

Infinium® HumanMethylation450 BeadChip

低コストで大規模なゲノムワイドDNAメチル化研究が行える理想的なソリューション

HumanMethylation450 BeadChipの特長

- ・ゲノム幅広い分析機能、高灵敏度スループット、
低価格を実現
ゲノムワイドなカバレッジをもち、サンプルあたり45万以上
のメチル化サイトを1塩基の解像度で解析
 - ・**比類ないアッセイ再現性**
繰り返し実験による再現性は99%以上
 - ・**シンプルなワークフロー**
信頼のInfinium HD Assayを用いた、PCR不要のプロトコール
 - ・**FFPEサンプルにも対応**
独自のDNA修復ステップによりFFPEサンプルでもメチル化解析

DNAメチル化

クな役割を担っています。DNAメチル化には、発生・分化における細胞の特殊化および分化細胞の安定維持、ウイルス遺伝子や非宿主DNA配列から生じる有害な発現の抑制、そして環境刺激に対する応答機序の付与などの役割があります。また異常なDNAメチル化（高メチル化、低メチル化）とそれによる遺伝子発現への影響は、癌などの多くの疾患過程に関与しています¹。

様々なアプリケーションに対応する費用効率の高いDNAメチ

包括的でゲノムワイドなカバレッジ解析を行ったのに、イナルミニは実績あるInfiniumアーチ
トリーとiScanおよびHiScan™ SQシステムによる信頼性の高いメチル化プロファイリングプラットフォームを提供します。HumanMethylation450 BeadChip（図1）はInfinium HDテクノロジーを用いており、専門家が選んだゲノムワイドなカバレッジコンテンツ、高サンプルスループット、低価格の特長を併せもち、ゲノムワイド関連解析（GWAS）コホートなどの大きなサンプル集団のスクリーニングに最適です。また、このアッセイは通常サンプルだけでなくホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）サンプルでも、1塩基レベルの解像度でCpGサイトのメチル化を定量することができるため、エピゲノムの詳細な変化を捉えることができます。

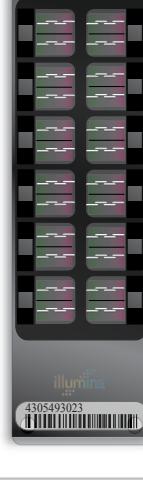
HumanMethylaton450 BeadChipsは、遺伝子領域を包括的にカバーしているだけではなく、

専門家が選択した高価値のコンテンツを含みます。Infinium HD テクノロジーは、メチル化DNAのキャプチャー法にしばしば伴うバイアスに依存することなく、コンテンツのデザインが可能です。CpGアイランドの密度が低い領域や、これまでのキャプチャー法では捉えづらかった領域の遺伝子を含む、99%のRefSeq遺伝子を網羅します。

このデザインの特長として、可能な限り広く包括的にメチル化状態を捉えるために、プロモーター領域、5' 非翻訳領域、第1

エクソノ、遺伝子内、3'非翻訳領域において複数サイトをターゲットとし、遺伝子領域全体をカバーしています(図2)。この

图1: Illumina HumanMethylation450 BeadChip



ト内とCpGアイラント外のメタル化サイトをターゲットとした、45万以上のプローブが搭載されています。

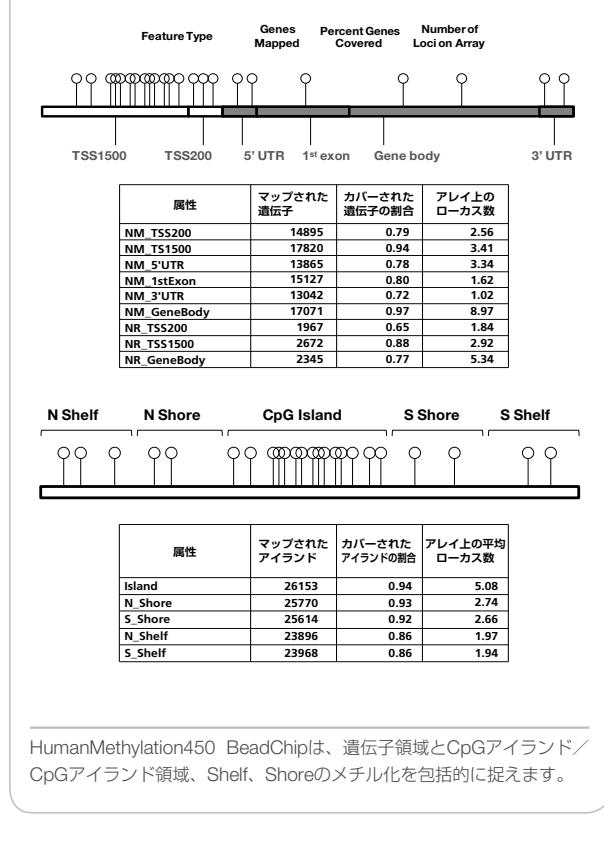
トおよびその周辺領域にまで拡入しています。CpGアイランドとアイランドShoreおよびアイランドShoreに隣接する領域（アイランドShelve）に含まれる複数サイトを合わせると、全体では96%のアイランドがカバーされています。遺伝子およびCpGアイランド領域の他にも、メチル化の専門家が選択した追加の高価値コンテンツが搭載されています。

