

案例三

Hi-C将耐药基因组和质粒基因组与宿主微生物基因组关联

Linking the resistome and plasmidome to the microbiome

The ISME Journal, 2019

1. 组装结果再现添加的大肠杆菌和质粒基因组

研究者构建了 2 类废水样本，1 份不做处理，命名为 WW，1 份添加了 $\sim 7 \times 10^7$ CFU/mL 的 *E. coli* K12::gfp，该菌株含有多重耐药质粒 pB10::rfp，命名为 WWEC。两份样本分别进行宏基因组和 Hi-C 分析，Hi-C 数据分别将 2 份样本的宏基因组组装的 contigs 聚类得到 1000 个以上 clusters，其中分别有 51 (WW) 和 38 (WWEC) 个 clusters 的组装完整性高于 80% (Figure 3)。

WWEC 样本 Hi-C 聚类得到的 EC cluster，包含了 1 个 cluster (4.2 Mbp) 和 3 个小的相似丰度的 clusters (共 480 Kbp)，分别比对到大肠杆菌基因组和质粒上，完整性超过 97% (Figure 4)，完整地重现了 WWEC 中添加的大肠杆菌和质粒基因组信息，且通过 Hi-C 将该质粒与其宿主大肠杆菌菌株信息聚类到 EC cluster。

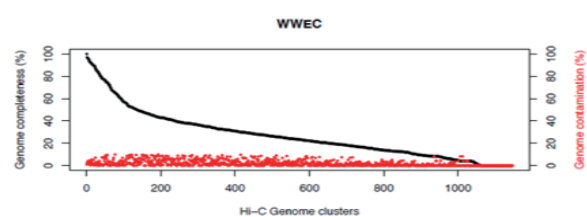
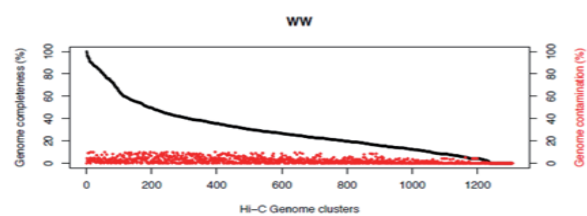


Figure 3 Hi-C聚类的cluster完整性和污染率评估

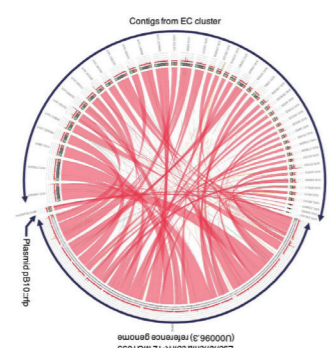


Figure 4 EC cluster (图上方, contigs from EC cluster) 与大肠杆菌 K-12 MG1655 和质粒 pB10::rfp 参考基因组 (图下方) 比对

2. Hi-C 将抗性基因、质粒与宿主关联

经 Hi-C 数据关联，在 WW 和 WWEC 样本中发现抗性基因 (ARGs) 通常与 γ -变形菌, β -变形菌 cluster 的 contigs 关联 (Figure 5)，发现抗性基因 *mphE* 和 *tet39* 广泛分布在几个隶属于 *Acinetobacter* 的 cluster 上 (Figure 5b)，与 ARGs 有大多数互作的 cluster 隶属于 *Aeromonadaceae* (Figure 5a)，该科通常与水体环境相关。

在 WW 和 WWEC 样本确定了质粒的广寄主 (BHR) 和窄寄主范围 (NHR) (Figure 5 C 和 D)，2 个已知的 BHR plasmids (IncQ-1 and IncQ-2) 在分析结果中，与跨越 γ -变形菌, β -变形菌 cluster 有关联，几个 NHR 质粒的 Markers 基本上仅关联到 *Enterobacteriaceae* cluster (Figure 5C)。

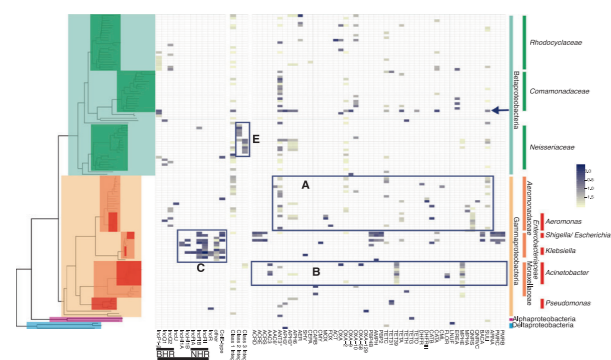


Figure 5 WW 样本中 Hi-C 关联质粒 markers, 整合子, ARGs 和隶属于 Alpha-, Beta-, Gamma-, and Delta-Proteobacteria 的 cluster

