

アジレント・テクノロジー CGH マイクロアレイ 操作実習補足資料



2017年3月作成

アジレント・テクノロジー株式会社

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。

プロトコル、ソフトウェア操作ガイド など

マイクロアレイトップページ -> テキストダウンロード

アジレント・テクノロジー株式会社
ライフサイエンスと化学分析

The Measure of Confidence

Agilent Technologies

本サイトの利用規約 アジレントについて お問い合わせ先 ご登録 グローバルサイト HOME

製品とサービス 分類別ソリューション テクニカルサポート/FAQ/故障判定 ライブラリ トレーニング&イベント

HOME > 製品とサービス > 分析機器と分析システム > DNA マイクロアレイ

DNA マイクロアレイ

アジレントの DNA マイクロアレイシステムなら、アレイを変えるだけで、様々なアプリケーションに対応できます。すさまじい速度でゲノムの読解が進んでいます。その解析用ツールとして中心的役割を果たす DNA マイクロアレイ。その用途は研究ニーズに伴って広がってきています。遺伝子発現解析に始まり、染色体異常を検出するアレイ CGH、タンパク質-DNA 相互作用、DNA メチル化などのクロマチン構造の解明に ChIP-on-chip、スプライシングバリエーション、マイクロ RNA など DNA マイクロアレイは様々な分野で使われ始めました。変化する研究者のニーズに応えることができるように、アジレントはさまざまな DNA マイクロアレイを開発提供しています。

⇒アジレントが提供するゲノミクスソリューションはこちら

遺伝子発現解析用マイクロアレイ

Gene List を [【こちら】](#) より確認の上ご注文ください。

- SurePrint G3 Human Exon
- SurePrint G3 Mouse Exon
- SurePrint G3 Rat Exon
- SurPrint G3 Human GE マイクロアレイ 8x60K v2
- Whole Human Genome DNA マイクロアレイ 4x44K v2
- Whole Mouse Genome

インフォメーション

ライブラリ

- アプリケーション
- テクニカルノート
- カタログ (PDF, 1.36MB) (2011/12/11)
- ポスター
- 論文・記事
- DNAマイクロアレイ マニュアル
- マイクロアレイのデザイン
- その他資料

技術サポート

- ゲノミクスサポート
- 技術サポート

トレーニング

- トレーニングコース
- ゲノミクス セミナ
- テキストダウンロード**
- セミナー・学会・展示会情報

パスワードは定期的に変更いたします。
(お問い合わせください)

内容

CGHマイクロアレイの技術および解析のワークフロー	… p.4
実験のチェックポイントサンプルDNAのQC	… p.16
使用する試薬・機器類	… p.23
アジレント・テクノロジー 微量ソリューション	… p.30
マイクロアレイ ラインナップ	… p.36
CGH+SNP マイクロアレイ解析原理	… p.49
実験室内のオゾンが マイクロアレイデータに与える影響とその解決法	… p.56
アジレントDNAマイクロアレイスキャナシステム	… p.66
CytoGenomicsによる解析操作	… p.72
Feature Extractionによるスキャン画像の数値化 (2カラー)	… p.85



CGHマイクロアレイの技術 および解析のワークフロー



ゲノムDNAの構造変化を検出する手法

CGHマイクロアレイは不均衡型変化（欠失・重複）を検出

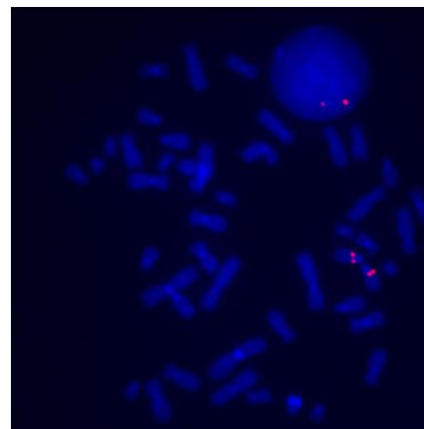
G分染法



(7.2 Mb重複) (10.9 Mb欠失)

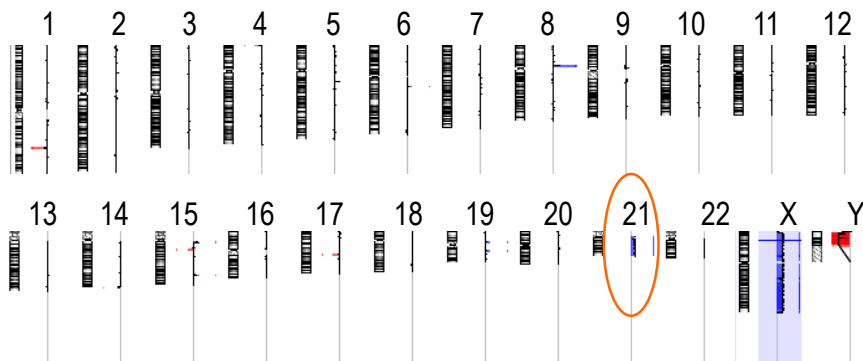
Miller et. al. Amer
J. Human Genet
86, 749–764, May
14, 2010 749

FISH法



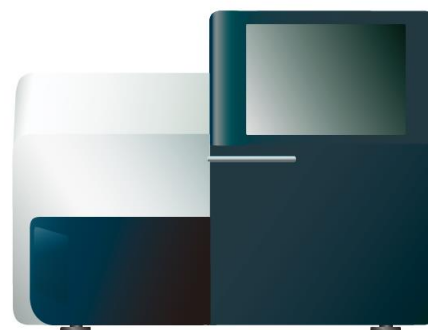
アジレント
SureFISH
15q11.2
UBE3A

CGHマイクロアレイ



例：アジレント SurePrint G3 ISCA CGH+SNPマイクロアレイ
Coriell Institute NA04592 (Trisomy 21)

次世代シーケンス



Togo picture gallery by DBCLS is licensed under a
Creative Commons Attribution 2.1 Japan license (c)



Agilent Technologies

感度や解像度などからみた各手法の特徴

	検出対象	検出 困難対象	解析試料	感度	解像度	網羅性
G分染法	均衡型・ 不均衡型 染色体転座	同色バンド 同士の転座 中間部の 異常	細胞	>20 細胞 (信頼度95%で 除外できる モザイク率 14%)	550 バンドレベル : 5 Mb (遺伝子約50個に相当) 高精度G分染 850バンドレベル : 約3.5 Mb (遺伝子約30個に相当)	ゲノム 全体
FISH法	染色体 逆位・ 重複・欠失	FISH プローブの 標的領域 よりも小さい コピー数変化	細胞	> 1 細胞 (低頻度モザイク 症例や複雑な 転座症例の 解析に特に有用)	BAC プローブ: 数100 kb (約> 1 遺伝子)	座位 特異的
CGH マイクロ アレイ法 (CGH+SNP)	重複・欠失 (UPD・ LOH)	均衡型転座・ 逆位など コピー数変化 を伴わない 構造変化	複数細胞 からの 抽出ゲノム DNA (500 ng*~) *約8x10 ⁴ 細胞	推奨の 解析条件で 混合率 約30%	例 : 4x180K ISCA CGH+SNP マイクロアレイ 疾患関連領域 >10 kb* ゲノム全体 >50 kb (*遺伝子など標的領域の 微細構造変化も検出) LOH・UPD: >5-10Mb	ゲノム 全体
次世代 シーケンス (WGS/WES /パネル)	塩基配列の 変異・転座 (WGS)・ InDel	リードdepth や手法による	複数細胞から の抽出ゲノム DNA	リードdepth や手法による	> 1塩基	ゲノム 全体・ 複数 標的領域

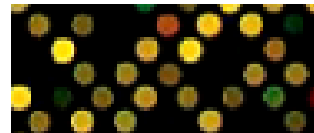


アジレントCGHマイクロアレイの原理

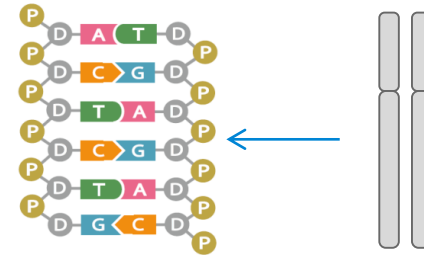
スライドガラス上に長鎖ロングオリゴヌクレオチド DNA (プローブ) を *In Situ* 合成

例：ヒト 4 x 180K
マイクロアレイ

約180,000箇所の
プローブ スポット



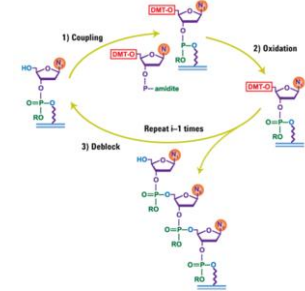
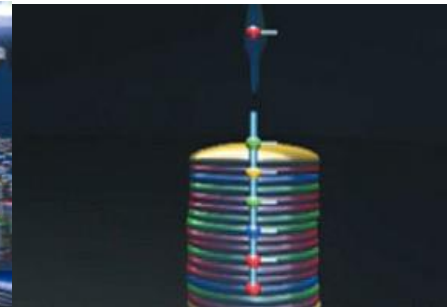
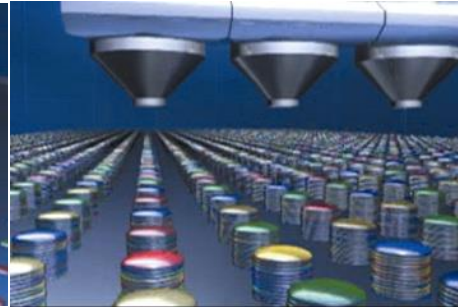
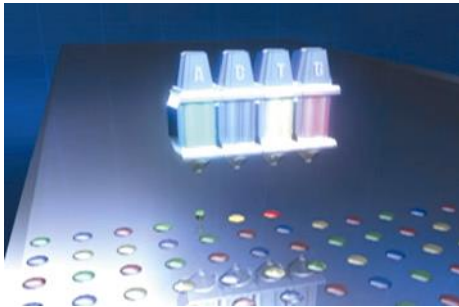
プローブ長：60塩基



Togo picture gallery by DBCLS is licensed under a Creative Commons Attribution 2.1 Japan license (c)

プローブの塩基配列：公的データベースの
ヒトリファレンスゲノムから選定した
特異性の高い配列 (Tm・二次構造)
(繰り返し配列領域、AluI・RsaI 認識領域の排除)

SurePrint 技術 - アジレントの高品質インクジェットプリントテクノロジー



Agilent Technologies

CGHマイクロアレイでデータを解析するまでの流れ

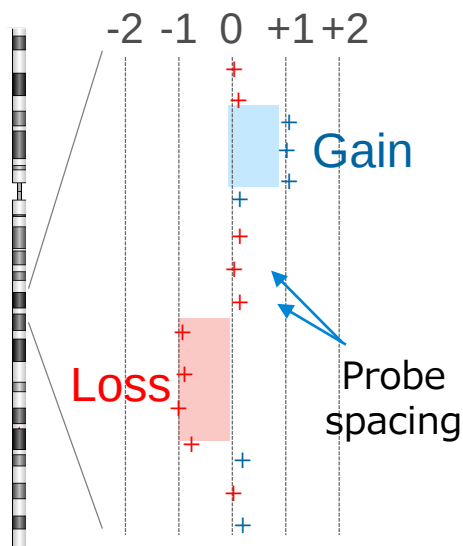
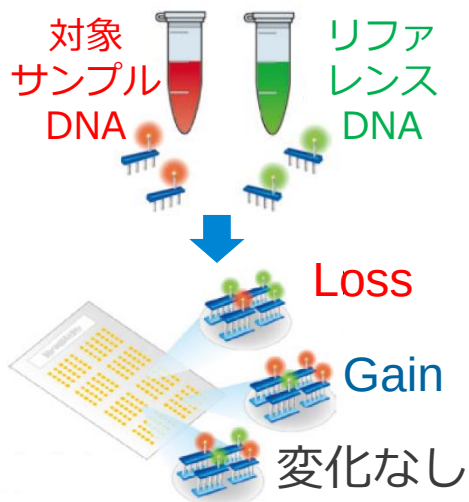
DNAの抽出・ラベル化

ハイブリと洗浄

スキャン

データ解析

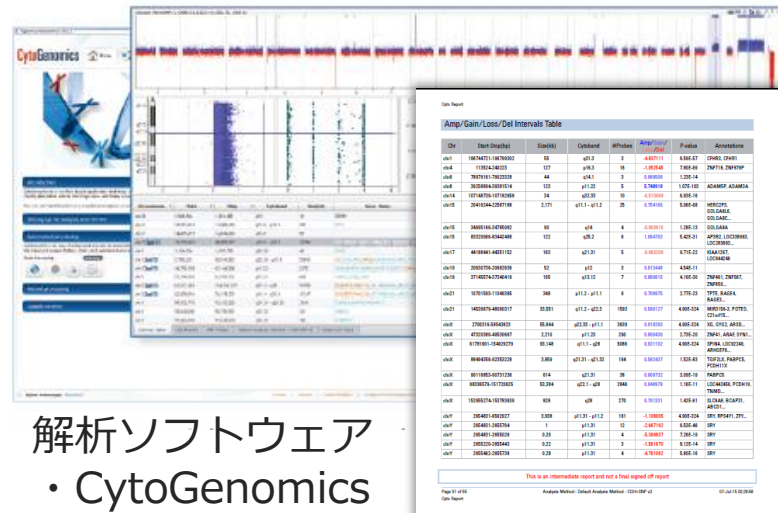
解像度例：
4x180K ISCA
CGH+SNP
マイクロアレイ
疾患関連領域
>10 kb
ゲノム全体
>50 kb
LOH・UPD：
>5-10Mb



解析：各プローブデータ
 $\text{Log}_2(\text{Sample}/\text{Reference})$ 比を
 配置・表示、
 構造変化領域の検出

- ・ 3つ以上の連続プローブの変化
- ・ 閾値以上の Log_2 ( /  比) 変化

CytoGenomics

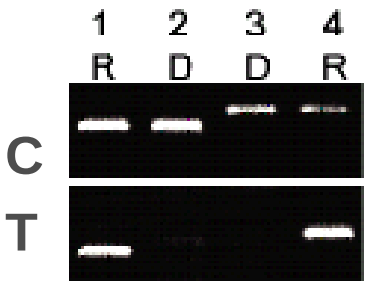
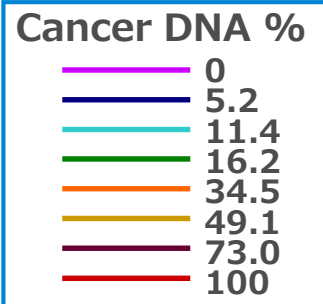


解析ソフトウェア

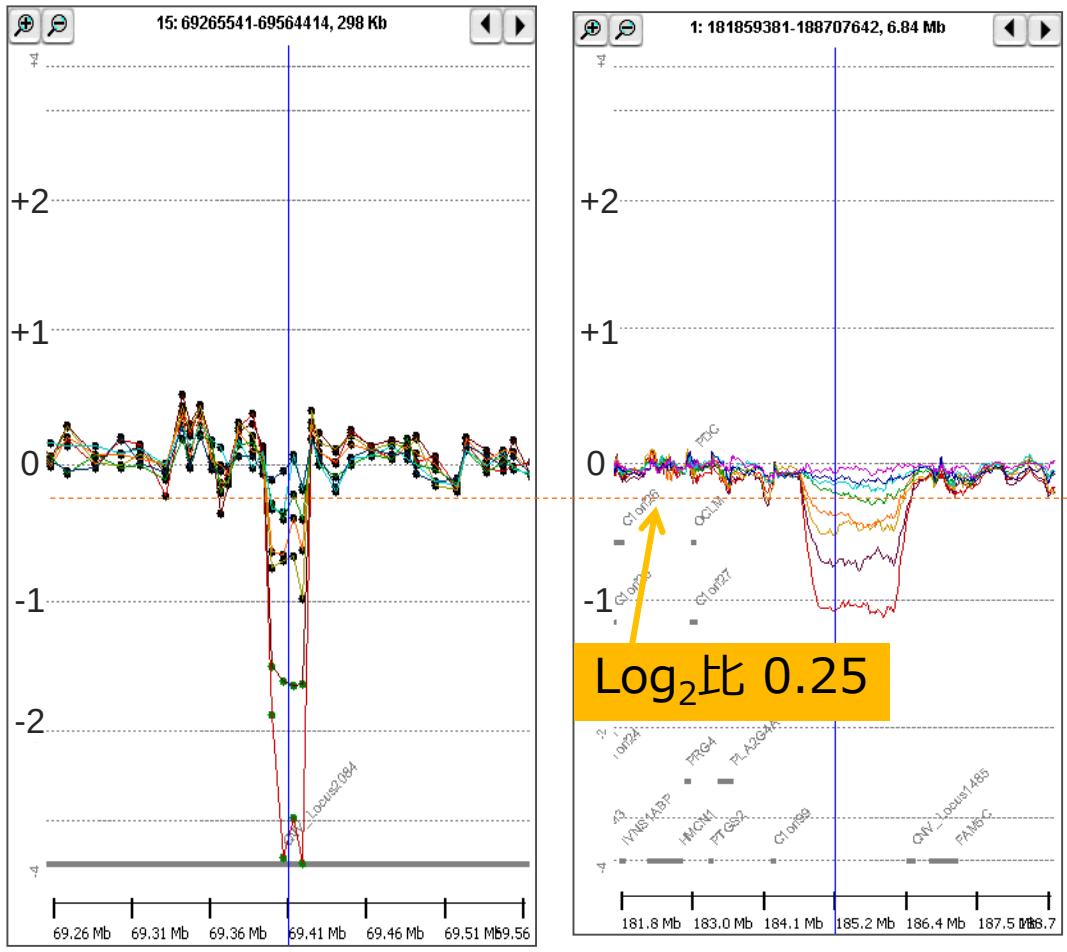
- CytoGenomics
- Agilent Genomic Workbench

CGHマイクロアレイにおけるサンプルの希釈の影響

■ 正常細胞が混入した細胞



Validated by Dr.Ogawa,
Tokyo U



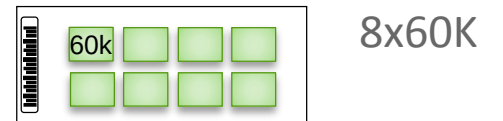
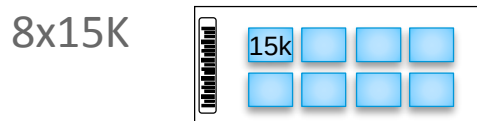
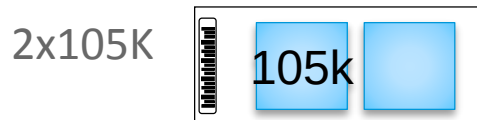
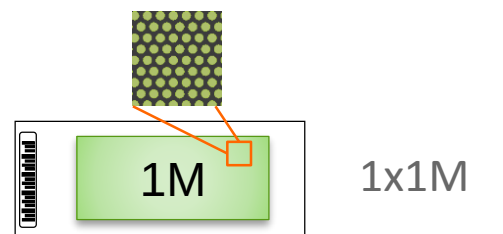
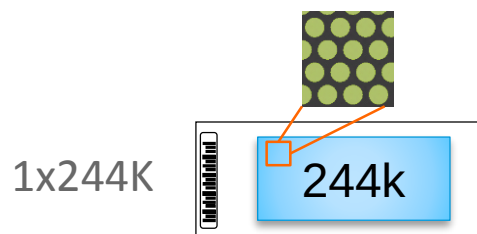
アジレントSurePrint アレイフォーマット

Bスキャナ、
Cスキャナ・SureScan（通常仕様）

Cスキャナ・SureScan
（高解像度仕様）

“HD”
（スポット径
~65 μ m）

“G3”
（スポット径
~30 μ m）

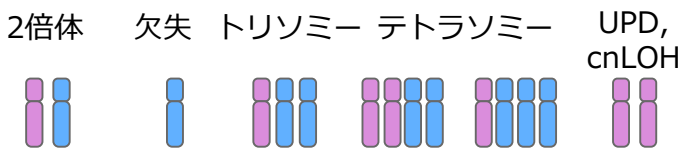
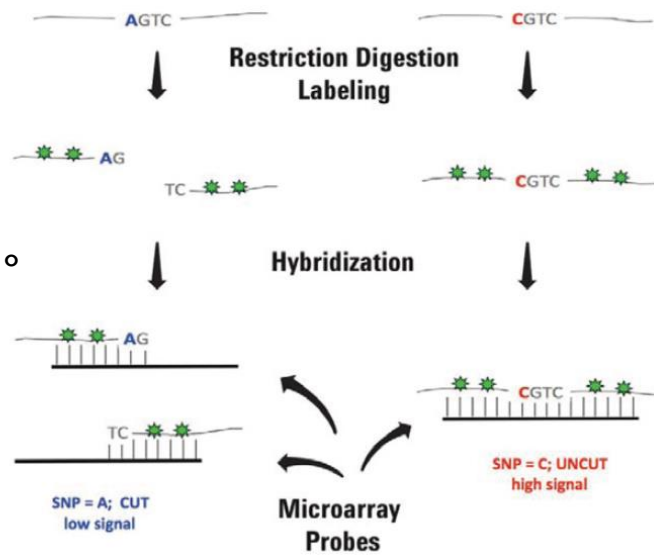
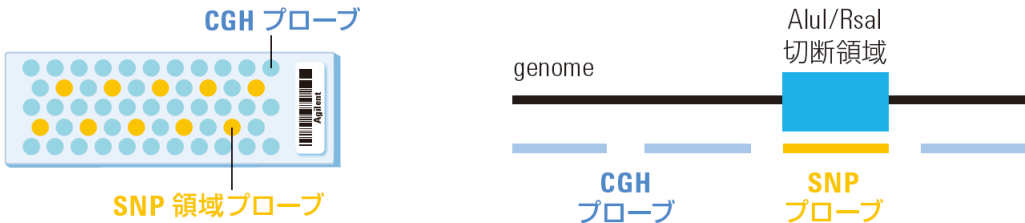


SNPプローブによるUPD・LOH検出

アジレントCGH+SNPマイクロアレイ

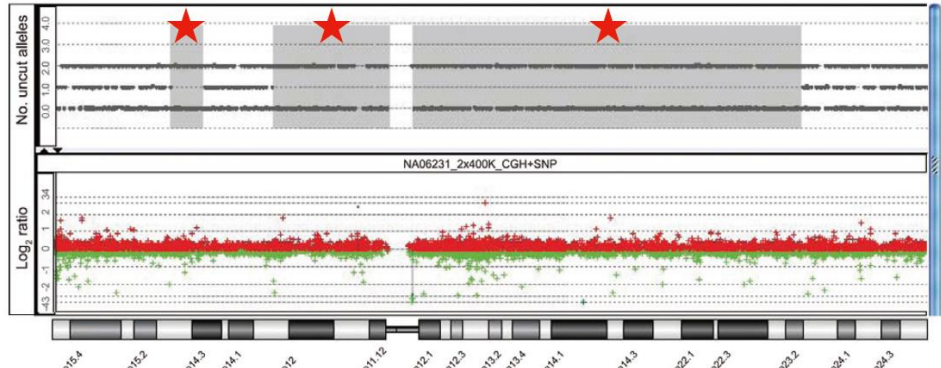
SNP検出原理

特定の制限酵素認識部位に被るSNPに対して
プローブを設計。切断感受性の違いにより
検体の各SNP領域における片方のアレルの数を検出。



cnLOH/UPD 領域 (★) をSNP プローブにて検出。
NA06231 (Coriell Cell Repository) を使用。

		Diploid	Hemizygous deletion	Trisomy	Tetrasomy (identical copies)	Tetrasomy (non-identical copies)	
No. of uncut alleles	4						SNP
	3						
	2						
	1						
	0						
	4						CGH
	3						
	2						
	1						
	0						



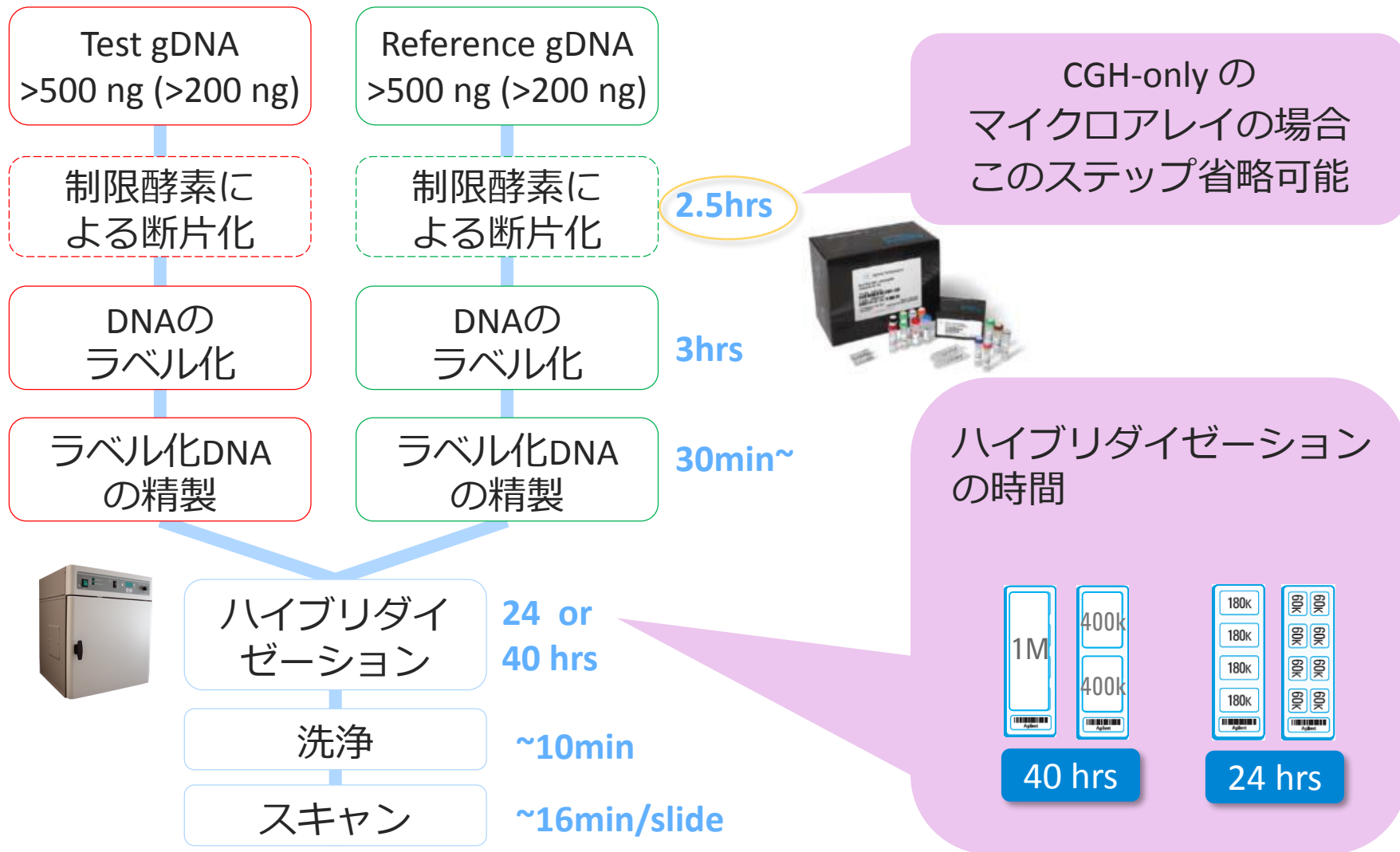
Application Note : 5990-6274EN

現在のラベル化プロトコル サマリ

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 – 1 µg (20.2 µl)	50 – 100 ng (10 µl)	非対応	1.5 µg (16.5 µl)	2 µg (16 µl)
	2x400K, 2x105K			非対応	1 µg (17 µl)	1 µg (17 µl)
	4x180K, 4x44K			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

