


# 医学全组学 研究手册

SINGLE CELL EPIGENOMICS TRANSCRIPTOMICS



单细胞。转录组。表观组。蛋白质组与代谢组。微生物组学

单细胞测序

全转录组测序

m<sup>6</sup>A甲基化测序

TMT标记定量蛋白质组学

宏基因组测序和宏转录组测序

...

EPIGENOMICS  
TRANSCRIPTOMICS  
SINGLE CELL



## 公司简介

COMPANY PROFILE

联川生物是一家成立于2006年的全球化生物基因科技公司，主要布局于基因的“读”、“写”、“改”三大方向，公司当前聚焦于基因高通量测序，是国际上少数拥有基因科技上游核心技术的国家高新技术企业。

在科研服务领域，联川生物为全球3000多家高校、医院、科研机构及药厂提供包括基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学、单细胞等全组学科研服务。公司十多年来累积发表用户文章超过3000余篇，涵盖各类组学服务内容，CNS主刊超过50篇，子刊数量超过300余篇。近些年公司积极布局m<sup>6</sup>A测序以及单细胞测序等新技术的开发与应用，并与10x Genomics官方成立单细胞测序联合实验室，为客户提供从解离、标记建库与生信分析的一站式单细胞服务。

目前联川生物在职员工300余人，硕博占比50%以上，建有省级研发中心、省级博士后工作站及杭州市院士专家工作站，在美国休斯顿建有全资子公司，并在北京、广州、南京等建有办事处。先后被授予杭州市最具成长型中小企业、新三板最具投资价值10强企业，科创板潜在的前100等荣誉称号。

# 目录

## Catalogue

<b>单细胞转录组学</b> .....	1
单细胞测序 .....	1
<b>转录组学</b> .....	8
全转录组测序 .....	8
基因表达谱芯片 .....	21
<b>表观组学</b> .....	25
m <sup>6</sup> A甲基化测序 .....	25
DNA甲基化测序 .....	29
ChIP-seq/ATAC-seq/CUT&Tag .....	34
RIP-seq .....	39
<b>蛋白质组与代谢组学</b> .....	42
TMT标记定量蛋白质组学 .....	42
Labelfree蛋白质组定量 .....	43
DIA定量与检测 .....	44
非靶代谢组学 .....	48
Olink蛋白质组学 .....	51
<b>微生物组学</b> .....	55
组织微生物测序 .....	55
宏基因组测序和宏转录组测序 .....	58
微生物群落多样性 (16S/ITS测序) .....	61
全长16S rDNA测序 .....	63
<b>联川生物近年用户文章列表</b> .....	66

# 单细胞转录组学

## 单细胞测序

随着测序技术尤其是高通量测序技术的迅速发展，人们对基因组变异/基因表达差异与表型之间关系的认识越来越深刻。然而传统的Bulk RNA测序手段是针对细胞集合进行测序，而单个细胞特异性的信息往往被掩盖，导致错失很多重要信息。

10x Genomics平台的微流控技术通过分选单个细胞，可一次性获得大量单细胞的基因表达数据、TCR/BCR序列信息以及染色质开放程度信息，从而实现大量细胞的快速高效标记、测序和分析，获得单细胞水平的基因表达谱和差异情况，并通过对复杂细胞群体进行深入细致分析，绘制大规模单细胞表达图谱，项目周期短，技术应用范围广。而10x Visium空间转录组技术可以获取组织中不同细胞异质性空间信息，能够更加直观的看到基因空间表达信息。

### 联川优势

- 超高的细胞通量，利用10x Genomics平台实现真正的单细胞测序
- 细胞捕获效率高，可实现大量细胞的快速高效标记、测序和分析
- 项目周期短，技术应用范围广
- 大规模单细胞VDJ+表达谱测序，单个细胞成本大大降低

### 技术服务

3'

10x单细胞3' 转录组

5'

10x单细胞5' 免疫组

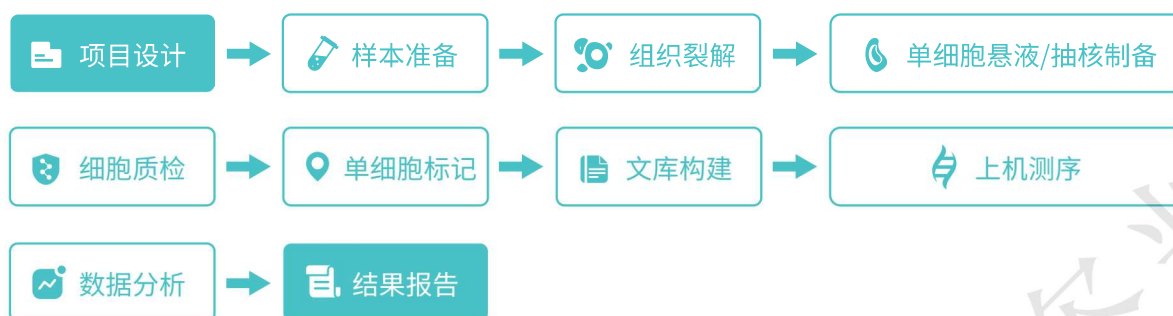
ATAC

10x单细胞ATAC

Visium

10x Visium空间转录组

## 项目流程



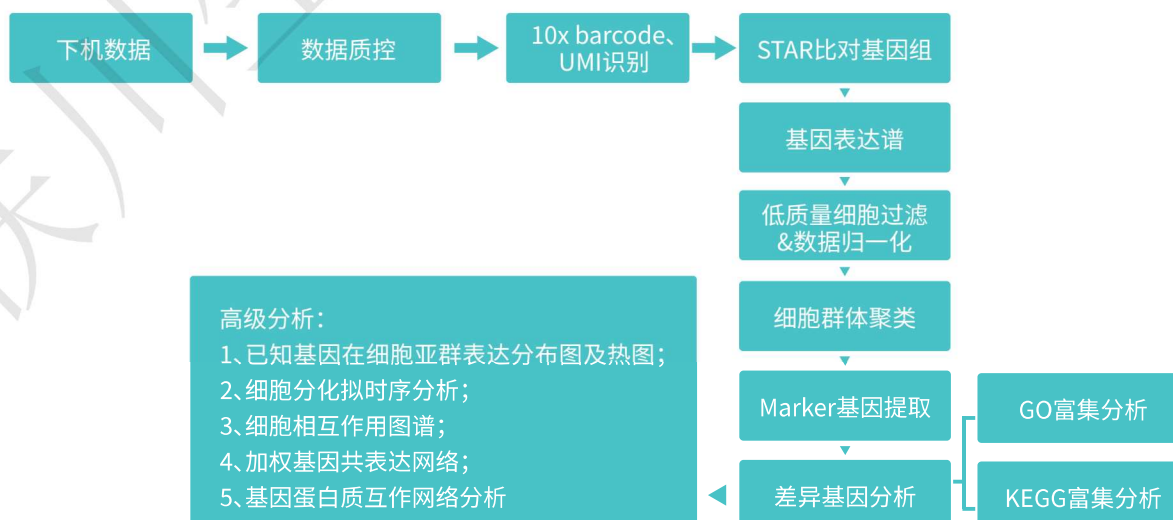
## 样品准备



(具体细节请咨询我司技术人员)

## 10x单细胞3' 转录组测序

10x Genomics平台首先利用微流控技术分选单个细胞,然后将带有barcode和引物的凝胶珠以及单个细胞包裹在油滴中;在油滴中凝胶珠溶解释放反转录oligo,细胞裂解释放mRNA,通过mRNA末端标签扩增(3' WTA)法获得用于测序的带barcode的cDNA;液体油层破坏后,cDNA进行后续文库构建,使用Illumina测序平台检测,即可一次性获得大量单细胞的基因表达数据,10min内自动完成多至80,000个细胞的捕获,细胞捕获率最高65%。可实现大量细胞的快速高效标记、测序和分析,获得单细胞水平的基因表达谱和差异情况,并通过对复杂细胞群体进行深入细致分析,绘制大规模单细胞表达图谱。



## 10x单细胞5' 免疫组

T淋巴细胞(T cell)和B淋巴细胞(B cell)主要负责适应性免疫应答,其抗原识别主要依赖于T细胞受体(T cell receptor, TCR)和B细胞受体(B cell receptor, BCR),这两类细胞表面分子的共同特点是其多样性,可以识别多种多样的抗原分子。BCR的轻链和TCR $\beta$ 链由V、D、J、C四个基因片段组成,BCR的重链和TCR $\alpha$ 链由V、J、C三个基因片段组成,这些基因片段在遗传过程中发生重组、重排,组合成不同的形式,保证了受体多样性。

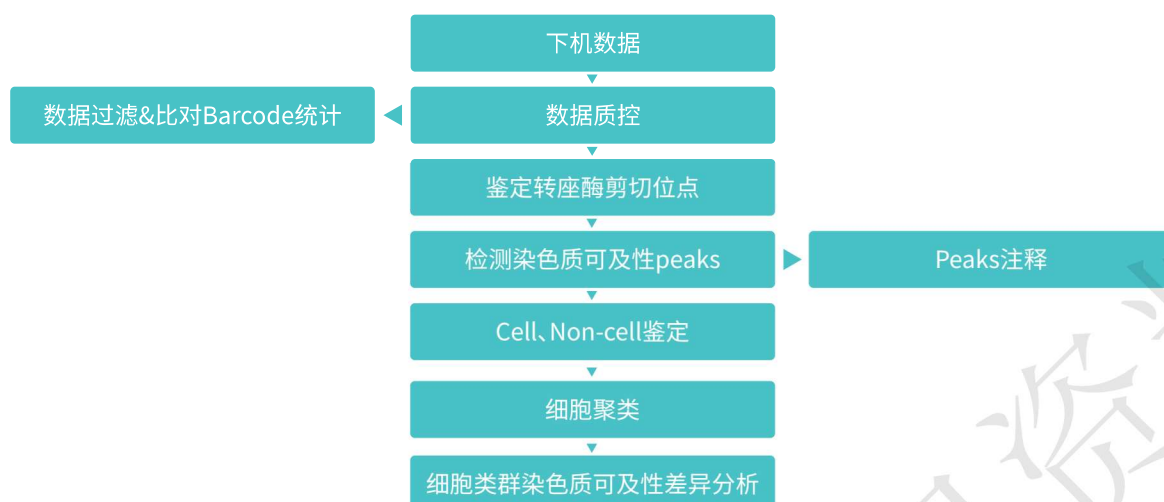
传统免疫组库研究方式局限性较大,10x Genomics新推出的“单细胞免疫谱分析”利用其微流控芯片制备单细胞体系,选择5'端接头的通用引物和免疫分子恒定区的巢式引物进行V(D)J富集,实现在单细胞水平,对成对的重链和轻链(B细胞)或 $\alpha$ 和 $\beta$ 链(T细胞)进行全长测序,为免疫组库全面、系统的研究提供了高效的技术平台,对疾病发生、发展的分子机制研究有重要的意义。



## 10x单细胞ATAC

Assay for Transposase Accessible Chromatin with high-throughput sequencing (ATAC-seq), 是2013年由美国Stanford大学的William Greenleaf教授研发了一种全新的方法,利用DNA转座酶结合高通量测序技术,来研究染色体的可进入性。该方法利用Tn5转座酶切割染色质的开放区域,并加上测序引物进行高通量测序,通过生物信息分析鉴定转录因子结合位点和核小体区域位置,从而为研究基因调控、DNA 印记等提供有效的方法。通过研究特定状态下开放染色质,可以在DNA水平研究基因转录调控。

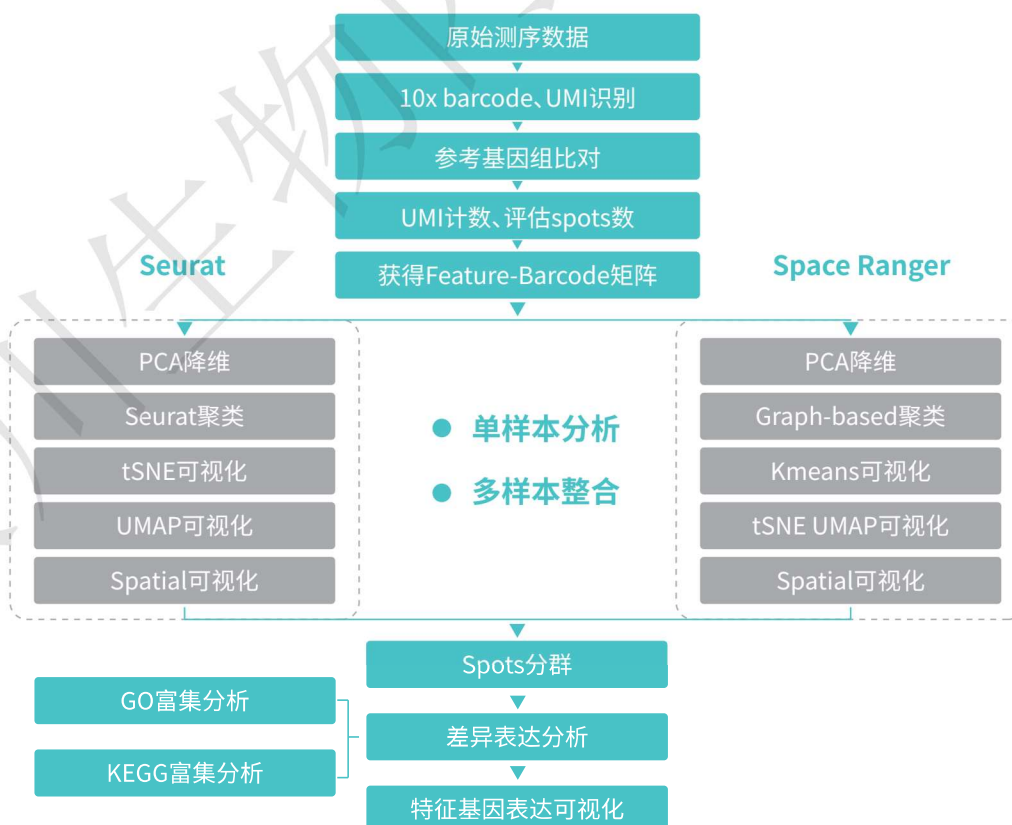
传统的寻找全基因组范围内开放的染色质区域采用的方式包括ATAC-seq、MNase-seq和DNase-seq、FAIRE-seq、chip-seq等。10x Genomics Chromium Single Cell ATAC Solution (10x scATAC-seq) 是10x Genomics新推出单细胞表观基因组学水平上揭示染色质可接近性的研究策略。通过单细胞染色质可接近性图谱构建,不仅能清晰了解染色质结构,还可以绘制高分辨率转录因子调控网络,为深入了解疾病的诊断和治疗铺平道路。



## 10x Visium空间转录组

细胞的转录信息、空间位置信息、形态学信息、生理学信息,对理解细胞功能至关重要。空间转录组技术实现在组织环境中将基因表达情况可视化。

联川空间转录组测序是利用10x Genomics Visium平台,结合显微成像、芯片、测序技术,从一片完整的冰冻组织切片中获取切片不同位置细胞中转录组数据,并将组织学和基因表达分析相结合,通过特有数据分析方法进行基因表达和形态学数据的可视化。在国内领先搭建了空间转录组测序服务平台,处理上百例样本类型,物种涵盖广,并研发了特殊组织透化方法,包括致密组织透化法、黏膜组织透化法、结缔组织透化法等。



## 用户案例分析

### 通过剪接体抑制捕获和维持小鼠全能干细胞

研究单位: 北京大学

发表期刊: Cell

研究手段: 单细胞转录组

影响因子: 41.582

本研究通过剪接体抑制实现了小鼠全能干细胞的体外建立和培养, 在分子和功能上将两类卵裂球重新命名为TBLC。随后作者发现敲低几个关键剪接因子后能广泛地诱导全能基因并使多能基因沉默以将小鼠多能胚胎干细胞重新编程为全能状态。转录组测序、DNA甲基化测序、单细胞测序等多组学分析, 结合功能嵌合试验等分析结果证明TBLC具有强大的双向发育能力, 可产生多个胚胎和胚胎外细胞谱系。剪接体抑制导致多能基因的广泛剪接抑制, 而包含很少短内含子的全能基因被有效剪接和转录激活。本研究为捕获和维持全能干细胞提供了一定的理论基础。

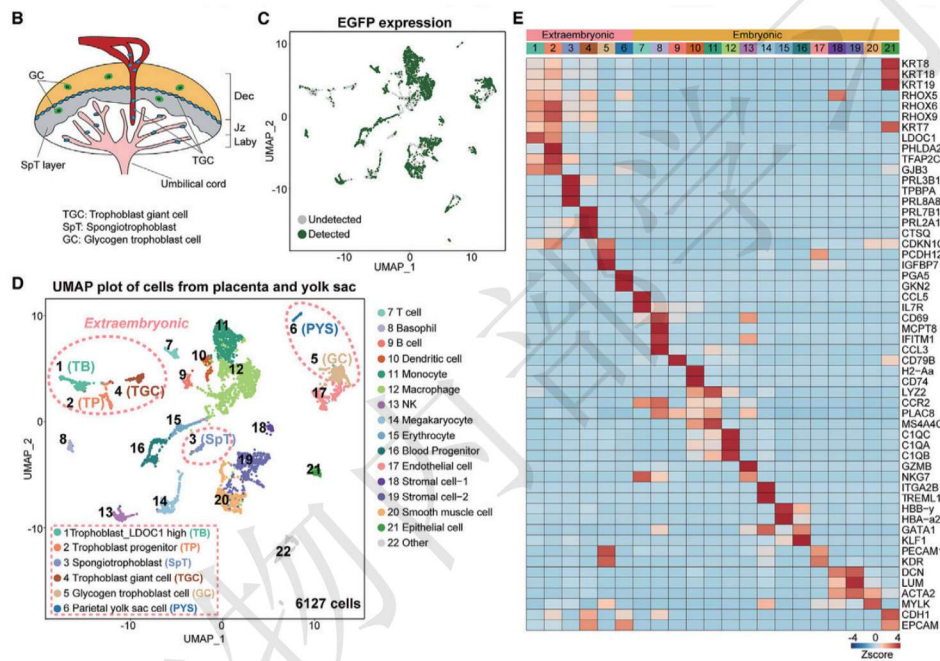


图1 与EPSC和2C样细胞不同, TBLC具有接近细胞卵裂球的转录组

### 单细胞转录组学分析揭示了类固醇耐药性哮喘恶化中肺的免疫状况

研究单位: 郑州大学医学科学院

发表期刊: PNAS

研究手段: 单细胞转录组

影响因子: 11.205

本研究利用尘螨 (HDM) 诱发的哮喘背景下建立了LPS脂多糖 (LPS) 诱发的类固醇抗性恶化的小鼠模型, 通过使用单细胞转录组测序来分析肺中的各类免疫细胞并鉴定了20个免疫细胞亚群。嗜碱性粒细胞、2型先天淋巴细胞 (ILC2) 和CD8+记忆T细胞主要表达IL-4和IL-13, 并对地塞米松具有耐药性。这些细胞产生的IL-13得到了IL-13报告基因小鼠的验证, IL13的中和消除了HDM/LPS诱导的气道高反应性、气道炎症和减少的粘液高分泌。此外, 使用Ingenuity Pathway Analysis系统, 确定了调节嗜碱性粒细胞、ILC2和CD8+记忆T细胞活化的经典途径和上游调节因子, 为进一步了解哮喘恶化期间的免疫状况提供了机制见解和重要的参考资源。



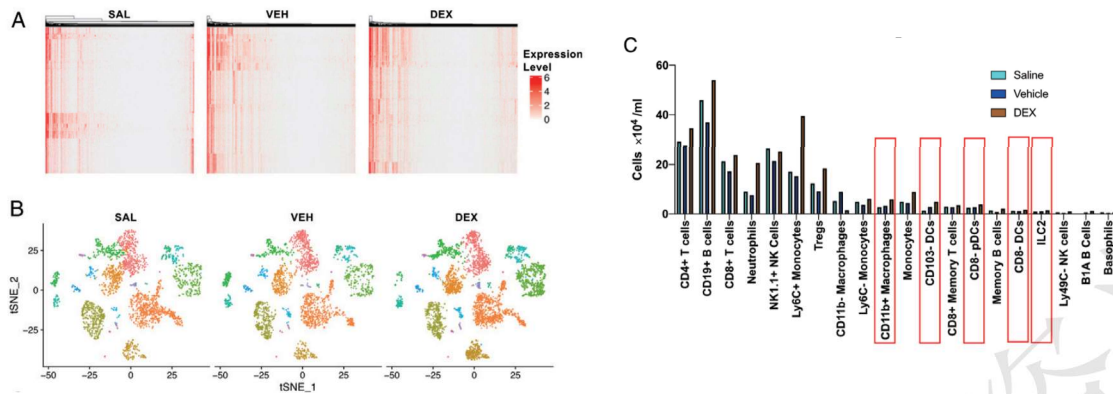


图2 scRNA-seq可识别多个细胞簇的增加和类固醇抗性表达

## 2型固有淋巴细胞通过介导CXCL-2中性粒细胞诱导肝癌微环境免疫抑制

研究单位: 浙江大学医学院附属第一医院

发表期刊: Hepatology

研究手段: 单细胞测序

影响因子: 17.425

由于组织固有特性, 2型固有淋巴细胞 ILC2 的功能随组织微环境不同而改变。大量研究表明 ILC2 介导多种炎症反应, 但是他们在肝癌中的作用仍然未知。在本研究中, 研究人员鉴定了肝细胞肝癌免疫微环境诱导的一种非经典 ILC2, 并深入分析了其对肝癌微环境的影响。

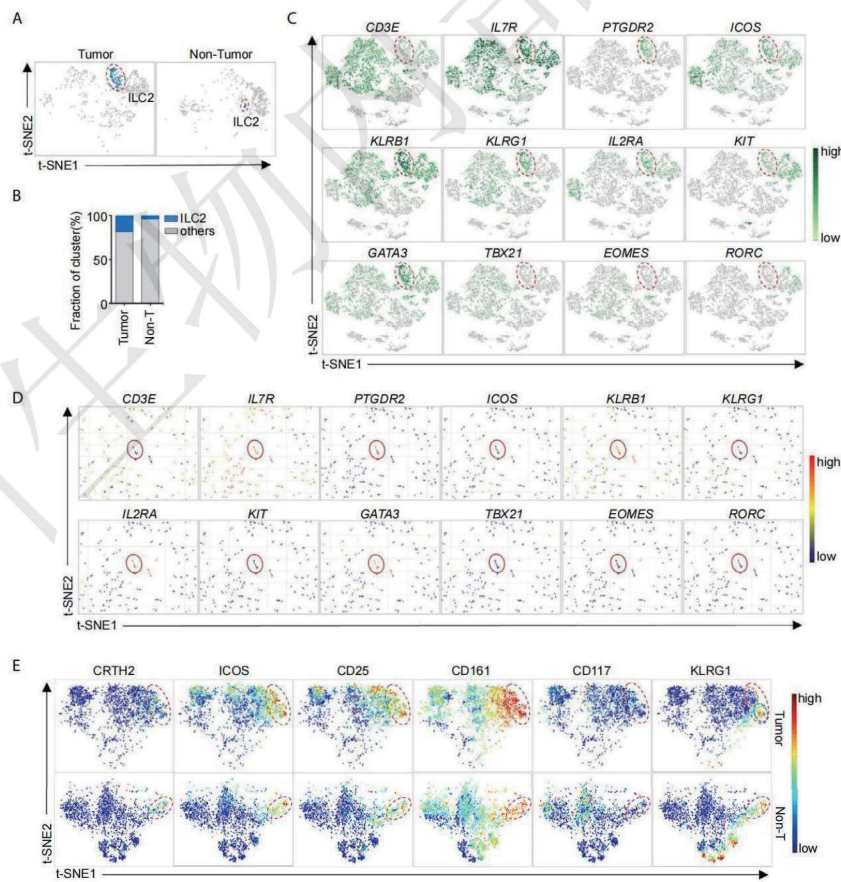


图3 肿瘤和非肿瘤组织中肝脏 ILC2 的表型

## 单细胞+miRNA揭示宇宙空间旅行, 人体如何应对太空压力

研究单位: NASA Ames研究中心

发表期刊: Cell Reports

研究手段: 单细胞测序

影响因子: 9.423

人、鼠等脊椎动物在太空环境中会表现出一系列独特的生物反应, 而电离辐射 (IR) 和微重力是低地球轨道 (LEO) 中的主要生物压力源。作者首先通过检测模拟太空飞行条件 (微重力、部分重力、LEO 相关 IR、深空辐射及其组合) 下小鼠和大鼠血清中的循环microRNA(miRNA)来验证预测的太空飞行相关 miRNA 特征。随后, 通过分析宇航员的miRNA 测序、单细胞 RNA 测序 (scRNA-seq) 和转座酶可及染色质(scATAC-seq), 研究了人类免疫细胞释放的miRNA与基因表达, 确定了受影响最大的细胞类型。此外, 作者发现miRNA的一个子集 (miR-125、miR-16 和 let-7a) 可以调节模拟深空辐射引起的血管损伤。

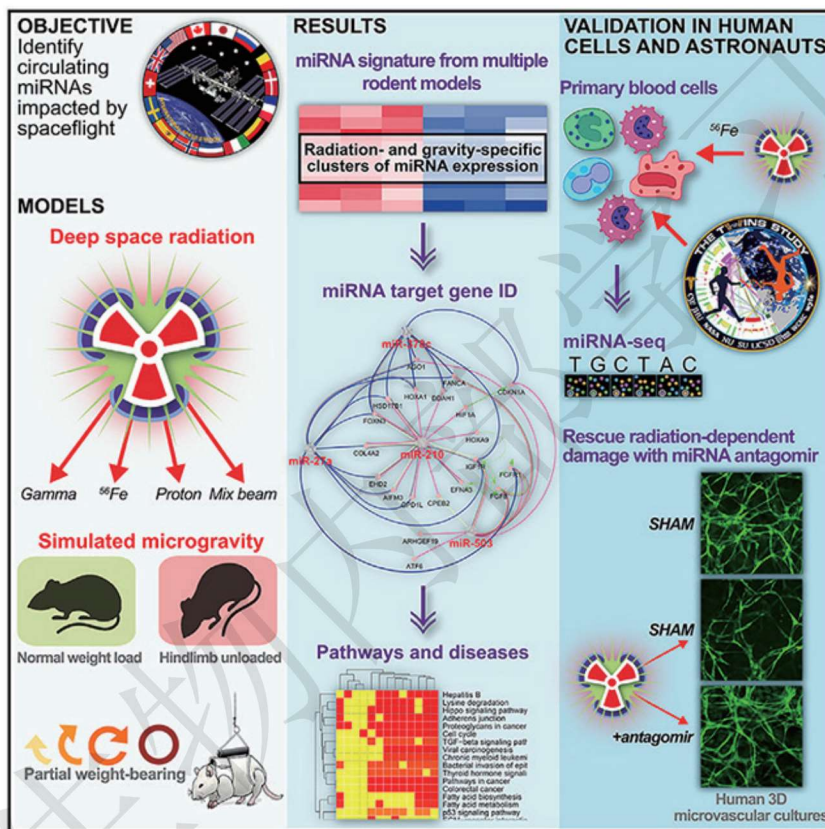


图4 研究概述

### 参考文献:

- [1]Shen H. et al. Mouse totipotent stem cells captured and maintained through spliceosomal repression. **Cell**. 2021.
- [2]Wang L. et al. Single-cell transcriptomic analysis reveals the immune landscape of lung in steroid-resistant asthma exacerbation. **PNAS**. 2021.
- [3]Xu X. et al. Group-2 Innate Lymphoid Cells Promote HCC Progression Through CXCL2-Neutrophil-Induced Immunosuppression. **Hepatology**. 2021.
- [4]Malkani S. et al. Circulating miRNA Spaceflight Signature Reveals Targets for Countermeasure Development. **Cell Reports**. 2020.