- ヒト幹細胞で同定された非CpGリートのステルル領域
 - 様々な組織、複数の癌種で確認された正常細胞と癌細胞間で異なるメチル化を示す領域
 - FANTOM 4プロモーター
 - DNase高感受性部位
 - miRNAプロモーター領域
 - イルミナのHumanMethylation27 BeadChipに搭載されているコンテンツの約90%

でシンプルなワーク

サンプル必要量が少ない（500ng）ため、DNA量が限られる貴重なサンプルの解析が可能です。HumanMethylation450 BeadChipキットには、メチル化解析を行うために必要なすべての試薬が含まれています（別売のバイサルファイト変換キットを除く）。

図2 : HumanMethylation450 BeadChipは遺伝子領域全体をカバー



データの統合

HumanMethylation450 BeadChipでカバーしているすべての遺伝子のうち2万以上はHumanHT-12 v4 Expression BeadChipでもカバーされており、それらの遺伝子のメチル化状態と発現レベルを併せて解析することが可能です。また、メチル化データとGWASで得られたジェノタイピングデータを統合することで、ジェノタイプとメチル化の相互の作用により、注目している遺伝子の表現型にどのような影響を及ぼすかをより理解することができます。

高品質データ

HumanMethylation450 BeadChipでは、メチル化解析のカバレッジを高めるため、Infinium IとIIのアッセイテクノロジーの両方を使用しています（図3）。Infinium IIデザインを追加することで、シングルビーズタイプに対して縮重オリゴスクレオチドプローブを用いることができます。あるCpGサイトをターゲットとするプローブの配列内に別のメチル化サイトが存在したとしても、最大3カ所までであればプローブデザインを工夫することで、調べようとするサイトの結果に影響を及ぼすことなく、メチル化されているか否かを知ることができます。

イルミナでは、高い再現性を保証するために、全製品について厳格なテストを行っており、業界最高レベルの品質のデータを得ることができます。

精度と正確性

再現性は、繰り返し実験から得られた結果の相関に基づいて決定されています。HumanMethylation450 BeadChipは繰り返し

実験間で強い相関を示し ($r^2 > 0.99$)、HumanMethylation27 BeadChipおよび全ゲノムバイオサルファイトシーケンス結果とも強い相関を示しました（図4）。

感度

繰り返し実験（8種類の生物学的サンプルの繰り返し実験）の結果の比較から、HumanMethylation450 BeadChipは0.2%の $\Delta\beta$ 値を1%未満の偽陽性率で確実に検出できることが示されています。

