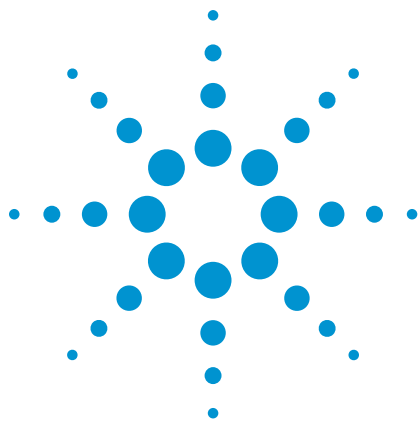




単一細胞を用いた 高解像度オリゴ aCGH 解析を 24 時間で

アプリケーションノート

著者

Paula Costa and Anniek De Witte
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA USA

要旨

細胞ごとに異型のゲノム構造をとることがあり、個々の細胞のゲノムをマイクロアレイで解析できると、がんや生殖の研究を大きく促進できます。Agilent SurePrint G3 Human Catalog 8x60K CGH マイクロアレイは高解像度、高感度ながら費用効果が高く、ゲノムの量的不均衡の検出に力を発揮します。我々は 8x60K マイクロアレイを使って単一細胞に対してオリゴヌクレオチドベースのアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション (aCGH) を行う条件を実験に基づいて最適化しました。参照サンプルやハイブリダイゼーションの長さを含む様々な実験条件を検討しています。単一細胞レベルに希釈した既知の構造異常を含むゲノム DNA (gDNA) と胚から単離した単一細胞に対して全ゲノム増幅 (WGA) を行いました。最適化された 24 時間ワークフローにより、9 番染色体にある既知のコピー数 (CN) 過剰があるサンプルと単一細胞から増幅した個々のゲノムでゲノム構造異常が正確に特定されました。



Agilent Technologies

はじめに

aCGH は、その開発以降、医学研究を変革してきました。この高解像度かつ高感度である技術は、先天的および後天的疾患におけるゲノムの変化の詳細な研究に応用され、成功してきました。しかし、個々の細胞のゲノムの背景が異なることがあるので、個々のゲノム背景を決定できることが重要です。単一細胞におけるゲノム異常の評価はがん、幹細胞と生殖研究、および法医学における新たな水平線を開きました。伝統的な FISH や PCR ベースの技術がこの目的に使用されてきましたが、同時に検出できる場所の数が制限されていることからその利用は限られていました^{1,2}。近年、BAC アレイが使われてきましたが、数千のプローブしか含まれていないため解像度が低く、さらに、バッチ間で性能がばらつく傾向があります。いくつかのグループが Agilent のカスタムアレイまたは以前作成された HD オリゴベースの aCGH マイクロアレイの単一細胞解析への利用に成功しています^{3,4,5,6}。このアプリケーションノートでは、SurePrint G3 Human Catalog 8x60K CGH マイクロアレイの力を使って単一細胞を解析し、個々のゲノムにおけるゲノム全体の CN 変化の評価を行いました。

実験

サンプル

9 番染色体短腕に既知の異常がある細胞株 NA03226 の gDNA は Coriell Cell Repository⁷ から入手しました。単一細胞のシミュレーションのために、15 pg の gDNA を使って単一細胞に相当するゲノム情報を確保しました。真の個々のゲノムの CN を評価するために、単一細胞を胚から針生検で単離しました。参照 gDNA は Agilent Human Reference DNA Male を単一細胞レベルまで希釈して調製しました。コントロールとして、Coriell の異常細胞株と Agilent Human Reference DNA (male と female) の gDNA 500 ng を使用しました。

全ゲノム増幅

WGA は PicoPlex Single Cell WGA Kit (Rubicon Genomics, p/n R30050) を使って行いました。参照ゲノムの過度の希釈と、増幅過程に固有のもの、両方に由来する変動を最小限にするため、複数の参照ゲノム反応液を増幅後に混ぜ合わせました。WGA の後、全てのサンプルを電気泳動し、コンタミネーションが無い事と反応効率を確かめました (図 1)。

