

DNA-蛋白质 互作技术研究

基因的表达调控影响生物体的功能变化。而基因表达调控分为转录前调控、转录后水平调控、翻译水平调控以及翻译后水平调控。而基因的表达调控受多方面的影响,其中一种就是DNA-蛋白质互作的影响。科学家们发现,DNA不仅可以编码蛋白质,还可以和蛋白质结合,调节基因活性,通过影响RNA转录来影响基因的表达;此外,DNA还可以作为各种化学修饰物的底物,对基因的沉默发挥一定的作用。蛋白质-DNA互作参与了很多体内的生物学过程,研究DNA-蛋白质相互作用的机制,对于我们了解DNA转录调控和基因表达机制,揭示各种生命活动现象具有极其重要的指导作用。

DNA-蛋白质互作研究中,根据已知什么、未知什么,分为未知DNA与未知蛋白质互作研究、已知蛋白质与未知DNA互作研究和已知DNA序列与未知蛋白质互作研究。

下面我们来一一揭晓。

■ 未知DNA与未知蛋白质研究

研究DNA与蛋白质互作时,通常需要有目标DNA或者目标蛋白质。如果研究时,只有处理材料,需要找寻处理材料中影响材料表型变化的调控因子,可以进行ATAC-seq实验。



技术介绍

ATAC-seq全称Assay for Transposase Accessible Chromatin with high-throughput sequencing,即利用转座酶研究染色质可进入性的高通量测序技术。主要是对生物样本进行提核处理,之后利用Tn5转座酶入核,对染色质进行空间构象切割,将染色质的开放区域DNA切割后富集纯化,最后对获得的DNA进行建库测序并分析预测开放区域中的转录因子及其结合的DNA序列(motif)。



实验步骤





性能展示

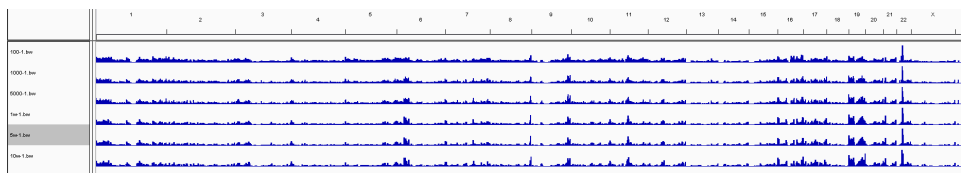


图:100-10w细胞投入量ATAC结果
细胞投入量从100个到10万个,均能得到建库结果,且结果的拟合度较高。



产品推荐

产品名称	货号	规格
Hieff NGS® ATAC-Seq Library Prep Kit for Illumina® ATAC建库试剂盒	12208ES12/48	12 T/ 48 T
Hieff NGS® Tagment Index Kit for Illumina® Tn5测序接头	12416ES24/96	48 T/ 192 T

■ 已知蛋白质, 研究与未知DNA互作

已知材料中研究蛋白质, 需要探究该目的蛋白质靶向的DNA结合区域, 可以使用ChIP-seq、CUT&Tag、DAP-seq、CUT&RUN进行研究得到结合的DNA序列后, 再利用EMSA、双荧光素酶报告基因、酵母单杂交实验、DNase I足迹试验等。若是研究时, 发现可能出现共调控的区域, 还需要进行CoIP或者GST pull down实验进行验证。

2.1 ChIP-seq、CUT&Tag、DAP-seq、CUT&RUN介绍



技术介绍

ChIP是研究DNA与蛋白互作的传统经典方法, 需要将样本进行甲醛交联后再用超声设备进行片段化处理, 之后利用特异性抗体进行靶向富集, 将富集得到的DNA进行建库测序分析即得到靶向蛋白质互作的DNA信息。

CUT&Tag是研究DNA与蛋白互作的新型技术,利用转座酶对抗体靶向区域进行切割,将切割得到的DNA序列可以一步扩增得到DNA文库。相对于ChIP-seq实验,CUT&tag具有可重复性强、背景噪音低、起始量要求低等优点。