# 转录组学

## 全转录组测序

全转录组是指细胞所转录出来的所有类型RNA的总和,包括mRNA和非编码RNA(ncRNA),这些RNA是转录调控研究中的主要对象。目前针对ncRNA的研究主要集中在miRNA,lncRNA和circRNA上。根据研究目的,可以有针对性的选择其中之一进行深入研究,也可以结合多种RNA信息进行整合分析,系统揭示生物学背后的转录调控规律。

从ncRNA视角解析调控机制一直是转录调控研究的热门方向,而最近发现的mRNA、lncRNA、circRNA竞争性结合miRNA的调控网络(ceRNA机制)更是成为ncRNA转录调控研究的新焦点。

### 联川优势

- 长期专注于为研究人员提供高效优质的转录调控研究整体解决方案
- 技术多元,项目经验丰富
- 合作课题组发表的高水平ncRNA转录调控研究论文已超过1200余篇

### 技术服务

转录组

转录组测序

miRNA

miRNA测序

lncRNA

lncRNA测序

circRNA

circRNA测序

全转录组

全转录组测序

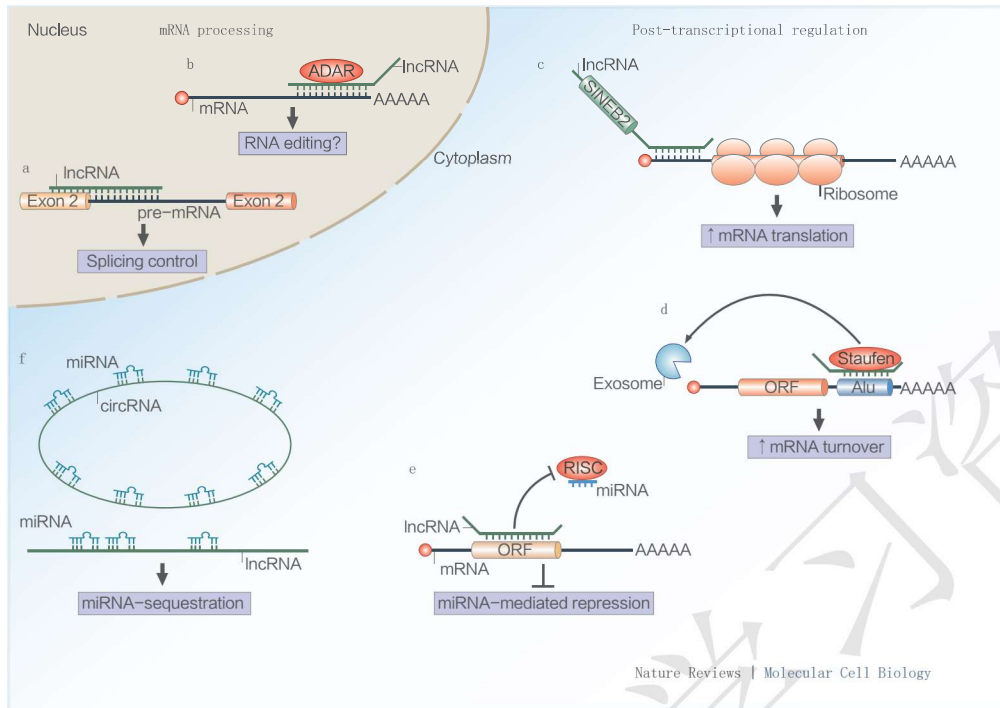
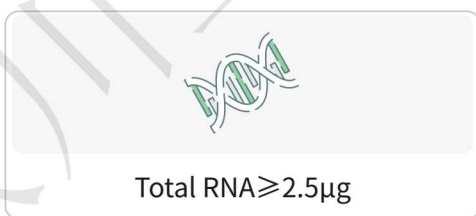


图 ncRNA (miRNA、lncRNA 和 circRNA) 和 mRNA 相互作用系统地参与转录调控技术服务

## 项目流程



## 样品准备

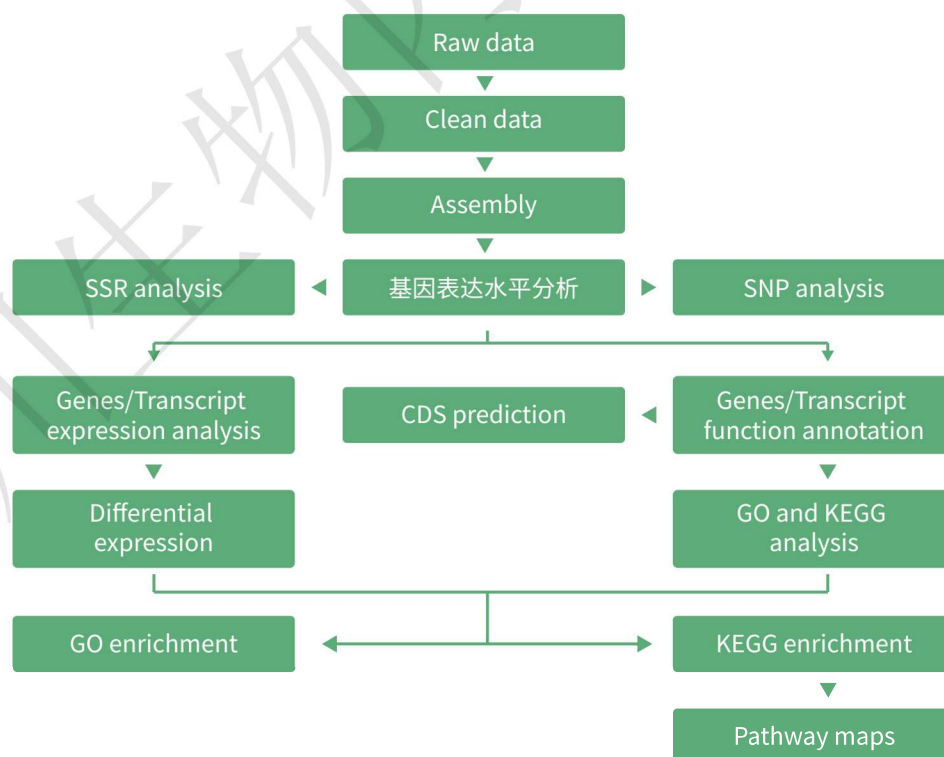
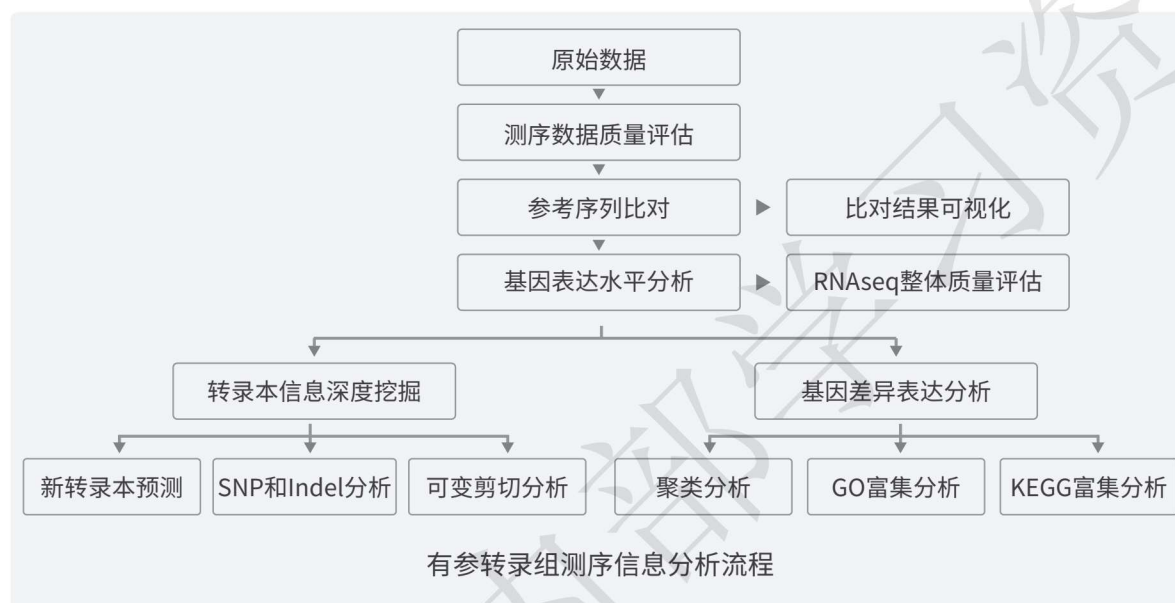


...  
(如您对其他样本RNA得率有疑问, 欢迎咨询我司技术支持或驻地销售获取详细信息)

## 转录组测序

转录组广义上指特定细胞在某一功能状态下的所有转录产物,包括mRNA和非编码RNA(ncRNA),其能够从整体水平研究基因功能以及基因结构,揭示特定生物学过程以及疾病发生过程中的分子机理。目前已广泛应用于基础研究、临床诊断和药物研发等领域。

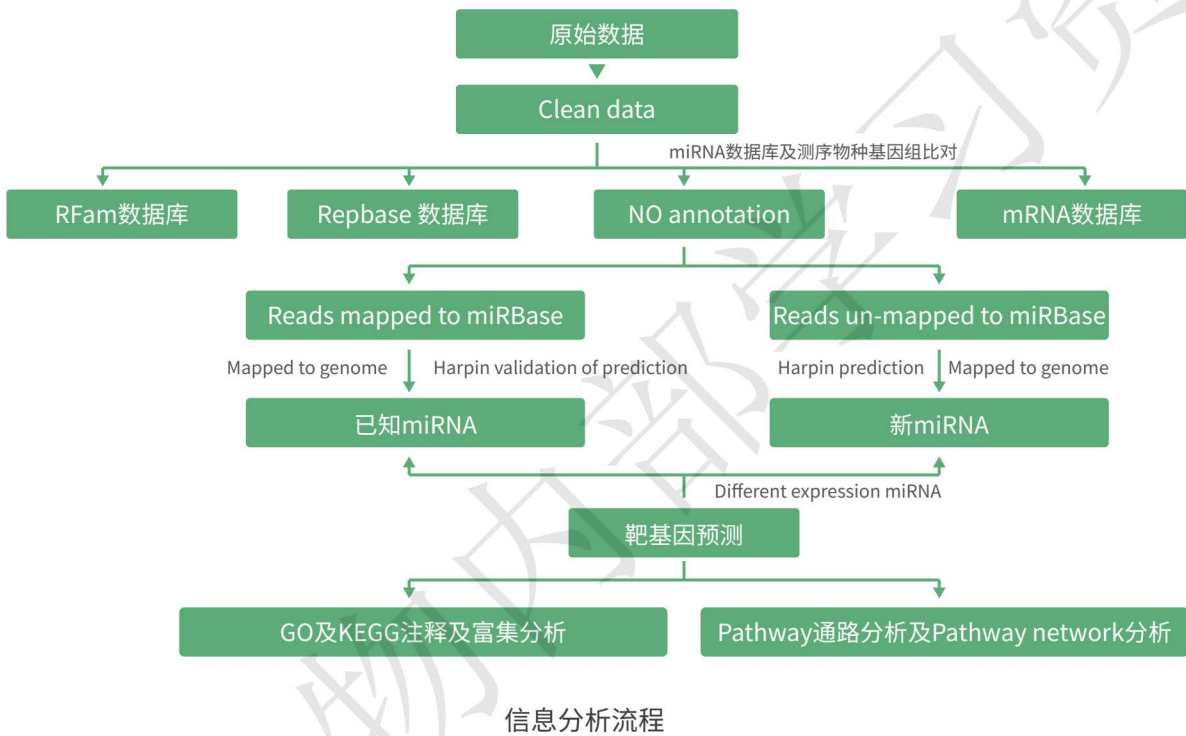
转录组测序特指对具有编码蛋白质功能的信使RNA(mRNA)进行序列测定及分析,以获得转录本信息,发现和鉴定新基因等。根据研究物种是否具有参考基因组以及注释信息,转录组测序可以分为有参转录组测序和无参转录组测序两个类型。



## miRNA测序

miRNA是在真核生物中发现的一类内源性的具有调控功能的非编码RNA (ncRNA), 其长度约为18~25nt。miRNA可在转录后水平与mRNA(靶基因)以完全匹配或不完全匹配的方式结合, 引起mRNA剪切降解或是抑制mRNA翻译来调控基因的表达, 进而发挥其生物学调控功能。

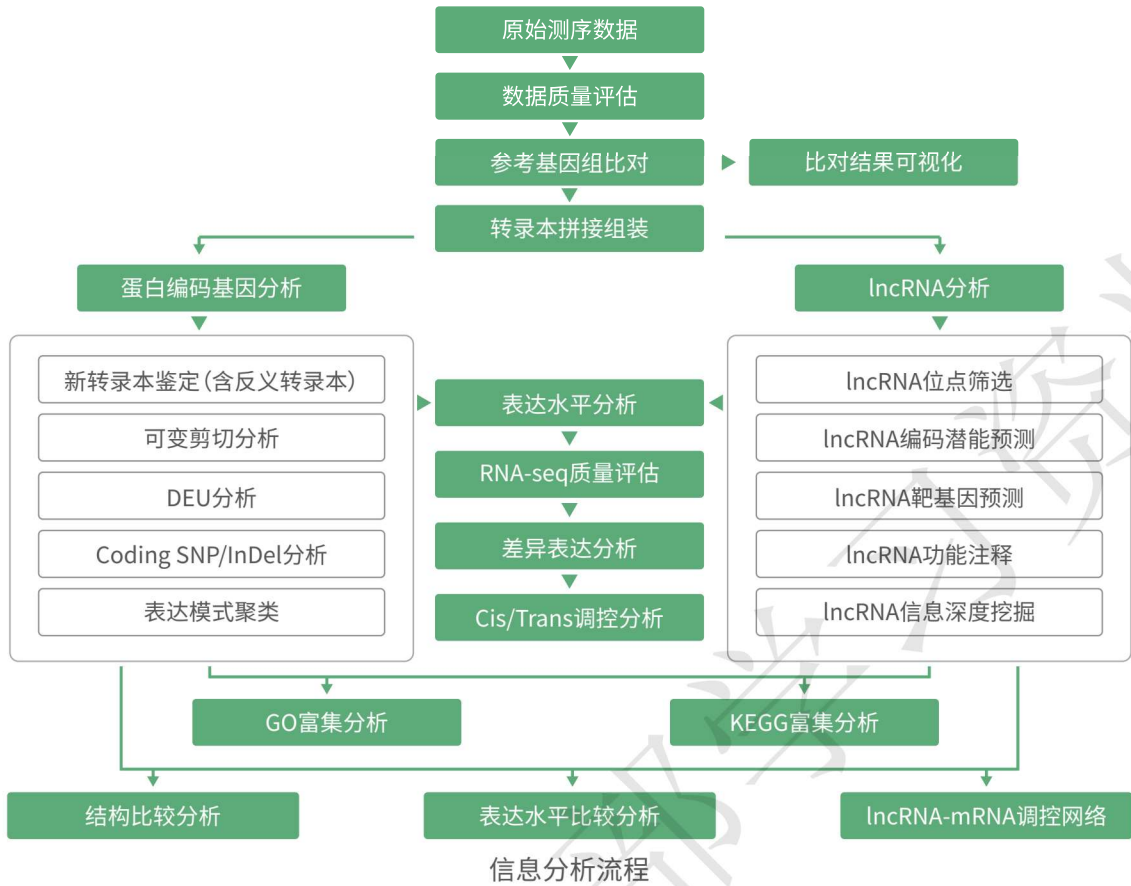
一个miRNA可以调控多个靶基因的表达, 多个miRNA也可以组合起来精细调控某一个基因的表达。miRNA参与的调节途径各种各样, 包括生长发育、病毒防御、造血过程、器官形成、细胞增殖和凋亡、脂肪代谢等。通过对miRNA进行测序及分析, 可以深入挖掘基因表达调控网络, 具有重要的生物学意义。



## LncRNA测序

长链非编码 RNA (lncRNA) 是一类长度大于200 nt的非编码RNA (ncRNA), 广泛存在于各种生物体内, 在表观遗传调控、细胞周期调控和细胞分化调控等众多生命活动中发挥重要作用, 与动植物的生长发育, 人类的疾病发生有着密切关系, 也可作为疾病诊断的标志物或是重要靶点。

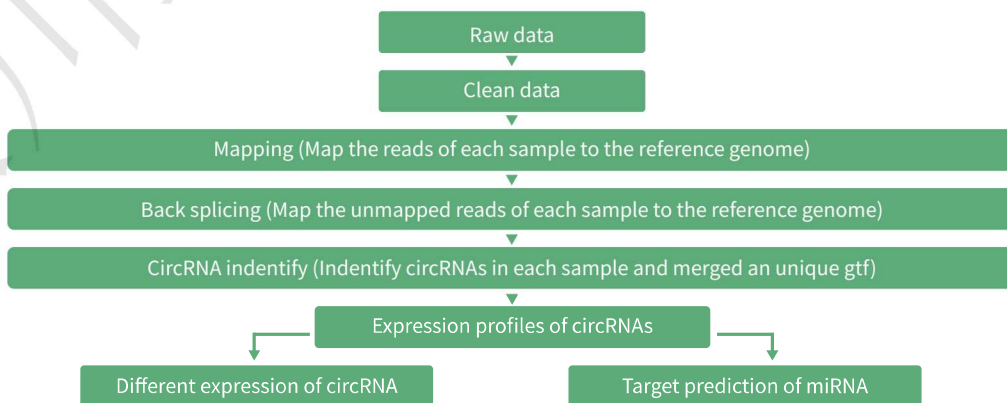
利用高通量测序技术进行lncRNA测序及生物信息学分析, 可快速准确地发现那些具有重要调控功能的lncRNA, 分析其与特定生物学过程的关系, 深入探索lncRNA的功能及其表达调控机制。



## circRNA测序

共价闭合、单链环状的 RNA (circRNA) 是一类比较特殊的RNA, 其没有游离的5'帽子结构和3' poly (A) 结构, 并且对核酸酶不敏感, 因此比普通的线性RNA (linear RNA) 更稳定。随着高通量测序以及生物信息分析技术的快速发展, 在不同物种中鉴定出成千上万个circRNA, 其中大多数circRNA在不同物种间具有保守性和稳定性, 并且circRNA的表达具有细胞特异性、组织特异性以及发育阶段特异性。

到目前为止, 已发现circRNA具有参与转录调控并能在转录时与mRNA前体发生剪切竞争的功能, 可以与mRNA竞争miRNA的靶标结合位点, 是ceRNA调控网络中的重要成员。尽管已经鉴定出大量的circRNA, 但是关于circRNA的功能以及成环机制仍然有待研究。



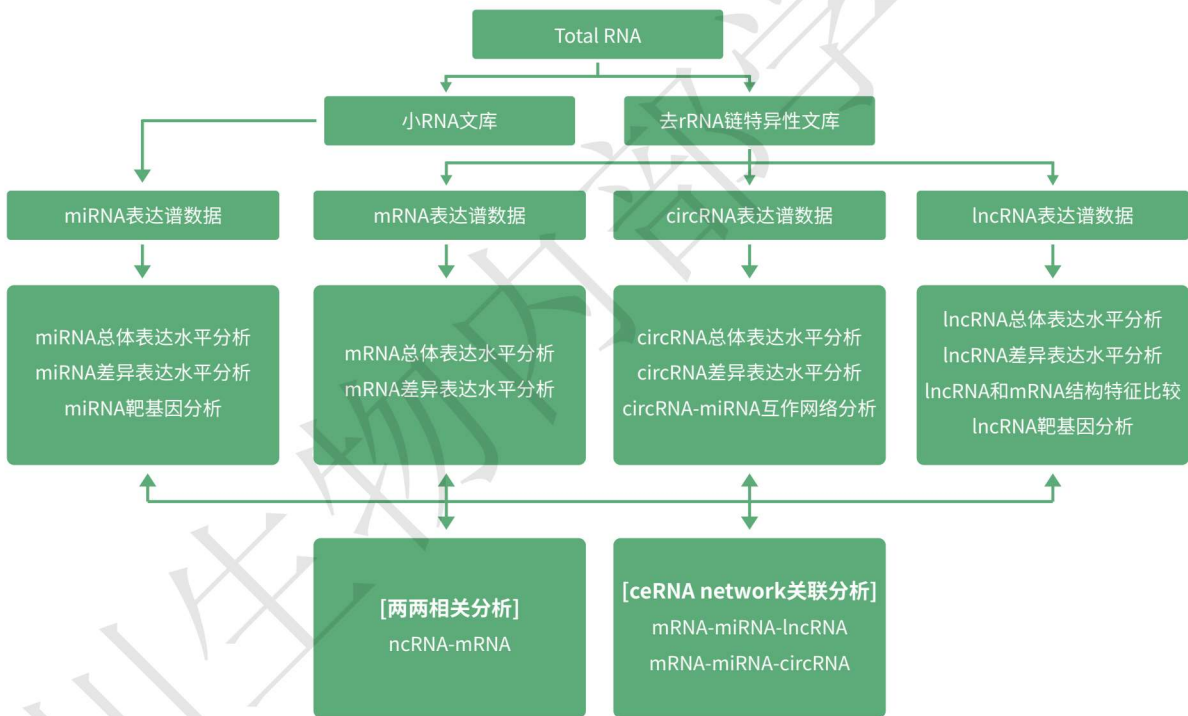
信息分析流程

circRNA测序的建库方式有两种,采用去除rRNA的建库方式,测序过程可以同时检测到mRNA和ncRNAs的表达水平;采用去除核糖体RNA (rRNA depletion) 加去除线性RNA (RNase R treat) 的建库方式,可以精确鉴定分析circRNA。

## 全转录组测序

广义的转录组指的是特定状态下细胞或组织中所有的转录产物,包含mRNA和非编码RNA (ncRNA)。对转录组中的ncRNA研究多集中在具有调控功能的smallRNA (以miRNA为代表), lncRNA和circRNA上,而这几类ncRNA的调控对象都和mRNA有关。其中, Competing endogenous RNA (ceRNA) 也叫内源性竞争结合RNA,是目前研究人气较高的一种新型调控RNA, ceRNA参与的调控网络也叫ceRNA network。

全转录组测序即对这些特定状态下全部的转录产物进行研究,包含ncRNAs和mRNA,通过测序和数据分析后,可深入探索潜在的转录调控规律,在RNA层面系统地揭示复杂的生物学意义。



信息分析流程



## 案例分

### TcpC通过增强泛素化介导的肽基精氨酸脱亚胺酶4的降解来抑制中性粒细胞胞外陷阱的形成

研究单位:浙江大学

发表期刊:Nature Communications

研究手段:转录组测序

影响因子:14.919

本文通过对LPS(脂多糖)和/或rTcpC(重组尿路致病性大肠杆菌的多功能毒力因子)处理的中性粒细胞进行了全基因组转录组学分析,确定中性粒细胞胞外陷阱形成(NETosis)过程中转录活性的相关性,揭示了TcpC对NETosis的影响及其机制。结果发现rTcpC对基因转录本的下调作用大于上调作用,ros依赖性NETosis的大量超氧化相关基因转录本和细胞因子被抑制,因此,TcpC不仅显著抑制了NETosis过程中染色质的解聚,而且影响了基因的转录。这一发现为Tcpc介导的先天免疫逃避提供了一种新的机制。

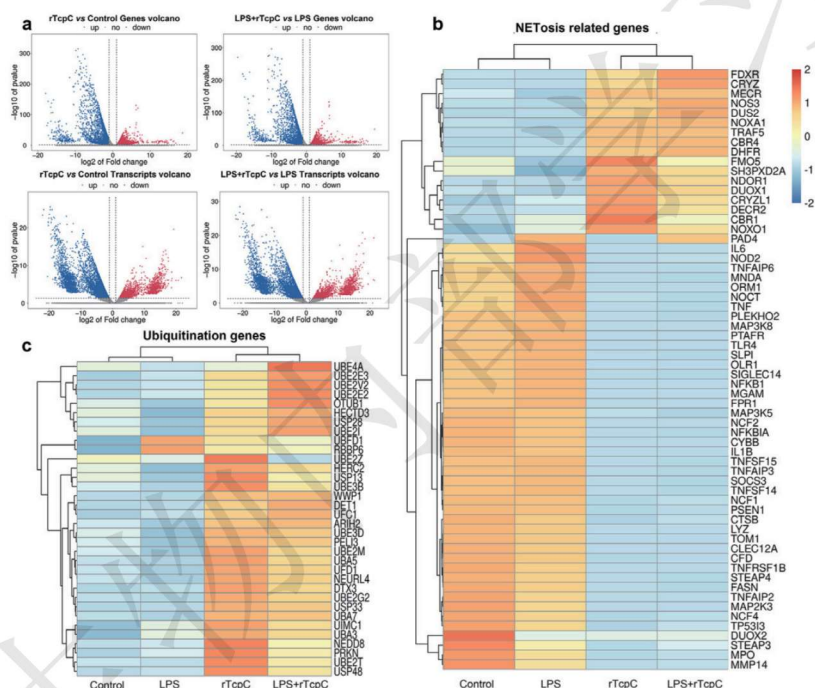


图1 rTcpC 影响中性粒细胞中基因的转录

### FGF4为非酒精性脂肪肝的潜在治疗新靶点

研究单位:温州医科大学

发表期刊:Hepatology

研究手段:转录组测序

影响因子:17.42

作者首先通过大样本临床分析,发现肝实质细胞特异表达的FGF4是FGFs家族成员中唯一的NAFLD/NASH负性响应因子,与脂肪肝病人的病程进展呈现显著的负相关;进一步,通过构建肝脏实质细胞特异性敲除Fgf4的转基因老鼠,发现Fgf4的缺失会显著加重高脂饮食(High-fat diet, HFD)引起的肝脏脂肪变性和损伤,提示FGF4可作为肝脏内源性保护因子及疾病的新型生物标记物。该研究还构建了HFD诱导的NAFLD和胆碱缺乏的HFD(choline-deficient HFD, CD-HFD)诱导的NASH小鼠模型,发现外源重组rFGF4能够显著减轻NAFLD/NASH小鼠肝脏脂肪变性、炎症、肝脏损伤和纤维化,从而达到改善甚至逆转NAFLD/NASH的作用。

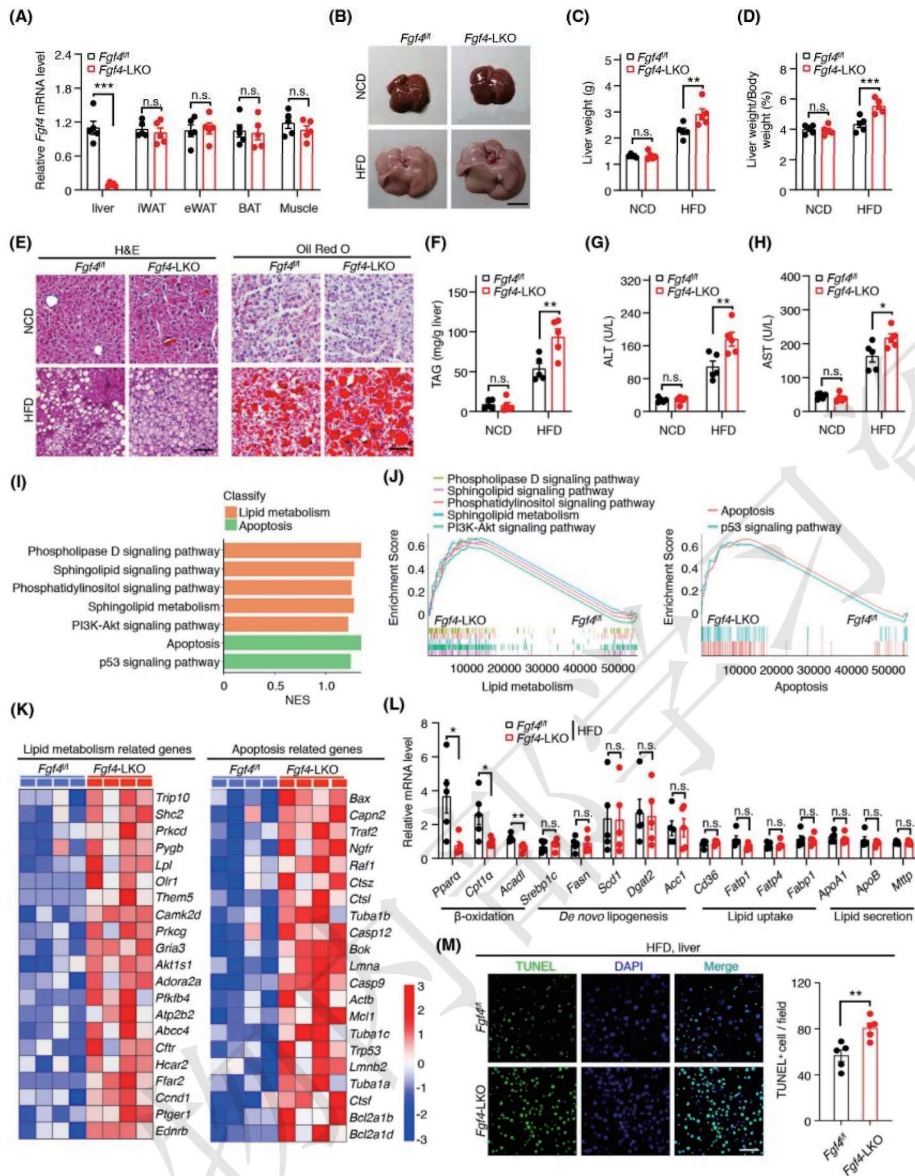


图2 Fgf4的肝脏特异性缺失加剧了慢性HFD挑战下的肝脏脂肪变性和组织损伤

**细胞周期蛋白D2过表达增强人诱导多能干细胞来源的心肌细胞在心梗模型中修复心肌的功效**

研究单位:阿拉巴马大学伯明翰分校

发表期刊:Circulation

研究手段:miRNA测序

影响因子:29.69

本研究发现大型哺乳动物急性心肌梗死模型中,过表达CCND2(细胞周期蛋白D2)的CCND2<sup>OE</sup>Exos增强了人类诱导多能干细胞分化为心肌细胞的能力,促进了移植物和受体组织中的心肌细胞增殖。CCND2<sup>OE</sup>Exos与CCND2<sup>WT</sup>Exos的批量miRNA测序分析分别鉴定了206和91个显著上调和下调的miRNA基因,本体富集分析确定了来自各种功能类别和途径的miRNA表达谱的显著差异,包括与细胞周期检查点(G2/M和G1/S转换)或胞质分裂机制有关的miRNA。结果表明CCND2<sup>OE</sup>CMs移植可能是修复梗塞心脏的潜在治疗策略。