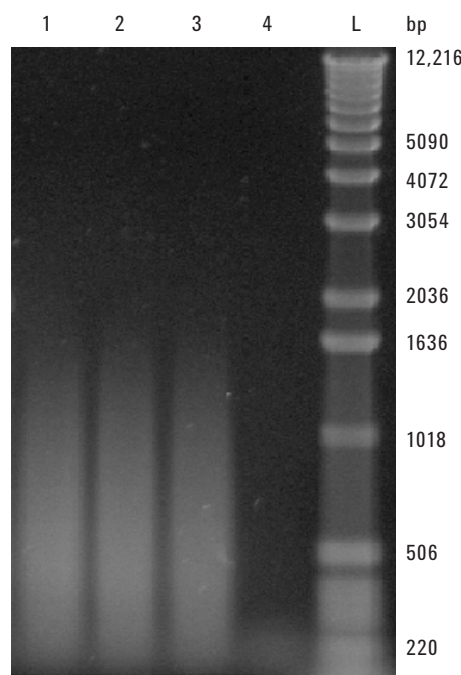


図 1. 電気泳動像。(1) 30 pg の参照 DNA、(2) 単一細胞レベルまで希釈された細胞株 NA03226 のゲノム DNA、(3) 単一細胞、(4) 鋳型を含まないコントロール、の増幅産物。(L) 1 Kb DNA Ladder

マイクロアレイ

実験サンプルと参照サンプルのそれぞれについて、Agilent SureTag Complete DNA Labeling Kit (p/n 5190-4240) に含まれる Exo-Klenow fragment を使い、Cy5 または Cy3 で蛍光標識された塩基で、増幅 DNA 13 µL を別々にラベル化しました。実験サンプルを適切な参照と混ぜ合わせ、ゲノム全体のバックボーンには均一に、遺伝子領域にはより高密度にプローブを配置した SurePrint G3 Human Catalog 8x60K CGH マイクロアレイ (表 1) にハイブリダイズしました。スキャンしたスライド画像から Agilent CytoGenomics ソフトウェア内蔵の Feature Extraction プログラムを使って数値化データを取得しました。コピー数 (CN) 変化は実験および参照サンプルの log 比をもとに、解析ソフト内蔵のコピー数変化領域検出アルゴリズムとデフォルトのフィルターにより検出しました。CN の表示では、各サンプルに 5 Mb のウィンドウに設定した moving average を適用しました。

結果と考察

プロトコルの最適化

単一細胞 aCGH のための適切な参照サンプルを決めるために、個々の増幅反応を行ったものと、15 または 30 pg のサンプルからの複数の増幅反応液のプールを比較しました。サンプルを単一細胞レベルへ希釈したために生じた増幅の変動により、15 pg の gDNA から個々に増幅した参照サンプルとハイブリダイズさせたもので最も高いレベルの probe-to-probe ノイズ (隣り合うプローブデータ間のばらつき) が測定されました。15 pg または 30 pg の DNA からの 8 つの増幅反応をプールした参照サンプルを使用するとノイズと CN 検出が改善されました (表 2)。

ハイブリダイゼーションの時間を短くしたときの CN 検出への影響を調べるため、1 セットのサンプルを 16 時間または 24 時間インキュベートしました。両方のハイブリダイゼーション時間のデータは同程度でした。(データは省略します)

最適化されたプロトコルは Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Single Cell Analysis – Enzymatic Labeling manual (p/n G4410-90012) に含まれます。

表 1. SurePrint G3 Human Catalog 8x60K CGH マイクロアレイ仕様

Microarray specifications	
Design ID	21924
Total features	62,976
Control grid feature count	3,886
Distinct biological features	55,077
Replicated probes (5x)	1,000
Additional negative controls	13
Unique probes	54,969 (99.8 %)
Homology filtered probes	149 (0.27 %)
Pseudoautosomal probes	108
Exonic probes	14,259 (25.9 %)
Intragenic probes	36,995 (67.2 %)
Intergenic probes	18,082 (32.8 %)
Median probe spacing	
Intragenic	33,307
Intergenic	78,946
CNV	26,688
Overall	41,448
Average probe spacing overall	54,455
RefSeq gene coverage	
At least 1 probe	15,553 (83.2 %)
≥ 3 probes	4,580 (24.5 %)
Cancer gene coverage	
At least 1 probe	351 (97.0 %)
≥ 3 probes	226 (62.4 %)

