

NimbleGen CGH/CNV マイクロアレイ

Discover more variants



疾患の原因となりうるゲノム変異；CNV

染色体の大きな異常が知的障害や発達遅延などの疾患の原因となることは古くから知られています。しかし、疾患の原因となりうる全てのコピー数変異 (copy number variants : CNV)、特に小さな変異を全て検出するのは技術的な問題で制約がありました。しかしながら、技術躍進に伴い今日では、小さな欠失や重複を含む CNV 研究が活発に行われ、新しい発見が次々に報告されています。

なかでも Comparative Genomic Hybridization (CGH) マイクロアレイ技術の発達は目覚ましく、疾患の要因となる小さな染色体変異を同定したという例も多数報告され、実績のある技術として広く認められるようになってきました。マイクロアレイによる CNV の解析は、得られるデータが高解像度であるということに加えて低コストで実施できるという観点から、疾患関連研究に技術的にふさわしい方法であると考えられるようになっており、CGH/CNV アレイを用いた大規模なゲノムワイド関連解析が急速に広まっています。

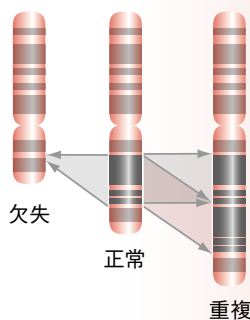
CNV 解析でどれだけ小さな変異を同定できるかは、検出に使用するプローブの数に依存します。Roche NimbleGen のマイクロアレイは1枚のアレイスライド上に最大420万フィーチャーという圧倒的な高密度でプローブを搭載できるプラットフォームであることから、特に優れた CGH/CNV 解析が可能となります。ヒトゲノム全体を420万フィーチャーで解析する製品では、1.4 kb もの小さな CNV を発見する能力があるのです。

NimbleGen CGH/CNV アレイはゲノムワイドに広がる稀な CNV やありふれた CNV を一度に網羅的に検出することで、複合疾患、がん、その他の遺伝性の疾患などの疾患関連研究分野を大きく発展させる重要なツールとなっています。



染色体

正常な細胞機能を制御する素材としての遺伝情報をもつ。染色体の異常は遺伝的な疾患やがんを導くほか、薬剤処理や環境ストレスへの感受性の違いなどの多型に寄与する。



アレイCGH

顕微鏡観察による染色体異常検査に代わるゲノムワイドな染色体異常（欠失、重複、不均衡転座）の解析に使用される。



生命科学研究用です。診断用途には使用しないでください。

Roche NimbleGen の CGH/CNV 解析

一方で、ゲノム研究でのディスカバリというレベルからバリデーションというレベルまでのどんなニーズにも応えられるように、Roche ではゲノム全体を網羅的に解析するアレイの他、エクソンなどの特定の領域に焦点を当てたアレイや、研究者独自の解析対象領域に対してプローブを設計するカスタムアレイを製品ラインナップとして取り揃えています。

また、Roche NimbleGen のマイクロアレイは HD4 プラットフォームの 1×4.2M、3×1.4M フォーマットと、HD2 プラットフォームの 1×2.1M、3×720K、12×135K フォーマット、385K プラットフォームの 1×385K、4×72K という様々なアレイフォーマットをご用意しております。それぞれ、420万、140万、210万、72万、13.5万、38.5万、7.2万フィーチャーを搭載できるアレイスライドです。

■小さな CNV も検出漏れなく

対象研究サンプルからより多くの CNV を発見することにより、鍵となる疾患関連 CNV を同定する成功率が高まります。

■より多くの CNV をより低価格で

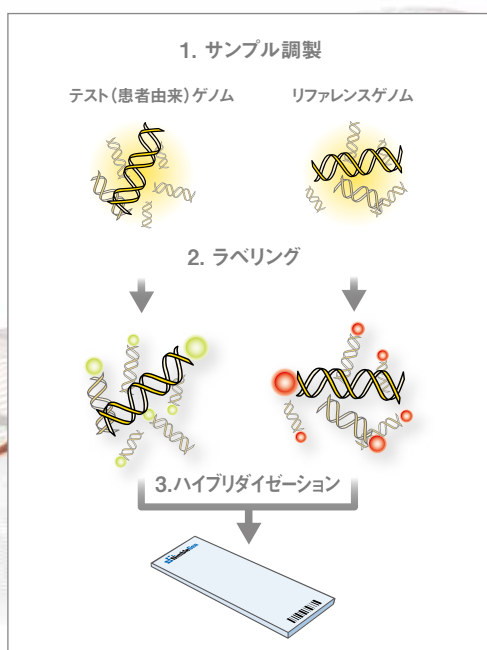
超高密度マルチプレックスアレイの利用で CNV 検出能力を損なうことなくサンプルあたりの解析コストを抑えた高スループット解析が可能です。

