



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112111470 A

(43) 申请公布日 2020.12.22

(21) 申请号 202010946487.8

(22) 申请日 2020.09.10

(71) 申请人 武汉大学

地址 430072 湖北省武汉市武昌区珞珈山
武汉大学

(72) 发明人 梁凯威 王康 王红红 李聪慧

(74) 专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 42222

代理人 胡甜甜

(51) Int. Cl.

C12N 9/22 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12Q 1/6804 (2018.01)

C12R 1/19 (2006.01)

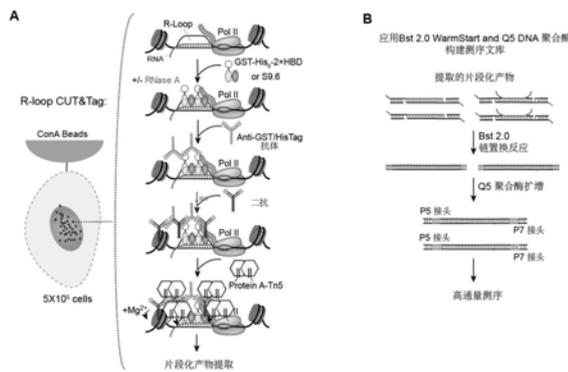
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

一种R-环结合蛋白GST-His₆-1/2×HBD及全基因组R-环的检测方法

(57) 摘要

本发明提供一种R-环结合蛋白GST-His₆-1/2×HBD及全基因组R-环的检测方法,GST-His₆-1/2×HBD蛋白能够用于结合和定位R-环,采用以下步骤制备:重组质粒GST-His₆-1/2×HBD的构建和提取;将重组质粒转入T7Express lysY/I^q感受态细胞,在2×YT培养基中培养并用IPTG诱导蛋白表达;使用Ni-NTA beads亲和纯化GST-His₆-1/2×HBD蛋白。借助其对R-环结构的特异性结合能力,运用靶向剪切及转座酶技术开发出少量细胞,操作简便,信噪比更高的R-Loop CUT&TAG,以便更好地绘制内源性R-环基因组图谱,阐释R-环在基因组中的功能。



1. 一种R-环结合蛋白GST-His₆-1/2×HBD,其特征在于:所述GST-His₆-1/2×HBD蛋白能够用于结合和定位R-环,其采用以下步骤制备:

步骤1:重组质粒GST-His₆-1/2×HBD的构建和提取;

其中,构建重组质粒GST-His₆-1/2×HBD时,质粒结构含有核糖核酸酶RNase H1的DNA:RNA杂交体结合域HBD (Hybrid Binding Domain),蛋白纯化标签谷胱甘肽S-转移酶 (GST-tag) 和组氨酸标签 (His-tag);

步骤2:将步骤1得到的重组质粒GST-His₆-1/2×HBD转入T7 Express lysY/I^q感受态细胞,在2×YT培养基中培养并用IPTG诱导蛋白表达;

步骤3:使用Ni-NTA beads亲和纯化步骤2的GST-His₆-1/2×HBD蛋白。

2. 如权利要求1所述的R-环结合蛋白GST-His₆-1/2×HBD,其特征在于:在步骤2中,诱导蛋白表达使用0.5mM IPTG,诱导时间为5小时,诱导温度为37℃。

3. 如权利要求1或2所述的R-环结合蛋白GST-His₆-1/2×HBD,其特征在于:所述GST-His₆-1/2×HBD蛋白对于R-环的结合能力在体外使用凝胶电泳迁移率分析实验 (EMSA) 检测。

4. 如权利要求1所述的R-环结合蛋白GST-His₆-1/2×HBD,其特征在于:在细胞水平结合和定位R-环应用DRIPc-seq方法,其中免疫沉淀R-环的蛋白为GST-His₆-2×HBD。

5. 一种全基因组R-环的检测方法,其特征在于:采用权利要求1所述的GST-His₆-2×HBD蛋白,使用靶向剪切及转座酶技术,特异性纯化细胞内R-环。

6. 如权利要求5所述的全基因组R-环的检测方法,其特征在于:所述靶向剪切及转座酶技术中,所用的pA-Tn5转座酶组装有适配器接头,接头包括:

Tn5MErev:5'-[phos]CTG TCT CTT ATA CAC ATC T-3';

Tn5ME-A:5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG-3';

