

InfiniumTM MethylationEPIC v2.0 BeadChip

Screening della metilazione
sull'intero genoma con
contenuto all'avanguardia

- Più di 935.000 CpG con nuovo contenuto definito da esperti
- Dati di metilazione del DNA altamente accurati e precisi
- Analisi a elevata processività a un costo minimo per campione
- Compatibile con il DNA estratto da campioni di tessuto FFPE

illumina[®]

Introduzione

La metilazione del DNA gioca un ruolo importante nella regolazione dell'espressione genica. Le modifiche negli stati di metilazione del DNA a livello cellulare è stata a lungo implicata nelle patologie legate all'invecchiamento, allo sviluppo e alle malattie.^{1,2} Per più di dieci anni, Illumina ha fornito ai ricercatori strumenti efficaci basati sui microarray alimentati dalla tecnologia BeadArray™ per misurare quantitativamente la metilazione del DNA sul genoma. Ad oggi, l'Infinium HumanMethylation450 BeadChip e il MethylationEPIC v1.0 BeadChip sono stati utilizzati dalla comunità di ricerca per portare avanti la raccolta dei dati per gli studi di associazione sull'intero epigenoma (EWAS, Epigenome-Wide Association Study). Questi Infinium BeadChip hanno inoltre permesso sia la scoperta sia l'applicazione dei biomarcatori basati sulla metilazione nei campi della ricerca sul cancro,^{3,4} patologie genetiche,⁵ invecchiamento⁶ ed epidemiologia molecolare.⁷ L'Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip (Figura 1, Tabella 1) è stato aggiornato in base alla stessa chimica affidabile di Infinium ed offre contenuto migliorato e selezionato da esperti per consentire più scoperte biologiche in una nuova fase della ricerca epigenetica.

Contenuto all'avanguardia sull'intero genoma

L'Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip si basa sulla struttura portante (backbone) per l'intero genoma dell'Infinium MethylationEPIC v1.0 BeadChip e oltre a mantenere un'elevata compatibilità retroattiva (Figura 2) aggiunge al contempo nuovo contenuto informato grazie al feedback di esperti e a valutazioni epigenetiche sui diversi tipi di cancro umano e campioni cellulari (Tabella 2, Tabella 3). Le sonde non funzionali vengono solitamente escluse negli studi di metilazione del DNA a causa di polimorfismi di singolo nucleotide (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) sottostanti, di ibridazione incrociata e di comportamenti che portano a più mappature genomiche.⁸ Nella nuova versione del BeadChip tali sonde sono state rimosse, lasciando spazio a contenuto più funzionale identificato dalla comunità epigenetica.

Sono state progettate più di 186.000 nuove sonde per mirare a intensificatori noti, super-intensificatori, domini leganti il CTCF e regioni della cromatina aperta associati

con i tumori primari identificati negli esperimenti con il saggio per la cromatina accessibile alla trasposasi seguita da sequenziamento (ATAC-Seq, Assay for Transposable-Accessible Chromatin Using Sequencing) e il sequenziamento per immunoprecipitazione della cromatina (ChIP-Seq, Chromatin Immunoprecipitation Sequencing). Questo contenuto è stato suggerito dai principali ricercatori nel campo dell'epigenetica e dalle recenti pubblicazioni scientifiche.⁹⁻¹⁴



Figura 1: Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip: l'Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip fornisce più di 935.000 CpG nelle regioni degli intensificatori, nei corpi dei geni, nei promotori e nelle isole CpG.

Tabella 1: Informazioni sul prodotto

Caratteristica	Descrizione
Specie	Umana
N. totale di marcatori ^a	> 935.000
N. di campioni per BeadChip	8
Requisito di input di DNA	250 ng
Tipi di campione specializzati	Tessuto FFPE
Chimica del saggio	Infinium HD
Supporto strumento	iScan System, NextSeq 550 System

a. Siti di metilazione interrogati.

