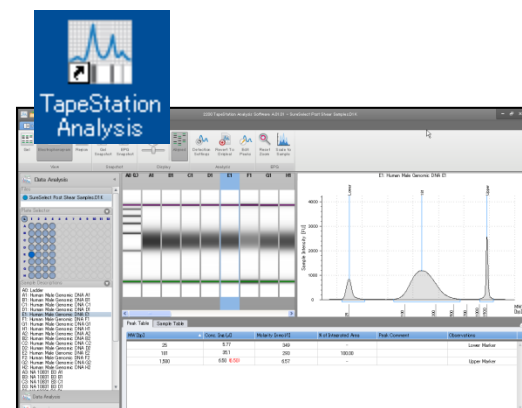
2 サンプル ピペットチップ テープをセット



3 データ解析

1サンプル1分以内に
結果が得られます

*アプリケーションにより異なります



新製品 : Genomic DNA Kit

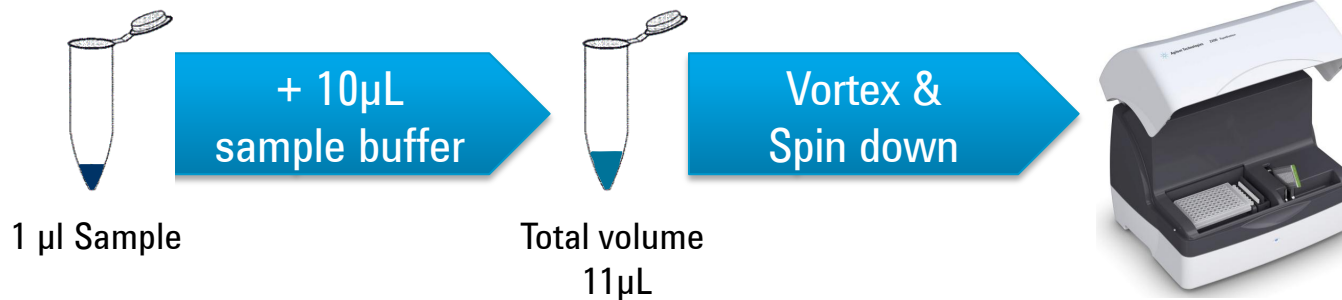
New!



GenomicDNA

Analytical Specification	GeomicDNA
分析分子量範囲	200 to >60,000 bp
感度	0.5 ng/μL
サイズ決定再現性	200-15,000 bp 15% CV
サイズ決定真度	200-15,000 bp ± 10%
定量再現性	15% CV
定量真度	± 20%
定量範囲	10-100 ng/μL
Physical Specification	
分析時間	16 samples < 25 minutes 96 samples < 150 minutes
サンプル数 / 1 Tape	16
サンプル必要量	1 μL
サンプル数 / 1 Kit	112 samples/box

