

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

著者

Sunny Song
Jim Collins
Agilent Technologies
Santa Clara, CA

Chad Brueck
Sigma-Aldrich
St. Louis, MO

詳細については、「Oligonucleotide Array CGH Analysis of a Robust Whole Genome Amplification Method」(Brueck, C. et al. *Biotechniques* (2007) 42(2):230-233) をご覧ください。

要旨

ゲノムの不安定性はがんや遺伝子疾患の典型的な特徴です。Agilent のオリゴヌクレオチドアレイベースの比較ゲノムハイブリダイゼーション (aCGH) プラットフォームは、ハイスループットかつゲノム全域にわたるスケールでの DNA コピー数変化のプロファイルを提供します。アジレントは Sigma 社の GenomePlex WGA Kit と既に確立している Agilent の高性能 aCGH マイクロアレイを組み合わせ、aCGH 解析のための迅速でインプット量が少ない全ゲノム増幅 (WGA) 法を開発しました。さらに、aCGH の結果は、Stratagene Mx3000P QPCR System を使って検証しました¹。この強力なシステムを使用すると、ナノグラム量のゲノム DNA から始めて、堅牢で正確な aCGH データを得られます。

はじめに

アレイベースの比較ゲノムハイブリダイゼーション (aCGH) は、現在多種のサンプルで染色体の変化を調べるために利用されています (Barett, M. T. et al., 2004)。この技術は発展し続けていますが、1 つの aCGH アレイを処理するのに、通常 1 サンプルあたり 0.5 ug の DNA を必要とします (Agilent Application note, 5989-5048EN)。しかし、ある種の貴重なサンプル、例えばレーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) で得た細胞や針生検検体では、ラベル化し、アレイにハイブリダイズさせるだけの DNA が得られません。全ゲノム増幅 (whole genome amplification; WGA) 法は、ジェノタイプングやシーケンス解析の際、使用するゲノム DNA の量が非常に少ない場合に日常的に使用されています (Kuivaniemi, H.S. et al., 2002; Hosono, S. et al., 2002)。2 つの WGA 法が広く使われており、① Taq DNAポリメラーゼ PCR ベース反応の primer extension pre-amplification (PEP) 法 (Zhang, L.X. et al., 1992) と ② Phi29 DNA ポリメラーゼを用いたゲノムの等温増幅を行う多置換増幅 (multiple displacement amplification; MDA) 法 (Dean, F.B. et al., 2002) です。PEP-PCR では、完全な degenerate プライマーを使うので、サイクル毎に産物が短くなります。また、我々は、Phi29 ポリメラーゼベースの MDA 法では、分解したり断片化したりした DNA のような低品質サンプルでのゲノムマイクロアレイ解析で、高頻度でノイズが高くなることを見出しました。一方、GenomePlex による

¹Agilent Technologies は、製品ラインナップの補完をすることで生命科学の発展を促進することを目的として Stratagene と統合しました。



Agilent Technologies

WGA では、例えば平均サイズが 1kb 未満まで断片化したサンプルからでもゲノムの増幅が可能です。この特徴により、今までは DNA の分解度が高いために役に立たないと思われていたサンプルも aCGH で解析することができます。このアプリケーションノートでは、GenomePlex による WGA で低い品質のゲノム DNA や断片化した DNA を増幅し、REPLI-g を使った MDA による WGA の性能と比較しました。さらに、Agilent の aCGH マイクロアレイでの GenomePlex の性能は、Stratagene Mx3000P QPCR System を使って検証しました。要約すると、このアプリケーションノートでは、Stratagene Mx3000P QPCR System を使って効果的に検証される堅牢な aCGH データを得るための、GenomePlex による WGA の使用例を示します。

材料と方法

DNA

プールされた正常 gDNA (P/N G1471 (male) と P/N G1521 (female)) は Promega から購入しました。ヒト結腸がん細胞株 HT29 由来 gDNA (P/N HTB-38D) は ATCC から購入しました。凍結乳がん組織は GenomicsCollaborative, Inc (GCI) から入手し、gDNA は Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (P/N 69504) を使い、メーカーのプロトコルに従って精製しました。

ゲノム DNA の断片化

ゲノム DNA はソニケータープローブ (Digital Sonifier 450, Branson Ultrasonics Corp., CA) を使って 5 秒、30 秒、90 秒、または 120 秒間、超音波処理を行いました。断片化した gDNA は 1.2 % アガロースゲル (E-gel Agarose Gels P/N G5018-01, Invitrogen, CA) で電気泳動を行って断片のサイズ分布を調べました。