～ダイレクトラベル法～ CGHアレイ・CGH+SNPアレイのprotocols



プロトコルがアップデートしました（2014年6月）

変更点(1) : ハイブリダイゼーション温度を65度から67度に変更

ラベル化試薬SureTagの色素取り込み率が高いことにより、マイクロアレイデータのQCメ

トリクスにおいてBG_Noiseの値が高くなることがありました。

この変更により高いS/Nを保ちながらBG_Noiseの値を下げるすることができます。

変更点(2) : Random PrimerとHybridization Mix調製時の温度を95度から98度に変更

同じアレイで対を成すCy3・Cy5間でこの操作における温度に大きく差がある場合、データが片側にスキヤッタする事がありました。

温度をより高めることだけでなく、温度差が生じないような注意書きが追加されました。

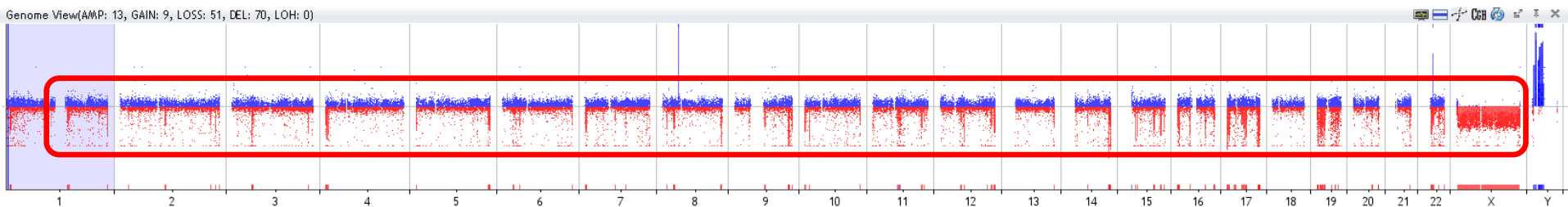
現在最新プロトコルは英語版のみとなり、日本語版は現在準備中です。
完成し次第お知らせいたします。

http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/Public/G4410-90010_CGH_Enzymatic_7.3.pdf

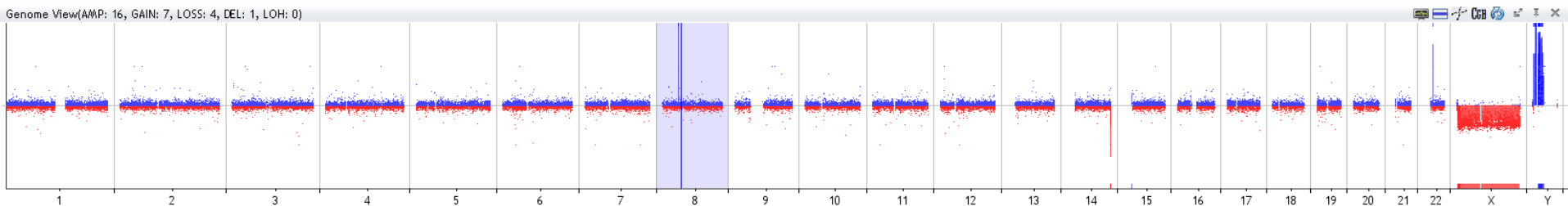


変性温度を98℃に変更することによりデータが改善された例

散発的に“Raindrop” 状のデータが生じる（変性温度 95℃）



変性温度 を98℃に変更



実験の チェックポイント サンプルDNAのQC

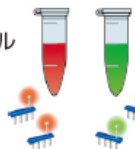


実験のQCポイント

1

DNA の抽出とラベル化

対象サンプル
DNA



リファレンス
DNA

対象サンプルとリファレンス
サンプルから抽出したゲノム
DNA をそれぞれ蛍光色素
(Cy5、Cy3) でラベル化

2

ハイブリと洗浄

コピー数変化なし



コピー数
Loss

コピー数
Gain

混合した 2 種のサンプル溶液
を CGH マイクロアレイにハイ
ブリし、洗浄

3

スキャン

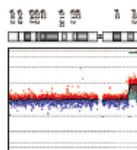


SureScan マイクロアレイス
キャナでスキャン、Cy5 と
Cy3 シグナルを検出

4

データ解析

CytoGenomics
Software



CytoGenomics ソフトウェアで
対象サンプルの重複、欠失領
域を計算、レポート

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



CGHマイクロアレイ実験における定量の重要性

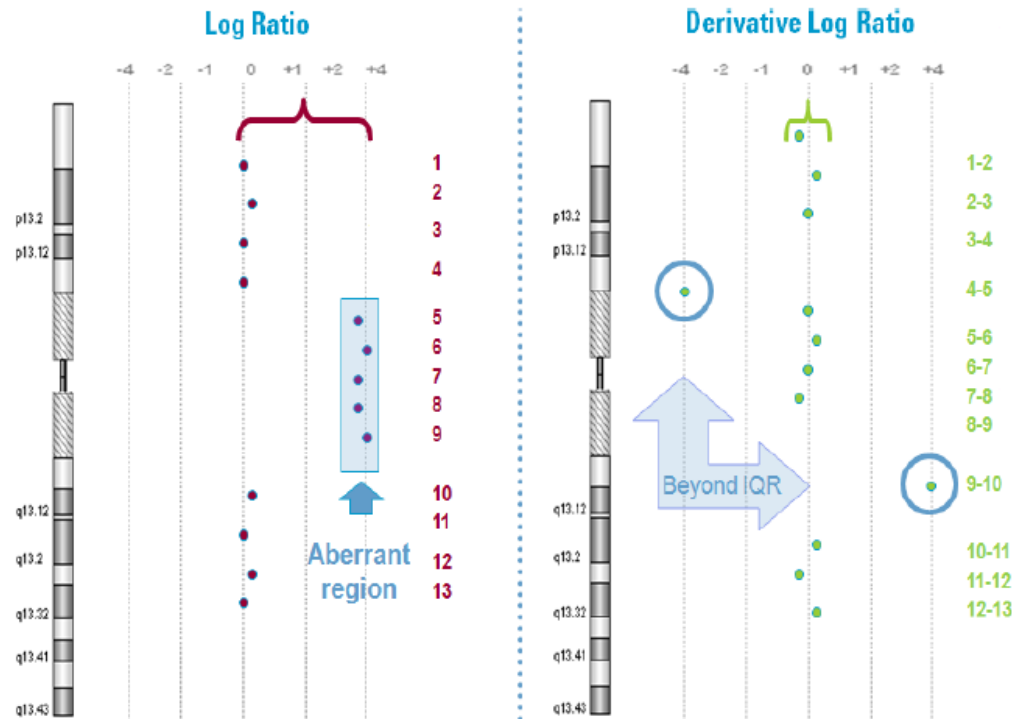
1

DNAの定量が不正確であると、ラベル化に使用するexperimentとreferenceのDNA量に差が生じ、その結果アッセイノイズ（DLRSD）を増加させます。

二本鎖DNA を高く選択的に定量する蛍光分析法
(例 Qubit dsDNA BR Assay Kit) による定量を推奨



DLRSDとは・・・



ゲノム全体の隣接
プローブ間のLog₂ratio
の差のばらつきを計算

より堅牢な計算・
ノイズ評価のために、
IQR (Inter Quartile
Range) statistics を
用いて、コピー数変化の
生じている領域に寄与
するoutliersを除外して
計算。

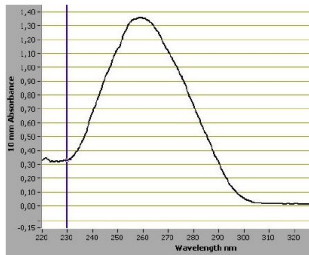


CGHマイクロアレイに推奨するサンプルDNAの品質

1

RNA、炭水化物やたんぱく質、
残存有機溶媒などの混入が低い

- A260/A280 (1.8-2.0) 、
A260/A230 (>1.0) を測定



pure DNA
スキャンデータ



NanoDrop ND-
1000 UV-VIS
Spectrophotometer
(or その相当品)

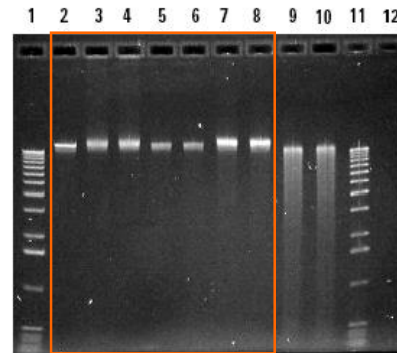
- 二本鎖DNA を
選択的に定量する
蛍光分析法の結果
との比較



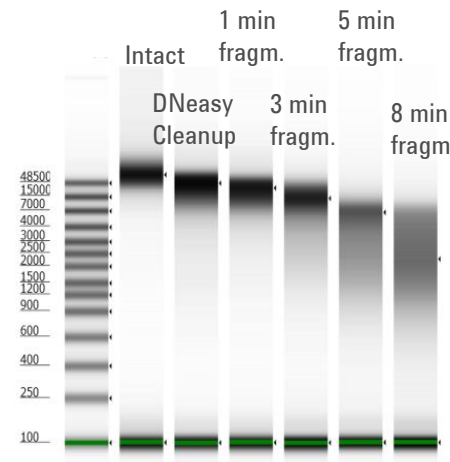
(例 Qubit dsDNA
BR Assay Kit)

分解が最小

- アガロースゲル電気泳動



1.2% Clear E-Gel,
SYBR Gold
Nucleic Acid Gel
Stain染色



TapeStation
Genomic DNA Kit

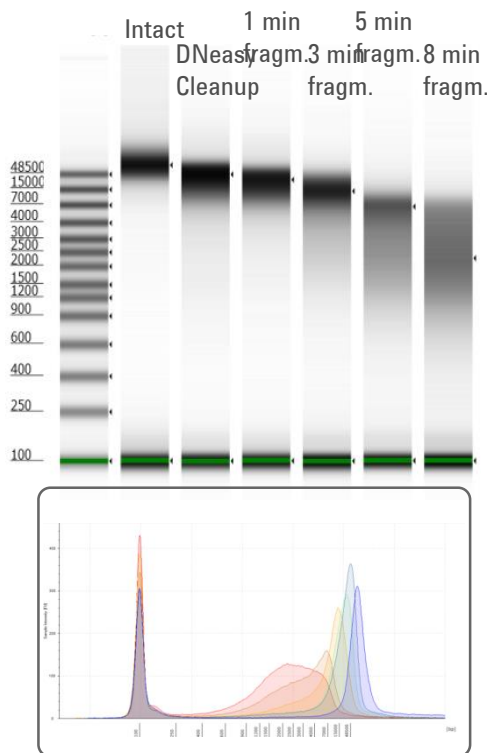


Agilent 4200 TapeStation Genomic DNA Kit

1



TapeStation Genomic DNA Kit 泳動例



Analytical Specification	GeomicDNA
分析分子量範囲	200 to >60,000 bp
感度* ¹	0.5 ng/μL
サイズ決定再現性* ²	200 - 15,000 bp 15% CV
サイズ決定真度* ²	200 - 15,000 bp ± 15%
定量再現性 * ³	15% CV
定量真度* ³	± 20%
定量範囲	10 - 100 ng/μL
DIN推奨濃度範囲* ⁴	5 - 300 ng/μL
分析時間	15 samples < 25 minutes 96 samples <140 minutes
サンプル数 / 1 Tape* ⁵	15
サンプル必要量	1 μL

*¹ Signal:Noise ratio>3 for a single peak

*² Determine using the Genomic DNA Ladder as sample

*³ Average result from various genomic DNA sample types

*⁴ DIN – DNA Integrity Number

*⁵ 1Tapeにつき1Ladderの泳動が必須になります



Agilent Technologies

ラベル化のQC：酵素法 (収量と色素取り込み効率:) 英語版プロトコル v7.5でのアップデート

Input gDNA (μg)	Yield (μg)	Specific Activity of Cyanine 3 and Cyanine 5 Labeled Sample (pmol/μg)
0.2 [*]	3 to 6	15 to 50
0.5	8 to 13	20 to 60
1	9 to 14	20 to 60

* 8x フォーマットのマイクロアレイのラベル化の場合

※制限酵素処理を省略した場合、典型的な取り込み効率値は上記表の値より5低くなります。



データのQCの目安：酵素法

3

Metric	Excellent	Good	Evaluate
BGNoise	< 10	10 to 20	> 20
Signal Intensity	> 150	50 to 150	< 50
Signal to Noise	> 100	30 to 100	< 30
Reproducibility	< 0.05	0.05 to 0.2	> 0.2
DLRSpread	< 0.2	0.2 to 0.3	> 0.3

QC Metrics項目 (g=Cy3、r=Cy5)	意味
AnyColorPrcntFeatNonUnifOL	Feature non-uniformity outlierフラグデータの割合
g_BGNoise, r_BGNoise	ネガティブコントロールの標準偏差
g_SignalIntensity, r_SignalIntensity	シグナル強度の目安
Signal to Noise	SignalIntensity/BGNoise
g_Repro、 r_Repro	繰り返しプローブのBGを差し引いた値のCV%メジアン
DerivativeLR_Spread	CGHデータのノイズレベル (CGH データ解析上のQC) (隣り合うプローブデータのLog2Ratio差の標準偏差)

プロトコル：「トラブルシューティング」も合わせてご覧ください



新しいQCメトリクス（CytoGenomics上に表示）

Restriction Control : 制限酵素の切断をQCしています。「制限酵素反応用のコントロールプローブ」には切断領域が含まれています。プロトコルの内容に従って実験を実施した場合、これらのプローブのシグナルは0になります。Restriction Controlの数値は、最終的に、「制限酵素反応用のコントロールプローブ」のRed および Green シグナルの最小値を示します。もしこのコントロールプローブが搭載されていないアレイデザインである場合、この値は-1になります。

LogRatioImbalance: 染色体上のプローブの並びから予想以上に高い・低いLogRatioのものが存在する、いわゆる “raindrops” の現象（前述）を検出します。染色体ごとのAmplificationとDeletionのバランスを計算しています。閾値はAmplificationとDeletionの数のバランスが通常予想される範囲から外れて、アンバランスであることを検出するように設定されています。一方向へのノイズが生じることで、通常Amplification もしくはDeletionいずれか片方だけに偏った偽Aberration callが生じ得ていることを示します。正常のサンプルで、広いカバレッジのアレイデザインで、Aberrationがそれほど多くない、質の良いデータでは、値は >-0.26 、 <0.26 (excellent range) となることが予想されます。CytoGenomics 3.0 上で望ましい値は >-0.75 です。

StdDevLR: 新しいStandard Deviationのメトリクス。DerivativeLR_Spread よりもシンプルで、waviness（染色体に沿って予想以上にLogRatioがあがったり下がったりする）を検出します。log ratiosの生値を計算に用いられています。常染色体のLogRatioの標準偏差を単純に計算することにより、データに存在するwavinessを検出し、その値は <0.3 が望ましいです。閾値の範囲は“DerivativeLR_Spread”と同じです（0.3）。

使用する試薬・機器類

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]

- 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)



リファレンスゲノム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。
- 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

* 精製カラムのみの販売もあります

(品名：Purification Columns、型番：5190-3391)

** リファレンスゲノムDNAが付属していないものも販売しております

(品名：SureTag DNA Labeling Kit、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]



(参考) Reference DNA例

CGH		
CGH+SNP		
	Individual	Pool
Human	Agilent Reference DNA Male*	Promega p/n G1521 (female)
	Agilent Reference DNA Female*	Promega p/n G1471 (male)
	NA18507 (Yoruba Male)**	
	NA18517 (Yoruba Female)**	
	NA12891 (European Male)**	
	NA12878 (European Female)**	
	NA18579 (Chinese Female)**	
CGH		
Mouse	Jackson Labs p/n 000664 (female and male)	
Rat	Harlan Sprague Dawley (custom)	

* SureTag Complete DNA Labeling Kit (5190-4240) に含まれます。

** Coriell Instituteより入手可

Reference DNAのCNVに由来するコピー数変化検出領域

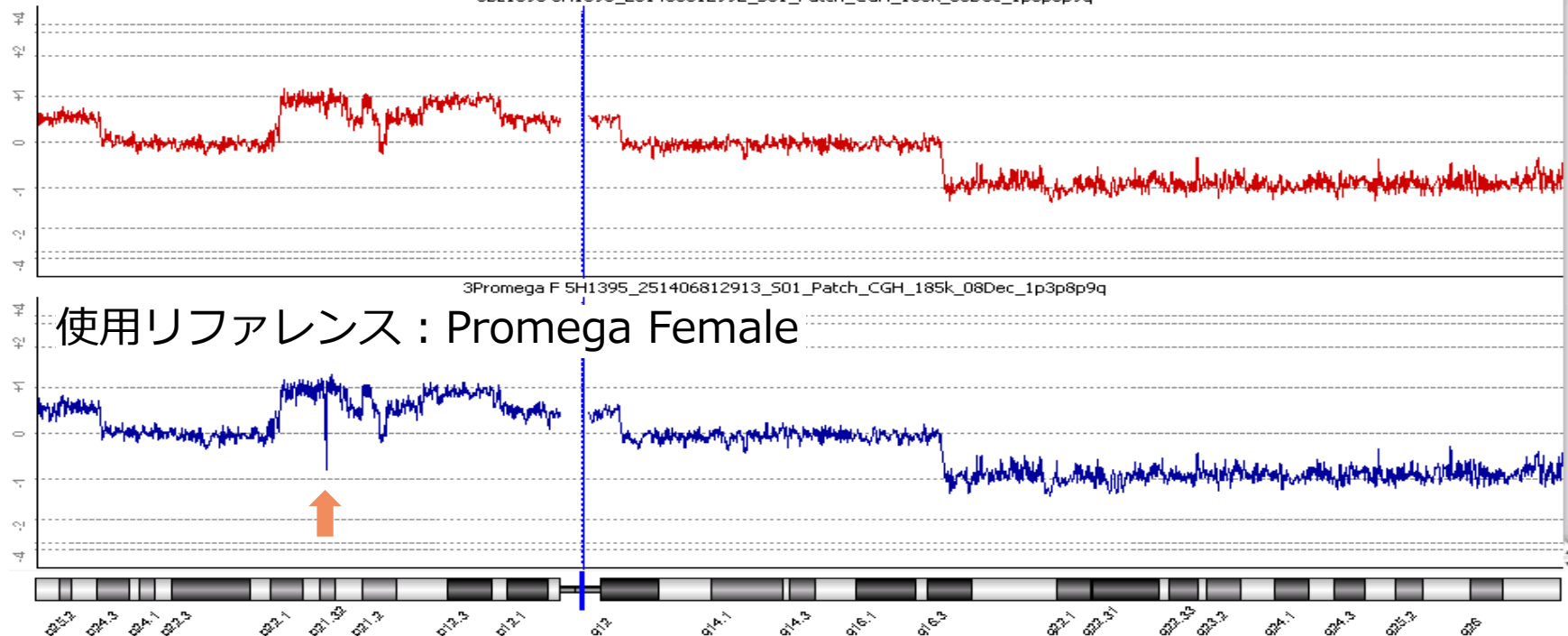
サンプル：癌由来 (H1395)

使用マイクロアレイ：Agilent 185K aCGH

6番染色体 (サンプル H1395)

使用リファレンス：BL1395 (同一患者由来のnormal DNA)

3BL1395 5H1395_251406812992_S01_Patch_CGH_185k_08Dec_1p3p8p9q



Cot-1 Human DNA

- 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 µg	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



スキャナ より確かな結果を生む 高性能スキャナ

SureScan

- 自動でスライドを連続スキャン
- スキャナのス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

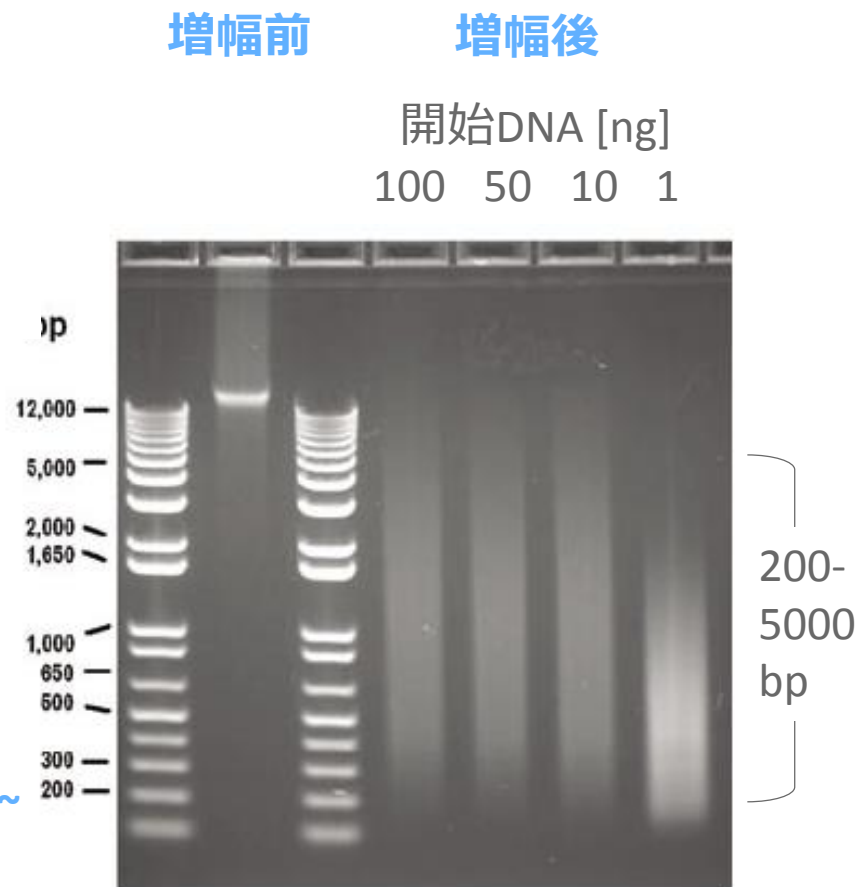
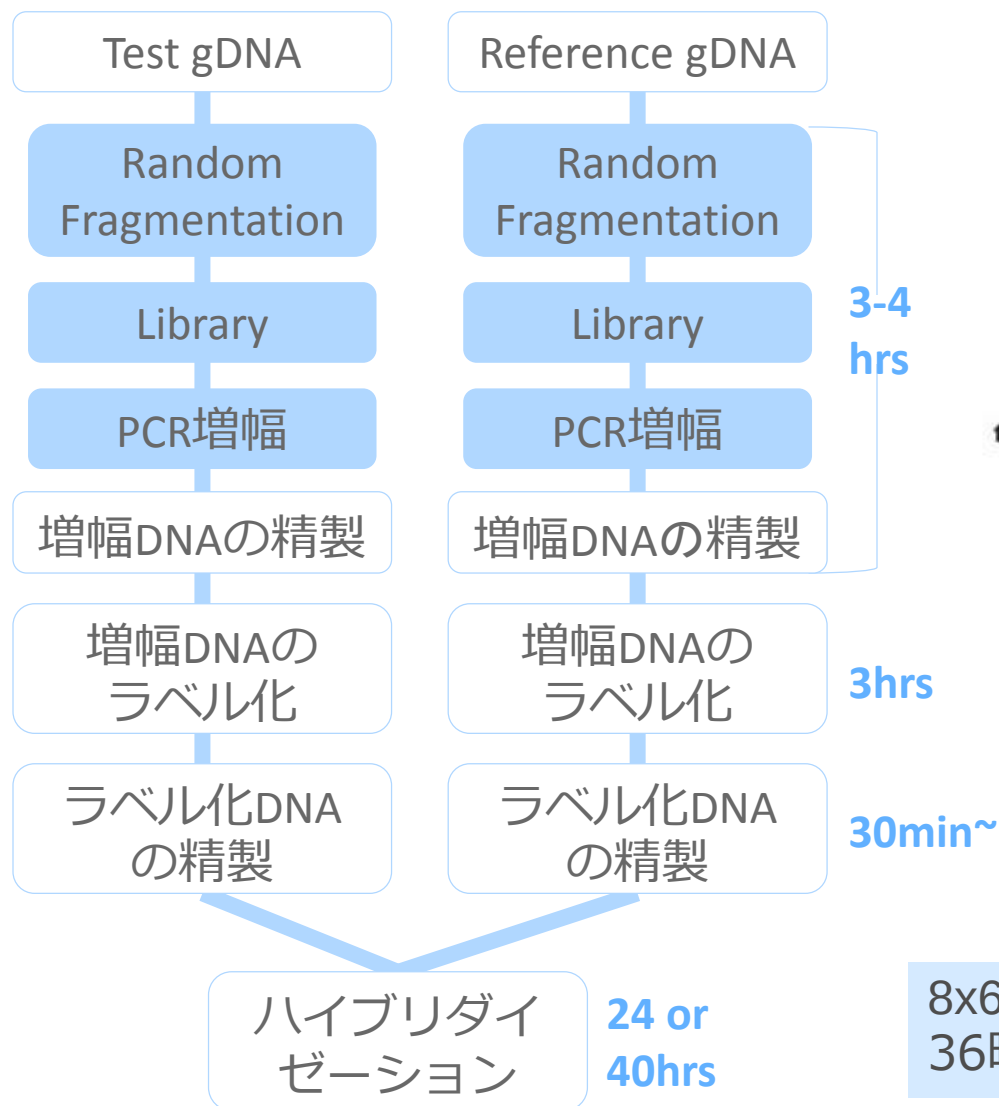


