

# TrueMethyl<sup>®</sup> oxBS technology

## 5hmC と 5mC を1塩基レベルで定量

### TrueMethyl<sup>®</sup> ハイライト

#### 新しく革新的な標準品

Cambridge Epigenetix社のTrueMethyl<sup>®</sup> oxBS Sequencing キットを使用することで5-Methylcytosine (5mC) と5-Hydroxymethylcytosine (5hmC)を同時に定量可能です。

#### 安定した高い再現性

革新的なワークフローによる再現性の高いデータの入手が可能です。

#### プラットフォーム非依存

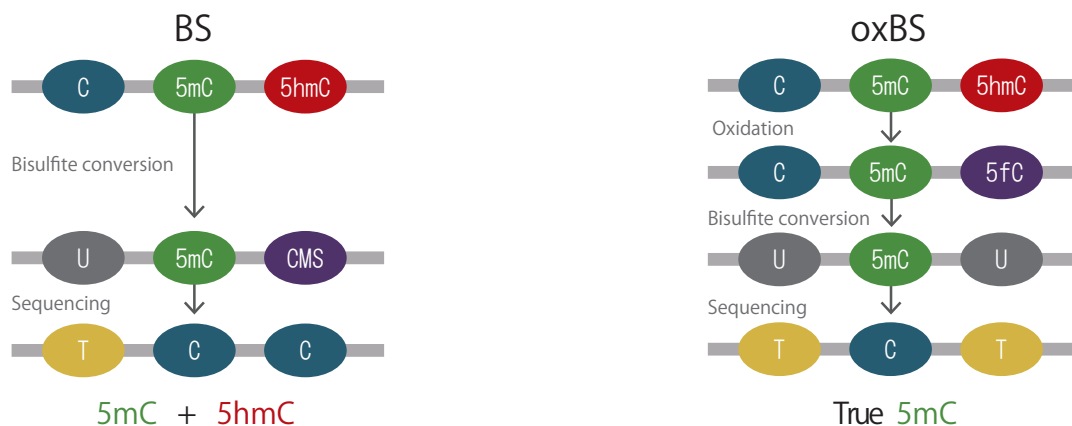
oxBS法は次世代シーケンシング (NGS)、Infinium 450Kメチル化アレイ、パイロシーケンシング、ターゲットアプローチを含む様々な技法に対して互換性があります。

### 5hmCが重要である5つの理由

1. 安定した修飾体で転写活動（抑制）に積極的に関与
2. 5mCとは異なるタンパクを結合
3. 細胞分化に重要な役割を果たしている TET酵素によって産生
4. がんやその他の疾病における強力な予後指標
5. 神経可塑性や免疫、他の機能システムの制御に関与

初期研究において5hmCは機能的に5-methylcytosine (5mC)とは全く異なることを示しています。

## TrueMethyl<sup>®</sup>テクノロジーが正確なメチル化シーケンシングを実現



1. **Bisulfite(BS)シーケンシング法**では5hmCはcytosine-5-methylenesulfonate(CMS)に変換され、5mCと5hmCは両方ともCとしてシーケンスされます。このため5mCと5hmCを区別する手法としてoxBS法が必要となります。

2. **Oxidative bisulfite(oxBS)シーケンシング**は1塩基解像度で5mCを定量できます。効率的な酸化反応によって5hmCは5-formylcytosine(5fC)に変換されます。次にバイサルファイト (BS)処理によって5fCとCがuracilに変換されるため、5mCだけがシーケンシングによって検出されます。

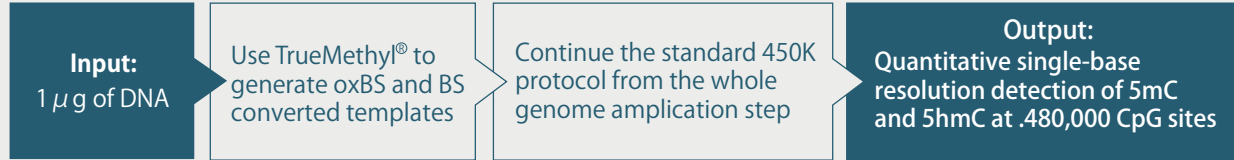
$$\text{BS} - \text{oxBS} = \text{True } 5\text{hmC}$$

3. 減算解析による定量比較で5hmC塩基が明らかになります。

# 実験データ

## TrueMethyl<sup>®</sup>と450Kアレイを使用した5mCと5hmCの解析

一般的なヒトの脳ゲノムDNAをTrueMethyl<sup>®</sup>を使って繰り返して処理をし、その後Illumina社のInfinium HumanMethylation450K BeadChip<sup>®</sup> (450K array) で解析



結果 (n=2, r<sup>2</sup>>0.98)