因此 Hi-C 关联结果表明，Hi-C 方法可以在不进行任何培养环节就可以确定质粒和整合子的寄主范围，且上述结果与近期研究结果一致，*Aeromonadaceae* 是研究水体中大多数 ARGs 和几种已知的 BHR 耐药质粒的宿主。*Aeromonadaceae* 广泛存在于水体环境中，其中有些物种对人类和其他脊椎非脊椎动物具有致病性，研究者推断 *Aeromonadaceae* 可能是该水体中抗性基因传播的重要载体。

武汉菲沙基因信息有限公司
Wuhan Frasergen Bioinformatics Co., Ltd.
武汉市东湖高新技术开发区高新大道666号 邮编:430075
T:027-87224696 F:027-87224785 E:support@frasergen.com

武汉菲沙基因组医学有限公司
Wuhan Frasergen Genomic Medicine Co., Ltd.
武汉市东湖高新技术开发区高新大道666号B8栋 邮编:430075
Building B8, 666 Gaoxin Road, East Lake High-tech Zone, Wuhan, China 430075

嘉兴菲沙基因信息有限公司
Jiaxing Frasergen Bioinformatics Co., Ltd.
嘉兴市嘉善县大云镇创业路555号C2栋 邮编:314100
Building C2, 555 Chuangye Road, Dayun Town, Jiashan County, Jiaxing, China 314100

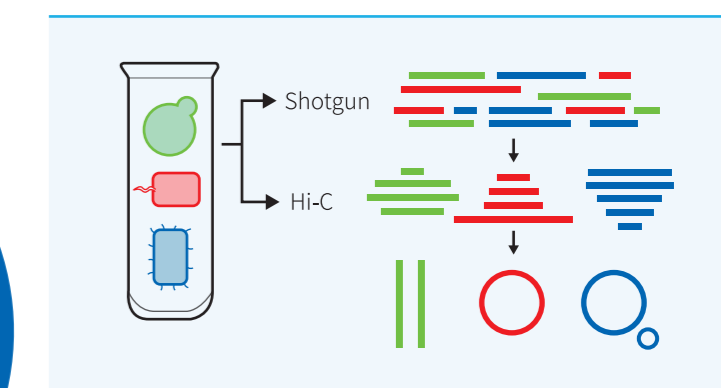
北京研发中心
Beijing Research Center
北京市海淀区中关村南大街12号科技综合楼 邮编:100081
12 Zhongguancun South St., Haidian District, Beijing, China 100081



扫码关注更多信息

Hi-C技术应用新方向

宏基因组Hi-C

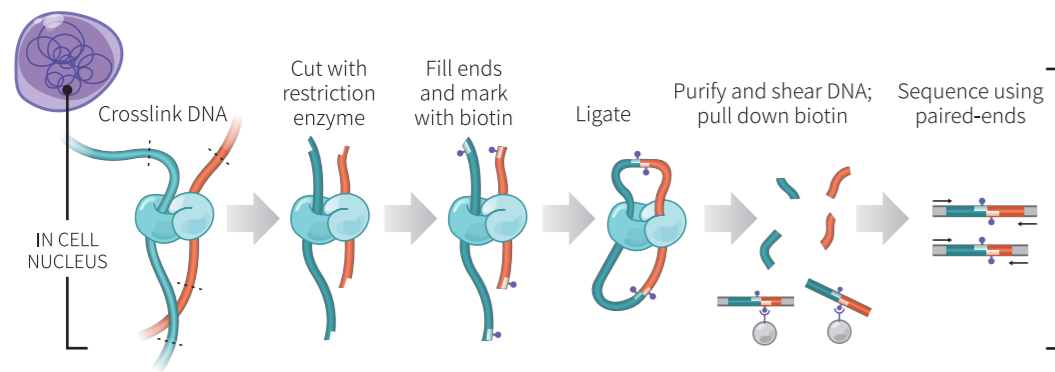


Frasergen 菲沙基因

技术介绍

DNA 和染色体存在于细胞核的三维空间中。虽然基因组在线性序列中存储了遗传信息，但是基因的正确表达、调控以及基因调控元件之间的相互作用都是在染色体折叠成的复杂三维结构中完成的，染色体的三维空间结构对基因的表达和调控具有重要影响。高通量染色体构象捕获（High-throughput chromosome conformation capture, Hi-C）则是一种可用于研究基因组三维结构的创新技术。