Tn5ME-B:5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G-3'。

7. 如权利要求5或6所述的全基因组R-环的检测方法,其特征在于:所述靶向剪切及转座酶技术中,R-Loop CUT&TAG测序文库构建之前使用Bst 2.0WarmStart DNA聚合酶完成链置换反应。

8. 如权利要求7所述的全基因组R-环的检测方法,其特征在于:所述靶向剪切及转座酶技术中,在pA-Tn5转座酶片段化基因组时,反应的缓冲液中添加物包含终浓度为10%二甲基甲酰胺或者0.85mM ATP,或者两者同时添加。

9. 如权利要求8所述的全基因组R-环的检测方法,其特征在于:所述靶向剪切及转座酶技术中,可使用单克隆S9.6抗体完成R-Loop CUT&TAG,检测到基因组R-环信号。

10. 如权利要求8或9所述的全基因组R-环的检测方法,其特征在于:所述靶向剪切及转座酶技术中,在GST-His₆-2×HBD蛋白或S9.6抗体孵育过程中,添加RNase A消化能够显著减少富集到的R-环信号。

一种R-环结合蛋白GST-His₆-1/2×HBD及全基因组R-环的检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于核酸组学领域,具体涉及一种R-环结合蛋白GST-His₆-1/2×HBD及全基因组R-环的检测方法。

背景技术

[0002] R-环(R-Loop)是RNA侵入双链DNA所形成的一种特殊的三链核酸结构,包括一条DNA:RNA杂合链和一条单链DNA(single strand DNA,ssDNA)。起初R-环被认为只是转录过程形成的副产物,但是近些年的研究发现R-环在细菌、酵母和哺乳细胞中广泛存在,参与调控整个细胞周期,并在基因表达,染色质结构稳定和DNA损伤修复等过程中起着关键作用。与R-环在转录调控和DNA损伤修复的功能相对应,近年来R-环也被报道与许多疾病相关,比如神经性退行性疾病和癌症。例如,在乳腺癌细胞中,肿瘤抑制因子BRCA1或者BRCA2的突变会造成R-环的积累和DNA损伤的加重,这些R-环直接参与肿瘤的发生,同时也是基因组不稳定的标志。在骨髓增生异常综合征(MDS)的研究中,多种剪切因子的突变也会造成造血干细胞R-环水平的紊乱,从而影响基因组稳定性和细胞功能的正常维持。因此,这些证据表明R-环的异常可能是肿瘤发生的驱动因素之一。

[0003] 然而,因为R-环功能的多样性,在总量上检测R-环水平的变化并不能阐释R-环在上述生理和病理过程中的作用机制。此外,R-环在转录和复制过程中的调控也显示出“亦正亦邪”的特质,因此近十年来许多研究团队一直在开发基因组水平上R-环的精确定位和定量方法。基于染色质免疫共沉淀技术,Chedin等(2012)首次利用识别DNA:RNA杂交体的S9.6单克隆抗体开发了体外富集R-环的高通量测序技术(DNA:RNA immunoprecipitation with deep sequencing,DRIP-seq);随后,陈亮等(2015)报道了另外一种基于RNASE H1突变体的R-环检测技术R-CHIP。这些方法虽然将R-环的检测带入了基因组学时代,但是不同检测策略映射出的R-环全基因组图谱存在着很大的差异。此外,这些方法都存在着实验周期长,操作步骤繁琐,信号背景差等缺点,在领域内无法形成一个R-环定位的“金标准”。

发明内容

[0004] 本发明目的在于提供一种R-环结合蛋白GST-His₆-1/2×HBD及全基因组R-环的检测方法,将RNase H1的DNA:RNA杂种结合域HBD进行改良,通过将HBD结构域串联制备特异性识别R-环的重组蛋白GST-His₆-1/2×HBD。借助GST-His₆-2×HBD对R环结构更强的特异性结合能力,运用最新的靶向剪切及转座酶技术(Cleavage Under Targets and Tagmentation,CUT&TAG)进一步开发出少量细胞,操作简便,信噪比更高的R-Loop CUT&TAG,以便更好地绘制内源性R-环基因组图谱,阐释R-环在基因组中的功能。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0006] 本发明第一方面提供一种全新的R-环结合蛋白GST-His₆-1/2×HBD,所述GST-His₆-1/2×HBD蛋白能够用于结合和定位R-环,其采用以下步骤制备:

[0007] 步骤1:重组质粒GST-His₆-1/2×HBD的构建和提取;其中,构建重组质粒GST-His₆-1/2×HBD时,质粒结构含有核糖核酸酶RNase H1的DNA:RNA杂交体结合域HBD (Hybrid Binding Domain),蛋白纯化标签谷胱甘肽S-转移酶 (GST-tag) 和组氨酸标签 (His-tag);

[0008] 步骤2:将重组质粒GST-His₆-1/2×HBD转入T7 Express lysY/I^q感受态细胞,在2×YT培养基中培养并用IPTG诱导蛋白表达;

[0009] 步骤3:使用Ni-NTA beads亲和和纯化GST-His₆-1/2×HBD蛋白。

[0010] 进一步地,在步骤2中,诱导蛋白表达使用0.5mM IPTG,诱导时间为5小时,诱导温度为37℃。

[0011] 进一步地,所述GST-His₆-1/2×HBD蛋白对于R-环的结合能力在体外使用凝胶电泳迁移率分析实验(EMSA)检测。纯化后的GST-His₆-1/2×HBD蛋白可以与DNA:RNA杂交体在体外孵育,使用凝胶电泳迁移率分析实验检测核酸与蛋白结合导致的阻滞效应,以此来反映纯化的GST-His₆-1/2×HBD蛋白活性以及与R-环的结合能力。

[0012] 进一步地,在细胞水平结合和定位R-环时采用DRIPc-seq方法,其中免疫沉淀R-环的蛋白为GST-His₆-2×HBD。

[0013] 本发明第二方面提供一种全基因组R-环的检测方法(R-Loop CUT&TAG),采用所述GST-His₆-2×HBD蛋白,使用靶向剪切及转座酶技术(CUT&TAG),特异性纯化细胞内R-环。

[0014] 进一步地,所述靶向剪切及转座酶技术中,所用的pA-Tn5转座酶组装有适配器接头,接头包括:

[0015] Tn5MErev (5'-[phos]CTG TCT CTT ATA CAC ATC T-3');

[0016] Tn5ME-A (5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG-3');

[0017] Tn5ME-B (5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G-3')。

[0018] 进一步地,所述靶向剪切及转座酶技术中,R-Loop CUT&TAG测序文库构建之前使用Bst 2.0WarmStart DNA聚合酶完成链置换反应。

[0019] 进一步地,所述靶向剪切及转座酶技术中,在pA-Tn5转座酶片段化基因组时,反应的缓冲液中添加物包含10%二甲基甲酰胺或者0.85mM ATP,或者两者同时添加。

[0020] 进一步地,所述靶向剪切及转座酶技术中,可使用单克隆S9.6抗体完成R-Loop CUT&TAG,检测到基因组R-环信号。

[0021] 进一步地,所述靶向剪切及转座酶技术中在GST-His₆-2×HBD蛋白或S9.6抗体孵育过程中,添加RNase A消化后会显著减少富集到的R-环信号。

[0022] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0023] (1) 本发明使用的GST-His₆-1/2×HBD是一种全新的R-环识别因子,解决了之前方法在识别全基因组R-环时由于识别因子特异性问题而产生的争议;

[0024] (2) 本发明首次提出使用靶向剪切及转座酶技术(CUT&TAG)技术检测全基因组R-环的策略;

[0025] (3) R-Loop CUT&TAG耗时短,操作简便,信噪比高,显著提高了R-环检测效率。

附图说明

[0026] 图1为本发明GST-His₆-1/2×HBD重组质粒的构建示意图;

[0027] 图2为本发明GST-His₆-1/2×HBD重组质粒在T7 Express lysY/I^q感受态细胞中,

使用原核表达系统设计的蛋白表达与纯化过程；

[0028] 其中,A图为蛋白表达与纯化流程,B图为蛋白纯化后考马斯亮蓝染色结果；

[0029] 图3为本发明EMSA实验分析GST-His₆-1/2×HBD蛋白对于DNA:RNA杂交体结构的特异性结合能力；

[0030] 图中,蛋白与核酸结合部分用括号指出,结果显示出GST-His₆-1/2×HBD对R-环具有极强的亲和力；

[0031] 图4为本发明基于已有的DRIPc-seq技术原理,使用GST-His₆-2×HBD定位全基因组R-环信号得到的代表性位点示意图；

[0032] 图中,基因位点示意图显示GST-His₆-2×HBD蛋白与S9.6抗体的信号高度一致,阐释了GST-His₆-2×HBD蛋白在定位全基因组R-环的可行性；