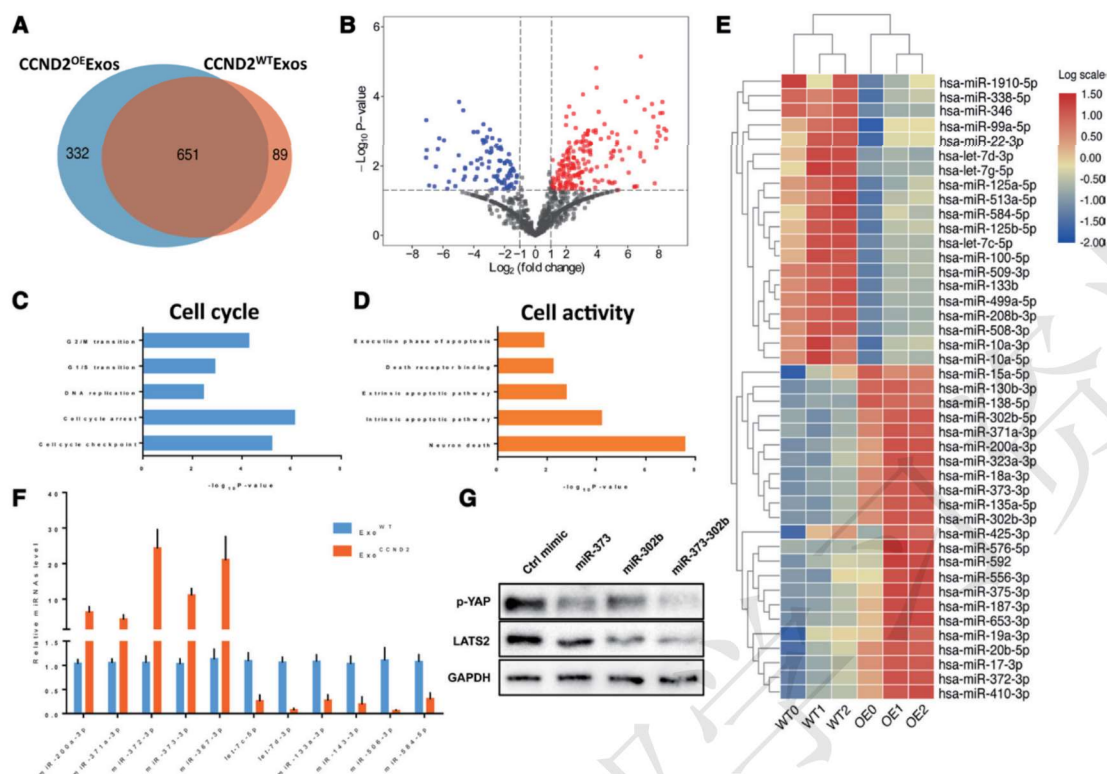


图3 CCND2在hiPSC-CM中的过度表达改变了hiPSC-CM分泌的外泌体的miRNA含量

### PD-L1 lncRNA 剪接异构体通过增强c-Myc活性促进肺腺癌进展

研究单位: 南京大学

发表期刊: Genome Biology

研究手段: lncRNA测序

影响因子: 13.583

本研究发现无论PD-L1蛋白在肿瘤中是阳性还是阴性, 人肺腺癌(LUAD)都会通过选择性剪接产生一个长链非编码RNA亚型PD-L1 (PD-L1-lnc)。与PD-L1 mRNA相似, 各种肺腺癌细胞中的PD-L1-lnc均被IFN $\gamma$ 显著上调。结果表明PD-L1基因可以通过选择性剪接产生长链非编码RNA, 增强c-Myc活性从而促进肺腺癌进展, 这一结果支持了PD-L1-lnc联合PD-L1阻断在肺癌治疗研究中的作用。

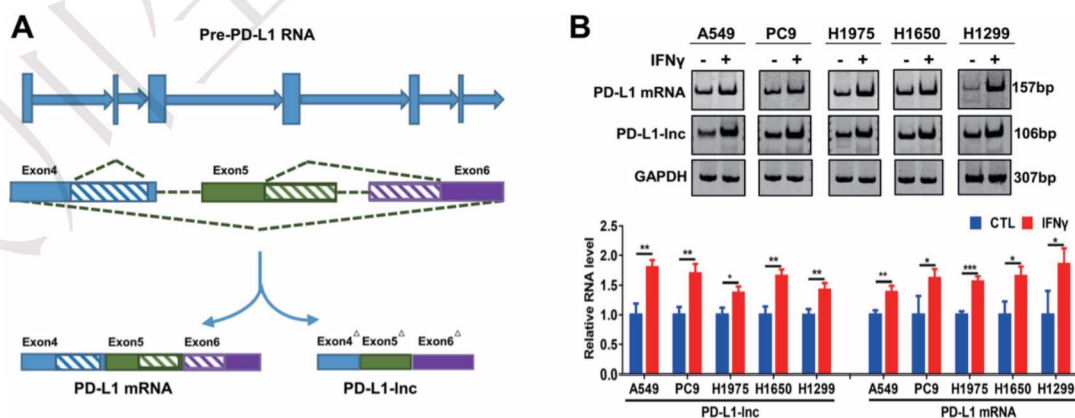


图4 人LUAD PD-L1-lnc受IFN $\gamma$ 治疗的调节

## 睾丸癌lncRNA促进肝癌发生发展的新机制

研究单位: 南京大学附属鼓楼医院

发表期刊: Nature Cancer

研究手段: lncRNA测序

影响因子: 21.937

睾丸癌 (Cancer-testis, CT) 基因正常情况下只在睾丸组织中特异表达, 而在成体其余组织中表达沉默。但是, CT基因在肿瘤发生过程中会被重新激活, 驱动肿瘤的恶性进程。CT基因这一独特的表达特征使其成为潜在的肿瘤治疗靶点。近年来, 研究发现长链非编码RNA (lncRNA) 通过与蛋白或者核酸相互作用, 调控多种肿瘤的发生发展。但是lncRNA在不同物种的进化过程中保守性不高, 这限制了在模式动物 (特别是小鼠和灵长类动物) 上研究lncRNA的生物学功能。是否存在进化保守, 并且符合CT基因表达特征的lncRNA (CT-lncRNA) 值得深入研究, CT-lncRNA可能成为预测肿瘤恶性进程生物标志物和治疗恶性肿瘤的新靶点。

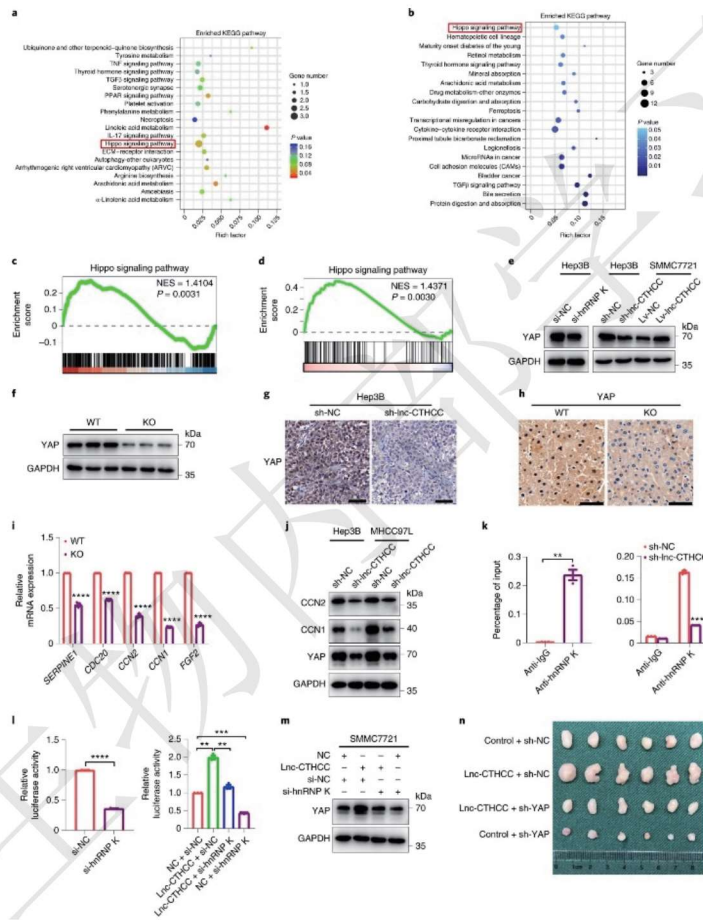


图5 lnc-CTHCC的m6A修饰增加了其在HCC细胞中的稳定性

## Circ3823 有助于结直肠癌的生长、转移和血管生成: miR-30c-5p/TCF7 轴的参与

研究单位: 河南省医药科学研究院

发表期刊: Molecular Cancer

研究手段: circRNA测序

影响因子: 27.401

本研究采用高通量测序分析结直肠癌 (CRC) 肿瘤和非肿瘤组织中circRNAs的差异表达, 其中Circ3823在CRC中明显高表达, 通过体外和体内功能实验研究circ3823对CRC肿瘤生长、转移和血管生成的影响。结果表明circ3823通过circ3823/miR-30c-5p/TCF7轴促进CRC生长、转移和血管生成, 可能作为CRC患者治疗的新诊断标志物或靶点。

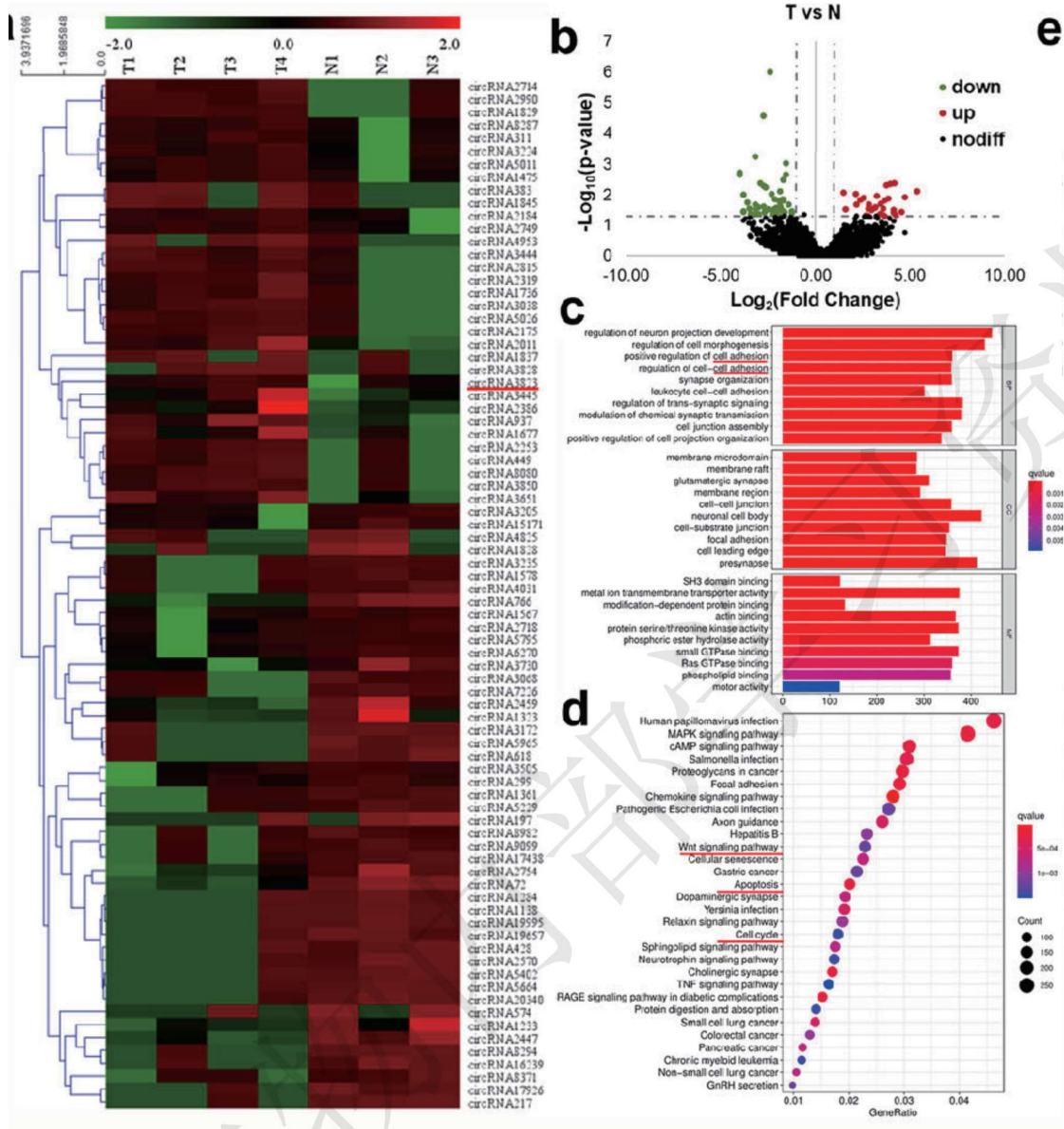


图6 CRC组织和正常组织中circRNA表达谱及血清和组织中circRNAs表达的验证

### 细胞外囊泡 circDYM 治疗抑郁症

研究单位: 东南大学医学院

发表期刊: Journal of Extracellular Vesicles

研究手段: circRNA测序

影响因子: 25.843

通过超速离心从过表达的 circDYM HEK 293T 细胞中成功纯化了 RVG-circDYM-EVs, 并且成功地证明了 RVG-circDYM-EVs 在大小、形态和特异性标记方面的表征。除了展示 RNA 药物递送技术的概念验证外, 该研究还观察到 RVG-circDYM-EV 的全身给药可有效地将 circDYM 递送至大脑, 并减轻 CUS 诱导的抑郁样行为, 该研究发现 RVG-circDYM-EV 显著抑制小胶质细胞活化、BBB 渗漏和外周免疫细胞浸润, 并减轻 CUS 诱导的星形胶质细胞功能障碍。CircDYM 可以与转录因子 TAF1 (TATA-box 结合蛋白相关因子 1) 结合, 导致其下游靶基因的表达降低, 从而抑制神经炎症。

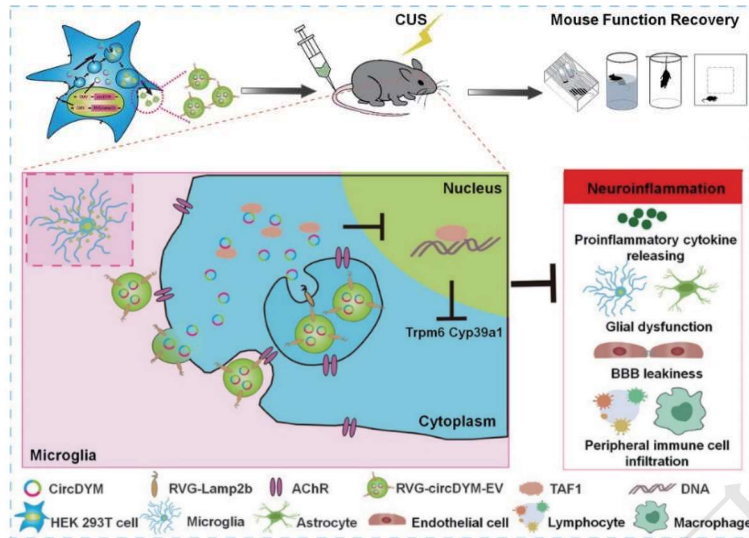


图7 RVG-circDYM-EVs对CUS小鼠功能恢复影响的示意图

### N<sup>6</sup>-甲基腺苷诱导的circ1662通过加速YAP1核定位促进结直肠癌转移

研究单位: 郑州大学第一附属医院结直肠外科

发表期刊: Theranostics

研究手段: 全转录组测序

影响因子: 11.556

本研究对6对CRC (结直肠癌) 及邻近正常组织进行高通量测序, 鉴定mRNA和circRNA的表达谱。结果发现一种新型circRNA circ1662 在结直肠癌组织中的表达明显高于配对的正常组织。在功能上, circ1662 通过控制体外和体内EMT (上皮间质转化) 促进CRC细胞侵袭和迁移; 机制上, circ1662 直接与YAP1结合并加速其核积累以调节SMAD3通路, 说明circ1662是CRC转移的新的预后和治疗标志物。

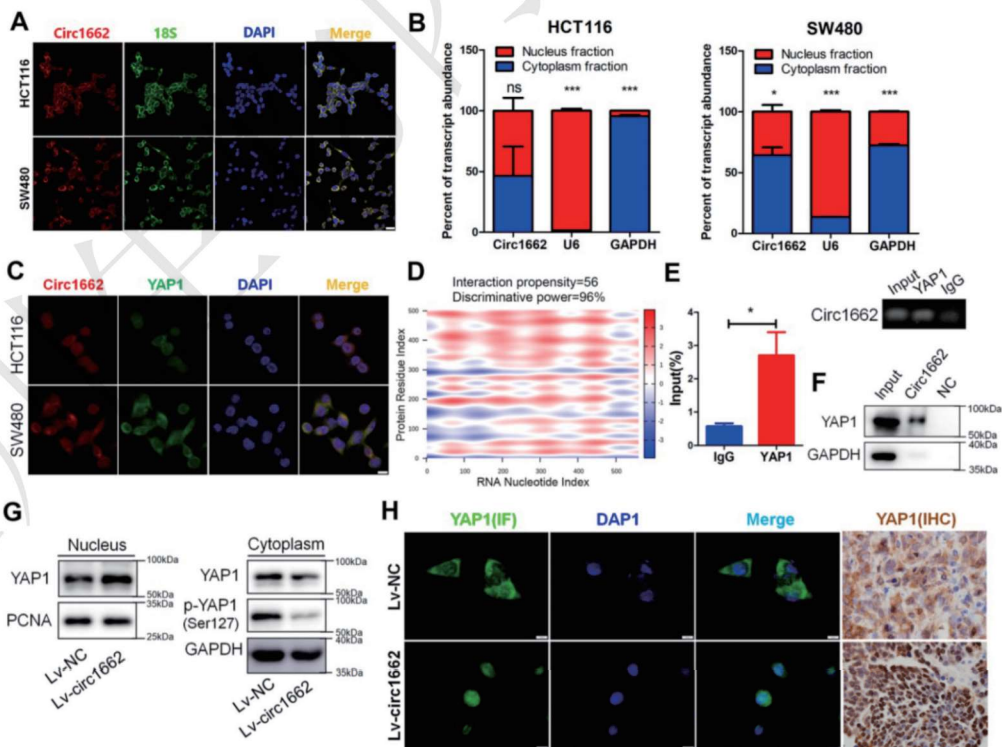


图8 circ1662通过促进YAP1的核转运促进CRC细胞的侵袭和迁移

## 参考文献

[1]Ou Q. *et al.* TcpC inhibits neutrophil extracellular trap formation by enhancing ubiquitination mediated degradation of peptidylarginine deiminase 4. **Nature communications**. 2021.

[2]Song L., *et al.* FGF4 protects the liver from non-alcoholic fatty liver disease by activating the AMPK-Caspase 6 signal axis. **Hepatology**. 2022.

[3]Zhao M. *et al.* Cyclin D2 Overexpression Enhances the Efficacy of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes for Myocardial Repair in a Swine Model of Myocardial Infarction. **Circulation**. 2021.

[4]Qu S. *et al.* PD-L1 lncRNA splice isoform promotes lung adenocarcinoma progression via enhancing c-Myc activity. **Genome biology**. 2021.

[5]Xia A. *et al.* The cancer-testis lncRNA lnc-CTHCC promotes hepatocellular carcinogenesis by binding hnRNP K and activating YAP1 transcription. **Nature Cancer**. 2022.

[6]Guo Y. *et al.* Circ3823 contributes to growth, metastasis and angiogenesis of colorectal cancer: involvement of miR-30c-5p/TCF7 axis. **Molecular cancer**. 2021.

[7]Yu X. *et al.* Extracellular vesicle - mediated delivery of circDYM alleviates CUS - induced depressive - - like behaviours. **Journal Of Extracellular Vesicles**. 2022.

[8]Chen C. *et al.* N<sup>6</sup>-methyladenosine-induced circ1662 promotes metastasis of colorectal cancer by accelerating YAP1 nuclear localization. **Theranostics**. 2021.

## 基因表达谱芯片

基因表达谱芯片以及基于安捷伦表达谱芯片而延伸定制化平台,可以根据自己所需定制相应的探针。联川生物的安捷伦基因表达谱芯片、lncRNA芯片及ceRNA芯片,能够对样本中所有的mRNA、lncRNA和circRNA进行表达谱检测。

安捷伦芯片本身无需对RNA进行扩增即可直接进行探针杂交,免去了PCR偏好性以及样本中可能存在污染等问题。对于血清、血浆以及外泌体中的微量RNA样本有着非常好的检测灵敏度。

### 联川优势

- 联川生物基于安捷伦公司专利芯片技术和超过十年的芯片实验经验,为研究者提供更完整的lncRNA, circRNA和mRNA筛查。

### 芯片参数

	表达谱芯片(人)	表达谱芯片(小鼠)	表达谱芯片(大鼠)	lncRNA芯片(人)	ceRNA芯片(人)
芯片规格	8×60k	8×60k	8×60k	4×180k	4×180k
mRNA探针数量	26,083	27,122	30,584	26,083	26,083
lncRNA探针数量	30,606	4,578	0	105,135	50,433
circRNA探针数量	0	0	0	0	88,701
探针长度	60nt				
探针数据库来源	安捷伦官方	安捷伦官方	安捷伦官方	16个主流数据库	7个主流数据库

### 技术服务

基因表达谱

基因表达谱芯片

lncRNA

lncRNA芯片

ceRNA

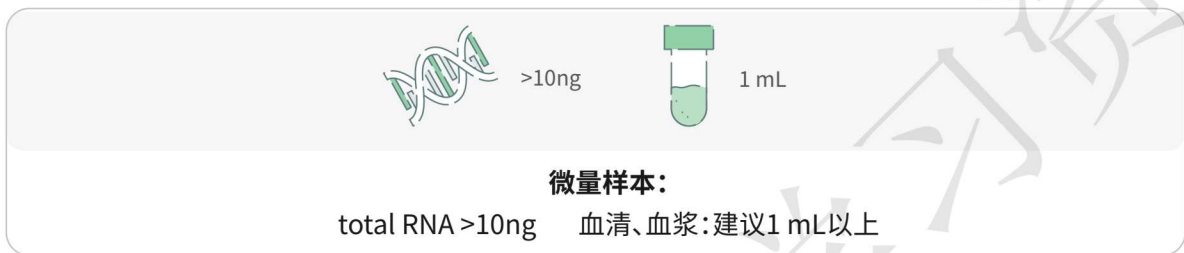
ceRNA芯片



## 项目流程



## 样品准备



## 基因表达谱芯片

基因表达谱分析是研究基因功能的基础。利用基因表达谱芯片对不同发育时期或是不同处理条件下的样品展开分析,可以广泛快速可靠地筛选出差异表达基因,展开功能和通路分析。使用芯片进行基因表达谱分析已成为生理调控、生物标记、疾病机理和药物筛选等领域广泛采用的检测手段。

## lncRNA芯片

lncRNA是一类长度大于200 nt的非编码RNA,广泛存在于各种生物体内,在表观遗传、转录以及转录后等多种水平上对生命活动进行关键性的调控。大量的医学研究证实,lncRNA与人类的疾病如癌症等发生密切相关,并且可作为疾病诊断的标志物或是重要靶点。

## ceRNA芯片

基因的转录后调控是一个十分复杂的精细调控网络。这其中，竞争性内源RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 调控机制最为引人注目：microRNA (miRNA) 处在这个调控网络的中心，由于长非编码RNA分子通常富含miRNA结合位点，可以竞争性地结合miRNA，解除miRNA对其靶基因的抑制作用，进而调控基因的表达水平。在ceRNA机制中，circRNA和lncRNA因为常携带多个miRNA结合位点，是典型的ceRNA。阐释circRNA和lncRNA发挥的ceRNA调控机制，将帮助医学研究者深入理解疾病发生发展过程中的精细调控网络，并可能指导药物开发和疾病诊治。

## 案例分析

### 乳腺癌外泌体传递lncRNA SNHG16诱导CD73+ $\gamma\delta$ 1 Treg细胞

研究单位：浙江大学第二附属医院乳腺外科

发表期刊：Signal Transduction and Targeted Therapy

研究手段：lncRNA/ceRNA芯片

影响因子：18.187

本研究对40对中国患者的BC (乳腺癌) (MCF-7和MDA-MB-231)和正常组织样本 (MCF-10A) 外泌体lncRNA差异表达情况进行分析，发现 $\gamma\delta$ 1 T细胞构成了BC中大部分的CD3+ T细胞。CD73+ $\gamma\delta$ 1 T细胞是BC中主要的调节性T细胞(Treg)群体，乳腺肿瘤细胞来源的外泌体 (TDEs) 可以将上调CD73表达的lncRNA SNHG16传递给 $\gamma\delta$ 1 T细胞。在机制方面，SNHG16作为ceRNA，通过海绵吞噬miR-16-5p，导致其靶基因SMAD5的下调，从而增强TGF- $\beta$ 1/SMAD5通路，上调 $\gamma\delta$ 1 T细胞中CD73的表达。结果表明，bc来源的外泌体SNHG16/ miR-16-5p/SMAD5调节轴增强TGF- $\beta$ 1/SMAD5通路的激活，诱导 $\gamma\delta$ 1 T细胞中CD73的表达。本研究结果首次确定了CD73+ $\gamma\delta$ 1 treg在BC中的意义，针对该亚群或阻断TDEs的治疗可能在未来的BC治疗中具有潜力。

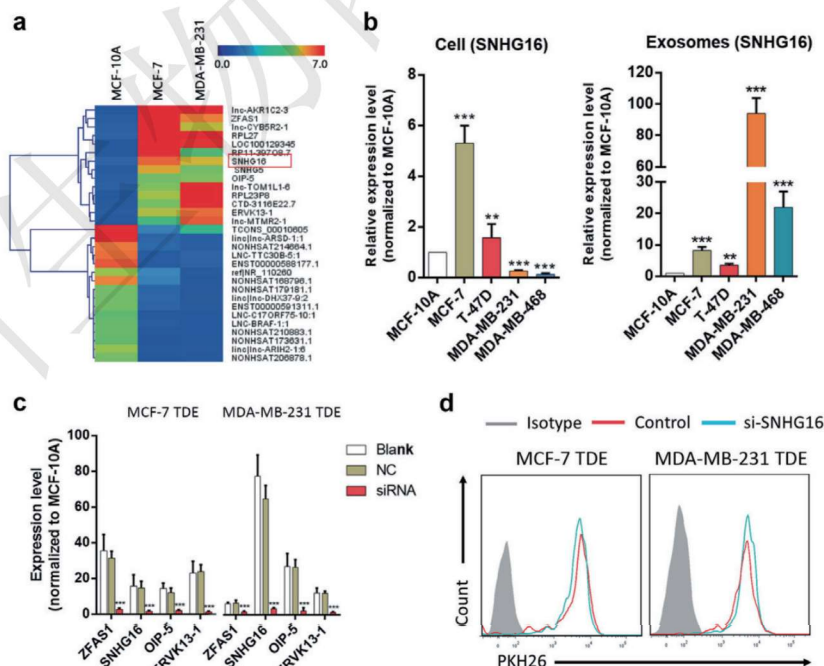


图1 TDE通过lncRNA SNHG16上调 $\gamma\delta$ 1 T细胞中CD73的表达

## 环状RNA circPPM1F 调节1型糖尿病中M1巨噬细胞活化和胰岛炎症

研究单位:复旦大学儿童医院

发表期刊:Theranostics

研究手段:circRNA芯片

影响因子:11.556

本研究通过全转录组微阵列测定巨噬细胞在1型糖尿病(T1DM)儿童外周血单核细胞(PBMC)的circRNA(circPPM1F)的表达、功能和调节机制。结果显示circPPM1F主要在单核细胞中表达,并在T1DM患者中显著上调。在功能上,circPPM1F通过增强NF- $\kappa$ B信号通路促进脂多糖(LPS)诱导的M1巨噬细胞活化;从机制上讲,circPPM1F与HuR竞争性相互作用以损害蛋白质磷酸酶、Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>依赖性1F(PPM1F)的翻译,从而减轻PPM1F对NF- $\kappa$ B通路的抑制作用。说明circPPM1F是通过circPPM1F-HuR-PPM1F-NF- $\kappa$ B轴激活M1巨噬细胞的新型正调节因子,其过表达可通过增强M1巨噬细胞活化来促进胰岛损伤,作为儿童T1DM的新潜在治疗靶点。

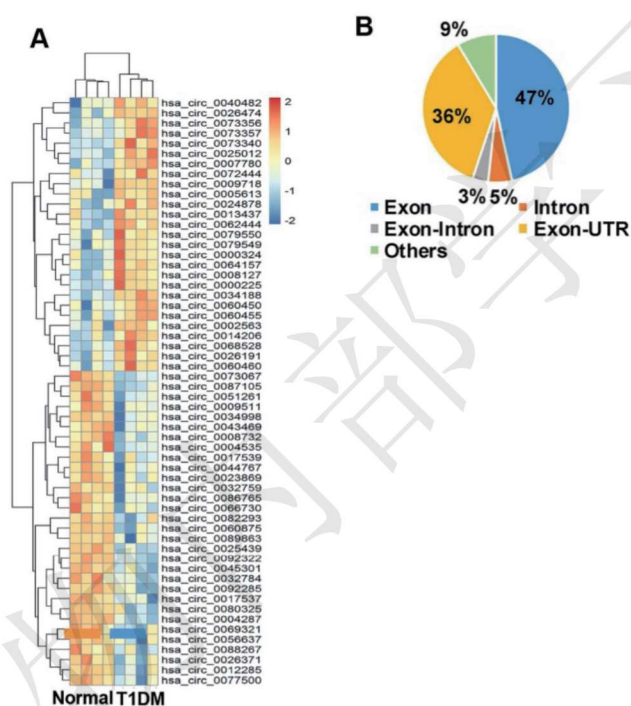


图2 circPPM1F上调并与来自1型糖尿病患者外周血单核细胞中的炎症细胞因子相关

[1]Ni C. *et al.* Breast cancer-derived exosomes transmit lncRNA SNHG16 to induce CD73+ $\gamma$  $\delta$ 1 Treg cells. **Signal transduction and targeted therapy.** 2020.

