

HumanMethylation450 の再現性



株式会社理研ジェネシス

2012年12月10日

目次

1	概要.....	3
2	方法.....	3
3	結果.....	3
3.1	同一検体を 2 回タイピングした時の再現性	3
3.2	バイサルファイト処理前ゲノム濃度を 3 通りに希釈した時の再現性	4
3.3	バイサルファイト処理前ゲノムに熱変性をかけた時の再現性の経時変化	5
4	まとめ	6

1 概要

本資料は、イルミナ社製 HumanMethylation450 BeadChip を使用した全ゲノム網羅的 DNA メチル化レベル測定の再現性についての検証結果を記すものです。

2 方法

以下の 3 つの観点で DNA メチル化レベルの再現性を確認しました。

- (1) 同一検体を 2 回タイピング
- (2) バイサルファイト処理前ゲノム濃度を 3 通りに希釈
- (3) バイサルファイト処理前ゲノムに熱変性をかけた場合の経時変化

- 使用したサンプル

- 0013A 血液由来 DNA(自社検体)

- 実験手法

Platform	illumina HumanMethylation450v1 BeadChip
Bisulfite conversion kit	Zymo Research EZ DNA Methylation Kit

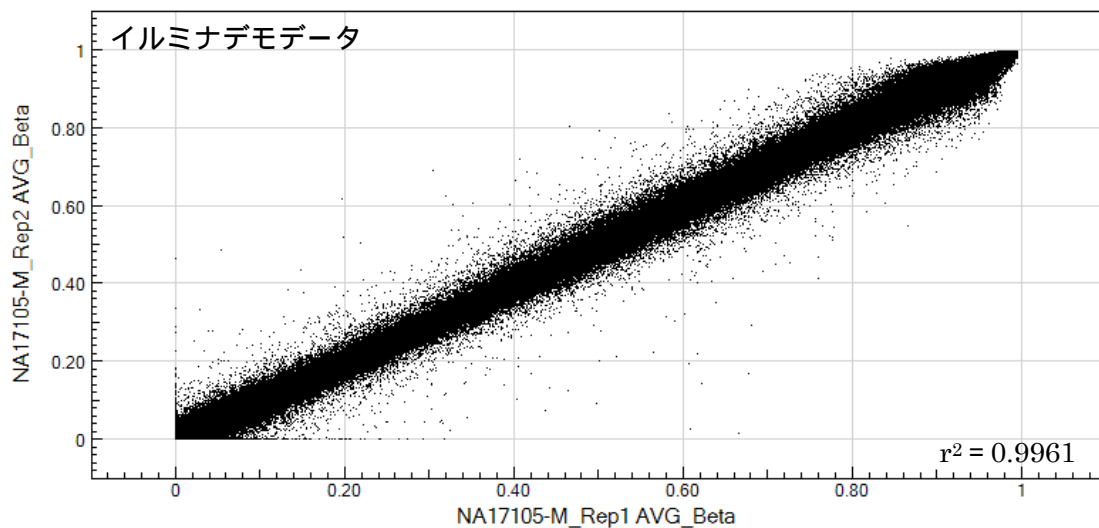
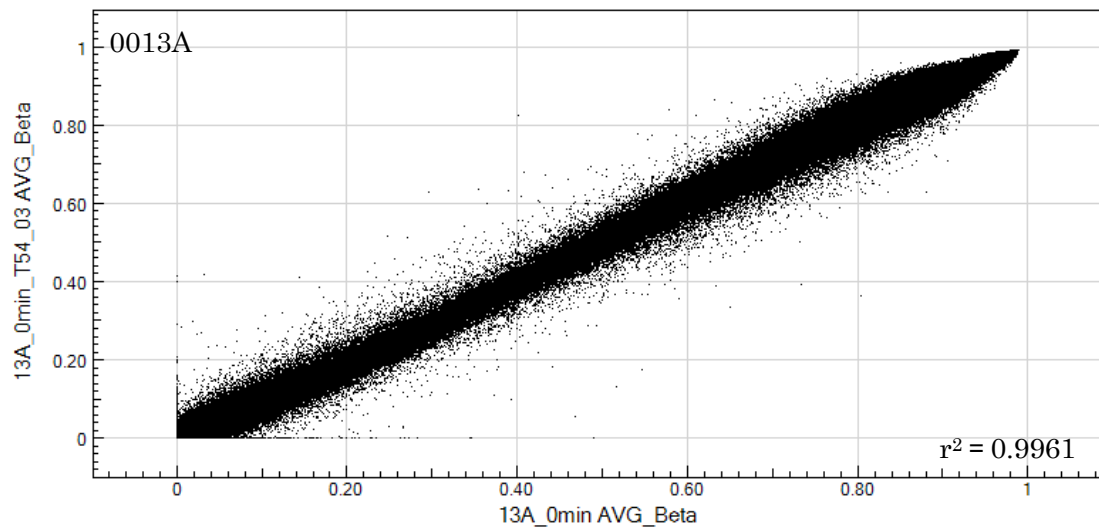
- データ解析手法