[0033] 图5为本发明R-Loop CUT&TAG实验流程示意图；

[0034] RNase A可作为对照组添加于抗体结合步骤,以验证该技术在全基因组定位R-环时信号的特异性和真实性；图中,A图表示的是R-Loop CUT&TAG在全基因组定位R-环的实验方法,B图表示的是利用R-环识别因子亲和纯化了基因组R-环后,构建文库用于测序的流程；

[0035] 图6为本发明R-Loop CUT&TAG在基因组上具有代表性的R-环位点检测到的信号,GST-His₆-2×HBD蛋白与S9.6抗体都检测到明显的R-环信号；

[0036] 图中,在RNase A的消化作用下,R-环的信号显著消失,验证了R-Loop CUT&TAG检测到的R-环的信号特异性和真实性。

具体实施方式

[0037] 通过以下详细说明结合附图可以进一步理解本发明的特点和优点。所提供的实施例仅是对本发明方法的说明,而不以任何方式限制本发明揭示的其余内容。

[0038] 本发明中“GST-His₆-1/2×HBD”指“GST-His₆-1×HBD”或“GST-His₆-2×HBD”。

[0039] **【实施例1】**重组质粒GST-His₆-1/2×HBD的构建

[0040] 1. 引物的设计合成

[0041] 根据Marcin Nowotny等(2008)提供了不同物种间RNase H1的高度同源性,从addgene上购得含人源的RNase H1编码序列的ppyCAG-RNASEH1-D210N质粒(addgene#111904),根据质粒信息设计合成特异性引物扩增HBD结构域。在一条引物上加入5个甘氨酸重复序列,表达柔性接头促进串联HBD蛋白表达。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,各引物的序列和编号如下：

[0042] (1) HBD基因扩增引物

[0043] LP-1:

[0044] GCCATATCGAAGGTCGTCATATGATGTTCTATGCCGTGAGGAGGGGC

[0045] RP-1:

[0046] CTTTGTTAGCAGCCGTTATCCCCCTCCGCTCCGCTTGAGATTTCCT

[0047] GACAAAGGC

[0048] (2) 2×HBD基因扩增引物

[0049] LP-2:GTCGTGCATCTGTTGGATATAACCATGGGCCATCATCATCAT

[0050] RP-2:AGTCAGTCACGATGAATTCCTCCCCCTCCGCTCC

[0051] 2.PCR扩增HBD基因与pET16b-His₆-HBD重组质粒构建

[0052] 以ppyCAG-RNASEH1-D210N质粒为模板,使用HBD基因扩增引物与PCR试剂盒(phanta max super-fidelity DNA polymerase,P505-d1,南京诺唯赞生物科技有限公司)特异性扩增HBD基因。用限制性核酸内切酶BamHI和NdeI双酶切pET16b质粒,琼脂糖凝胶电泳后凝胶回收载体片段。利用T5核酸外切酶同源重组修复的原理,将PCR片段与酶切载体以3:1的摩尔比率转化到大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,经过抗性筛选,挑选阳性重组克隆菌种,核苷酸测序验证获得pET16b-His₆-HBD重组质粒。

[0053] 3.GST-His₆-1/2 \times HBD重组质粒构建

[0054] 以pET16b-His₆-HBD重组质粒为模板,使用2XHBD基因扩增引物特异性扩增His₆-HBD基因。用限制性核酸内切酶BamHI和EcoRI双酶切pGEX-2T质粒,琼脂糖凝胶电泳后凝胶回收载体片段。采取步骤2同样的同源重组技术,筛选获得GST-His₆-1/2 \times HBD重组质粒,质粒结构示意图见图1。