全ゲノム増幅

REPLI-g MDA 法では、gDNA サンプルは REPLI-g キット (Qiagen P/N 150043) を使い、メーカーのプロトコルに従って増幅しました。全ゲノム増幅反応に使用した gDNA の量は 50 ng です。増幅後、QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen P/N 27106) を使って増幅産物から余分なプライマーや dNTP を除いて精製しました。

GenomePlex WGA では、gDNA サンプルは GenomePlex WGA キット (Sigma P/N WGA2) を使い、メーカーのプロトコルに従って増幅しました。全ゲノム増幅反応に使用した gDNA の量は 50 ng ですが、漸増試験に使用した量は除きます。使用した量は表示されている通りです。増幅後、Sigma の GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma P/N NA1020) を使って余分なプライマーや dNTP を除きました。

DNA のラベル化とハイブリダイゼーション

Agilent の Genomic DNA Labeling Kit PLUS (Agilent P/N 5188-5309) を使い、Cyanine 3 または Cyanine 5 で DNA をラベル化しました。Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis Protocol version 5.0 に従い、2–2.5 ug の増幅した DNA を各ラベル化反応の出発物質として使用しました。増幅しない場合には、0.5 ug の増幅していないゲノム DNA をラベル化反応に使用しました。Agilent の標準的な aCGH マイクロアレイの操作手順に従って、Cyanine 3 と Cyanine 5 でラベル化されたサンプルを混ぜ合わせ、Agilent の標準的な aCGH マイクロアレイの操作手順に従って、Cyanine 3 と Cyanine 5 でラベル化されたサンプルを混ぜ合わせ、Agilent の Human Genome CGH Microarray Kit (244A (Agilent P/N G4411B)、105A (Agilent P/N G4412A) または 44B (Agilent P/N G4410B (販売終了)、後継品 P/N G4426B AMADID 14950) のマイクロアレイにハイブリダイズしました。

マイクロアレイ処理とデータ解析

Agilent マイクロアレイのスキャンと画像解析は上記 aCGH プロトコルに従って行いました。マイクロアレイは Agilent DNA Microarray Scanner (Agilent P/N G2565BA)、Agilent Scanner Control Software version 7.0 を使ってスキャンしました。Agilent Feature Extraction ソフトウェア (version 9.5) を使って解析準備としてマイクロアレイの画像ファイルを数値化しました。Agilent CGH Analytics ソフトウェア (version 3.4) を使って aCGH マイクロアレイプロファイルからゲノム構造変化パターンを可視化、検出、解析しました。

定量 PCR 法

マイクロアレイの結果を確認するため、BRCA2 遺伝子のエクソン 2、3、および 26 のプロファイルを SYBR Green 定量 PCR (qPCR) で解析しました。サンプルは Sigma の SYBR Green JumpStart Taq Ready Mix を使って調製しました。データ取得には Stratagene Mx3000P QPCR システムを使用しました。相対コピー数変化が C(t) 値で解析できるようにするため、すべての反応は等量で行いました。

結果

1. インプット DNA 漸増試験

レーザーキャプチャマイクロダイセクション (LCM) で得た細胞と針生検では、限られた量のゲノム DNA (gDNA) しか得られないことが多く、aCGH 解析が困難となっています。限られた量の出発物質に対して GenomePlex WGA を行い、Agilent の human genome CGH マイクロアレイで解析しました。1、10、50、または 100 ng のプールされた正常女性の gDNA とヒト結腸がん細胞株 HT29 由来 gDNA を Sigma の GenomePlex キットを使って増幅し

ました。どの量から始めても、増幅産物の収量は、概ね 5-10 ug の範囲でした。DNA のサイズ分布は、1.2 % アガロースゲル電気泳動の結果から 200 から 5000 bp と測定されました。1 ng から始めた WGA 産物のサイズ分布は、若干低分子量側に偏っていました (200 から 1000 bp) (データは省略します)。

増幅したヒト結腸がん細胞株 HT29 の DNA を増幅したプールされた正常女性の DNA に対して Agilent Human Genome CGH 2x105K マイクロアレイ上で競合的にハイブリダイズさせました (図 1)。性能評価に使用したメトリクスは次の通りです。Derivative Log Ratio Standard Deviation (DLRS D)、Signal-To-Noise Ratio (SNR)、および Background Noise (BGNoise)。これ

らの結果は、増幅していない gDNA と同等でした (表 1)。許容範囲ですが、インプット量が 1 ng のものは、DLRS D 値が他のインプット量のものより大きくなりました。probe-to-probe log ratio ノイズ (DLRS D, 隣り合うプローブ間の log ratio 差の標準偏差) 値が低いことで示されたように、染色体構造異常は、この広い範囲の DNA インプット量にわたって一貫して検出されと考えられます。Agilent CGH Analytics ソフトウェアを使って、このインプット量範囲で増幅したヒト結腸がん細胞株 HT29 由来 gDNA におけるコピー数変化パターンを解析しました (図 1)。8 番染色体短腕の欠失、8 番染色体長腕の増幅、8q23 の局所的欠失を含む全ての既知の構造異常は、どのインプット量でも chromosome view で確かに検出されました。これらのデータが