[2]Zhang C. *et al.* Circular RNA circPPM1F modulates M1 macrophage activation and pancreatic islet inflammation in type 1 diabetes mellitus. **Theranostics.** 2020.

# 表观组学

## m<sup>6</sup>A甲基化测序

近年来RNA上修饰逐渐成为研究的热点,包括N<sup>6</sup>甲基腺苷修饰(m<sup>6</sup>A)、N1甲基腺苷修饰(m<sup>1</sup>A)、甲基胞嘧啶修饰(m<sup>5</sup>C)、假尿苷修饰(Ψ)等。作为mRNA中最常见的甲基化修饰,m<sup>6</sup>A主要富集在mRNA的启动子区、终止密码子区附近。作为一种可逆化修饰, RNA既可以在甲基化转移酶的作用下发生m<sup>6</sup>A甲基化修饰,又可以在FTO、ALKBH5等酶的作用下发生去甲基化修饰。

### 联川优势

- 携手RNA甲基化研究国际知名团队,深度优化实验与分析流程
- 提炼数百篇顶级RNA甲基化文章思路,量身定制前沿实验方案
- 提供多组学整合分析与功能验证一站式服务,大幅缩短实验周期
- 一流的数据挖掘团队+丰富的论文审稿经验,加速科研成果发表

联川生物是国内目前m<sup>6</sup>A高分文章产出最多的服务公司,用户文章囊括了Nature主刊、Cell主刊、Nature Communications、Science Advances、Molecular Cancer等顶级杂志,总数量超过50篇。此外公司还开发了1μg超微量m<sup>6</sup>A-seq等前沿技术,是您值得信赖的合作伙伴。

### 技术服务

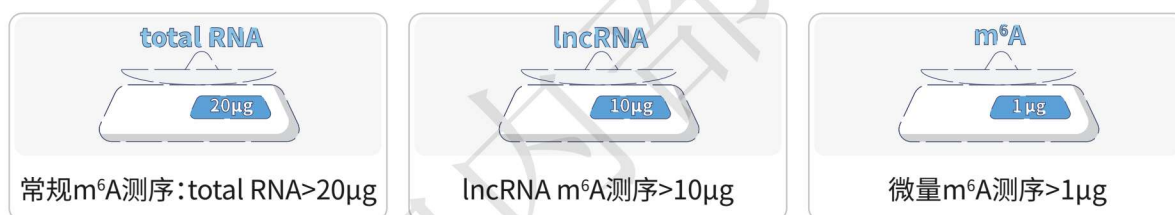
m<sup>6</sup>A

m<sup>6</sup>A /微量m<sup>6</sup>A甲基化测序

## 项目流程



## 样品准备



(由于物种及样本类型不一,具体送样量请咨询我司技术人员)

## 案例分析

### Hakai 在果蝇 m<sup>6</sup>A 修饰通路中的作用

研究单位: 复旦大学

发表期刊: Nature Communications

研究手段: m<sup>6</sup>A-seq

影响因子: 14.919

本研究分析了潜在的E3泛素连接酶Hakai与其他m<sup>6</sup>A甲基转移酶组件共定位并相互作用的机理, Hakai突变体在果蝇中表现出典型的m<sup>6</sup>A通路缺陷, 例如mRNA中的m<sup>6</sup>A水平降低, 异常的Sxl表达导致mRNA选择性可变剪接、长短翅表型和行为缺陷等。Hakai、Vir、Fl(2)d和Flac形成稳定的复合物, 复合物的破坏会导致其他三个组分的降解。通过m<sup>6</sup>A-seq表明果蝇mRNA上m<sup>6</sup>A修饰规律与哺乳动物相反, 其中果蝇的m<sup>6</sup>A修饰主要分布在mRNA的5' UTR区域而哺乳动物通常在3' UTR和5' UTR都有分布。本研究促进了对m<sup>6</sup>A甲基转移酶蛋白复合体的机制和调控的理解, 并对Sxl基因如何与m<sup>6</sup>A修饰调控自身mRNA剪接提供了理论基础。

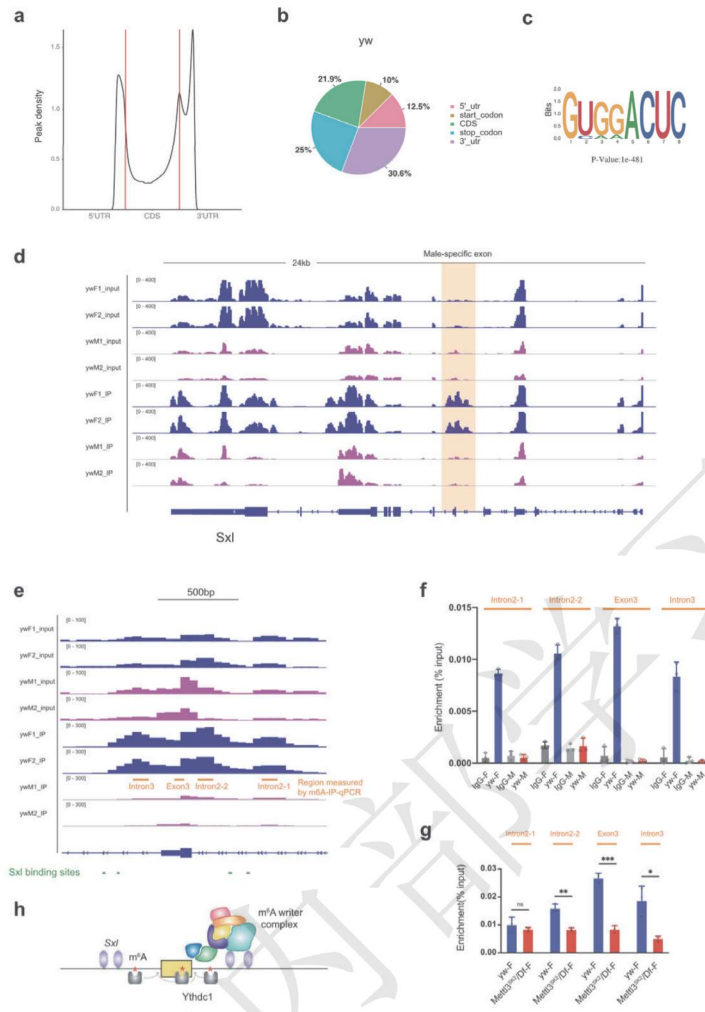


图1 m<sup>6</sup>A 在Sxl mRNA上的雌性特异性沉积

**甲基转移酶样蛋白14减弱线粒体抗病毒信号蛋白表达, 通过N<sup>6</sup>-甲基腺苷修饰负调节抗病毒免疫**

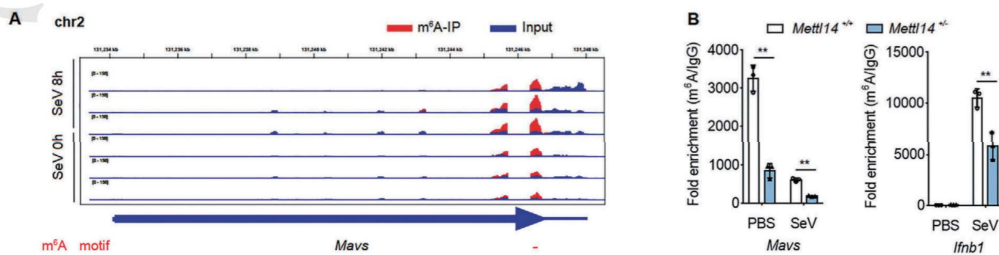
研究单位: 山东大学齐鲁医学院

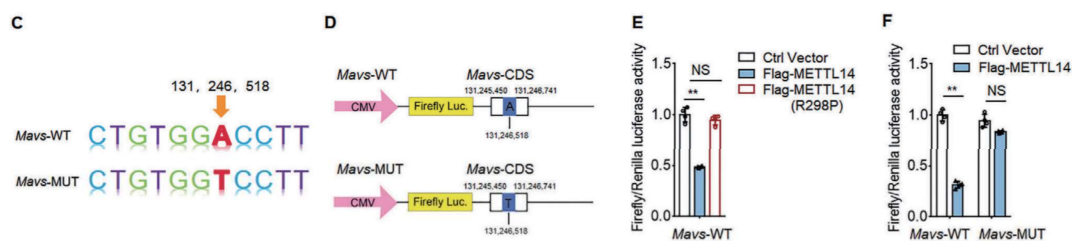
发表期刊: Advanced Science

研究手段: m<sup>6</sup>A-seq

影响因子: 16.806

线粒体抗病毒信号转导 (MAVS) 蛋白是RNA信号通路中的核心信号转接器, 本项研究发现MAVS mRNA通过METTL14进行m<sup>6</sup>A修饰, 从而导致MAVS mRNA的快速周转, METTL14的敲除或缺乏会增加MAVS mRNA的稳定性、TBK1/IRF3的下游磷酸化和干扰素-β 响应RNA病毒的产生。与野生型小鼠相比, 杂合子Mettl14<sup>+/-</sup> 小鼠能够更好地抵抗RNA病毒感染, 揭示了m<sup>6</sup>A修饰在转录后调节MAVS转录本稳定性的新机制。



图2 METTL14催化Mavs mRNA的m<sup>6</sup>A修饰

### 乳酸化驱动的 m<sup>6</sup>A修饰促进肿瘤浸润性骨髓细胞的免疫抑制

研究单位:浙江大学医学院

发表期刊:Molecular Cell

研究手段:m<sup>6</sup>A-seq、转录组测序

影响因子:17.97

乳酸一方面以组蛋白H3K18乳酸化修饰形式促进TIMs中Mettl3转录;另一方面,乳酸化修饰能直接发生在METTL3蛋白的“CCCH”锌指结构域(zincfinger domain, ZFD),而ZFD起着targetrecognition domain (TRD)的作用,增强METTL3结合并催化靶RNA的m<sup>6</sup>A修饰。因此,本研究从“代谢-表观-转录”层面,揭示肿瘤微环境持续积累的乳酸如何促进METTL3表达和功能,以m<sup>6</sup>A修饰方式增强JAK1-STAT3枢纽信号活化,研究结果可能为靶向髓系细胞的肿瘤治疗策略提供新的启示。

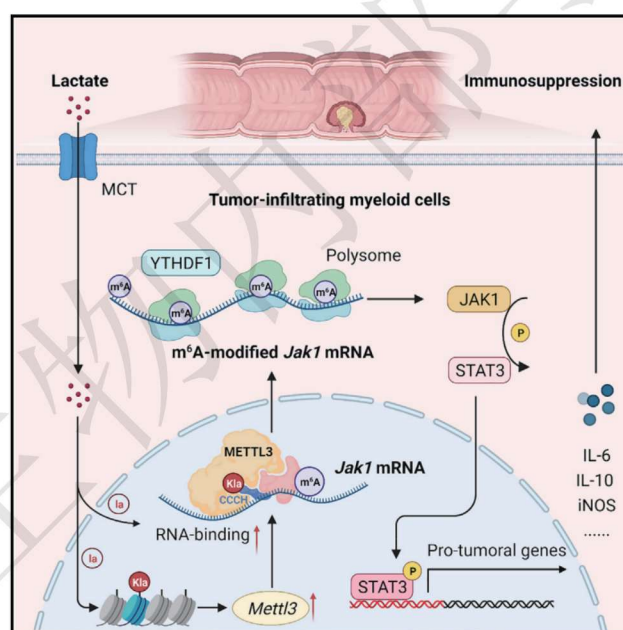


图3 调控机制

[1]Wang Y. et al. Role of Hakai in m<sup>6</sup>A modification pathway in Drosophila. **Nature communications**.2021.

[2]Qin F.et al. Methyltransferase-Like Protein 14 Attenuates Mitochondrial Antiviral Signaling Protein Expression to Negatively Regulate Antiviral Immunity via N<sup>6</sup>-methyladenosine Modification. **Advanced science**.2021.

[3]Xiong J. et al. Lactylation-driven METTL3-mediated RNA m<sup>6</sup>A modification promotes immunosuppression of tumor-infiltrating myeloid cells. **Molecular Cell**. 2022.

# 表观组学

## DNA甲基化测序

DNA甲基化是重要的表观遗传学标记信息,全基因组分析和靶向方法都可以在单核苷酸水平上对甲基化模式进行深入研究。Bisulfite甲基化测序是以新一代高通量测序平台为基础,结合基因组Bisulfite处理和生物信息数据分析技术,进行低成本、高效率、高准确度的全基因组DNA甲基化水平图谱绘制。

### 联川优势

- 检测范围广:全基因组水平鉴定甲基化区域
- 重复性好:多样本的覆盖区域重复性可达85%-95%,适合多样本间的甲基化差异分析
- 精确度高:在其覆盖范围内可达到单碱基分辨率
- 高性价比:基于基因组重亚硫酸盐转化的方法,测序区域更有针对性,实现单碱基分辨率的甲基化位点,数据利用率更高

### 技术服务

WGBS

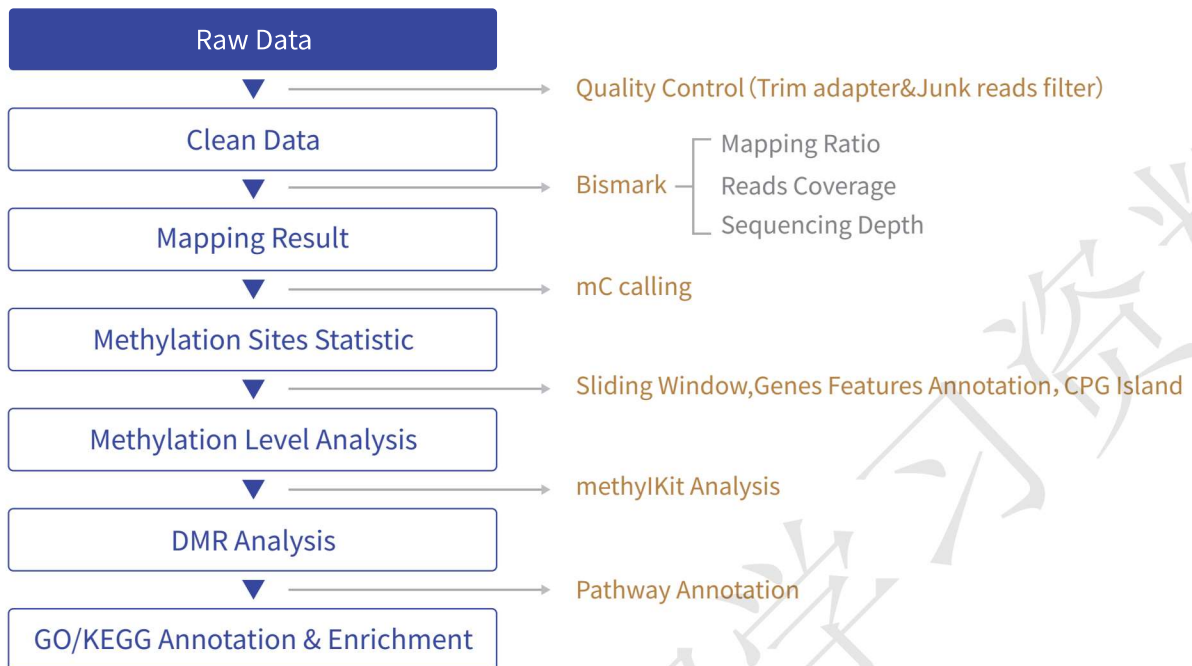
全基因组甲基化测序(WGBS)

RRBS

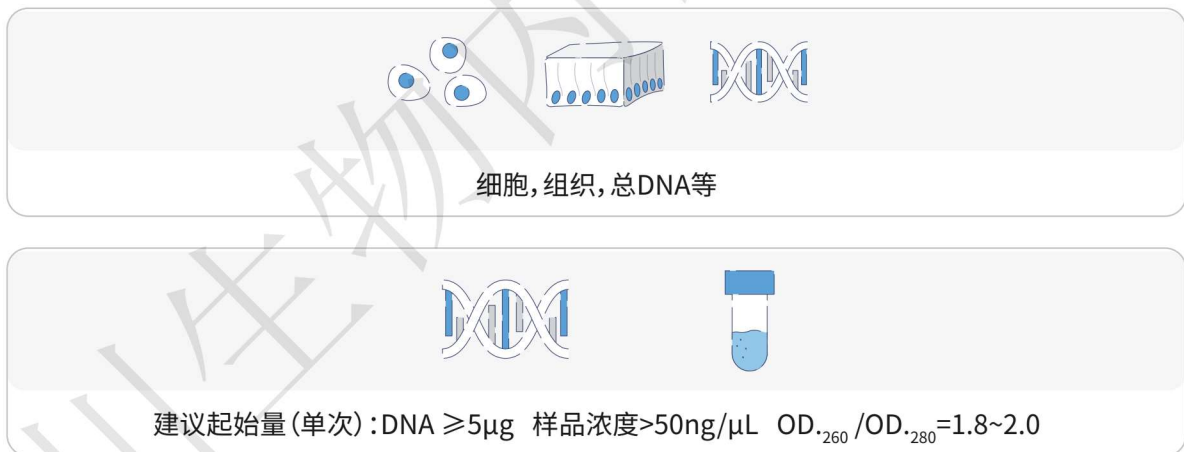
简化甲基化测序(RRBS)



## 项目流程



## 样品准备



## 全基因组甲基化测序(WGBS)

全基因组甲基化测序(Whole Genome Bisulfite Sequencing, WGBS), 采用亚硫酸氢盐处理基因组DNA使未甲基化修饰的胞嘧啶C转化为尿嘧啶U, 通过对处理后的DNA进行全基因组重测序, 并与参考基因组进行比对, 从基因组水平实现单碱基分辨率的、高精度度甲基化水平分析, 对表观遗传学的时空特异性研究具有重要意义。

## 简化甲基化测序 (RRBS)

简化甲基化测序(Reduced Representation Bisulfite Sequencing,RRBS)是利用限制性内切酶对基因组进行酶切, 然后进行Bisulfite测序对基因组甲基化展开分析。该技术显著提高了CpG区域的测序深度, 在CpG岛、启动子区域和增强子元件区域可以获得高精度的分辨率。

### 案例分析

#### 通过剪接体抑制捕获和维持小鼠全能干细胞

研究单位: 北京大学

发表期刊: Cell

研究手段: 全基因组甲基化测序WGBS

影响因子: 41.582

本研究通过剪接体抑制实现了小鼠全能干细胞的体外建立和培养, 在分子和功能上将两类卵裂球重新命名为TBLC。随后作者发现敲低几个关键剪接因子后能广泛地诱导全能基因并使多能基因沉默以将小鼠多能胚胎干细胞重新编程为全能状态。转录组测序、DNA甲基化测序、单细胞测序等多组学分析, 结合功能嵌合试验等分析结果证明TBLC具有强大的双向发育能力, 可产生多个胚胎和胚胎外细胞谱系。剪接体抑制导致多能基因的广泛剪接抑制, 而包含很少短内含子的全能基因被有效剪接和转录激活。本研究为捕获和维持全能干细胞提供了一定的理论基础。

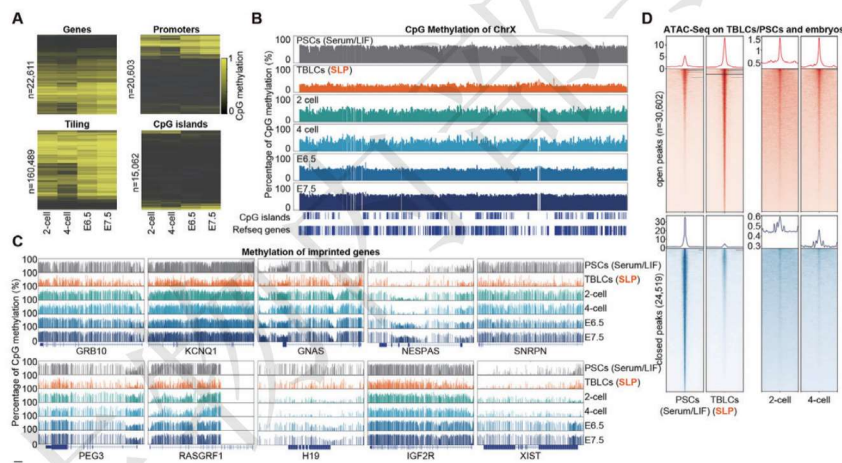


图1 TBLC具有接近细胞卵裂球的表现基因组

#### mTORC1通过SAM合成和m<sup>6</sup>A mRNA依赖性控制蛋白质合成来刺激细胞生长

研究单位: 美国西北大学医学院

发表期刊: Molecular Cell

研究手段: DNA甲基化测序 (RRBS)

影响因子: 17.97

雷帕霉素复合物1 (mTORC1) 的机制靶点可根据营养、生长和致癌信号调节代谢和细胞生长。我们发现mTORC1通过控制甲硫氨酸腺苷转移酶2α (MAT2A) 的表达来刺激主要甲基供体S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 的合成。mTORC1下游的转录因子c-MYC直接与MAT2A的内含子1结合并促进其表达。此外, mTORC1增加了Wilms肿瘤1相关蛋白 (WTAP) 的蛋白质丰度, WTAP是人类N<sup>6</sup>-甲基腺苷 (m<sup>6</sup>A) RNA甲基转移酶复合物的正调控亚基。通过控制MAT2A和WTAP水平, mTORC1信号传导刺激m<sup>6</sup>RNA修饰以促进蛋白质合成和细胞生长。抑制MAT2A后细胞内SAM水平的下降会降低m<sup>6</sup>RNA修饰、蛋白质合成率和肿瘤生长。因此, mTORC1通过控制SAM和WTAP水平来调整m<sup>6</sup>RNA修饰, 从而启动合成代谢细胞生长的翻译机制。

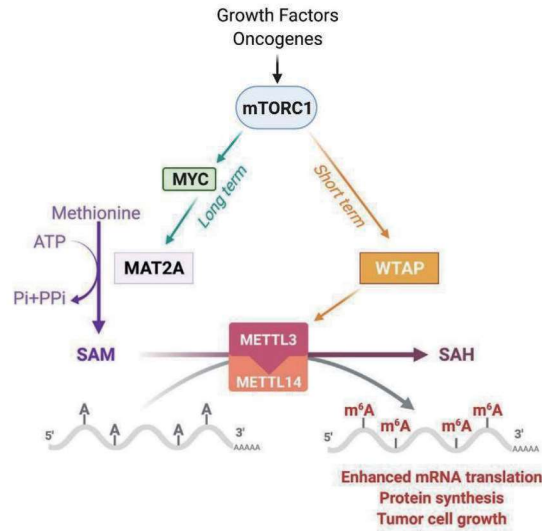


图2 图形概要

## DNA甲基化, 通过DNMT1在胃肠道平滑肌细胞和疾病的发展中具有重要作用

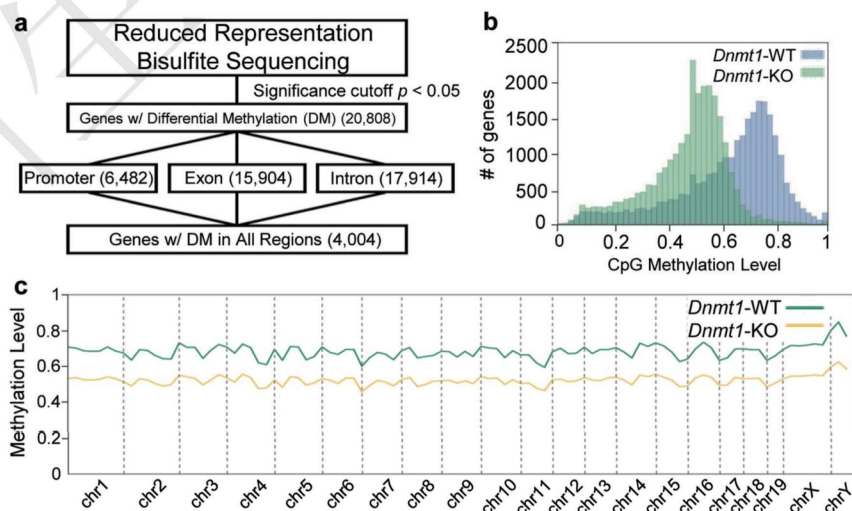
研究单位: 内华达大学医学院

发表期刊: Cell Death & Disease

研究手段: 全基因组甲基化测序WGBS

影响因子: 8.469

本研究利用Cre-lox小鼠模型, 生成SMC限制性DNA甲基转移酶(Dnmt1)基因敲除(KO)小鼠, 并分析Dnmt1缺陷的影响。Dnmt1-KO幼鼠出生时比野生型同窝仔小, 胃肠道缩短, 并且由于肠道中肌层的缺失而停止蠕动, 导致肠道大幅度扩张, 在出生21天左右死亡。在平滑肌组织中, 显著CpG低甲基化发生在整个基因组的启动子、内含子和外显子处; 分化的SMC标记物(Srf、Myh11、miR-133、miR-143/145)显著减少, 促凋亡标记物(Nr4a1、Gadd45g)增加, 细胞连接性丧失和包被囊泡的积累在SMC内。此外, Dnmt1-KO小鼠和患病的人类胃肠(GI)组织之间都发现了参与DNA甲基化酶的异常表达模式。结果表明胚胎SMC中的DNA低甲基化是通过先天性Dnmt1缺陷, 导致基因表达的大量失调, 进一步说明了Dnmt1在SMC胚胎初级发育过程中的重要作用。



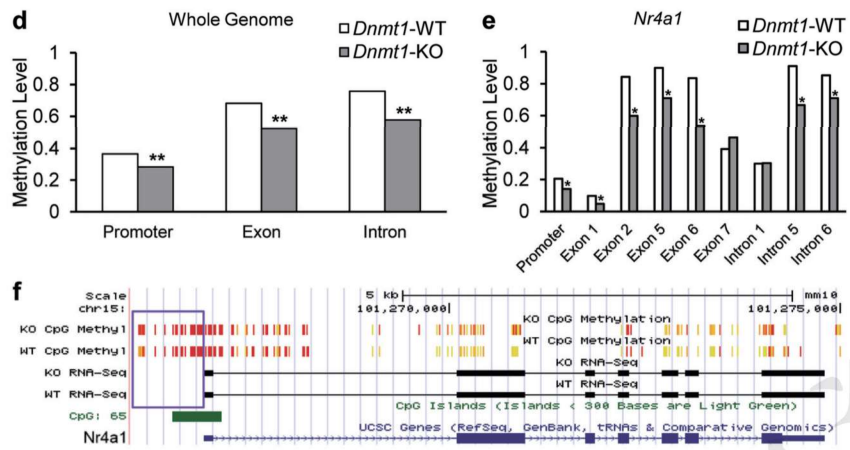


图3 GI-SMC中Dnmt1的缺失导致全球基因组CpG低甲基化。

[1]Shen H. et al. Mouse totipotent stem cells captured and maintained through spliceosomal repression. **Cell**. 2021

[2]Villa E. et al. mTORC1 stimulates cell growth through SAM synthesis and m<sup>6</sup>A mRNA-dependent control of protein synthesis. **Molecular Cell**. 2021.