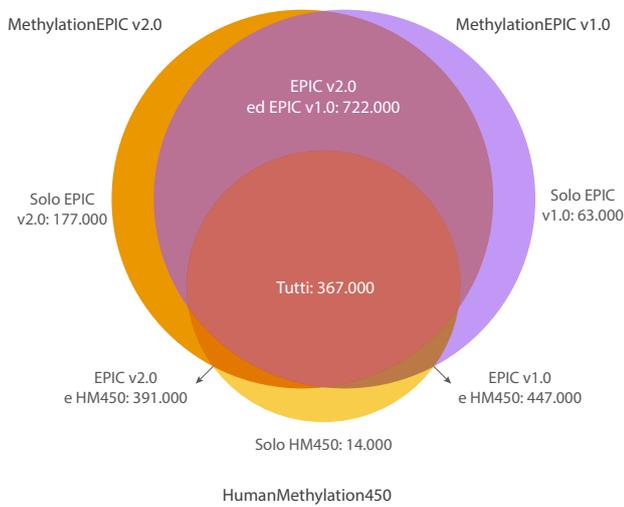


Figura 2: Alta compatibilità retroattiva con i precedenti BeadChip: l'Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip si basa sulle esistenti strutture portanti (backbone) delle CpG contenute nell'Infinium MethylationEPIC v1.0 BeadChip e nel HumanMethylation450 BeadChip.

Grazie a ulteriori sonde è stata migliorata la copertura accurata delle isole CpG e degli esoni che erano coperti in modo insufficiente sull'Infinium MethylationEPIC v1.0 BeadChip. Inoltre, nella nuova versione sono sottoposte a query più di 450 mutazioni driver del cancro che rendono l'Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip uno strumento multiomico per gli studi sul cancro.¹⁵ Tuttavia, i ricercatori in tutte le aree di studio possono sfruttare il nuovo contenuto all'avanguardia per le future scoperte nel campo dell'epigenetica.

Tabella 2: Copertura densa delle isole CpG

Caratteristica	N. coperto	% coperta	N. medio di loci/ caratteristica
Isola	25.381	91%	5,4
Sponda nord	25.115	90%	3,5
Sponda sud	24.870	89%	3,6
Sito nord	21.719	78%	2,1
Sito sud	21.677	78%	2,1

Contenuto ripreso nell'Infinium MethylationEPIC BeadChip v1.0 e v2.0:

- Isole CpG
- Siti metilati non CpG (CHH) identificati nelle cellule staminali umane
- Cromatina aperta e intensificatori ENCODE
- Intensificatori FANTOM5
- Siti ipersensibili alla DNasi
- Regioni del promotore miRNA
- > 85% di contenuto dell'HumanMethylation450 BeadChip

Il nuovo contenuto dell'Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip include:

- Siti metilati differenzialmente identificati nei campioni di tumore rispetto ai campioni normali per più tipi di cancro
- Intensificatori e super-intensificatori identificati mediante ChIP-Seq in campioni di cancro e della linea cellulare
- Regioni differenzialmente accessibili alla cromatina identificate nei tumori primari umani utilizzando ATAC-Seq
- Copertura ampliata delle isole CpG
- Copertura migliorata degli esoni per un più accurato rilevamento delle variazioni del numero di copie (CNV, Copy Number Variation)
- Comuni mutazioni driver del cancro

Tabella 3: Copertura delle regioni genomiche dell'Infinium MethylationEPIC v2.0

Tipo di caratteristica	N. di caratteristiche mappate	% di caratteristiche coperte	N. medio di loci/caratteristica
RefSeq			
NM_TSS200 ^a	51.688	82%	2,8
NM_TSS1500	59.981	96%	5,6
NM_5' UTR	42.051	67%	1,7
NM_1stExon	44.471	71%	1,8
NM_3' UTR	39.407	63%	1,3
NM_Exonic	207.398	28%	0,5
NR_TSS200	12.706	68%	2,0
NR_TSS1500	15.961	86%	3,9
NR_1stExon	9.810	53%	1,4
NR_Exonic	30.211	25%	0,5
GenCode Basic v41			
TSS200	160.572	79%	1,7
TSS1500	197.603	80%	3,9
5' UTR	61.823	59%	1,4
Primo esone	118.516	47%	1,1
3' UTR	41.659	53%	1,2
Esonico	417.055	26%	0,5
Intensificatori			
Siti ipersensibili alla DNasi ^b	432.393	16%	0,2
Intensificatori FANTOM5 ^c	23.852	84%	1,0
CisReg Site Evid 40-50 ^d	19.159	70%	1,3
CisReg Site Evid 50-60	21.609	67%	1,2
CisReg Site Evid 60-70	30.152	61%	1,1
CisReg Site Evid 70-80	66.446	47%	0,8
CisReg Site Evid > 80	153.712	19%	0,3
Mutazioni driver del cancro			
Mutazioni driver del cancro ^e	473	81%	0,8

- a. Distanza in coppie di basi da siti d'inizio della trascrizione (TSS, Transcriptional Start Site).
 b. Da ENCODE v5: 2.745.580 siti ipersensibili alla DNasi sull'intero genoma.
 c. Regioni genomiche identificate come intensificatori dal progetto FANTOM5.
 d. Da ENCODE v5: 87 studi con completa annotazione dei dati.
 e. Da: Bailey MH, Tokheim C, Porta-Pardo E, et al. Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. Cell. 2018;173(2):371-385.e18.