■あなたの研究ニーズに対応

12サンプルを一度に解析するアレイから超高密度アレイまで、様々なフォーマットのアレイをご用意しておりますので、研究の必要性に合わせて選択してください。

■最適で効率的な、信頼できる実験ワークフロー

最適化されたプロトコールと機器、自動データ解析ツールを用いた一貫したワークフローで信頼性の高いデータが得られます。

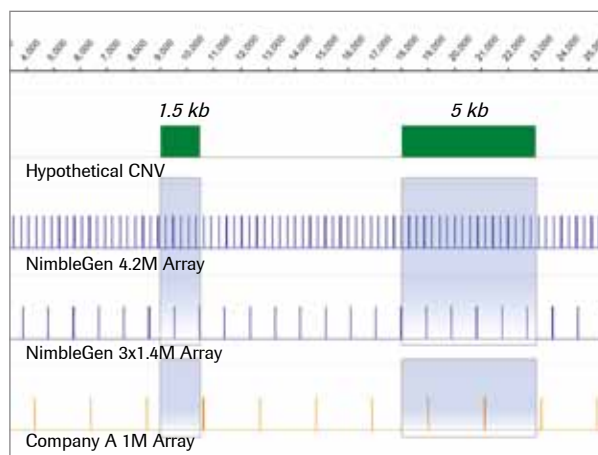


▲図1: Comparative Genomic Hybridization (CGH) 実験プロトコール

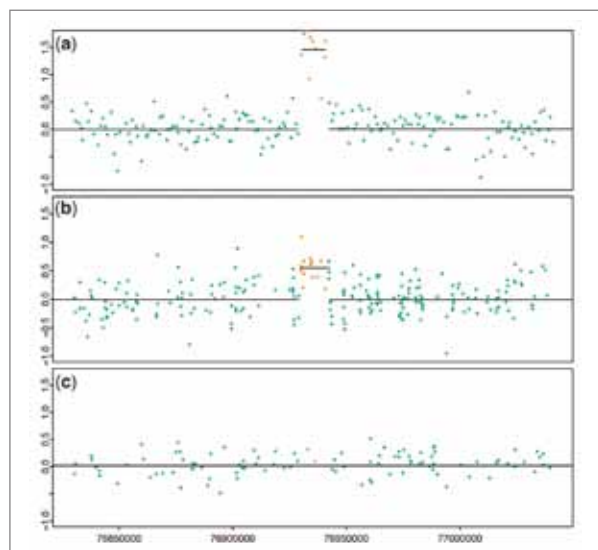
多くの CNV を確実に検出するプラットフォーム

Roche では様々なアレイプラットフォーム / アレイフォーマットで CGH/CNV アレイを提供しています。このうち、HD4プラットフォームアレイは HD2プラットフォームのフィーチャー密度を倍増させた構造の最新の超高密度アレイです。1枚のアレイにより多くのプローブを搭載した高密度アレイでは、ゲノム配列に対してより細かな間隔でプローブを設計できます。図2に示したように、プローブ間隔が狭くなればなるほど、より小さな CNV が検出可能となります。超高密度アレイはかつて無いレベルでの CNV 検出を達成しているのです。

NimbleGen CGH アレイによる CNV 検出が他社のアレイプラットフォームでの解析より優れているというデータが、公平に実施された研究文献で紹介されています (図3)¹。NimbleGen の1×2.1M アレイがより小さな CNV を検出するのに必要な高密度を満たしていると示された一方で、SNP の検出をベースとした技術では SNP 箇所が CNV である場合のみしか検出できないことにより、小さな CNV の検出に限界があることが示唆されています。小さな CNV を模した小さなスパイクインコントロール断片を検出する試験で、この文献での実験に使用した各プラットフォームのなかで高密度アレイである NimbleGen CGH 2.1M アレイが最も優れていることが示されました。



▲図2：プローブ間隔が狭いほど小さな CNV 解析が可能になる
横軸は模式的なゲノム位置を、各トラックの縦棒は個々のプローブを示しています。一段目のトラック(緑)ではそれぞれ1.5 kb、5 kbの CNV イメージを示しています。2段目以下のトラックでは、異なる間隔でプローブが設計されたアレイプラットフォームを示しています。CNV としての判定に5つの連続したプローブでの変動が必要である場合、1.5 kb の CNV は NimbleGen 1x4.2M アレイでのみ検出されます。5 kb の CNV は NimbleGen 1x4.2M と NimbleGen 3x1.4M アレイの両方で検出されます。



