



Application

10⁵個のメダカ胚由来細胞を用いた *in situ* Hi-C Seq

製品名

KAPA Hyper Prep Kit (KK8500, KK8502, KK8504)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

以下のデータにつきましては東京大学大学院 理学系研究科 生物科学専攻 動物発生学研究室 熊谷 真彦 様、武田 洋幸 教授のご厚意により掲載させていただきました。

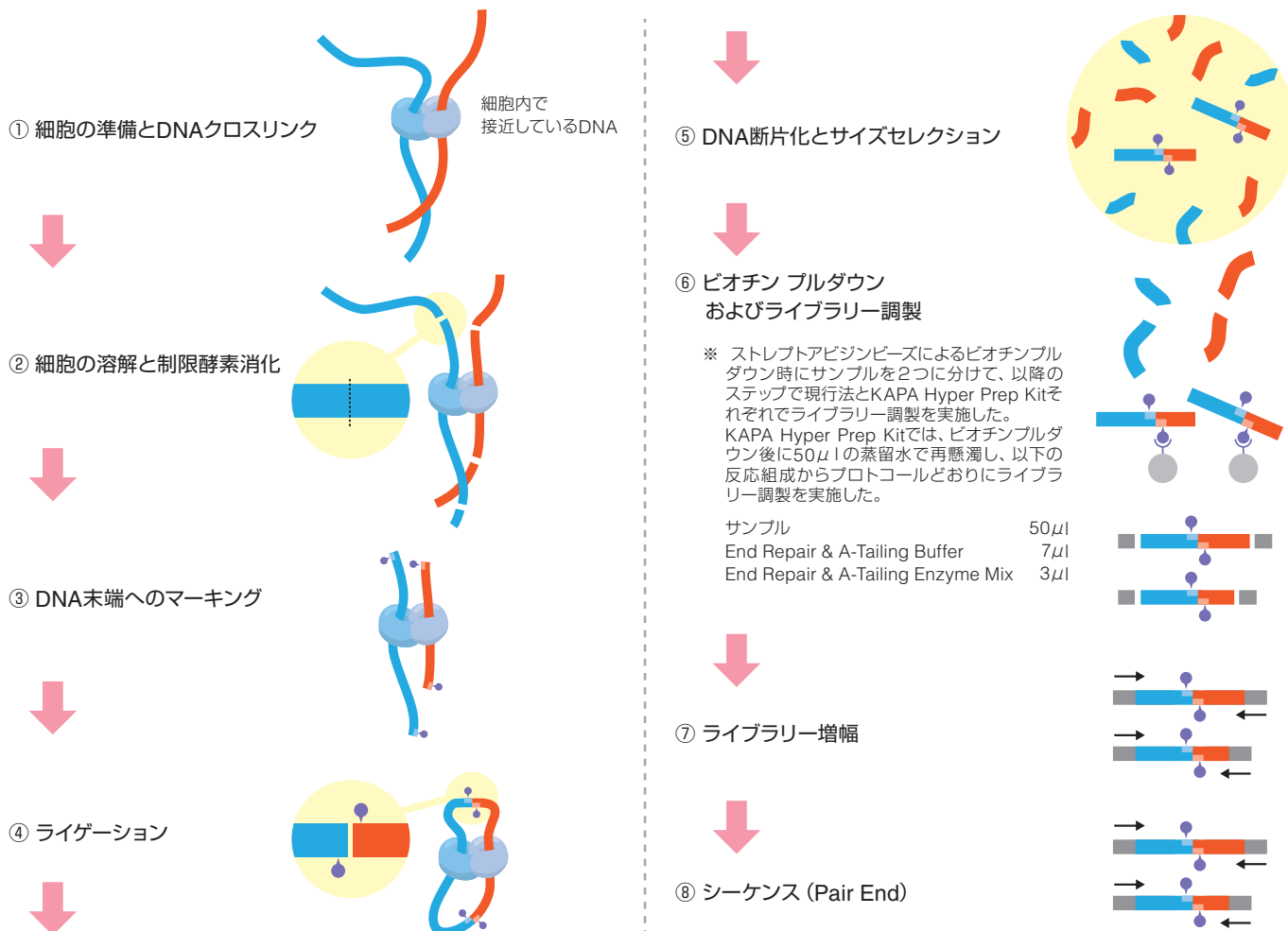
方法

次世代シーケンサーの性能が向上し、汎用性が広がると共に、様々な分野における新たな解析アプリケーションとして、多くの手法が開発されてきている。染色体の3次元立体構造を解析する手法として開発された3C (chromosome conformation capture) は、染色体の近接したDNA領域の検出を可能とする。¹⁾ この3Cの手法を発展させた dilution Hi-C Seq法²⁾ を用いることで、これまでにメダカ胚由来10⁷個の細胞まで、また、更に改良された *in situ* Hi-C Seq法³⁾ (現行法) を用いることで、10⁶個の細胞まで解析することが可能であった。