Flusso di lavoro ottimizzato

L'Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip Kit si attiene a un flusso di lavoro ottimizzato e di facile utilizzo che non richiede raggruppamento in pool e indicizzazione dei campioni. Il BeadChip a otto campioni viene elaborato con l'Infinium HD Methylation Assay e scansionato sull'iScan™ System o sul NextSeq™ 550 System.

Il saggio di metilazione Infinium è stato ottimizzato grazie a nuovi metodi di conversione rapida con bisolfito che riducono la durata complessiva del saggio (dall'estrazione del DNA fino ai file delle intensità) da quattro a tre giorni. La conversione con bisolfito, completata prima del saggio di metilazione Infinium, può essere ora completata in tre ore con i kit per la conversione rapida con bisolfito di terze parti raccomandati. Questi kit supportano l'automazione, riducono la variabilità e al contempo aumentano la processività dei campioni.

L'Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip contiene tutti i reagenti richiesti per eseguire lo screening della metilazione, fatta eccezione per i kit di conversione con bisolfito, che sono acquistabili separatamente.



Per maggiori informazioni consultare la nota tecnica [Automated bisulfite conversion for Infinium Methylation BeadChips](#) (Conversione automatizzata con bisolfito per gli Infinium Methylation BeadChip).

Dati di metilazione altamente accurati e precisi

La chimica dell'array Infinium utilizza molti replicati di microsferi per ciascun sito CpG sottoposto a query, ogni sito è collegato con migliaia di sonde. In questo modo, il saggio di metilazione Infinium fornisce misurazioni di metilazione molto precise. Questo è stato evidenziato da esperimenti interni effettuati su linee cellulari del cancro con una riproducibilità di più del 99% tra i replicati tecnici (Figura 3A). Il saggio di metilazione Infinium consente inoltre di ottenere elevata sensibilità analitica grazie alla capacità di rilevare le differenze nei valori beta di 0,2 con un tasso di falsi positivi inferiore all'1%. Gli esperimenti mostrano anche un'elevata correlazione tra il contenuto sovrapposto dei saggi Infinium MethylationEPIC BeadChip v2.0 e v1.0 (Figura 3B) e i dati del sequenziamento per metilazione (Figura 3C).