図1：4本のプローブ (A, B, C, D) の450Kアレイによる解析結果。従来のバイサルファイト変換後の非メチル化シトシンとメチル化及びヒドロキシルメチル化シトシン (5mC+5hmC) は区別されていない。

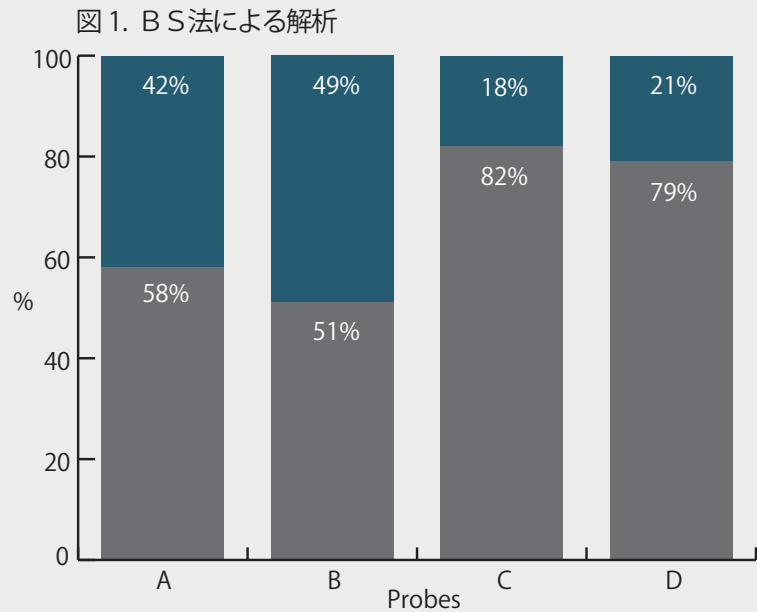
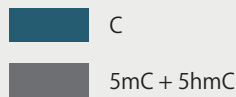
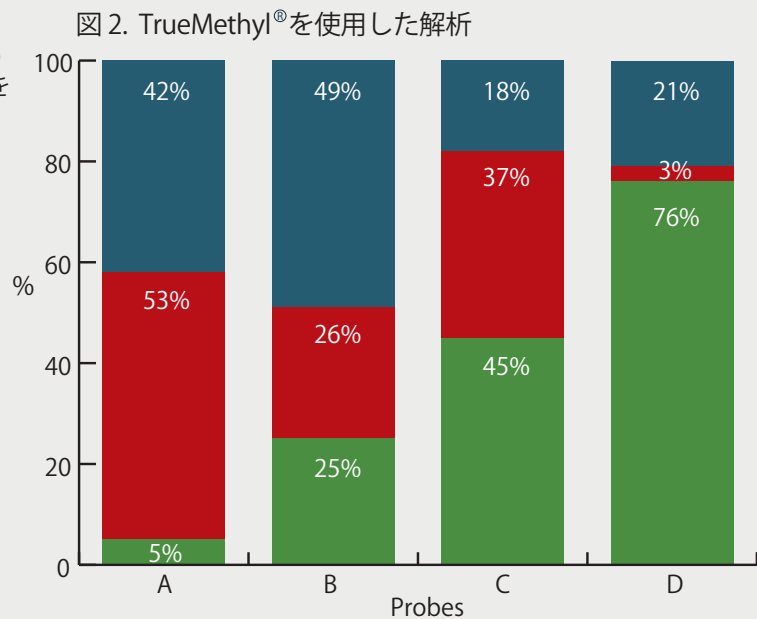
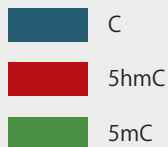


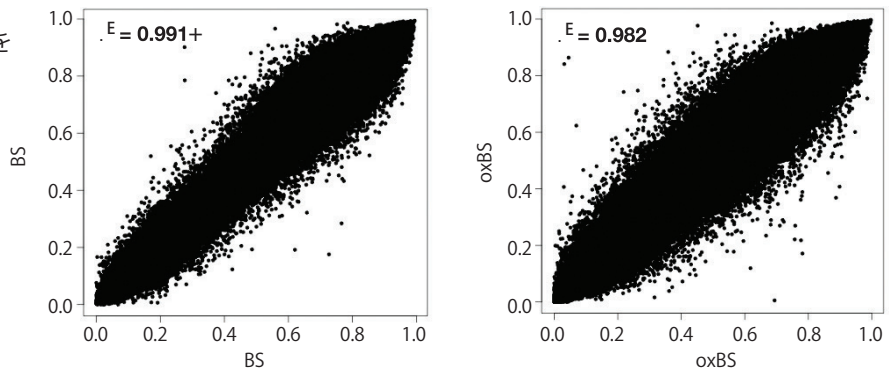
図2：TrueMethyl<sup>®</sup>による変換後の非メチル化シトシン(C)、メチル化シトシン(5mC)、ヒドロキシルメチル化シトシン (5hmC) それぞれの量をFigure1と同じプローブを使用して測定した結果。5mCと5hmCの実際の量が測定されている。