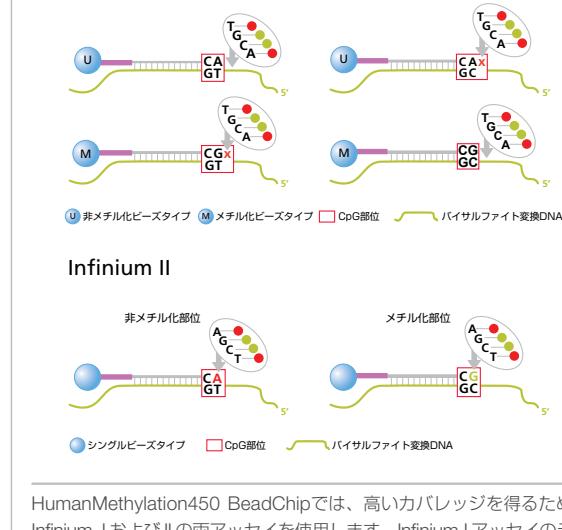
内部品質コントロール

Infinium HDベースのアッセイには、最高品質のデータが確実に得られるよう、サンプル依存コントロールと非依存コントロールが付属します。HumanMethylation450 BeadChipには600種類のネガティブコントロールが含まれています。バイオサルファイト変換後はシーケンスの複雑性が低下するため、メチル化解析アッセイではネガティブコントロールが特に重要です。GenomeStudio®メチル化モジュールソフトウェアには統合されたControls Dashboardが付属し、全コントロールのパフォーマンスを簡単にモニターできます。

統合解析ソフトウェア

HumanMethylation450 BeadChipのデータ解析は、強力で直観的なGenomeStudioMethylationModuleによりサポートされており、差分的メチル化解析を手軽に行えます（図5）。GenomeStudioソフトウェアの特徴である先進的な可視化ツールにより、大量のデータをヒートマップ、散布図、折れ線グラフなどの1枚のグラフで表示できます。これらのツールとGenomeStudio Genome Browserを用いれば、染色体構造、%GC、CpGアイランド中の位置、メチル化 β 値などの貴重な情報が得られます。

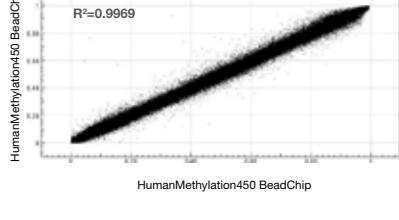
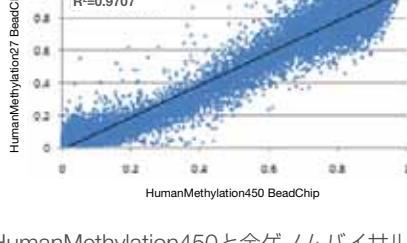
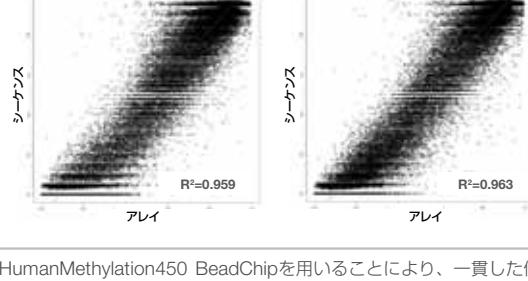
図3 : Infinium I・II アッセイのデザイン



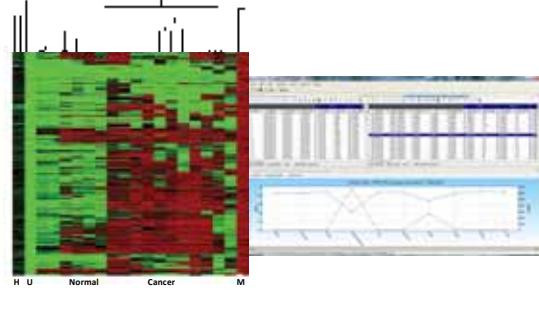
HumanMethylation450 BeadChipでは、高いカバレッジを得るため、Infinium IおよびIIの両アッセイを使用します。Infinium Iアッセイのデザインでは、CpG部位1カ所につき2個のビーズタイプ（メチル化状態、非メチル化状態に対して各1個）を用います。Infinium IIアッセイのデザインでは1個のビーズタイプを用い、メチル化状態はハイブリダイゼーション後の1塩基伸長ステップにおいて決定されます。

図4：アッセイの再現性

A : HumanMethylation450繰り返し実験の相関

B : HumanMethylation27と
HumanMethylation450の相関C : HumanMethylation450と全ゲノムバイオラル
ファイトシーケンス結果の相関

HumanMethylation450 BeadChipを用いることにより、一貫した信頼性の高いデータを確実に得ることができます。内部検定で得られた代表的なプロットは、繰り返し実験間の強力な相関（A）に加え、Human Methylation27 BeadChip（B）および全ゲノムバイオラルファイトシーケンス結果（C）との強力な相関を示しています。

