



表观遗传技术

服务手册 \ Service Manual



客户服务中心



微信公众号

上海天昊生物科技有限公司

上海市浦东新区康桥路787号9号楼

www.geneskybiotech.com

400-065-6886 021-50802059

上海天昊生物科技有限公司

Genesky Biotechnologies Inc., Shanghai

上海天昊生物科技有限公司

上海天昊生物科技有限公司，2008年4月创建于上海浦东张江高科技园区。作为上海高新技术企业，天昊生物研发了多项具有国际水平的专利技术，包括多种 SNP 分型和拷贝数检测技术、微生物 16S 扩增子绝对定量技术，在 2018 年荣获“浦东新区企业研发机构”称号，2023 年荣获“上海市专精特新中小企业”称号。

01 | 丰富的项目经验

天昊生物在人类医学遗传和动植物、微生物领域已经形成了涉及分子生物学、基因组学和遗传学相关科研服务体系超过 100 类迄今已经为国内外近 1366 多家科研院校医疗单位和生物公司提供了超过 2 万多项科研技术服务。

02 | 专业的技术团队

天昊生物拥有一支长期从事基因及遗传分析的专业团队，公司总经理姜正文博士获得江苏省“双创人才”、苏州工业园区“领军人才”等荣誉，并荣获 2018 年度“上海市青年科技杰出贡献奖”和 2018 年度“浦东新区创新成就奖”。市场部售前专家团队全部具有国内知名院校医学或遗传学博士学位；公司技术及研发专业团队硕士及以上学历占 60%。

03 | 创新的专利技术

上海天昊独立研发了多项 SNP 分型和 CNV 检测的专利技术，另外利用二代测序技术开发出 FastTarget® 目的区域富集测序、MethylTarget® 多重目的区域甲基化富集测序及 Accu16S® 细菌绝对定量测序技术等。截至 2023 年 5 月，公司递交了 5 项 PCT 专利，43 项国内发明专利，54 项软件著作权已注册 48 件商标。

目录 CONTENTS

全基因组甲基化测序	03
人 935K 甲基化芯片检测	04
MethylTarget® 多重目的区域甲基化富集测序	05
DNA 甲基化分析结果展示	06
DNA 甲基化合作文章集锦	07
DNA 甲基化部分合作文章列表	10
全基因组羟甲基化测序	11
多重目的区域羟甲基化富集测序	12
DNA 羟甲基化合作文章集锦	13
m6A RNA 甲基化测序	15
m6A RNA 甲基化合作文章集锦	17
ATAC-seq 染色质可及性测序	20
ATAC-seq 合作文章集锦	22

全基因组甲基化测序

技术简介

全基因组重亚硫酸盐测序 (WGBS) 是基于重亚硫酸盐处理的甲基化分析方法, 首先通过重亚硫酸盐对样本 DNA 进行处理, 将未甲基化的 C 碱基转化为 U 碱基, 而甲基化的 C 碱基不会改变, 进行 PCR 扩增后 U 碱基会变成 T, 与原本甲基化的 C 碱基区分开, 再结合高通量测序技术, 可绘制单碱基分辨率的全基因组 DNA 甲基化图谱。该技术适用于所有具有参考基因组的物种, 实现真正意义上的全基因组甲基化检测。

技术路线



分析路线



样本要求与建议

- a) 样本类型: 完整无污染的基因组 DNA
- b) 样本浓度: 浓度 ≥ 50 ng/ μ L
- c) 样本纯度: OD260/280 介于 1.8-2.0, OD260/230 ≥ 2.0
- d) 样本需求量: 总量 ≥ 4 μ L

人935K甲基化芯片检测

技术简介

Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip Kit (935K) 是一种全基因组甲基化筛选工具, 靶向人类甲基化组最具生物学意义的区域中超过 935,000 个 CpG 位点, 同时在其前代产品 MethylationEPIC v1.0 (850K) 的基础上极大的提高了向后兼容性。该芯片保留了以单核苷酸分辨率定量分析全基因组 CpG 的能力, 同时提供高度准确和精确的甲基化测量, 不受测序深度的影响。可使用精简、用户友好的 Infinium 甲基化检测分析多种 DNA 样本类型, 包括从 FFPE 分离的 DNA 样本。与其他方法相比, MethylationEPIC v2.0 具有可扩展性和更低的单个样本总成本, 因此可用于筛选大型队列, 发现关于疾病机制的有影响力的生物学见解。

技术路线



分析路线



样本要求与建议

- a) 样本类型: 完整无污染的基因组 DNA
- b) 样本浓度: 浓度 ≥ 50 ng/ μ L
- c) 样本纯度: OD260/280 介于 1.8-2.0, OD260/230 ≥ 2.0
- d) 样本需求量: 总量 ≥ 1 μ L

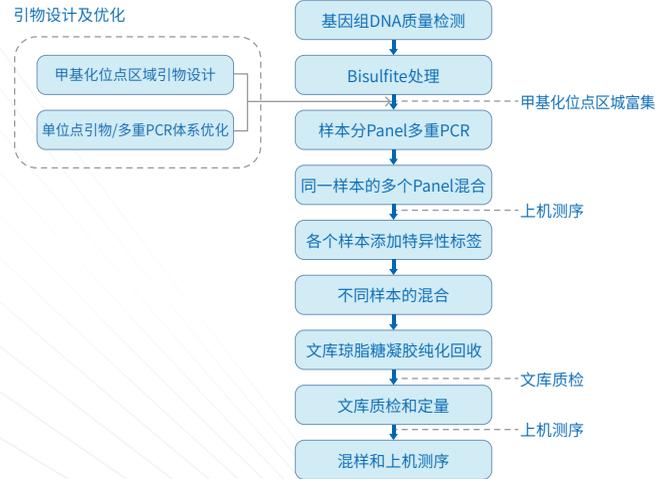
MethylTarget®多重目的区域甲基化富集测序

技术简介

甲基化是一种非常重要的表观遗传学标记信息，参与了包括基因调控、生物发育、疾病发生等多种生物学过程。除了全基因组水平的甲基化研究，对于众多目的基因的甲基化研究则更有针对性和大样本可行性。使用亚硫酸氢盐处理DNA后，天昊生物结合目的区域富集和二代测序技术，推出自主研发的多重目的区域甲基化富集测序技术——MethylTarget®，在大幅度降低研究费用的同时实现个性化目的区域甲基化富集测序。

技术路线

分析路线



样本要求与建议

- a) 样本类型: 完整无污染的基因组 DNA
- b) 样本浓度: 浓度 ≥ 20 ng/μL
- c) 样本纯度: OD260/280 介于 1.8-2.0, OD260/230 ≥ 2.0
- d) 样本需求量: 总量 ≥ 1 μg (满足 70 个目的片段测序)

DNA甲基化分析结果展示



图1 基因组范围差异甲基化区域所在基因元件信息统计

图2 所有甲基化位点曼哈顿图

图3 各样本的甲基化程度violin图

图4 组间不同样本利用差异甲基化位点绘制PCA图

图5 差异区域上各差异甲基化位点的甲基化值点线图

图6 目标基因不同位点甲基化水平折线图

图7 差异甲基化位点火山图

图8 差异甲基化基因GO富集条形图

DNA甲基化合作文章集锦

代表文章 1: 系统性硬化症患者 T 细胞中发现甲基化 marker

中文题目: 全基因组 DNA 甲基化研究发现系统性硬化症患者 CD4+ 和 CD8+ T 细胞的干扰素相关基因表现低甲基化

英文标题: Genome-Wide DNA Methylation Analysis in Systemic Sclerosis Reveals Hypomethylation of IFN-Associated Genes in CD4+ and CD8+ T Cells