**oxBS technology resolves DNA modifications (5mC & 5hmC) for accurate epigenetic interpretation**

## 高い再現性

- TrueMethyl®は化学に基づいた技術で、信頼性に乏しい酵素反応を使用していません。
- 環境に依存しない安定した変換 (dense/sparse, high/low, CpG & CpH)
- 偏りのない安定したデータの再現性が得られます。(r<sup>2</sup>>0.98)



Coefficient of determination(r<sup>2</sup>) from simple linear regression of BS and oxBS replication

## New improved design

第2世代 (Gen2)TrueMethyl®のワークフローは最適な性能を発揮できるよう更に向上しています。

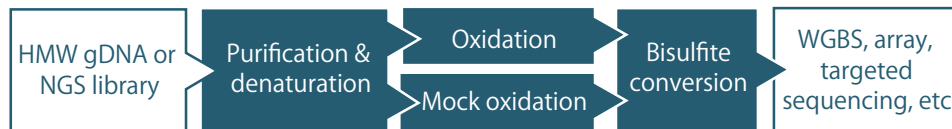
- 使いやすさ向上
- サンプル回収率向上
- より少ない試料で解析可

Gen2キットはハイスループット処理や自動処理にも対応しています。

	Gen1 kits (TM6 & TM24)	Gen2 kits (TM-Seq & TM-Array)
DNA input for WGBS	≥800ng	≥50ng
DNA input for 450K array	4ug	1ug
Automatable	No (uses columns & filters)	Yes (uses magnetic beads)
High throughput	No	Yes

## TM-SeqとTM-Array キット

第2世代 (Gen2)TrueMethyl®キットには、複雑なゲノムサンプルの酸化やバイサルファイト変換を行うために必要なコントロールと試薬が入っています。このキットを使用することでシトシンメチル化及びシトシンヒドロキシメチル化の両方を1塩基の解像度で正確で偏りがなく安定した定量をすることが可能です。また標準的な作業工程と解析方法との互換性もあります。



実験計画を促進し、TrueMethyl®が現在使用されているプロトコールにシームレスに統合されることを確実にするため、Cambridge Epigenetix社は、選択された解析プラットフォーム用に最適化された2種類のキットを用意しています。

**TrueMethyl® Seq** : NGSライブラリー調整とWGBS、RRBS、ターゲット濃縮を含むアプリケーション

**TrueMethyl® Array** : 高分子量ゲノムDNAを450Kアレイ、パイロシーケンス、アンプリコンシーケンスを含むアプリケーション用に変換

## Highlighted publications using oxBS technology

Role of Tet1 and 5-hydroxymethylcytosine in cocaine action.

Feng J. et al., Nature Neuroscience, 2015.

Accurate Measurement of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine in Human Cerebellum DNA by Oxidative Bisulfite on an Array (OxBS-Array)

Field S.F. et al., Plos One, 2015.

Large conserved domains of low DNA methylation maintained by Dnmt3a.

Jeong M. et al., Nature Genetics, 2013.

Oxidative bisulfite sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine.

Booth M.J. et al., Nature Protocols, 2013.

FGF signaling inhibition in ESCs drives rapid genome-wide demethylation to the epigenetic ground state of pluripotency.

Ficz G. et al., Cell Stem Cell, 2013.

### 製品リスト

	Catalogue #	# Reactions	価格	1サンプルあたりの価格
TrueMethyl® Seq	CEGXTMS	24 oxBS + 24 BS	ご照会	ご照会
TrueMethyl® Array	CEGXTMA	96 oxBS + 96 BS	ご照会	ご照会

### Reduced bisulfite sequencing (redBS-Seq)

5-Formylcytosineの定量について

RedBS法によって5-formylcytosineを1塩基の解像度で定量可能です。

TrueFormyl™ redBS-SeqはTrueMethyl®キットをご使用の方に限りご利用可能です。

詳細はお問い合わせください。



Cambridge Epigenetix

Jonas Webb Building

Babraham Campus, Cambridge, CB22 3AT UK

<http://www.cambridge-epigenetix.com/>

<輸入元>

〒541-0047 大阪市中央区淡路町2丁目2番5号

TEL: (06) 6231-6146 (代) FAX: (06) 6231-6149

Mail : [info@shigematsu-bio.com](mailto:info@shigematsu-bio.com)

WEB : <http://www.shigematsu-bio.com/>