表 2. プールした参照サンプルとハイブリダイズした単一細胞のマイクロアレイのデータでは、個々の増幅参照サンプルを用いた場合と比べて、probe-to-probe ノイズ、すなわち derivative log ratio spread (DLRS) が減少しました。

Single cell versus	DLRS	Signal intensity		Background noise		Signal-to-noise	
		Green	Red	Green	Red	Green	Red
Individual ref	1.66	224	413	7	9	32	44
Eight pooled ref 15 pg	0.78	318	366	7	10	43	37
Eight pooled ref 30 pg	0.78	324	373	6	8	53	48

希釈した gDNA と

単一細胞の CN プロファイリング

細胞株 NA03226 から増幅した DNA において、予測された 9 番染色体短腕における CN 過剰はこのアッセイで検出されました (図 2A)。単一細胞では、性染色体のプロファイルはサンプルと male 参

照サンプルの log 比で算出しました。図 2B では、X 染色体のプロファイルは、この細胞が女性のものであることを示しています。

増幅した単一細胞のゲノム全体で、さらに他の部分的および全染色体構造異常が検出されました。

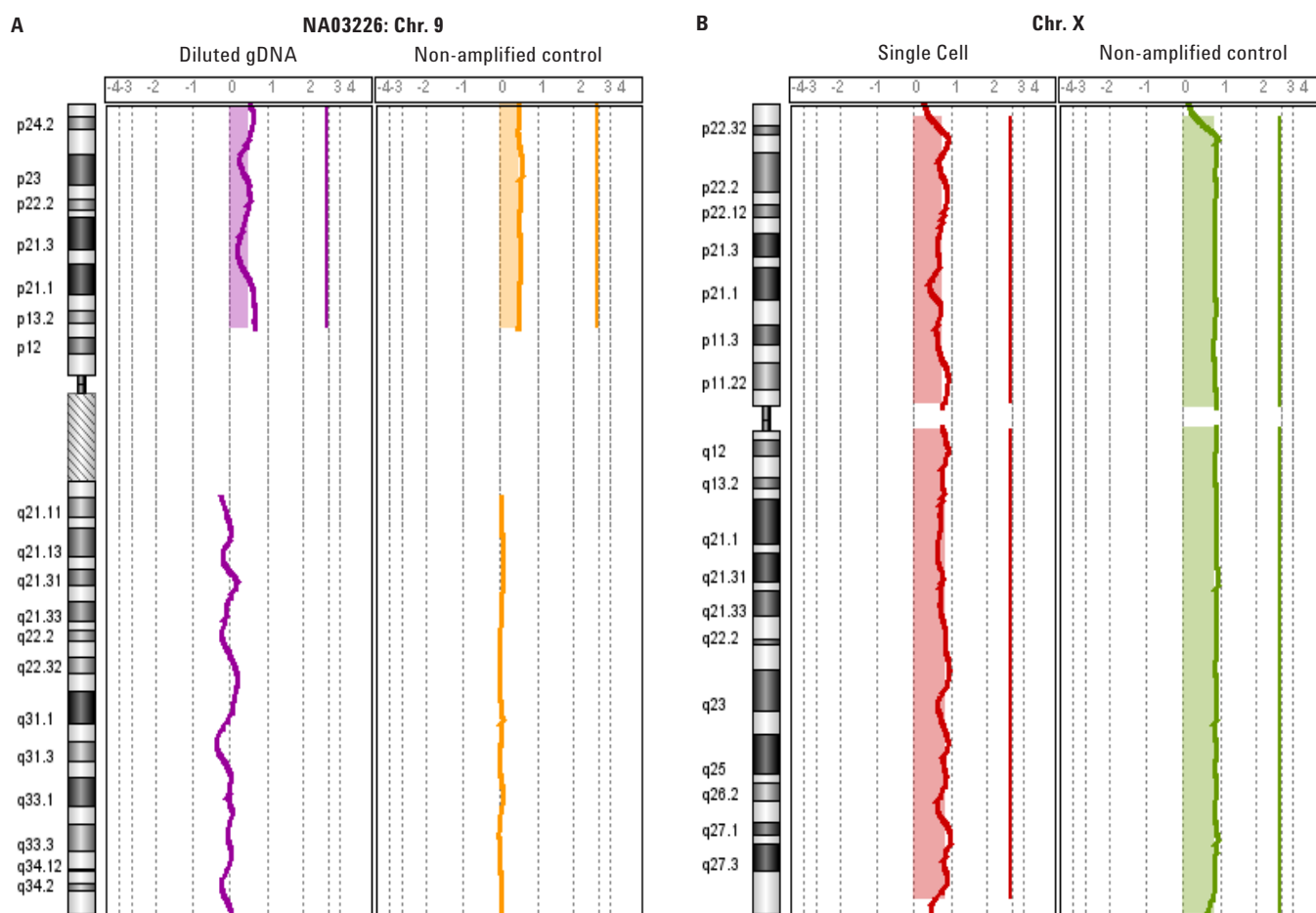


図 2. SurePrint G3 8x60K CGH マイクロアレイに 16 時間ハイブリダイズさせたサンプルで同定された CN 変化。

(A) 細胞株 NA03226 の gDNA から増幅した DNA (左) と増幅していないコントロール gDNA (右) の 9 番染色体における予測された CN 過剰の検出。

(B) コントロール male 参照サンプルとハイブリダイズした、単一細胞 (左) と増幅していないコントロール female サンプル (右) の X 染色体プロファイルからの性別判定。もう 1 つの X 染色体があるので、この単一細胞は女性のものであることがわかります。