アジレント・テクノロジー 微量ソリューション



① アジレントCGH 増幅法

GenomePlex Complete Whole Genome Amplification による全ゲノム増幅

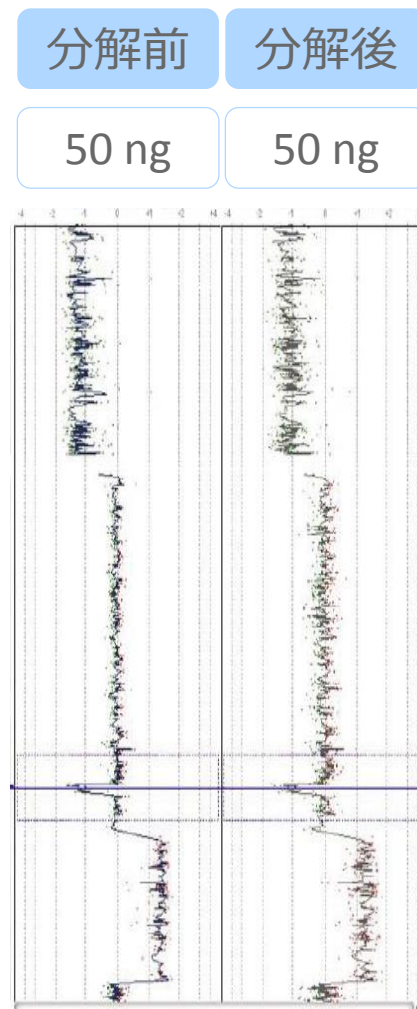
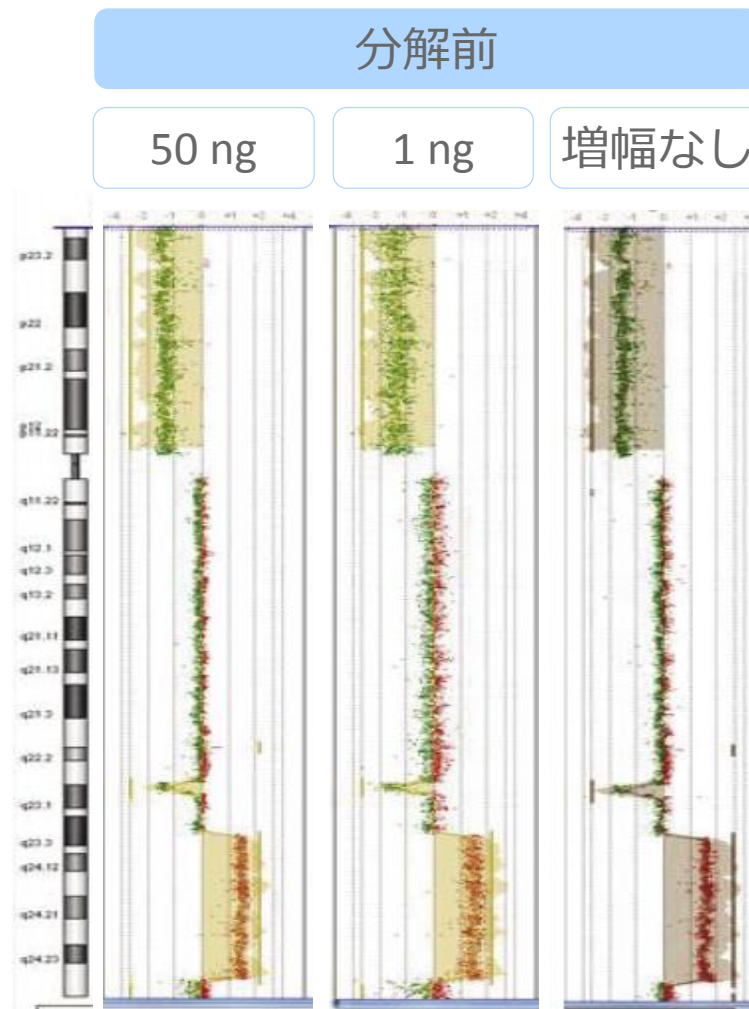
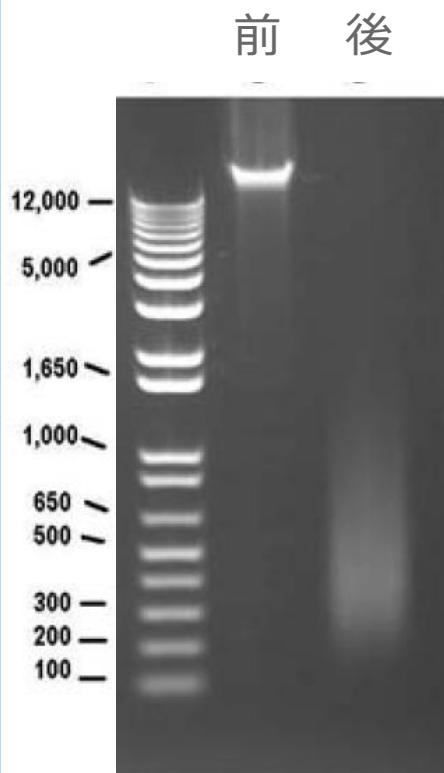


8x60K, 4x180K フォーマットの場合
36時間程度で結果取得



① アジレントCGH 増幅法 CGHアレイデータ例

分解DNA
電気泳動



使用マイクロアレイ CGH 2x105K



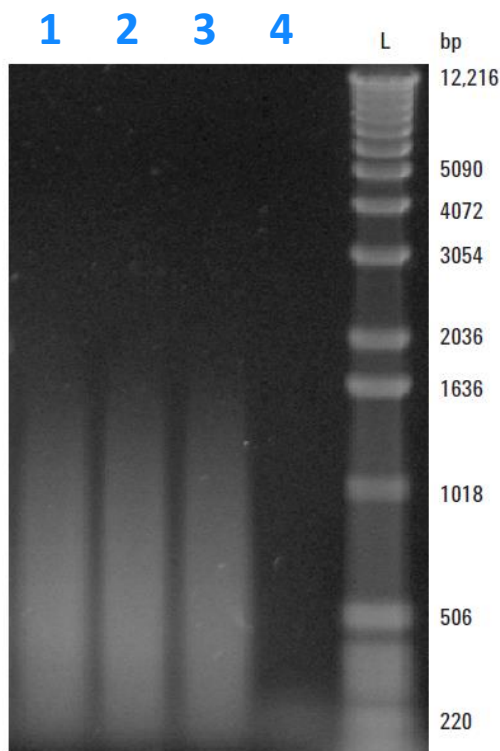
Agilent Technologies

②アジレントCGH 1 細胞プロトコル

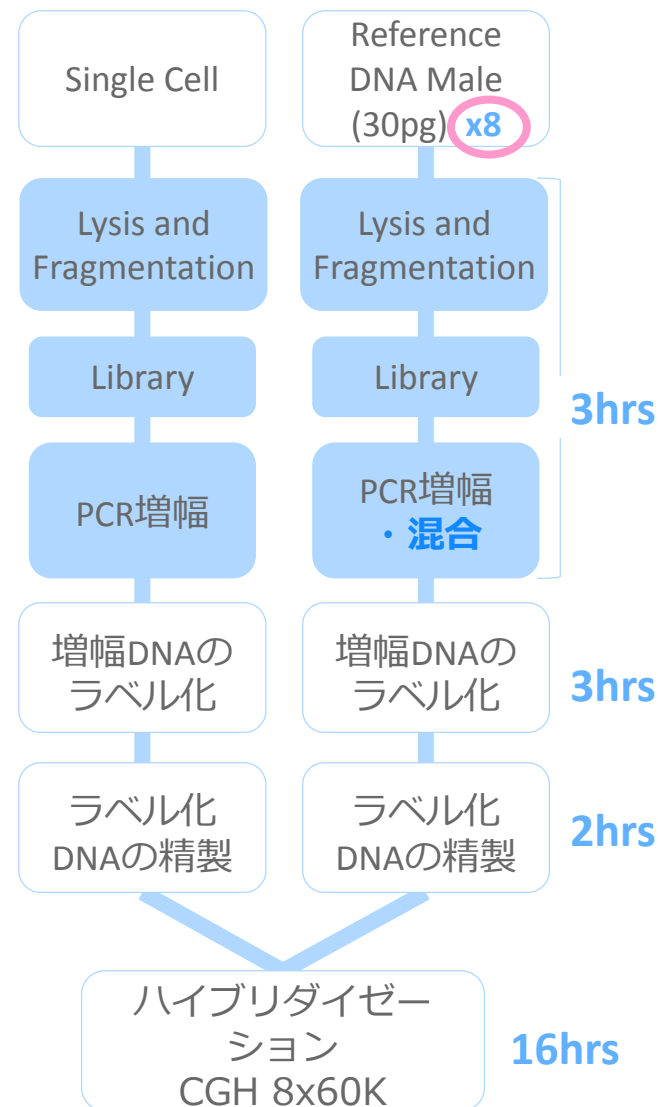
Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Single Cell Analysis [G4410-90012]

- 増幅原理：PCR-based WGA methods
- 増幅試薬：PicoPlex WGA Kit for Single-Cell (Rubicon Genomics)

増幅後DNA



1. Reference Genome Male (30 pg)
2. 精製ゲノム DNA (15 pg)
3. 1 細胞 (胚生検)
4. テンプレート なし



②アジレントCGH 1細胞プロトコル

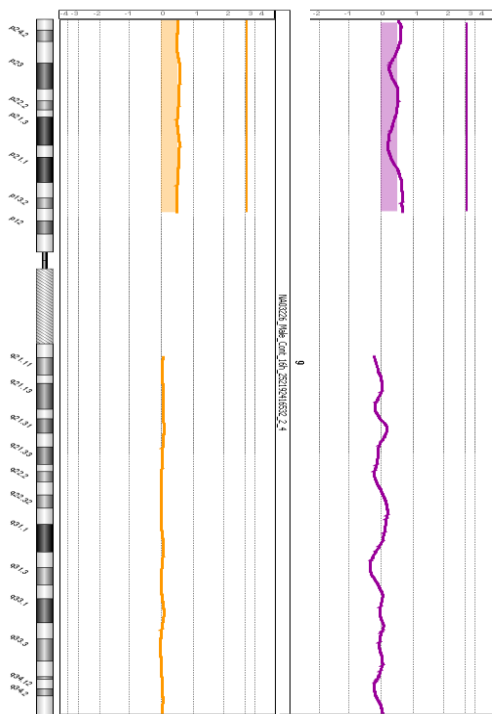
精製ゲノムDNAおよび胚生検を用いた解析例

精製ゲノムDNA 15pg

胚生検 1細胞

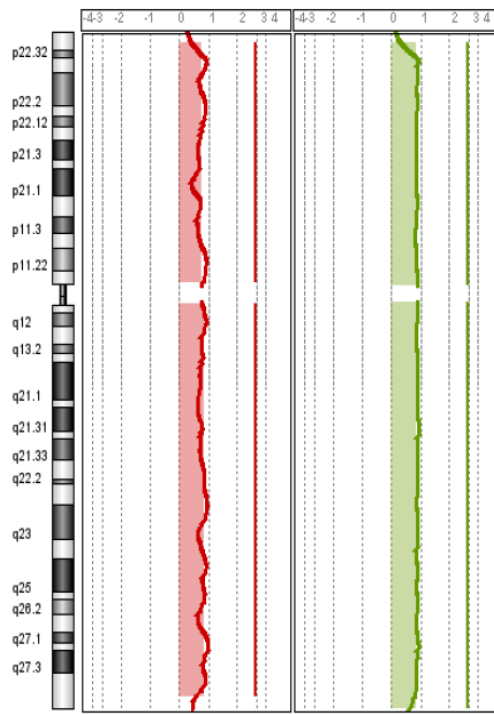
増幅なし*

増幅あり



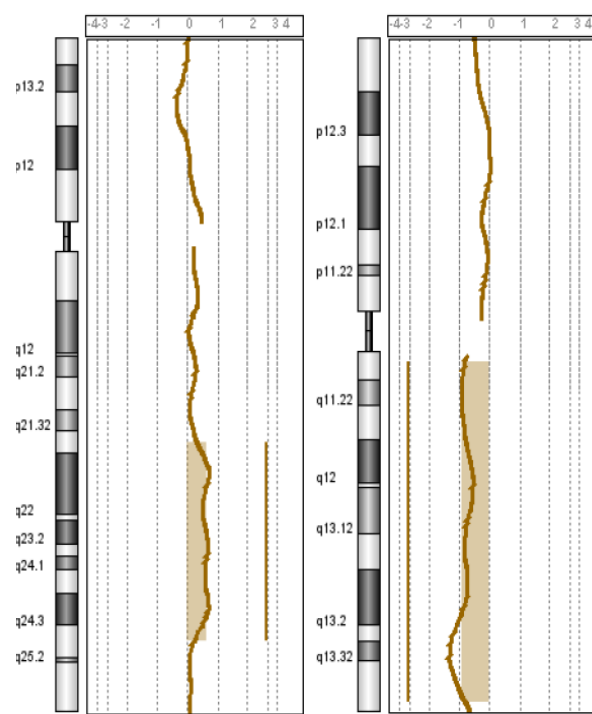
増幅あり

増幅なし*



増幅あり

増幅あり



検出条件

≥ 5 Mb aberrations.

増幅 $\geq 0.3 \log_2 \text{ ratio}$ ・ 欠失 $\geq 0.55 \log_2 \text{ ratio}$

使用マイクロアレイ

SurePrint G3 Human CGH 8 x 60K

*増幅なしのDNA量 : 500 ng



Agilent Technologies

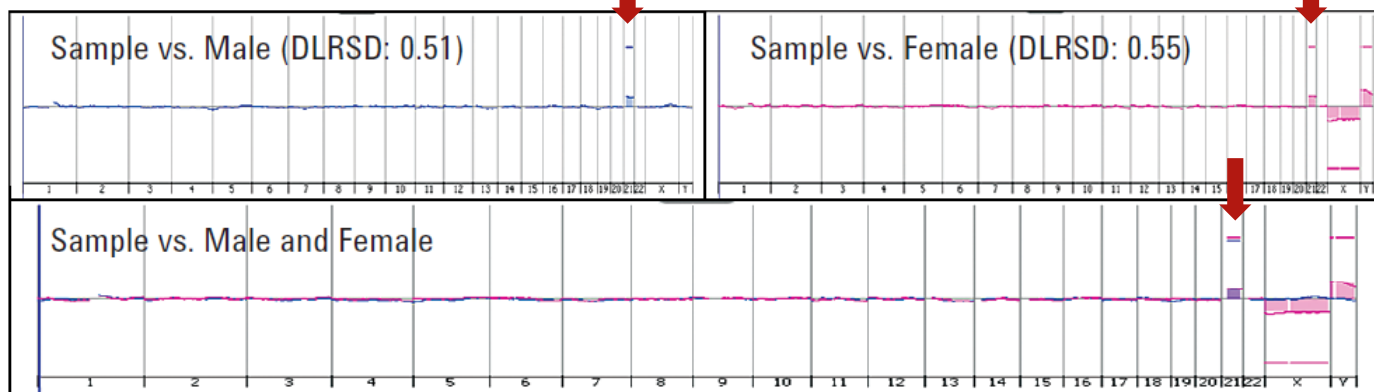
アジレント1細胞ソリューション アプリケーションノート

“Same Day, Cost-Effective Aneuploidy Detection with Agilent Oligonucleotide array CGH and MDA Single Cell Amplification Method” [5991-4063EN]

- 増幅原理：WGA method based on multiple displacement amplification (MDA) (Phi29ポリメラーゼ使用)
- 増幅試薬：REPLI-g single cell kit (Qiagen)
- 増幅ゲノム：10kb以上 (2-100 kb)

Dr. Ali Hellaniとのコラボレーション

擬似一色法解析



5日目の胚盤胞 (Blastocyst)、8x60K CGHマイクロアレイ使用

サンプル
調製・増幅
2.5時間

ラベル化
1.5 時間

ハイブリ
2-6 時間

スキャン・解析
30分



Agilent Technologies

マイクロアレイ ラインナップ



ゲノム構造変化検出用のカタログマイクロアレイ

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)

CGH+SNP

コピー数変化 と コピー数変化を伴わない構造変化
(LOH・UPD) を同時に高解像検出
(ヒトのみ)

- 遺伝子・exon 領域にバイアスをかけたデザイン。網羅的な解析に
- 疾患関連領域によりフォーカスした解析に (ヒトのみ)
- Baylor College of Medicine デザイン マイクロアレイ (ヒトのみ)

CNV

Database of Genomic Variant *登録のCopy number variant (CNV) やSegmental Duplication の領域に
フォーカスしたデザイン、
もしくはバイアスなしデザイン (ヒトのみ)

*2009年 DGV v5



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 1 × 1 M SurePrint G3 Human CGH 2x400K SurePrint G3 Human CGH 4x180K SurePrint G3 Human CGH 8x60K SurePrint G3 Human High-Resolution Discovery 1x1M* SurePrint G3 Human CGH 8 × 60 K (ISCA)* SurePrint G3 Human CGH 4 × 180 K (ISCA)* SurePrint G3 CGH Postnatal Research 4x180K* SurePrint G3 CGH Postnatal Research 8x60K*	Human Genome CGH 244A Human Genome CGH 105A Human Genome CGH 4 × 44K Human CGH 4 × 44 K (ISCA)* Human CGH 2 × 105 K (ISCA)* SurePrint HD CGH Prenatal Research 2x105K*
	CGH + SNP	SurePrint G3 CGH+SNP 2x400K SurePrint G3 Cancer CGH+SNP 4x180K* SurePrint G3 CGH+SNP 4x180K (ISCA) GenetiSure Postnatal Research CGH+SNP 2 X 400K GenetiSure Cancer Research CGH+SNP 2 X 400K SurePrint G3 CGH+SNP Postnatal Research 2x400K* SurePrint G3 CGH+SNP Prenatal Research 4x180K*	
	CNV	SurePrint G3 Human CNV 2x400K*	
Mouse	CGH	SurePrint G3 Mouse CGH 1x1M SurePrint G3 Mouse CGH 4x180K	
Rat	CGH	SurePrint G3 Rat CGH 1x1M* SurePrint G3 Rat CGH 4x180K*	
Chicken	CGH		Chicken Genome CGH 244A *
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



CGH マイクロアレイ

遺伝子・exon 領域にバイアスをかけたデザイン。網羅的な解析に

型式	品名	Median probe spacing		
		intragenic	CNV	Overall
G4447A	SurePrint G3 Human CGH マイクロアレイキット 1 × 1 M	1.8 kb	2.1 kb	2.1 kb
G4448A	SurePrint G3 Human CGH マイクロアレイキット 2 × 400 K	4.6 kb	5.2 kb	5.3 kb
G4449A	SurePrint G3 Human CGH マイクロアレイキット 4 × 180 K	11.2 kb	12.7 kb	13.1 kb
G4450A	SurePrint G3 Human CGH マイクロアレイキット 8 × 60 K	33.3 kb	26.7 kb	41.4 kb
G4824A#23642	SurePrint G3 Human High-Res Discovery マイクロアレイ 1 × 1 M*	2,628 (no bias)		

モデル生物・SurePrint HDの製品もあります。

疾患関連領域によりフォーカスした解析に

型式	品名	Targeted ISCA region	Median probe spacing	
			ISCA 領域	backbone
G4827A#31746	SurePrint G3 Human CGH マイクロアレイ 8 × 60 (ISCA) *	~500	5 kb	60 kb
G4826A#31748	SurePrint G3 Human CGH マイクロアレイ 4 × 180 K (ISCA) *	~500	5 kb	20 kb
G4426B#31747	Human CGH マイクロアレイ 4 × 44 K (ISCA) *	~230	5 kb	75 kb
G4425B#31750	Human CGH マイクロアレイ 2 × 105 K (ISCA) *	~500	5 kb	35 kb

ISCA (The International Standards For Cytogenomic Arrays Consortium) によるデザイン。
ISCA 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の標準化を目指した国際コンソーシアムで、2015 年 7 月現在は The ClinGen Structural Variant Working Group に変更されています。

*受注製造品です。

SurePrint HD human CGH マイクロアレイ仕様

		Human Genome CGH Microarray Kit 244A	Human Genome CGH Microarray Kit 105A	Human Genome CGH Microarray Kit, 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 SurePrint G3			
		Mouse		Rat	
		1x1M	4x180K	1x1M	4x180K
AMADID		027414	027411	027065	027064
Genome build		mm9	mm9	rn4	rn4
Intragenic probes		55.3%	50.9%	43.0%	38.8%
Intergenic probes		43.5%	43.1%	55.8%	55.1%
Median probe spacing	Intragenic	1.5kb	9.1 kb	1.3 kb	8.0 kb
	Intergenic	2.5 kb	14.0 kb	2.4 kb	14.5 kb
	Overall	1.8 kb	10.9 kb	1.7 kb	10.7 kb
Average probe spacing	Overall	2.7 kb	15.1kb	2.8 kb	16.0 kb
RefSeq* coverage	At least 1 probe	87.9%	73.9%	89.9%	73.8 %
RefSeq* coverage (+/- 5kb)	At least 1 probe	96.1%	94.8%	98.0%	97.4 %

*25,767 mouse genes
16,168 rat genes



CGH+SNP マイクロアレイ

癌・疾患関連の標的領域・標的遺伝子 exon 領域にフォーカスしたデザイン

型式	品名	参照データベース	CGH Median probe spacing			SNPプローブ	
			Exon領域	backbone	Overall	標的 SNPs数	LOH/UPD 解像度
G5975A	GenetiSure Cancer Research CGH+SNP マイクロアレイキット 2 X 400K	COSMIC/CGC	~ 89% ≥3プローブ/エクソン	20 kb	~9.8 kb	102,911 SNPs	2.5-10 Mb
G5974A	GenetiSure Postnatal Research CGH+SNP マイクロアレイキット 2 X 400K	ClinGen/ISCA	~ 89% ≥3プローブ/エクソン	20 kb	~9.8 kb	102,911 SNPs	2.5-10 Mb

ゲノムワイド、かつターゲット領域・遺伝子にフォーカス

- 特定の遺伝子のエクソンにターゲット
- 特定の領域により多くのプローブを配置
- 各領域で高いprobe scoreのCGH probesを選抜 (>0.5 quality score)

Cancer

- 癌関連領域と遺伝子にフォーカス
- エクソンレベルにカバー：690 遺伝子 (CGCとSanger COSMIC データベース)
- 標的エクソンの89% に ≥ 3 プローブを配置
- テロメア/セントロメア・2つのfragile site (FHIT, WWOX)を含む 94 の追加領域にプローブ密度追加

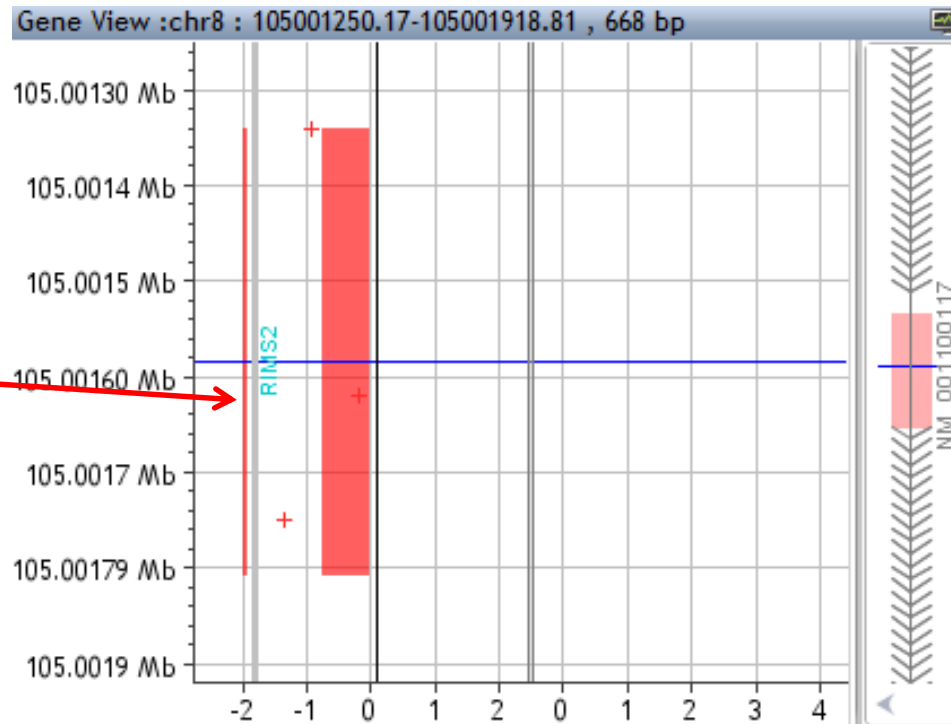
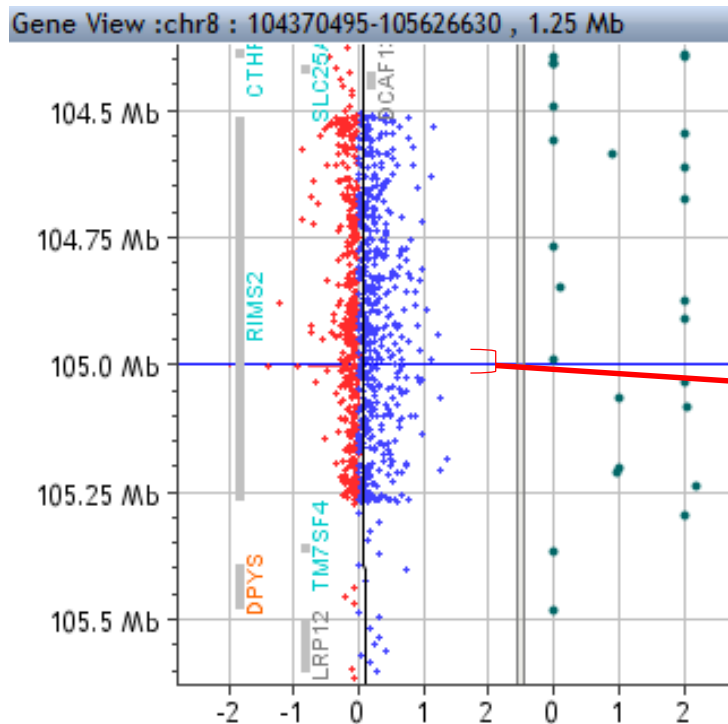
Postnatal

- 疾患関連領域と遺伝子にフォーカス
- エクソンレベルにカバー：ClinGen/ISCA において量感受性のあると考えられている 424 遺伝子
- 標的エクソンの89% に ≥ 3 プローブを配置
- ペリセントロメア・サブテロメアを含む従来の ISCA 領域にプローブ密度追加



GenetiSure Cancer Research CGH+SNPマイクロアレイ データ例

Loss 検出 (Single Sanger Exon (Cancer) – Leukemia – RIMS2)



