illumina®

TruSeq® ChIP サンプル調製キット

実績あるTruSeqの高品質データにより、ターゲットとするタンパク質－DNA間相互作用のプロファイルを最も網羅的かつ精確に解析

特　長

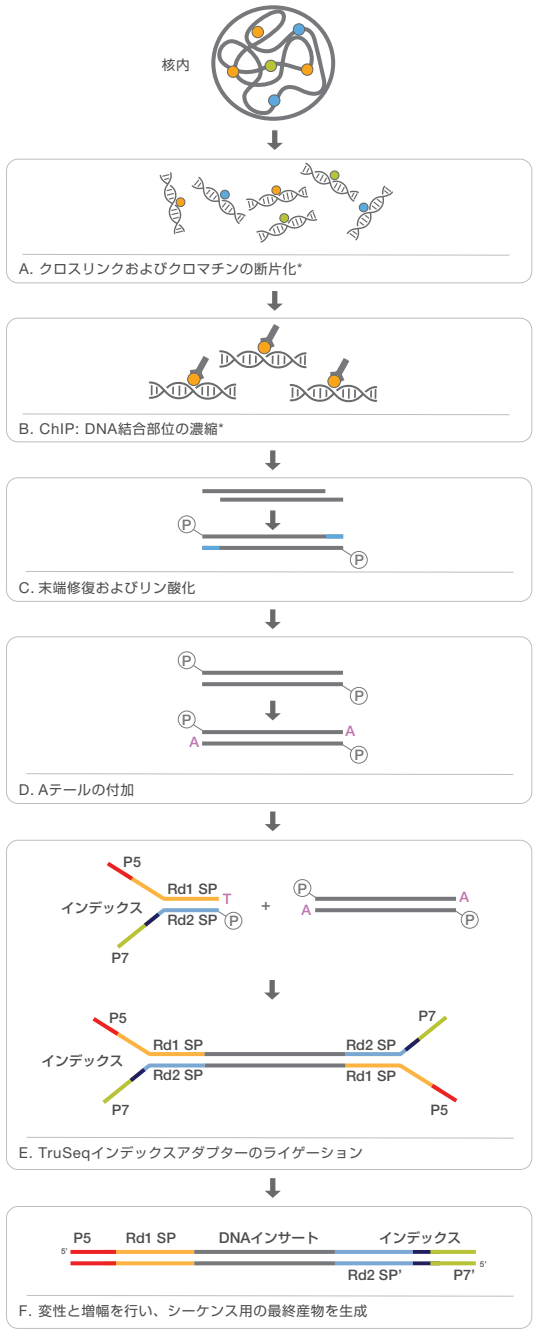
- **実績あるTruSeqのデータ品質**
  ターゲットとするタンパク質－DNA間相互作用のプロファイルを最も網羅的に解析
- **微量DNAインプット**
  さまざまなサンプルから得られたわずか5ngのDNAで安定した結果を取得
- **シンプルで効率的なワークフロー**
  使いやすくシンプルなワークフローと、高い拡張性
- **24種のインデックスによるマルチプレックスシーケンス**
  シーケンスのデータ量をサンプル間で最適化、1サンプルあたりのコストを削減

はじめに

DNAタンパク質相互作用による遺伝子発現調節の仕組みを解明することは、様々な生物学的プロセスおよび疾病の病態を理解する上で欠かせません。また、このようなエピジェネティック情報は、DNAシーケンス、ジェノタイピング、遺伝子発現などのゲノム解析を相補うものとなります。クロマチン免疫沈降シーケンス（ChIP-Seq）は、次世代シーケンサー（NGS）のパワーを活用し、特定のDNA結合タンパク質について、ターゲット部位の分布と存在量を、全ゲノム規模で高速かつ高効率に解明します。ChIP-Seqは、次世代シーケンサーのアプリケーションの中で最も広く用いられているものとなっており、様々なターゲットタンパク質の結合部位を、全ゲノムにわたって確実に同定することができます。また、高解像度での解析が可能であり、制約もありません。

次世代シーケンサーのアウトプットが増加し続ける中、ChIP-Seqを用いた研究においては、高度なマルチプレックス化およびシンプルで効率的なワークフローの両方を実現する必要性がますます高まっています。TruSeq ChIP サンプル調製キットはこれらの要望を満たす製品であり、遺伝子制御メカニズムを解明する上で、シンプルかつコスト効率のよいソリューションを提供します。ChIP後のDNAからライブラリーを調製する過程にはインデックスアダプターの付加が含まれており、必要とされるカバレッジに応じて、シーケンスのデータ量配分を最適化することができます。本製品のサンプル調製ワークフローは最適化されており、拡張性が高く、試薬はマスターミックスとして調製済みであるため、ハンズオンタイムが短く、また自動化が容易な、最大48サンプル平行処理のフォーマットにも対応しています。異なるインデックスを持つサンプルを組み合わせ、実験のスループットが最大となるよう調整することができます。必要なサンプルインプットは微量（5ng）で、使用できるDNAが限られているケースでも強固な結果を得られます。このため、様々な開始サンプルからの標的タンパク質解析に柔軟に対応することができます。

