

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

- ゲノムワイドなカバレッジ、高サンプルスループット、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、PCB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

はじめに

DNAメチル化は、遺伝子発現調節において重要なダイナミッ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。

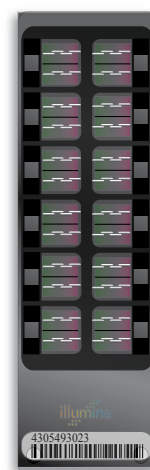
様々なアプリケーションに対応する費用効率の高いDNAメチル化解析を行うために、イルミナは実績あるInfiniumケミストリーとiScanおよびHiScan™ SQシステムによる信頼性の高いメチル化プロファイリングプラットフォームを提供します。HumanMethylation450 BeadChip (図1) はInfinium HDテクノロジーを用いており、専門家が選んだゲノムワイドなカバレッジコンテンツ、高サンプルスループット、低価格の特長を併せもち、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) コホートなどの大きなサンプル集団のスクリーニングに最適です。また、このアッセイは通常サンプルだけでなくホル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と、エピゲノムの詳細な変化を捉えることができます。

包括的でゲノムワイドなカバレッジ

HumanMethylation450 BeadChipは、遺伝子領域とCpGアイランドを包括的にカバーしているだけではなく、メチル化の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エクソン、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

図1 : Infinium HumanMethylation450 BeadChip



Infinium HumanMethylation450 BeadChipには、CpGアイランド内とCpGアイランド外のメチ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。

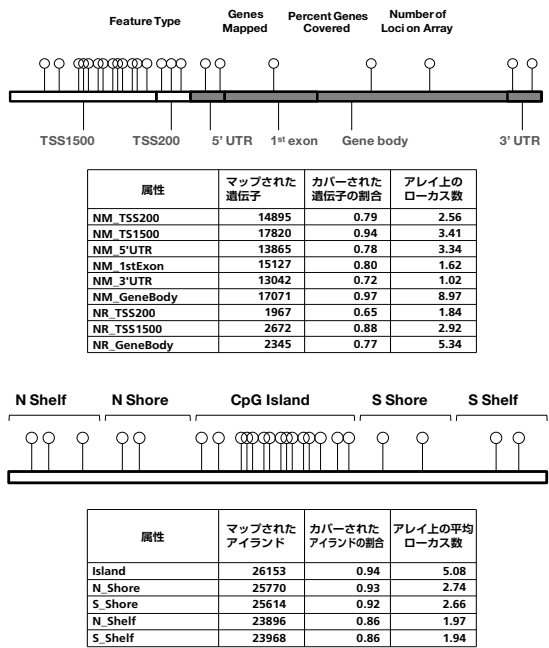
複数サイトをターゲットとするアプローチはCpGアイランドおよびその周辺領域にまで拡大しています。CpGアイランドとアイランドShoreおよびアイランドShoreに隣接する領域（アイランドShelve）に含まれる複数サイトを合わせると、全体では96%のアイランドがカバーされています。遺伝子およびCpGアイランド領域の他にも、メチル化の専門家が選択した追加の高価値コンテンツが搭載されています。

- CpGアイランド以外のCpGサイト
- ヒト幹細胞で同定された非CpGサイトのメチル化領域
- 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Human Methylation27 BeadChipに搭載されているコンテンツの約90%

ワークフロー

HumanMethylation450 BeadChipは、ユーザーフレンドリーでシンプルなワークフローを採用し、PCRを必要としません。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



HumanMethylation450 BeadChipは、遺伝子領域とCpGアイランド／CpGアイランド領域、Shelf、Shoreのメチル化を包括的に捉えます。

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的作用により、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ヌ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可能です。

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取得することができます。

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。

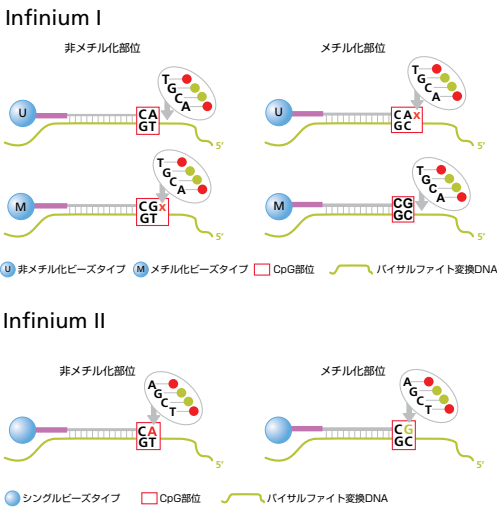
内部品質コントロール

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、強力で見やすいGenomeStudio Methylation Moduleによりサポートされており、差別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。

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、HumanMethylation27 BeadChip (B) および全ゲノムバイサ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。

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。

	通常 プロトコール	FFPE対応 プロトコール
再現性*	r ² >98%	r ² >98%
サイト検出数*	>99%	>95%

* 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

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。

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。

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

〒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

Illumina, illumina*Dx*, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPro, DASL, DesignStudio, Eco, GAllx, 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 は Illumina, Inc. の商標または登録商標です。
 その他会社名や商品名は、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. 370-2010-1001 03DEC11