[0055] 【实施例2】GST-His₆-1/2 \times HBD蛋白表达与纯化

[0056] 1.GST-His₆-1/2 \times HBD蛋白表达

[0057] 将GST-His₆-1/2 \times HBD重组质粒转化到T7 Express lysY/I^q感受态细胞,经过抗性筛选,挑选单克隆菌种培养在含100 μ g/mL氨苄青霉素钠的2 \times YT培养基,细菌培养条件设置为37 $^{\circ}$ C,转速200rpm。当细菌的OD₆₀₀达到0.6时,加入0.5mM IPTG诱导蛋白表达。培养5小时后离心收集细菌颗粒,除去多余的培养基,加入pH7.5的裂解HEX缓冲液(组分包括20mM HEPES,0.8M氯化钠,10%甘油,0.2%Triton X-100,1X蛋白酶抑制剂)。缓冲液与细菌充分混匀后使用细胞破碎仪进行高压破碎,4 $^{\circ}$ C,800psi条件下破碎5分钟,然后高速离心收集上清,此时上清包含有可溶性的GST-His₆-1/2 \times HBD蛋白。

[0058] 2.GST-His₆-1/2 \times HBD蛋白纯化

[0059] 依照Ni-NTA Beads(SA004010,常州天地人和生物科技有限公司)说明书亲和纯化GST-His₆-1/2 \times HBD蛋白。在上一步获得的上清中加入1/20体积的Ni-NTA Beads,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。在蛋白纯化柱中,依次加入含有20mM咪唑和100mM咪唑的HEX缓冲液,洗去非目的蛋白,直至洗涤液中无蛋白组分洗出,最终使用含250mM咪唑的HEX缓冲液纯化目的蛋白。纯化的目的蛋白在4 $^{\circ}$ C环境中透析过夜,多次透析去除咪唑后,使用超滤管浓缩。使用SDS-PAGE分析GST-His₆-1/2 \times HBD蛋白纯度,然后用BCA蛋白定量试剂盒(PA115-01,北京天根生化科技有限公司)检测蛋白浓度。GST-His₆-1/2 \times HBD蛋白纯化流程与纯化结果见图2。

[0060] 【实施例3】GST-His₆-1/2 \times HBD蛋白特异性识别R-环结构

[0061] (1)凝胶电泳迁移率分析实验(EMSA)检测不同浓度的GST-His₆-1/2 \times HBD蛋白与DNA:RNA杂交体的结合能力,反应条件和体系如下:

	GST-His ₆ -1/2 \times HBD 蛋白+DEPC 水	16 μ l
	0.6 uM DNA:RNA 杂交体	1 μ l
[0062]	10 \times EMSA 缓冲液	2 μ l
	0.1mg/ml 鲑鱼精 DNA	1 μ l

[0063] 用移液器将上述组分混匀,在PCR热循环仪上进行以下反应:25 $^{\circ}$ C孵育30分钟

[0064] (2) 将步骤(1)的样品加入到6% TBE-PAGE凝胶中进行电泳,电泳缓冲液为 $0.5 \times$ TBE,电泳电压设置为60V,电泳时间为60分钟。

[0065] (3) 使用GE公司的Typhoon9500扫描凝胶,根据核酸在凝胶内的阻滞现象验证GST-His₆-1/2 \times HBD蛋白能特异性结合DNA:RNA杂交体,具体结果见图3。

[0066] **【实施例4】**基于DRIPc-seq, GST-His₆-2 \times HBD蛋白定位基因组R-环根据Chedin等(2019)设计的DRIPc-seq方案

[0067] (1) 基因组分离与片段化:消化收集 1×10^7 数量的HEK293T细胞,加入20% SDS与蛋白酶K在37 $^{\circ}$ C水浴条件下过夜消化细胞,然后利用酚氯仿法抽提细胞基因组。加入BsrGI, EcoRI, HindIII, SspI和XbaI这五种限制性内切酶后,37 $^{\circ}$ C过夜消化基因组,使用酚氯仿抽提回收片段化的基因组DNA。

[0068] (2) R-环分离与纯化:加入GST-His₆-2 \times HBD蛋白在4 $^{\circ}$ C条件下孵育14~17h,利用特异性结合GST标签的磁珠分离纯化HBD蛋白及其结合的R-环结构。经过蛋白酶K消化后,使用酚氯仿抽提获得纯化的R-环。

[0069] (3) 基于RNA的建库:用DNASE I消化上一步获得的R-环中的DNA,以此得到R-环结构中的RNA链,再通过逆转录反应合成cDNA,经第二链补齐形成双链DNA,然后在DNA两端添加接头标签,建库并在Nova-seq上进行高通量测序。基因组具有代表性的R-环位点见图4。