发表杂志: Journal of Investigative Dermatology

影响因子: 6.5

发表时间: 2018 年

主要结果: 本研究首先对 24 例患者和 24 例对照的 CD4 及 CD8 细胞进行全基因组范围甲基化检测 (450K 芯片), 确定差异甲基化位点后, GO 富集分析发现干扰素相关通路基因在 2 种 T 细胞的 DMR 中都显著富集 (图 1a, c)。然后利用目的区域甲基化技术检测第一阶段的部分样本, 表明 450K 甲基化芯片和目的区域甲基化技术结果的一致性非常好

(图 1b)。Pearson 相关性高达 86% 和 90%。目的区域甲基化技术在独立扩大样本中验证第一阶段获得的干扰素信号通路基因 (16 个基因; 62 个位点), 其中 5 个基因的差异甲基化得到验证 (图 1d)。另外通过检测干扰素信号通路基因的表达量, 部分基因的表达量与甲基化程度表现显著的负相关。通过检测血液 IFN- α 、IFN- β 水平, 发现部分干扰素信号通路基因高表达与高 IFN- α 、IFN- β 水平相关。

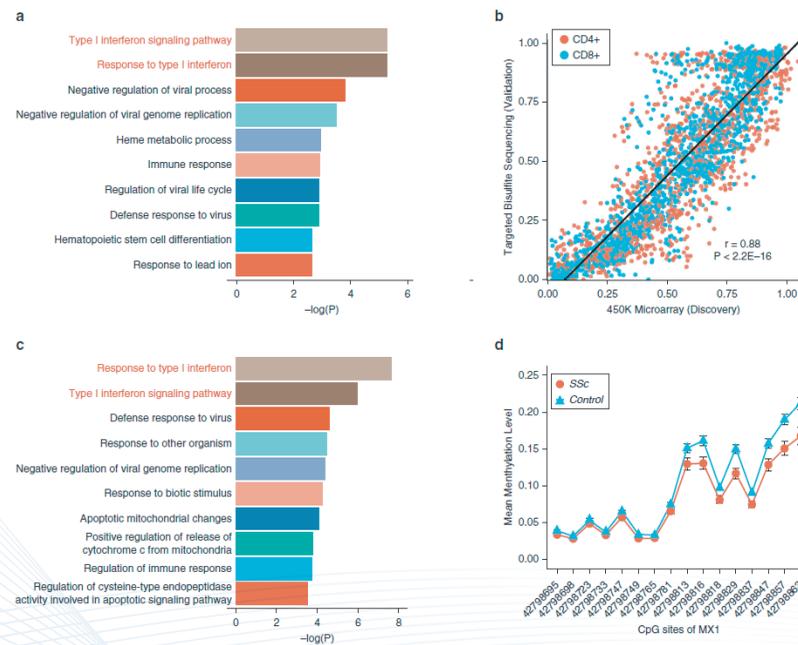


图1 GO分析及目的区域甲基化测序验证差异甲基化位点

代表文章 2: 类风湿性关节炎 DNA 甲基化标志物

中文题目: 外周血单核细胞中类风湿性关节炎相关的 DNA 甲基化位点

英文标题: Rheumatoid arthritis-associated DNA methylation sites in peripheral blood mononuclear cells

发表杂志: Annals of the Rheumatic Diseases

影响因子: 27.4

发表时间: 2018 年

主要结果: 本研究首先对来自 RA 患者和健康对照的外周血单个核细胞进行了全基因组 DNA 甲基化 (450K 芯片) 和 mRNA 表达谱分析, 并对 DNA 甲基化与 mRNA 表达数据进行相关性分析和因果推理检验。发现与 RA 相关的 DNA 甲基化位点共有 1046 个, 所鉴定的差异甲基化位点 (DMP) 对 mRNA 表达有调控作用。因果推理检验鉴定了 6 条 DNA 甲基化-mRNA-RA 调控链。所鉴定的 DMP 与基因形成干扰素诱导基因相互作用网络 (如 MX1、IFI44L、DTX3L 和 PARP9)。利用目的基因甲基化测序和定量 PCR 验证了 10 个感兴趣的 DMP/ 基因的甲基化和表达水平, 最终发现 PARP9 甲基化与 RA 患者 Jurkat 细胞和 T 淋巴细胞 mRNA 水平相关 (图 1)。PARP9 基因对 Jurkat 细胞的细胞周期、细胞增殖、细胞活化和炎症因子 IL-2 的表达有重要影响。这一研究表明 DNA 甲基化在 RA 的病理中具有重要作用。