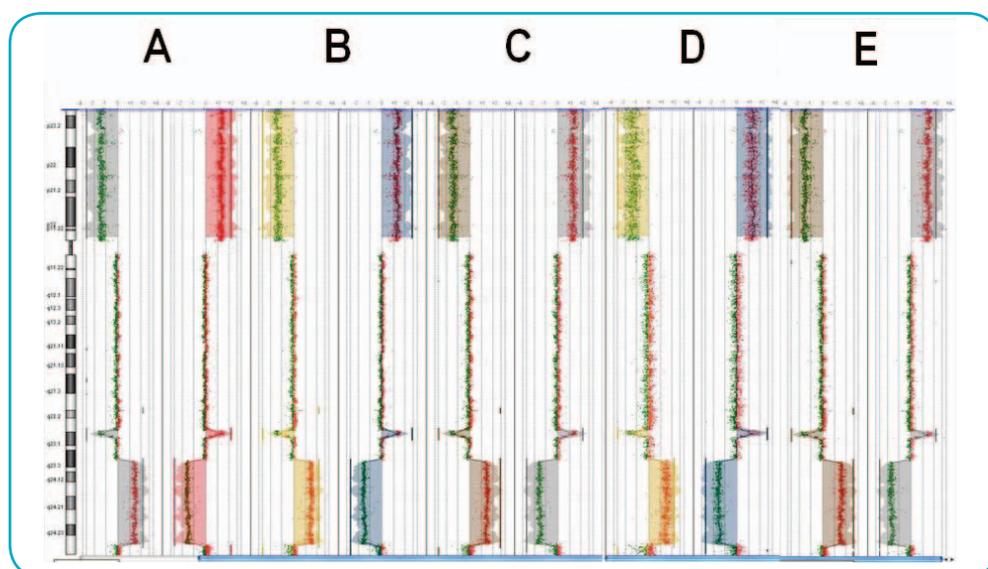


図 1. 1 ng から 100 ng のインプット gDNA において等価な結果を示す Agilent の CGH Analytics の表示画像

様々なインプット量の gDNA を GenomePlex で増幅し、Agilent Human Genome CGH 105A マイクロアレイで解析しました。各パネル (A-E) に Dye swap した (サンプル間で Cy3 と Cy5 を入れ替えた) プロットが向かい合わせで表示されています。polarity +1 (Cy5-HT29/Cy3-Female) は左に、polarity -1 (Cy5-Female/Cy3-HT29) は右に示しています。これらのプロットでは、GenomePlex で増幅した正常女性の gDNA とヒト結腸がん細胞株 HT29 由来 gDNA (8 番染色体短腕の欠失、8q23.3-24.33 にある 8 番染色体長腕の増幅、8q23.1 の局所的欠失を含む) を比較しています。

A: 100 ng のインプット量から増幅、B: 50 ng のインプット量から増幅、C: 10 ng のインプット量から増幅、D: 1 ng のインプット量から増幅、E: 0.5 ng のインプット量 (増幅なし)。

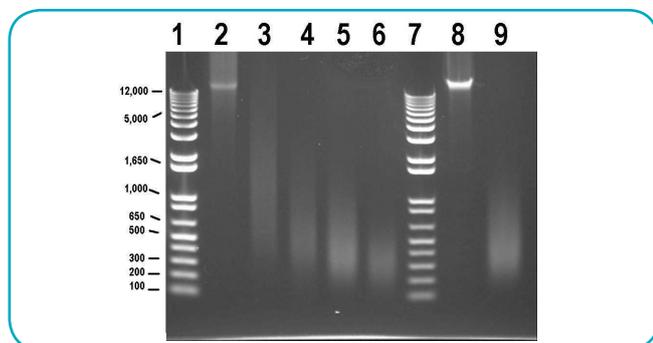
	DLRS D	SNR-Cy3	SNR-Cy5	BG Noise-Cy3	BG Noise-Cy5
Unamplified (0.5 µg input)	0.14 +/- 0.002	155 +/- 1	190 +/- 1	2.0 +/- 0.2	3.1 +/- 0.16
Amplified (100 ng input)	0.11 +/- 0.0002	137 +/- 2	192 +/- 8	1.9 +/- 0.2	2.6 +/- 0.2
Amplified (50 ng input)	0.11 +/- 0.002	118 +/- 25	190 +/- 6	2.4 +/- 0.6	2.9 +/- 0.29
Amplified (10 ng input)	0.14 +/- 0.003	94 +/- 22	202 +/- 2	2.4 +/- 0.9	2.3 +/- 0.1
Amplified (1 ng input)	0.24 +/- 0.012	142 +/- 11	221 +/- 9	1.7 +/- 0.01	2.2 +/- 0.07