図1：ChIP-Seqワークフロー



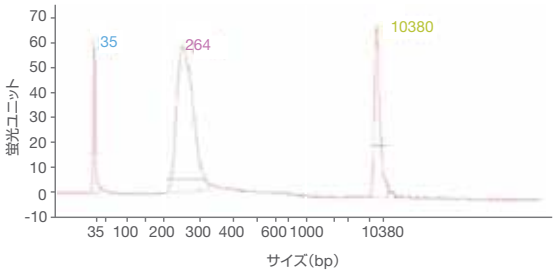
シンプルで効率的なTruSeq ChIP サンプル調製キットのワークフロー（ステップC～F）は、ハンズオンタイムが短く、高速な解析を可能にします。TruSeqユニバーサルアダプターにより、ワークフローの効率が上昇し、安定したマルチプレックスシーケンスを実現します。

シンプルで効率的なワークフロー

TruSeq ChIP サンプル調製キットのライブラリー調製ワークフローは、他の手法に比べて大幅に改善されたものとなっています。TruSeqのワークフローでは、精製、サンプルの移し替え、ピペット操作、およびクリーンアップのステップ数が少なくなっています。ユニバーサルアダプターは、最初のライゲーション時にインデックス配列が取り込まれるようの設計されており、ワークフローの効率が向上すると同時に、より安定したマルチプレックスシーケンスを可能にしています（図1）。

* ステップAおよびBはTruSeq ChIPサンプル調製ワークフローの開始前に行います。

図2：MafKライブラリーのBioAnalyzer解析



TruSeq ChIP サンプル調製キットを用いて調製した、転写調節因子MafKのChIPライブラリーをBioAnalyzerで泳動した結果です。ライブラリーは5ngのインプットDNAから調製しました。中央のピークは、目的のサイズのインサートが強固に得られていることを示します。

TruSeq ChIPシーケンスではまず、研究対象となるタンパク質に対する抗体を用いて、クロスリンクされたDNAタンパク質複合体を特異的に濃縮します（図1A～B）。次に、ターゲットのタンパク質と結合したDNA断片を分離し、これをインプットサンプルとしてライブラリー調製を行います。DNA断片を末端修復した後、平滑となった各鎖に「A」を1塩基付加し、シーケンスアダプターとライゲーションを行える状態にします（図1C～D）。TruSeqアダプターは3'末端に「T」オーバーハングを持ちます。このオーバーハングは、Aテールを持つDNAフラグメントと相補的であるため、ライゲーションが起こります（図1E）。最終産物が完成し（図1F）、サイズによる選択を行った後、全てのChIP DNAフラグメントを一斉にシーケンスします。

表1：TruSeq ChIPサンプル調製キットによって検出されたピークのモチーフ検索解析結果と、ENCODEのリファレンスピークデータとの比較

名称	MafKモチーフを持つトップピークの割合
TruSeq ChIP	95%
ENCODE HELA	92%
ENCODE HES	86%

最大限の柔軟性を提供するため、TruSeq ChIP サンプル調製キットはシングルリードまたはペアエンドシーケンスのサンプル調製に使用できるようになっており、MiSeq®およびHiSeq®システム全製品を含む、イルミナのシステム全てに対応しています。