Multi-CUT&Tag是利用新兴的纳米抗体偶联Tn5 (Nanobody-Tn5),利用纳米抗体识别一抗,使得Tn5被纳米抗体靶向到特定位置发挥靶向切割,将切割得到的DNA序列进一步扩增得到DNA文库。相对于传统CUT&Tag技术,Multi-CUT&Tag可以实现一份样本,同时研究两种靶标,节约样本和时间,实验无需二抗,减少实验流程。

CUT&RUN是研究DNA与蛋白质互作的新型技术,利用Mnase酶对染色质开放区域进行切割,之后将切割得到的DNA进行建库以获得靶向蛋白质互作的DNA信息。

DAP-seq是研究DNA与蛋白互作的技术,它属于体外ChIP-seq,主要针对一些非模式物种构建转基因体系或者过表达实验不容易操作的样本,本实验的优点是无需购买抗体即可实验。

CUT&Tag	Multi-CUT&Tag	ChIP-seq	CUT&RUN	DAP-seq
胞内反应	胞内反应	*胞内反应	胞内反应	胞外反应
收集细胞, 无需特殊处理	收集细胞, 无需特殊处理	甲醛交联	收集细胞, 无需特殊处理	提取样本DNA进行片段化和接头连接
ConA磁珠与细胞孵育	ConA磁珠与细胞孵育	细胞破碎裂解, 超声打断gDNA	ConA磁珠与细胞孵育	
一抗二抗结合目的蛋白	两种抗体同时孵育并靶向(无需二抗)	一抗结合目的蛋白	一抗二抗结合目的蛋白	麦胚乳蛋白表达系统表达蛋白并在在体外与DNA进行共孵育
转座酶复合体结合二抗, 激活反应	转座酶结合、激活反应	免疫沉淀	MNase酶复合体结合二抗, 激活反应	
磁珠回收DNA片段	磁珠回收DNA片段	洗脱, 解交联, 获得DNA片段	纯化获得DNA片段	洗脱并纯化获得DNA片段
一步法PCR扩增文库	一步法PCR扩增文库	多步反应: 修复加A, 加接头, PCR扩增	多步反应: 修复加A, 加接头, PCR扩增	多步反应: 修复加A, 加接头, PCR扩增
产物纯化, 上机测序	产物纯化, 上机测序	产物纯化, 上机测序	产物纯化, 上机测序	产物纯化, 上机测序
总时长: 7.5 hour	总时长: 6 hour	总时长: 3-5 Day	总时长: 1-2 Day	总时长: 1-2 Day

注:* ChIP-seq早期可以称之为胞内反应,样本通过甲醛固定,使得样本当时的胞内状态被静止,但是后续的IP实验实际上为胞外反应,抗体在胞内和胞外效应可能会有差异。