▲図3：小さな CNV の検出比較
各社から販売されているアレイプラットフォームで測定された各プローブのシグナル強度ログ比の生データ(M 値)をプローブのゲノム位置データと関連させて表示しました。赤色のドットは CNV として判定された領域内のプローブデータです。(a) NimbleGen 2.1M Array (b) Affymetrix 6.0. (c) Illumina 1M Duo. これらのデータは Oxford University Press の許可を得て掲載しています¹。

¹ Halper-Stromberg, E, *et al.* Performance assessment of copy number microarray platforms using a spike-in experiment. *Bioinformatics*. 2011 Apr 15;27(8):1052-1060.

可能性を見逃さず次のステップへ

1×4.2M アレイは僅か1.4 kb までの小さな CNV を検出できるように設計されていることから、以前の技術では検出できなかったより多くのバリエーションが明らかになると期待できます。実際に NimbleGen Human CGH 4.2M 全ゲノムタイリングアレイを使用した解析で非常に小さな CNV が新たに数多く検出されました。実際のデータの一部を図4に示しましたが、1~3 kb の重複を検出した例を拡大表示しています。この検出解像度は市販されている他のアレイプラットフォームを圧倒しています。

大きなスケールの染色体異常の解析では解明されなかった過去の研究も、小さな CNV、稀な CNV、新規のバリエーションなどの様々なゲノム変異を検出できるツールを用いることで次のブレイクスルーに繋がるかもしれません。

■疾患などとの関連性の発掘

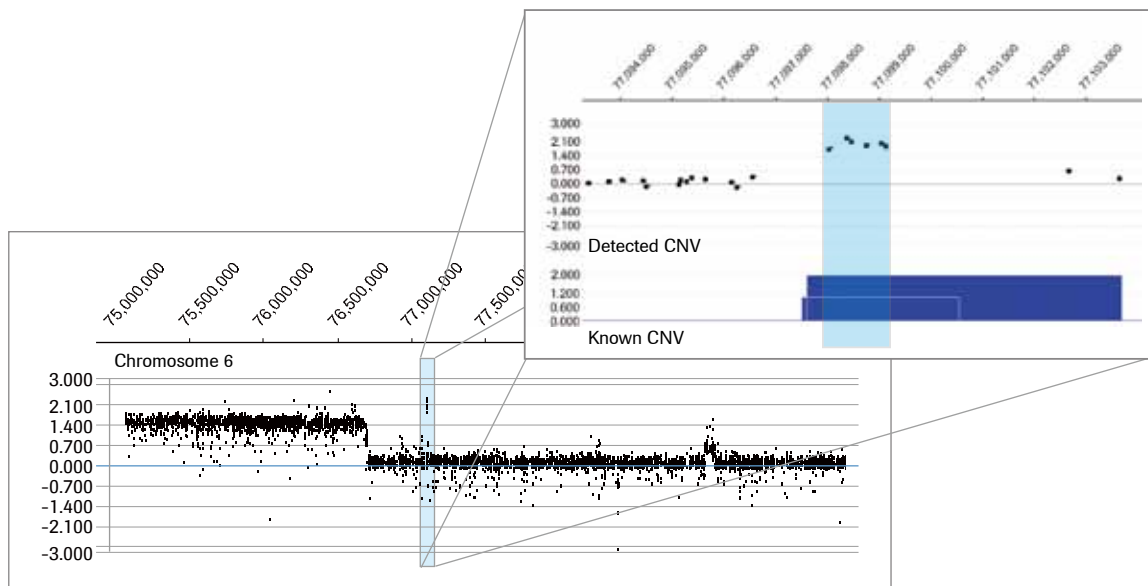
解像度の低いアレイ技術での解析や過去の GWAS では検出することができなかった、より小さな“稀な” CNV を見逃さず、疾患との関連性を発見する可能性が上がります。

■データの信頼性

実験的に最適化されたプローブ、NimbleGen MS200 マイクロアレイスキャナによる2 μ m 画像スキャン、データ QC ツールによるワークフローで、信頼性の高い実験データが得られます。