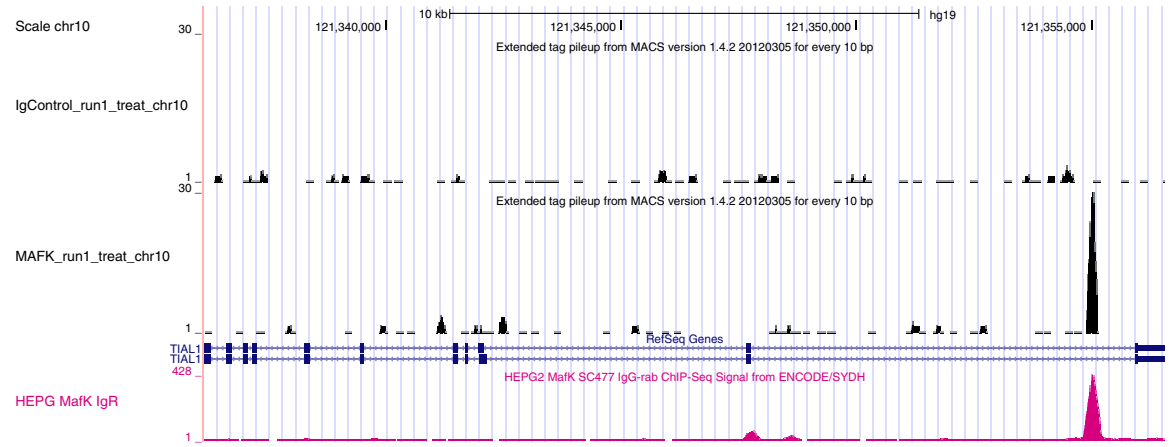
TruSeqデータ品質

実績あるTruSeqデータ品質により、最も網羅的かつ精確にターゲットとなるDNAタンパク質相互作用のプロファイルを解析できます。また、理想的なパスフィルターリードの割合、アライメント可能なリードの割合、およびカバレッジ均一性を得るとともに、少数しか存在しないフラグメントも高感度で検出することができます。

強固なマルチプレックス性能

TruSeqChIPサンプル調製キットは、最大24種のインデックスを利用でき、結果を損なうことなく、スループットおよび均一性を向上します。ライブラリー調製の過程で、TruSeqのユニ

図3：MafKに関するピーク検出の結果



TruSeq ChIP サンプル調製キットは幅広い研究デザインにおいてライブラリーの調製が可能です。上図は、ネガティブIgコントロール、ターゲットである転写調節因子MafK、およびENCODEデータベースより得たMafKのリファレンスピークに対する各ピークデータを示します。

バーサルアダプターがサンプルフラグメントとライゲーションし、サンプルのプーリングが可能になり、ダウンストリーム解析において個々のサンプルを識別することができます。このインデックス化性能により、ワークフローの効率が向上し、強固なマルチプレックスシーケンスが可能になります。インデックス化によって研究デザインの柔軟性が高まり、またサンプル毎に理想的なリード深度を得られるよう、リードのアウトプット配分を最適化し、各ランから最大限の価値あるデータを引き出すことができます。

幅広いターゲットに対応

TruSeq ChIP サンプル調製キットは、わずか5ngのインプットDNAからライブラリーを調製し、様々なデザインのChIP研究において、高品質でコスト効率がよくハイスループットなソリューションを提供します。ChIP-Seqは非常に応用範囲が広いアプリケーションであり、これまでに転写調節因子やクロマチンの構成要素であるヒストンを含む、多種多様なタンパク質をターゲットとしたChIP-Seqが実施されてきました。転写調節因子をターゲットとしたChIP研究は、疾病の病態、進行段階、または他の病態に寄与する特定の修飾因子やシグナル伝達パスウェイの解明に役立っています。一方、ヒストン「マーク」の解析は、クロマチン修飾および局所的構造変化が遺伝子発現の活性にもたらす影響の解明において有用です。

全ゲノムにわたってピークを検出

TruSeq ChIP サンプル調製キットを用い、5ngのインプットDNAから、転写調節因子MafKに対するライブラリーを作製しました（図2）。インプットDNAは、HELA細胞を用いて行ったChIPから得たものです。シーケンスのデータは1回のMiSeqランから得ました。クオリティ値によるフィルタリング済みのBAM出力ファイルをMACS peak finder softwareで解析し、検出されたピークについてMEME motif finder softwareによって濃縮のスクリーニングを行いました。図3はDNA－タンパク質間相互作用を確実に検出できる感度を示しており、検出された代表的なピークはENCODEプロジェクトのデータベースに含まれるMafK結合部位に相当しました。既知MafK結合モチーフの濃縮は予想通りに検出され（表1）、ここでもENCODEプロジェクトを通じて得たMafKのピークデータと一致していました。少ない開始インプット量から、全ゲノムにわたりピークを強固に検出する性能は、ChIP研究の成功に欠かせません。

TruSeq ChIP サンプル調製キットは、あらゆるタンパク質をターゲットにできる柔軟性を備え、1サンプルあたり広範なリードを必要とする転写調節因子（図3）、およびH3K4Me3のようなヒストンマーク（図4）の研究に、効率的でコスト効率の高いソリューションを提供します。