- 0.47kb
- 3 probes
- $\text{Log}_2\text{Ratio} = -0.77$

社内データ



Agilent Technologies

CGH+SNP マイクロアレイ

遺伝子・exon 領域にバイアスをかけたデザイン。網羅的な解析に

型式	品名	CGH Median probe spacing		SNPプローブ (2016年3月以前のデザイン)	
		intragenic	Overall	搭載 プローブ数	LOH/UPD 解像度
G4842A	SurePrint G3 CGH+SNP マイクロアレイキット 2 × 400 K	~4 kb	~7 kb	64,367 SNPs	5-10 Mb

癌・疾患関連領域によりフォーカスした解析に

型式	品名	CGH Median probe spacing		SNPプローブ (2016年3月以前のデザイン)	
		Targeted region	Overall	搭載 プローブ数	LOH/UPD 解像度
G4869A	SurePrint G3 Cancer CGH+SNP マイクロアレイキット 4x180K*	1 probe/ 0.5-1 kb	25 kb	59,647 SNPs	5-10 Mb
G4890A	SurePrint G3 CGH+SNP マイクロアレイキット 4x180K**	5 kb	25 kb	59,647 SNPs	5-10 Mb

*Cancer Cytogenomics Microarray Consortium ;
癌のサイトゲノミクス用マイクロアレイの標準化を目指した国際コンソーシアムによるデザイン。

受注製造品です。

標的領域：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 (現 The ClinGen Structural Variant Working Group) によるデザイン

標的領域：

- ・ 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



Baylor College of Medicine デザイン マイクロアレイ

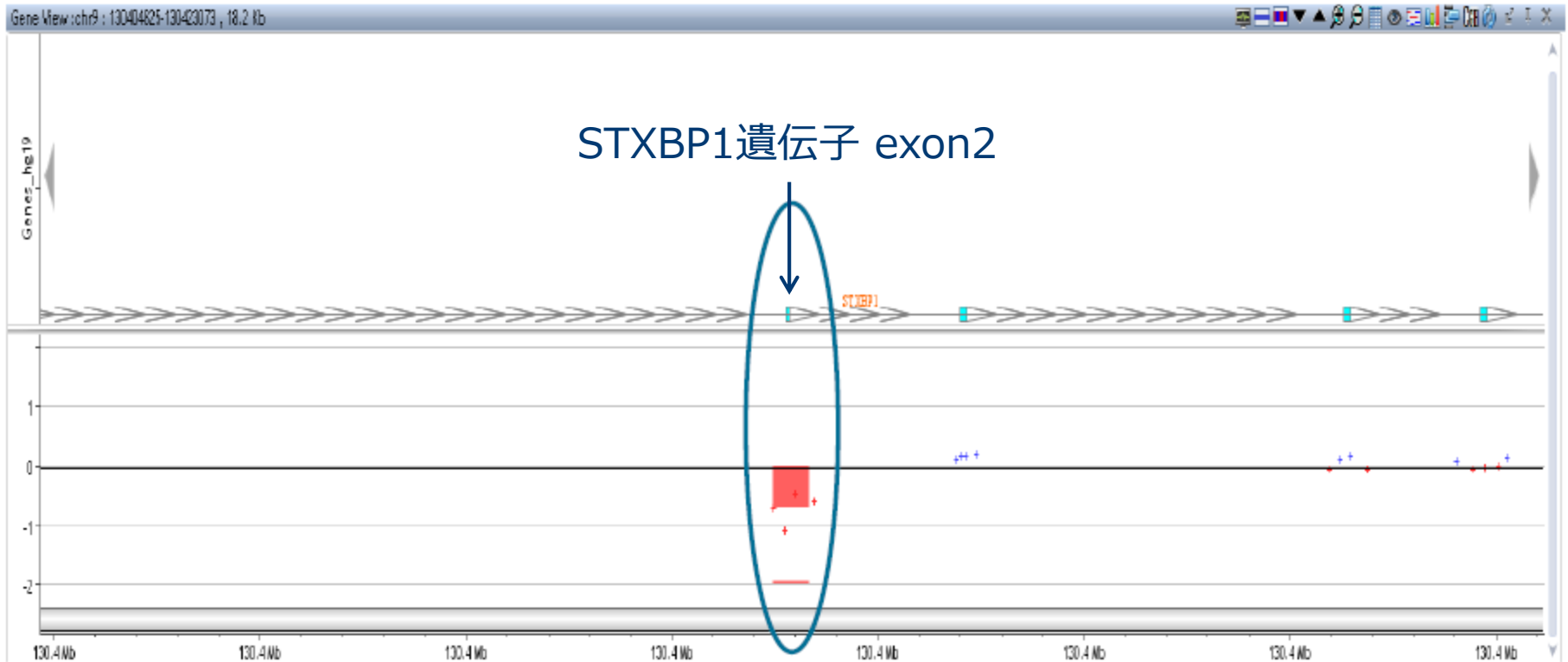
型式	品名	CGH Average probe spacing			Disease-associated miRNA	SNPプローブ (2016年3月以前デザイン)	
		Targeted region	overall	backbone		搭載 プローブ数	LOH/UPD 解像度
G5957A	SurePrint G3 CGH+SNP Postnatal Research マイクロアレイキット 2x400K	Exon-by-exon : cytogenetically relevant 1700 genes (ISCA領域含む)	3.7 kb	30 kb	755	59,647 SNPs	5-10 Mb
G5961A	SurePrint G3 CGH Postnatal Research マイクロアレイキット 4x180K	Exon-by-exon : cytogenetically relevant 1700 genes (ISCA領域含む)	2.4 kb	30 kb	755		-
G5958A	SurePrint G3 CGH Postnatal Research マイクロアレイキット 8x60K		11 kb	60 kb	-		-
G5960A	SurePrint G3 CGH+SNP Prenatal Research マイクロアレイキット 4x180K	Exon-by-exon: cytogenetically relevant 22 genes	13.4 kb	30 kb	-	59,647 SNPs	5-10 Mb
G5959A	SurePrint HD CGH Prenatal Research マイクロアレイキット 2x105K			30 kb	-		-
G5956A	SurePrint G3 CGH+SNP Cancer Research マイクロアレイキット 2x400K	Exon-by-exon: cancer associated 2,300 (6 probes per exon) genes (CCMC標的領域含む)	2.4 kb	12 kb	235	59,646 SNPs	5-10 Mb



Exon-by-exonデザイン

STXBP1 遺伝子の単一エクソンのコピー数変化をソフトウェアで自動検出

STXBP1遺伝子 exon2 の欠失を わずか4プローブで検出



CNV マイクロアレイ

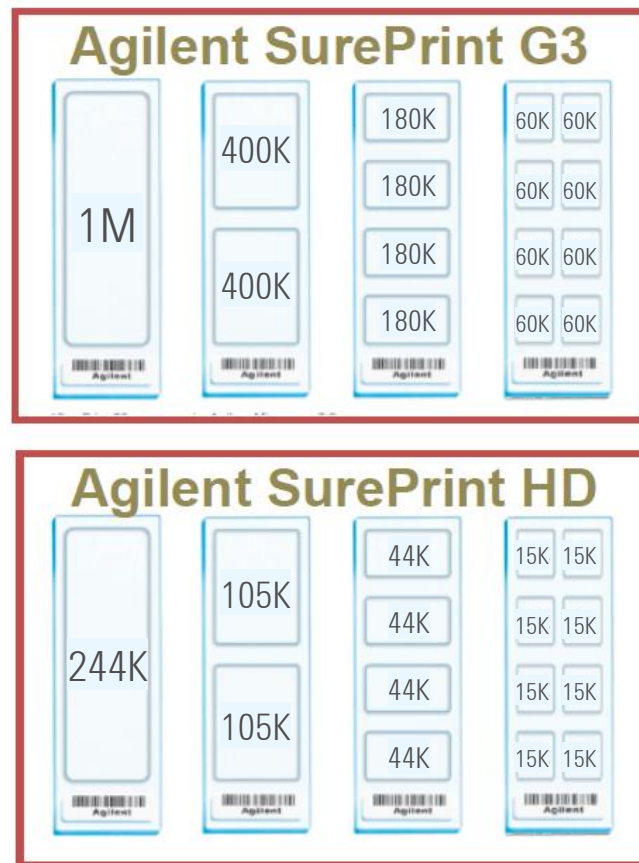
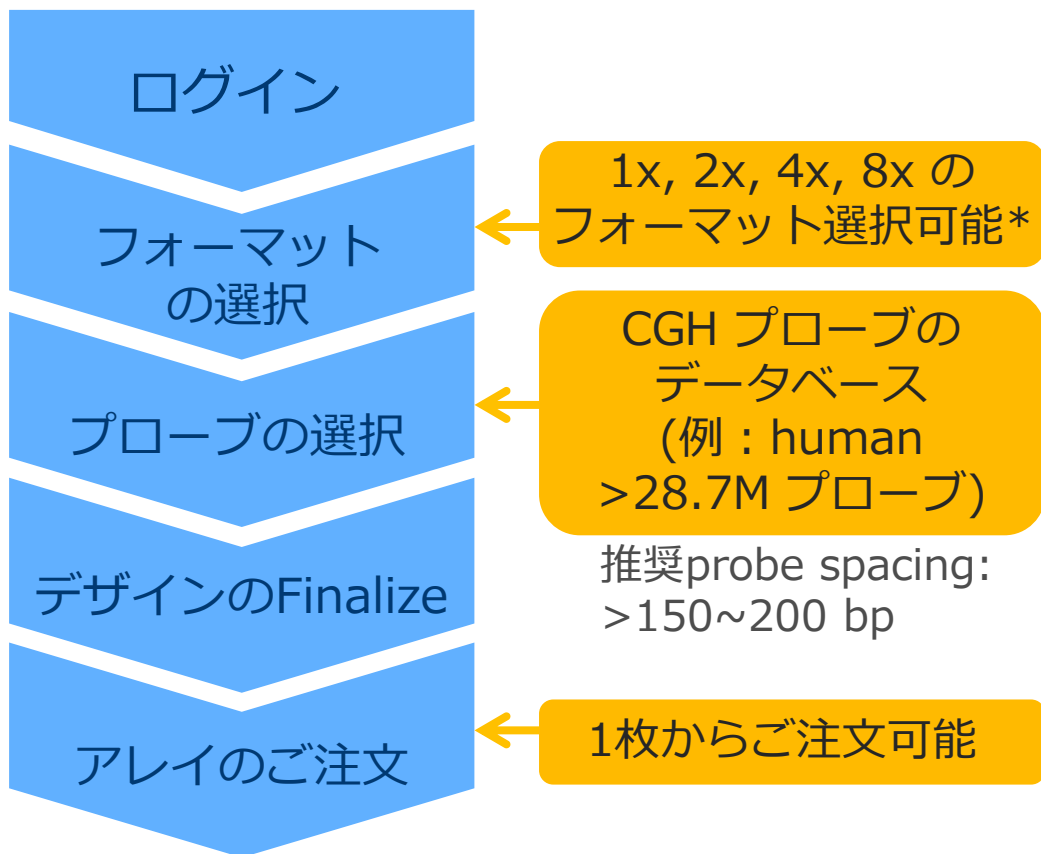
		SurePrint G3 Human CNV 2x400K
Total features		420,288
Genome build		hg18
Exonic probes		17,588 (4.3%)
Intragenic probes		207,876 (50.3%)
Intergenic probes		205,016 (49.7%)
Median probe spacing	Intragenic	920
	Intergenic	1,077
	CNV	1,130
	Overall	1,056
Average probe spacing	Overall	6,630
RefSeq coverage (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%)
	>=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%)



SureDesignでカスタムマイクロアレイをデザインするフロー

SureDesign 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

*マイクロアレイのフォーマット



*CGH+SNPカスタムアレイは SurePrint G3 のみ

SureDesignの CGH, SNP プローブ データベースコンテンツ

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	約115,000 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	



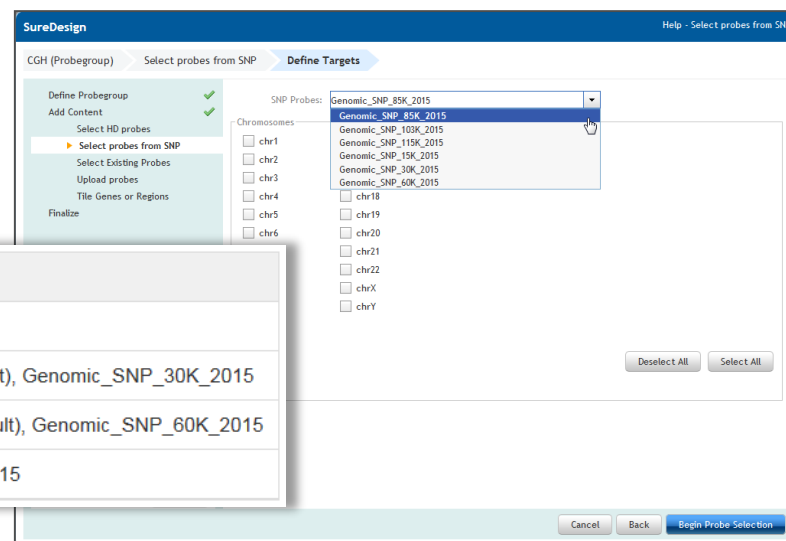
SureDesign v. 3.5以降（2016年3月以降）のSNPプローブ

よりパフォーマンスの良い SNP プローブでより高解像度の LOH 検出を実現

- 約 60K のSNP プローブを追加（トータルで約115K SNPプローブ）
- SNP プローブの アノテーションをdbSNP130からdbSNP141にアップデート
それに伴い、従来デザインにあったSNPプローブのうち一部排除
（例：genotypeがNNになってしまうものなどを排除）

CGH+SNP カスタムアレイ作成時
プローブリストを選択いただきます

Array Layout	Available Probegroups
8 x 60K	Genomic_SNP_30K_2015, Genomic_SNP_15K_2015 (default)
4 x 180K	Genomic_SNP_103K_2015, Genomic_SNP_85K_2015, Genomic_SNP_60K_2015 (default), Genomic_SNP_30K_2015
2 x 400K	Genomic_SNP_115K_2015, Genomic_SNP_103K_2015, Genomic_SNP_85K_2015 (default), Genomic_SNP_60K_2015
1 x 1M	Genomic_SNP_115K_2015 (default), Genomic_SNP_103K_2015, Genomic_SNP_85K_2015



CGH カスタムアレイ作成時の注意

カスタムアレイ用に選抜したProbeの大部分についてコピー数変化が見込まれる場合、dye normalization用のprobe groupも別途含める必要があります。

- **その数は？**

Minimum: Feature Extractionの機能上、全 available feature の 1% 以上

Recommend: もし可能であれば、244K フォーマットの場合10%以上

- **その内容は？**

non-aberrant がmajorであることが見込まれる領域、または常染色体にランダムに設定したプローブグループなどが望ましいです。

現在カスタムアレイ作成時、各常染色体からランダムに選択された“**Agilent Normalization Probe group**”を選択いただけます。

（もちろん、このProbe groupをremoveして、ユーザ様定義によるprobe groupをかわりに載せていただいても構いません）

CGH+SNP マイクロアレイ 解析原理

SNPプローブが新しくなりました (2016年 3 月)

対象 : GenetiSure Cancer Research ・ Postnatal Research CGH+SNPマイクロアレイ
2016年 3 月以降のカスタムCGH+SNPマイクロアレイ

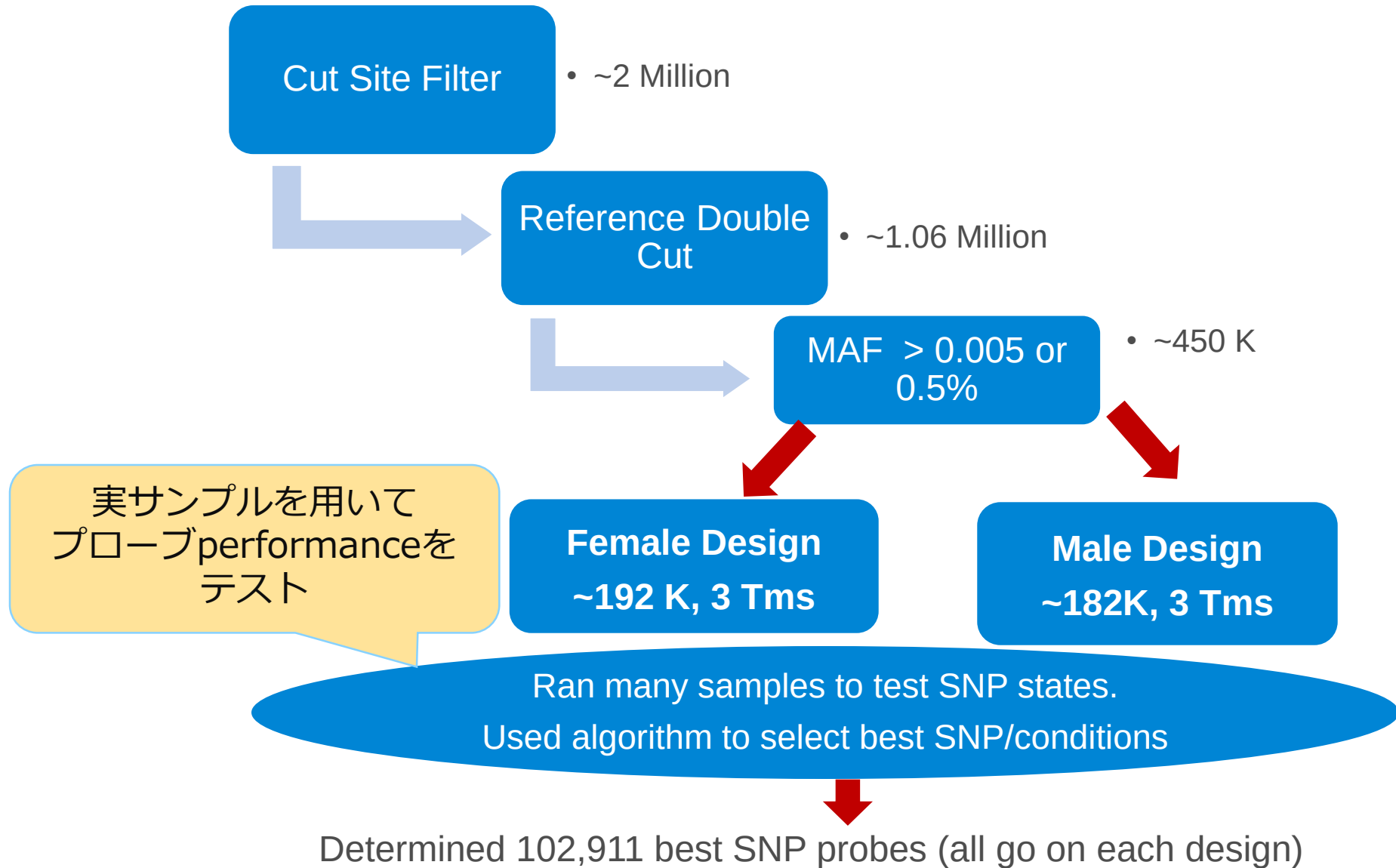
- SNPプローブのアノテーション参照先のデータベースを dbSNP130からdbSNP141にアップデート。
従来デザインにあったSNPプローブのうち genotypeがNNになるものなど、一部排除しました。
- 選抜基準Minor Allele Frequency を>5%から0.5%に変更し、
SNPプローブの数が増加 (60K→103K) 。
さらに実験により性能の良いプローブを選抜しました。
copy neutral-LOHの検出解像度がアップ (5-10 Mb→2.5-10 Mb)
SNPカバレッジがより均一化されました。

ご注意ください

- 2016年3月以降のSNPプローブが搭載されているマイクロアレイの
サポート対象とする推奨Referenceサンプルが
Agilent Reference Male ・ Femaleとなりました。
- 2016年 3 月以降デザインのCGH+SNPマイクロアレイ最適な条件で
解析するにはCytoGenomics ソフトウェア version 3.0.6以降と
dbSNP141に基づく新Reference genome fileの使用による解析が必要です。



SNPプローブの特徴



Note: Only Agilent European Male/Female References are supported with the new arrays

(参考) 2016年3月以前のSNPプローブが設計されているSNP領域

dbSNP130

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

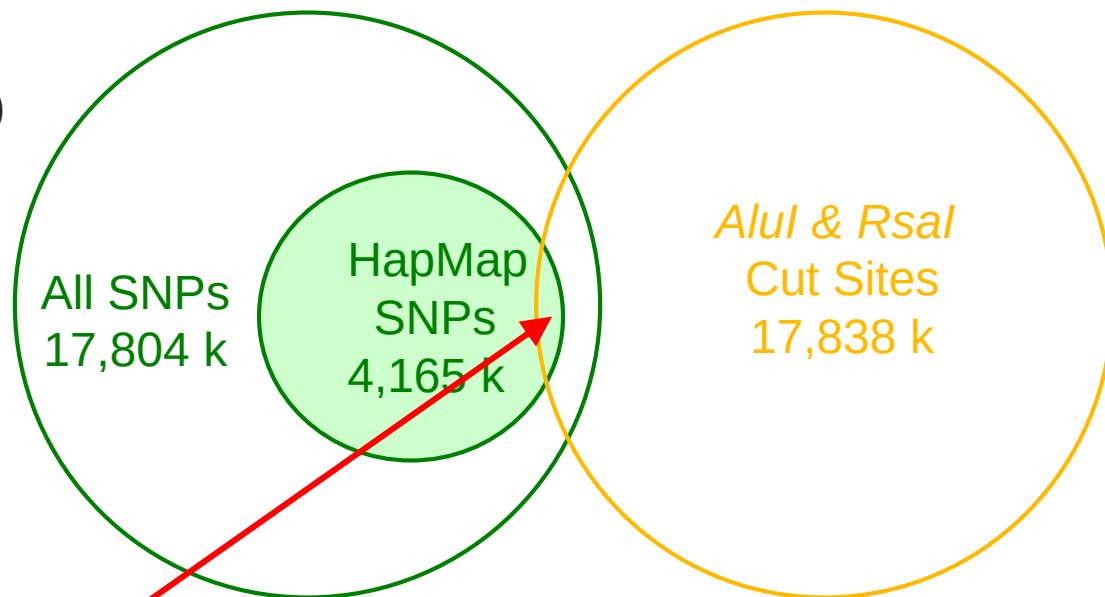
2. # SNPs in genome:
~17,804,034 (Sep 3rd 2009)

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

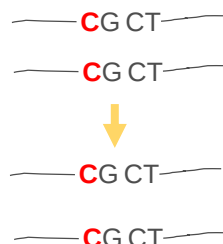


制限酵素によりアレルに依存したシグナル強度を生じる

例：CとAのSNP領域（アレルAでは制限酵素配列となり、Cでは切断されない）

Homozygous CC

制限酵素による
断片化
(AluI & RsaI)



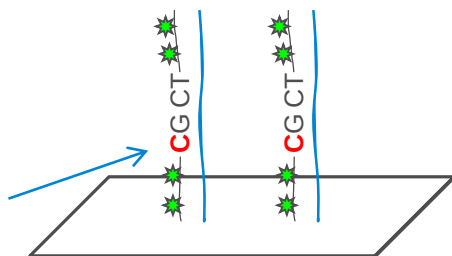
酵素による
ラベル化反応



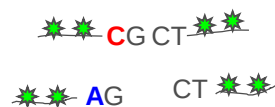
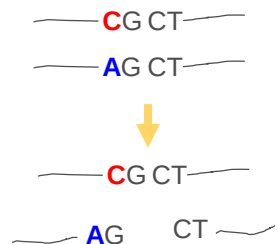
ハイブリダイ
ゼーション
・洗浄

高シグナル

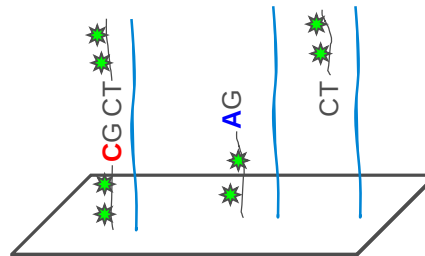
プローブは
制限酵素で
切断されない
配列をもとに
デザイン



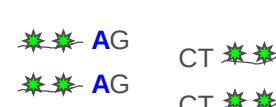
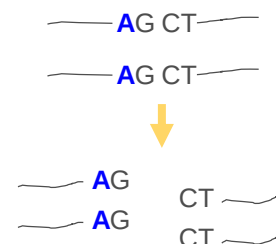
Heterozygous CA



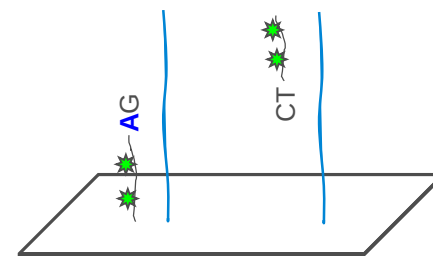
中シグナル



Homozygous AA



低シグナル



SNPデータの解析ステップ1

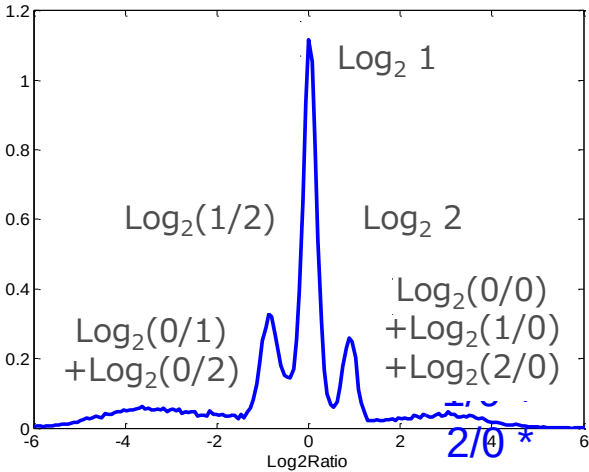
- 1. 全ての SNP プローブの $\log_2$ (検体/リファレンス) 比値の計算
- 2. リファレンスで制限酵素で切れないアレルの数が
 - 0 の SNP データを排除
 - 1 のデータの $\log_2$ 比値を補正 (1 引く)

制限酵素で切れないアレルの数		検体		
		0	1	2
リファレンス	0	$\text{Log}_2(0/0)$	$\text{Log}_2(1/0)$	$\text{Log}_2(2/0)$
	1	$\text{Log}_2(0/1)$ -1	$\text{Log}_2 1$ -1	$\text{Log}_2 2$ -1
	2	$\text{Log}_2(0/2)$	$\text{Log}_2(1/2)$	$\text{Log}_2 1$