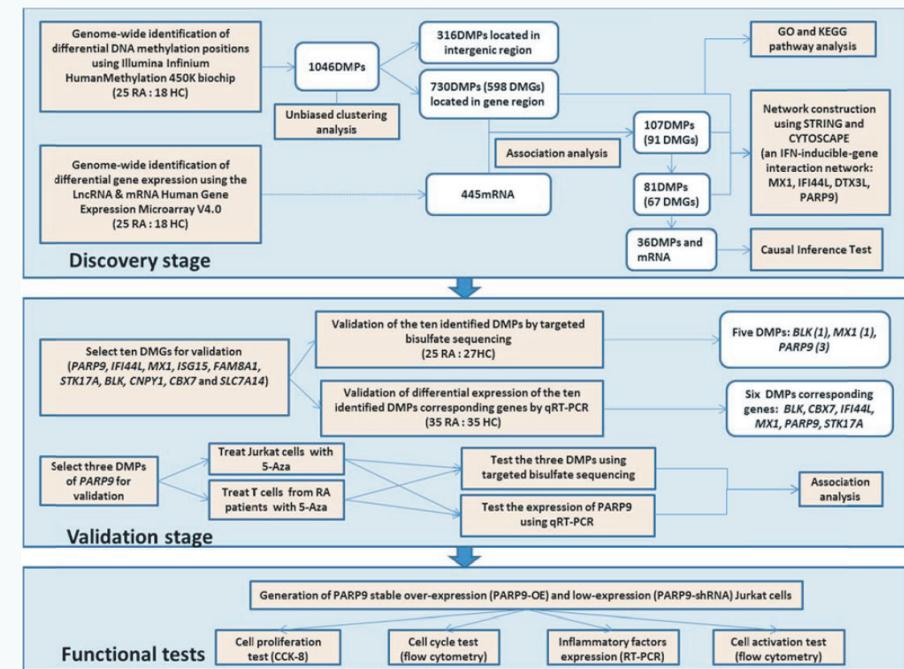


图1 研究思路流程图

代表文章 3: 子痫前期表观调控新机制

中文题目: lncRNA TUG1 介导的新调控机制网络诱导子痫前期螺旋动脉重构损伤

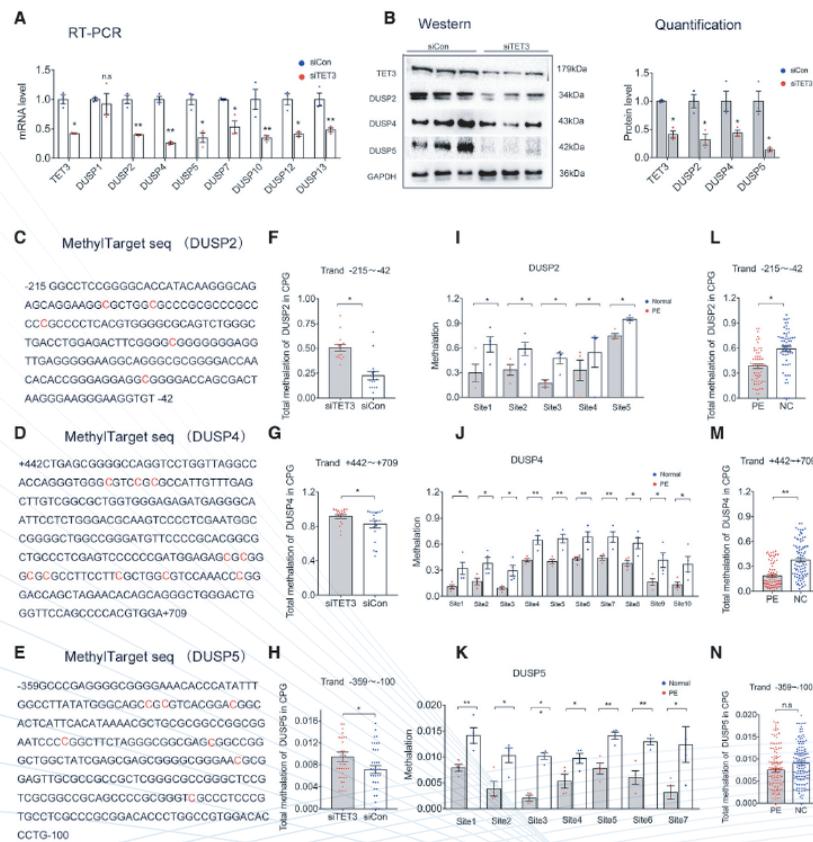
英文标题: A novel regulatory mechanism network mediated by lncRNA TUG1 that induces the impairment of spiral artery remodeling in preeclampsia

发表杂志: Molecular Therapy

影响因子: 12.4

发表时间: 2022 年

主要结果: 子痫前期 (PE) 与产妇和胎儿围产期的发病率和死亡率有关, 它带来了巨大的痛苦, 并在全世界造成了经济负担。子宫螺旋动脉重塑的失败可能与滋养层细胞功能异常有关, 并导致 PE 的发生和发展。长链非编码 RNA (lncRNA) 异常表达与子宫螺旋动脉重构失败有关。然而, 在 PE 中 lncRNA 表达的调控还不明确。该研究报道了缺氧



诱导的 miR-218 通过靶向 FOXP1 抑制 lncRNA TUG1 的表达。进一步的 RNA 测序和机制分析显示, 沉默 TUG1 通过与细胞核中的 SUV39H1 结合, 增加了 DNA 去甲基化酶 TET3 和增殖相关的 DUSP 家族, 包括 DUSP2, DUSP4 和 DUSP5 的表达。此外, TUG1 通过 TET3 介导的表观遗传机制在体外调控 DUSP 家族 (目的区域甲基化测序, 图 1)。综上所述, 当前研究结果揭示了一个由 TUG1 介导的新的调节网络, 它是 PE 发病机制的基本决定因素, 调节细胞生长, 并可能调控其他疾病的发生和发展。

图 1 TET3 依赖的 DUSP 家族表观遗传调控

DNA 甲基化部分合作文章列表

英文标题	中文标题	杂志 (2023年IF)	年份
A multiplex blood-based assay targeting DNA methylation in PBMCs enables early detection of breast cancer	PBMC 中靶向 DNA 甲基化的多重血液检测能够实现乳腺癌早期诊断	Nature Communications (IF: 16.6)	2023
DNA methylation-based testing in peripheral blood mononuclear cells enables accurate and early detection of colorectal cancer	基于 DNA 甲基化的外周血单个核细胞检测能够准确、早期诊断结肠癌	Cancer Research (IF: 11.2)	2023
DNA hypermethylation-induced miR-182 silences targets BCL2 and HOXA9 to facilitate the self-renewal of leukemia stem cell, accelerate acute myeloid leukemia progression, and determine the sensitivity of BCL2 inhibitor venetoclax	DNA 高甲基化诱导 miR-182 沉默, 上调靶基因 BCL2 和 HOXA9, 促进白血病干细胞自我更新, 从而加速 AML 进展, 并确定 BCL2 抑制剂维奈托克的敏感性	Theranostics (IF: 12.4)	2023
Regulation of Hsa-miR-4639-5p expression and its potential role in the pathogenesis of Parkinson's disease	Hsa-miR-4639-5p 表达调控及其在帕金森病发病机制中的潜在作用	Aging Cell (IF: 7.8)	2023
The impact of HTR1A and HTR1B methylation combined with stress/genotype on early antidepressant efficacy	HTR1A 和 HTR1B 甲基化结合应激 / 基因型与抗抑郁疗效相关	Psychiatry and Clinical Neuroscience (IF: 11.9)	2022
Combined HTR1A/1B methylation and human functional connectome to recognize patients with MDD	联合 HTR1A/1B 甲基化和人类功能连接组识别 MDD 患者	Psychiatry Research (IF: 11.3)	2022
DNA hydroxymethylation reprogramming of β -oxidation genes mediates early-life arsenic-evoked hepatic lipid accumulation in adult mice	β -氧化相关基因羟甲基化重塑诱导了成年小鼠早期砷诱发的肝脏脂质积累	Journal of Hazardous Materials (IF: 13.6)	2022
DNA methylations of brain-derived neurotrophic factor exon VI are associated with major depressive disorder and antidepressant-induced remission in females	脑源性神经生长因子第六外显子的 DNA 甲基化与女性的重度抑郁症和抗抑郁剂治疗的疾病缓解有关	Journal of Affective Disorders (IF: 6.6)	2021
Association between methylation of BIN1 promoter in peripheral blood and preclinical Alzheimer's disease	外周血中 BIN1 启动子的甲基化与临床前阿尔茨海默病的关系	Translational Psychiatry (IF: 6.8)	2021
Hypermethylation of GNA14 and its tumor-suppressive role in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma	GNA14 高甲基化及其在乙型肝炎病毒相关肝癌中的抑制作用	Theranostics (IF: 12.4)	2021
Combined effects of progesterone and SOCS3 DNA methylation on T2DM: a case-control study	黄体酮和 SOCS3 DNA 甲基化对 T2DM 的联合作用: 一项病例对照研究	Clinical Epigenetics (IF: 5.7)	2021
DNA Methylation Patterns in the HLA-DPB1 and PDCD1LG2 Gene Regions in Patients with Autoimmune Thyroiditis from Different Water Iodine Areas	不同水碘区自身免疫性甲状腺炎患者 HLA-DPB1 和 PDCD1LG2 基因区 DNA 甲基化模式	Thyroid (IF: 6.6)	2021
Deoxyribonucleic acid methylation signatures in sperm deoxyribonucleic acid fragmentation	精子脱氧核糖核酸断裂中的 DNA 甲基化特征	Fertility and Sterility (IF: 6.7)	2021
Genome-wide methylation sequencing identifies progression-related epigenetic drivers in myelodysplastic syndromes	全基因组甲基化测序鉴定骨髓增生异常综合征进展相关的表观遗传驱动因素	Cell Death & Disease (IF: 9.0)	2020
Identification and validation of prognosis-related DLX5 methylation as an epigenetic driver in myeloid neoplasms	髓系肿瘤中与预后相关的 DLX5 甲基化作为表观遗传驱动因素的鉴定和验证	Clinical and Translational Medicine (IF: 10.6)	2020

全基因组羟甲基化测序

技术简介

5- 羟甲基胞嘧啶 (5hmC) 是甲基化胞嘧啶 (5mC) 在 TET 蛋白酶氧化作用下产生的一种表观遗传学修饰。5hmC 具有重要的生物学功能, 不仅在 DNA 去甲基化调控过程中起作用, 并参与染色体重编程、基因转录与表达等生物学过程, 且 5hmC 可能与特定的疾病发生密切相关, 或可成为某些疾病早期诊断的分子标志物。