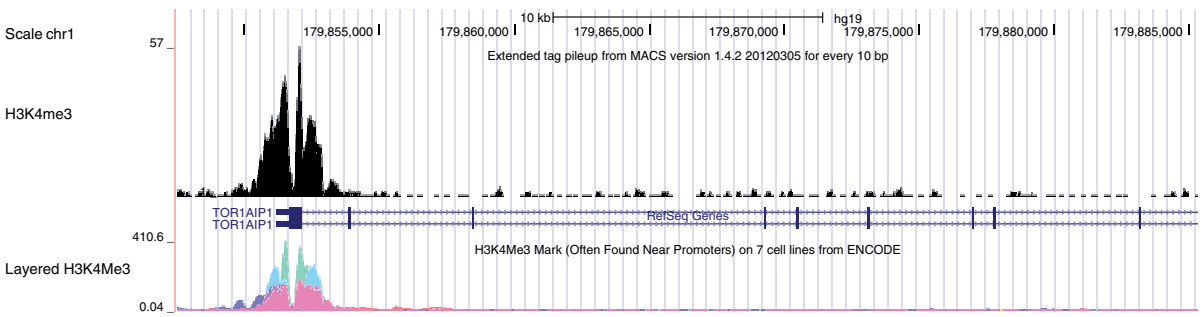
イルミナのシーケンスソリューション

TruSeq ChIP サンプル調製キットは、MiSeqおよびHiSeqプラットフォームを含む、イルミナのsequencing by synthesis（SBS）をベースとした全システムに対応しています。革命的なワークフローと比類ない精確性を提供するMiSeqは、DNAサンプルからデータの獲得までを8時間以内に終えることができ、小スケールの研究をサポートします。HiSeqシステムは、革新的なエンジニアリングによって、より多くのサンプルを迅速かつ高いコスト効率でシーケンスできます。どのシステムを用いてもデータの互換性は確保されます。

まとめ

TruSeq ChIP サンプル調製キットは、実績あるTruSeqの精確性とともにシンプルで効率的なワークフローを提供し、高度にマルチプレックス化されたコスト効率のよいChIPシーケンスを可能にします。微量のインプットサンプルからでも、多種多様なターゲットについて全ゲノムにわたる解析を可能にする本製品は、DNA－タンパク質間相互作用のプロファイルを網羅的かつ精確に解析し、遺伝子制御のメカニズム解明に貢献します。

図4：H3K4me3に関するピーク検出の結果



ターゲットのH3K4me3は、すでにその特徴が良く知られていますが、このターゲットに対するピーク検出の結果は、ENCODEアノテーションデータに遜色ないものでした。ヒストンマークターゲットのH3K4me3に対する代表的なピークと、それに対応するENCODEリファレンスピークを示します。

参考文献

1. Johnson DS, Mortazavi A, Myers RM, Wold B (2007) Genome-wide mapping of *in vivo* protein-DNA interactions. Science 316: 1497–1502.
2. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE et al. (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. Cell 129: 823–837.
3. Marban C, Su T, Ferrari R, Li B, Vatakis D, et al. (2011) Genome-wide binding map of the HIV-1 Tat protein to the human genome. PLoS One 6: e26894.
4. Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, Yokoyama A, Chikanishi T, et al. (2011) GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. Nature 480: 557–560.
5. Botti E, Spallone G, Moretti F, Marinari B, Pinetti V, et al. (2011) Developmental factor IRF6 exhibits tumor suppressor activity in squamous cell carcinomas. Proc Natl Acad Sci U S A 108: 13710–13715.
6. Bernt KM, Zhu N, Sinha AU, Vempati S, Faber J, et al. (2011) MLL-rearranged leukemia is dependent on aberrant H3K79 methylation by DOT1L. Cancer Cell 20: 66–78.
7. de Almeida SF, Grosso AR, Koch F, Fenouil R, Carvalho S, et al. (2011) Splicing enhances recruitment of methyltransferase HYPB/Setd2 and methylation of histone H3 Lys36. Nat Struct Mol Biol 18: 977–983.
8. Wu H, D'Alessio AC, Ito S, Xia K, Wang Z, et al. (2011) Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. Nature 473: 389–393.
9. ENCODE Project Consortium, Myers RM, Stamatoyannopoulos J, Snyder M, Dunham I, Hardison RC, et al. (2011) A user's guide to the encyclopedia of DNA elements (ENCODE). PLoS Biol. 9:e1001046. PMID: 21526222; PMCID: PMC3079585.

製品情報

製品名	カタログ番号
TruSeq ChIP Sample Prep Kit, Set A (12 indexes, 48 samples)	IP-202-1012
TruSeq ChIP Sample Prep Kit, Set B (12 indexes, 48 samples)	IP-202-1024

イルミナ株式会社

〒108-0014
東京都港区芝5-36-7　三田ベルジュビル22階
Tel (03)4578-2800　Fax (03)4578-2810
www.illuminakk.co.jp

代理店

本製品の使用目的は研究に限定されます。

© 2013 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, illumina*Dx*, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPro, DASL, DesignStudio, Eco, GAIIx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, TruSight, VeraCode, the pumpkin orange color, the Genetic Energy streaming bases design は Illumina, Inc の商標または登録商標です。
その他の会社名や商品名は、各社の商標または登録商標です。予告なしに仕様を変更する場合があります。

Pub. No. 770-2012-J029 15OCT2012

illumina®