表 1. Agilent aCGH Microarray Performance Metrics: DNA インプット量漸増試験。詳細は Appendix を参照してください。

ら、幅広いインプット量にわたって増幅が可能であり、10 ng の開始ゲノム DNA があれば GenomePlexによる増幅で一貫性のある aCGH の結果が得られることが示されました。

2. 断片化した DNA の全ゲノム増幅の aCGH による評価

aCGH 解析に分解したゲノム DNA を使うしかないことがよくあります。次の実験の目的は、断片化した DNA を増幅して Agilent の human genome aCGH マイクロアレイで良好な aCGH 結果が得られるのかどうかを調べることです。分解していない正常女性のプールした gDNA とヒト結腸がん細胞株 HT29 由来 gDNA に対して、時間を変えて超音波処理を行いました。ゲノム DNA のサイズ分布はアガロースゲル分析で調べました (図 2)。



GenomePlex による WGA を、HT29 由来 gDNA の断片化していないものと断片化したものの両方を使って行いました。Agilent aCGH の結果、図 3 に示すように、8 番染色体の良く知られた HT29 の構造異常の全てが検出されました。さらに Agilent microarray performance quality metric (マイクロアレイデータクオリティ基準値) は断片化した gDNA としていない gDNA の間で非常に近い値を示しました (表 2)。これらの結果から、Agilent のマイクロアレイでは、少なくとも平均サイズ 400 bp にまで切断された gDNA を増幅して使用しても、高分子量の分解していないゲノム DNA と同等の結果を得られることが示唆されます。

図 2. 断片化した gDNA の 1.2% アガロースゲル電気泳動解析

GenomePlex WGA での増幅の前に DNA 断片の大きさをゲル電気泳動で測定しました。正常女性の gDNA と HT29 の gDNA は高分子量のバンド (>12,000 bp) を示し、5-120 秒間断続的に超音波処理した gDNA は様々な大きさの低分子量 DNA のバンドを示しました。レーン 1 と 7: 分子量マーカー、レーン 2: 断片化していない gDNA (>12,000 bp)、レーン 3: 5 秒間超音波処理した正常女性の gDNA (~1,500 bp)、レーン 4: 30 秒間超音波処理した正常女性の gDNA (~600 bp)、レーン 5: 90 秒間超音波処理した正常女性の gDNA (~400 bp)、レーン 6: 120 秒間超音波処理した正常女性の gDNA (~300 bp)、レーン 8: 断片化していない HT29 gDNA (>12,000 bp)、レーン 9: 90 秒間超音波処理した HT29 gDNA (~400 bp)。aCGH 解析には、断片化していない正常女性の gDNA (レーン 1)、90 秒間超音波処理した正常女性の gDNA (レーン 5)、断片化していない HT29 gDNA (レーン 8)、および 90 秒間超音波処理した HT29 gDNA (レーン 9) を使用しました。