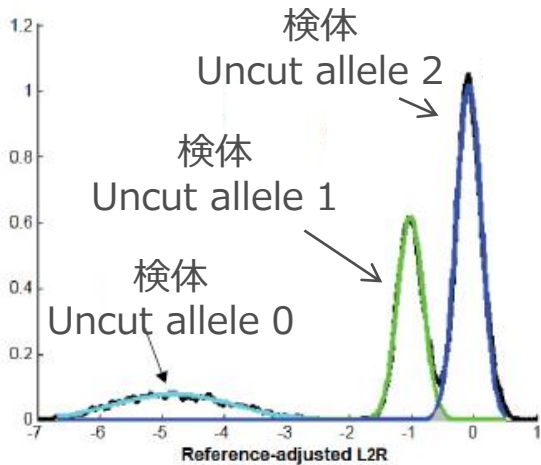
補正後の $\log_2$ 比 :

とても小 -1 0

2 倍体におけるプローブの $\log_2$ (検体/リファレンス) 比分布 (生データ)



補正後の $\log_2$ 比分布



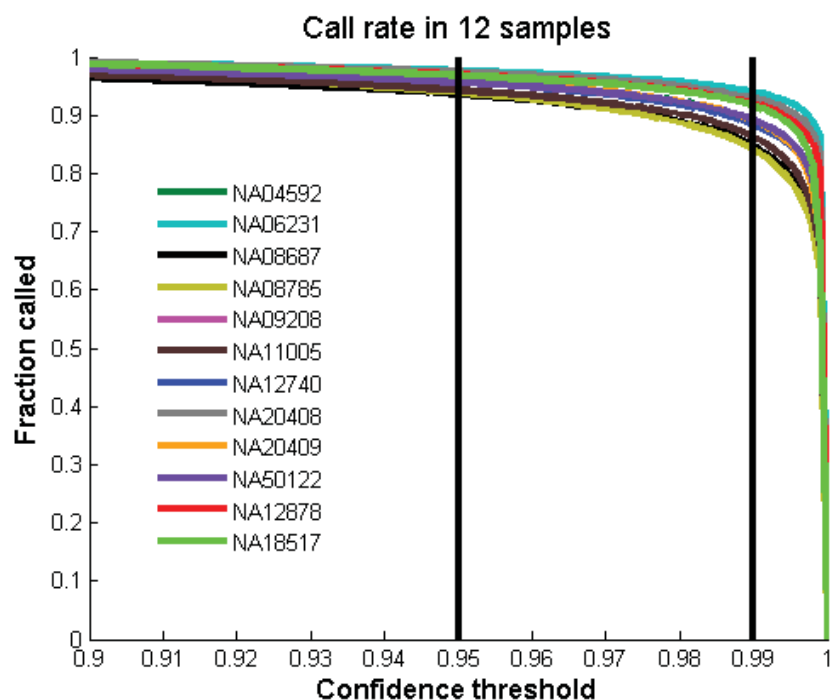
SNPデータのその他の補正（前のページStep2以降の補正）

3. 全SNP プローブの $\log_2$ ratio 値の分布から、ピークを検出。uncut alleleのコピー数を決定
4. ピークの fitting
5. Bayesian likelihood
6. Outlierのフィルター
7. Step 2 で排除された「Reference で uncut allele=0のデータ」の一部を復活
8. Allele Specific Copy Number の算出
9. Genotypeの出力
(CGHデータから得られるゲノムコピー数の情報も用いられる)

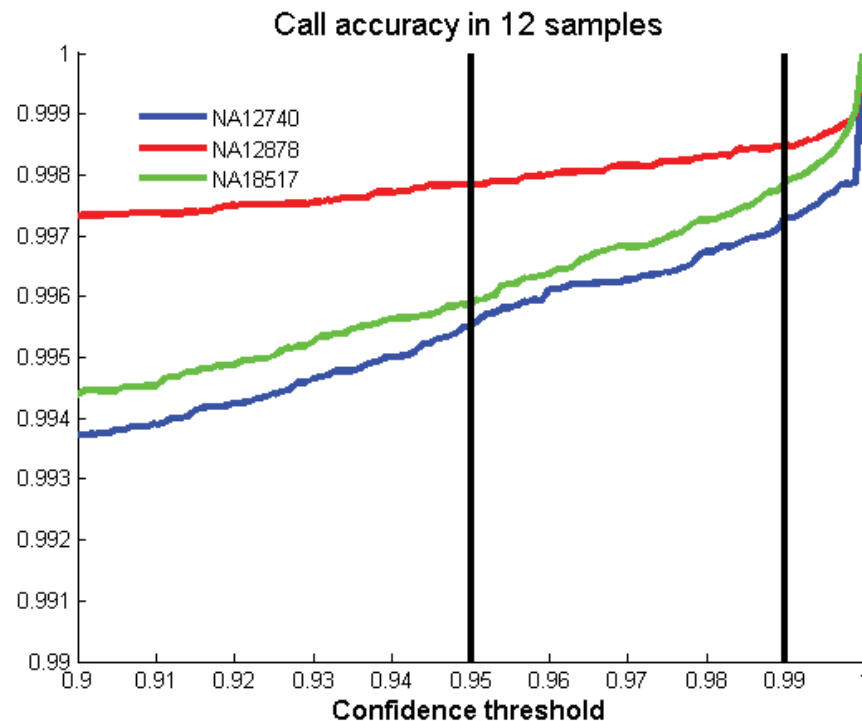
例：制限酵素で切れないアレルC
切れるアレルA のSNPの場合
コピー数= 3, 制限酵素で切れないアレル数= 2 だと
→**genotype=ACC**

SNPコールの信頼性と正確性

Call の信頼性



Call の正確性



各検出 SNP call の信頼度 (confidence) 95%以上のSNP call 割合 (Call rate) をレポートに出力

Agilent社 Application Note 5990-6274EN

新たにリファレンスとして用いる検体を genotypeする場合

リファレンスのgenotypeに依存した排除データが生じるため（解析step2参照）
より完全なgenotypeデータを得るためには
異なるリファレンスでgenotypeし、それを統合して取得するのがすることを推奨

用いた リファレン ス	リファレン ス1	リファレン ス2	リファレン ス3	リファレン ス4	リファレン ス5	検体の Genotype 情報
snp1	AC	AC	排除	AC	AC	AC
snp2	排除	CTT	CTT	排除	CTT	CTT
snp3	AT	AT	AT	AT	排除	AT
snp4	TT	排除	TT	TT	TT	TT
snp5	CC	排除	CC	CC	CC	CC
snp6	AC	AC	AC	排除	AC	AC
Snp7	排除	CT	CT	CT	排除	CT

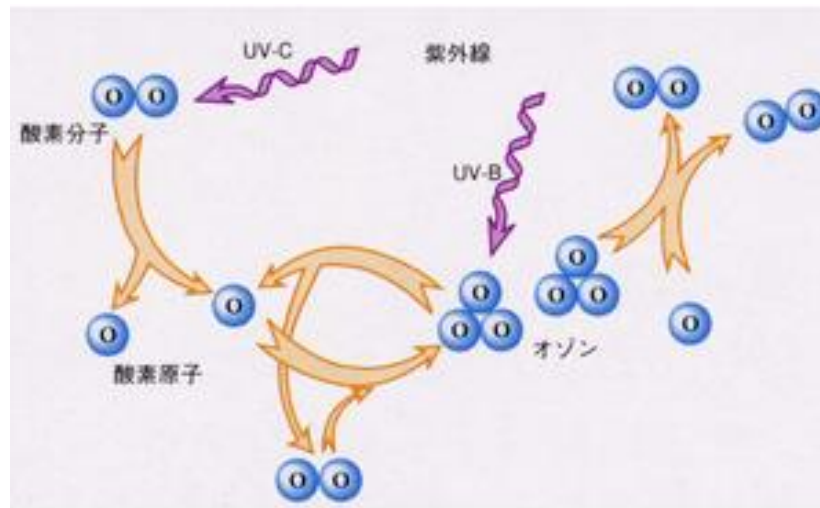


実験室内のオゾンが マイクロアレイデータに与える影響と その解決法



オゾン：蛍光色素の退色の主な原因

蛍光色素を退色させる要因は、光、pHなど種々あるが最も大きな要因は空気中のオゾン



参考文献 1)

"Effects of Atmospheric Ozone on Microarray Data Quality"

Thomas et al., *Anal. Chem.*, 75 (17), 4672 -4675, 2003

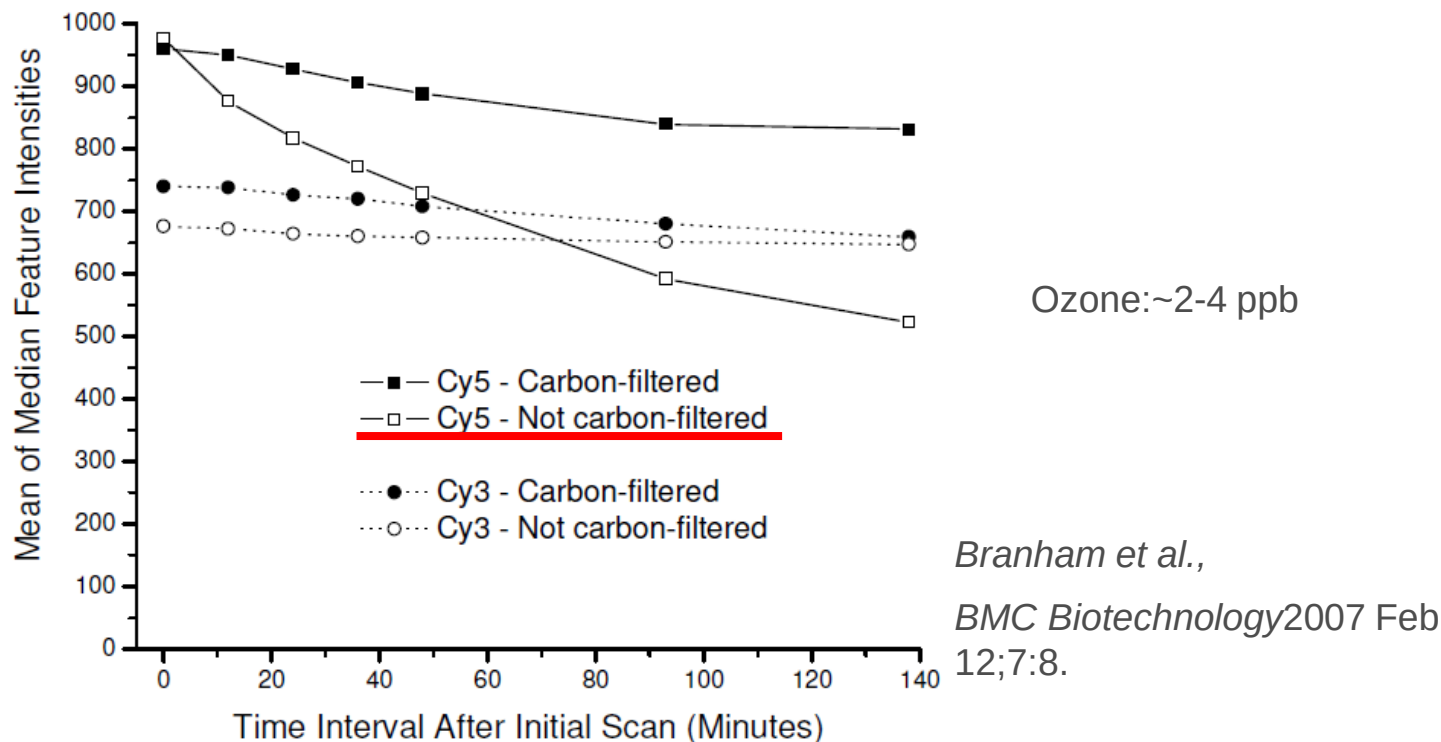
参考文献 2)

"Elimination of laboratory ozone leads to a dramatic improvement in the reproducibility of microarray gene expression measurements"

Branham et al., *BMC Biotechnology* 2007 Feb 12;7:8.



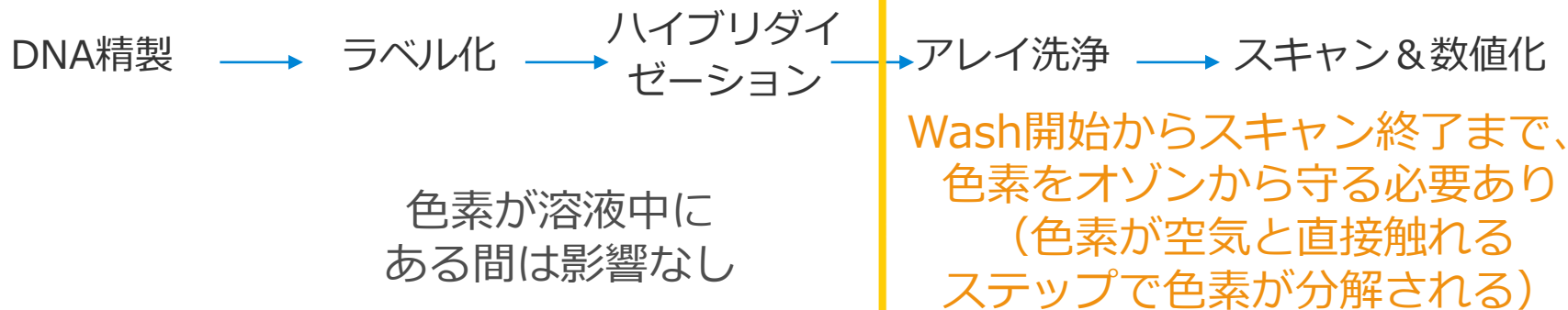
オゾン暴露による Cy-Dye の選択的分解



- オゾンに曝露した状態（白抜きポイント）では**Cy5**のシグナル強度は顕著に**減衰**するが**Cy3**のシグナル強度には影響がない
- Alexa647等の他の赤色蛍光色素でもCy5と同様の影響があった
- Alexa555等の他の緑色蛍光色素ではCy3同様にオゾン濃度100ppbまでは影響がなかった

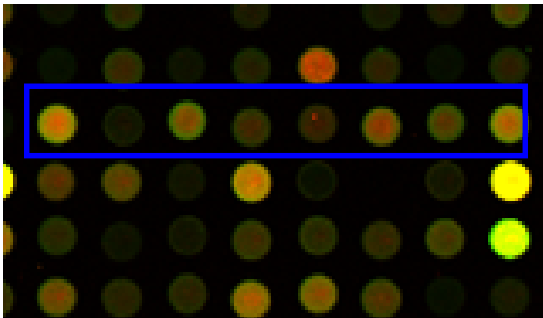


オゾンが影響を与える実験ステップ



データへの影響

各スポットに与える影響 Wet Mode



- スポット内のCy5シグナル不均一
- スポット上のオリゴが乾く間の数秒間に起こる影響

スライド全体に与える影響 Dry Mode



実物のアレイ画像ではなく、特徴を強調したイメージ

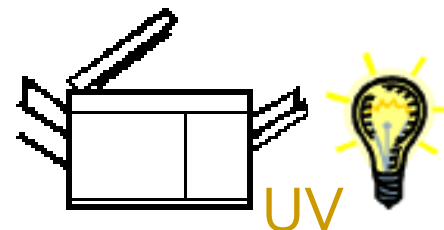
- スライド内のCy5シグナル分布不均一
- Wash完了後スキャンまでの数分、数時間の間に起こる影響



実験環境をオゾンから守るために

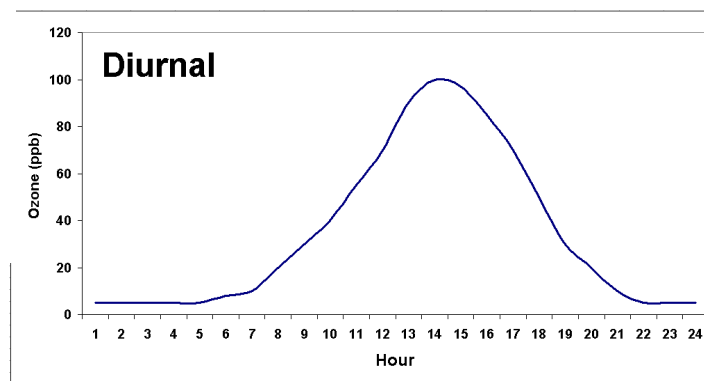
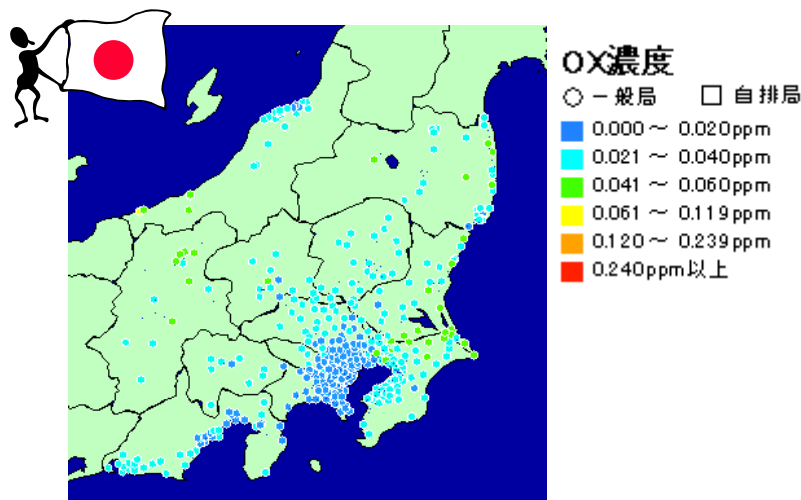
1. スキャナーと同じ部屋に、強いUV光源をもつ機器の設置を避ける

- ・ UV吸光度計やクリーンベンチなどの実験機器
- ・ コピー機やレーザープリンタなどのオフィス機器



2. オゾン除去フィルターを設置する（後述）

- ・ オゾンは大気中に存在するため、UV光源を避けても完全には除けない



オゾン濃度は日内・年内変動する

大気中のオゾン濃度は地域によって異なる



オゾン対策

対策が必要な場合いずれかを検討して下さい

- 1) 簡易型オゾンクリーンブースの導入(推奨)
- 2) 空調にオゾン除去フィルターの設置
- 3) Stabilization and Drying Solution

上のいずれかの対策と、Ozone Barrier Slide Coverを組み合わせることも可能



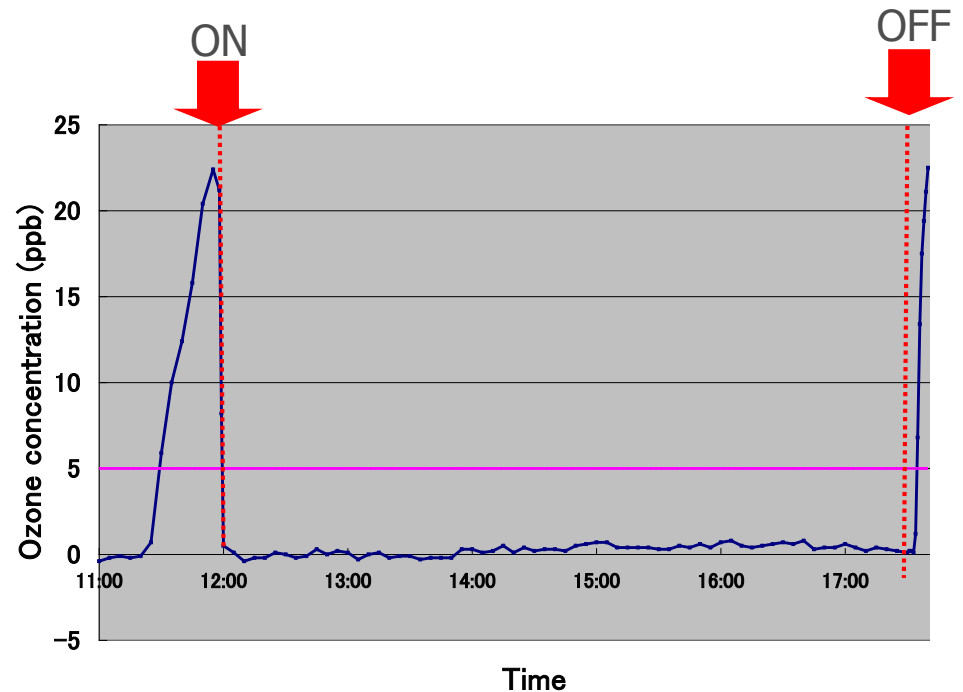
1) オゾンクリーンブース (推奨)

-Wash・スキャン空間をオゾンフリーに



製品番号 : 2-M005-01B
製品名 : オゾンフリーブース
サイズはB・CスキャナとSureScanでは異なります。担当営業までお問い合わせください。

フィルターは定期的に交換が必要です



- ・スキャナーのカバーを完全に開けられます。
- ・Wash時には下半分を開けて使用
- * ブース内は陽圧になっているので
外部の空気が開放部から入ることはありません。

2) 空調ラインにオゾン除去フィルターを導入 -実験室全体をオゾンフリーに

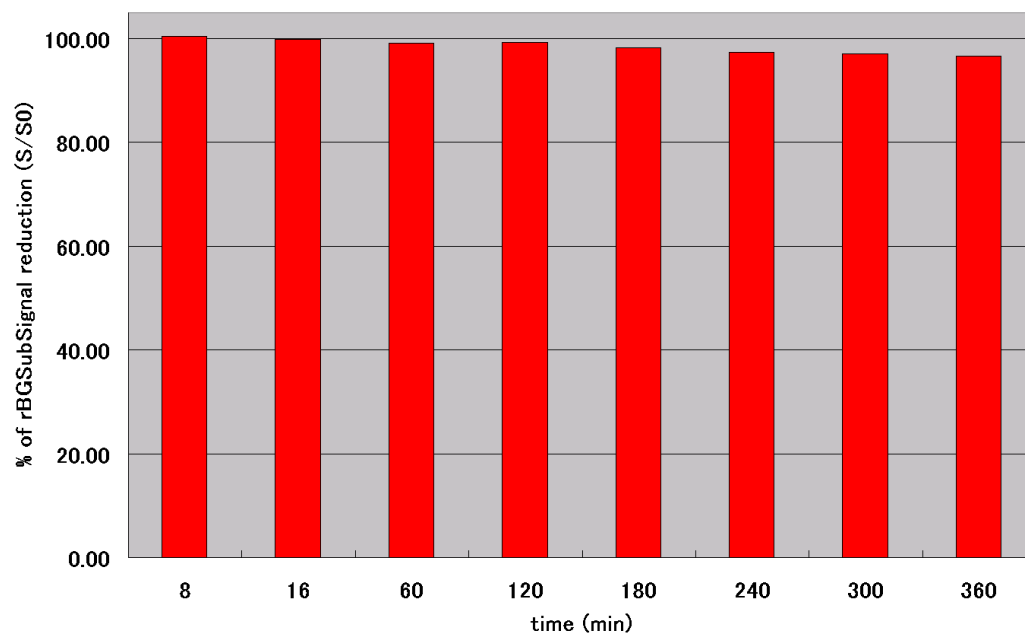


フィルターは定期的に交換が必要です

繰り返しスキャンによるシグナル値の
減衰はごくわずかであった

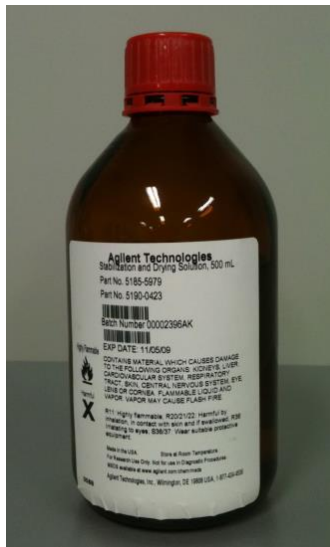
* ラボの空調の空気の取り込みラインに、オゾン除去用のチャコールフィルターを導入する。

注意) 必ず、貴研究所の空調担当者と直接お打ち合わせください。



3) Agilent Stabilization and Drying Solution -スライドガラス表面をコーティング

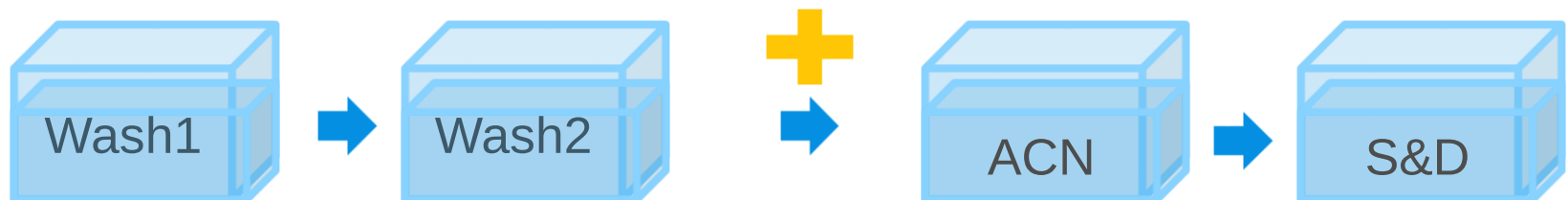
(製品番号: 5185-5979)



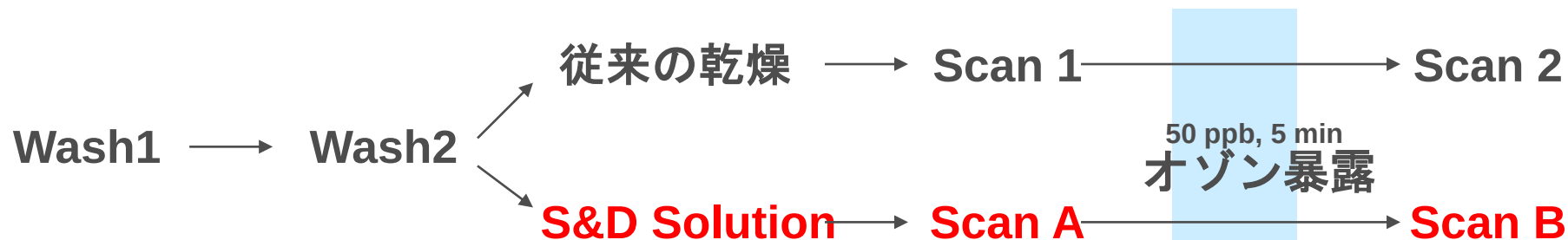
- S&D Solution はオゾン除去(補足)剤として機能。
- Wet Mode と Dry Mode でのCy5 の分解を防ぐ。