[3]Jorgensen Brian G. et al. DNA methylation, through DNMT1, has an essential role in the development of gastrointestinal smooth muscle cells and disease. **Cell death & disease**. 2018.

## ChIP-seq/ATAC-seq/CUT&Tag

Chromatin Immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) 即染色质免疫共沉淀测序技术,是研究蛋白质与DNA相互作用的有力工具,通常用于转录因子结合位点或组蛋白特异性修饰位点的研究。将ChIP与二代测序技术相结合的ChIP-Seq技术,能够高效地在全基因组范围内检测与组蛋白、转录因子等互作的DNA区段。

Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing (ATAC-seq) 是一种研究染色质可及性的分子生物学方法。这种技术于2013年由Buenrostro等人在Nature Methods期刊中的论文中提出,可作为 MNase-seq、FAIRE-seq及DNase-seq等方法的补充或替代,目的是鉴定DNA染色质的可触及区域,即未被组蛋白保护的开放区域(DNase I能够起作用的区域)。

Cleavage Under Targets and Tagmentation (CUT&Tag) 是一种用来研究蛋白质和DNA之间的相互作用,并确定目标蛋白质的DNA结合位点的方法,其技术目标和ChIP-seq类似。

### 联川优势

- 贝勒医学院与MD Anderson Cancer Center的博士团队联合打造的高端服务项目
- 采用顶级期刊的个性化分析服务
- 几十款抗体测试数据
- IP成功率在业内遥遥领先

### 技术服务



ChIP-seq

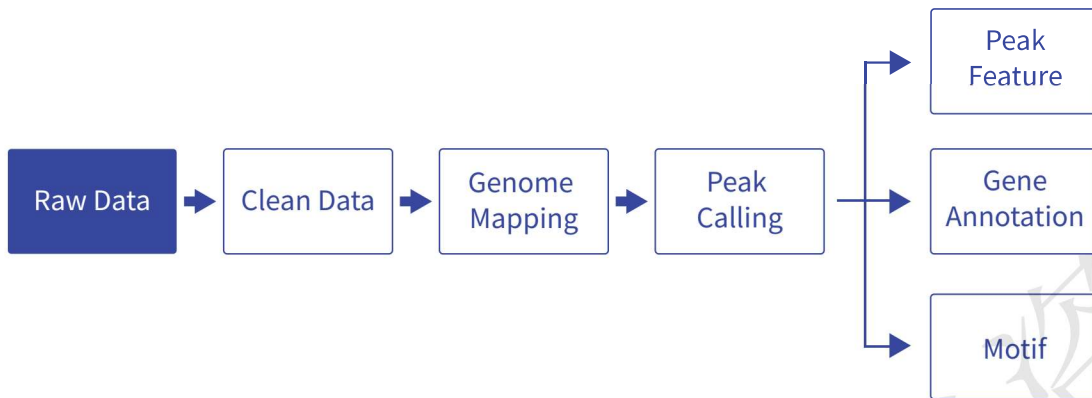


ATAC-seq

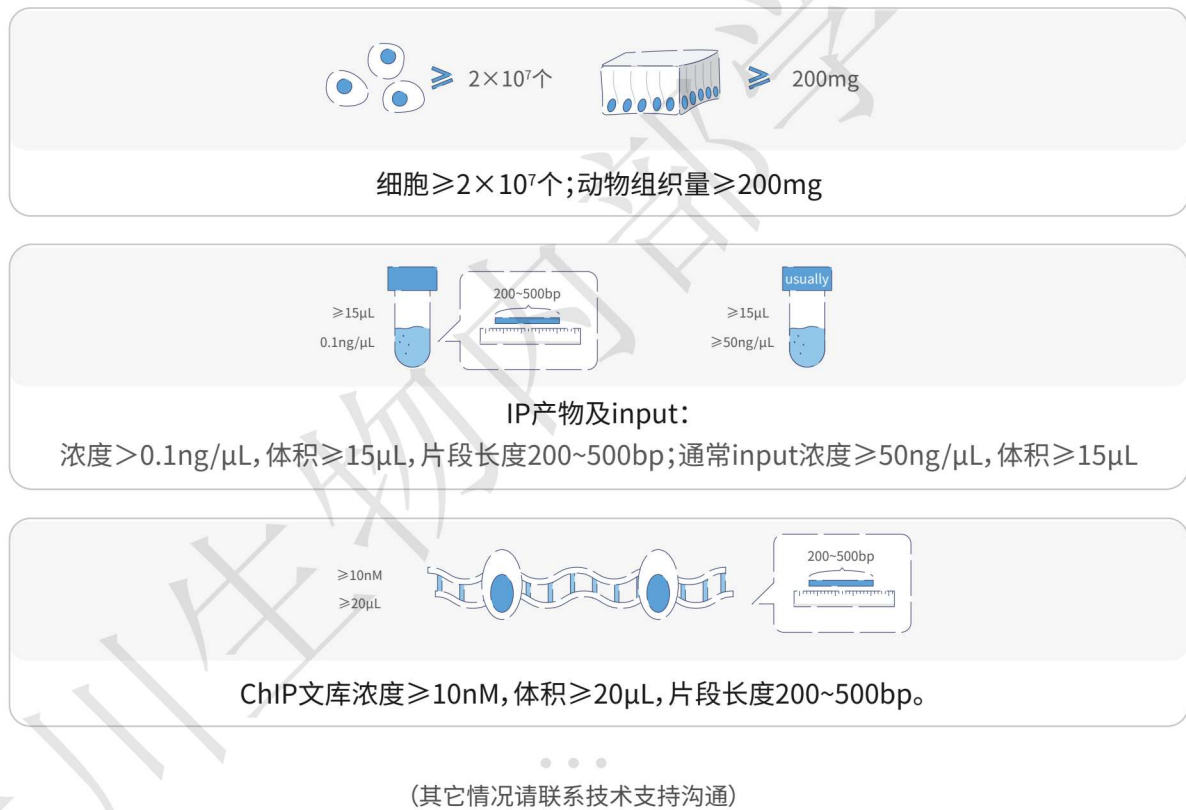


CUT&Tag

## 项目流程



## 样品准备



## ChIP-seq

首先通过染色质免疫共沉淀技术特异性地富集目的蛋白结合的DNA片段, 并对其进行纯化与文库构建; 然后对富集得到的DNA片段进行高通量测序。通过将获得的数百万条序列标签精确定位到基因组上, 从而获得全基因组范围内与组蛋白、转录因子等互作的DNA区段信息。

## ATAC-seq

首先通过抽核的方式拿到暴露在外的染色质结构, 然后通过Tn5转座酶对核基因组中的DNA染色质开放区域进行切割, 并且后续直接连上测序接头, 构建测序文库进行测序和生信分析。

## CUT&Tag

首先使细胞膜具有通透性, 然后加入目标蛋白的一抗孵育, 进而和二抗孵育, 最后加入proteinA-Tn5和测序接头的复合物。Tn5将通过pA-抗体的相互作用定位到靶蛋白上, 然后加入 $Mg^{2+}$ 激活TN5的转座酶活性, 通过转座切割目标蛋白周边DNA并将测序接头连接上去。最后经过PCR即可获得测序文库。

## 案例分析

### TXNIP介导的氧化应激和NLRP3炎症小体激活的表观遗传调控导致SAHH抑制加重糖尿病肾病

研究单位: 中山大学中山医学院附属第七医院

发表期刊: Redox Biology

研究手段: ChIP-seq

影响因子: 11.799

本研究发现使用SAH水解酶(SAHH)抑制剂腺苷二醛(ADA)会积累细胞内或血浆S-腺苷高半胱氨酸(SAH)水平、增加高糖诱导的足细胞损伤并加重STZ诱导的与Nod样受体相关的糖尿病肾病蛋白(NLRP3)炎症小体激活。抑制或敲除NLRP3可减轻SAHH抑制加重的足细胞损伤和糖尿病肾病。此外, SAHH抑制会增加硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)介导的氧化应激和NLRP3炎症小体激活, 但在TXNIP敲除小鼠中未观察到这些影响; 从机制上讲, SAHH抑制通过抑制zeste同源物(EZH2)的组蛋白甲基转移酶增强子并减少组蛋白H3赖氨酸27的三甲基化及其在早期生长反应(EGR1)启动子处的富集来增加TXNIP。结果表明EZH2/EGR1/TXNIP/NLRP3信号级联有助于SAHH抑制加重的糖尿病肾病, 这一结论为SAHH抑制在糖尿病肾病中的作用和机制提供了新的见解。

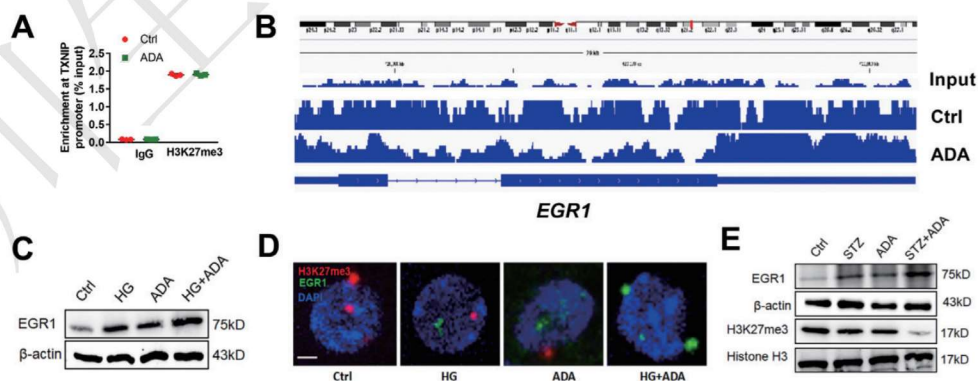


图1 SAHH抑制诱导的TXNIP表达需要转录因子EGR1

## VDR-SOX2 信号在酸性微环境中促进结直肠癌干性和恶性

研究单位:中山大学肿瘤防治中心

发表期刊:Signal Transduction and Targeted Therapy

研究手段:ChIP-seq&ATAC-seq

影响因子:18.187

先前的研究已证明酸性环境驱动了恶性肿瘤的发生,且维生素D受体(VDR)的表达与结直肠癌(CRC)的发生发展密切相关。本研究发现酸中毒可通过下调过氧化物酶体增殖物激活受体delta(PPAR $\delta$ )的表达来降低VDR的表达,而VDR的过表达有效抑制了酸中毒的干细胞特性和奥沙利铂耐药性。ChIP-seq和ATAC-seq联合分析表明VDR通过与SOX2启动子中的维生素D反应元件结合来抑制SRY-box 2(SOX2)转录,从而损害肿瘤生长和耐药性。这一发现揭示了酸中毒通过调节SOX2表达影响CRC干细胞的新机制,并表明异常VDR表达使得维生素D信号传导无效,从而导致维生素D在抗肿瘤过程中缺乏疗效。

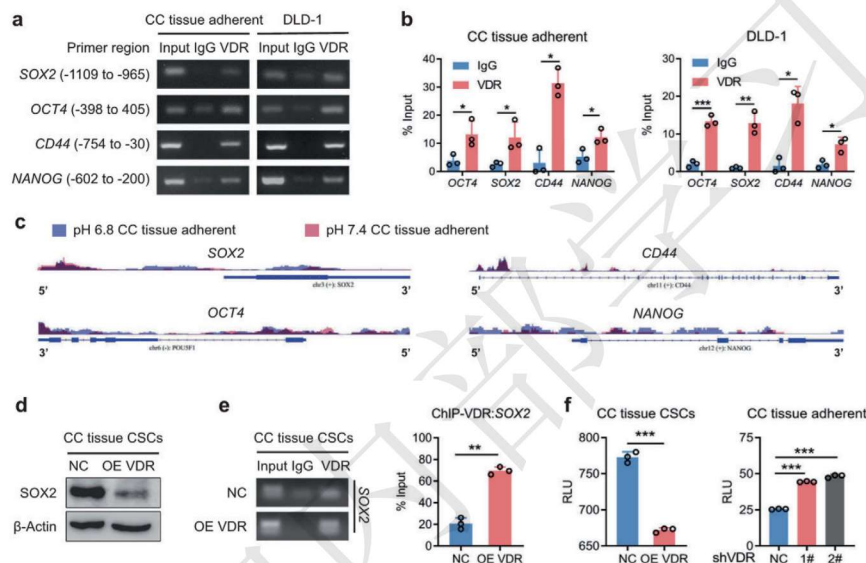


图2 VDR通过抑制SOX2启动子的转录活性来下调SOX2的表达

## WDR5通过增加Myc依赖性和独立途径中HIF-1 $\alpha$ 的积累促进EMT和CCA的转移

研究单位:山东大学齐鲁医学院

发表期刊:Molecular Therapy

研究手段:CUT&Tag

影响因子:11.454

胆管癌(CCA)是一种侵袭性极强的恶性肿瘤,预后极差。c-Myc在CCA中的致癌作用和预后价值尚未得到很好的阐明。WDR5是一个关键的调节因子,直接与c-Myc相作以调节染色体位置处的c-Myc募集,但未发现WDR5和c-Myc在CCA中的相互作用。

该项研究检测了所有胆管癌(CCA)类型中WD重复结构域(WDR5)和c-Myc的表达,包括ICCA、pCCA和dCCA,并评估了它们的预后意义,证明WDR5与CCA的不良预后显著相关,且WDR5和c-Myc共表达是更敏感的预后因素。此外通过体内外实验和生物信息学发现WDR5与c-Myc的Myc box IIIb(MBIIIb)基序相互作用,促进Myc诱导的HIF1A转录,从而促进CCA的上皮-间质转化(EMT)、侵袭和转移。结果表明WDR5通过增加Myc依赖性途径中HIF-1 $\alpha$ 的积累促进HIF-1 $\alpha$ 转录和稳定HIF-1 $\alpha$ 的Myc非依赖性途径促进EMT和CCA转移。



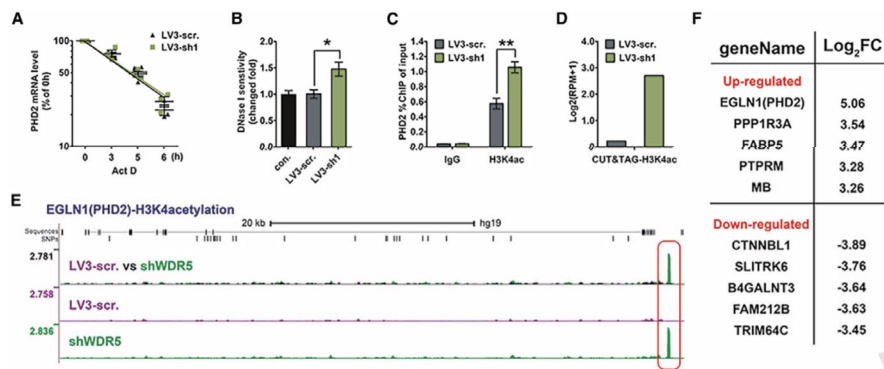


图3 WDR5通过HDAC2诱导的H3K4去乙酰化抑制PHD2表达

[1]Dai X. et al. Epigenetic regulation of TXNIP-mediated oxidative stress and NLRP3 inflammasome activation contributes to SAHH inhibition-aggravated diabetic nephropathy. **Redox Biology**. 2021.

[2]Hu P. et al. VDR-SOX2 signaling promotes colorectal cancer stemness and malignancy in an acidic microenvironment. **Signal transduction and targeted therapy**. 2020.

[3]Chen T. et al. WDR5 facilitates EMT and metastasis of CCA by increasing HIF-1 $\alpha$  accumulation in Myc-dependent and independent pathways. **Molecular Therapy**. 2021.

# 表观组学

## RIP-seq

RNA immunoprecipitation sequencing (RIP-seq)是RNA免疫共沉淀结合高通量测序的一种技术,通过免疫沉淀靶蛋白来捕获互作的RNA。其原理是运用针对目标蛋白的抗体把相应的RNA-蛋白复合物沉淀下来,然后经过分离纯化获得结合在复合物上的RNA,再通过高通量测序实现对目的RNA的信息分析。RIP技术与高通量测序的结合,能帮助研究人员从全基因组层面了解转录后调控网络的动态过程。

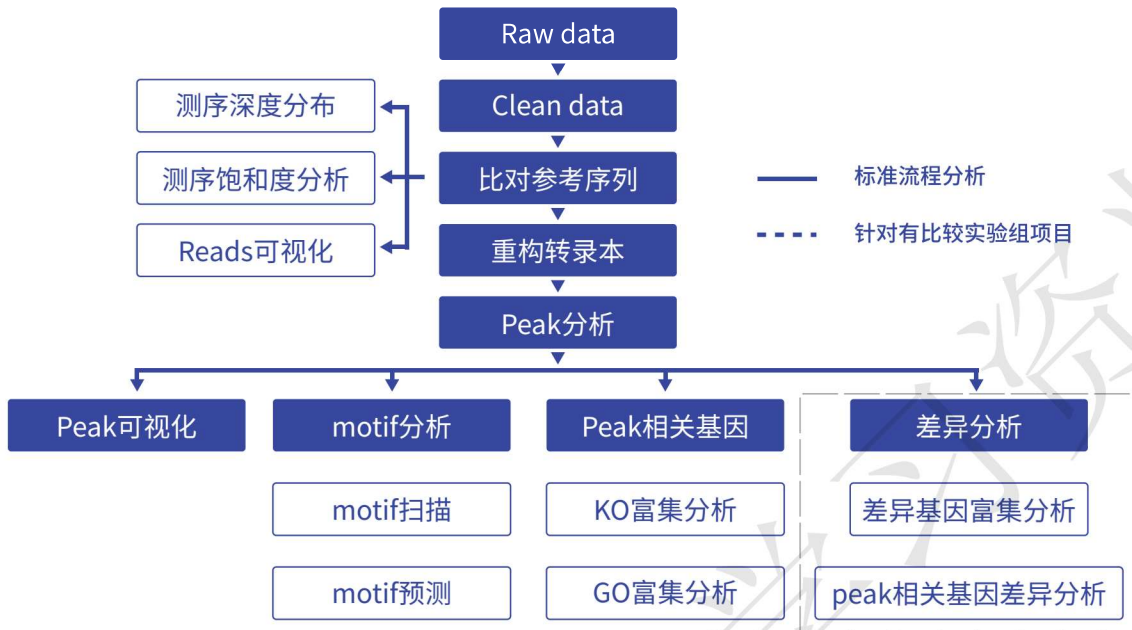
### 联川优势

- 用户文章登顶Top期刊
- 多年经验总结抗体特性,保证高IP成功率
- Peak可视化等个性化服务为高分文章保驾护航

### 样品准备



## 项目流程



## 案例分析

### m<sup>6</sup>A 和 H3K27 三甲基化的相互作用抑制细菌感染期间的炎症

研究单位: 中山大学

发表期刊: Science Advances

研究手段: RIP-seq

影响因子: 14.136

虽然细胞中各种生化反应中 mRNA 属于最普遍修饰之一, 但其在调节细菌诱导的炎症反应中的机制仍然未知。

来自中山医学院的赵蔚课题组发现, m<sup>6</sup>A reader YTHDF2 促进了组蛋白 H3K27me<sub>3</sub> 的去甲基化, 从而导致促炎性细胞因子的产生增强, 并促进了 m<sup>6</sup>A 共转录的沉积。从机理上讲, KDM6B 的 mRNA 被 m<sup>6</sup>A 修饰, 其降解由 YTHDF2 介导。YTHDF2 表达降低能够提升 KDM6B 的 mRNA 稳定性, 以促进多种促炎细胞因子的 H3K27me<sub>3</sub> 去甲基化, 继而增强了它们的转录水平。此外本研究还确定了 H3K27me<sub>3</sub> 作为转录过程中 m<sup>6</sup>A 修饰的障碍 (barrier), KDM6B 募集 m<sup>6</sup>A 甲基转移酶复合物, 以通过去除相邻的 H3K27me<sub>3</sub> 障碍继而促进转录 mRNA 时 m<sup>6</sup>A 的甲基化修饰。

这些结果揭示了细菌感染过程中 m<sup>6</sup>A 与 H3K27me<sub>3</sub> 之间的 cross-talk, 这对于破译免疫稳态中的转录组学具有更广泛的意义。

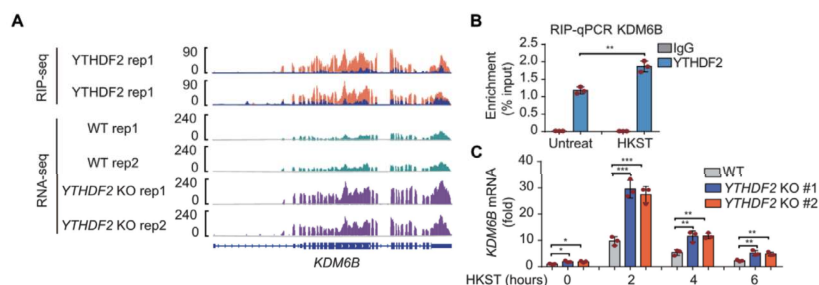


图1 YTHDF2通过m<sup>6</sup>A依赖性方式降解KDM6B mRNA

## YTHDF1增强的铁代谢取决于TFRC m<sup>6</sup>A甲基化

研究单位: 浙江大学医学院附属邵逸夫医院

发表期刊: Theranostics

研究手段: RIP-seq

影响因子: 11.556

本研究通过生物信息学分析、样品分析和转录组测序来评估m<sup>6</sup>A修饰与铁代谢之间的相关性。通过铁代谢和细胞生物学分析,评价m<sup>6</sup>A阅读器YTHDF1对HPSCC增殖和铁代谢的影响,绘制转录组范围的m<sup>6</sup>A-seq和RIP-seq数据,以探索YTHDF1在HPSCC中的作用的分子机制。结果表明YTHDF1与HPSCC患者的铁蛋白水平和瘤内铁浓度密切相关,YTHDF1诱导的HPSCC肿瘤发生依赖于体内铁代谢。在机制上,YTHDF1甲基转移酶结构域与TFRC mRNA的3'UTR和5'UTR相互作用,进而正向调控m<sup>6</sup>A修饰的TFRC mRNA的翻译。同时功能获得和功能丧失分析也证实了这一发现,表明TFRC是YTHDF1介导铁代谢增加的一个关键靶基因。从治疗的角度来看,这一发现为靶向治疗YTHDF1和TFRC介导的铁代谢HPSCC提供了一定的理论基础。

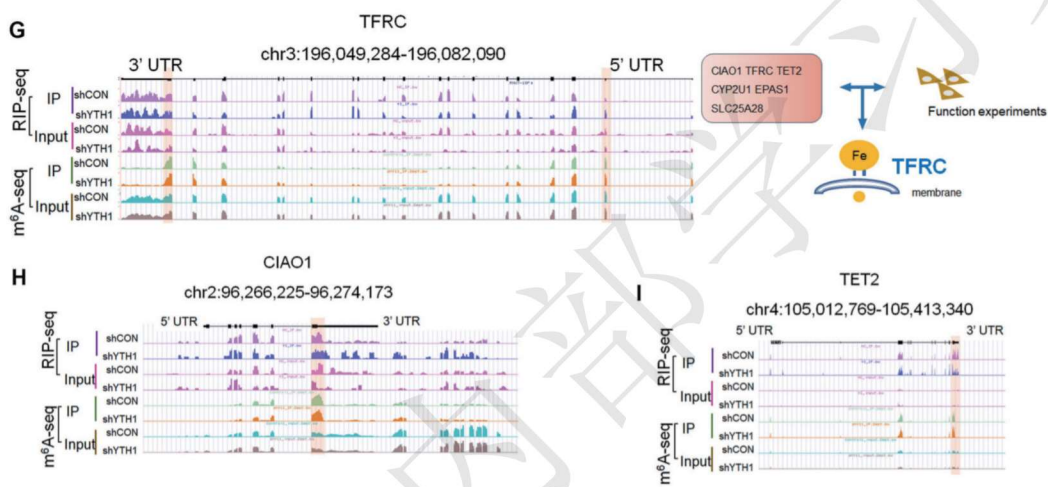


图2 全转录组m<sup>6</sup>A-seq、RNA-seq和RIP-seq检测

[1]Wu C.*et al.* Interplay of m<sup>6</sup>A and H3K27 trimethylation restrains inflammation during bacterial infection. **Science Advances**.2020.

[2]Ye J.*et al.* YTHDF1-enhanced iron metabolism depends on TFRC m<sup>6</sup>A methylation. **Theranostics**.2020.