今回、微量サンプル (1ng ~) からライブラリー調製が可能なKAPA Hyper Prep Kitを用い、10⁵個の細胞で解析を試みた。

- 1) Dekker J, *et al*, Science, 295, 1306-1311, 2002
- 2) Lieberman-Aiden, E., *et al*. Science, 326, 289-293, 2009
- 3) Suhas S.P. Rao *et al*, Cell 159, 1665-1680, 2014

生物種 : メダカ胚由来細胞
 初発サンプル量 : 上記の細胞 10⁵個
 (実際には2×10⁵個の細胞でスタートし、途中のステップで2つに分け、現行法とKAPA Hyper Prep Kitで比較)
 ライブラリー調製キット : KAPA Hyper Prep Kit
 シーケンサー : HiSeq1500 (illumina)

in situ Hi-C Seqのワークフロー



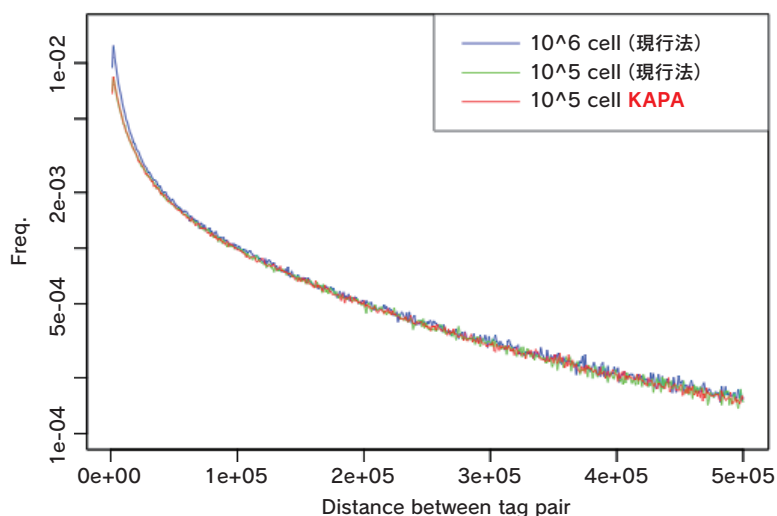
結果

Table1 DNA amounts (ライブラリー調製ステップ前後におけるDNA量)