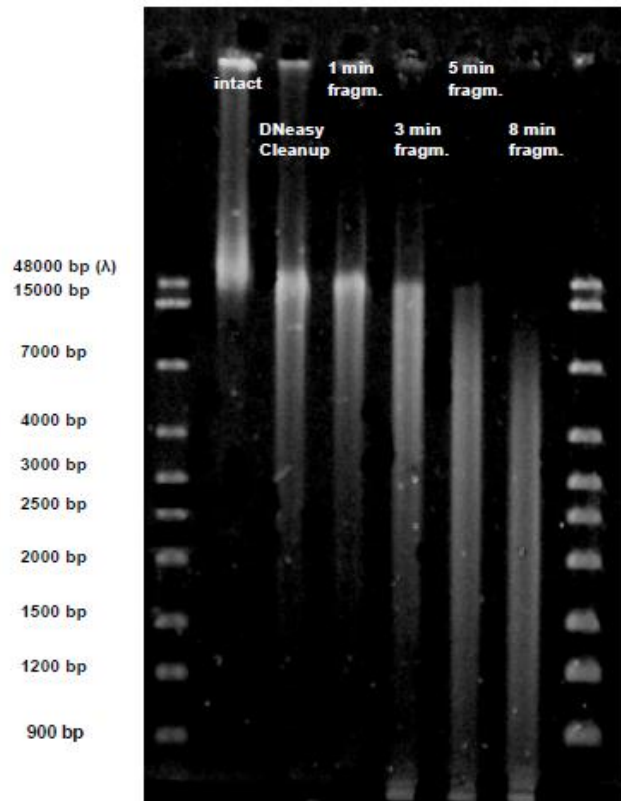
サンプルの準備手順は簡単



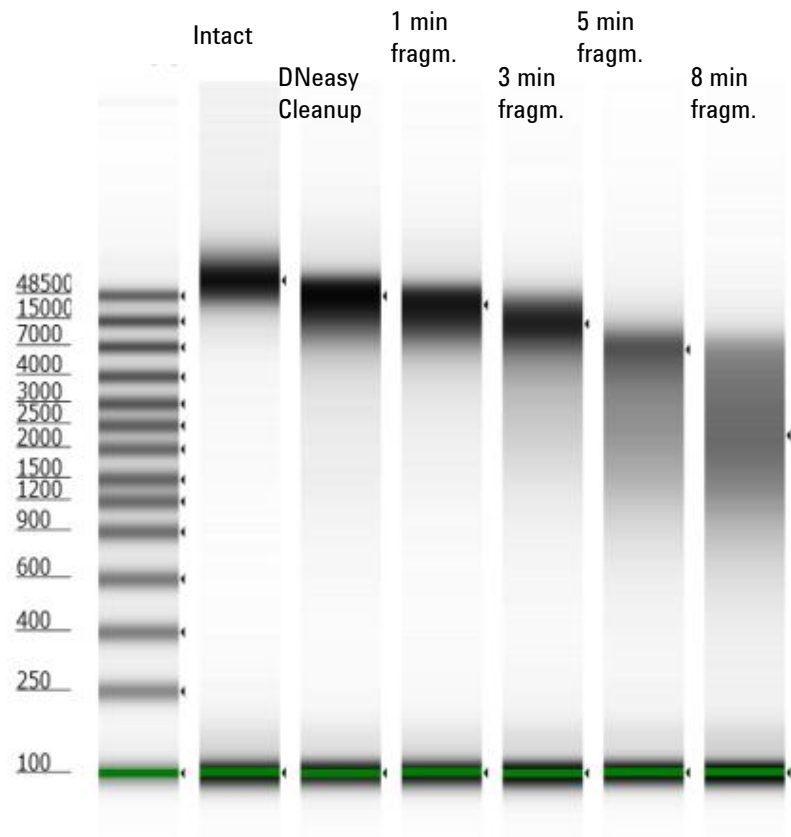
- 必要サンプル量 ; 1µL
- Sample bufferを混ぜるだけですぐ泳動できます

0.8% Agarose gelとの比較

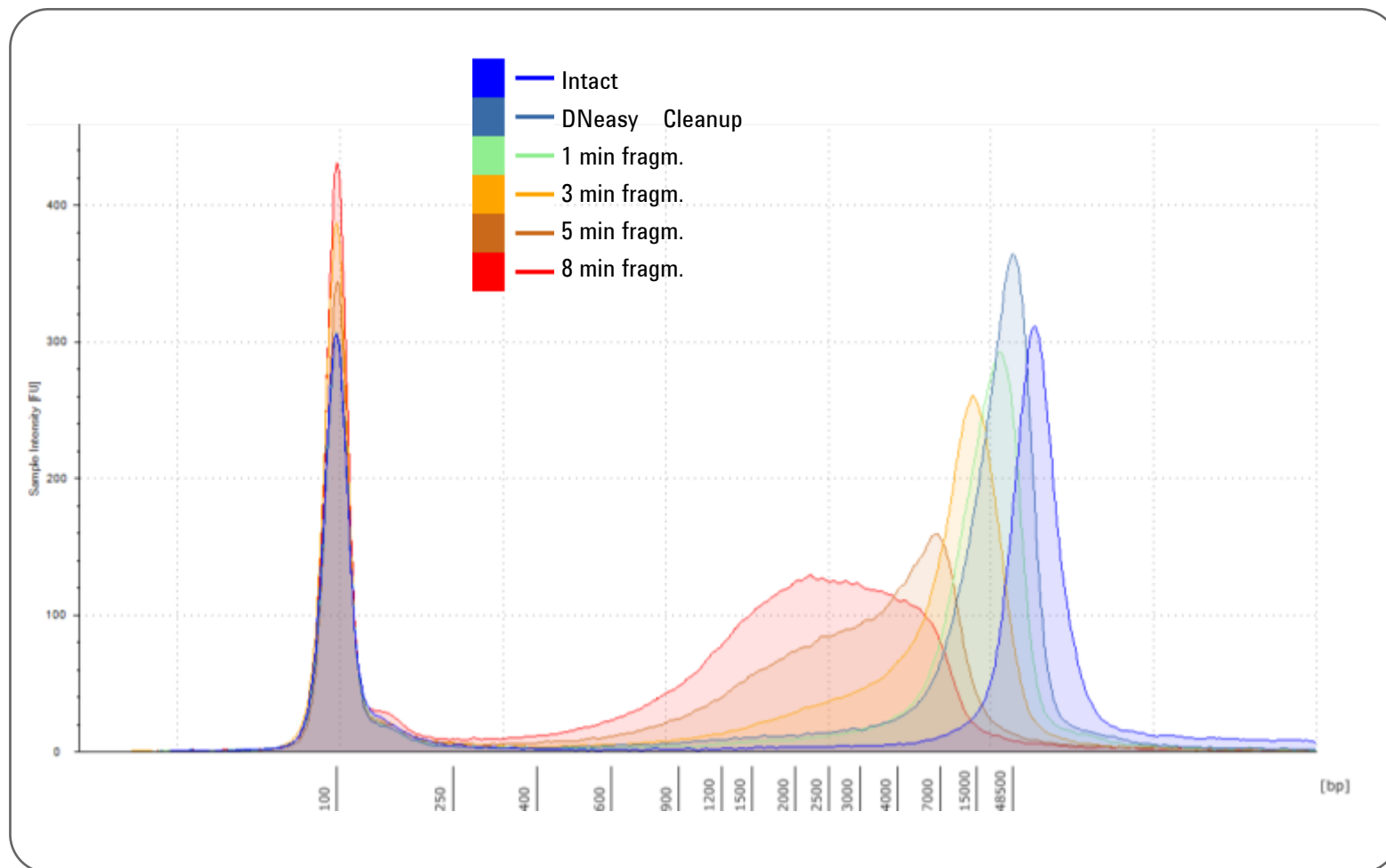
0.8% Agarose gel



2200 TapeStation



断片化したDNAの Electropherogram 重ねがき



NanoDrop, Qubitとの定量比較