自 2009 年美国 Job Dekker 研究组开发出了 Hi-C 技术后，Hi-C 技术现已广泛应用于细菌、酵母、拟南芥、棉花、水稻、玉米、小鼠及人类基因组研究中。

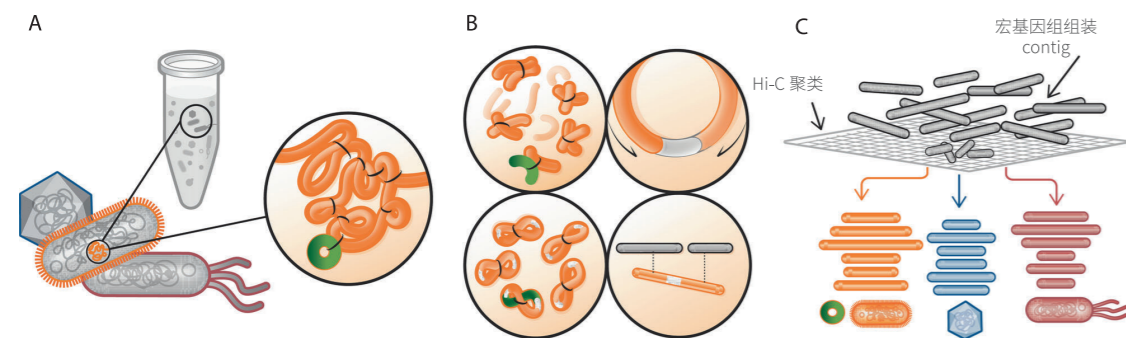


In situ 原位 Hi-C 实验流程

技术应用

宏基因组是研究微生物群落的有效工具，但其难以将序列“归类”到群落组成中的物种和菌株水平。与 Hi-C 技术应用到真核生物染色体水平参考基因组辅助组装原理类似，Hi-C 技术可运用到宏基因组的组装，提升宏基因组组装结果，将宏基因组 contigs 聚类到物种和菌株水平。

与不同细胞（微生物）相比，来源于同一个细胞（微生物）内的 DNA 分子互作更强，基于此原理可将来自于同一种微生物的 contigs 序列聚类到同一个 groups 中，并对 group 进行物种鉴定。除此之外，Hi-C 还可将质粒、噬菌体聚类，并将微生物群落中质粒、噬菌体与宿主细菌进行关联，这对理解和全面研究微生物生态系统的复杂性至关重要。



宏基因组 Hi-C 聚类原理

分析内容

标准分析

1	原始数据质控
2	数据产出统计
3	与宏基因组比对及过滤
4	基于比对结果进行宏基因组 HiC 聚类、物种鉴定和评估

个性化分析

质粒 / 噬菌体 / 抗性基因与微生物宿主 cluster 互作

1	比对数据库确定质粒 / 噬菌体 / 抗性基因 contig
2	基于 Hi-C 互作关联质粒 / 噬菌体 / 抗性基因 contigs 与 Hi-C cluster

发表文章(节选)

环境类型	期刊	科学问题
城市污水	The ISME Journal, 2019	Linking the resistome and plasmidome to the microbiome 经Hi-C技术重构了污水中已知质粒-宿主关系，确定了抗性基因、质粒和整合子宿主范围。
牛瘤胃微生物群落	Genome Biology, 2019	Assignment of virus and antimicrobial resistance genes to microbial hosts in a complex microbial community by combined long-read assembly and proximity ligation 基于长读长contigs的Hi-C聚类，确定了188个新的病毒-宿主关联，以及噬菌体生命周期状态。
牛瘤胃微生物群落	Nature Communication 2018	Assembly of 913 microbial genomes from metagenomic sequencing of the cow rumen 43头牛的瘤胃微生物基于宏基因组和Hi-C分析，共组装了913个微生物基因组近完成图和草图，并关联了质粒-宿主。
小鼠肠道微生物	science advances, 2017	Scaffolding bacterial genomes and probing host-virus interactions in gut microbiome by proximity ligation (chromosome capture) assay 基于Hi-C互作数据，完成小鼠肠道细菌和噬菌体基因组组装，并可将噬菌体与宿主细菌关联。
啤酒样本	Yeast, 2017	Identification of a novel interspecific hybrid yeast from a metagenomic spontaneously inoculated beer sample using Hi-C 自然接种的啤酒样本技术宏基因组和Hi-C技术，聚类注释得到7个真菌或细菌，另外一个groups推测是一种新型的中间杂交酵母。

应用案例

案例一

利用Hi-C从自然接种的啤酒样品中鉴定一种新型的种间杂交酵母

Identification of a novel interspecific hybrid yeast from a metagenomic spontaneously inoculated beer sample using Hi-C
Yeast, 2018