[0070] **【实施例5】**一种基因组学定位R-环方法:R-Loop CUT&TAG

[0071] 以HEK293T细胞为例

[0072] (1) 5×10^5 数量的细胞经过acutase消化后收集,接下来使用PH7.5的洗涤缓冲液(组分包括20mM HEPES, 150mM氯化钠, 0.5mM亚精胺, $1 \times$ 蛋白酶抑制剂)洗涤2次。细胞中加入10 μ l活化的刀豆球蛋白A包被磁珠,室温孵育10分钟后洗脱磁珠,完成细胞的固定和穿孔过程。

[0073] (2) 接下来孵育GST-His₆-2 \times HBD蛋白或者S9.6抗体,以识别细胞内特定的R-环结构。根据相应的蛋白依次孵育anti-GST或者anti-His-tag抗体或者兔抗鼠IgG抗体,以及对应的二抗,实现R-环信号的富集。

[0074] (3) 使用pH7.5的dig-wash缓冲液(组分包括20mM HEPES, 300mM氯化钠, 0.5mM亚精胺, $1 \times$ 蛋白酶抑制剂, 0.05% 毛地黄皂苷)洗涤三次以去除未结合的蛋白。加入带有适配接头的pA-Tn5转座酶复合物,在pH8.5的片段化缓冲液(组分包括10mM TAPS, 10mM氯化镁, 10% 二甲基甲酰胺, 0.85mM ATP)中室温孵育1小时完成片段化反应。

[0075] (4) 然后添加2.25 μ l 0.5M乙二胺四乙酸, 2.75 μ l 10% SDS和0.5 μ g蛋白酶K,在55 $^{\circ}$ C条件下反应30分钟终止片段化反应。片段化产物经DNA磁珠回收后使用Bst 2.0WarmStart DNA聚合酶完成链置换反应。