■次のブレイクスルーへ

新しい CNV 情報で研究は次のステージに。



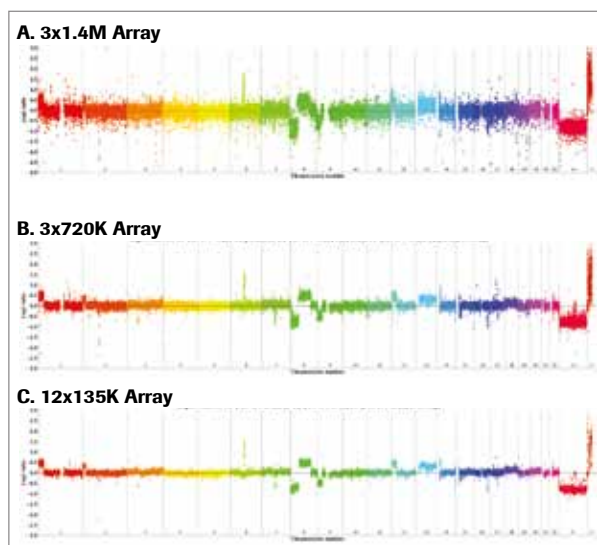
▲図4：微細重複の検出

パーキッリン腫研究サンプルと Promega 社から提供されている健常なヒトプールゲノム DNA を NimbleGen Human CGH 4.2M 全ゲノムタイリングアレイで比較した実験で、6番染色体上に3 kb 未満のコピー数重複箇所をはっきりと検出しています。

マルチプレックスアレイの能力

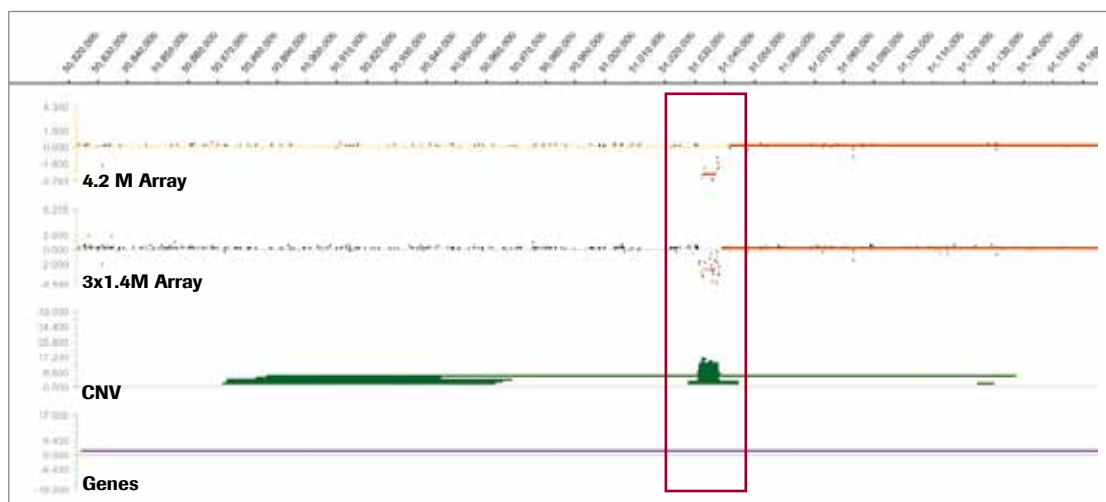
Roche では1枚のスライド上に複数のサブアレイを配したマルチプレックスアレイも提供しています。マルチプレックスアレイは複数の検体の解析を1枚のスライドで実施することができ、3×1.4M、3×720K、12×135K アレイはそれぞれ、3、3、12の独立したデータを同時に取得することが可能です。高解像度でありながら解析スループットとコスト効率を高めたこれらのアレイを利用すると、メンデル型疾患、知的障害、自閉症、統合失調症、がん、自己免疫疾患などの広範囲のヒト疾患の研究でのゲノムワイドな CNV のバリデーションやスクリーニング研究を効率よく進めることができます。

図5では、同一のがんサンプル由来のゲノム DNA を異なるマルチプレックスアレイで解析した結果を相互に比較しています。図6では3×1.4M アレイと1×4.2M アレイでの解析結果を比較しています。図6の結果をみると、3×1.4M アレイでも1×4.2M アレイに匹敵するほどの高解像度な CNV 検出が可能であることが示唆されています。



