

Roche NimbleGen 甲基化芯片介绍

仪方生物提供的 Roche NimbleGen 为基因组及表观遗传学研究提供高灵敏度、高特异性的 DNA 甲基化芯片研究方案。以鉴定 DNA 甲基化首选的亲和作用原理富集甲基化 DNA 片段，如甲基化 DNA 免疫沉淀 (MeDIP) 或甲基化结合域 (Methyl Binding Domain) 蛋白方法，NimbleGen DNA 甲基化芯片提供了高重复性可靠的启动子及基因 DNA 甲基化的检测方法，并为比较不同细胞、组织、肿瘤等样本中的甲基化差异性提供技术平台。

NimbleGen DNA 甲基化芯片优势

高密度长寡核苷酸平台，提供更强的检测灵敏度

■ 全套芯片设计，满足您所有需求

从全基因组叠片、目标叠片、增强子、CpG 岛与增强子，或自定义芯片设计中，选择最能满足您科研需求平台，2.1M (210,000 个探针)，3x720K (3x72,000 个探针)，385K (385,000 个探针)，或 4x72K (4x72,000 个探针) 任您选择；NimbleGen 芯片技术固有的灵活性，可叠片式覆盖目前大部分基因组结构；

■ 精选对照区域，作为有效内参

CpG 与增强子的芯片包含了印记基因 (如 H19/IGF2) 和深度甲基化的 HoxA 基因群，可作为阳性对照区域来验证实验结果。选择基因组中 non-CpG 区域作为阴性对照，确保实验有效性。

■ 高分辨率叠片覆盖，高分辨率检测结合位点

2.1M 或 3x720K 探针形式的高密度芯片以高分辨率叠片式覆盖您的基因组，增加了鉴别甲基化 DNA 区域的准确性；使用标准的 100bp 间距，或自定义芯片设计，以增加分辨率或基因组的覆盖度。

■ 高灵敏度和高特异性提供了非平行性结果

结合我们严谨的杂交实验方案，利用我们的等温 ($T_m=76^{\circ}\text{C}$) 长寡核苷酸探针 (50-75mer)，可获得高灵

敏度和高特异性结果；使用我们的双色实验方案，对进行杂交的免疫沉淀样本和总 DNA 样本同时进行分析。可消除不同芯片的批间差异；每 500bp 片段内能够可靠地检测到 2 个甲基 CpG。