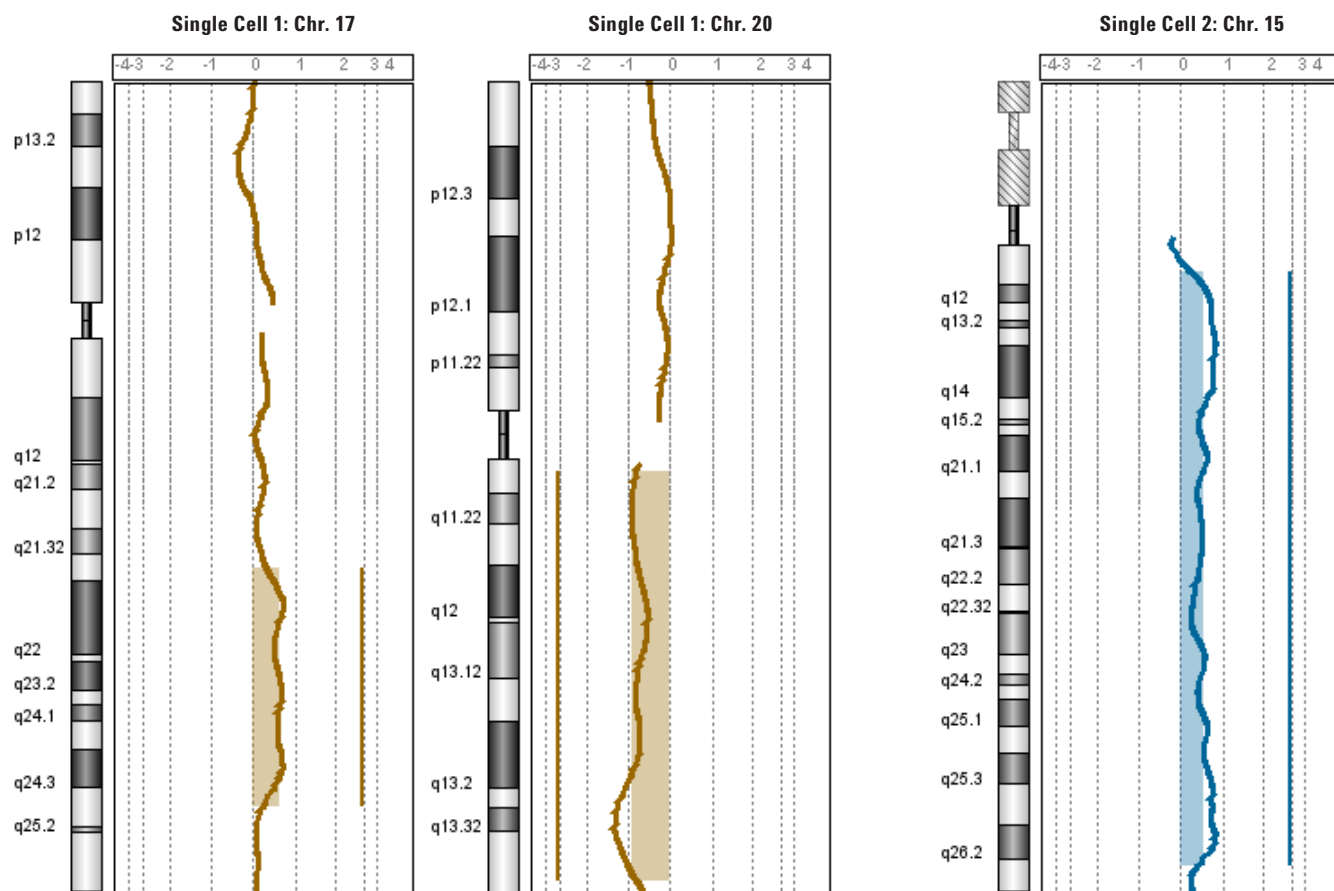


図 3. 単一細胞ゲノムで同定された部分および全染色体構造異常

結論

明瞭でシンプルな手順 (図 4) で、単一細胞のゲノム全域の CN 変化をオリゴベースの aCGH でプロファイルすることができます。単離した単一細胞と参照 DNA から、24 時間程度で解析まで行うこと

ができます。高解像度、高い再現性、および SurePrint G3 8x60K CGH マイクロアレイによって達成できた短いワークフローによって、FISH、PCR ベースの方法、および BAC アレイに関わる限界を克服