与 5mC 相比, 5hmC 在组织中含量更低, 检测难度更大。随着高通量测序技术的发展, 目前已有多种实验方法能够用于羟甲基化的检测, 包括羟甲基化 DNA 免疫共沉淀测序 (hMeDIP-seq)、TET 辅助的亚硫酸盐测序 (TAB-seq)、氧化-亚硫酸盐测序 (oxBS-seq) 等, 但 hMeDIP-seq 无法达到单碱基分辨率, 广泛使用的亚硫酸盐处理会造成 DNA 断裂损伤等问题的存在使羟甲基化检测受到限制。因此, 发展可靠、准确和灵敏的 5hmC 检测技术对生物学、转化医学等研究具有重要意义。

全基因组羟甲基化测序方法原理是使用 AID/APOBEC 家族 DNA 脱氨酶—APOBEC 代替化学脱氨, 该酶可特异性地使 C 及 5mC 脱氨为 U/T, 而 5hmC 经保护不受其脱氨作用而被检测识别。该方法无需亚硫酸氢盐, 可在单碱基分辨率条件下进行 5hmC 的检测定位, 起始量低, 准确性高, 性价比优, 是 DNA 羟甲基化研究的强有力工具。

技术及分析路线



样本要求与建议

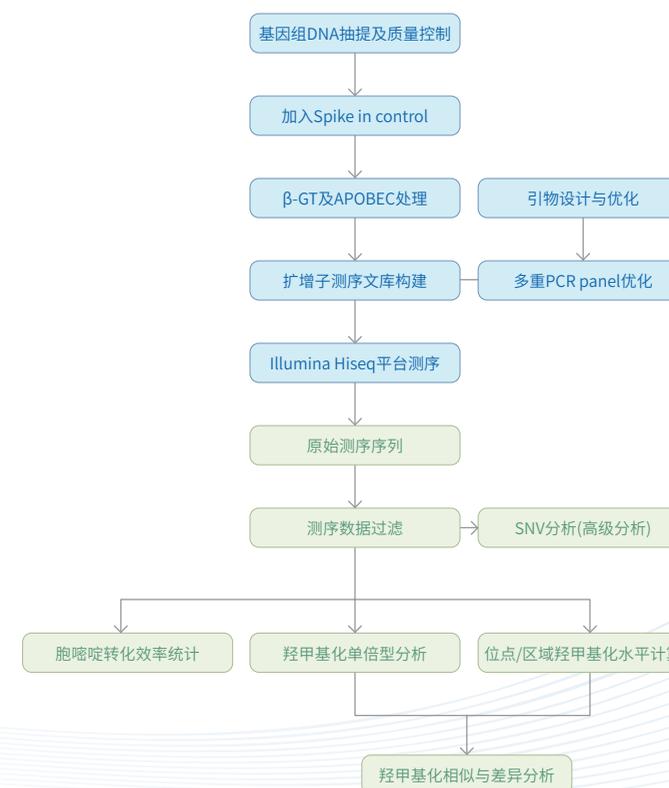
- a) **样本类型:** 溶解于蒸馏水或 TE (pH 8.0) 中的基因组 DNA
- b) **样品需求量:** Qubit 检测, 要求浓度 ≥ 20 ng/ μ L, 总量 ≥ 500 ng
- c) **样品纯度:** 样本无色透明, 粘度低, 琼脂糖凝胶电泳检测无挂孔
- d) **样品完整性:** 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 完整性, 要求电泳条带清晰可见, 无明显降解, 且无 RNA 污染

多重目的区域羟甲基化富集测序

技术简介

新兴的 APOBEC 偶联表观遗传测序 (ACE-seq) 无需亚硫酸盐处理, 处理起始量低, 可在单碱基分辨率条件下进行 5hmC 的检测, 开启了表观遗传研究的新探索。我们基于 ACE-seq 方法, 依托公司多重 PCR 的专利技术, 实现对多个特定 CpG 岛同时捕获测序, 并凭借高深度测序数据, 能够准确计算每个 CpG 位点的羟甲基化水平。该技术准确性高, 起始量低, 灵活性强, 性价比优, 为 DNA 羟甲基化研究提供有效的实验工具。

技术及分析路线



样本要求与建议

- a) **样本类型:** 溶解于蒸馏水或 TE (pH 8.0) 中的基因组 DNA
- b) **样品需求量:** Qubit 检测, 要求浓度 ≥ 20 ng/ μ L, 总量 ≥ 500 ng (可检测 30 个片段)
- c) **样品纯度:** 样本无色透明, 粘度低, 琼脂糖凝胶电泳检测无挂孔
- d) **样品完整性:** 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 完整性, 要求电泳条带清晰可见, 无明显降解, 且无 RNA 污染

DNA羟甲基化合作文章集锦

代表文章 1: 羟甲基化在砷暴露中对肝脏的重要影响

中文题目: β-氧化基因 DNA 羟甲基化重编程介导了成年小鼠早期砷诱发的肝脏脂质积累

英文标题: DNA hydroxymethylation reprogramming of β-oxidation genes mediates early-life arsenic-evoked hepatic lipid accumulation in adult mice

发表杂志: Journal of Hazardous Materials

影响因子: 13.6

发表时间: 2022 年

主要结果: 为了探讨早期砷暴露是否对成年小鼠肝脏脂代谢相关基因表观遗传重编程产生影响, 作者利用 LC-MS/MS 发现暴露组 5mC 和 5hmC 在基因组水平上并没有显著改变。利用天昊生物多重目的区域甲基化测序技术 MethylTarget® 对肝脏脂代谢相关基因 Fasn, Srebf1, Cpt1a, Ppara, Atgl 和 Mtp 的 5mC 修饰水平进行分析, 发现部分基因的 CpG 片段甲基化水平发生改变 (如图 1A-D)。同时, 利用天昊生物基于 ACE-seq 自主设计的多重目的区域羟甲基化测序技术分析了这些基因的 5hmC 水平, 部分片段的羟甲基化水平也发生了显著变化 (如图 1E-H)。

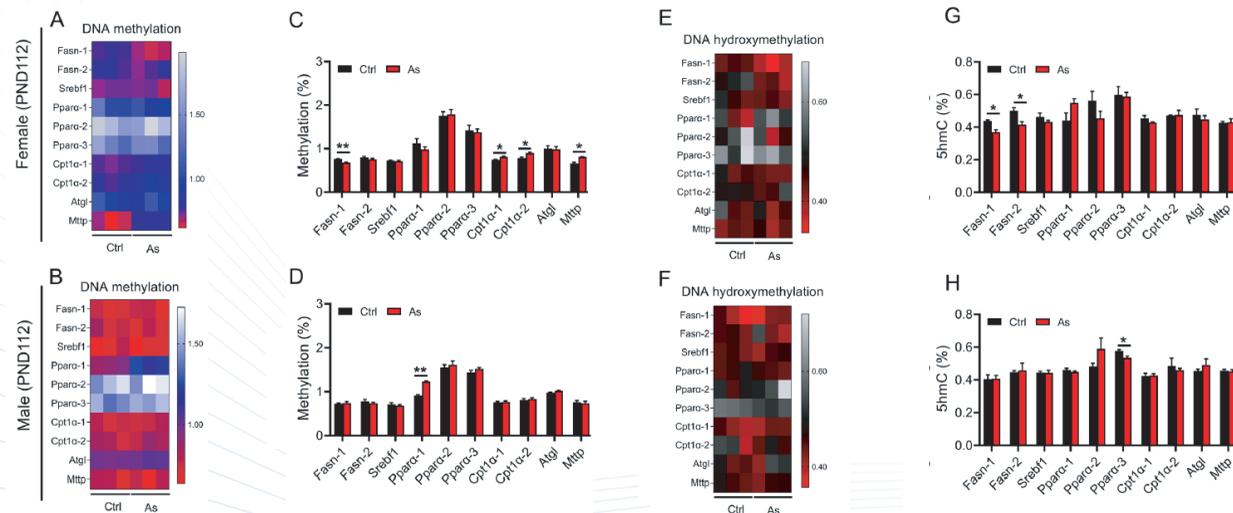


图1 早期砷暴露改变了小鼠成年后代肝脏脂代谢相关基因甲基化和羟甲基化

代表文章 2: 环境暴露通过表观遗传引起焦虑样行为

中文题目: 妊娠期1-硝基芘暴露导致雄性成年后代的焦虑样行为部分是通过改变海马突触可塑性的表观遗传重编程引起的

英文标题: Gestational 1-nitropyrene exposure causes anxiety-like behavior partially by altering hippocampal epigenetic reprogramming of synaptic plasticity in male adult offspring