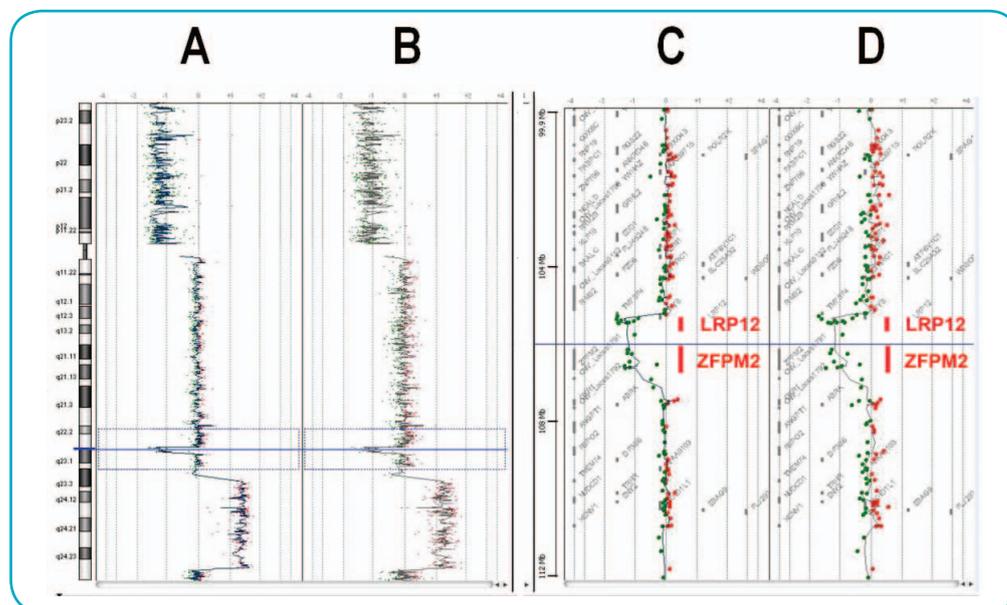


図 3. GenomePlex WGA は 1 kb 未満の DNA の増幅を可能とし、Agilent human genome aCGH 44B マイクロアレイでの結果も断片化していない gDNA と等価

Agilent CGH Analytics での 8 番染色体の模式図に、ヒト結腸がん細胞株 HT29 由来 gDNA の断片化したものとしていないものの両方を使った GenomePlex による WGA のデータを示します。断片化していない HT29 gDNA (A) と断片化した HT29 gDNA (B) から増幅した GenomePlex WGA 産物は、8 番染色体短腕の欠失、8q23.3-24.33 にある 8 番染色体長腕の増幅、8q23.1 の局所的欠失 (青い点線の四角で示された部分) の検出において同一であることが分かりました。断片化していない gDNA (C) と断片化した DNA (D) の両方の Chr8 q22.2-23.1 に相当する部分のデータを拡大した gene views (12 Mb)。BAC アレイベースの解析で報告 (Garnis, C, et al. 2004) があるジंकフィンガープロテイン ZFPM2 と腫瘍抑制因子 LRP12 を含む約 1.5 Mb の欠失を明らかに示しています。

3. 断片化した DNA に対する全ゲノム増幅法の比較： GenomePlex 対 REPLI-g

高い鎖置換、処理能力、および kb オーダーの長さの鋳型を必要とする REPLI-g 法は断片化した gDNA サンプルの増幅に成功しないことがよくあります。この実験では、断片化した DNA を出発物質として使用し、MDA ベースの REPLI-g キットと GenomePlex WGA キットを比較しました。ヒト結腸がん細胞株 HT29 由来のゲノム DNA を分解していない gDNA のソースとして使用し、HT29 の超音波処理した gDNA を断片化した DNA のソースとして使用しました。50 ng の DNA を出発物質として両方の増幅法で使用しました。図 4 と表 3 に示すように、断片化した DNA の REPLI-g による MDA は非常に高い probe-to-probe

log-ratio ノイズ (DLRSD) を示し、その結果 Agilent 44K aCGH アレイと CGH Analytics ソフトウェアで既知の構造異常が検出できませんでした。一方、GenomePlex による WGA では、断片化した HT29 DNA でも断片化していない HT29 DNA でも既知の構造異常を全て検出しました (図 4C-D)。GenomePlex で増幅した断片化した DNA の DLRSD は、約 0.22 であり、REPLI-g のもの (1.48) より約 7 倍も低いノイズレベルでした。REPLI-g によって増幅された断片化 DNA で得られたシグナル強度は非常に低いものでした。GenomePlex によって増幅された断片化 DNA のシグナル対ノイズ比は 40-70 であり、REPLI-g のものと比べて 5-10 倍高い値を示しました (表 3)。予測通り、分解していないゲノム DNA を GenomePlex と REPLI-g の両方で増幅した場合

	DLRSD	SNR-Cy3	SNR-Cy5	BG Noise-Cy3	BG Noise-Cy5	Response ¹
Intact HT29/Female	0.13 +/- 0.004	68 +/- 3	87 +/- 10	1.8 +/- 0.08	2.5 +/- 0.4	NA
Sonicated (90s) HT29/Female	0.22 +/- 0.012	49 +/- 4	77 +/- 10	2.1 +/- 0.1	2.4 +/- 0.13	NA
Intact Male/Female	0.12 +/- 0.0002	65 +/- 4	96 +/- 4	1.9 +/- 0.14	2.3 +/- 0.2	0.83 +/- 0.02 [#]
Sonicated (90s) Male/Female	0.21 +/- 0.007	53 +/- 5	86 +/- 3	1.9 +/- 0.008	2.0 +/- 0.13	0.73 +/- 0.003

¹ Applies to male versus female comparison only. NA, not applicable. [#] The response is slightly compressed in amplified samples.