Software	GenomeStudio V2011.1 (Methylation Module 1.9.0)
Manifest revision	v.1.2
Normalization	controls
Subtract Background	enable

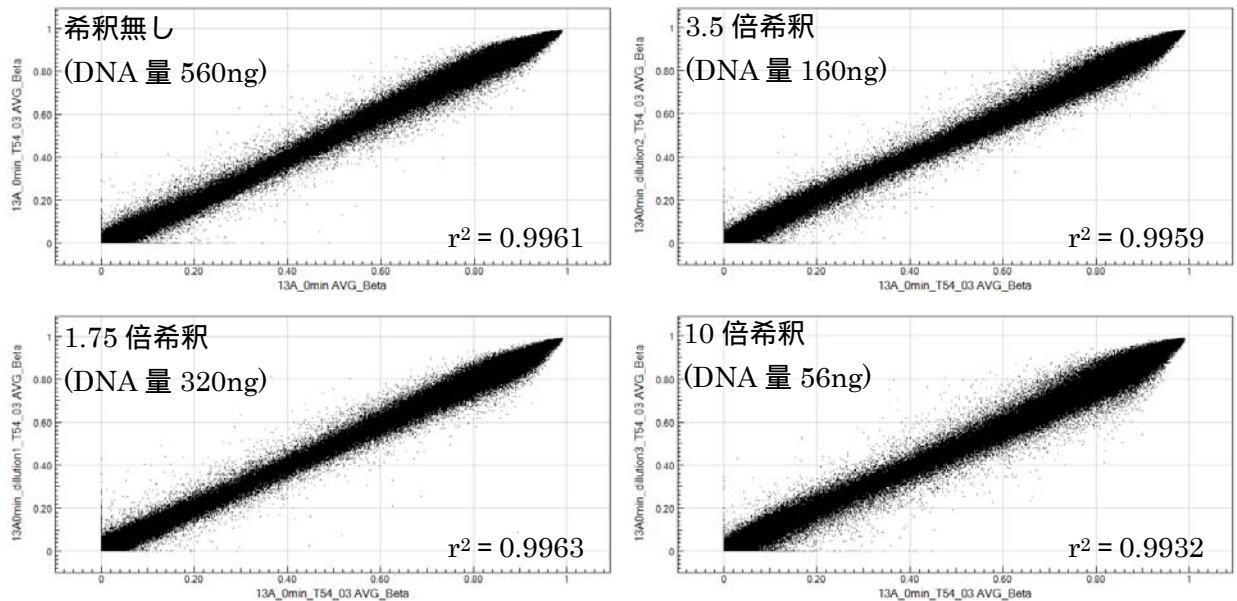
3 結果

3.1 同一検体を 2 回タイピングした時の再現性

同一検体を異なる BeadChip でタイピングした時の、DNA メチル化レベルの再現性を確認しました。比較対象としてイルミナ社の HumanMethylation450 デモデータの中から、最も再現性の高いサンプル(NA17105-M)の結果も併せて掲載しています。HumanMethylation450 の製品仕様としては、再現性： $r^2 > 0.98$ であるため、製品仕様を大幅にクリアする良好な結果が得られています。