# 蛋白质组与代谢组学

## TMT标记定量蛋白质组学

TMT™ (Tandem Mass Tag™) 技术由美国Thermo Fisher Scientific开发的一种多肽体外标记技术。该技术采用了6标(TMTsixplex™ Isobaric Label Reagent Set)、10标(TMT10plex™ Isobaric Label Reagent Set)、16标(TMTpro 16plex) 同位素标签,通过与肽段特异氨基酸位点相连实现不同来源的肽段标记,然后进行串联质谱分析,监测碎裂下来的标签实现肽段定量。一次实验可灵活比较最多16种不同样本中蛋白质的相对含量。TMT技术是常用的差异蛋白质组学技术,在疾病标记物筛选、药物作用靶点、动植物抗病/抗胁迫机制、动植物发育分化机理等领域都有广泛应用。

### 联川优势

- 液相色谱与串联质谱连用,自动化操作,分析速度快,分离效果好
- 对绝大部分物种蛋白质进行分离鉴定,TMT能同时对15组样本中包含的蛋白进行鉴定及表达差异分析

### 项目流程



### 样品准备

细胞、组织、尿液、全血、血清、血浆、总蛋白等

建议总蛋白起始量(单次):  $\geq 500 \mu\text{g}$ , 浓度  $\geq 1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  蛋白质溶液, 组织样品、细胞及体液样品

(其它样品信息请咨询我司技术人员)

# 蛋白质组与代谢组学

## Labelfree蛋白质组定量

蛋白质非标记定量技术 (label-free) 是通过液质联用技术对蛋白质酶解肽段进行质谱分析, 无需使用昂贵的稳定同位素标签做内部标准, 只需分析大规模鉴定蛋白质时所产生的质谱数据, 比较不同样品中相应肽段的信号强度, 从而对肽段对应的蛋白质进行相对定量。Label-free的技术优势就在于蛋白质不需要昂贵的同位素标签进行标记, 所需样品总量少, 耗费低。

### 联川优势

- Labelfree蛋白质组定量所需样本量少, 可对微量样本进行分析
- 不受样本数量限制且对实验操作稳定性、重复性要求高, 至少做三个生物重复 (尽可能多做生物学重复)
- 深度覆盖检测动态范围可以达到8个数量级以上, 提高了低丰度蛋白质的检测效率

### 项目流程



### 样品准备

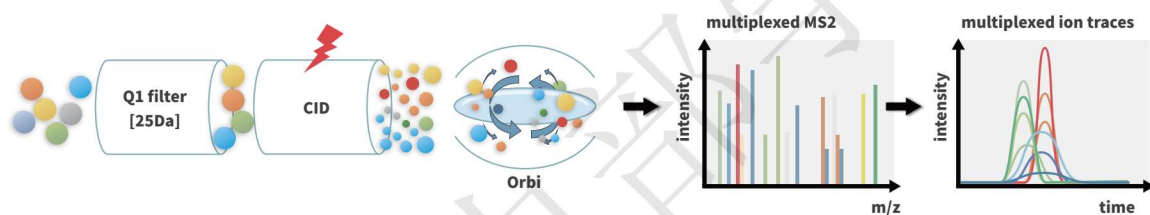


(其它样品信息请咨询我司技术人员)

# 蛋白质组与代谢组学

## DIA定量与检测

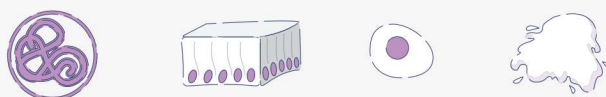
数据非依赖性的扫描模式 (Data-independent acquisition, DIA) 是近几年来发展的一种新的质谱数据采集方式。可以对特定质量范围内的所有母离子进行碎裂,采集所有母离子的碎片离子信息进行蛋白定性和定量。目前流行的蛋白质组学研究手段,如iTRAQ\T-MT、Label-free、SILAC采用的都是数据依赖性的扫描模式(Data-dependent acquisition, DDA)。相对于DDA, DIA 具有更好的准确性和可重复性,是蛋白质组学研究的一大重要趋势。下图为 DIA 定量技术原理图:



### 联川优势

- DIA定量与检测灵敏度高,无歧视地获得所有肽段的信息,不会造成低丰度蛋白信息的丢失
- 循环时间固定,扫描点数均匀
- 定量准确度高,重复性好,重复样品间的定量相关性可达到0.99以上

### 样品准备



蛋白质溶液,组织样品、细胞及体液样品

(其它样品信息请咨询我司技术人员)

## 项目流程



## 案例分析

### 抑制caspase-1介导的炎症小体活化可降低蛛网膜下腔出血后脑脊液中的血液凝固

研究单位: 浙江大学医学院附属第二医院

发表期刊: EBioMedicine

研究手段: TMT蛋白质组定量

影响因子: 8.143

脑脊液 (CSF) 中的神经炎症和凝血反应导致与蛛网膜下腔出血 (SAH) 相关的不良结果。本文探讨了 caspase-1 介导的炎症小体激活对 SAH 后脑脊液外源性凝血的作用。分析了 SAH 后的蛋白质组学变化以及 caspase-1 与人脑脊液中外在凝血因子之间的相关性。在大鼠 SAH 模型中探索了 SAH 后炎症小体和外源性凝血蛋白的时间过程和细胞定位。采用 VX-765 对 caspase-1 的药理抑制作用, 探讨 caspase-1 在大鼠 SAH 后血液清除和脑脊液循环中的作用。原代星形胶质细胞用于评估 caspase-1 在血红蛋白诱导的细胞焦亡和组织因子 (TF) 产生/释放中的作用。结果表明人脑脊液中 SAH 后激活的神经炎症和凝血。caspase-1 水平与外在凝血因子显著相关。大鼠 SAH 后星形胶质细胞活化的 caspase-1 和外源性凝血引发剂 TF 增加。VX-765 在短期内通过抑制焦亡性神经炎症和 TF 诱导的纤维蛋白沉积, 通过加速脑脊液循环和血液清除来减轻神经功能缺损, 并通过在 SAH 后长期防止海马神经元丢失和脑积水来提高学习和记忆能力老鼠。VX-765 减少了原代星形胶质细胞中血红蛋白诱导的细胞焦亡和 TF 的产生/释放。说明 VX-765 对 caspase-1 的抑制似乎是针对 SAH 后脑脊液中的神经炎症和凝血的潜在治疗方法。

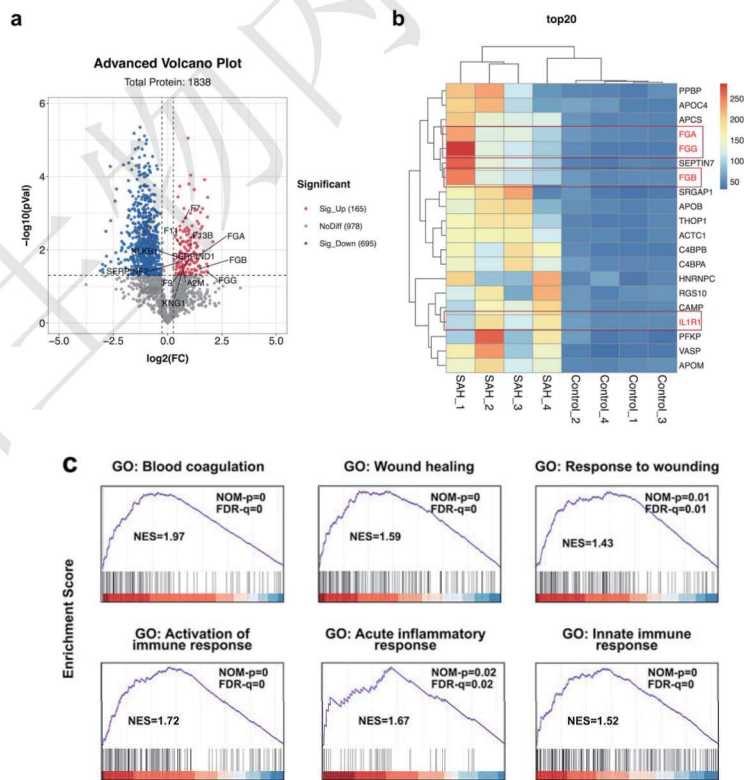


图1 SAH后人脑脊液的凝血和神经炎症反应



## 补充受体3依赖性人单核细胞TGF- $\beta$ 1转运囊泡的免疫调节

研究单位: 莱布尼茨天然产物研究和感染生物学研究所

发表期刊: Nature Communications

研究手段: Label-free

影响因子: 12.121

细胞外囊泡在细胞通讯中具有重要功能。本文展示了人和小鼠单核细胞释放TGF- $\beta$ 1转运囊泡以响应病原真菌白色念珠菌。来自白色念珠菌的可溶性 $\beta$ -葡聚糖与单核细胞上的补充受体3 (CR3, 即CD11b/CD18) 结合, 并诱导 TGF $\beta$ 1 转运囊泡的释放, 使用由 CRISPR-CAS9 基因组编辑生成并从CR3缺陷 (CD11b 敲除) 小鼠中分离的CR3缺陷 (CD11b 敲除) 单核细胞证明了CR3依赖性。这些囊泡减少了人类M1巨噬细胞和全血中的促炎反应。囊泡转运的TGF- $\beta$ 1与TGF- $\beta$ 受体的结合通过全血中的SMAD7途径抑制IL1B 转录并诱导内皮细胞中的TGFB1转录, 而TGF- $\beta$ 1被抑制后这一情况则消失。人类补充受体3的凋亡小体诱导单核细胞中类似的TGF- $\beta$ 1转运囊泡的产生, 表明早期免疫反应可能通过这种 CR3 依赖性抗炎囊泡途径受到抑制。

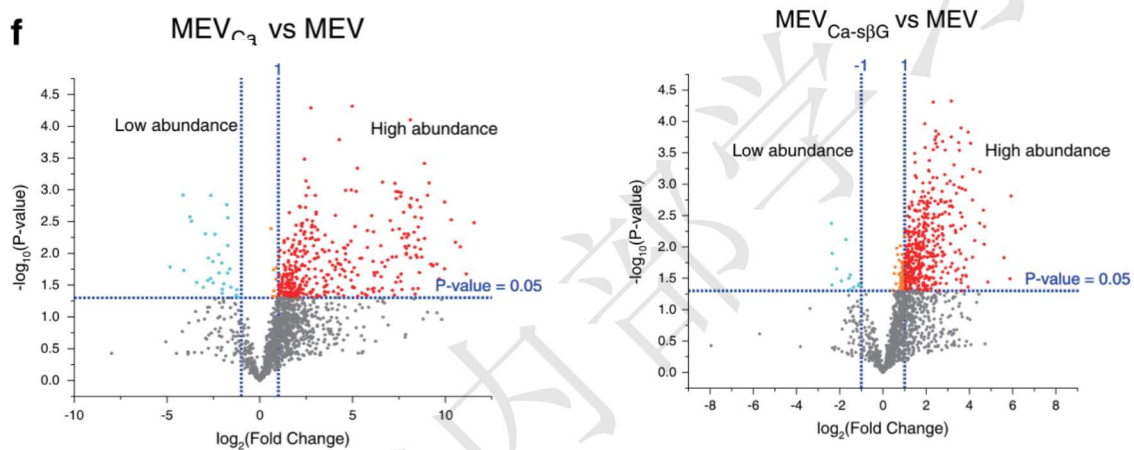


图2 与MEVs相比MEVsCa显示出显着更高的蛋白质含量

## 基于蛋白质组学分析人类干细胞源性视网膜色素上皮的EMT与恶性肿瘤相关的EMT的相似性

研究单位: 圣地亚哥加利福尼亚大学礼利眼科研究所等

发表期刊: Mol Cell Proteomics

研究手段: DIA

影响因子: 5.911

视网膜色素上皮 (RPE) 的应激和损伤常常导致去分化和上皮间质转化 (EMT)。本研究基于人类诱导多能干细胞 (iPSC) 的RPE-EMT模型中发生的时间蛋白表达变化。利用串联质谱标记 (TMT) 和高分辨率串联质谱对RPE-EMT蛋白质组进行精确和深入的定量。在基于TMT的质谱分析中, 鉴定并量化了7937个蛋白质组。共观察到532种蛋白质在RPE-EMT期间受到差异调节。为了验证这些结果, 又进行了 (DIA) 的质谱相关研究。最后作者分析出一个全面的RPE-EMT图谱, 用于理解RPE-EMT发病的分子信号事件和相关生物途径, 对开发EMT抑制作为视网膜疾病治疗方法提供参考依据。

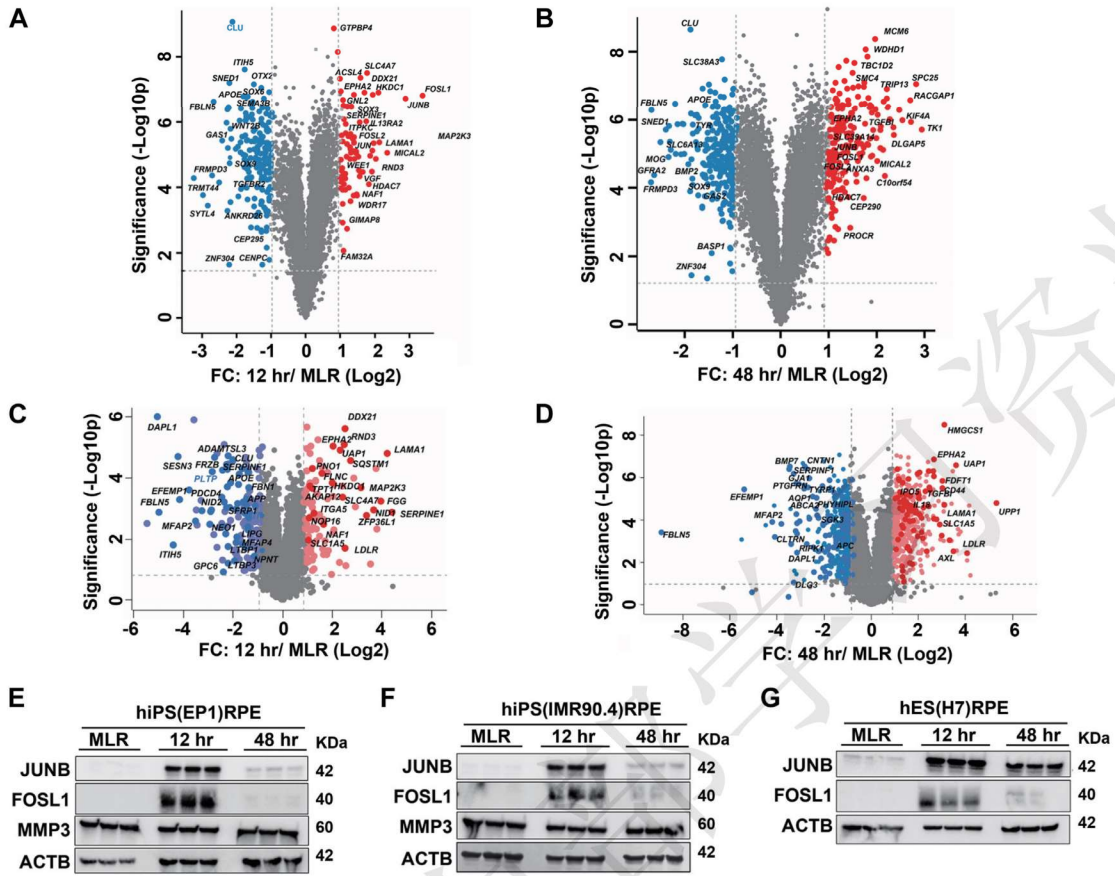


图3 解离诱导的EMT改变了恶性肿瘤相关的间充质蛋白和RPE特征蛋白

[1]Fang Y. et al. Inhibition of caspase-1-mediated inflammasome activation reduced blood coagulation in cerebrospinal fluid after subarachnoid haemorrhage. **EBioMedicine**. 2022.

[2]Halder Luke D. et. al. Immune modulation by complement receptor 3-dependent human monocyte TGF-β1-transporting vesicles. **Nature communications**, 2021

[3]Karl J Wahlin et. al. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) of human stem cell-derived retinal pigment epithelium shares commonalities with malignancy-associated EMT: a proteomic analysis. **Mol Cell Proteomics**, 2021

# 蛋白质组与代谢组学

## 非靶代谢组学

为非靶向代谢组学分析,通常采用色谱-质谱(LC-MS/MS)联用技术采集样品的代谢谱图,比较不同组样品代谢产物的含量,鉴定差异表达的代谢物,并探索差异代谢物之间的代谢通路。代谢组学分析技术已广泛应用于疾病诊断、药物靶点发现、疾病机理研究、营养食品科学、毒理学、植物学等相关领域,已成为目前研究的新热点。

### 联川优势

- 基于先进的液相串联质谱技术,检测多达上千种pg级化合物,可以胜任热不稳定、不易挥发、不易衍生化等物质的检测
- 侧重于相关特定组分共性研究,筛检有意义代谢产物,检测成本较低
- 提供从基因组学、转录组学、蛋白质组学到代谢组学的全程科技服务,深度剖析生物学现象

### 项目流程



### 样品准备



细胞、组织、尿液、全血、血清、血浆等。建议起始量(单次):血浆或血清>200  $\mu$ L, 尿液>1 mL, 组织>100 mg, 细胞> $10^7$ 个。

(其它样品信息请咨询我司技术人员)

## 案例分析

### 缺氧预处理通过 IDO1/犬尿氨酸途径防止缺血性肾损伤

研究单位:堪萨斯大学医学中心

发表期刊:Cell Reports

研究手段:代谢组学

影响因子:9.423

长时间的细胞缺氧会导致能量衰竭和死亡。然而,亚致死缺氧可以触发一种称为缺氧预处理的适应性反应。虽然脯氨酰羟化酶(PHD)酶和缺氧诱导因子(HIF)已被确定为氧感应机制的关键要素,但缺氧预处理防止损伤的机制仍不清楚。在这里,作者进行血清代谢组学分析,以评估由两种有效的细胞保护方法-缺氧预处理和药理学PHD抑制引起的改变。作者发现这两种方法都增加了血清犬尿氨酸水平并增强了犬尿氨酸生物转化,从而导致缺血后肾脏中NAD<sup>+</sup>的保留。此外,吡啶胺2,3-双加氧酶1 (Ido1)缺乏会消除犬尿氨酸的全身性增加以及随后由缺氧预处理和PHD抑制产生的肾脏保护作用,而犬尿氨酸的外源性给药可在Ido1缺乏的情况下恢复缺氧预处理。总的来说,该研究结果证明了IDO1-犬尿氨酸轴在介导缺氧预处理中的关键作用。

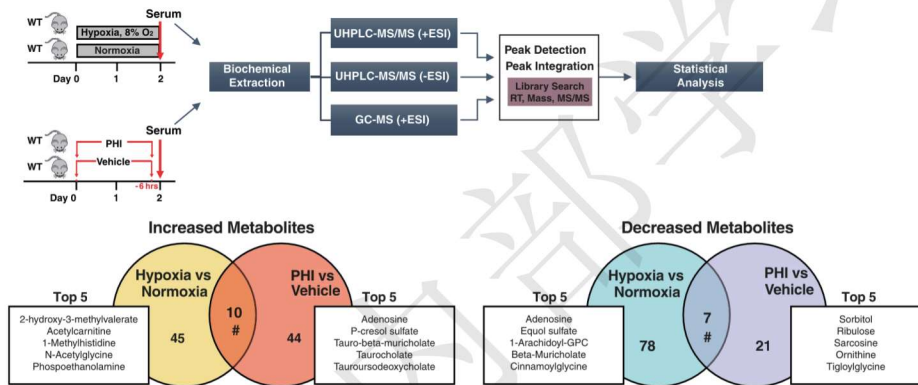


图1 缺氧和药理学PHD抑制以IDO1依赖性方式促进色氨酸代谢为犬尿氨酸

### 幼龄大鼠肝移植到老年大鼠肝移植后年轻供者肝脏和老年受者血清中代谢物的年龄相关变化

研究单位:浙江大学医学院

发表期刊:Aging Cell

研究手段:代谢组学

影响因子:9.304

为了更好地了解肝脏衰老的机制,本研究将年轻大鼠的肝脏移植到年轻和年老大鼠中,并进行了非靶向代谢组学以检测肝组织和血清中代谢物的变化。结果显示未接受肝移植的年老大鼠和幼鼠的肝脏和血清中分别有83种和153种代谢物不同;这些代谢物中,在肝脏和血清中均观察到了7种不同的代谢物。肝移植后5周,年轻供者肝脏中25种代谢物的水平与老年大鼠相似,25种代谢物发生改变,包括有机酸及其衍生物、脂质和类脂分子等;血清中78种代谢物差异显著,年轻和年老大鼠差异显著,老年受体大鼠差异不显著。将代谢组学数据与GEO的转录组学数据相结合,发现肝脏中改变的代谢物和基因富含9条代谢途径,包括甘油磷脂、花生四烯酸、组氨酸和亚油酸等。本研究对年龄相关代谢物和潜在途径以及肝脏与全身环境之间的相互作用研究具有重要的生物学意义。

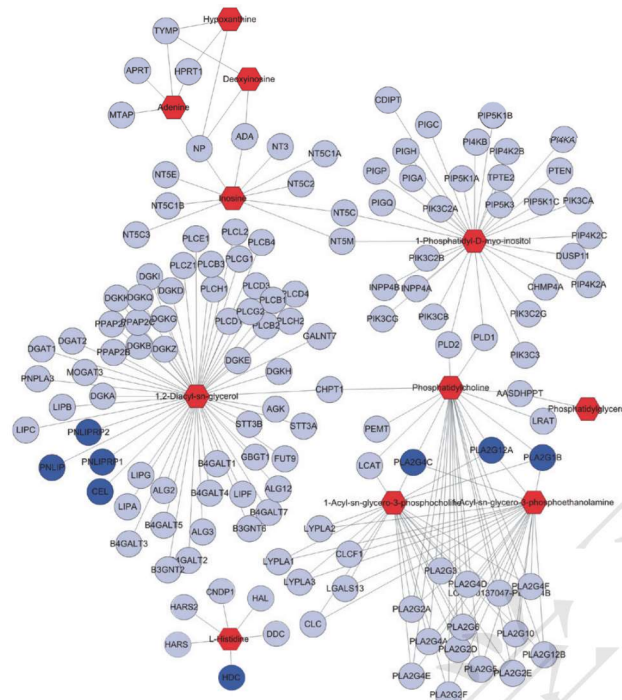


图2 代谢物和基因紧密相连

[1]Torosyan R. *et.al.* Hypoxic preconditioning protects against ischemic kidney injury through the IDO1/kynurenine pathway. **Cell Rep**, 2021.

[2]Han Q. *et.al.* Age-related changes in metabolites in young donor livers and old recipient sera after liver transplantation from young to old rats. **Aging cell**, 2021.

# 蛋白质组与代谢组学

## Olink蛋白质组学

传统的蛋白组学、蛋白标志物检测方法,在检测的通量、灵敏度、临床转化的能力上,有种种限制。为了克服这些限制,Olink Proteomics基于专利Proximity Extension Assay (PEA)技术,开发并充分验证了一系列开创性的Olink Panel。通过在1-6 $\mu$ l体液中精确检测48~3072种生物标志物,更加充分地理解实时生物学。借助多组学发现pQTL等创新药物靶点、筛选更好的疾病预测和预后标志物、理解药物作用的MoA, Safety, PK, PD, Dose、拓展已上市药物的适应症、开发伴随诊断、加速药物研发进程、降低药物研发成本、促进从临床科研到临床应用的转化、提高肿瘤等疾病早筛方法的灵敏度和特异性,并最终达致精准医学。

### 联川优势

#### 1.高通量:

- 快速检测批量样品中的1536种蛋白标志物(已经拓展至3000种)

#### 3.靶向性:

- 所有检测蛋白,均为生物标志物

#### 5.宽动态:

- 动态范围横跨10个log,覆盖高、中、低丰度蛋白(尤其低丰度蛋白)

#### 7.多组学:

- 可通过一台NGS二代测序仪,和相似的工作流程,得到多组学数据

#### 2.低体积:

- 每个样品仅需不到4微升

#### 4.高灵敏:

- 检测灵敏度可达fg/ml级别

#### 6.自动化:

- 自动化样品处理流程提供了绝佳的简易性、准确性和重复性

#### 8.液体活检:

- 兼容组织在内的各类样本,尤其擅长检测体液中的低丰度蛋白

### 项目流程



#### 样品采集

血清血浆等样品



#### 孵育

抗体+DNA寡核苷酸链  
特异性结合靶蛋白



#### 延伸/预扩增

DNA寡核苷酸链杂交  
提供预扩增模板



#### 检测

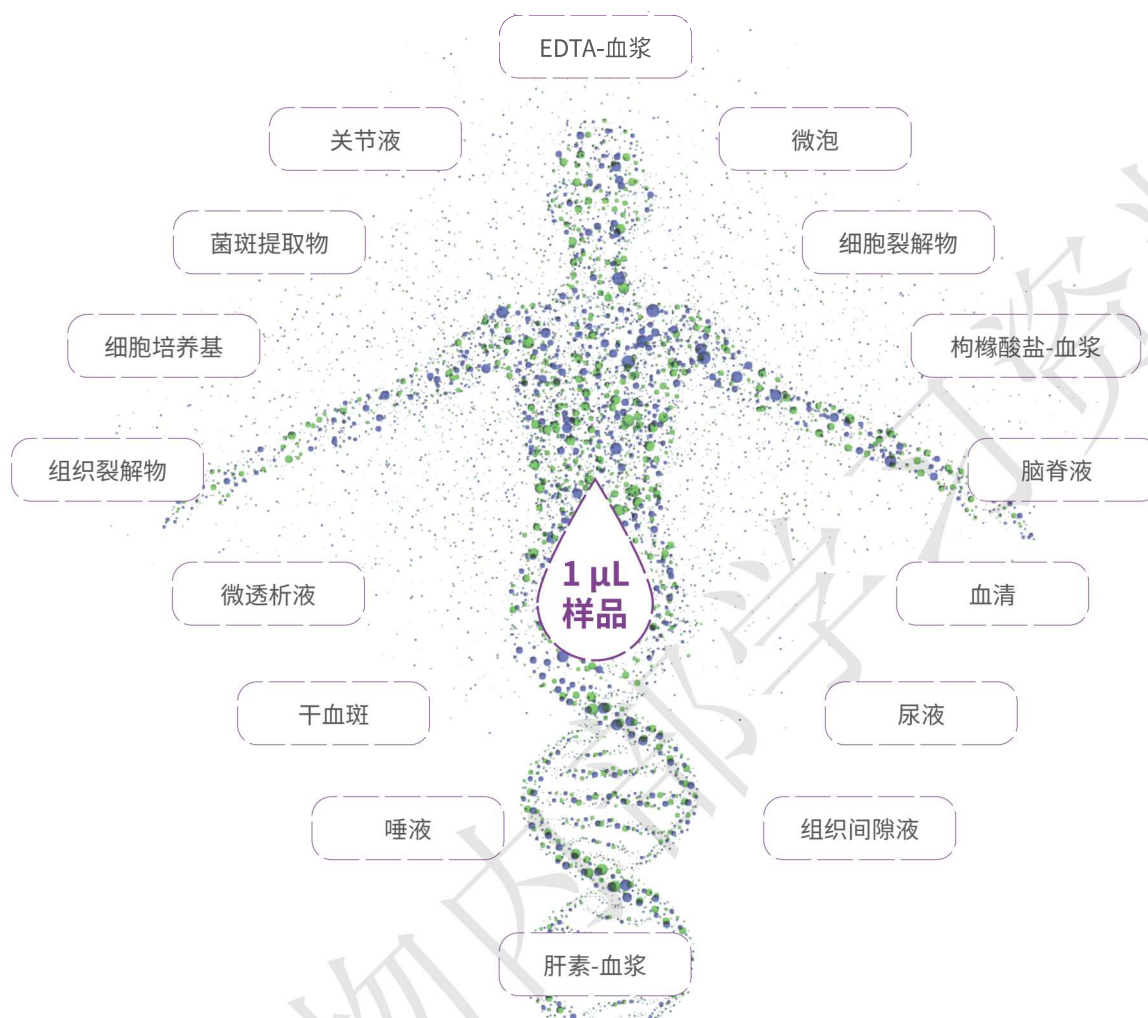
qPCR放大信号  
计算Ct值



#### 数据分析

数据归一化  
Ct值 $\rightarrow$ NPX

## 样品准备



## 案例分析

### 肠道微生物群靶向调节人体免疫状态

研究单位: 斯坦福医学院

发表期刊: Cell

研究手段: Olink蛋白质组学

影响因子: 41.582

饮食可以调节肠道微生物群, 进而影响免疫系统。本研究确定了两种针对微生物群的饮食干预措施, 即植物性纤维和发酵食品如何影响健康成年人的身体微生物组和免疫系统。使用为期 17 周的随机前瞻性研究 (n = 18/组) 结合微生物组、宿主的组学测量以及广泛的免疫分析, 发现了饮食特异性效应。尽管微生物群落多样性稳定、细胞因子反应评分没有变化, 但高纤维饮食增加了微生物组编码的聚糖降解碳水化合物活性酶 (CAZymes), 三个不同的免疫轨迹与基线微生物群多样性相对应, 高发酵食品饮食稳步增加微生物群多样性并减少炎症标志物。这些数据强调了将饮食干预与深度和纵向免疫和微生物组分析相结合如何提供个性化和全人群的洞察力。发酵食品可能有助于对抗工业化社会中普遍存在的微生物组多样性减少和炎症增加。