した、単一細胞の全ゲノム研究の費用効果が高い解析が可能となりました。

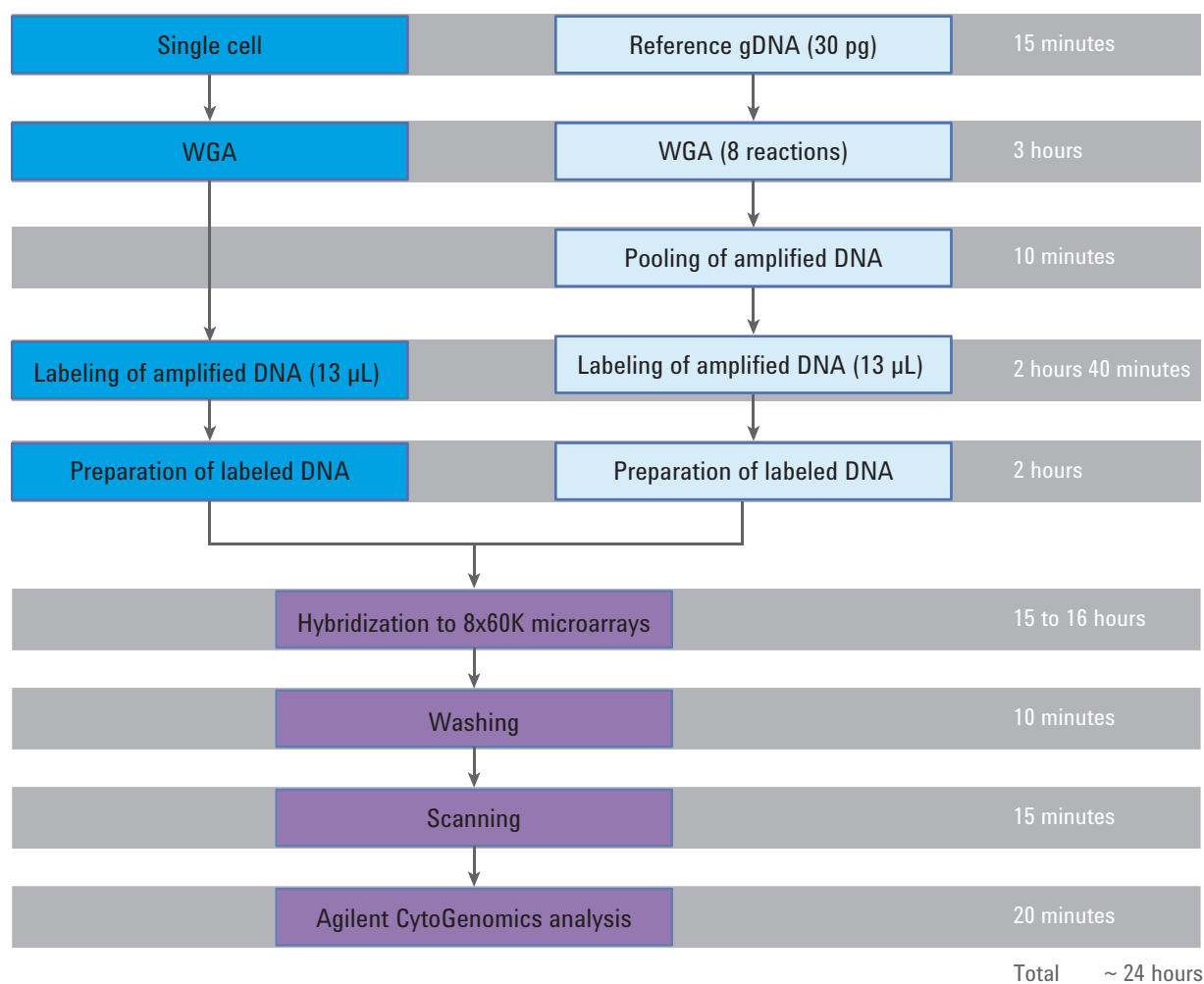


図 4. 単一細胞解析のワークフローと 8 サンプルを用いる場合の想定処理時間

参考文献

1. Munné et al. Improved detection of aneuploid blastocysts using a new 12-chromosome FISH test. *Reproductive Biomedicine Online*, **2010**, 20(1):92-97.
2. Barat-Houari et al. New multiplex PCR-based protocol allowing indirect diagnosis of FSHD on single cells: can PGD be offered despite high risk of recombination? *European Journal of Human Genetics*, **2010**, 18(5):533-538.
3. Bi et al. Detection of ≥ 1 Mb microdeletions and microduplications in a single cell using custom oligonucleotide arrays. *Prenatal Diagnosis*, **2012**, 32(1):10–20.
4. Cheng et al. Single-cell copy number variation detection. *Genome Biology*, **2011**, 12(8):R80.
5. Hellani et al. Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening. *Reproductive BioMedicine Online*, **2008**, 17(6):841-847.
6. Traversa et al. The genetic screening of preimplantation embryos by comparative genomic hybridization. *Reproductive Biology*, **2011**, 11(3):51-60.
7. <http://ccr.coriell.org/>

Agilent CGH processing components

製品名	型番
SurePrint G3 Human CGH Bundle, 8x60K	G5923A, Option 1
Hybridization Chamber, stainless	G2534A
Hybridization Oven	G2545A
Hybridization Oven Rotator Rack	G2530-60029
SureScan Microarray Scanner Bundle	G4900DA
Agilent CytoGenomics Software	G1662AA

www.genomics.agilent.com

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
Published in Japan, June 19, 2012
5991-0643JAJP



Agilent Technologies