表 2. Agilent aCGH Microarray Performance Metrics: DNA 断片化実験。詳細は Appendix を参照してください。

HT29/Female	Method	DLRSD	SNR-Cy3	SNR-Cy5	BG Noise-Cy3	BG Noise-Cy5
Intact	GenomePlex	0.13 +/- 0.004	68 +/- 2.5	87 +/- 10.7	1.8 +/- 0.08	2.5 +/- 0.39
	REPLI-g	0.23 +/- 0.0001	70 +/- 10.8	105 +/- 1.04	2.5 +/- 0.35	2.8 +/- 0.06
Sonicated (90s)	GenomePlex	0.22 +/- 0.012	49 +/- 4.0	77 +/- 10.3	2.1 +/- 0.10	2.4 +/- 0.13
	REPLI-g	1.48 +/- 0.014	40 +/- 23	13 +/- 1.9	1.7 +/- 0.30	2.0 +/- 0.12

表 3. Array Performance Metrics: 断片化した DNA としていない DNA を使った GenomePlex と REPLI-g による WGA。詳細は Appendix を参照してください。

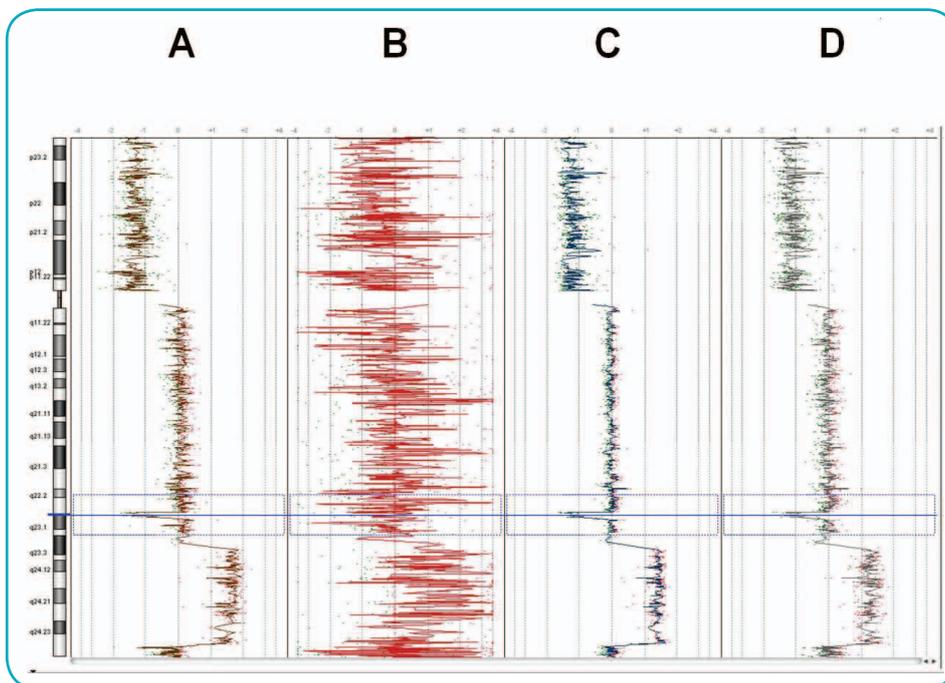


図 4. REPLI-g と GenomePlex の比較

ヒト結腸がん細胞株 HT29 DNA を正常女性の gDNA に対して競合的にハイブリダイズさせて Agilent 44K マイクロアレイで解析したときの CGH Analytics の結果。REPLI-g (A-B) と GenomePlex (C-D) はそれぞれ標的の増幅に使用しました。

A: REPLI-g で増幅した断片化していない gDNA HT29/正常女性、B: REPLI-g で増幅した断片化した gDNA HT29/正常女性、C: GenomePlex で増幅した断片化していない gDNA HT29/正常女性、D: GenomePlex で増幅した断片化した gDNA HT29/正常女性。いずれの増幅反応でも、50 ng の gDNA を出発物質として使用しています。