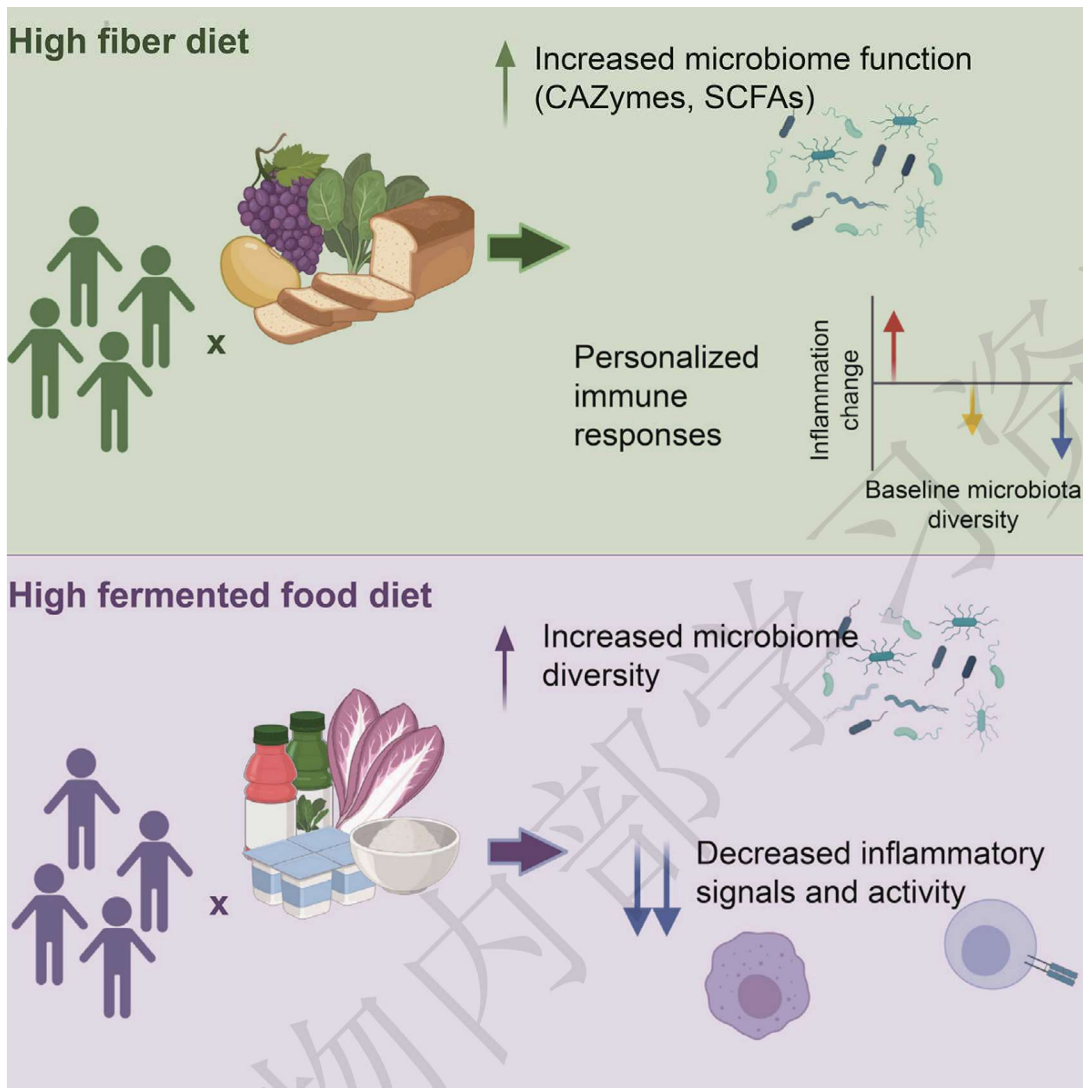


图1 研究概要

### 免疫蛋白质组学分析揭示了患有持续性 COVID-19 后呼吸道疾病的个体气道中的异常免疫细胞调节

研究单位: 伦敦帝国理工学院

发表期刊: Immunity

研究手段: Olink蛋白质组学

影响因子: 31.745

本研究记录了出院后3~6个月健康对照组和COVID-19后患者气管和外周血中的免疫蛋白质组学情况。与健康个体相比, COVID-19患者表现出异常的气管蛋白质组, 与细胞凋亡、组织修复和上皮损伤相关的蛋白质浓度升高。在气管功能障碍较大的个体中观察到细胞毒性淋巴细胞数量增加、B细胞数量增加和单核细胞亚群也发生了变化。对一些COVID-19后患者的一年随访表明, 这些异常随着时间的推移被解决。结论: COVID-19会导致持续性肺病患者的气道免疫环境发生长期变化, 细胞毒性T细胞的持续激活与细胞死亡和组织修复有关。



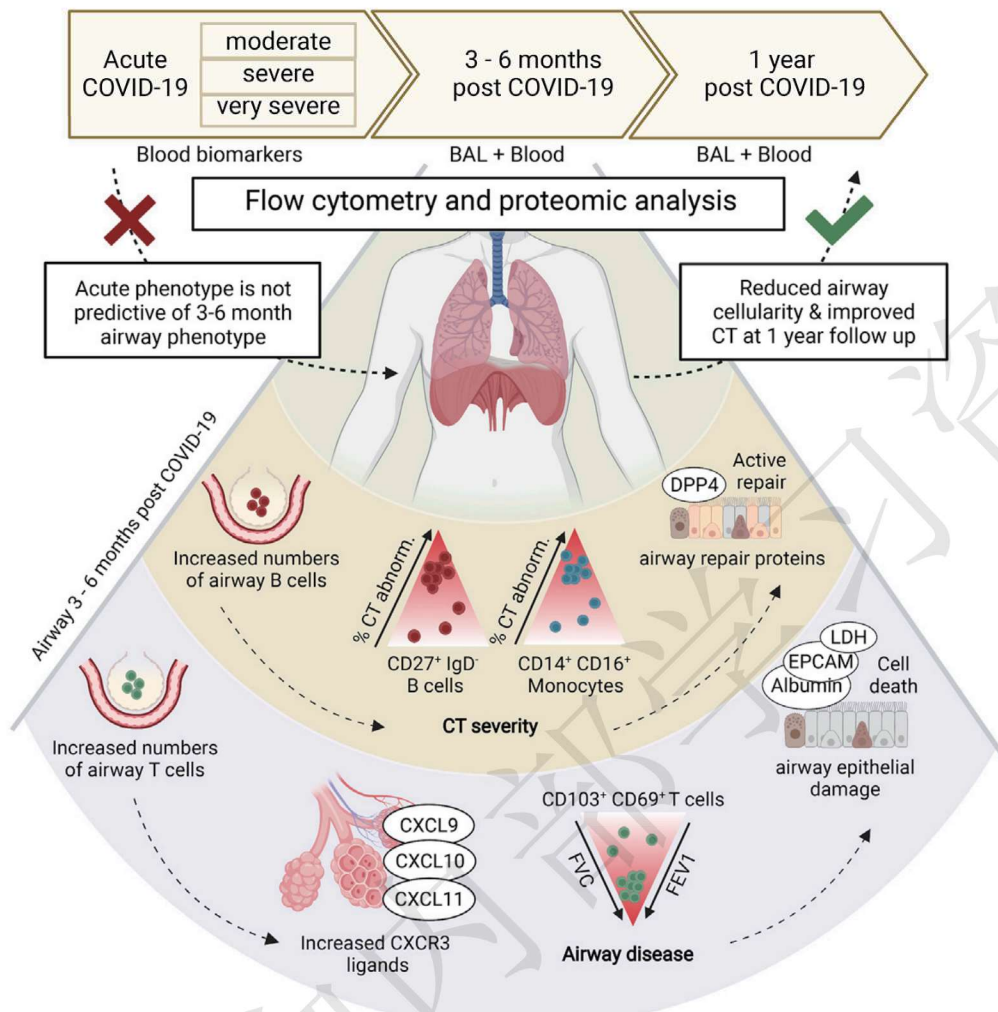


图2 研究概要

[1] Wastyk HC. et.al. Gut-microbiota-targeted diets modulate human immune status. **Cell**, 2021.

[2] Vijayakumar B. et.al. Immuno-proteomic profiling reveals aberrant immune cell regulation in the airways of individuals with ongoing post-COVID-19 respiratory disease. **Immunity**, 2022.

# 微生物组学

## 组织微生物测序

研究人员早已在肿瘤内发现了细菌的存在, 但因其生物量低, 全面描述肿瘤微生物组的特征极具挑战性。肿瘤内的细菌已被发现具有肿瘤特异性, 并且已有的机制研究表明, 肿瘤内微生物群可能直接调节肿瘤的发生、发展, 以及对化疗或免疫治疗的应答。2020年两项重量级的肿瘤内微生物组研究相继在Nature和Science上发表, 标志着研究人员可以借助高通量测序技术对肿瘤内的微生物组开展全面且深入地研究, 更进一步地揭示微生物在肿瘤中的作用。

### 联川优势

- 汲取最新的研究成果和检测技术, 采用5R 16S测序, 即对16S rRNA基因上的五个区域进行多重PCR扩增和测序, 有效降低了组织中宿主DNA对细菌16S rDNA扩增的严重干扰
- 配合专用的污染菌过滤流程, 助力研究人员全面真实地阐释组织内微生物组的特征和功能适用于其他微生物含量极低的样本检测

### 项目流程



### 样品准备



## 案例分析

### 实证肿瘤细胞和免疫细胞中存在细菌

研究单位:魏茨曼科学研究所

发表期刊:Science

研究手段:5R 16S测序

影响因子:47.724

本研究分析7种癌症类型(乳腺癌,肺癌,卵巢癌,胰腺癌,黑色素瘤,骨癌,脑瘤)1526个肿瘤及其邻近正常组织的肿瘤微生物组。5R 16S测序发现每种肿瘤都有不同的菌群组成,乳腺癌菌群最丰富。瘤内细菌具有代谢活性,大部分位于细胞内,在癌细胞和免疫细胞中都存在。瘤内细菌或其预测的功能,与肿瘤类型和亚型、患者吸烟状况和免疫治疗应答之间存在关联。

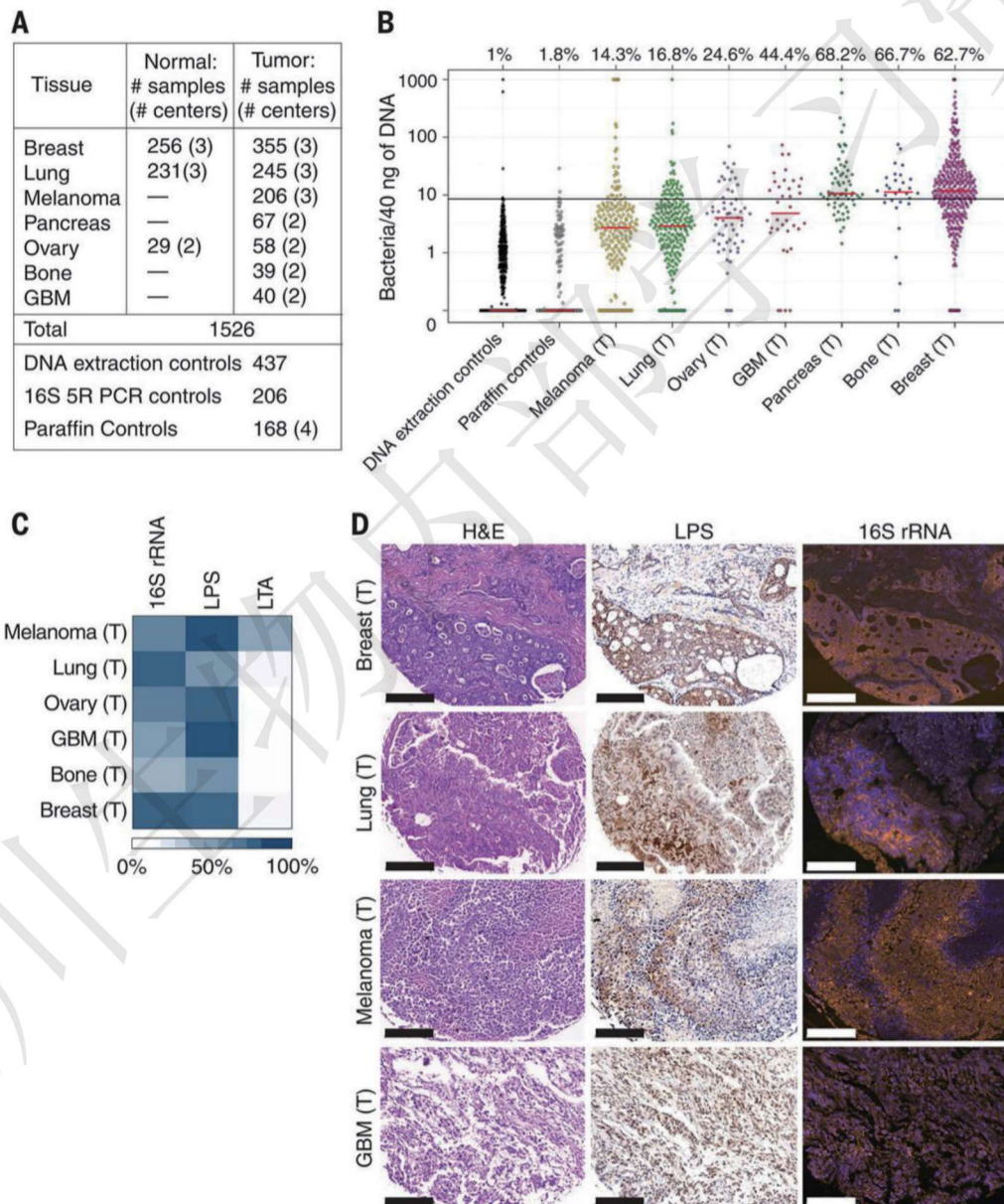


图1 人类肿瘤中检测到细菌

静脉注射活的李斯特菌诱导Gsdmermin依赖性肿瘤焦亡并激发抗肿瘤免疫应答

研究单位:复旦大学

发表期刊:ACS Nano

研究手段:5R 16S测序

影响因子:15.881

联川合作课题组通过改造李斯特菌 (Lmo@RBC) 开发了一种新的免疫治疗系统。借助转录组和肿瘤组织微生物组 (5R 16S测序) 分析, 首次发现Lmo@RBC可诱导广泛的Gsdmermin依赖性细胞焦亡, 从而逆转免疫抑制性肿瘤微环境并促进全身性的抗肿瘤免疫反应, 对实体瘤和肿瘤转移有极好的治疗效果。

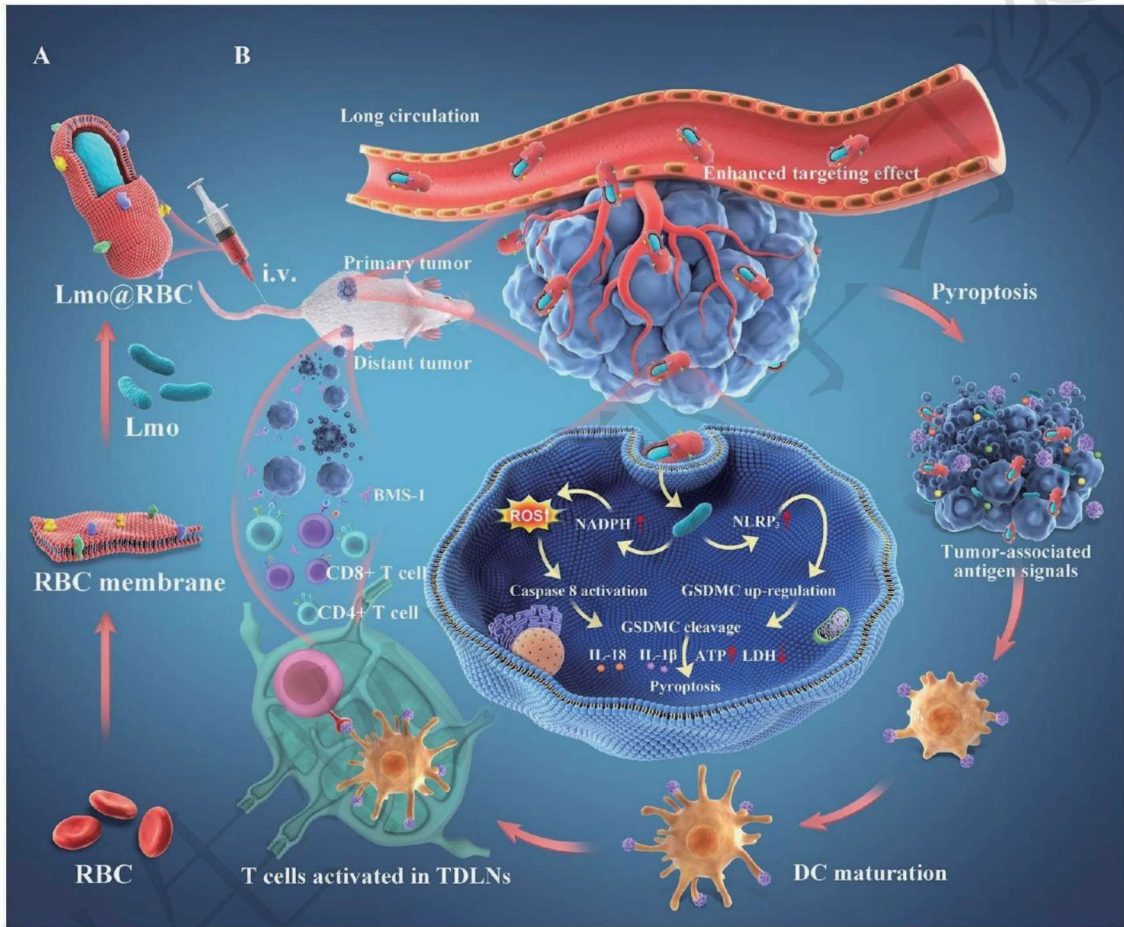


图2 RBC膜提取和Lmo@RBC制备的示意图

参考文献

[1]Nejman D. et. al. The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. **Science**. 2020.

[2]Liu Y. et al. Intravenous Delivery of Living *Listeria monocytogenes* Elicits Gsdmermin-Dependent Tumor Pyroptosis and Motivates Anti-Tumor Immune Response. **ACS Nano**. 2022.

# 微生物组学

## 宏基因组测序和宏转录组测序

宏基因组测序 (Metagenomics Sequencing) 是对环境样品中的微生物群落的基因组进行高通量测序, 主要研究微生物种群结构、基因功能活性、微生物之间的相互协作关系以及微生物与环境之间的关系。

宏转录组测序 (Metatranscriptomics sequencing) 是在转录水平, 以特定样本中微生物群落的全部转录本为研究对象, 分析微生物群落的基因表达与调控。相比于扩增子测序, 宏基因组测序或是宏转录组测序可以给研究者提供更丰富的微生物群落的基因功能信息和参与的通路信息, 更有助于阐释微生物群落与宿主或是环境的相互作用。

### 项目流程

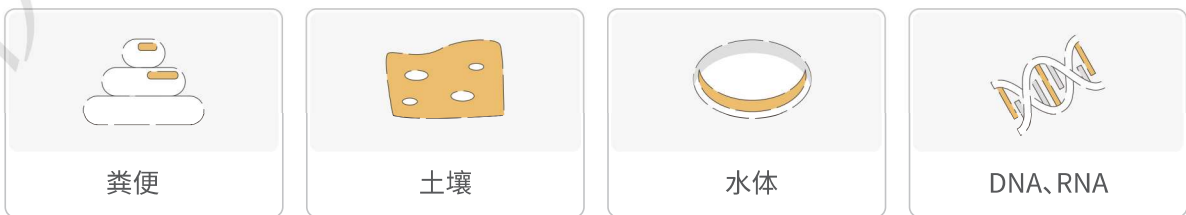
#### 宏基因组测序



#### 宏转录组测序



### 样品准备



### 综合组学分析揭示肥胖成人肠道微生物代谢物的改变

研究单位: 桂林医科大学

发表期刊: Briefings in Bioinformatics

研究手段: 宏基因组测序

影响因子: 11.622

本研究利用比较宏基因组学和代谢组学分析分别确定了六名中国正常和肥胖成年人的肠道微生物群和肠道宿主代谢物谱, 并在进行功能和途径分析之后, 通过肠道代谢物的变化了解肠道微生物群对宿主代谢物的影响。结果表明, 肠道微生物群的变化可能参与调节肠道代谢物的变化, 促进糖酵解、三羧酸循环和同型乳酸发酵。此外, 综合代谢组学分析表明肠道和宿主中失调的代谢物可能存在正相关, 包括 L-苯丙氨酸、L-酪氨酸、尿酸、犬尿氨酸、硫酸胆固醇和葡萄糖胺, 而这些代谢物会导致肥胖等代谢紊乱和糖尿病。这一结果为肥胖成人肠道微生物群代谢物与宿主代谢之间关联性提供理论基础。鉴定出的代谢物变化可以作为评估肥胖和代谢紊乱的生物标志物。

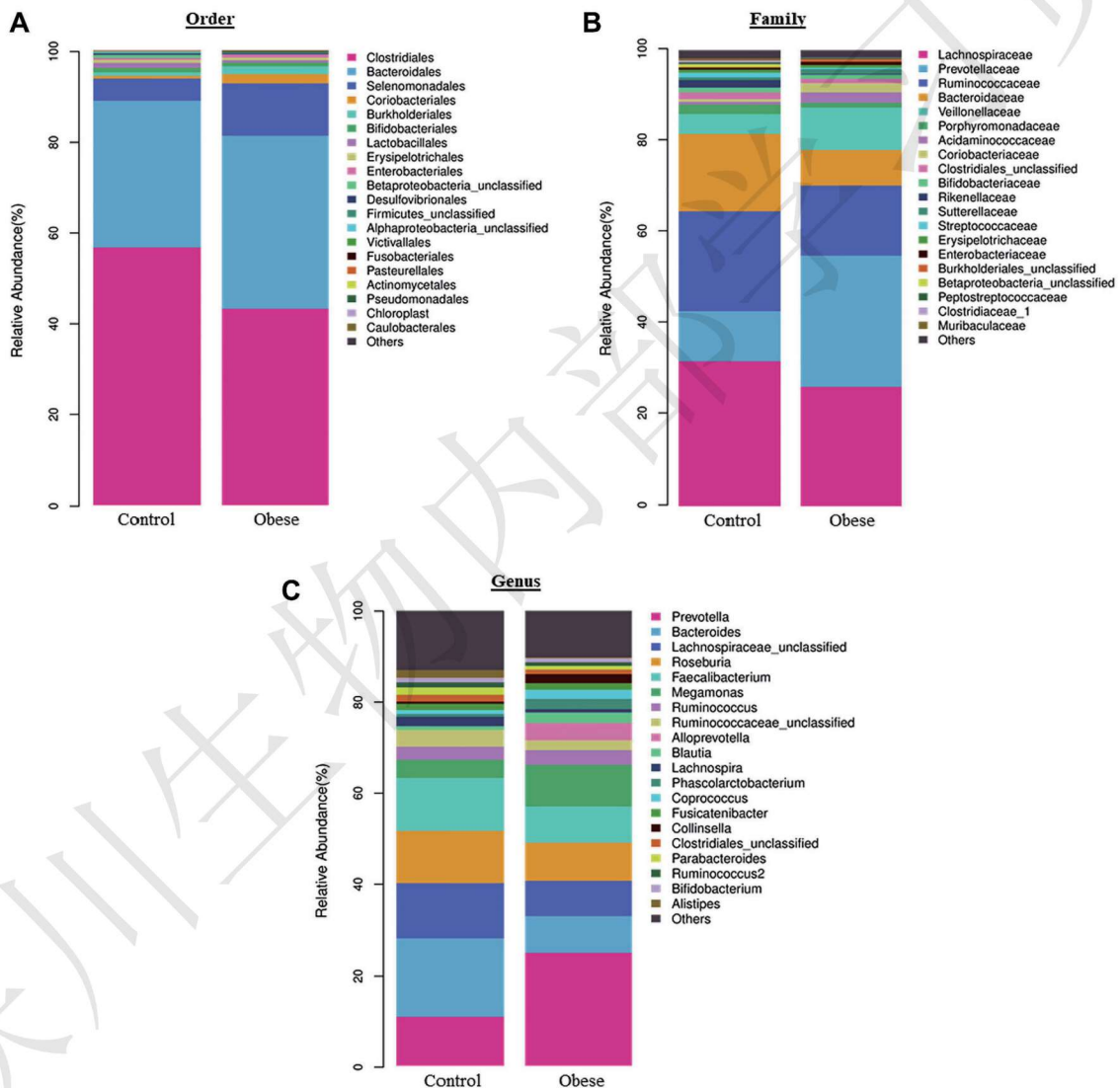


图1 比较宏基因组学分析确定了肥胖成人与正常成人肠道微生物群的变化

## 木糖醇通过肠道微生物群的交叉喂养增强结肠中丙酸的合成

研究单位:浙江工商大学

发表期刊:Microbiome

研究手段:宏转录组测序

影响因子:14.65

木糖醇是一种可被结肠微生物消化多元醇或糖醇,促进有益细菌的增殖和短链脂肪酸(SCFAs)的产生。本研究了在鼠粮中分别喂食0%、2% (2.17 g/kg/天)和5% (5.42 g/kg/天)木糖醇3个月,在小鼠体内消化实验的基础上,在结肠模拟系统(CDMN)中添加3%(重量/体积)(人0.27 g/kg/d)木糖醇7天并通过16S rDNA测序、有益的代谢生物标志物量化、代谢组和宏转录组测序分析来研究木糖醇的生命前机制。选择与木糖醇消化相关的代表性细菌,分别进行2株和3株细菌的单培养和共培养,探索在葡萄糖、木糖醇、混合碳源和无碳源培养基中木糖醇的微生物消化和利用,并从分子层面探讨微生物组成和SCFAs变化的机制。

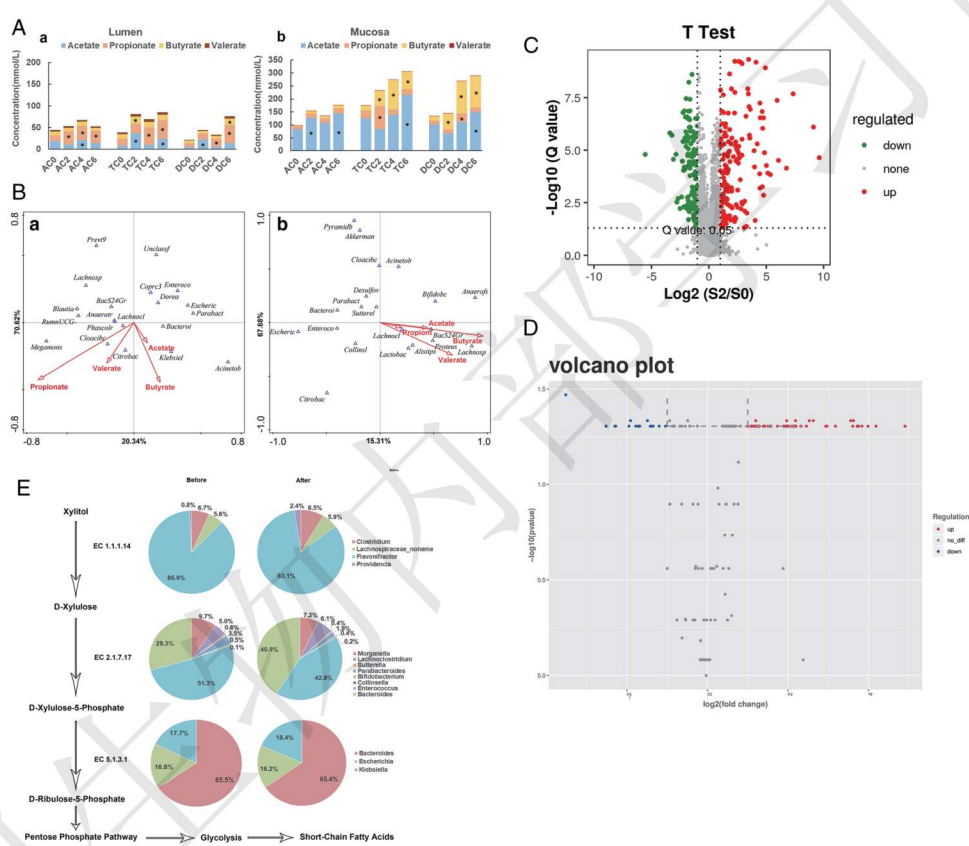


图2 木糖醇对结肠微生物宏转录组的影响

[1]Li R. et al. Integrated omics analysis reveals the alteration of gut microbe-metabolites in obese adults. **Briefings in Bioinformatics**. 2021.