▲図5：NimbleGen の3種のマルチプレックスアレイでの染色体異常検出の比較

NimbleGen Human CGH 3x1.4M、3x720K、12x135K 全ゲノムタイリングアレイを用いてパーキットリンパ腫由来のゲノム DNA の解析を行いました。この実験ではリファレンスゲノムとして性別を一致させない DNA プールを用いています。コピー数解析は segMNT アルゴリズムを用いて実施し、ゲノム全体の染色体異常を各染色体ごとに色分けしてプロットしています。



▲図6：4.2M と3x1.4M アレイでの解析による8番染色体上の CNV 検出の比較

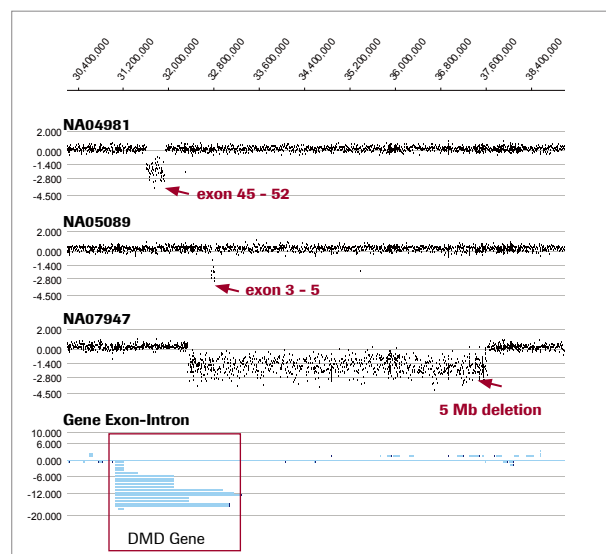
約5 kb の CNV 領域 (赤線四角範囲内) が両アレイフォーマットで検出されています。この実験では HapMap サンプルの NA15510 (健康女性) と NA10851 (健康男性) を比較しています。

標的を絞ったアレイで詳細な位置情報を

エクソンは遺伝子の構成要素ですが、エクソン単位でサイズの異なる CNV が遺伝子に障害を引き起こし、様々な疾患の要因となる場合があることが最近の研究で示唆されています。Roche ではエクソンに焦点を当てたタイプの全ゲノムアレイエクソンフォーカスアレイをカタログアレイとしてご用意しています。このアレイはエクソン内に高密度でプローブを設計（平均65 bp 間隔）しているのに加えて、その外の領域にもやや広い間隔でプローブを配置することで、ゲノム全体を平均7,291 bp のプローブ間隔で解析するようにデザインされた3×720K フォーマットのアレイです。

エクソンフォーカスアレイを使用して研究を行った研究者は、“高解像度の CGH マイクロアレイベースのアプローチでジストロフィン遺伝子の欠失と重複の両方を正確に検出することが可能”²と結論付けています。この研究ではそれ以前の研究では同定できていなかった疾患関連 CNV とジストロフィン遺伝子の関係を述べています。

エクソンフォーカスアレイを用いた弊社での実験で（図7）、3つの異なる検体でエクソンレベルでの欠失がジストロフィン遺伝子（DMD）上のそれぞれ別々の位置に明確に検出されました。特に図7の3段目のトラックは（NA07947）、慢性肉芽腫性疾患、網膜色素変性症、知的障害を含むような複雑な表現型を持つデュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者のデータです。この検体の以前の分子生物学的な解析では、DMD 遺伝子の5' 末端の外側から少なくともエクソン19までが欠失し、少なくともエクソン44については欠失していないことが同定されていましたが、エクソンフォーカスアレイを用いた高解像度解析で、この欠失領域はエクソン30までであることが明らかとなりました（データは示されていませんが、10回の再現性データで同一の結果が得られています）。



▲ 図7：NimbleGen Human CGH 3x720K 全ゲノムエクソンフォーカスアレイを用いたデュシェンヌ型とベッカー型の筋ジストロフィー検体でのDMD 遺伝子領域の欠失の検出