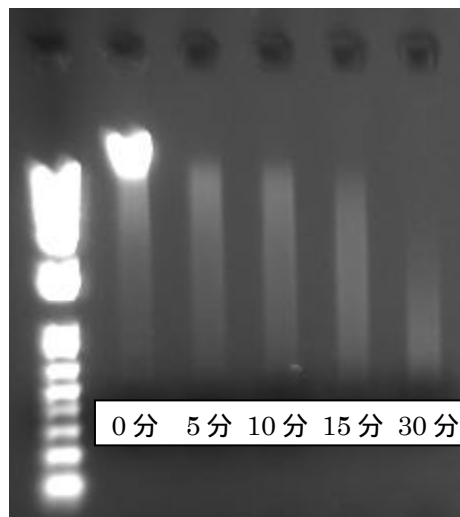


- 3.2 バイサルファイト処理前ゲノム濃度を 3 通りに希釈した時の再現性
 バイサルファイト処理前ゲノム濃度を 1.75 倍・3.5 倍・10 倍の 3 通りに希釈した時の、DNA メチル化レベルの再現性を確認しました（希釈無しで 70ng/μl）。横軸が希釈無しの DNA メチル化レベルで、縦軸が希釈時の DNA メチル化レベルです。
 10 倍希釈では僅かに再現性の低下が見られますが、3.5 倍希釈までは殆ど再現性に影響が無い事が分かります。3.5 倍希釈時の DNA 量 160ng は、Zymo Research EZ DNA Methylation Kit の Input DNA 量推奨値の下限 200ng を下回っており、許容範囲が広い測定手法である事が伺えます。

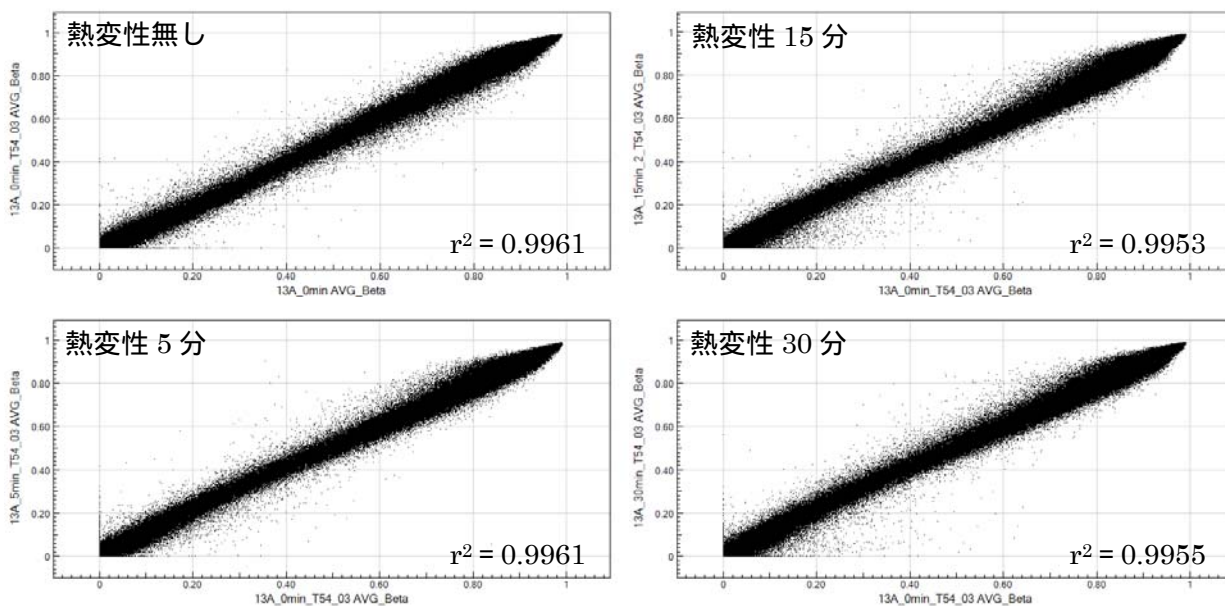


- 3.3 バイサルファイト処理前ゲノムに熱変性をかけた時の再現性の経時変化
状態の悪いゲノムをタイピングした際の影響を確認するために、95 で 5 分～
30 分の熱変性をかけた時の、DNA メチル化レベルの再現性を確認しました。

電気泳動結果では 5 分の熱変性でゲノム状態が悪化しており、30 分の熱変性ではゲノム不良と判断して差し支えないレベルに達しています。



その一方で DNA メチル化レベルの再現性は、30 分の熱変性でもあまり低下していません(横軸が熱変性無しの DNA メチル化レベルで、縦軸が熱変性時の DNA メチル化レベルです)。ゲノム状態に左右されにくい測定手法である事が伺えます。



4 まとめ

上記検証結果より、イルミナ社製 HumanMethylation450 BeadChip と Zymo Research EZ DNA Methylation Kit の組み合わせは、ゲノム状態やゲノム濃度に左右されにくく、再現性の高い DNA メチル化レベル測定を行える手法であると言えます。

以上