[0076] (5) 最后使用Q5高保真混合体系完成文库构建后用于高通量测序,实验流程设计见图5,检测到的R-环信号见图6。

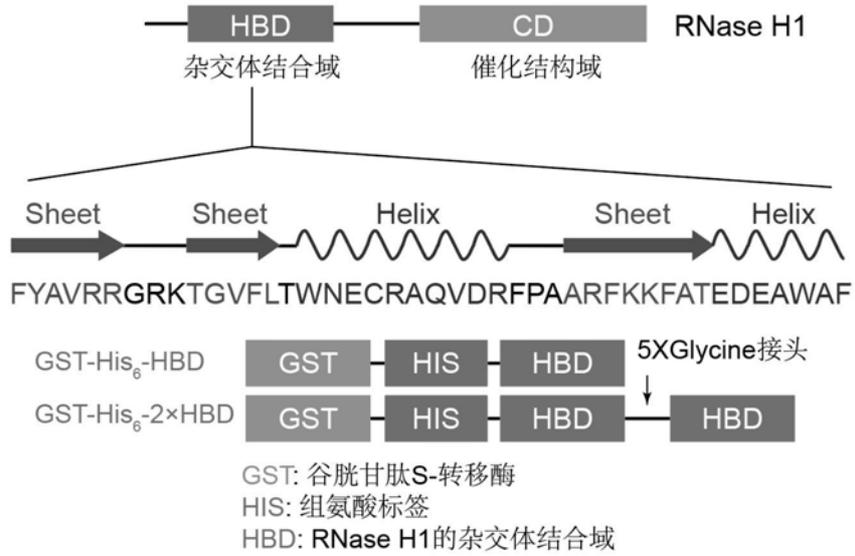


图1

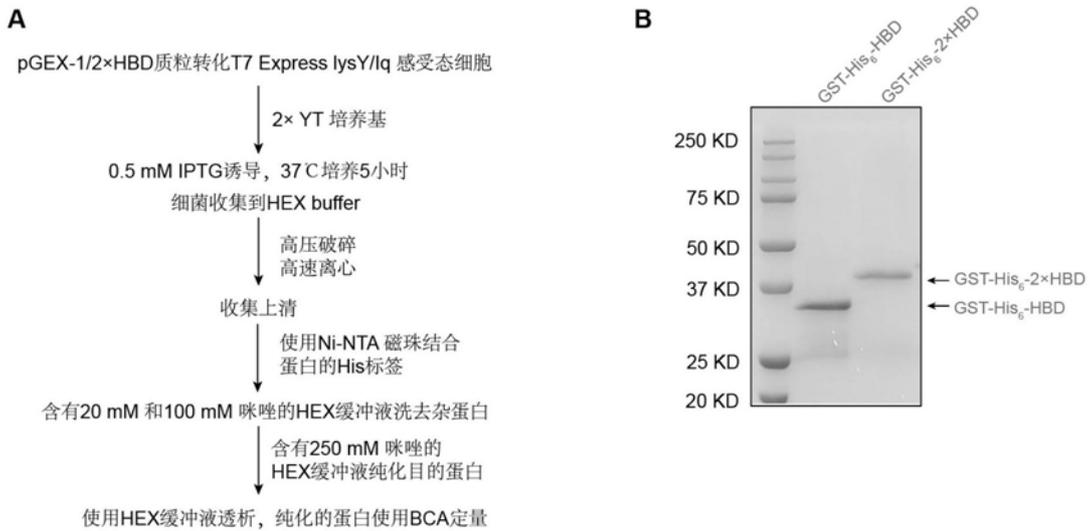


图2