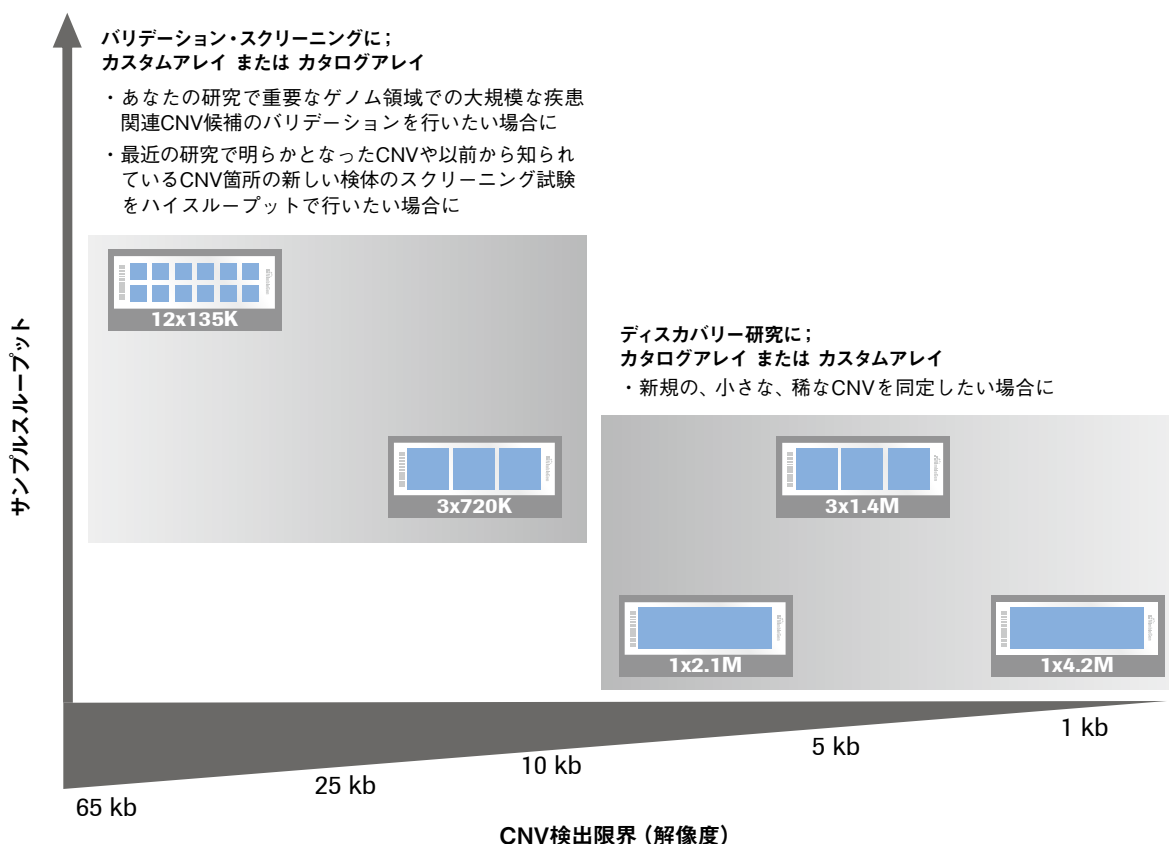
ゲノム上のアノテーション情報トラック（エクソン-イントロン情報）は最下段のトラックに示し、赤線四角内のDMD 遺伝子はリバース鎖（右側から左側向き）にコードされています。個々の患者検体は性別を合わせた健常者のゲノム DNA プールに対して比較解析を行いました。NA04981ではエクソン45～52を含む領域（～305 kb）、NA05089ではエクソン3～5を含む領域（～54 kb）、NA07947ではDMD 遺伝子の5' 末端の外側からエクソン30に渡る～5 Mb の欠失が検出されています。

² Hegde MR, et al. Microarray-based mutation detection in the dystrophin gene. *Hum Mutat.* 2008 Sep;29(9):1091-9.

研究に合わせてアレイを選択： カタログアレイ／カスタムアレイ

あなたの研究の目的と実験の進め方によって、最適なアレイデザインは異なります。Roche では超高密度の CGH/CNV カタログアレイから、ご要望に合わせて設計・製造するカスタムアレイまでをご用意していますので、ぴったりのアレイを簡単に選択していただけます。カタログアレイには様々なアレイフォーマットで設計された全ゲノムタイリングアレイやエクソンフォーカスアレイなどがございます。

全ゲノムレベルで詳細な CNV 検出をする必要がある場合には、1×4.1M、3×1.4M、1×2.1M の全ゲノムタイリングアレイをご利用ください。バリデーション研究のためには、マルチプレックスアレイの利用が便利です。特にこの場合にはカスタムアレイを使用するという選択も非常に有効です。もちろん、ディスカバリー研究においてもカスタムアレイをご利用いただくことが可能です。カスタムアレイは弊社独自のマスクレスアレイ合成技術により低コストで簡単に利用することができます。



CGH/CNV 解析関連製品

Roche は NimbleGen DNA マイクロアレイのための最適化された統合ワークフローを提供しています。このワークフローでは、マイクロアレイのほか、専用の試薬、機器、解析ソフトウェアを利用します。