发表杂志: Journal of Hazardous Materials

影响因子: 13.6

发表时间: 2023 年

主要结果: 本研究利用天昊生物基于 ACE-seq 自主设计的多重目的区域羟甲基化测序技术检测了 Nrg1 和 Erbb4 基因中的 5hmC 含量。Nrg1 和 Erbb4 基因 CpG 片段的总 5hmC 含量无显著差异 (图 1D)。有趣的是, 在暴露于 10 μg/kg 1-NP 的胎儿中, Nrg1 基因中两个 CpG 位点 (32008909 和 32009239) 的 5hmC 含量降低。此外, Erbb4 基因中三个 CpG 位点 (69107743、69107866 和 69107899) 的 5hmC 含量在暴露于 100 μg/kg 1-NP 的胎儿中降低 (图 1E-G)。检测胎儿前脑 TET1、TET2、TET3 表达及 TET 活性, 尽管对 Tet1、Tet2、Tet3 mRNA 及其蛋白没有显著影响, 但 100 μg/kg 1-NP 组胎儿前脑 TET 活性降低, 相应地, 100 μg/kg 1-NP 组胎儿前脑 α-KG 含量降低 (图 1H-L)。这些结果表明, 妊娠期 1-NP 暴露降低了胎儿前脑 TET 活性和 gephyrin 相关基因的 5hmC。

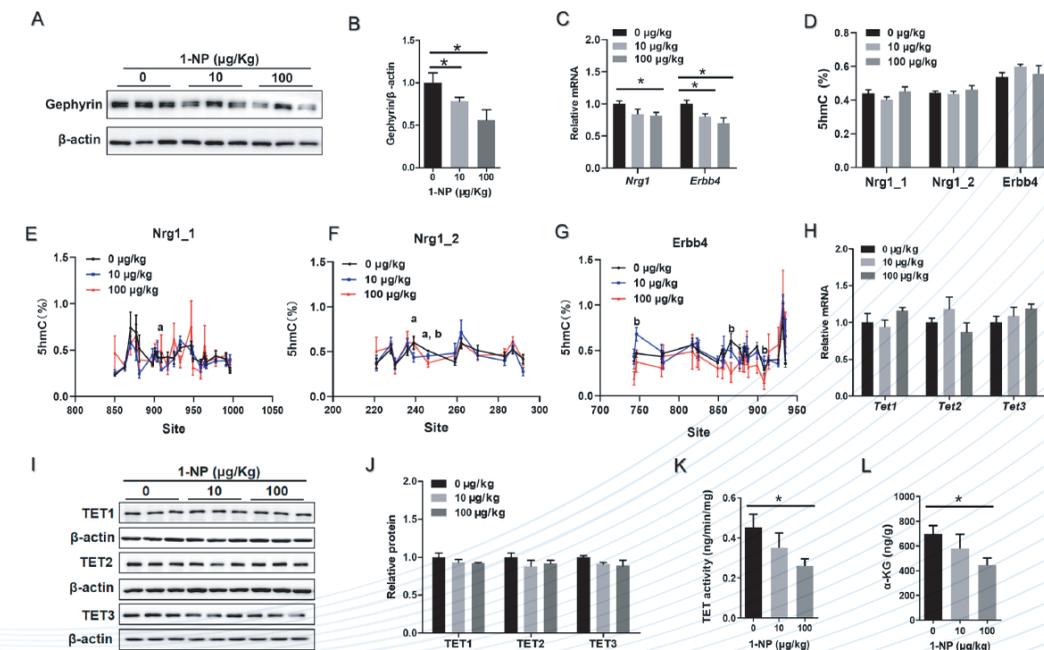


图1 妊娠期1-NP暴露可通过抑制胎儿前脑TET活性降低gephyrin相关基因的5hmC

m6A RNA甲基化测序

技术简介

N6-甲基腺嘌呤 (m6A) 修饰是真核生物mRNA中最普遍的内部修饰，通常m6A修饰嵌入在5'-DRACH-3' (D=G/A/U, R=G/A, H=A/U/C)保守的共有序列中，而且主要富集在终止密码子区域，表明m6A修饰的分布特征可能具有重要的生物学功能。m6A RNA甲基化测序 (MeRIP-seq) 是以RNA免疫共沉淀为基础，采用特异抗体对发生m6A甲基化修饰的RNA片段进行富集后测序的技术手段，能够准确识别100-200个核苷酸区域的m6A修饰，在m6A RNA表观修饰领域被广泛采用。

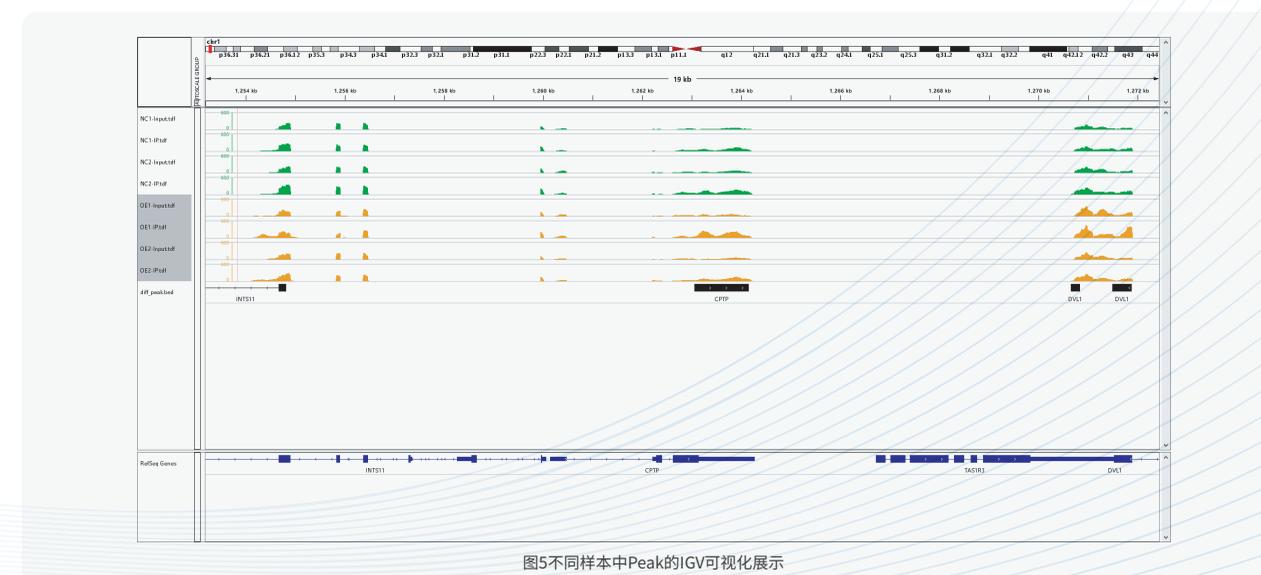
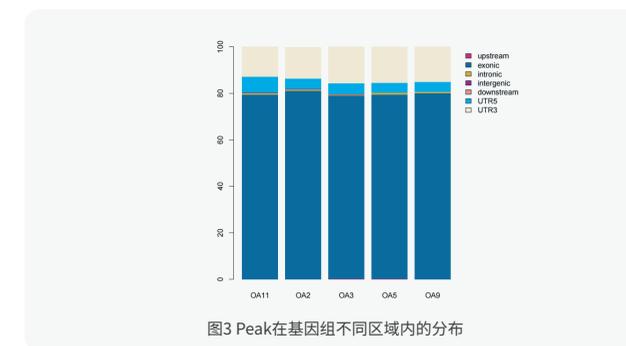
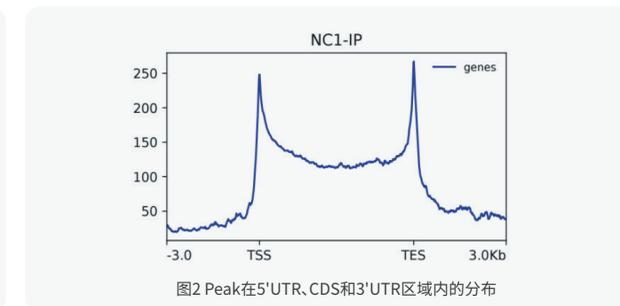
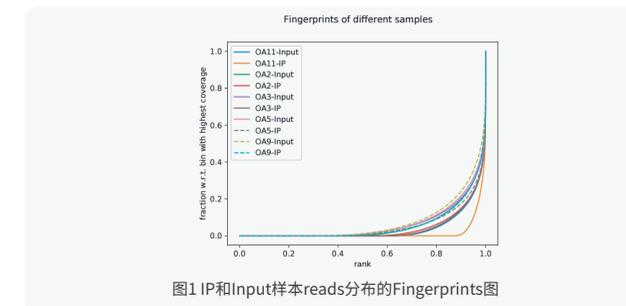
样本要求与建议