NimbleGen DNA 甲基化芯片实验方案

双色共杂交技术为您提供可靠的结合位点检测方案

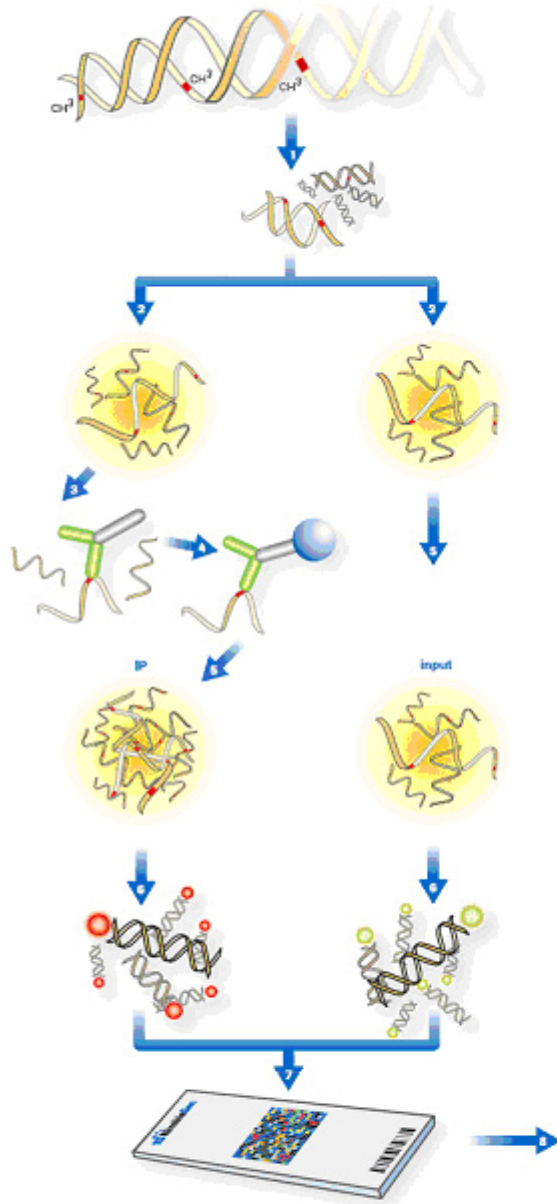


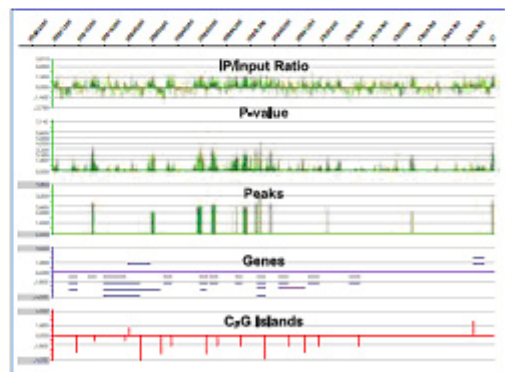
图2：使用SignalMap软件可视化DNA甲基化数据
NimbleGen专业分析软件使用统计学方法根据原始数据生成IP/input比值的对数log₂-ration数据和每一探针的p-value 富集数据。之后根据p-value数据生成peaks（甲基化区域）。SignalMap数据浏览器可以将这些数据以及基因和CpG位点注释一并显示出来。

NimbleGen DNA甲基化芯片提供从样品制备到数据分析的全面有效的实验方案。

图1：DNA甲基化（MeDIP）实验方案

(请联系Roche Microarray Technical Support 获取完整的方案细节)。

1. 打断基因组：
将基因组DNA超声打断为小分子量片段。
2. DNA变性：
加热DNA片断使其变性为单链DNA,并且分装两份。
3. 免疫沉淀：
在一份单链DNA片段中加入抗5'-甲基胞嘧啶核苷抗体，另一份单链DNA保存为对照（input）。
4. 富集：
抗体复合物通过亲和固相得以捕获，其它任何未结合片段被洗脱。
5. 扩增：
纯化免疫沉淀DNA片段（IP），如有必要可以扩增IP和input样品。
6. 标记：
IP和input样品分别用Cy5和Cy3进行标记。
7. 杂交：
标记的IP和input样品在DNA甲基化芯片上混合、变性，并且共杂交。
8. 数据分析：
使用NimbleScan分析软件提取数据，可以计算出IP对input的比值，同时将peaks对应定位到相应基因的转录起始位点。



NimbleGen DNA 甲基化芯片的产品种类与设计特性

罗氏 NimbleGen 目前提供 4 种规格的 DNA 甲基化芯片：分别为含有 2,100,000 个探针，（2.1M）、3x720,000 个探针（3x720K）、385,000 个探针（385K）的芯片和含有 4x72,000 个探针（4x72K）的芯片。同时提供全基因组范围、启动子及 CpG 岛 区域、指定区域的目录芯片产品，以及随您所需的定制产品。

全基因组设计

NimbleGen 基因芯片能够以 100bp 或更小的平均探针间距，覆盖目标基因组相关区域。您可订购整套基因组芯片，也可单独订购一种基因组芯片，目前可提供人类、小鼠、大鼠、拟南芥四个物种的全基因组甲基化芯片产品，其它种属的基因组芯片也即将陆续添加。