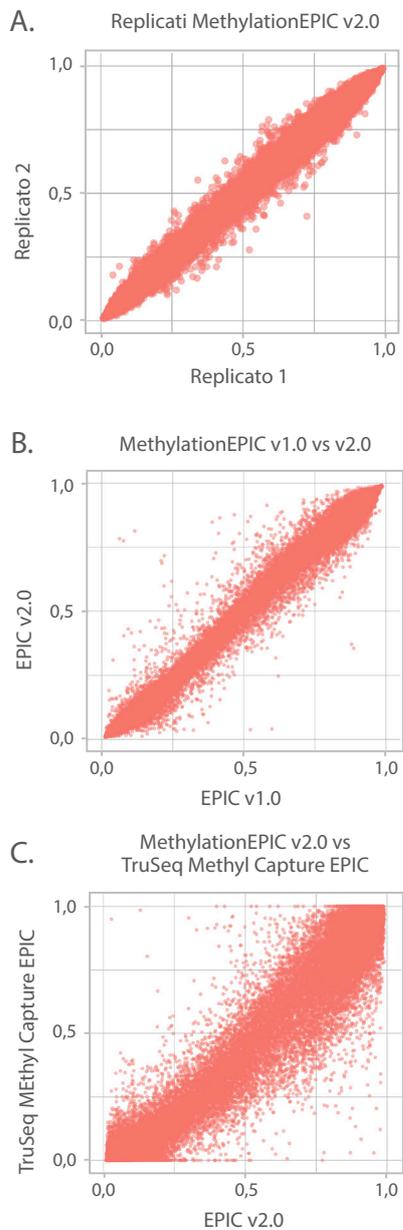


Figura 3: Gli Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip mostrano elevata riproducibilità, compatibilità retroattiva e correlazione rispetto ai dati del sequenziamento: (A) il confronto dei valori beta da replicati tecnici per i campioni HeLa sul MethylationEPIC v2.0 con un valore R^2 di più del 99%. (B) Il confronto dei valori beta sui campioni HeLa su contenuto sovrapposto tra MethylationEPIC v1.0 e v2.0 mostra un valore R^2 di più del 99%. (C) I dati del MethylationEPIC v2.0 mostrano elevata correlazione nelle identificazioni di metilazione (R^2 più del 96%) rispetto ai dati del sequenziamento mirato con bisolfito a profondità di sequenziamento di 100x. I grafici della concordanza sono stati sviluppati con i valori beta generati dal pacchetto di analisi dei dati SeSAmE.

Gli studi hanno mostrato che il livello di accuratezza e precisione ottenuti con gli Infinium BeadChip si possono ottenere solo con un'elevata profondità di sequenziamento di 100x o superiore.¹⁶

Controllo qualità semplice e integrato

I saggi di metilazione Infinium contengono controlli dipendenti e indipendenti dal campione per un controllo qualità (QC, Quality Control) semplice e intuitivo. Tali controlli indicano la qualità dei dati come una funzione dei passaggi del flusso di lavoro Infinium, dei controlli specifici per il campione come l'efficienza della conversione con bisolfito e dei controlli negativi. I controlli possono essere valutati in un formato tabulare utilizzando BeadArray Controls Reporter oppure visivamente su più campioni utilizzando il GenomeStudio™ Methylation Module Software. Inoltre, la base utenti ha ideato ulteriori metodi per la valutazione della qualità dei dati utilizzando soluzioni software di terze parti come SeSAmE¹⁷ e minfi.¹⁸

Semplice analisi dei dati secondaria

Per più di dieci anni i BeadChip di metilazione Infinium sono stati ampiamente utilizzati e ciò ha consentito alla comunità di utenti di sviluppare semplici pacchetti R per l'analisi dei dati. Tali pacchetti, come SeSAmE e minfi, forniscono i più aggiornati metodi bioinformatici per la normalizzazione, il filtraggio delle sonde e il rilevamento della metilazione differenziale. [Video](#) di formazione e guide utente complete spiegano l'utilizzo di questi pacchetti di analisi dei dati. Inoltre, grazie alla natura mirata della tecnologia BeadArray, i dati di output possono essere facilmente elaborati con minima potenza di calcolo e archiviati a costi ridotti o nulli.

Compatibilità con i campioni FFPE

I campioni di tessuto fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE, Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded) mostrano prestazioni efficaci con una versione modificata dell'Infinium Methylation HD Assay (Tabella 4). Per campioni preziosi e integrità ottimale del campione si raccomanda l'[Infinium FFPE QC and DNA Restoration Kit](#).

Tabella 4: Dati efficaci con i campioni FFPE

Infinium MethylationEPIC BeadChip	Standard	FFPE
Riproducibilità (replicati tecnici)	$r^2 \geq 98\%$	$r^2 \geq 98\%$
N. di siti rilevati ^a	$\geq 96\%$	$\geq 90\%$

a. Basato su campioni non tumore, quantità raccomandate di input di campione di DNA di elevata qualità come confermati da PicoGreen e attenendosi a tutte le altre raccomandazioni di Illumina in base alle guide per l'utente.

Riepilogo

L'Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip offre uno strumento accessibile per l'analisi di metilazione sull'intero genoma con contenuto all'avanguardia e funzionalità di elevata processività che lo rendono una soluzione ideale per studi di epigenetica di tutte le dimensioni.

Maggiori informazioni

Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip, illumina.com/products/by-type/microarray-kits/infinium-methylation-epic.html.

Supporto per l'Infinium MethylationEPIC v2.0 [BeadChipsupport.illumina.com/array/array_kits/infinium-methylation-epic-beadchip-kit.html](https://support.illumina.com/array/array_kits/infinium-methylation-epic-beadchip-kit.html).

Analisi con gli array di metilazione, illumina.com/techniques/microarrays/methylation-arrays.html.

Consigli sull'analisi dei dati ottenuti dagli array di metilazione, illumina.com/techniques/microarrays/methylation-arrays/methylation-array-data-analysis-tips.html.

Conversione con bisolfito rapida e automatizzata, illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/automated-bisulfite-infinium-methylation-tech-note-m-gl-00144/automated-bisulfite-Infinium-methylation-tech-note-m-gl-00144.pdf.