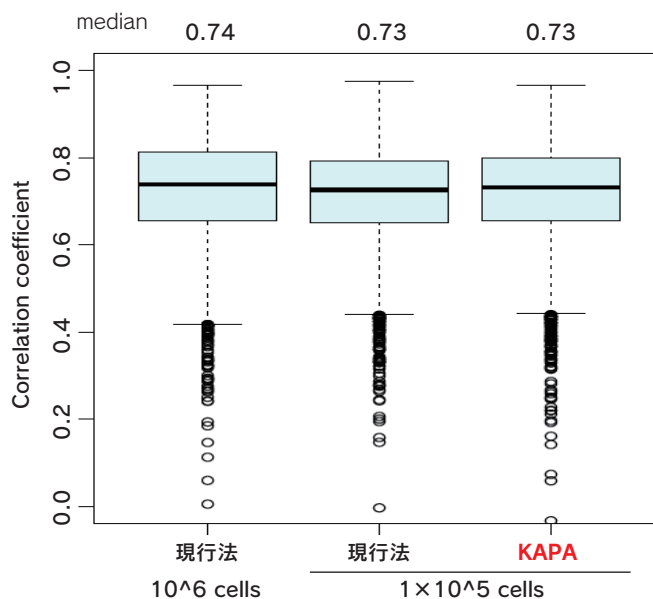
	現行法 10 ⁶ cells	現行法 10 ⁵ cells	KAPA Hyper Prep 10 ⁵ cells
ライブラリー調製前 (ワークフロー⑥の前) total DNA amount (Qubit)	4,217ng	296ng	296ng
ライブラリー調製後 (ワークフロー⑥の後) total DNA amount (Qubit)	388ng (/50μl)	71.1ng (/50μl)	65.7ng (/50μl)
ライブラリー増幅サイクル数	7	8	8
ライブラリー増幅後のライブラリー量 (ワークフロー⑦の後)	668ng	189ng	280ng

KAPA Hyper Prepでは、10⁵ cellsで、現行法よりも1.5倍量のライブラリーを得ることができた。

Fig.1 Frequency of paired end tag distance (Pair End tagの距離の分布図)

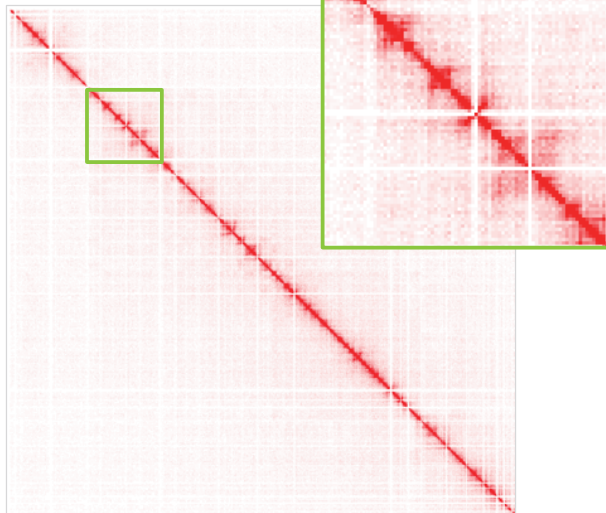
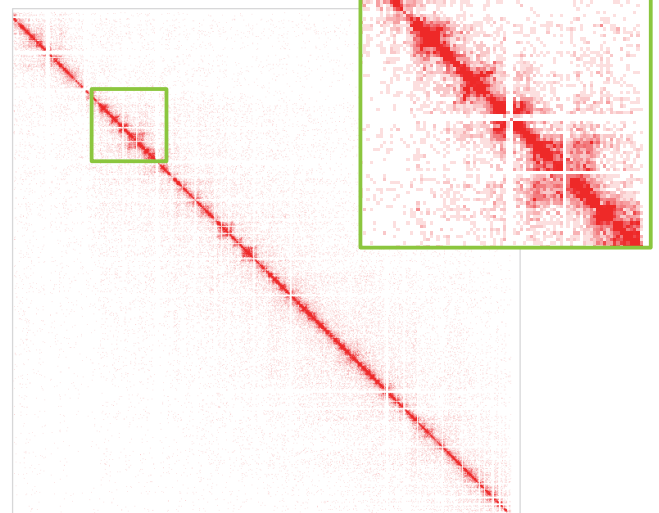


各サンプル間 (10⁵ cells, 10⁶ cells) でほぼ同様の分布を示した。

 Fig.2 Distribution of correlation coefficient to dilution Hi-C with 10⁷ cells
(10⁷細胞におけるdilution Hi-C Seqデータとの相関係数分布の比較)