启动子区域设计

■ 2.1M 格式 Deluxe 高密度启动子区域甲基化芯片

目前可提供人类、小鼠相应产品。两个物种均已推出二代产品，详见下表。

产品名称	数据来源	探针覆盖启动子上游区域	探针覆盖启动子下游区域	CpG 岛数量	覆盖 miRNA 启动子	探针平均间距	货号	包装
Human DNA Methylation 2.1M Deluxe Promoter v2 Array	HG19	8000	3000	27867	730(-15kb to mature miRNA)	100bp	06532969001	1 Slide
Human DNA Methylation 2.1M Deluxe Promoter Array	HG18	7250	3250	28226	475 (-15kb through mature transcript)	100bp	05463173001	1 Slide
Mouse DNA Methylation 2.1M Deluxe Promoter v2 Array	MM9	8000	3000	15969	599 (-15kb to mature miRNA)	100bp	06532977001	1 Slide
Mouse DNA Methylation 2.1M Deluxe Promoter Array	MM8	8200	3000	16002	510 (-20kb through mature miRNA)	100bp	05463181001	1 Slide

■ 3x720K 芯片格式 CpG 岛 & RefSeq 明确基因启动子区域甲基化芯片产品

单一芯片设计覆盖了所有 UCSC 注释的 CpG 岛和所有 RefSeq 数据库基因的启动子区域。针对小 CpG 岛，覆盖范围向两端延伸达到 700bp 从而提高了检测的可靠性。DNA 甲基化阳性对照区域，例如 HoxA、H19/IGF2、KCNQ1 和 IGF2R 等基因簇也同时包含在芯片上。目前可提供人类、小鼠、大鼠相应产品。

产品名称	数据来源	探针覆盖启动子上游区域	探针覆盖启动子下游区域	代表的启动子的个数	CpG 岛数量	探针平均间距	货号	包装
Human DNA Methylation 3x720K CpG Island Plus RefSeq Promoter Array	Source: UCSC Build: HG18	2440	610	22,5322	27,728	50-75 mer	05924529001	1 Slide
Mouse DNA Methylation 3x720K CpG Island Plus RefSeq Promoter Array	Source: UCSC Build: MM9	2960	740	20,404	15,980	50-75 mer	05924537001	1 Slide
Rat DNA Methylation 3x720K CpG Island Plus RefSeq Promoter Array	Source: UCSC Build: RN34	3880	970	15,287	15,790	50-75 mer	05924545001	1 Slide

■ 385K Two-Array Sets

两张芯片构成的芯片组包含所有明确基因的剪切变异和选择性转录起始位点。该芯片组能够全面有效地对基因组范围内包括 RefSeq 基因, Mammalian Gene Collection 和 UCSC 已知基因在内的转录调控元件进行图谱绘制, 从而实现最全面的转录子覆盖。目前已推出人 (4.7kb)、小鼠 (4.4kb)、大鼠 (6kb) 及拟南芥 (6.3kb) 的启动子区域产品。

■ 385K 格式启动子& CpG 岛区域甲基化芯片产品 (Promoter Plus CpG Island Arrays)

单张芯片即可覆盖 UCSC 数据库注释的 CpG 岛及 RefSeq 基因的启动子区域, 并将 HoxA gene cluster, H19/IGF2 cluster, KCNQ1 cluster, and the IGF2R gene 设为内参检测区域。目前该设计可提供的物种有人类、大鼠、小鼠。

■ 385K 格式 RefSeq 基因启动子区域甲基化芯片产品

目前该设计提供物种有人类、小鼠、大鼠。

■ 385K 格式 RefSeq XM 基因启动子区域甲基化芯片

单一芯片，覆盖 NCBI's Genome Annotation Project 的 RefSeq 数据库模式参考序列（带 XM 前缀的）的启动子区域。目前该设计提供物种有人类和小鼠。

特定区域设计

■ 385K Targeted Tiling Arrays

以 5bp 为间距依次叠加探针设计的特定区域甲基化芯片，采用 385K 格式制作

- 针对 HoxA, HoxB, HoxC, HoxD, β -globin and Xist 基因叠加设计探针
- 针对人类基因组 Encode 区域进行叠加设计的甲基化芯片，采用 385K 格式制作
- 针对犬类基因组 Encode 区域进行叠加设计的甲基化芯片，采用 385K 格式制作
- 人类非编码 RNA 启动子甲基化芯片