Epigenetica del cancro, illumina.com/areas-of-interest/cancer/research/cancer-epigenetics.html.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip Kit (8 samples)	20087706
Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip Kit (16 samples)	20087707
Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip Kit (32 samples)	20087708
Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip Kit (96 samples)	20087709

Ogni Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip può elaborare otto campioni in parallelo e analizzare più di 935.000 siti di metilazione per campione.

Bibliografia

1. Bibikova M, Lin Z, Zhou L, et al. [High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays.](#) *Genome Res.* 2006;16(3):383-393.
2. Fan JB, Oliphant A, Shen R, et al. [Highly parallel SNP genotyping.](#) *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* 2003;68:69-78.
3. Capper D, Jones DTW, Sill M, et al. [DNA methylation-based classification of central nervous system tumours.](#) *Nature.* 2018;555(7697):469-474. doi: 10.1038/nature26000.
4. Sengos AP, Aldape K. [DNA Methylation Profiling: An Emerging Paradigm for Cancer Diagnosis.](#) *Annu Rev Pathol.* 2022;17:295-321. doi: 10.1146/annurev-pathol-042220-022304.
5. Sadikovic B, Levy MA, Kerkhof J, et al. [Clinical epigenomics: genome-wide DNA methylation analysis for the diagnosis of Mendelian disorders.](#) *Genet Med.* 2021;23(6):1065-1074. doi: 10.1038/s41436-020-01096-4.
6. Horvath S, Raj K. [DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing.](#) *Nat Rev Genet.* 2018;19(6):371-384. doi: 10.1038/s41576-018-0004-3.
7. Nwanaji-Enwerem JC, Colicino E. [DNA Methylation-Based Biomarkers of Environmental Exposures for Human Population Studies.](#) *Curr Environ Health Rep.* 2020;7(2):121-128. doi: 10.1007/s40572-020-00269-2.
8. Zhou W, Laird PW, Shen H. [Comprehensive characterization, annotation and innovative use of Infinium DNA methylation BeadChip probes.](#) *Nucleic Acids Res.* 2017; 45(4):e22. doi: 10.1093/nar/gkw967.
9. Corces MR, Granja JM, Shams S, et al. [The chromatin accessibility landscape of primary human cancers.](#) *Science.* 2018;362(6413):eaav1898. doi:10.1126/science.aav1898.
10. Chen H, Li C, Peng X, et al. [A Pan-Cancer Analysis of Enhancer Expression in Nearly 9000 Patient Samples.](#) *Cell.* 2018;173(2):386-399. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.027.
11. Lovén J, Hoke HA, Lin CY, et al. [Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers.](#) *Cell.* 2013;153(2):320-334. doi:10.1016/j.cell.2013.03.036.
12. Hnisz D, Abraham BJ, Lee TI, et al. [Super-enhancers in the control of cell identity and disease.](#) *Cell.* 2013;155(4):934-47. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.053.
13. Jiang Y, Qian F, Bai X, et al. [SEdb: a comprehensive human super-enhancer database.](#) *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D235-D243. doi: 10.1093/nar/gky1025.
14. Chapuy B, McKeown MR, Lin CY, et al. [Discovery and characterization of super-enhancer-associated dependencies in diffuse large B cell lymphoma.](#) *Cancer Cell.* 2013;24(6):777-790. doi:10.1016/j.ccr.2013.11.003.
15. Bailey MH, Tokheim C, Porta-pardo E, et al. [Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations.](#) *Cell.* 2018;173(2):371-385. doi: 10.1016/j.cell.2018.02.060.
16. Zhou L, Ng HK, Drautz-Moses DI, et al. [Systematic evaluation of library preparation methods and sequencing platforms for high-throughput whole genome bisulfite sequencing.](#) *Sci Rep.* 2019;9(1):10383. doi: 10.1038/s41598-019-46875-5.
17. Zhou W, Triche Jr TJ, Laird PW, Shen H. [SeSAMe: reducing artifactual detection of DNA methylation by Infinium BeadChips in genomic deletions.](#) *Nucleic Acids Res.* 2018;46(20): e123. doi: 10.1093/nar/gky691.
18. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrado-Bravo H, et al. [Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays.](#) *Bioinformatics.* 2014;30(10): 1363-1369. doi: 10.1093/bioinformatics/btu049.



Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566
 techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2022 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitare la pagina Web www.illumina.com/company/legal.html.
 M-GL-01156 ITA v1.0