[2]Xiang S. et al. Xylitol enhances synthesis of propionate in the colon via cross-feeding of gut microbiota. **Microbiome**. 2021.

# 微生物组学

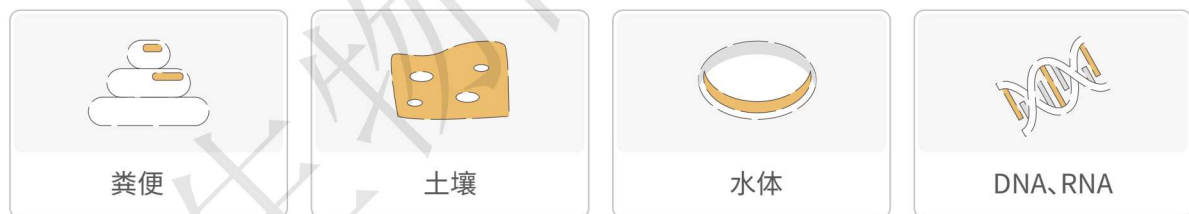
## 微生物群落多样性 (16S/ITS测序)

扩增子测序常用于微生物群落的多样性分析。16S rDNA测序 (v3-4) 和ITS测序 (ITS2) 分别用于细菌群落和真菌群落的多样性分析。联川生物的扩增子测序数据分析已全面使用QIIME 2流程, 并且不再使用传统的基于OTU的分析方法, 取而代之的是调用DADA2, 对原始数据进行去噪, 相当于按照100%的相似性聚类, 进而获得单碱基精度的代表序列, 更真实的还原微生物群落结构。

### 项目流程



### 样品准备



### 案例分析

#### 生酮饮食通过改变肠道微生物组减少结肠三组先天淋巴细胞来缓解结肠炎

研究单位: 上海同济大学

发表期刊: Signal Transduction and Targeted Therapy

研究手段: 16S rDNA测序

影响因子: 18.187

本研究比较了用生酮饮食 (KDs), 低碳水化合物饮食 (LCD) 或正常饮食 (ND) 喂养的小鼠的肠道微生物组和代谢变化。使用硫酸葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导的结肠炎模型研究了KD对炎症, 肠道微生物组, 粘膜屏障和免疫力的影响。通过转录组测序, RT2 profiler PCR阵列, 组织病理学和免疫荧光分析结肠组织, 通过代谢测定试剂盒分析血清样本, 通过16S rDNA测序, 液相色谱-质谱和气相色谱-质谱分析粪便样本。观察到KD通过改变肠道菌群和代谢产物以不同于LCD的方式减轻了结肠炎。



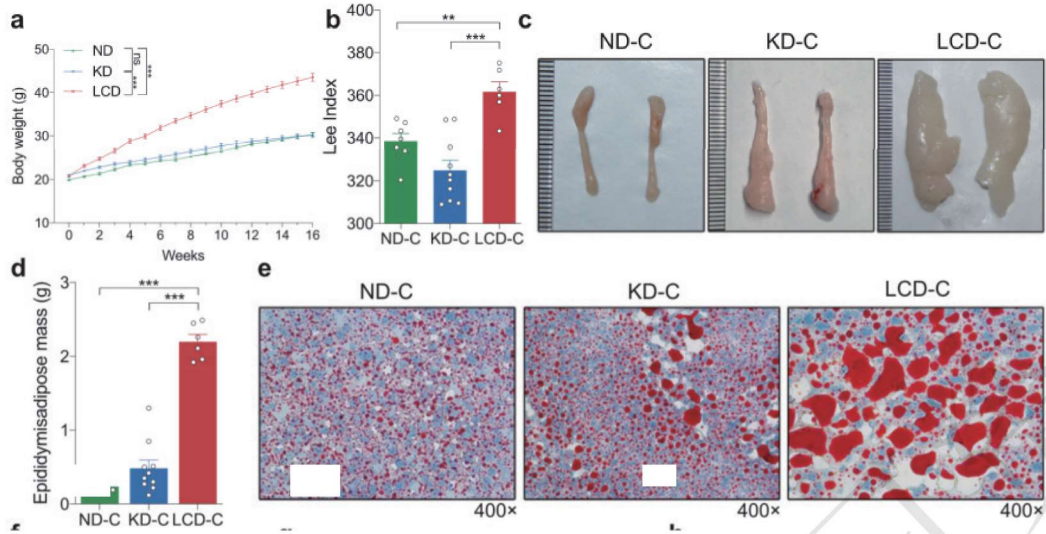


图1 KD控制体重的增加并改变小鼠代谢状态

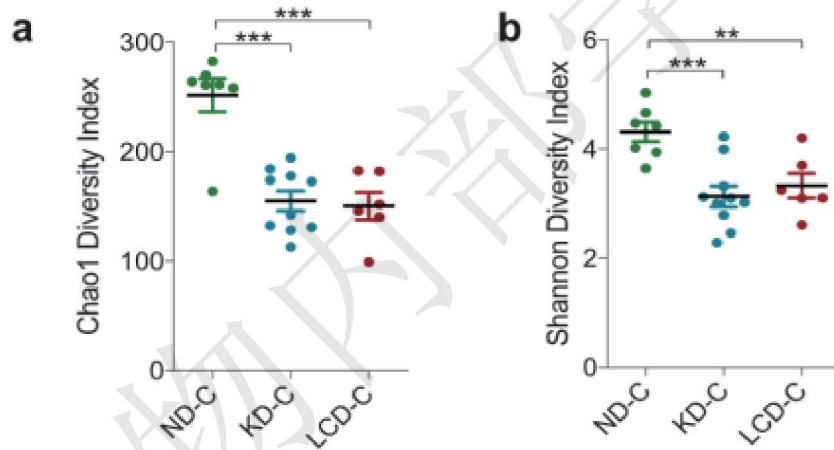


图2 16S rDNA分析KD和LCD对结肠炎小鼠肠道微生物群的影响

Kong C. *et al.* Ketogenic diet alleviates colitis by reduction of colonic group 3 innate lymphoid cells through altering gut microbiome. **Signal Transduction and Targeted Therapy**. 2021.

# 微生物组学

## 全长16S rDNA测序

细菌群落的多样性分析首选16S rDNA测序。受二代测序短读长的影响,常规16S rDNA测序只能妥协于对16S的部分可变区(如V3-V4)进行测定,仅占全长16S序列(约1.5Kb)的30%左右,使得菌群鉴定的分辨率和准确性都打了折扣。由此常规16S测序,一般只能准确获取属水平的菌群分类结果,而丢失了大部分更为重要的种水平的信息。随着三代超长测序的技术发展和成熟,基于PacBio的全长16S rDNA测序可以轻而易举地获取全长16S序列,进而实现“种”水平的菌群多样性分析。

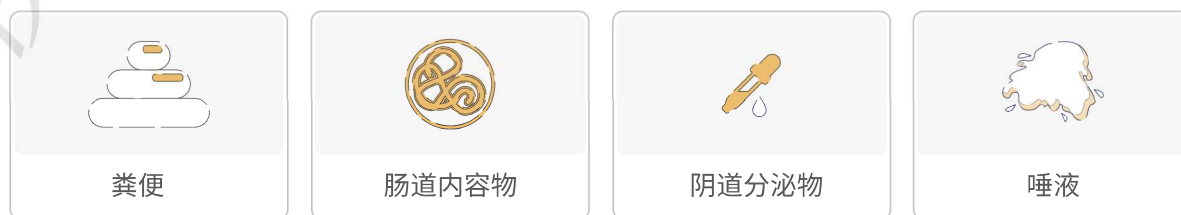
### 联川优势

- 借助PacBio超长测序读长,平均可达16S rDNA序列长度的10倍,直接测得全长16S序列
- 基于实测数据,全长16S测序的种水平平均注释率 $\geq 60\%$ ,种水平注释率提升10倍
- 种水平的菌群鉴定。更特异地鉴定出疾病的菌群标志物,更精准地筛选药物作用的细菌靶点

### 项目流程



### 样品准备



## 案例分析

### 肠道菌群失调诱导遗传易感性小鼠的白血病发生

研究单位: 西班牙萨拉曼卡生物医学研究所

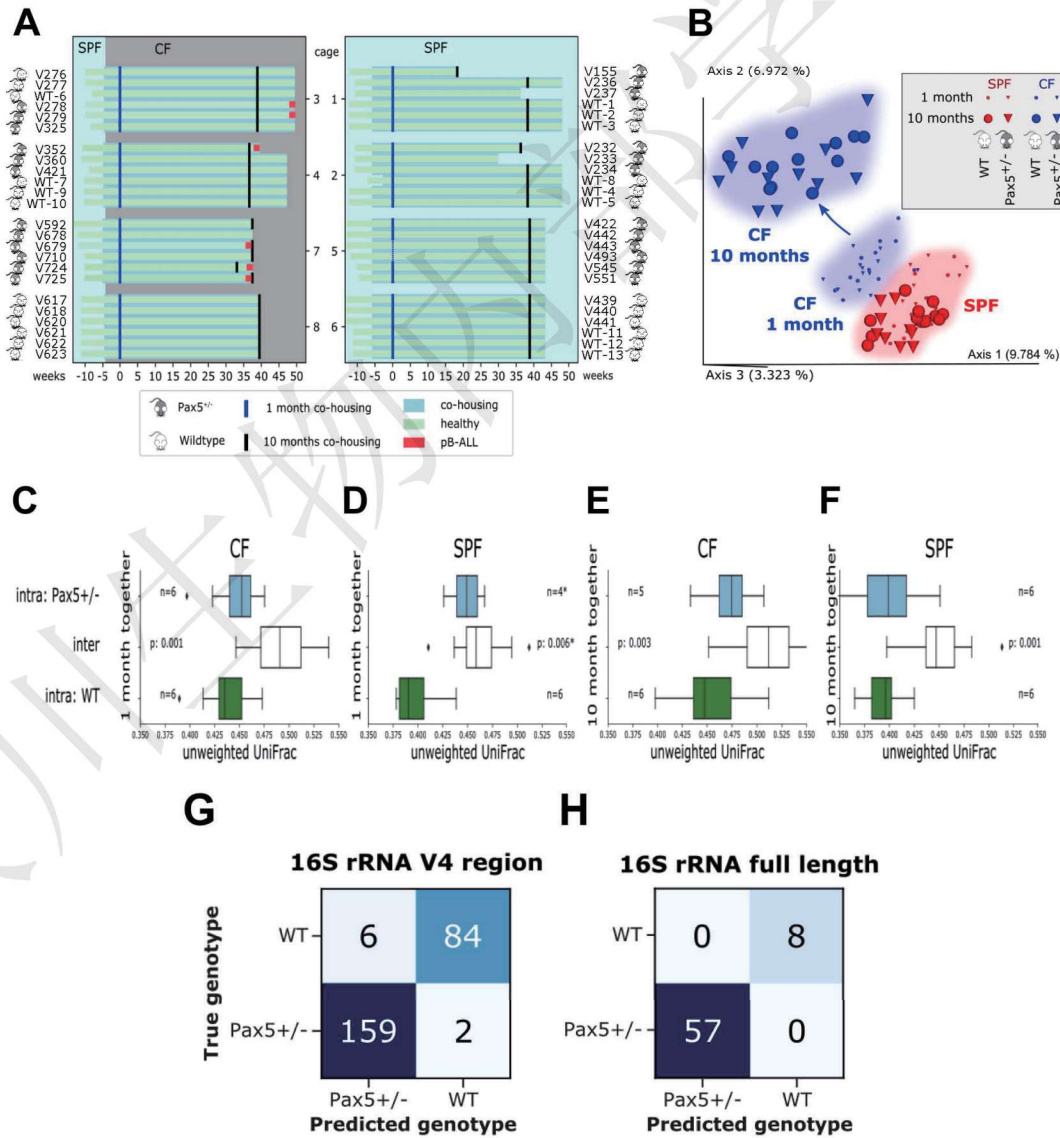
发表期刊: BLOOD

研究手段: 全长16S rDNA测序

影响因子: 22.113

本研究使用pB-ALL (Pax5杂合性或ETV6-RUNX1融合) 的小鼠模型, 表明即使在没有感染性刺激且独立于T细胞的情况下, 生命早期抗生素治疗引起的微生物组紊乱足以在遗传易感性小鼠中诱发白血病。通过对一系列粪便样本进行V4和全长16S rDNA测序, 发现pB-ALL的遗传易感性形成了独特的肠道微生物组。使用3,983个扩增子序列变体 (ASV) 中的40个作为细菌物种的代表, 准确 (96.8%) 预测了遗传易感性。将野生型 (WT) 或 Pax5 +/- 造血骨髓细胞移植到 WT 受体小鼠中, 发现微生物组以供体基因型特异性方式形成和确定。来自 WT 和 Pax5 +/- 小鼠的血清的气相色谱-质谱 (GC-MS) 分析表明存在特定于基因型的不同代谢组学特征。本研究表明在遗传易感性小鼠中, 是缺乏共生微生物群而不是特定细菌的存在促进了白血病的发生。

Figure 1



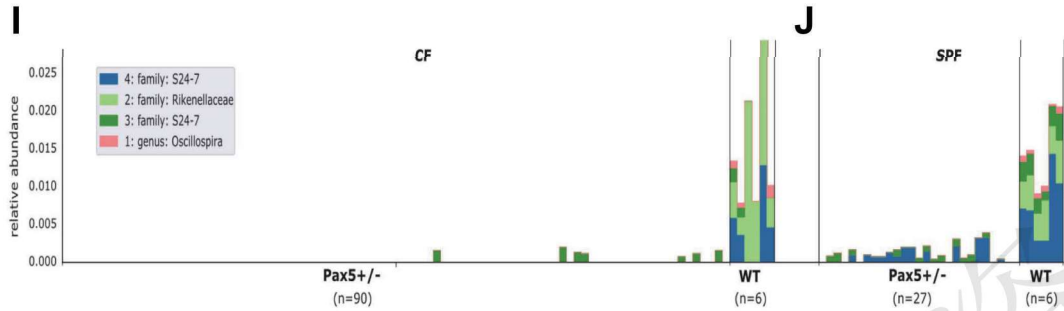


图1 Pax5+/- 与pB-ALL相关的遗传易感性塑造了特定的肠道微生物群

**相较于母亲粪便和阴道菌群, 胎粪菌群与羊水菌群具有更多的共同特征**

研究单位: 内蒙古农业大学

发表期刊: Gut Microbes

研究手段: 全长16S rDNA测序

影响因子: 10.245

本研究采用全长16S rDNA测序分析了39对母婴的母体样本(羊水、粪便、阴道液、唾液)和胎粪的微生物群, Alpha和Beta多样性分析揭示了样本类型特定的微生物群特征。大多数样本类型以代表不同属的序列为主(羊水和阴道液微生物群中的乳酸杆菌和弯曲杆菌;胎粪微生物群中的芽孢杆菌和大肠杆菌/志贺氏菌;母体粪便微生物群中的拟杆菌属和粪杆菌;母体唾液微生物群中的链球菌和普氏菌)。此外, 在所有样本类型中都确定了特定的操作分类单位(OTU)。Dyad分析揭示了多个母体样本的胎粪微生物群和微生物群之间的共同OTU。与母体粪便和阴道微生物群相比, 胎粪微生物群与羊水微生物群具有更多的特征。我们的研究结果强烈表明, 胎粪微生物群是从多个母体部位播种的, 羊水微生物群对所调查的母体部位中胎粪微生物群的播种贡献最大。

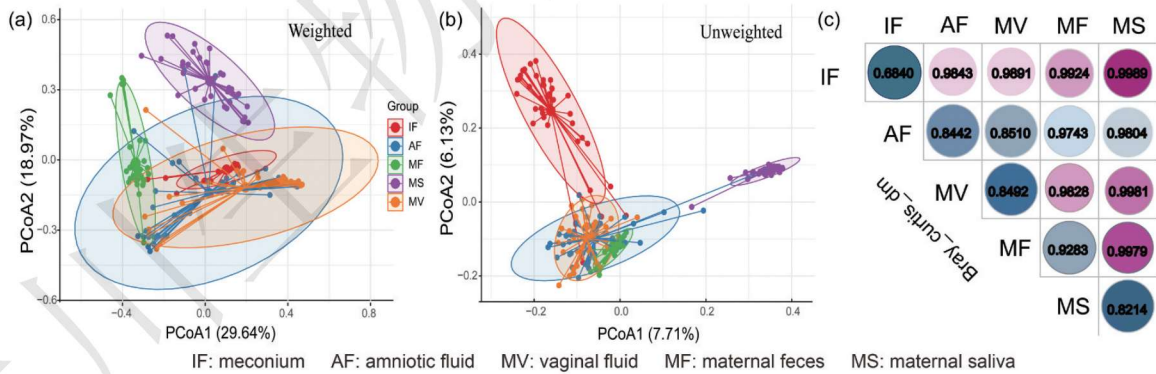


图2 不同样本类型微生物群落的基于差异的多变量分析

[1] Vicente-Dueñas C. et.al. An intact gut microbiome protects genetically predisposed mice against leukemia. **Blood**. 2020

[2] He Q. et.al. The meconium microbiota shares more features with the amniotic fluid microbiota than the maternal fecal and vaginal microbiota. **Gut Microbes**. 2020

## 联川生物近年用户文章列表

- [1]Liu L., *et al.* (2022) BCL-2 expression promotes immunosuppression in chronic lymphocytic leukemia by enhancing regulatory T cell differentiation and cytotoxic T cell exhaustion. **Molecular Cancer** (IF=27.4)
- [2]Xu Y., *et al.* (2022) Extracellular vesicle - mediated delivery of circDYM alleviates CUS - induced depressive - like behaviours. **Journal Of Extracellular Vesicles** (IF=25.843)
- [3]Gai X., *et al.* (2022) Pre-ribosomal RNA reorganizes DNA damage repair factors in nucleus during meiotic prophase and DNA damage response. **Cell Research** (IF=25.612)
- [4]Xia A., *et al.* (2022) The cancer-testis lncRNA lnc-CTHCC promotes hepatocellular carcinogenesis by binding hnRNP K and activating YAP1 transcription. **Nature Cancer** (IF=21.937)
- [5]Dai H., *et al.* (2022) Systemically administered silica nanoparticles result in diminished T cell response in lung. **Nano Today** (IF=20.722)
- [6]Xiong J., *et al.* (2022) Lactylation-driven METTL3-mediated RNA m<sup>6</sup>A modification promotes immunosuppression of tumor-infiltrating myeloid cells. **Molecular Cell** (IF=17.97)
- [7]Song L., *et al.* (2022) FGF4 protects the liver from non-alcoholic fatty liver disease by activating the AMPK-Caspase 6 signal axis. **Hepatology** (IF=17.42)
- [8]Liu Y., *et al.* (2022) Intravenous Delivery of Living *Listeria monocytogenes* Elicits Gasdmermin-Dependent Tumor Pyroptosis and Motivates Anti-Tumor Immune Response. **ACS Nano** (IF=15.88)
- [9]Xue M., *et al.* (2022) Investigation of fiber utilization in the rumen of dairy cows based on metagenome assembled genomes and single-cell RNA sequencing. **Microbiome** (IF=14.65)
- [10]Chen Y., *et al.* (2022) Activation of YAP1 by N<sup>6</sup>-Methyladenosine-Modified circCPSF6 Drives Malignancy in Hepatocellular Carcinoma. **Cancer Research** (IF=12.7)
- [11]Yu Z., *et al.* (2022) TNF- $\alpha$  stimulation enhances the neuroprotective effects of gingival MSCs derived exosomes in retinal ischemia-reperfusion injury via the MEG3/miR-21a-5p axis. **Biomaterials** (IF=12.48)
- [12]Liu Z., *et al.* (2022) Phospholipase A2 inhibitor and LY6/PLAUR domain-containing protein PINLYP regulates type I interferon innate immunity. **PNAS** (IF=11.2)
- [13]Nie S., *et al.* (2022) ALKBH5-HOXA10 loop-mediated JAK2 m<sup>6</sup>A demethylation and cisplatin resistance in epithelial ovarian cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research** (IF=11.161)
- [14]Shen H., *et al.* (2021) Mouse totipotent stem cells captured and maintained through spliceosomal repression. **Cell**(IF=41.582)
- [15]Zhao M., *et al.* (2021) Cyclin D2 Overexpression Enhances the Efficacy of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes for Myocardial Repair in a Swine Model of Myocardial Infarction. **Circulation**(IF=29.69)
- [16]Guo Y., *et al.* (2021) Circ3823 contributes to growth, metastasis and angiogenesis of colorectal cancer: involvement of miR-30c-5p/TCF7 axis. **Molecular Cancer**(IF=27.401)
- [17]Wu J., *et al.* (2021) Cyst(e)ine in nutrition formulation promotes colon cancer growth and chemoresistance by activating mTORC1 and scavenging ROS. **Signal Transduction and Targeted Therapy**-(IF=18.187)
- [18]Kong C., *et al.* (2021) Ketogenic diet alleviates colitis by reduction of colonic group 3 innate lymphoid cells through altering gut microbiome. **Signal Transduction and Targeted Therapy**(IF=18.187)
- [19]Dai Z., *et al.* (2021) N7-Methylguanosine tRNA modification enhances oncogenic mRNA translation and promotes intrahepatic cholangiocarcinoma progression. **Molecular Cell** (IF=17.97)
- [20]Villa E., *et al.* (2021) mTORC1 stimulates cell growth through SAM synthesis and m<sup>6</sup>A mRNA-dependent control of protein synthesis. **Molecular Cell** (IF=17.97)

- [21]Xu X., *et al.* (2021) Group-2 Innate Lymphoid Cells Promote HCC Progression Through CXCL2-Neutrophil-Induced Immunosuppression. **Hepatology** (IF=17.424)
- [22]Herman AB. , *et al.* (2021)Reduction of lamin B receptor levels by miR-340-5p disrupts chromatin, promotes cell senescence and enhances senolysis. **Nucleic Acids Research**(IF=16.971)
- [23]Qin F. , *et al.* (2021)Methyltransferase-Like Protein 14 Attenuates Mitochondrial Antiviral Signaling Protein Expression to Negatively Regulate Antiviral Immunity via N<sup>6</sup>-methyladenosine Modification. **Advanced Science**(IF=16.806)
- [24]Ou Q. , *et al.* (2021)TcpC inhibits neutrophil extracellular trap formation by enhancing ubiquitination mediated degradation of peptidylarginine deiminase 4. **Nature Communications**(IF=14.919)
- [25]Beatty, A. , *et al.* (2021)Ferroptotic cell death triggered by conjugated linolenic acids is mediated by ACSL1. **Nature Communications**(IF=14.919)
- [26]Wang, Y. , *et al.* (2021)Role of Hakai in m<sup>6</sup>A modification pathway in Drosophila. **Nature Communications**(IF=14.919)
- [27]Yin, H. , *et al.* (2021)RNA m<sup>6</sup>A methylation orchestrates cancer growth and metastasis via macrophage reprogramming. **Nature Communications**(IF=14.919)
- [28]Hou J. , *et al.* (2021)TREM2 sustains macrophage-hepatocyte metabolic coordination in nonalcoholic fatty liver disease and sepsis.**Journal of clinical investigation**(IF=14.808)
- [29]Xiang S. , *et al.* (2021)Xylitol enhances synthesis of propionate in the colon via cross-feeding of gut microbiota. **Microbiome**(IF=14.65)
- [30]Ma, *et al.* (2021)Arginine methyltransferase PRMT5 negatively regulates cGAS-triggered antiviral immune response. **Science Advances**(IF=14.136)
- [31]Yang X., *et al.* (2021)Epitranscriptomic regulation of insecticide resistance. **Science Advances** (IF=14.136)
- [32]Qu S, *et al.* (2021)PD-L1 lncRNA splice isoform promotes lung adenocarcinoma progression via enhancing c-Myc activity. **Genome Biology**(IF=13.583)
- [33]Zheng C., *et al.* (2021) Systems pharmacology: a combination strategy for improving efficacy of PD-1/PD-L1 blockade. **Briefing in Bioinformatics** (IF=11.622)
- [34]Chen T. , *et al.* (2021)WDR5 facilitates EMT and metastasis of CCA by increasing HIF-1 $\alpha$  accumulation in Myc-dependent and independent pathways. **Molecular Therapy**(IF=11.454)
- [35]Xie M. , *et al.* (2020)Exosomal circSHKBP1 promotes gastric cancer progression via regulating the miR-582-3p/HUR/VEGF axis and suppressing HSP90 degradation. **Molecular Cancer**(IF=27.401)
- [36]Morrow, C. S. , *et al.* (2020)Vimentin Coordinates Protein Turnover at the Aggresome during Neural Stem Cell Quiescence Exit. **Cell Stem Cell**(IF=24.633)
- [37]Suresh Kumar. , *et al.* (2020)Mammalian Atg8 proteins and the autophagy factor IRGM control mTOR and TFEB at a regulatory node critical for responses to pathogens. **Nature Cell Biology** (IF=28.824)
- [38]Gao, L. , *et al.* (2020)Exosomes secreted by hiPSC-derived cardiac cells improve recovery from myocardial infarction in swine. **Science Translational Medicine**(IF=17.956)
- [39]Huang, W. , *et al.* (2020)Circular RNA cESRP1 sensitises small cell lung cancer cells to chemotherapy by sponging miR-93-5p to inhibit TGF- $\beta$  signalling. **Cell Death and Differentiation**(IF=15.828)
- [40]Peng W., *et al.* (2020)miRNA-1-3p is an early embryonic male sex-determining factor in the Oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis*. **Nature Communications**(IF=14.919)

- [41]Zhu, S. , *et al.* (2020)An oncopeptide regulates m<sup>6</sup>A recognition by the m<sup>6</sup>A reader IGF2BP1 and tumorigenesis. **Nature Communications**(IF=14.919)
- [42]Halder, L. D. , *et al.* (2020) Immune modulation by complement receptor 3-dependent human monocyte TGF- $\beta$ 1- transporting vesicles. **Nature Communications**(IF=14.919)
- [43]Zhang, Y. C. , *et al.* (2020)Reproductive phasiRNAs regulate reprogramming of gene expression and meiotic progression in rice. **Nature Communications**(IF=14.919)
- [44]Peng, L. H. , *et al.* (2020)Engineering bacterial outer membrane vesicles as transdermal nanoplat-forms for photo-TRAIL-programmed therapy against melanoma. **Science Advances**(IF=14.136)
- [45]Wu, C. , *et al.* (2020)Interplay of m<sup>6</sup>A and H3K27 trimethylation restrains inflammation during bacte-rial infection. **Science Advances**(IF=14.136)
- [46]Niklas Michel, *et al.* (2020)Maturational Changes in Mouse Cutaneous Touch and Piezo2-Mediated Mechanotransduction. **Cell Reports**(IF=9.423)
- [47]Malkani, S. , *et al.* (2020)Circulating miRNA Spaceflight Signature Reveals Targets for Countermea-sure Development. **Cell Reports**(IF=9.423)
- [48]Zhang J., *et al.* (2019)Excessive miR-25-3p maturation via N<sup>6</sup>-methyladenosine stimulated by cigarette smoke promotes pancreatic cancer progression. **Nature Communications** (IF=14.919)
- [49]Feng, W. , *et al.* (2019) Genetic determinants of cellular addiction to DNA polymerase theta. **Nature Communications**(IF=14.919)
- [50]Irmscher, S. , *et al.* (2019)Serum FHR1 binding to necrotic-type cells activates monocytic inflam-masome and marks necrotic sites in vasculopathies. **Nature Communications**(IF=14.919)
- [51]Y Shi, *et al.* (2019)YTHDF1 links hypoxia adaptation and non-small cell lung cancer progression. **Nature Communications**(IF=14.919)



杭州联川生物技术股份有限公司

LC-Bio Technologies (HangZhou) Co.,Ltd

电话：0571-87662413 网址：www.lc-bio.com

地址：杭州经济技术开发区6号大街260号中自科技园16幢4层