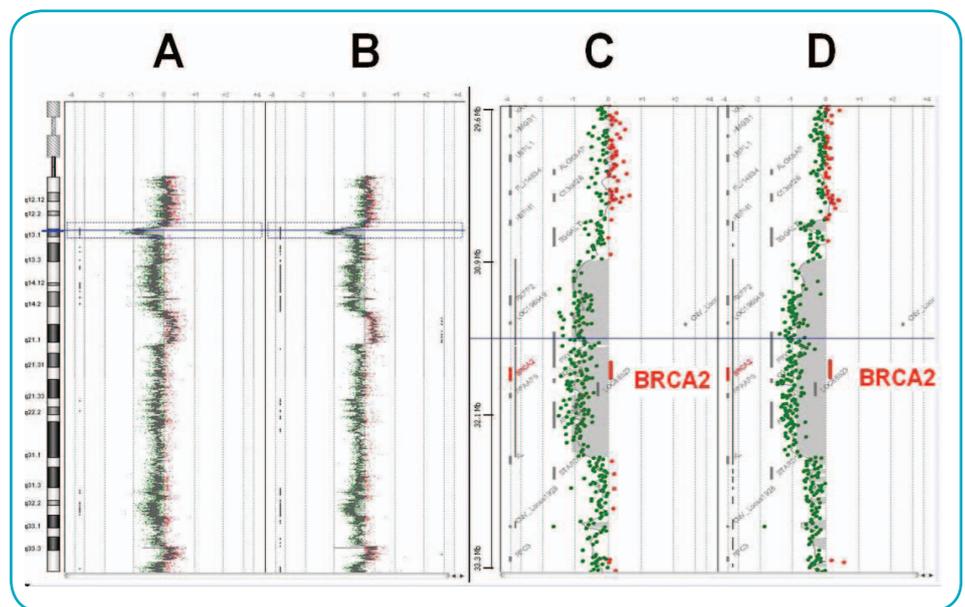


図 5. GenomePlex で増幅した DNA を使った Agilent human genome aCGH 244K マイクロアレイでの局所的欠失の検出 GenomePlex で増幅した DNA から得られた aCGH データは増幅していない DNA と同等でした。244K マイクロアレイのデータから作成したスカッタープロットによって、増幅サンプル (A) と増幅していないサンプル (B) の両方で 13 番染色体の p13.1 領域 (青い点線の四角で示された部分) にある局所的欠失が明らかとなりました。局所的欠失を含む 13p13.1 にある 3.7 Mb ウィンドウを拡大した gene view (C: 増幅、D: 増幅なし)。乳がん遺伝子 BRCA2 (赤線) を含む欠失が胸部腫瘍 DNA から調製した WGA 産物と増幅していないゲノム DNA の両方で検出されました。

には、結果は同等でした (図 4A と C) (表 3)。そして WGA でない DNA から得られたデータと一致しました (データは省略します)。この結果、GenomePlex WGA は断片化している gDNA でも断片化した gDNA でも Agilent aCGH マイクロアレイで堅牢で正確な値が得られることが示されました。

4. Stratagene Mx3000P QPCR System を使った Agilent aCGH マイクロアレイでの GenomePlex で増幅した腫瘍 DNA における局所的欠失の検証

GenomePlex WGA 法を使い、Agilent 244K aCGH マイクロアレイにより乳がんサンプルにおける局所的欠失の検出を行いました (図 5)。GenomePlex WGA データは増幅していないデータと比較しました (図 5)。データは Stratagene Mx3000P QPCR System を使った遺伝子特異的 qPCR 解析で比較しました (図 6)。BRCA2 遺伝子 (Tavtigian, S.V. et al.) のエクソン 2、3、および 26 を標的とした 3 セットの SYBR Green 定量 PCR プライマーは、乳がん gDNA と正常女性 gDNA の間に平均して 1.54 サイクルの違いを示しました (図 6A)。正常サンプルに対して腫瘍サンプ

ルの BRAC2 遺伝子におけるこの 2.9 倍 ($2^{1.54}$) の低下は 13p13.1 の局所的ヘテロ接合性欠失の結果と一致します (図 5C-D、図 6B)。

結論

Agilent の 2 色法 aCGH マイクロアレイでは、少量の分解していない DNA (最小 10 ng) または断片化した DNA (平均サイズは少なくとも 400 bp) の両方を使って、高品質の aCGH データを得ることができます。この新しい増幅法は、通常 1 ug 未満の DNA しか得られない LCM や針生検のようなサンプルを使う機会を生み出します。GenomePlex 全ゲノム増幅プロトコルと Stratagene Mx3000P QPCR システムは、Agilent aCGH ワークフローにシームレスに統合されています。