【注意点】

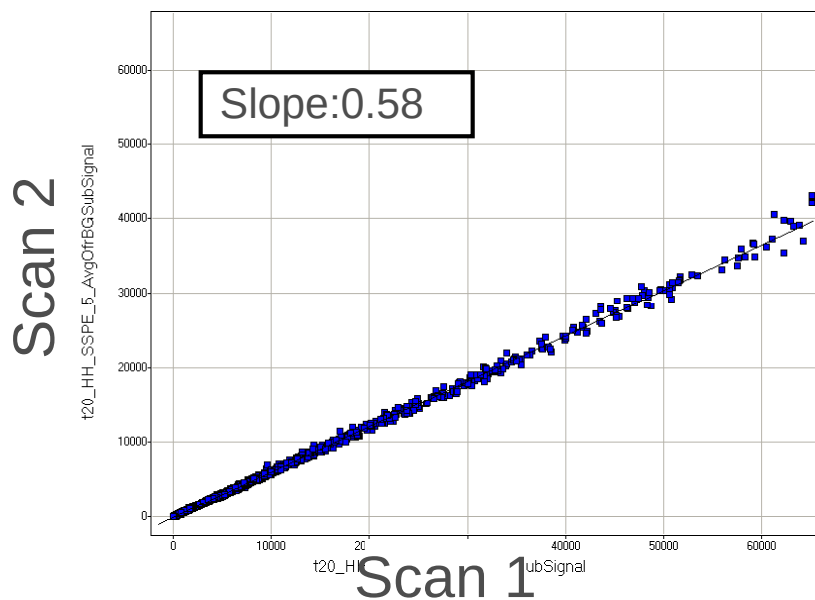
- 2色法にのみ対応しています
- 前日から加温・攪拌して溶解する必要があります



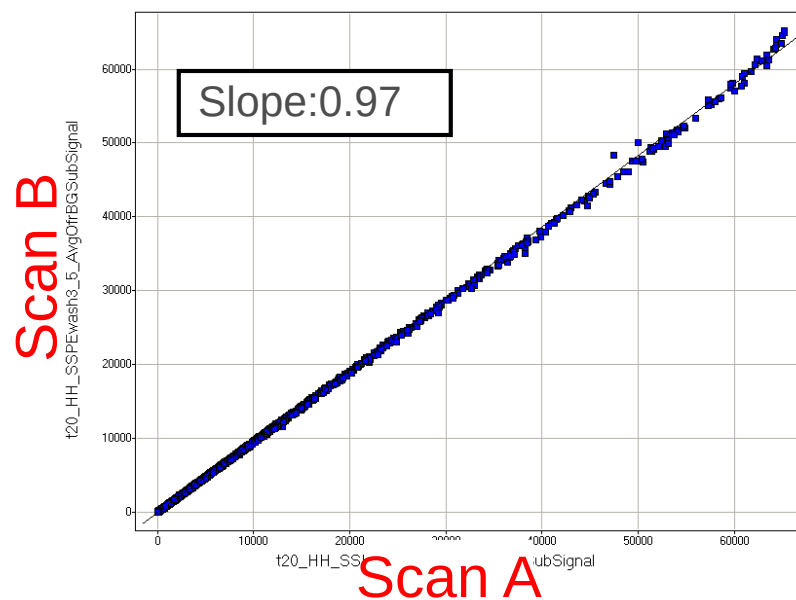
S&D Solutionの評価実験



従来の乾燥



S&D Solution & 乾燥



X軸:暴露前のCy5シグナル強度(BGSUB), Y軸:暴露後のCy5シグナル強度(BGSUB)

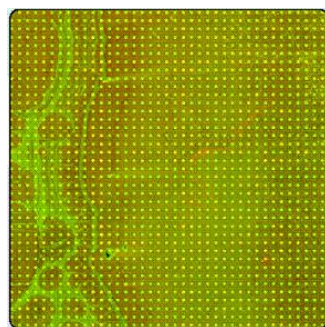
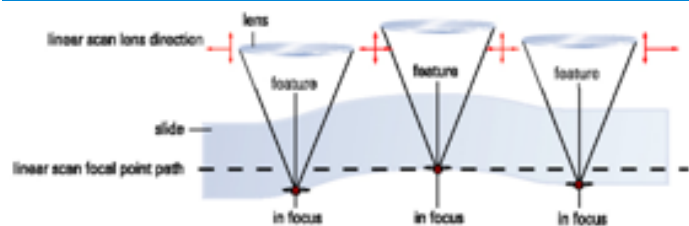
アジレントDNAマイクロアレイ スキャナシステム



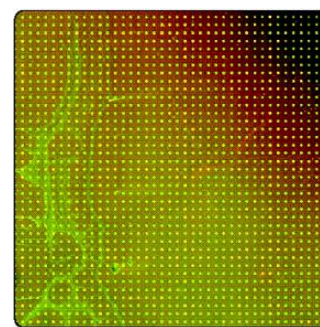
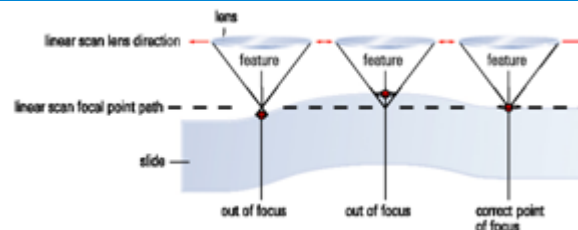
ダイナミックオートフォーカス

- ピクセルごとに焦点を自動調整
→必要であれば1回のスキャン中に100万回以上調整
- スライド表面にたわみ・ゆがみがあっても**全ての面で焦点の合った画像**を産生可能

ダイナミックオートフォーカス機能 On



ダイナミックオートフォーカス機能 Off



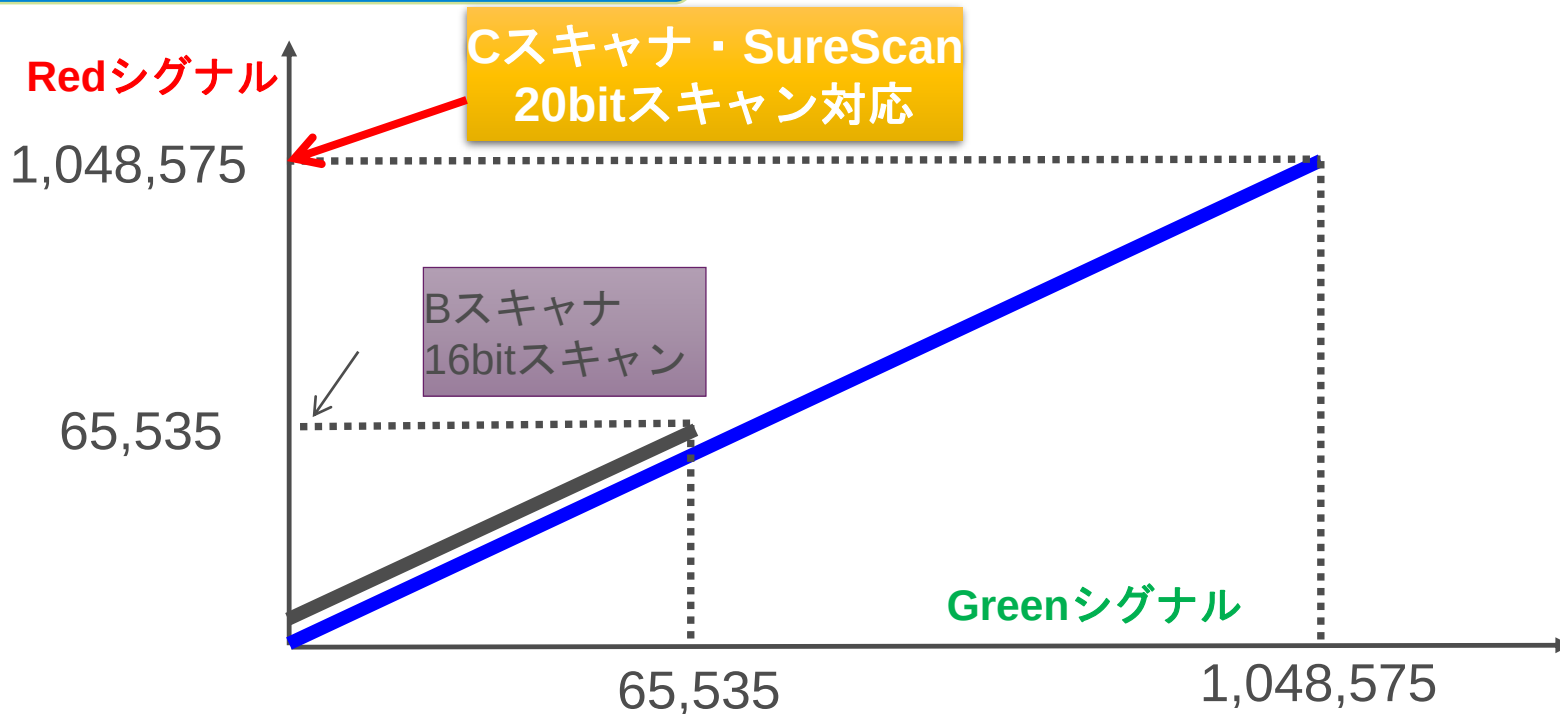
スキャナ バージョン間の違い まとめ

	Bスキャナ	Cスキャナ・ SureScan 標準仕様	Cスキャナ・ SureScan 高解像度仕様
		 	 
スキャン解像度	10・5 um		10・5・3・2 um
スキャン可能なアレイ	4x44K (5um)	4x44K (5um)	4x44K(5um) 8x60K(3um)
TIFFのデータ範囲	16bit	16bit or 20bit	
XDRスキャン (遺伝子発現・ miRNAの場合)	必要	20bitスキャンなら不要	
スキャナコントロール ソフトウェア	Ver.7	Ver.8	Ver.9



16 bitと20 bit

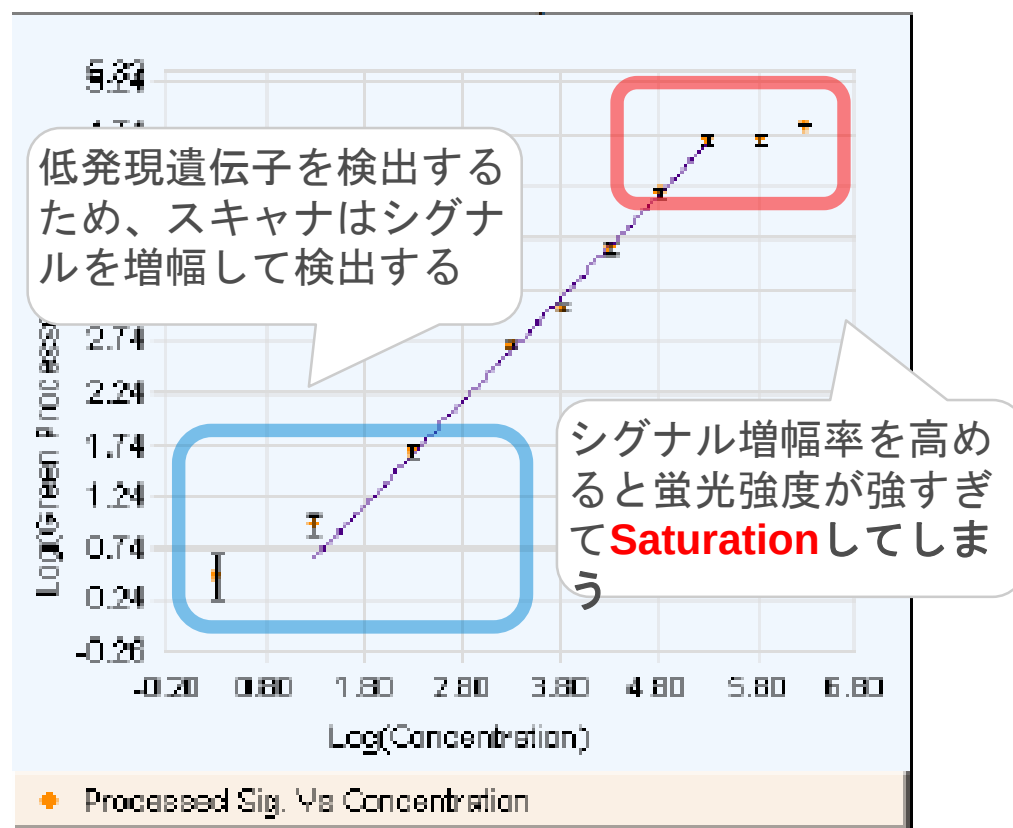
20 bit スキャン



TIFFデータに保存できるシグナル強度範囲を20bitまで広げることで、1回のスキャンで広い有効ダイナミックレンジを得ることができる

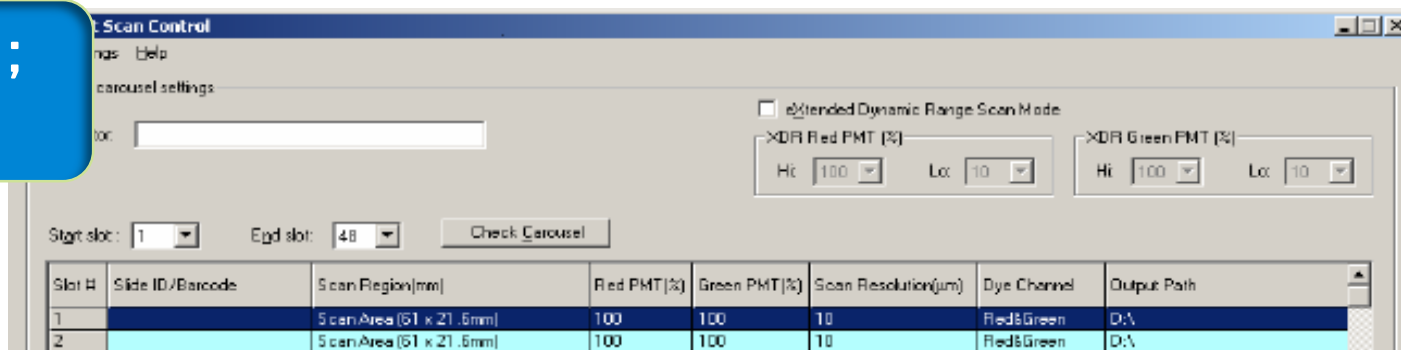
XDR・20 bit : Saturation回避方法 (遺伝子発現・miRNA)

Saturation ・ ・ ・ 遺伝子発現のダイナミックレンジが『データファイルが保存できるシグナル強度範囲』を超えると、シグナルに定量性がなくなる

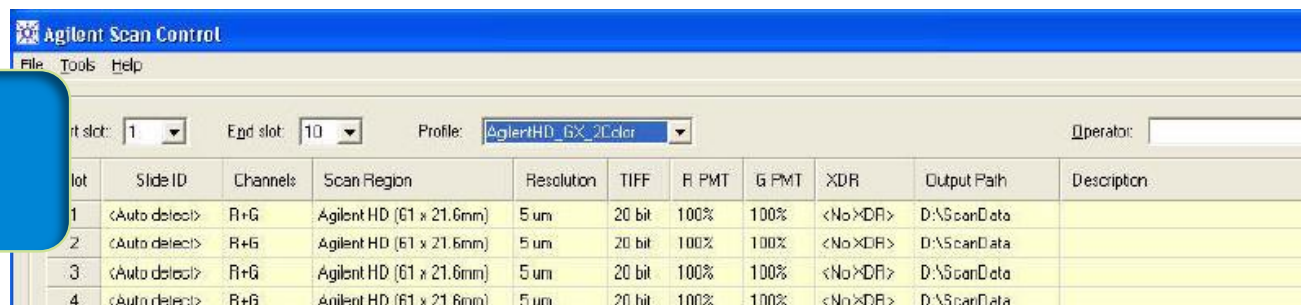


スキャンコントロールソフトウェアのバージョン

Bスキャナ ;
ver7



Cスキャナ ;
ver8



SureScan ;
ver9

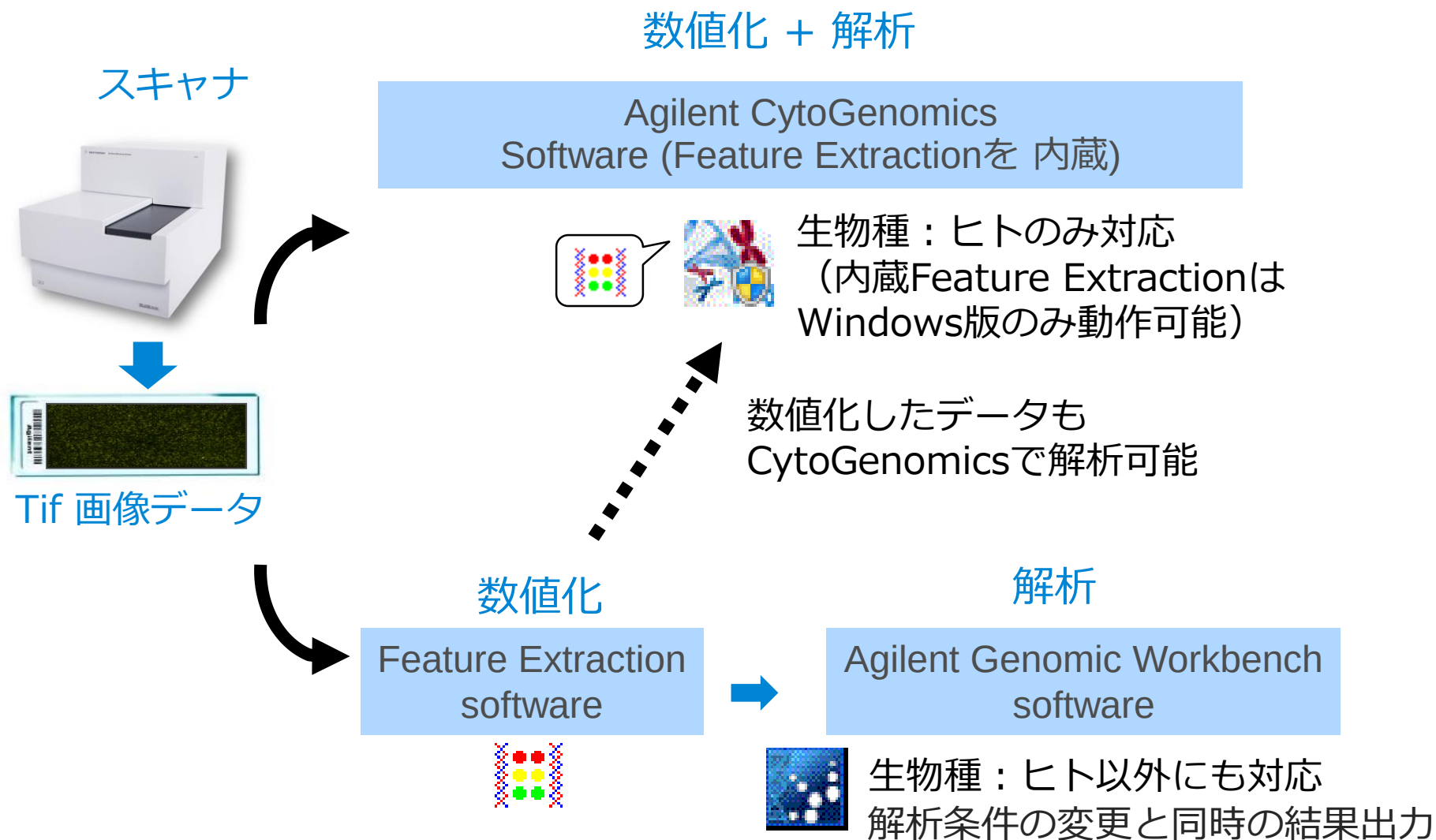
	Slide ID	State	Scan Protocol	Output Folder
01	251727810267	Scanning (10%)	AgilentG3_CGH	C:\ScanData
02	252657310248	In queue 1	AgilentHD_CGH	C:\ScanData
03	251727810212	In queue 2	AgilentG3_CGH	C:\ScanData
04	251727810296	In queue 3	AgilentG3_CGH	C:\ScanData
05	252657310211	In queue 4	AgilentHD_CGH	C:\ScanData
06	251727810231	In queue 5	AgilentG3_CGH	C:\ScanData
07	252657310233	In queue 6	AgilentHD_CGH	C:\ScanData
08	251727810236	In queue 7	AgilentG3_CGH	C:\ScanData



CytoGenomicsによる解析操作



CGH・CGH+SNPマイクロアレイデータ解析に 使用するソフトウェア（数値化と解析）



CytoGenomicsソフトウェア（生物種ヒトのみ対応）

□ CGH・CGH+SNP マイクロアレイのための 使い易い解析ツール

推奨解析条件が含まれた“ワークフロー”形式の解析ソフト。
臨床研究にも最適

□ 構造変化検出のための強力なアルゴリズムを搭載

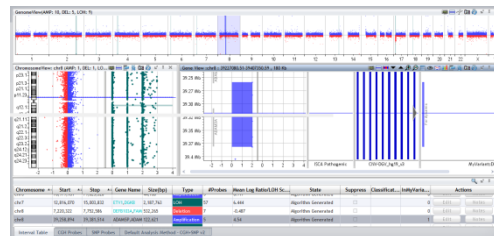
精度良くコピー数・Loss of Heterozygosity を検出
3倍体自動検出、クローナルフラククション自動算出



□ 無償で提供



マイクロアレイ
スキャン画像



解析結果を表示



Sample Information	Sample ID	Sample Name	Sample Type	Sample Status	Sample Date	Sample Location	Sample Operator	Sample Reviewer	Sample Approval
Sample ID	000001104_1_2	000001104_1_2	Agilent Data Platform	Ready	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010
Sample Name	000001104_1_2	000001104_1_2	Agilent Data Platform	Ready	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010
Sample Type	000001104_1_2	000001104_1_2	Agilent Data Platform	Ready	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010
Sample Status	000001104_1_2	000001104_1_2	Agilent Data Platform	Ready	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010
Sample Date	000001104_1_2	000001104_1_2	Agilent Data Platform	Ready	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010
Sample Location	000001104_1_2	000001104_1_2	Agilent Data Platform	Ready	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010
Sample Operator	000001104_1_2	000001104_1_2	Agilent Data Platform	Ready	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010
Sample Reviewer	000001104_1_2	000001104_1_2	Agilent Data Platform	Ready	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010
Sample Approval	000001104_1_2	000001104_1_2	Agilent Data Platform	Ready	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010	1/1/2010

レポートを出力



Design Fileとは？

スポット位置や各スポットの染色体位置情報が含まれる。
数値化・解析の際に必ず必要です。

デザインファイル名：

SurePrint G3 Human CGHマイクロアレイ 4x180Kの場合

022060_D_F_20101001.xml

6桁のDesign ID

デザインファイルの作成日

デザインファイルに含まれる情報

Probe Name	アレイ上の60merの配列に対応した Probe ID	デザインファイル名のDesign IDが同じであれば、変更なし
Gene Name	公的データベースを元にした遺伝子名	公的データベースをもとにした情報なので、デザインファイルの作成日によって異なる
Systematic Name	公的データベースの染色体位置情報	
Description	遺伝子の説明書き	

※Probe Name以外は出力形式によってはテキストファイルに含まれないことがあります。

デザインファイルなど各種ファイルのダウンロード SureDesign

研究に最適なカスタムデザインを簡単に迅速に設計いただけるように開発しました。



カタログ製品の情報もダウンロードいただけます。

SureDesign へのログイン、登録はこちら。

【お知らせ】

2013年11月19日より、SureDesignからCGH, ChIP-on-chip
各マイクロアレイのデザインを作成して頂けるようになります。

SureDesign の資料

◆ SureDesignの使い方

- **SureDesign 概要**
SureDesign とは / 機能紹介 / ご利用について / 運営法
- **SureDesign の登録法**
登録の前に / 登録法 / 各タブの説明
- **カタログ製品各種ファイルダウンロード法**
2種のファイルダウンロード法 / Favorites 設定
- **コラボレーションスペース**
ご利用前に / Collaboration スペース作成 / デザインの移動 / Member の確認
- **購入方法**
見積もり依頼 / オーダー

◆ アレイ CGH

- **CGHマイクロアレイ** カスタムマイクロアレイ作成ガイド

そのほか各種ファイルも
ダウンロードいただけます。

【Gene List】各マイクロアレイのプロブの染色体位置情報や遺伝子情報のリスト

【Sequence List】アレイに搭載されている60merのプロブ配列リスト

【BED file】UCSCのGenome Browserに取り込み、各プロブのゲノム上の位置をGenomeBrowser内に表示させることができるファイル

(各ファイルはマイクロアレイのデザインごとに作られています。)



2016年3月以降のSNPプロブの解析のための 解析ソフトウェアアップデート (CytoGenomics 3.0.6以降)

- 新しいSNPコンテンツを解析するために
SNP アルゴリズムに改良が加えられました。

※GenetiSure Cancer Research CGH+SNP・GenetiSure Postnatal Research CGH+SNPの解析には3.0.6以降をご使用ください。

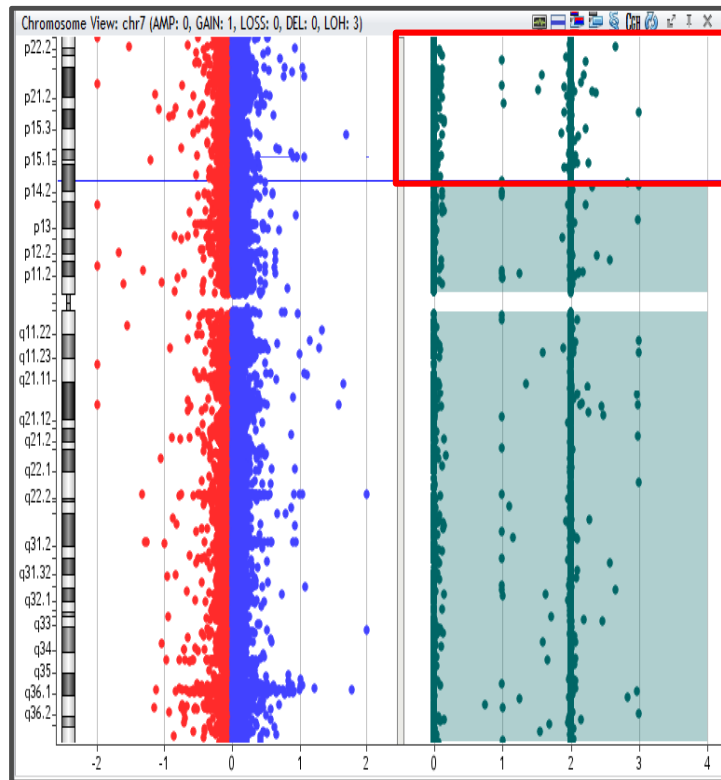
※新しいアルゴリズムは以前より販売いたしておりました
CGH+SNPマイクロアレイの解析にも有用です。

- 解析に使用するGenotype Referenceファイルに
新しく2つのファイルが追加されました。
(Agilent Male_DBSNP141・Agilent Female_DBSNP141)