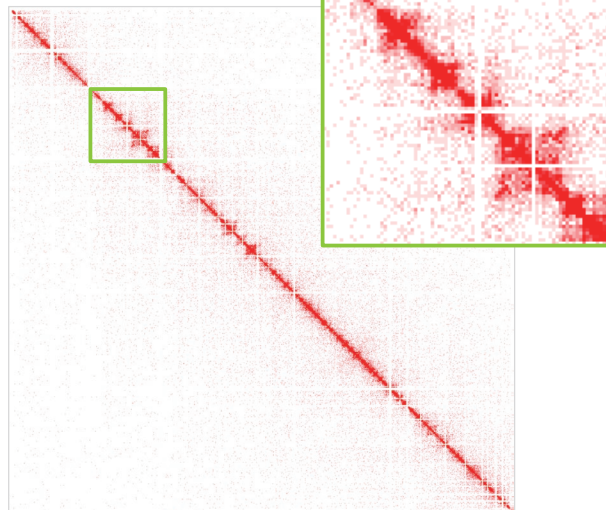
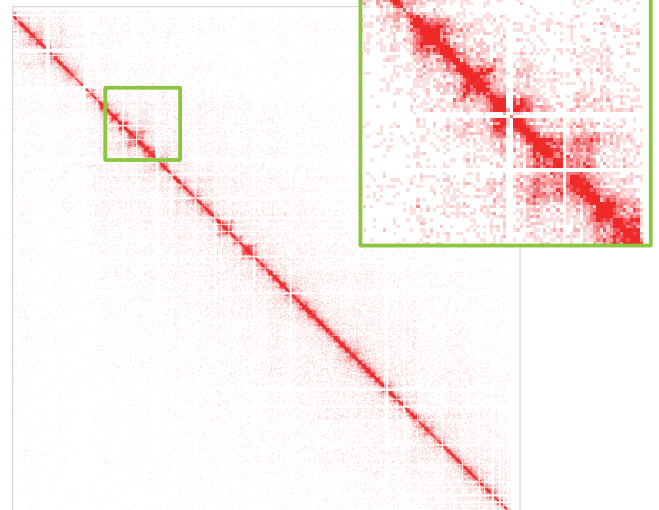
ゲノムを100kbごとのwindowに分割し、各windowごとの接触情報について、10⁷細胞におけるdilution Hi-C Seqデータとの間で相関を見た。
10⁶, 10⁵と細胞数を減らしても同等の結果が得られた。

結果

Fig.3 10^7 細胞でのDilution Hi-C Seqの結果と 10^5 *in situ* Hi-C Seq (KAPA Hyper Prep) の結果との比較
Contact matrix of 40kb bin (接触マトリクス)Dilution Hi-C, 1×10^7 cells,
146.7M read 1×10^5 cells (KAPA Hyper Prep),
5.1M read

Raw read count chr20, 40Kbin

どちらも良好な接触パターンが得られた。

Fig.4 10^6 細胞の *in situ* Hi-C Seqの結果と 10^5 *in situ* Hi-C Seq (KAPA Hyper Prep) の結果との比較
Contact matrix of 40kb bin (接触マトリクス) 1×10^6 cells,
5.0M read 1×10^5 cells (KAPA Hyper Prep),
5.1M read

Raw read count chr20, 40Kbin

どちらも良好な接触パターンが得られた。

今回、KAPA Hyper Prep Kitを用い、 10^5 個の細胞で $10^7 \sim 10^6$ 個と同様の解析が可能であった。
今後、この手法を応用することにより、メダカ初期発生過程における染色体の動態を網羅的に解析できることが期待される。



お客様のコメント

KAPA Hyper Prep Kitは精製ステップが少なく、時間と手間が省け、簡便であった。
また、ライブラリー増幅用酵素KAPA HiFi HotStart ReadyMixは、増幅バイアスが抑えられるため、もともとライブラリーの増幅用で使用していたが、今回得られたデータでもバイアスが低く抑えられていた。
また増幅効率が良いためライブラリー増幅の際のサイクル数をさらに減らすこともできる。
今後、より少ない試料からのライブラリー作成が行えることを期待している。