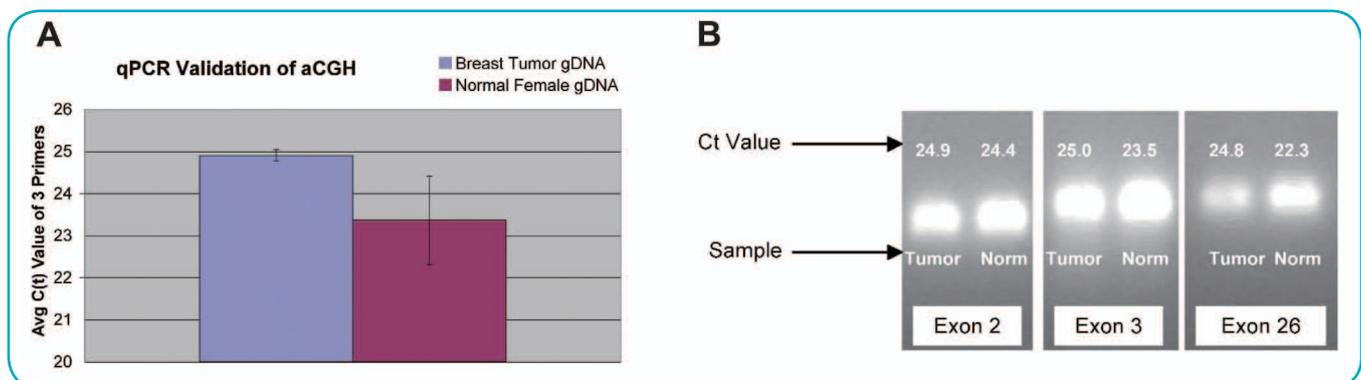


図 6. BRCA2 遺伝子特異的定量 PCR と Stratagene Mx3000P QPCR System を用いた aCGH 胸部腫瘍データの検証

A: BRCA2 遺伝子のエクソン 2、3、および 26 を標的とした 3 セットの SYBR Green 定量 PCR プライマーの Cycle threshold (C(t)) 値の平均が示されています。青: 胸部腫瘍 gDNA、紫: 正常女性 gDNA。B: PCR 産物のゲル電気泳動解析。Tumor: 胸部腫瘍 PCR DNA。Norm: 正常女性 PCR DNA。

Appendix

Array Performance/QC Metrics (CGH Analytics 3.4 software QC metrics)			
DLRSD	Derivative Log ₂ Ratio Standard Deviation	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 Log ₂ Ratio 差の標準偏差)	Excellent: <0.2 Good: 0.2-0.3 Poor: >0.3
BGNoise	Background Noise	Cy3 (g)、Cy5 (r) のネガティブコントロールの標準偏差	Excellent: <5 Good: 5-10 Poor: >10
SNR	Signal to Noise Ratio	シグナル強度を BGNoise で割った値	Excellent: >100 Good: 30-100 Poor: <30
Response ¹	Log Ratio Response	X 染色体プローブのシグナル強度の Log ₂ Ratio のメジアン	Typical good scores: >0.8

¹ 異性試料間での比較を行う場合のみ

参考文献

- Barrett, M.T., A. Scheffer, A. Ben-Dor, N. Sampas, D. Lipson, R. Kincaid, *et al.*, (2004). **Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarray and total genomic DNA.** *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (51): 17765-17770.
- Dean, F.B., S. Hosono, L. Fang, X. Wu, A.F. Faruqi, P. Bray-Ward, *et al.*, (2002) **Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification.** *Proc Natl Acad Sci USA*, Apr 16;99(8):5261-6.
- Hosono, S., A.F. Faruqi, F.B. Dean, Y. Du, Z. Sun, X. Wu, *et al.*, (2003) **Unbiased whole-genome amplification directly from clinical samples.** *Genome Res.* May;13(5):954-64.
- Garnis, C., B.P. Coe, L. Zhang, M.P. Rosin, W.L. Lam (2004) **Overexpression of LRP12, a gene contained within an 8q22 amplicon identified by high-resolution array CGH analysis of oral squamous cell carcinomas.** *Oncogene.* April 1;23 (14):2582-6.
- Kuivaniemi, H., S. Yoon, H. Shibamura, M. Skunca, S. Vongpunsawad, G. Tromp (2002) **Primer-extension preamplified DNA is a reliable template for genotyping.** *Clin Chem.* Sep;48(9):1601-4.
- Tavtigian, S.V., *et al.* (1996) **The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds.** *Nature Genetics* 12. 333-337.
- Zhang, L., X. Cui, K. Schmitt, R. Hubert, W. Navidi, N. Arnheim (1992) **Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992 Jul 1;89(13):5847-51.

Agilent Technologies について

Agilent Technologies は複雑な生物学的過程の理解、疾患メカニズムの解明、および創薬の加速を可能にする生命科学システムの世界をリードするメーカーです。高感度、高再現性、およびワークフロー生産性が高い Agilent の生命科学ソリューションは、器具類、マイクロフルイディクス、ソフトウェア、マイクロアレイ、消耗品類、およびゲノミクス、プロテオミクス、メタボロミクスアプリケーションのためのサービスを含みます。

このアプリケーションノートに記載されている情報は研究目的のみの使用向けであり、診断目的には対応していません。このアプリケーションノートの情報、記述、および仕様は予告なく変更されることがあります。

Agilent Technologies は本書に含まれる誤植、あるいは本品の性能、または使用に関する偶発的ないし間接的な損害に関して責任を負いません。

アジレント・テクノロジー株式会社
©Agilent Technologies, Inc. 2012
Printed in Japan. September 13, 2012
5989-6624JAJP



Agilent Technologies