覆盖 462 个 miRNA、362 个 snoRNA、89 个 piRNA 基因簇与部分的 ENCODE 区域和管家基因非编码 RNA 启动子的甲基化芯片

■ 4x72K 人类 ENCODE 叠片式甲基化芯片

每张 4x72K 芯片能够同时对 4 份独立样品进行检测，为大批量样品的 DNA 甲基化样本质量的预先鉴定，或者对感兴趣区域的筛选试验提供了更高通量、更低费用的解决方案。覆盖了具有重要生物学意义的人 ENCODE 引导区域 (HoxA、 β -globin、Apo 等)。

定制甲基化芯片 Custom Arrays

利用与 NimbleGen 2.1M、3×720K、385K 和 4x72K 格式芯片，对任何已测序基因组，以您指定的探针密度为您感兴趣的区域定制甲基化芯片。

NimbleGen DNA 甲基化芯片性能数据

灵敏检出甲基化发生的基因区域

通过 MeDIP 实验对卵巢畸胎瘤（仅母体发生甲基化）与完全性葡萄胎（仅父体甲基化）两种细胞系进行甲基化区域的基因组富集，之后采用人类 2.1M Deluxe 启动子甲基化芯片和全基因组 10 片套裝甲基化芯片进行杂交。无论是全基因组芯片还是启动子芯片均可灵敏检出发生甲基化的区域；两种芯片针对同一样本的检测结果有很好的 consistency。

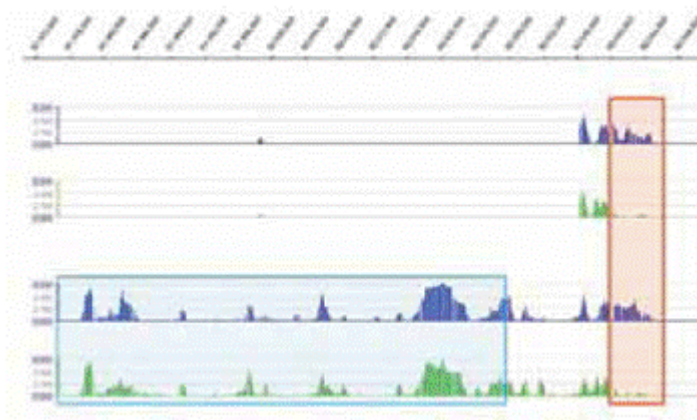


图 3: 使用人类 2.1M Deluxe 启动子甲基化芯片和全基因组 10 片套裝甲基化芯片检出 19 号染色体上 ZIM2 和 PEG3 基因的启动子区域及基因细部。

OT and CHM MeDIP 样本由 Dr. Andrew Sharp, University of Geneva, Geneva, Switzerland. 馈赠。

高可重复性的数据获得

组内或组间的实验可重复性对于基于芯片技术的甲基化研究至关重要。为了评估重复性指标，用同一种芯片 (3x720K) 杂交了 5 个相同的样本，来看组内的重复性，结果如 (Table 1, A). 来自 12 张芯片的平均标准偏差 (CV). 组间即芯片间的 CV 取自 18 张芯片的结果，见表格 (Table 1, B). 较低的 CV 证明了 NimbleGen 甲基化芯片较高的可重复性。

Table 1: 3x720K 格式的甲基化芯片的芯片内及芯片间可重复性比较。

以正常男性基因组样本经 MeDIP 方法富集获得甲基化区域与芯片杂交所得结果进行重复性评估。

DNA Methylation			
A. Intra-array Variation			CV
Array	Test Specifications	Input (Cy3)	IP (Cy5)
12 arrays	5 replicate probes/array	1.0%	2.1%
B. Inter-array Variation			CV
Array	Test Specifications	Input (Cy3)	IP (Cy5)
18 arrays	637,962 MeDIP probes	2.1%	3.6%