Table 1. Species identified in spontaneously inoculated beer

Cluster Number	Total length of contigs (bp)	N50 (bp)	Percentage of reference covered by assembly	Abundance	Plurality	Percentage eukaryotic	Plurality taxonomy	
1	1716	8251 667	8278	69,03%	9,25%	#0 (SC-FY)	100,00%	Saccharomyces cerevisiae
2	3367	8294 670	4247	55,32%	16,19%	#1 (DB)	99,99%	Dekkera bruxellensis
3	3822	16988 186	8416	64,01%	19,06%	#2(PM)	99,43%	Pichia membranifaciens
4	1068	9135 821	12637	80,40%	15,18%	#3(PK)	100,00%	Pichia kudriavzevii
5	285	286 331	69866	NA	0,08%	#4(OWB1)	0,00%	Acetobacter; Gluconobacter xylinus
6	212	2618 979	12000	47,39%	1,36%	#5(Ap)	0,00%	Bacteria; e-proteobacteria; Acetobacter pasteurianus
7	501	941 088	2554	NA	0,43%	#6(OWB2)	0,00%	Bacteria; firmicutes; Lactobacillus
8	218	2071 872	15372	84,53%	11,68%	#6(OWB2)	0,00%	Bacteria; firmicutes; Pedococcus dimorphus

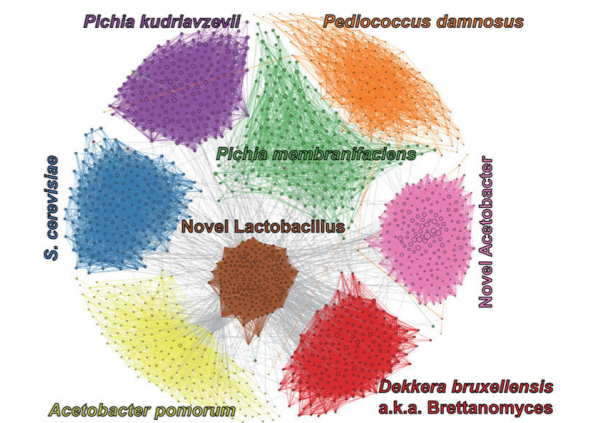


Figure 1 Hi-C 聚类结果图

案例二

基于Hi-C技术揭示微生物染色体构象多样性

Metagenomic chromosome conformation capture (meta3C) unveils the diversity of chromosome organization in microorganisms
eLife, 2014

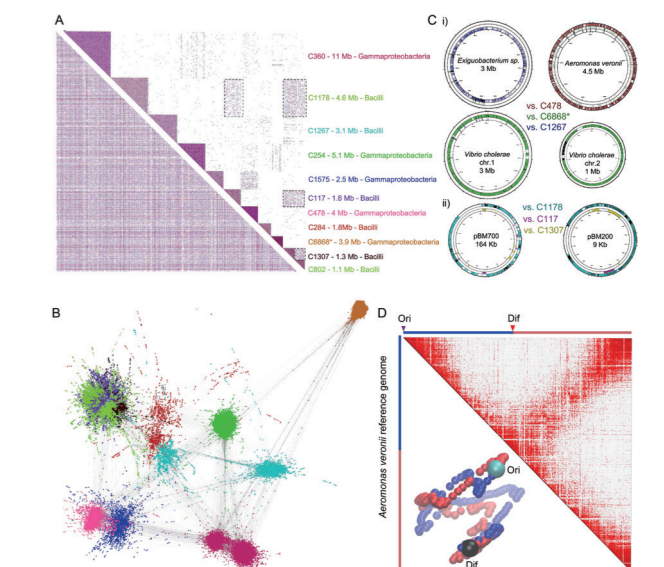


Figure 2 Hi-C 数据分析结果

A: 聚类前后的11个最大community; B: 11个最大contigs相互作用示例图; C: community注释基因组; D: 比对到Aeromonas veronii的community内部互作热图

研究者对河底沉积物收集和处理后进行 meta3C 文库构建和测序，经 IDBA-UD 对 meta3C sediment library 组装得到 contig，基于此 Hi-C 聚类得到 184 个显著 communities of contigs，最大的 11 个在互作热图对角线中呈现（Figure 2A）及相互间互作强度（Figure 2B），其中一个 community 包含的 contigs 覆盖了霍乱弧菌（V. cholerae）基因组的 95%，其他两个 community 可以比对到 Aeromonas veronii 和 Exiguobacterium sp. (Figure 2C i)，另外 2 个 community 注释为 Bacillus megaterium 质粒（Figure 2C ii）。