CGH/CNV マイクロアレイ

	D 製品番号 マイクロアレイ販売	S 製品番号 受託サービス	データソース	プローブ間隔
全ゲノムタイリングアレイ				
Human CGH 4.2M Whole-Genome Tiling Array	5 862 892	—	HG19	284 bp
Human CGH 3x1.4M Whole-Genome Tiling Array	5 862 906	—	HG19	941 bp
Human CGH 12x135K Whole-Genome Tiling v3.0 Array	5 520 878	5 520 886	HG18	12,524 bp
Human CNV 2.1M Whole-Genome Tiling v1.0 Array	5 913 152	5 913 195	HG18	1,239 bp
Human CNV 3x720K Whole-Genome Tiling v1.0 Array	5 913 209	5 913 233	HG18	4,750 bp
Human CGH 3x720K Whole-Genome Exon-Focused Array	5 542 073	5 544 122	HG18	Variable

カスタムアレイ	D 製品番号 マイクロアレイ販売	S 製品番号 受託サービス	データソース	プローブ間隔
Custom CGH 4.2M Array	5 862 914	—	ご指定ください	ターゲット領域サイズに依存/ご指定の間隔
Custom CGH 3x1.4M Array	5 862 922	—	ご指定ください	ターゲット領域サイズに依存/ご指定の間隔
Custom CGH 2.1M Array	5 223 873	5 223 911	ご指定ください	ターゲット領域サイズに依存/ご指定の間隔
Custom CGH 3x720K Array	5 355 184	5 355 290	ご指定ください	ターゲット領域サイズに依存/ご指定の間隔
Custom CGH 12x135K Array	5 223 881	5 223 920	ご指定ください	ターゲット領域サイズに依存/ご指定の間隔

D = ご自身で実験していただくためのマイクロアレイ販売時の製品番号

S = 受託サービス利用時の製品番号

マイクロアレイプロセッシングアクセサリ

試薬	製品番号	機器	製品番号
NimbleGen Labeling and Hybridization Control Kit	5 993 776	NimbleGen Hybridization System 4 (110V)	5 223 652
NimbleGen Dual-Color DNA Labeling Kit 192 Reactions	6 370 381	NimbleGen MS 200 Microarray Scanner	5 394 341
NimbleGen Dual-Color DNA Labeling Kit 48 Reactions	6 370 250		
NimbleGen Hybridization Kit	5 583 683	ソフトウェア	ダウンロード
NimbleGen Hybridization Kit, LS	5 583 934	DEVA Software	available for download at www.nimblegen.com/DEVA
NimbleGen Wash Buffer Kit	5 584 507		
NimbleGen Array Processing Accessories	5 223 539		
NimbleGen Sample Tracking Control Kit	5 223 512		

ご不明な点等ございましたら、tokyo.as-support@roche.com までお問い合わせください。

最適化された CGH/CNV 解析ワークフロー



NimbleGen CGH/CNV マイクロアレイ

🕒 カタログアレイ、またはカスタムアレイを注文

NimbleGen CGH アレイには次のカテゴリのアレイがあります。

- 全ゲノムタイリングアレイ：ヒトゲノムの全体にわたる検査を行うためのアレイ
- ターゲットアレイ：エクソンフォーカスアレイなどのように、特定の領域に焦点を当てたアレイ
- カスタムアレイ：研究の必要性に合わせて設計をご依頼いただけるアレイ。1枚からご注文可能

サンプル調製と標識

🕒 所要時間：5時間
(作業時間は2~3時間)

断片化されていないゲノム DNA サンプルを NimbleGen Dual-Color DNA Labeling Kit を用いて標識します。その際、データ品質確認のために NimbleGen Sample Tracking Control Kit、NimbleGen Labeling and Hybridization Control (LHC) Kit も同時に使用します。

- 機能的に検証されたキット構成試薬により、最大の精度を達成するために必要な一貫した収量、効率の標識産物を調製可能
- 全てのアレイにワークフローの成功を確認するための LHC ポジティブコントロールプローブを、マルチプレックスアレイにはサンプル間のコンタミネーションを確認するためのプローブを搭載

ハイブリダイゼーション

🕒 所要時間：40時間^{注)}
(作業時間は2時間未満)

信頼性が高く再現性のあるデータを得るために、NimbleGen ハイブリダイゼーションシステムでハイブリダイゼーションを行います。堅実なハイブリダイゼーションにより実験に集中することができます。