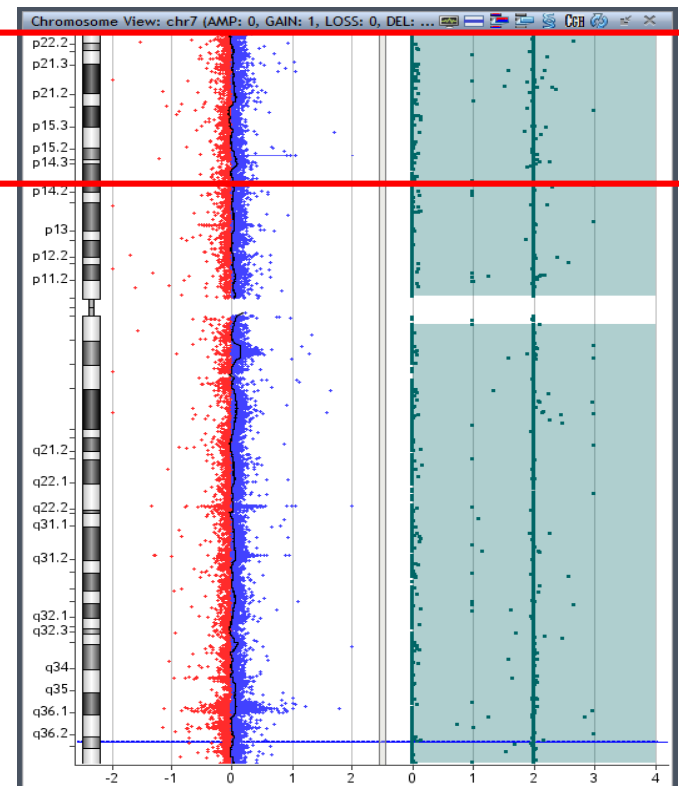
Reference	Green Sample (Cy3)
Green Sample (Cy3) ▼	
Green Sample (Cy3) ▼	AGILENT FEMALE_DBSNP141
	AGILENT MALE_DBSNP141
	Agilent Euro Female
	Agilent Euro Male
	Chinese Female (NA18579_v1)
	European Female (NA12878_v1)
	European Male (NA12891_v1)
	PG_MALE2015



2016年3月以降のSNPプローブのための CytoGenomics 3.0.6以降 新LOH検出アルゴリズム



p-arm の一部がLOHとして検出されていない (v3.0.6以前のバージョン)



検出されていなかったp-arm が
LOH として検出 (v3.0.6)

社内データ



本日の実施内容

1. CytoGenomics ソフトウェアの起動
2. ライセンスの認識 (割愛)
3. デザインファイルのインポート
4. データを解析: “Analysis Workflow”, “Select Samples”
 - Global Display Name を “Del Chr 17”に変更 (trriage viewにも表示)
 - green sample (Cy3) を NA12891 に設定
 - Array ID を表示
5. 解析画面 (“Triage view”) を開く
6. CytoReportの作成

使用データ

使用マイクロアレイ

カタログ 4x180K CGH+SNP ISCA マイクロアレイ

NA09208*

Miller-Dieker lissencephaly syndrome; mdls chromosome deletion

Cy5

対象
サンプル

Cy3

リファ
レンス

NA12891*

CEPH/UTAH PEDIGREE
1463, INTERNATIONAL
HAPMAP PROJECT
Caucasian, Male

Reference	Green sample (Cy3)	Red sample (Cy5)	想定されるコピー数変化	性別
Green sample (Cy3)	NA12891	NA09208	Chr 17における欠失、 Chr 6における小さい コピー数増幅 (Database of Genomic Variant (DGV) の 既知 CNVsと重なる)	Male

*Coriell Cell Repository



Agilent Technologies

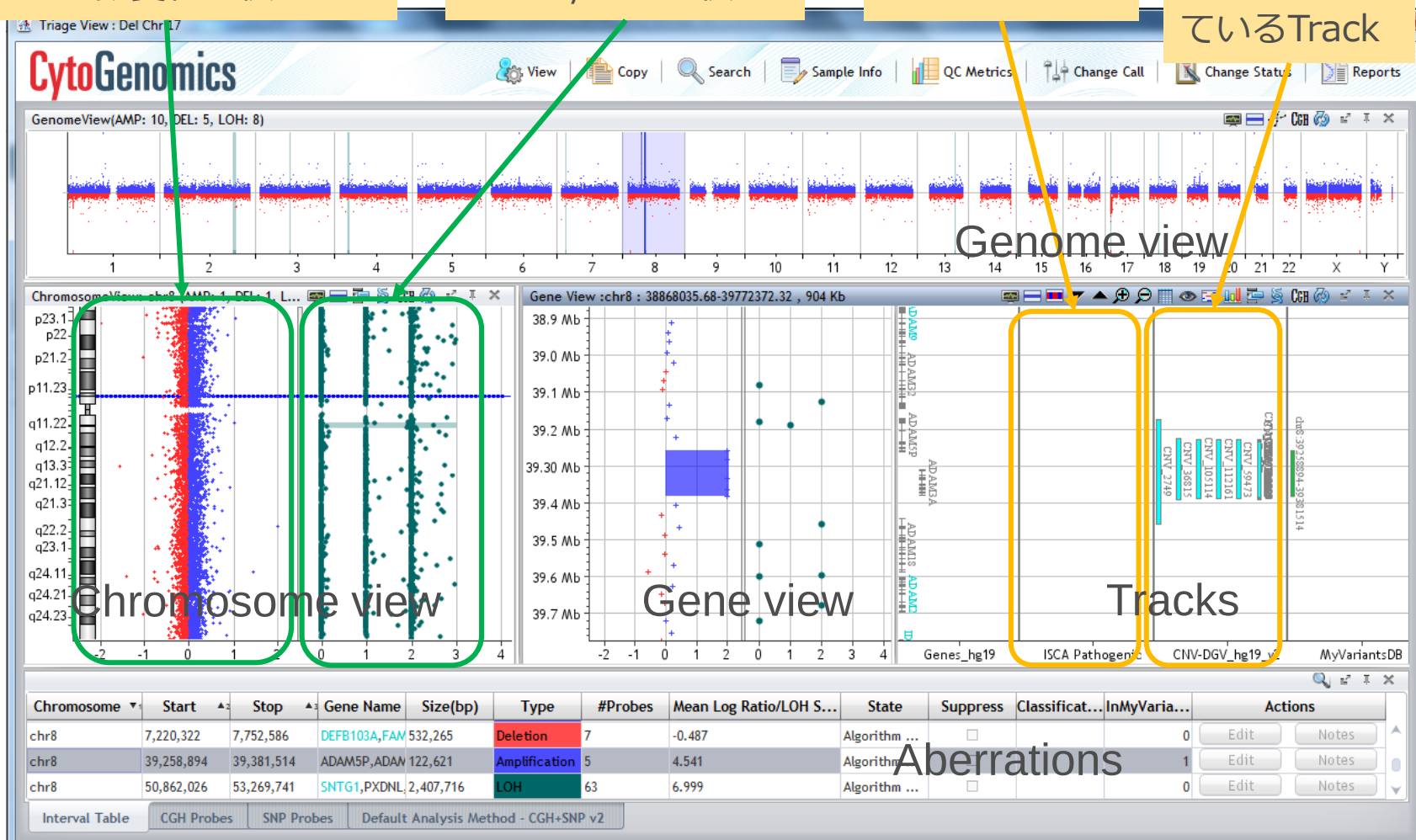
Triage View上の各Viewer

Log₂ (対象/リファレンス)
→コピー数変化の検出

片側のアレルの数
→LOH/UPDの検出

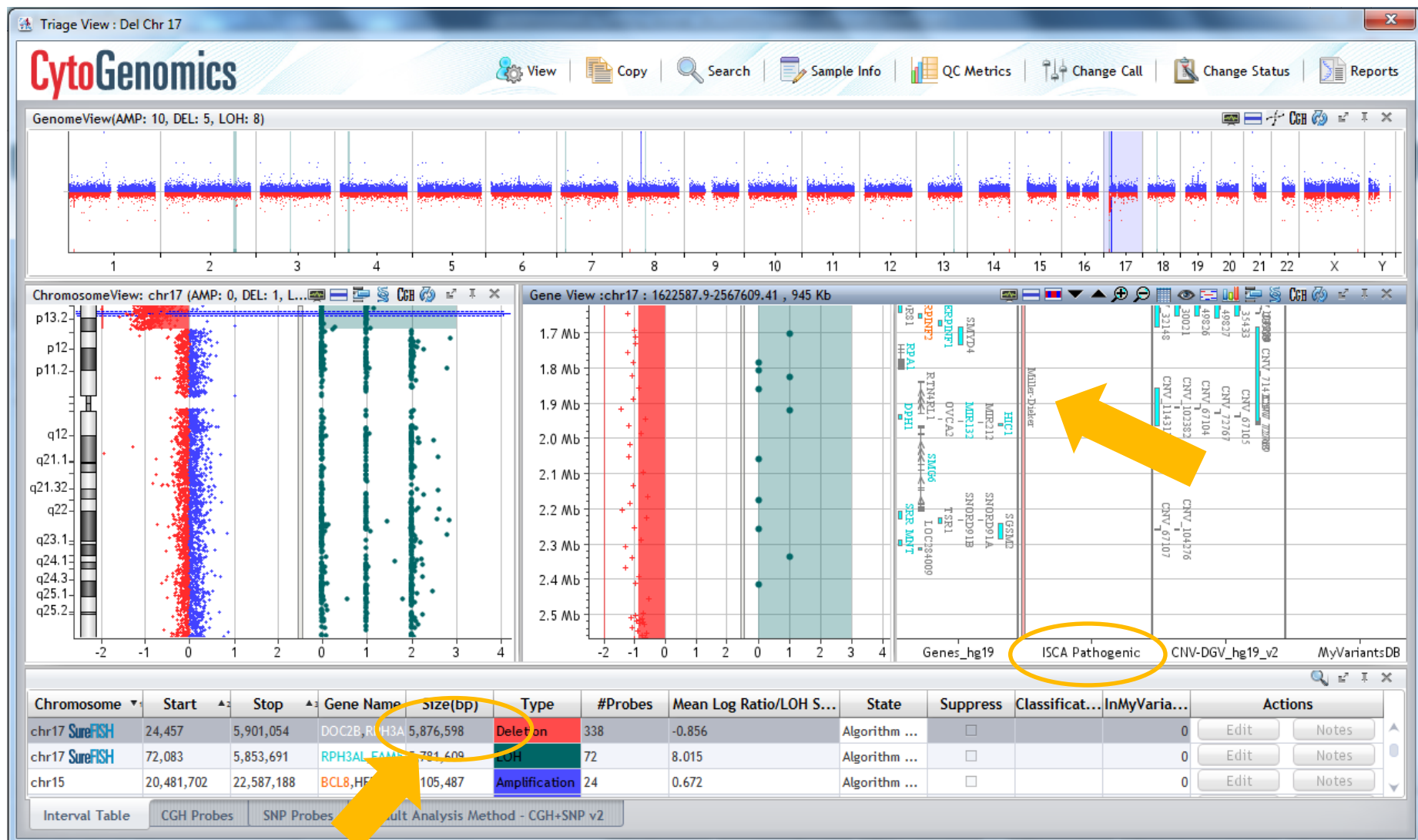
ユーザ作成の
Track

予めソフト
ウェアに入っ
ているTrack



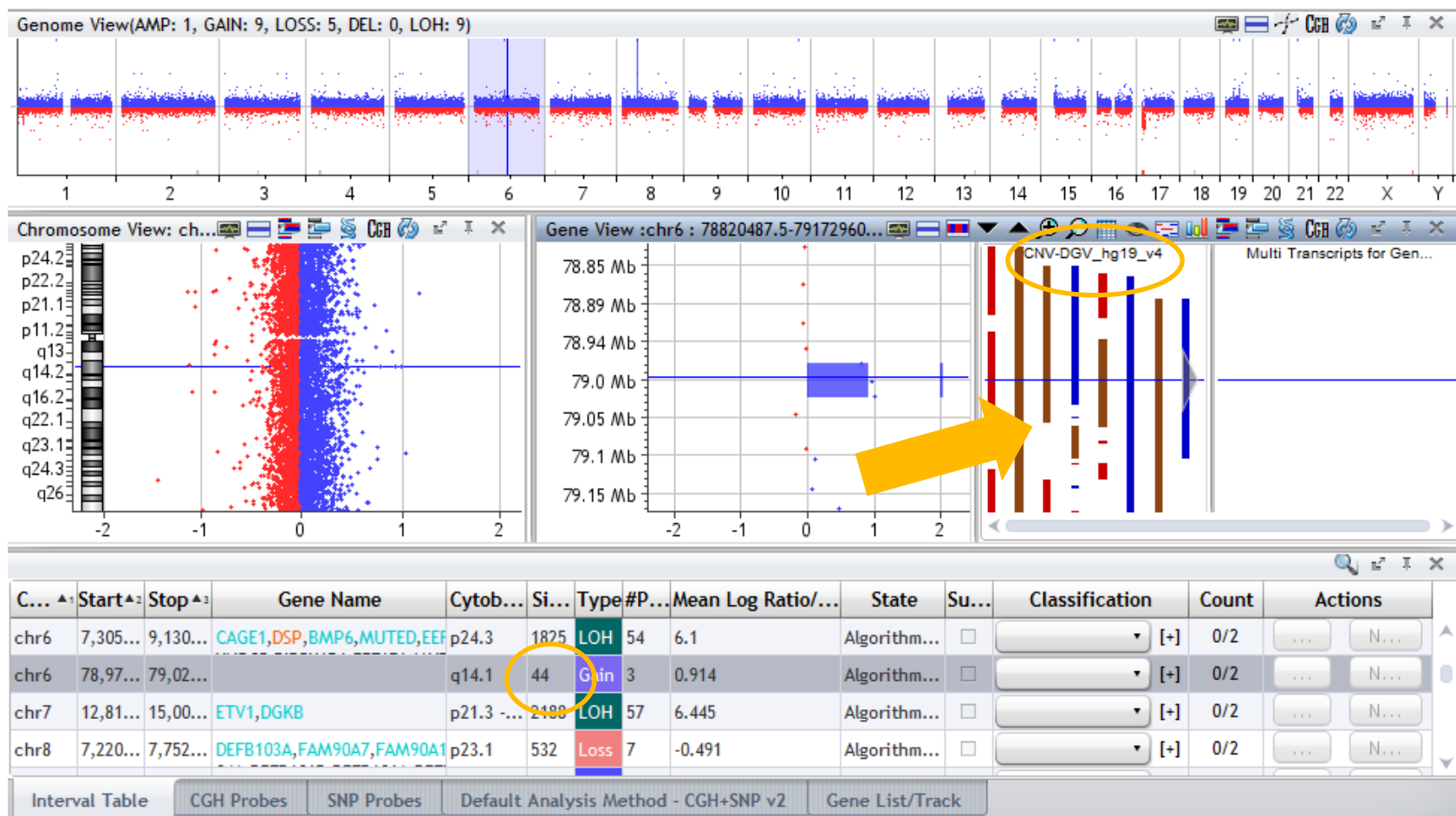
SurePrint G3 CGH+SNP マイクロアレイ 4x180K使用

chr 17の欠失 (ISCAの"pathogenic"データベース との重なり) 検出領域の大きさも表示 (5.9 Mb)



chr 6 のコピー数増幅 (DGVの既知 CNVs との重なり) 検出領域の大きさも表示 (44 kb)

(青:Gain・赤:Loss・茶:Complex・紫:Inversion・黒:Unknown)



外部データソースへのリンク(インターネット接続使用時) : Gene Viewを右クリック

The screenshot displays the CytoGenomics software interface. The main window shows a genome view of chromosome 17 with a red and blue signal. Below it, a chromosome view of chromosome 6 is visible. To the right, a gene view for chromosome 6 is shown, displaying a plot of data points. A right-click context menu is open over the gene view, listing options: Create Track, Create Probe ID List, Show Intensity Bar Chart, Show in UCSC, Show in DGV, Show in Ensemble, UCSC(hg18), and UCSC(hg19). A yellow callout box with an arrow points to the 'Show in UCSC' option. Below the gene view, a table of data is visible.

Gene view を右クリックし、
Show in UCSC
を選択

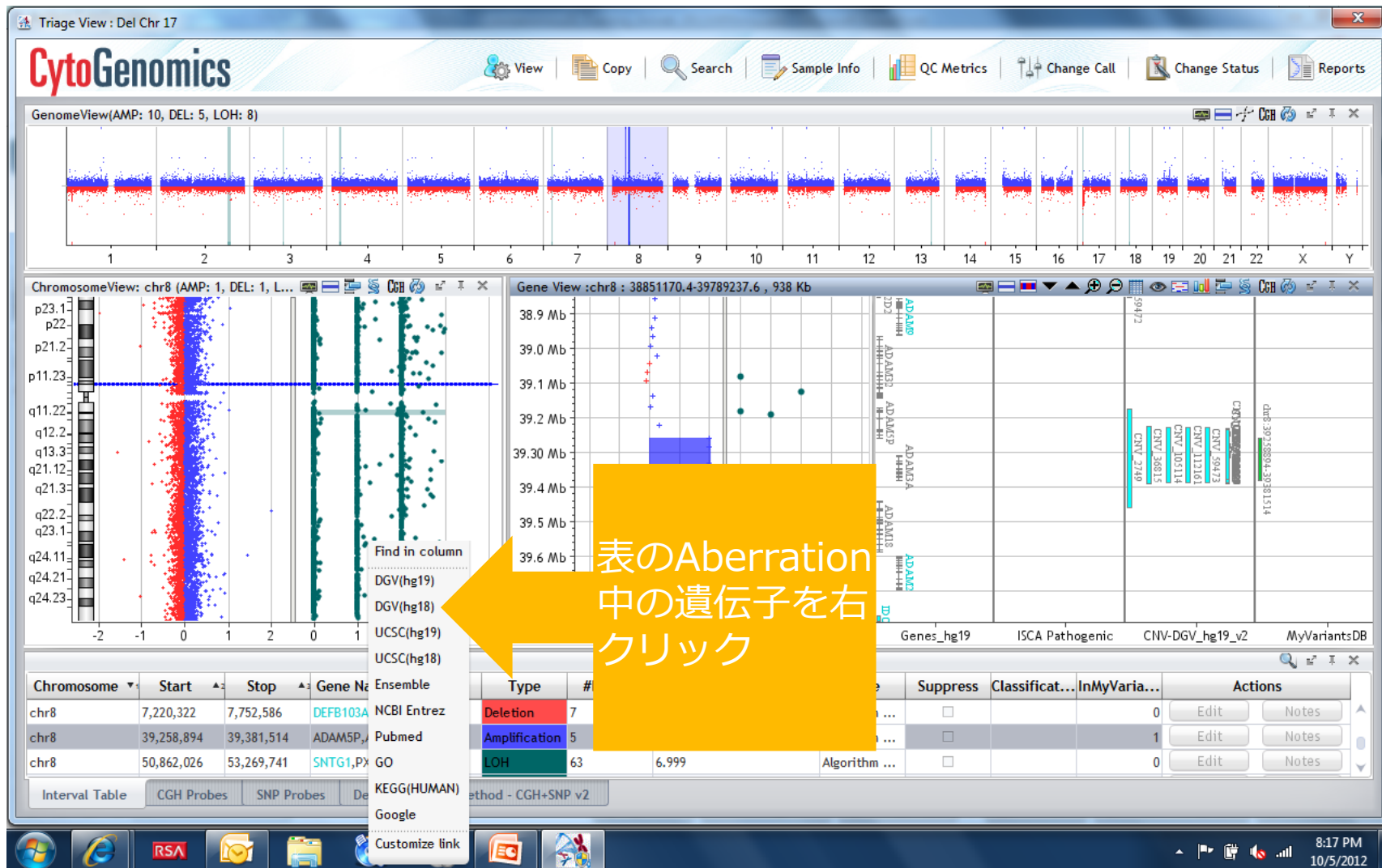
Probes	Mean Log Ratio/LOH S...	State	Suppress	Classificat...	InMyVaria...	Actions
6.434		Algorithm ...	☐		0	Edit Notes
0.920		Algorithm ...	☐		0	Edit Notes
6.778		Algorithm ...	☐		0	Edit Notes

SurePrint G3 CGH+SNP マイクロアレイ 4x180K使用



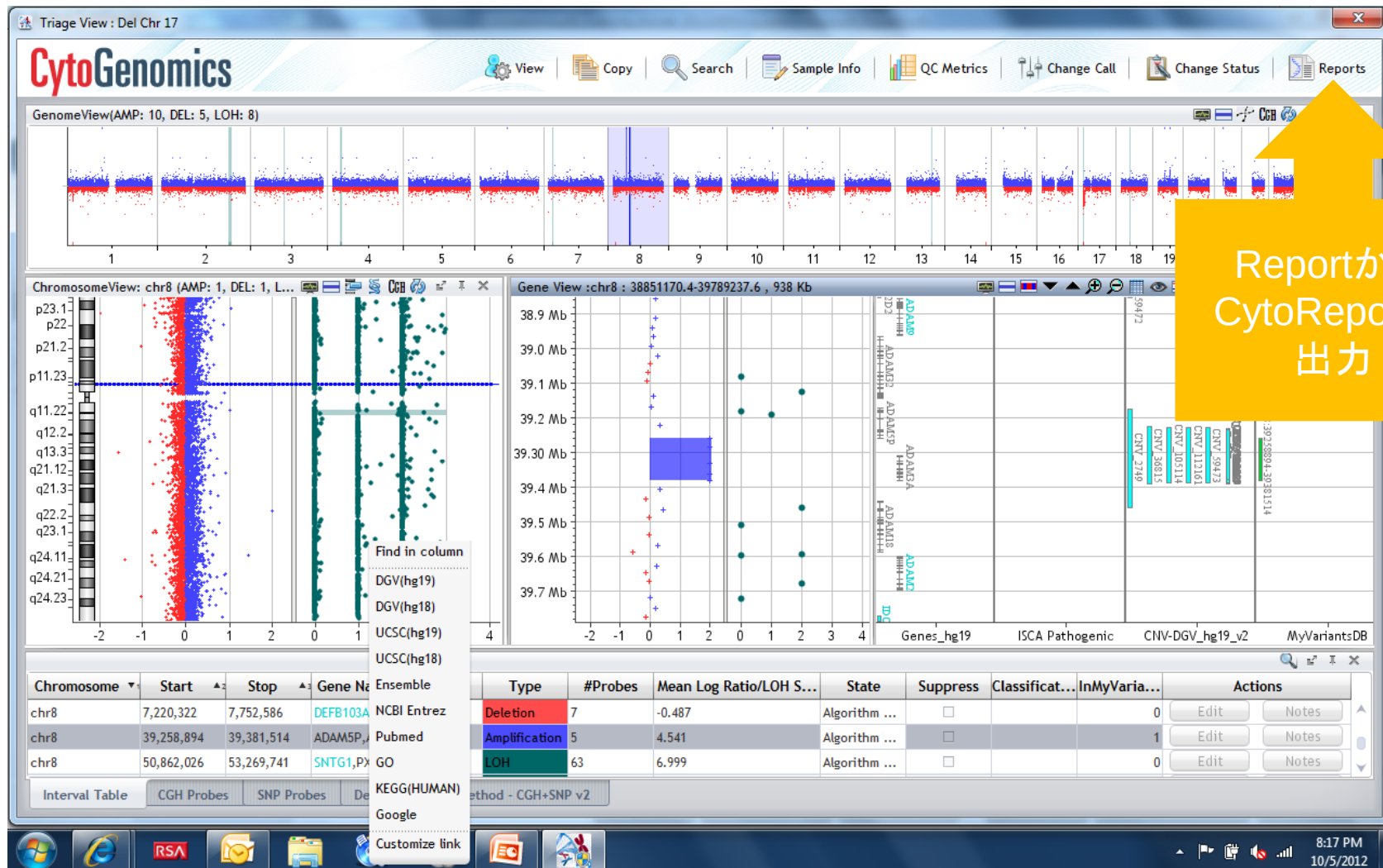
Agilent Technologies

外部データソースへのリンク(インターネット接続使用時) :
表の各検出構造変化 (Aberration) の遺伝子を右クリック



SurePrint G3 CGH+SNP マイクロアレイ 4x180K使用

CytoReportを作成

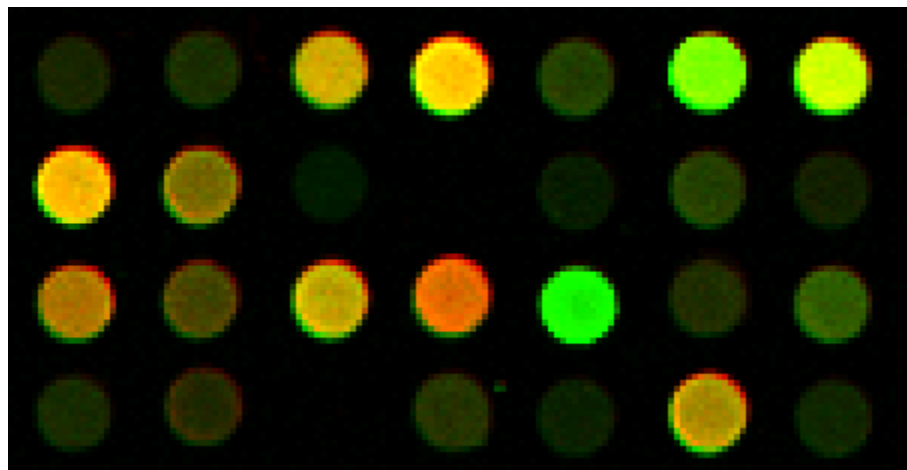


SurePrint G3 CGH+SNP マイクロアレイ 4x180K使用

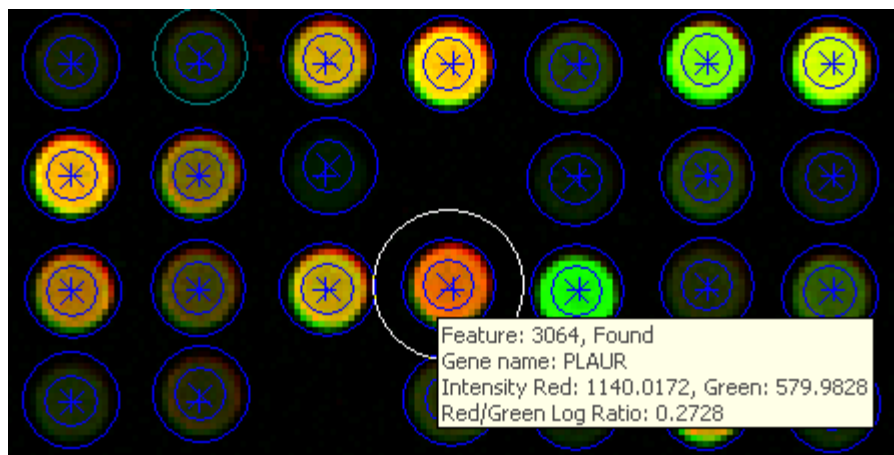
Feature Extractionによる スキャン画像の数値化 (2カラー)