实验步骤

染色质制备/
细胞核提取

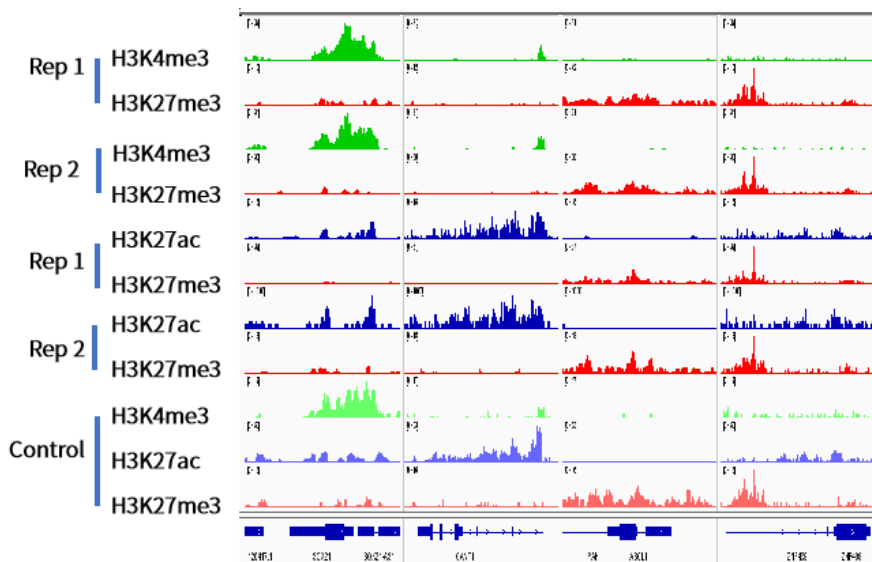
抗体靶向

建库测序

生信分析



性能展示



图：不同组蛋白修饰的CUT&Tag及Multi-CUT&Tag实验结果
Multi-CUT&Tag可以实现一份样本，两种不同组蛋白修饰的研究。组蛋白修饰同时研究的数据拆分后的结果与常规单靶标研究结果一致。



产品推荐

产品名称	货号	规格
Hieff NGS® G-Type In-Situ DNA Binding Profiling Library Prep Kit for Illumina® CUT&Tag建库试剂盒 (pA/G-Tn5款)	12598ES12/48	12 T/ 48 T
Hieff NGS® Multi-CUT&Tag Library Prep Kit for Illumina® Multi-CUT&Tag试剂盒 (Nanobody-Tn5款)	12592ES12/48	12 T/ 48 T
Hieff NGS® Tagment Index Kit for Illumina® Tn5测序接头	12416ES24/96	48 T/ 192 T
Hieff NGS® OnePot Pro DNA Library Prep Kit V2 CUT&RUN、ChIP-seq以及DAP-seq搭配的DNA建库试剂盒	13577ES24/96	24 T/ 96 T
Hieff NGS® 384 CDI Primer for Illumina®	12413ES02	96×2T

2.2 双荧光素酶报告检测实验

荧光素酶报告基因是指以荧光素(luciferin)为底物来检测萤火虫荧光素酶(firefly luciferase)活性的一种报告系统。荧光素酶可以催化luciferin氧化成oxyluciferin, 在luciferin氧化的过程中, 会发出生物荧光(bioluminescence)。

双荧光素酶实验能够检测启动子活性、转录因子鉴定、miRNA 与LncRNA/circRNA/mRNA互作等。



实验步骤



性能展示

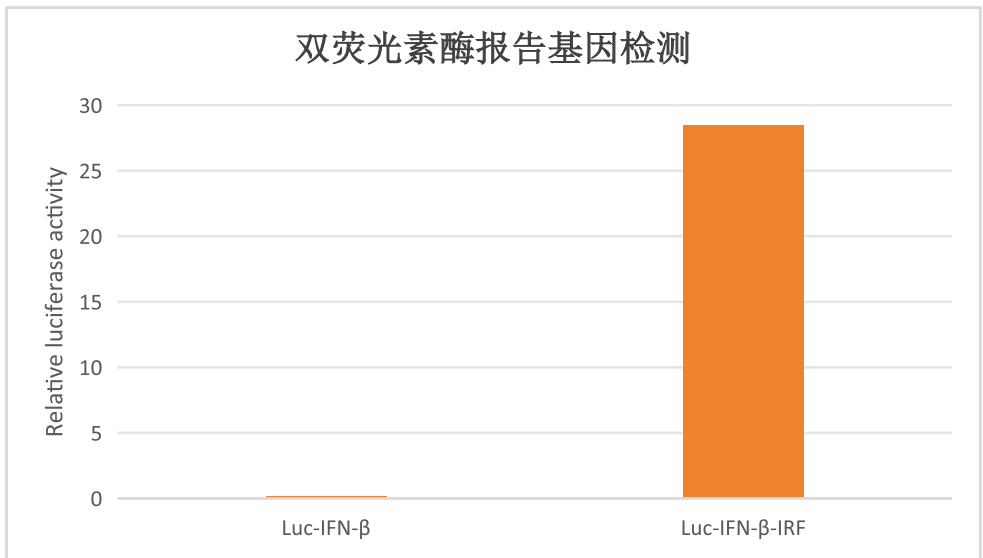


图: 转录因子IRF3对IFN-β启动子的调控作用
构建Luc-IFN-β启动子载体和IRF3的过表达载体后进行共转染实验, 之后双荧光素酶报告基因检测显示转录因子IRF3对IFN-β具有调控作用。