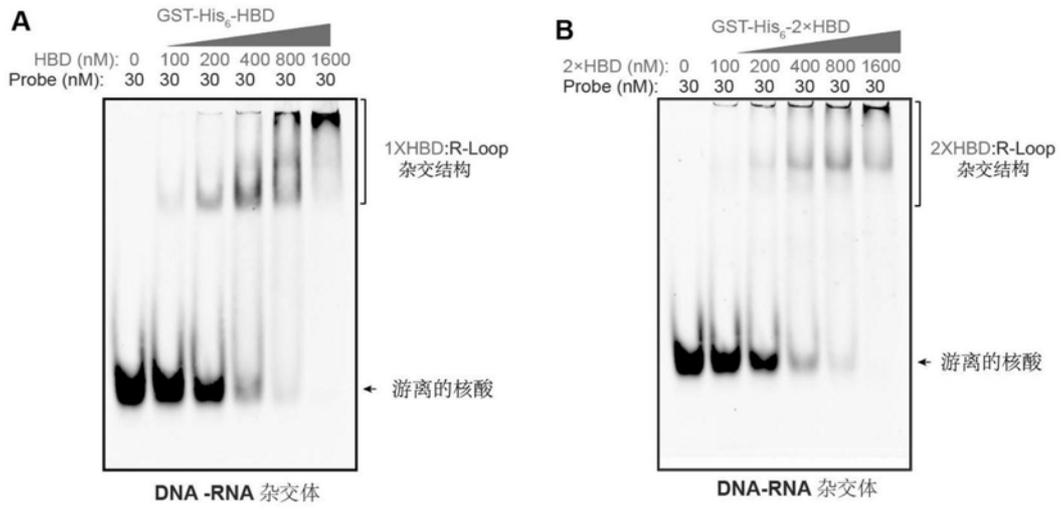


图3

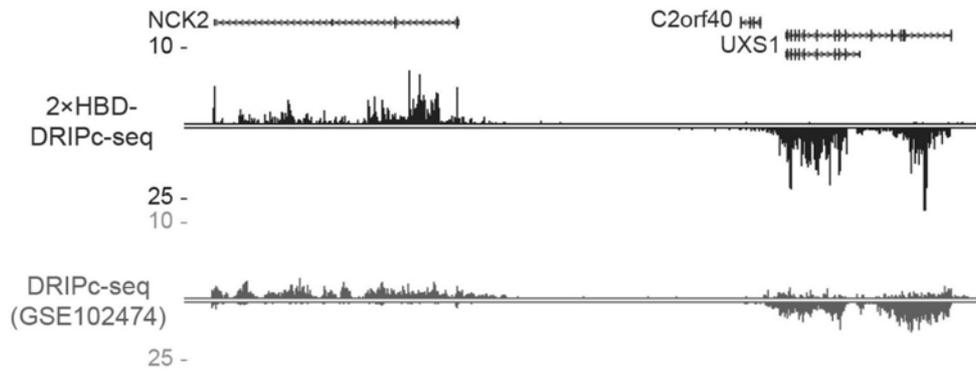


图4

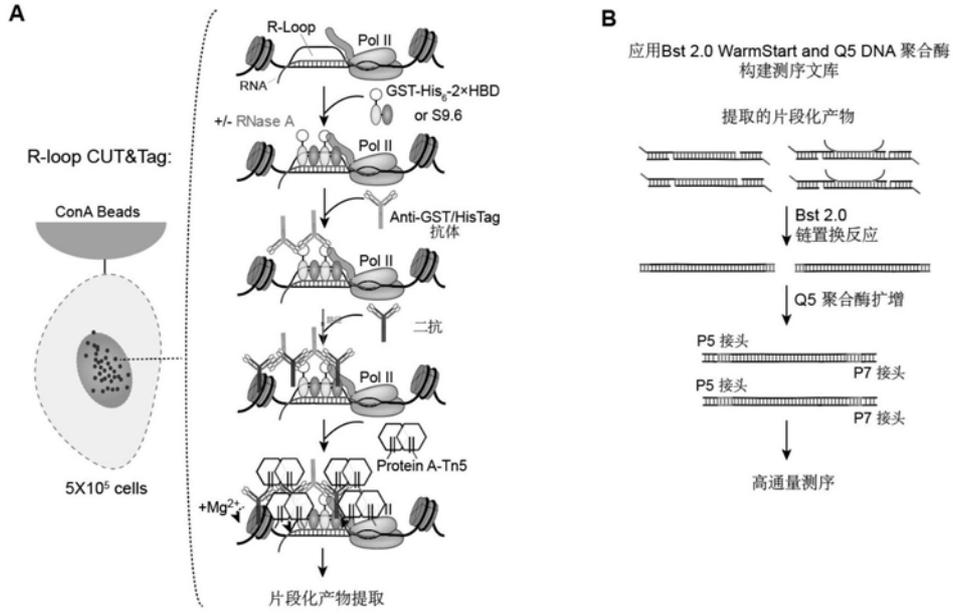


图5

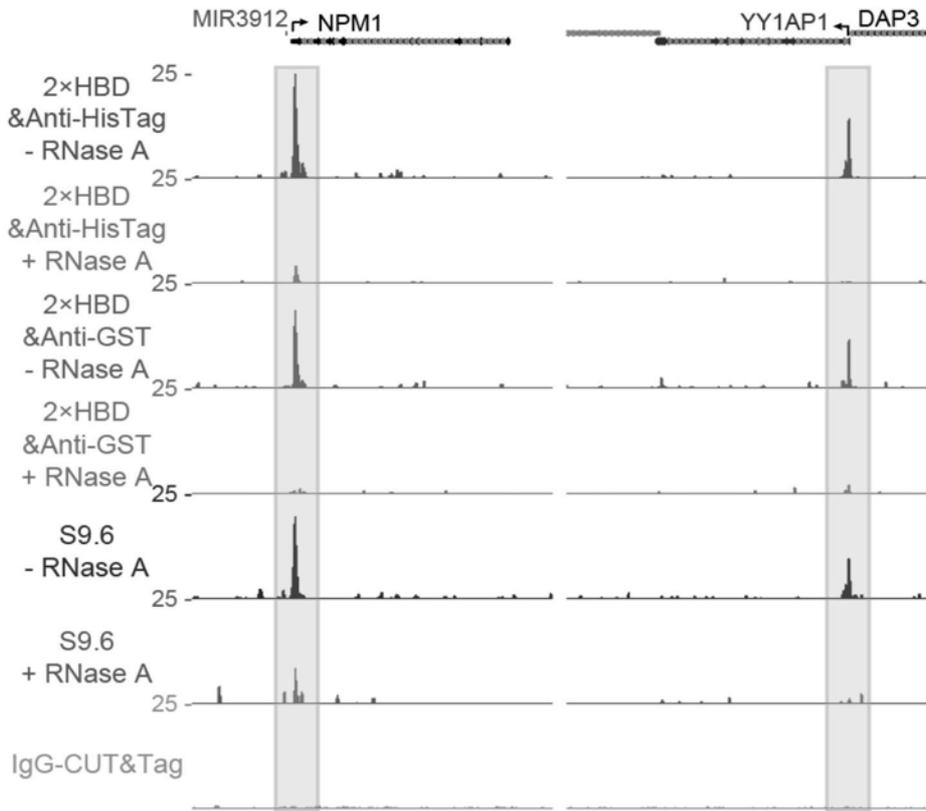


图6