イメージの数値化とは



このままではただの
光っているイメージ



スポットの中のシグナル値を抽出
1カラー → 緑Cy3のシグナル値
2カラー → 緑Cy3と赤Cy5の
シグナル値

CGH, ChIP-on-chip, CH3,
GE 2color



イメージの数値化の前に …

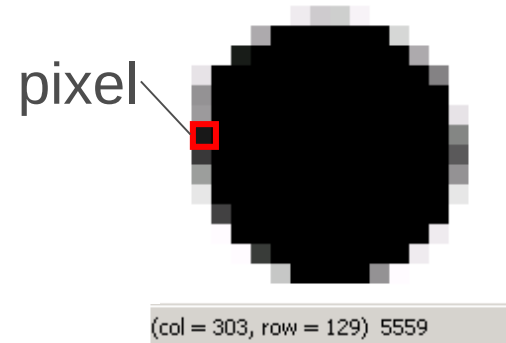
ピクセル？ ビット？

ピクセル： スキャン画素

ビット： 情報の量を表す単位

16bit; 0 ~ 65,535

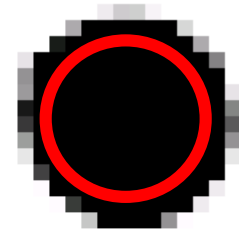
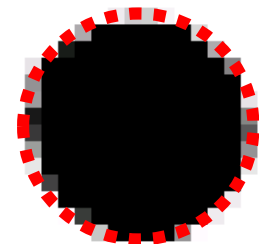
20bit; 0 ~ 1,048,575



スポット？ フィーチャ？

スポット： プローブが搭載されているエリア。
(通常ハイブリにより光った部分全体)

フィーチャ： 最終的に抽出されるエリア。
(理想的には異常ピクセルを取り除いたもの)



数値化（スポット解析）の流れ

スポット位置の検出

フィーチャ&バックグラウンド領域の決定

シグナル強度の抽出

バックグラウンド補正

エリア補正

色素補正

発現比計算

各ステップで出力される項目
2color

g/r MeanSignal

g/r BGSubSignal

g /r ProcessedSignal

LogRatio
(Log₁₀)

全自動！



1. スポット位置の検出と領域決定

・スポット位置の検出

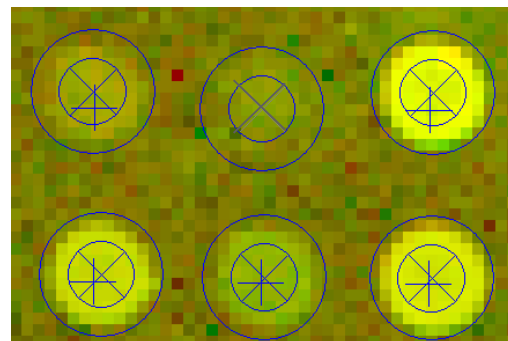
デザインファイルを利用し、全自動でアレイ上のスポット位置を決定

明るいスポット

- スポットの位置を蛍光強度から決定

暗いスポット

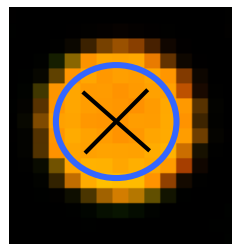
- グリッドからスポット位置を推定



・領域決定

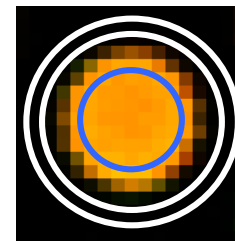
フィーチャ

- スポット部分を丸く打ち抜く(クッキーカッター)



ローカルバックグラウンド

- スポットの周辺部をローカルバックグラウンドとして切り取る



2. シグナル抽出

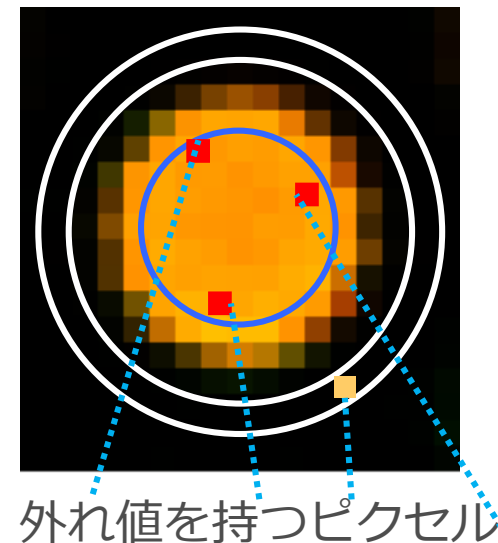
外れ値を持つピクセルの排除を含めて

Step 1.

領域内の外れ値を持つピクセルを排除

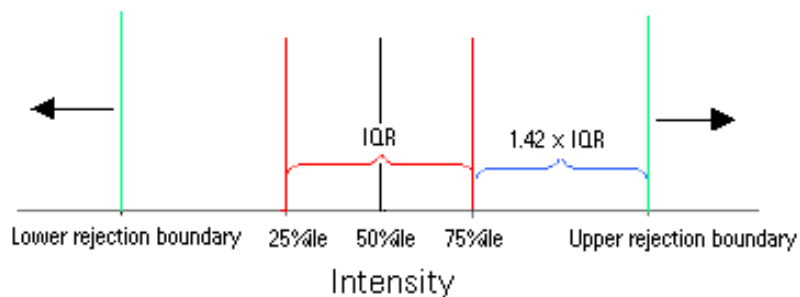
Step 2.

残りのピクセルを用いて、フィーチャおよびローカルバックグラウンドのシグナルを計算
平均および**標準偏差**を算出

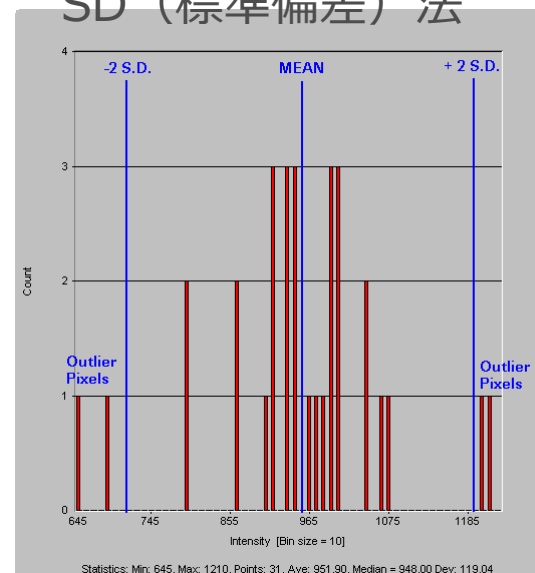


FeatureExtractionソフトが提供する
ピクセル外れ値排除法

IQR（四分位間範囲）法



SD（標準偏差）法



3.異常フィーチャおよび バックグラウンドの検出

Step 2で除外できないものを検出しフラグ(Outlier)をたてる
染み、ゴミ等に由来する



フラグ(Outlier)の種類

- (1) 不均一なピクセルで構成されるスポット
→ **NonUniformityOutlier**

Feature (r, g)

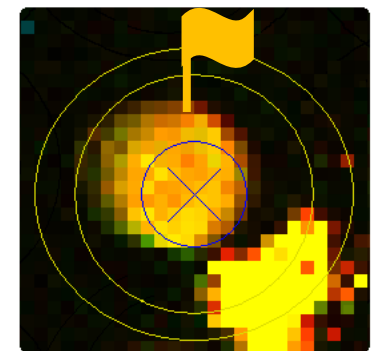
- (2) 集団(繰り返しスポット間)において
極端に高い(低い)値を持つスポット
→ **PopulationOutlier**

Feature (r, g)

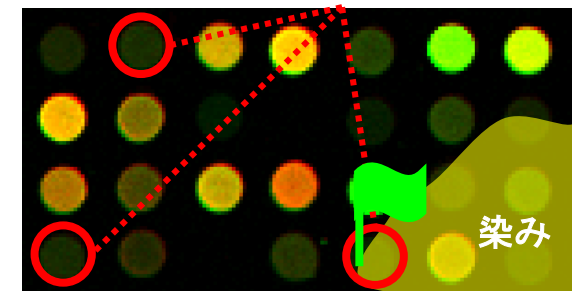
feature outlier



local background outlier



繰り返しスポット
(同じプローブが搭載されているスポット)



4. バックグラウンド補正

Spatial Detrend*

Background correction methods Agilent offers

Local subtraction :

Local background

Global subtraction:

Average of all background areas

Average of negative control features

Minimum signal (feature or background)

Global background adjustment

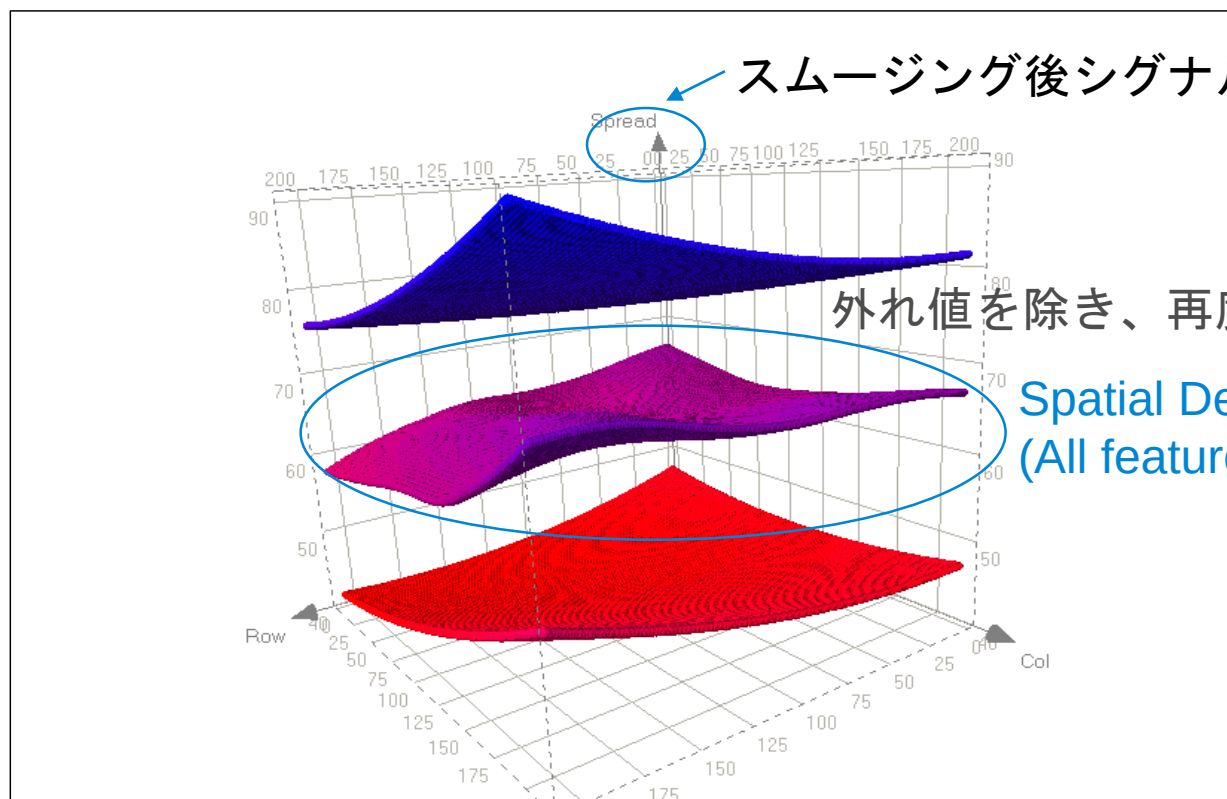
Option : other background subtraction methods



Spatial Detrend

CGHではNegativeControlFeaturesを用いてSurface Fitをおこなう

Spatial (Additive) Detrend Surface



スミージング後シグナル強度

外れ値を除き、再度、スミージングを行う

Spatial Detrend Surface
(All features)

$$\text{BGSubSignal} = \text{MeanSignal} - \text{BGUsed}$$

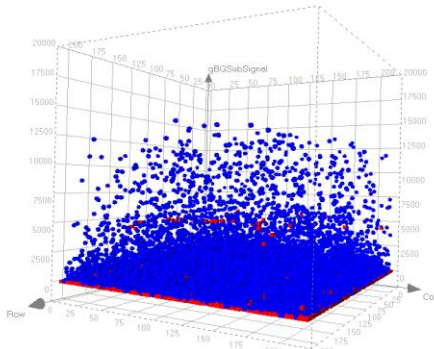
Default設定ではSpatialDetrendにより見積もられたBG



6. フィーチャシグナルのアレイ内補正 Multiplicative Detrending

1枚のアレイ内で、
各エリアでのシグナル強度の傾向 (Trend)を見つけることで、
アレイ全体のシグナル強度を補正 **(エリア補正)**

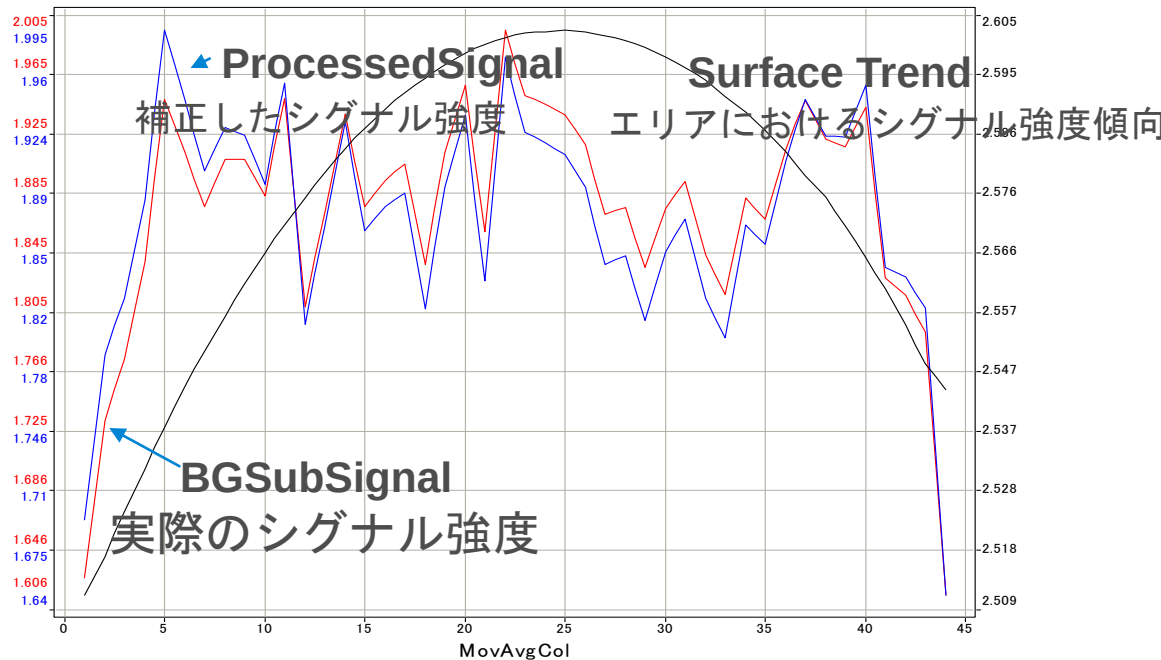
Look For Trends by Fitting The BGSubSignal



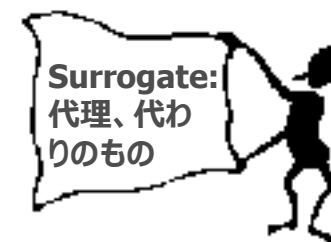
Surface Trendの検出

Multiplicative Detrending補正

Effect of Detrending

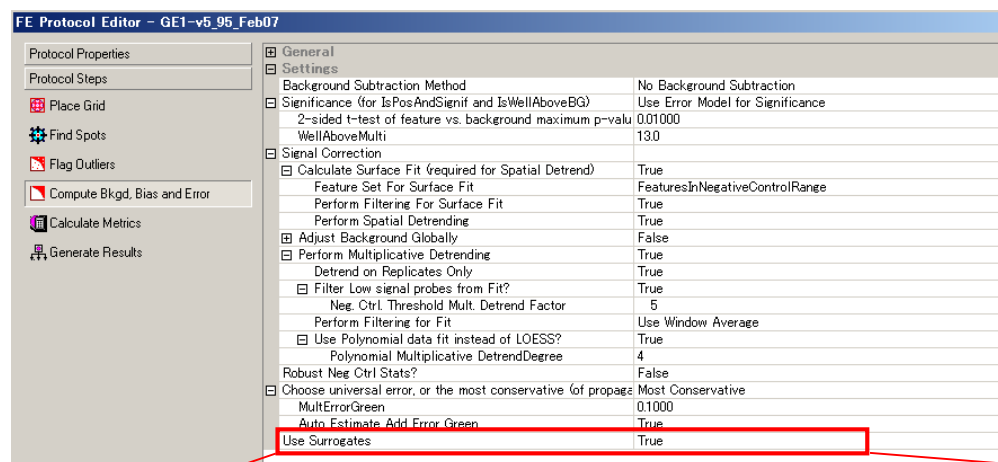


7. Surrogates



シグナル強度がノイズと同等、あるいはマイナス値を持つ場合にSurrogate値を当てはめる。

シグナル強度がマイナス値を持つと、log値が計算できない等不都合が生じる



Use Surrogates	True
----------------	------

8. 色素補正(Dye Normalization)

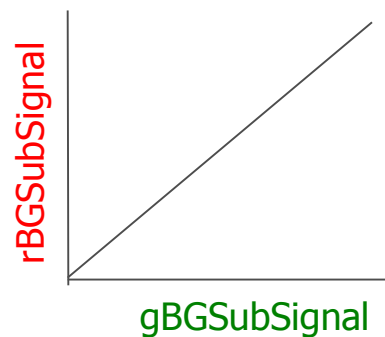
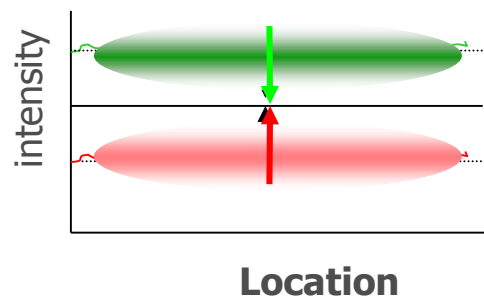
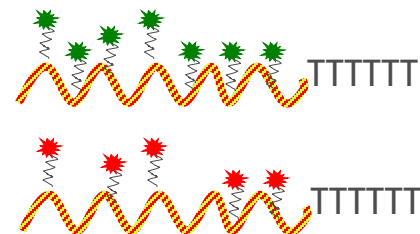
バイアス要因：

- 2つの色素のラベリング効率の相違
- スキャン時のレーザーパワーの違い

background-subtracted シグナルに
dye normalization factorをかけることにより
バイアスを補正する。

色素補正（正規化）における2つのステップ

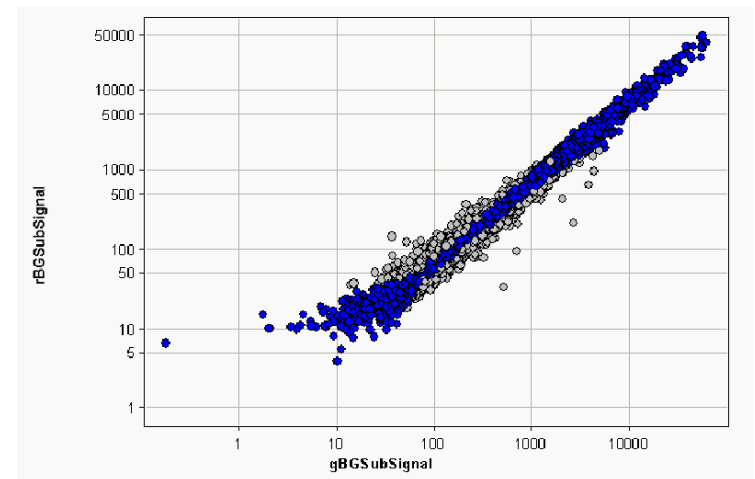
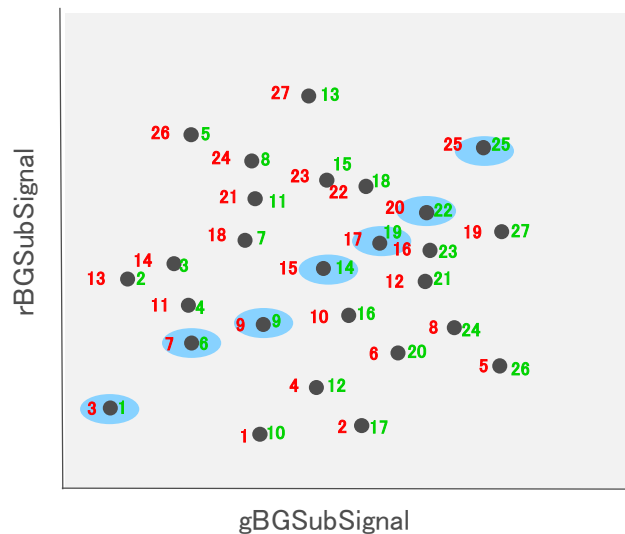
1. 補正係数の計算に用いるフィーチャの選択
2. 補正係数の計算と各フィーチャへの適用



8. (続き)

1. 補正係数の計算に用いるフィーチャの選択

- 色素間で強度ランクが似通った遺伝子の使用
 - Rank Consistency Filter (デフォルト)
- ノーマライズ用の遺伝子リストの使用
- フラグを除く全遺伝子の使用



RankConsistencyFilterにより
選ばれたFeature (青)



8. (続き)

2. 補正係数の計算

- Linear(デフォルト)
- Linear&LOWESS
- LOWESS

LOWESS :

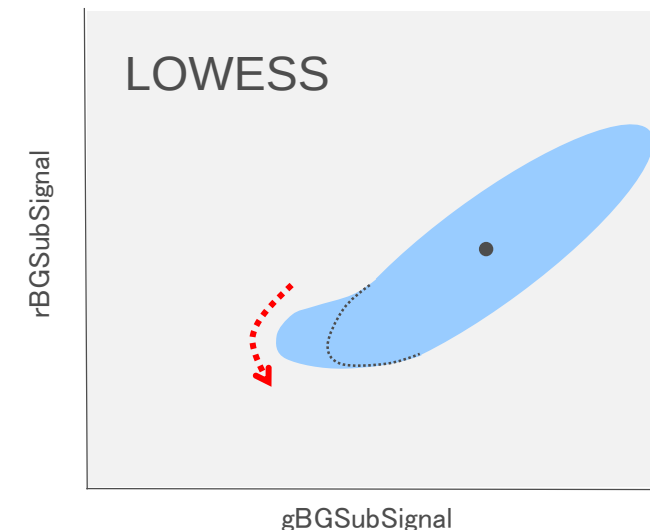
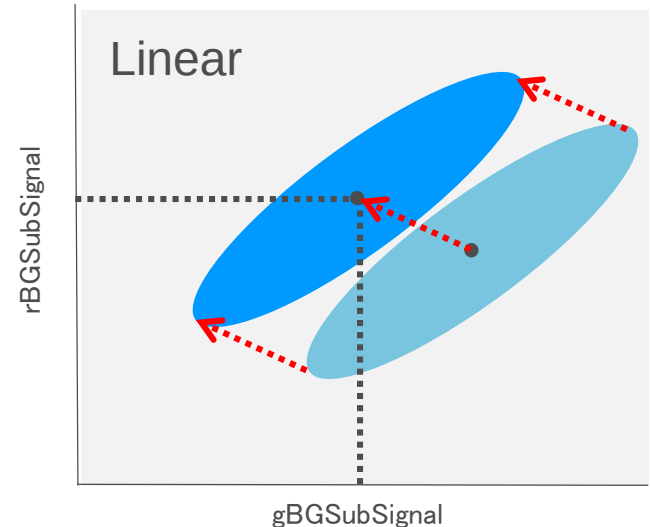
locally weighted scatterplot smoothing locally weighted linear regression

- ダイバイアスがシグナル強度依存すると仮定
- 各々の遺伝子が異なった係数を持つ

・J. Quackenbush. 2002 Nature Genetics:

・The Chipping Forecast II ,496-501 (Nature Japan webに和文PDF有り)

・<http://www.mged.org/normalization>

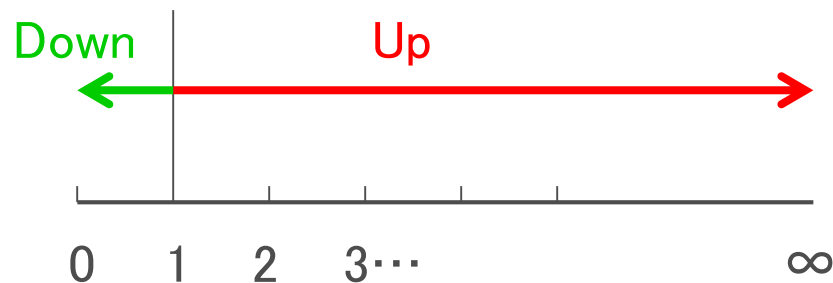


9. Log比計算

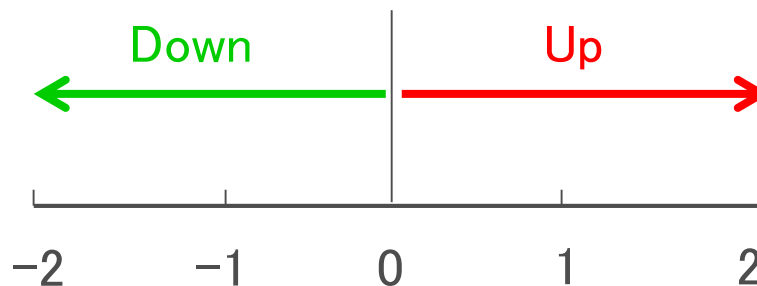
何故Log Ratioなのか？

$$\frac{\text{Cy5}}{\text{Cy3}}$$

分数



Ratio: Up と Down 非対称なスケール



Log Ratio: Up と Down 対称なスケール



9. 続き

▪ Log Ratio

$$= \text{Log10} \frac{\text{Cy5} \cdots \cdots \text{rProcessedSignal}}{\text{Cy3} \cdots \cdots \text{gProcessedSignal}}$$

▪ Log Ratio Error

▪ P-value

- エラーモデルに従いDifferential expressionの有意性を判定