产品推荐

产品名称	货号	规格
Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit 双荧光素酶报告基因检测试剂盒HOT	11402E560/80	100 T/1000 T
Luciferase Reporter Gene Assay Kit 萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂盒	11401E560/76/80	100 T/500 T/1000 T
pGM-CMV Luciferase Reporter Plasmid Positive Control pGM-CMV- Luc荧光素酶报告基因质粒阳性对照	11556E503	1 µg
Luciferase Reporter Plasmid negative control (荧光素酶报告基因质粒阴性对照)	11555E503	1 µg
pGMLR-CMV Luciferase Reporter Plasmid (pGMLR-CMV海肾荧光素酶报告基因质粒)	11558E503	1 µg

2.3 CoIP或GST-pull down

CoIP或GST-pull down是研究互作蛋白的技术。在DNA-蛋白质互作研究时,通常会发现,在调控DNA区域,或出现多个蛋白共结合的情况,此时可能是蛋白质不同亚型或者不同蛋白组成复合体后发挥调控功能。这种情况下,需要进行湿实验验证,CoIP或者GST-pull down是使用较多的技术。

酵母双杂交是将待研究的两种蛋白质分别克隆(融合)到酵母表达质粒的转录激活因子(如GAL4等)的DNA结合结构域(DNA-BD)和转录激活域(AD)上,构建成融合表达载体,从表达产物分析两种蛋白质相互作用的系统。

	CoIP	GST-pull down	酵母双杂交
原理	抗原抗体特异性反应	GST对谷胱甘肽偶联磁珠得特异性	真核生物转录调控过程
检测瞬时相互作用	否	否	是
检测弱相互作用	否	否	是
检测直接相互作用	否	是	否
验证方式	体内直接或间接相互作用检测	体外直接得相互作用检测	体内直接或间接相互作用检测
是否需要蛋白纯化	否	是	否
是否需要抗体	是	否	否



实验步骤

CoIP实验步骤



GST-pull down实验步骤



酵母双杂交实验步骤





产品推荐

产品名称	货号	规格
蛋白A/G琼脂糖纯化树脂	36403ES03/05/08/25/60	1/2/5/25/100 mL
蛋白A/G琼脂糖快速纯化树脂	36404ES08/25/60	5 /25 /100 mL
蛋白A/G免疫沉淀磁珠	36417ES03/08	1/5 mL
GSTSep Glutathione MagBeads GST标签蛋白纯化磁珠	20562ES03/05/08/25	1/2/5/25 mL
X- α -Gal 5-溴-4-氯-3-吡啶- α -D-吡喃半乳糖苷	10903ES25/60/72/76	25/100/250/500 mg
Aureobasidin A(AbA) 金担子素A	60231ES03/08/10	1/5/10 mg
WB/IP裂解液	20118ES60	100 mL
蛋白酶抑制剂Cocktail	20124ES03/10/60/76	1/10/100/500 mL
高分辨率预制胶	36245ES-36256ES10	1盒 (10块)
蛋白marker (8-180 KDa)	20350ES72/76/90	1/2/10 \times 250 μ L
快速封闭液	36122ES60/76	100/500 mL
β -actin, Mouse mAb	30101ES10/50	10/50 μ L
GADPH (Clone1A6), Mouse mAb	30201ES10/50	10/50 μ L
His-Tag, Mouse mAb	30405ES10/50	10/50 μ L
HA-Tag, Mouse mAb	30704ES10/50	10/50 μ L
GST-Tag, Mouse mAb	30901ES10/50	10/50 μ L
ECL化学发光超敏显色试剂盒	36208ES60/76	100/500 mL

YEASEN

聚焦生命科学工具，让世界更健康更快乐



扫码关注
了解更多工业资讯



扫码进入翌圣商城
查看更多活动信息

Tel: 400-6111-883

E-mail: marketing@yeasen.com