- a) 样本类型：完整无基因组 DNA 污染的 Total RNA
- b) 样本需求量：总量 ≥ 100 μg，浓度 ≥ 200 ng/μL
- c) 样本纯度：OD260/280 = 1.8~2.2，OD260/230 ≥ 2.0
- d) 样本完整度：Agilent 2100 检测 RIN 值 ≥ 7.0，28S/18S ≥ 1.0

技术路线



分析结果展示



m6A RNA甲基化合作文章集锦

代表文章 1: 肝癌 m6A 修饰调控新机制

中文题目: ALKBH5 通过 m6A 修饰表观上抑制下游靶点 LYPD1 限制了肝细胞癌的恶性

英文标题: ALKBH5 suppresses malignancy of hepatocellular carcinoma via m6A-guided epigenetic inhibition of LYPD1

发表杂志: Molecular Cancer

影响因子: 37.3

发表时间: 2020 年

主要结果: 作者首先应用 dot blot 检测了 ALKBH5 对 m6A 修饰的调节作用。ALKBH5 的缺失导致 Huh7 和 MHCC97H 细胞中 m6A 水平明显升高,而过表达 ALKBH5 则产生相反的结果(图 1A)。为了发现观察到的依赖 ALKBH5 表型的确切机制,作者利用稳定的 ALKBH5 过表达和载体转染的 HCCLM3 细胞(每组两个生物学重复),采用 MeRIP-seq 和 RNA-seq 相结合的方法。MeRIP-seq 显示,当 ALKBH5 上调时,有 1538 个差异的 m6A peaks 丰度降低(1344 个相应的转录本)。同时, RNA-seq 发现了 481 个在 ALKBH5 过表达时下调的转录本。

作者更重视甲基化模式和表达水平受 ALKBH5 调控的癌基因。因此只选择那些在 ALKBH5 过表达时同时具有低的 m6A peaks 和表达降低的转录本进行后续研究(图 1B)。为了进一步缩小候选基因的范围,集中在重叠的前 10 个基因,即 COCH、LYPD1、ADAMTS14、ABCA4、TP53I11、COLCA2、TMED7、CYP4F3、IL17RB 和 VCAN。在 ALKBH5 沉默或过表达的细胞中通过 qPCR 进行初步验证(图 1C)。有趣的是,在所有三种肝癌细胞中,只有 LYPD1 始终被 ALKBH5 负向调控(图 1D-G),western blot 结果进一步证实了这一点(图 H)。综上所述,LYPD1 可能是 ALKBH5 的直接下游靶点。

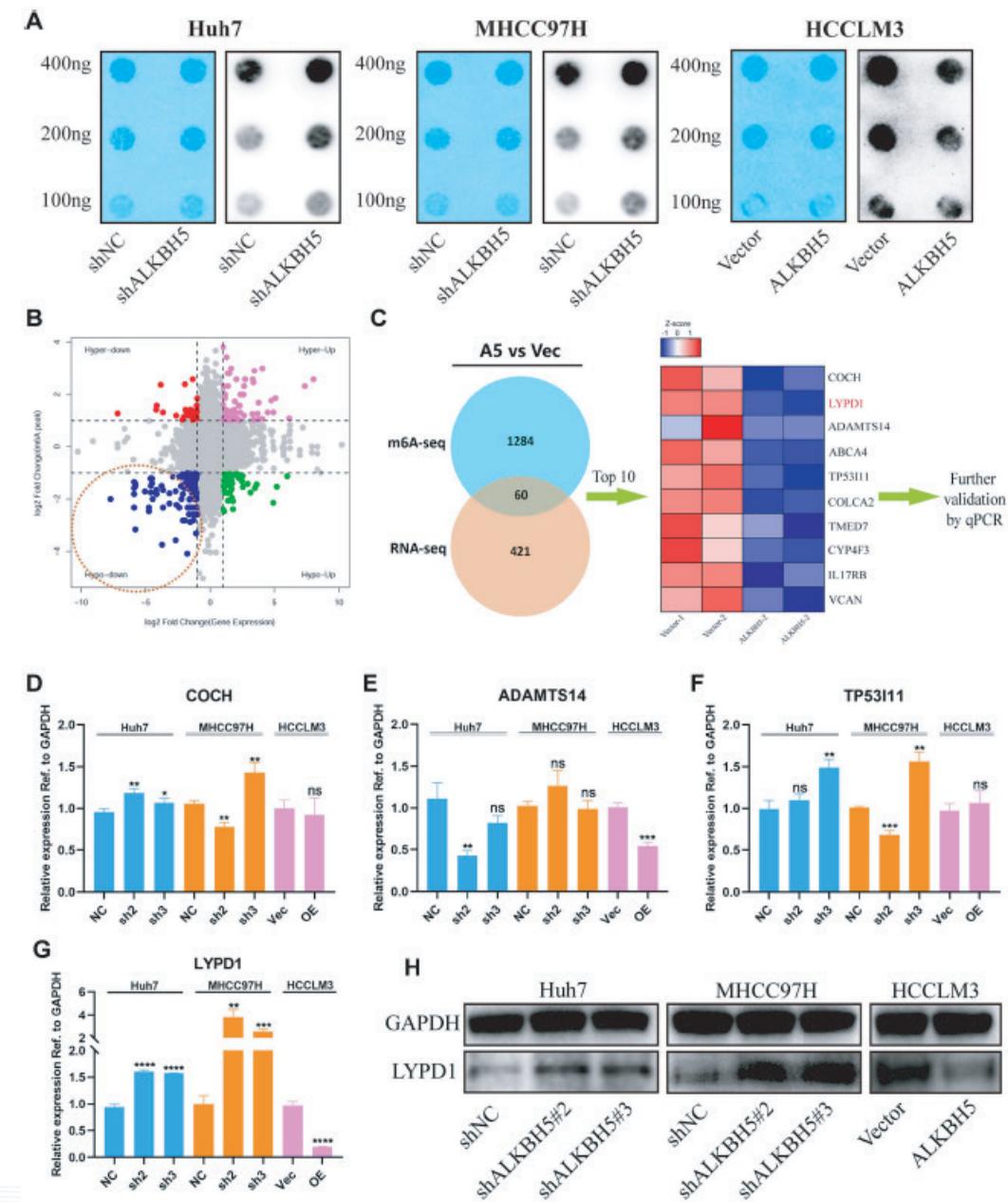


图1 MeRIP-seq结合RNA-seq发现LYPD1为ALKBH5的候选靶点

代表文章 2: 结直肠癌转移潜在新靶点

中文题目: TCF4 和 HuR 介导的 METTL14 通过 N6-甲基腺苷依赖的 ARRDC4 沉默抑制结直肠癌的转移

英文标题: TCF4 and HuR mediated-METTL14 suppresses dissemination of colorectal cancer via N6-methyladenosine-dependent silencing of ARRDC4