図5：イルミナGenomeStudio Softwareを用いた
データ解析

GenomeStudioは、あらゆるプラットフォームでのDNAメチル化解析をサポートします。データは直観的な図で表示されます。遺伝子発現データはメチル化プロジェクトと簡単に統合できます（右のプロット）。

InfiniumHDメチル化アッセイで得られるデータは、イルミナの他のアプリケーション（遺伝子発現プロファイリングなど）で得られるデータとの互換性が高いため、遺伝子発現データと HumanMethylation450 BeadChipメチル化データの統合などのクロスアプリケーション解析が可能です。

FFPEサンプルのメチル化解析

FFPEサンプル用に改訂されたプロトコールにより、FFPEサンプルでもHumanMethylation450 BeadChipによるメチル化解析を行うことができます³。簡単に使用できるInfinium FFPE DNA Restorationアッセイ⁴により高い再現性のある結果を得ることができます（表1）。FFPE DNA Restorationアッセイには Infinium HD FFPE QC キットと FFPE DNA Restore キットが必要となります。FFPEサンプルでメチル化解析を行うときは必ずInfinium HD FFPE Methylation Assay プロトコール（マニュアル/自動化）^{5,6}をお使いください。通常プロトコールからFFPE用に重要な改訂がされています。

表1 : HumanMethylation450データ比較
(通常/FFPE対応プロトコール)

通常 プロトコール	FFPE対応 プロトコール
再現性*	$r^2>98\%$
サイト検出数*	>99%

* 非癌細胞からの高品質DNAサンプルをPicoGreen定量をもとにした推奨インプット量、イルミナユーザーガイドに従ったプロトコールで解析時

製品情報

カタログ番号	製品	内容
WG-314-1003	Infinium HumanMethylation450 BeadChip DNA Analysis Kit (24 samples)*	各パッケージには、BeadChip 2枚と、ヒトDNA 24サンプル分のDNAメチル化解析用試薬が含まれます。
WG-314-1001	Infinium HumanMethylation450 BeadChip DNA Analysis Kit (48 samples)*	各パッケージには、BeadChip 4枚と、ヒトDNA 48サンプル分のDNAメチル化解析用試薬が含まれます。
WG-314-1002	Infinium HumanMethylation450 BeadChip DNA Analysis Kit (96 samples)*	各パッケージには、BeadChip 8枚と、ヒトDNA 96サンプル分のDNAメチル化解析用試薬が含まれます。
WG-321-1001	Infinium HD FFPE QC Kit (384 samples)**	FFPEサンプル評価のためのqPCR用のプライマーとコントロールDNAが384サンプル分含まれます。
WG-321-1002	Infinium HD FFPE Restore Kit (24 samples)**	FFPE DNA 修復するための試薬が24サンプル分含まれます。

* それぞれのHumanMethylation450 BeadChipでは、12サンプルの同時処理と1サンプル当たり45万以上のメチル化サイトのアッセイが可能です。
** FFPE サンプル解析時に必要となります。

まとめ

HumanMethylation450 BeadChipは、メチル化の専門家が選択した包括的カバレッジ、高スループット、低価格を実現し、サンプル数が多い大規模なゲノムワイドのDNAメチル化研究を行うための理想的なソリューションです。

参考文献

- Portela A, Esteller M (2010) Epigenetic modifications and human disease. Nat Biotechnology 28: 1057–1068.
- http://www.illumina.com/products/humanht_12_expression_beadchip_kits_v4.ilmn
- Infinium HD FFPE DNA Restoration Protocol
- http://www.illumina.com/products/infinium_ffpe_dna_restoration_solution.ilmn
- Infinium HD FFPE Methylation Assay, Manual Protocol
- Infinium HD FFPE Methylation Assay, Automated Protocol
- Infinium HD FFPE QC Assay Protocol

イルミナ株式会社

〒108-0014
東京都港区芝5-36-7 三田ベルジュビル22階
Tel (03)4578-2800 Fax (03)4578-2810
www.illuminakk.co.jp

代理店



本製品の使用目的は研究に限定されます。

© 2013 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, illuminaDx, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPro, DASL, DesignStudio, Eco, GAIx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, TruSight, VeraCode, the pumpkin orange color, the Genetic Energy streaming bases design is Illumina, Inc の商標または登録商標です。

その他の会社名や商品名は、各社の商標または登録商標です。予告なしに仕様を変更する場合があります。

Pub. No. 270-2010-J001 07DEC11