- アクティブミキシングによりアレイ全体の均一なハイブリダイゼーションを促進
- 実験のスループットの必要性に応じて変更できる拡張性のあるシステム

注) 3x720K、12x135K アレイ：40~72時間
1x2.1M、1x4.2M、3x1.4M アレイ：60~72時間



洗浄・乾燥

🕒 所要時間：30～50分間
(作業時間は20～30分)

NimbleGen Wash Buffer Kit とプロセッシングアクセサリによる簡単な操作です。

- NimbleGen アレイの洗浄に最適化されたバッファーで効率的な洗浄
- ユーザーズガイドで操作方法を指示

スキャンニング

🕒 所要時間：2 μm の分解能でスキャンニングを行った場合、スライド1枚あたり20分
(作業時間5～20分)

NimbleGen MS 200 マイクロアレイスキャナーを使って高分解能でスキャンします。

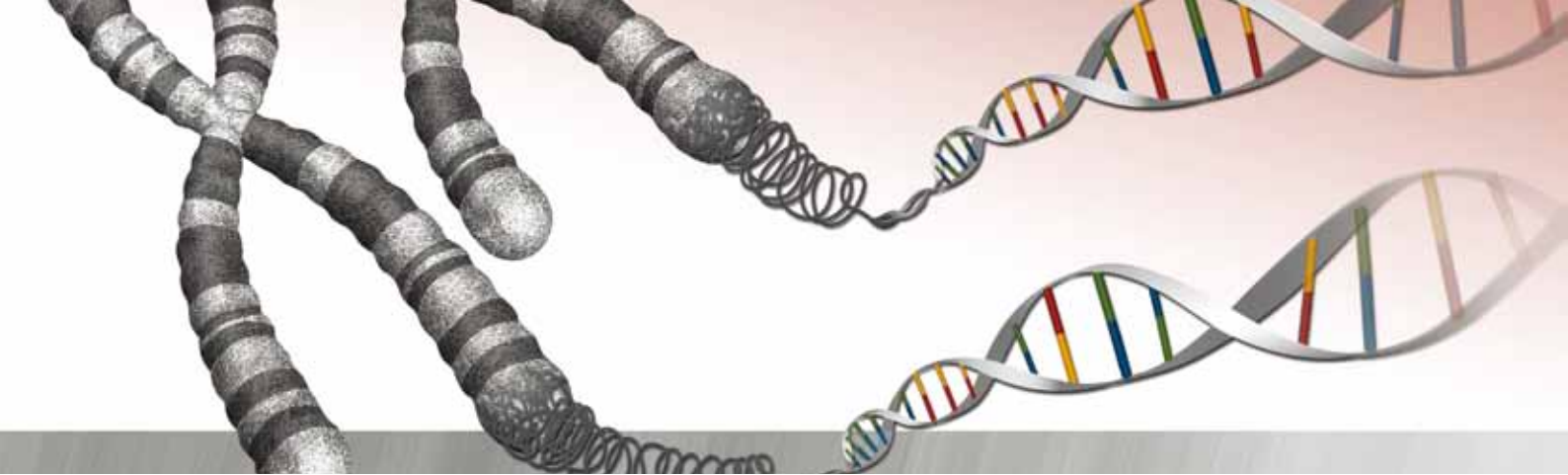
- オートローダーを用いたシステムにより最大処理能力は48スライド、12×135 K アレイなら最大576サンプル分のデータを一度にスキャンニング
- 内蔵式のオゾン軽減システムにより、蛍光シグナルの減衰を軽減
- 進歩したオートフォーカスとオートゲインにより、一貫した最善の結果を提供

データ解析

🕒 所要時間：1サンプルあたり20～60分
(解析用ワークフローの設定に5分未満)

DEVA ソフトウェアは蛍光シグナルデータの抽出から解析結果を視覚化するためのソフトウェアです。

- NimbleGen MS 200マイクロアレイスキャナーと連動した自動画像処理と、NimbleGen ワークフローを適用した自動データ作成
- ハイブリダイゼーションデータの品質管理のためのレポート作成機能



生命科学研究用です。診断用途には使用しないでください。

NimbleGen and DEVA are trademarks of Roche.

All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

© 2010 Roche Diagnostics GmbH All rights reserved.



お問い合わせは…

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

AS事業部 (研究用試薬・機器)

本社：〒105-0014 東京都港区芝2丁目6番1号

TEL.03-5443-5287 FAX.03-5443-7098

E-Mail: tokyo.as-support@roche.com

U R L : <http://www.roche-biochem.jp>