发表杂志: Cell Death & Disease

影响因子: 9.0

发表时间: 2021 年

主要结果: 本研究发现 METTL14, 作为 m6A 甲基化的一个关键成分, 在功能上与 ARRDC4/ZEB1 信号的抑制以及随之而来的 CRC 转移的抑制有关。实验结果揭示了 METTL14 介导的 m6A 修饰谱, 并通过 m6A 测序等确定了 ARRDC4 是 METTL14 的直接下游靶点 (图 1)。敲低 METTL14 可显著增强 ARRDC4 mRNA 的稳定性, 这依赖于 m6A 识别蛋白 YHTDF2。此外, 证明了 TCF4 可以诱导 METTL14 蛋白表达, 而 HuR 通过直接结合 METTL14 的启动子抑制 METTL14 的表达。在临床上, 结果表明, METTL14 的降低与预后不良相关, 是 CRC 生存的独立预测因子。总之, 当前研究结果表明 METTL14 作为转移抑制因子发挥作用, 并在 CRC 中定义了 TCF4/HuR-METTL14-YHTDF2-ARRDC4-ZEB1 的新信号轴, 可能是 CRC 的潜在治疗靶点。

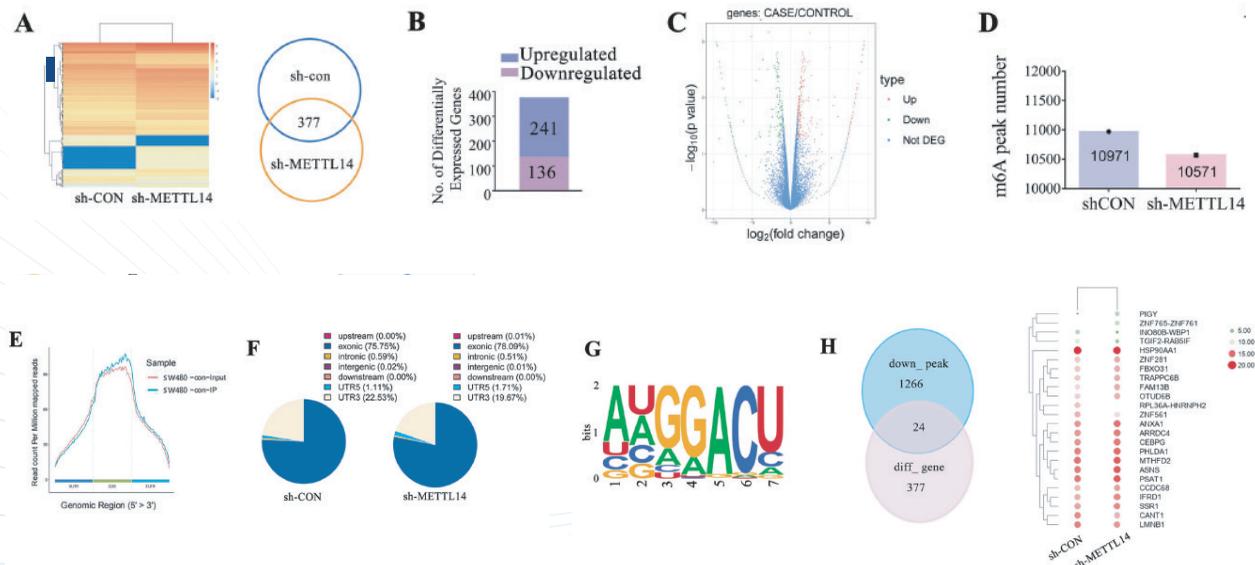


图1 MeRIP-seq结合RNA-seq发现METTL14的潜在靶点

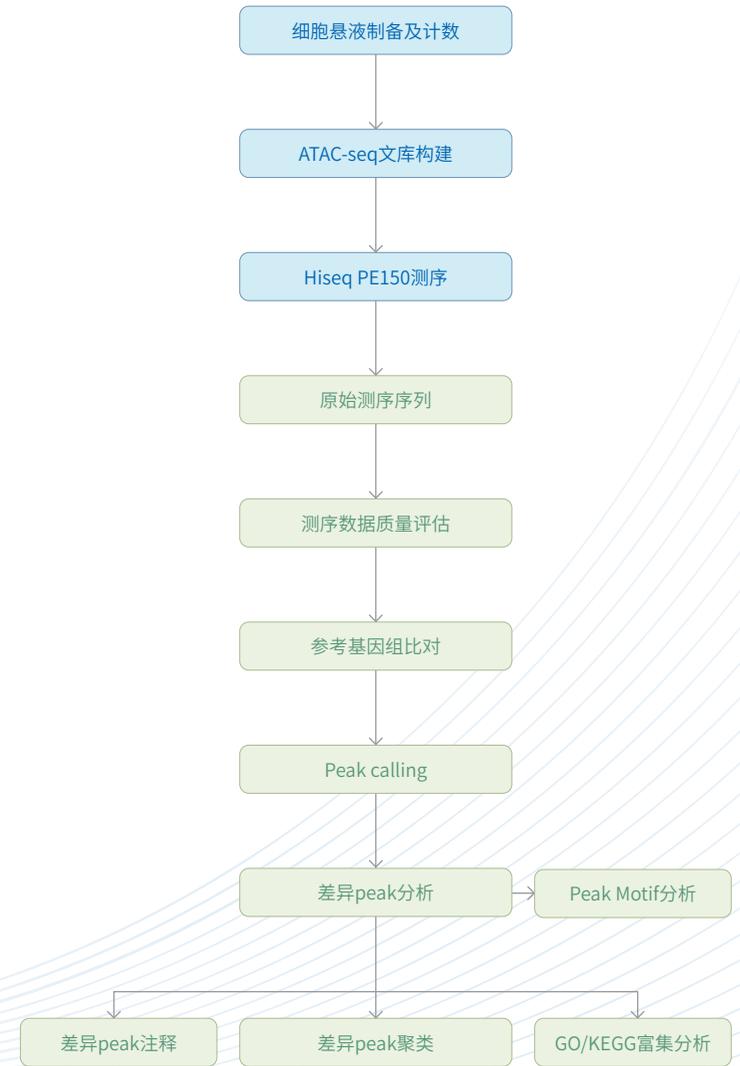
ATAC-seq染色质可及性测序

技术简介

真核生物的染色质通常情况下以核小体为单位进行致密的折叠, 不表现出转录活性, 而部分开放的染色质区域作为特异性反式作用因子和顺式作用元件与基因组 DNA 相互作用的活跃区域。这种由染色质的开放程度定义的染色质可接近性 (Chromatin Accessibility) 对细胞的基因的表达, DNA 的复制和修复等生命活动产生重要的影响。因此检测特定时空状态下细胞染色质的开放程度, 是探索染色质结构重塑对生物的生长发育、疾病的发生发展影响的重要研究方向。

ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing) 方法利用高灵敏度的转座酶 (Tn5) 在寻找染色质上可接近位置的同时对染色质 DNA 进行片段化和接头连接, 扩增后进行高通量测序。细胞需求量小, 更适合数量有限的临床珍贵样本, 实验操作方便快捷, 是一种创新的单碱基分辨率的表观遗传学研究技术。目前该技术已被广泛应用于揭示不同状态下开放染色质的变化, 以及多种疾病中开放染色质图谱的绘制等, 同样适用于单细胞染色质开放性的研究。在医学领域已经成为疾病标志物、发病机制、新药研发等重要研究的利器。

技术及分析路线



样本要求与建议

医学细胞样品

- a) 样品保存 / 运输要求: (活细胞) 细胞培养液保存于细胞培养瓶, 常温运输; (冻存细胞) 保存于细胞冻存液, 干冰运输
- b) 样品总量: 单次实验 $\geq 5^4$ 细胞, 请尽可能提供两次以上的用量
- c) 样品质量: 细胞样本活细胞比例 $\geq 80\%$, 无外源污染

医学组织样品

- a) 样品保存和运输条件: (新鲜组织) 单细胞悬液, 细胞培养瓶保存, 常温运输; (冻存组织) 干冰运输
- b) 样品总量: 单次实验 ≥ 1 mg 组织, 请尽可能提供两次以上的用量

动植物样品

- a) 细胞 $\geq 1 \times 10^6$
- b) 动物组织 ≥ 50 mg
- c) 植物组织 ≥ 500 mg

分析结果展示

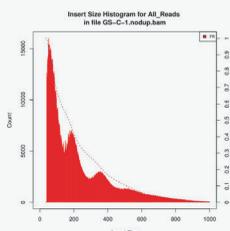


图1 样品插入片段长度分图

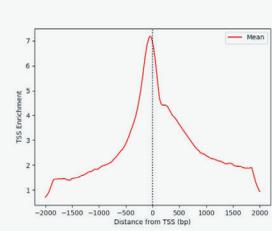


图2 转录起始位点 (TSS) 附近的平均结合信号分布

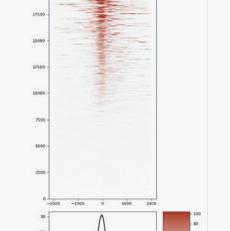


图3 转录起始位点为中心的上下游2kb区域信号分布

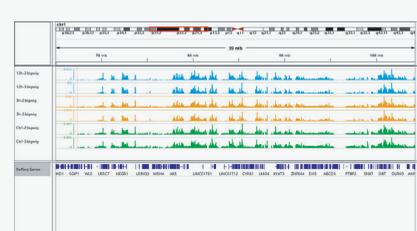


图4 IGV可视化展示peak

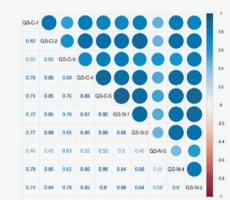


图5 样本一致性热图

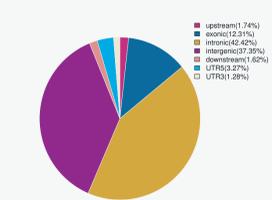


图6 Peak在基因上的分布图

Rank	Motif	P-value	log P-value	% of Targets	% of Background	STD(Bg STD)	Best Match/Details	Motif File
1	TGACTCA	1e-3740	-8.613e+03	32.23%	6.82%	210.8bp (63.5bp)	MA1448.1 fos-1(0.996) More Information Similar Motifs Found	motif file (matrix)
2	CTGCCAG	1e-2919	-6.722e+03	65.31%	36.92%	272.4bp (69.9bp)	MA0671.1 NFKB(0.840) More Information Similar Motifs Found	motif file (matrix)
3	CCACTI	1e-2653	-6.110e+03	62.36%	35.24%	267.6bp (67.1bp)	MA0672.1 NFKB2-3(0.915) More Information Similar Motifs Found	motif file (matrix)
4	ACATTCC	1e-2561	-5.899e+03	68.99%	42.61%	258.9bp (62.1bp)	MA1121.1 YEAD2(0.967) More Information Similar Motifs Found	motif file (matrix)
5	GCCTC	1e-2305	-5.308e+03	73.74%	49.29%	294.8bp (70.9bp)	MA0295.2 Th(0.712) More Information Similar Motifs Found	motif file (matrix)

图7 Peak motif分析结果

ATAC-seq合作文章集锦

代表文章 1: 银屑病中染色质可及性图谱

中文题目: 银屑病中染色质可及性的表征

英文标题: Characterization of chromatin accessibility in psoriasis

发表杂志: Frontiers of Medicine

影响因子: 8.1

发表时间: 2021年

主要结果: 银屑病的病理特征涉及与转录水平相关的 T 细胞基因的改变, 这是由染色质可及性决定的。然而, 这些 T 细胞转录水平的改变在多大程度上再现了银屑病的表观遗传特征仍然未知。该研究系统地分析了 Th1、Th2、Th1-17、Th17 和 Treg 细胞的染色质可及性, 发现染色质重塑在疾病的发病机制中起着重要作用 (图 1)。不同亚型 Th 细胞的染色质重塑倾向相对一致。接下来, 分析了记忆 Th/Treg 细胞的染色质可及性和转录组动态。在记忆细胞中, 鉴定出 803 个染色质可及性区域增加, 545 个染色质可及性区域减少。在记忆 Treg 细胞中, 染色质可及性区域增加 713 个, 染色质可及性区域减少 1206 个。在与记忆 Th 和 Treg 细胞相关的 peak 上, 分别有 54 和 53 个基因差异表达。FOSL1、SPI1、ATF3、NFKB1、RUNX、ETV4、ERG、FLI1 和 ETC1 被确定为银屑病发展的调节因子。转录调控网络显示, NFKB1 和 RELA 高度连接, 处于网络的中心位置。NFKB1 调控 CCL3、CXCL2 和 IL1RN 基因。当前的研究结果提供了候选转录因子和疾病调控组的基本框架。

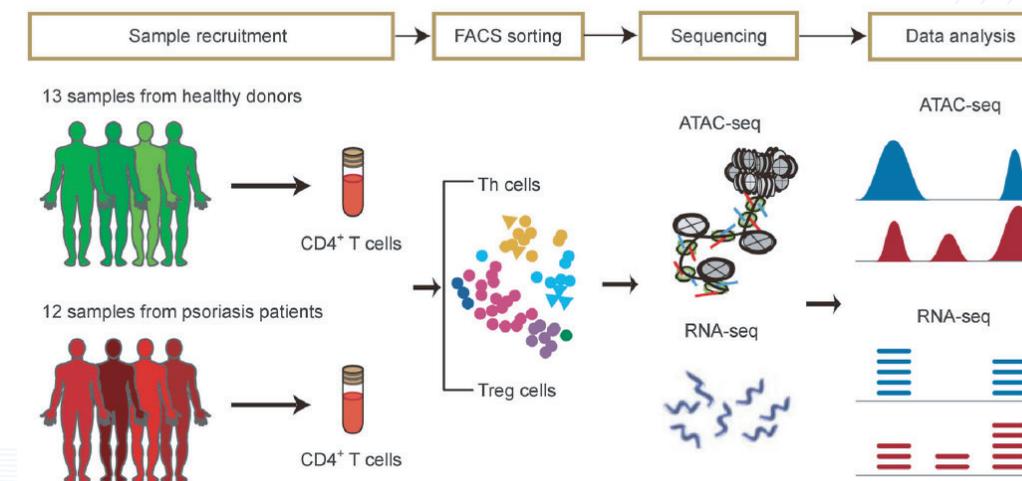


图1 银屑病染色质可及性研究设计