

文献汇报

——田鹏

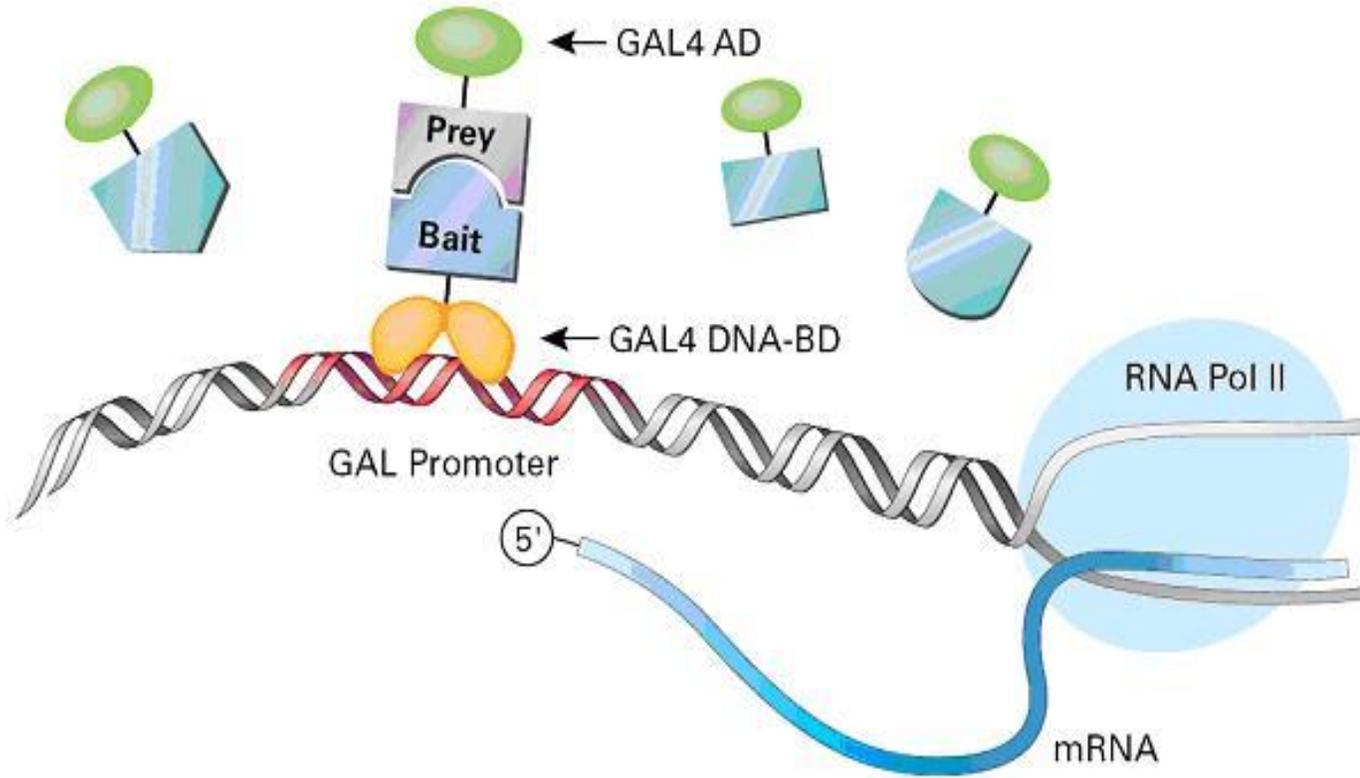
植科院作物遗传育种专业

2017301110103

CrY2H-seq:一种大规模、多复用的深度覆盖互作网络绘制
试验方法

CrY2H-seq: a massively multiplexed assay for deep-coverage interactome mapping

Y2H:酵母双杂交技术



- 酵母转录因子GAL4
- N端DNA结合域 (BD), C端的转录激活域 (AD)
- 结合上游激活序列 (UAS), 启动下游报告基因表达
- BD-X的融合蛋白称为 Bait, AD-Y的融合蛋白称为Prey

图片来源：百度百科

自激活现象 self-activating

特点：

一般指TFs结合BD，激活下游报告基因
蛋白互作中的假阳性（false positive）
普通Y2H难剔除

Cre-LoxP重组酶系统

- 介导2个LoxP位点间的特异性重组
- LoxP位点：2个13bp的反向重复序列和8bp中间序列组成
- 特点：
 - 两个 LoxP位点位于一条DNA链且方向相同， cre重组酶切除中间序列
 - 两个 LoxP位点位于一条DNA链但方向相反， cre重组酶介导中间序列倒位
 - 两个LoxP位点位于两条DNA链或染色体上， cre重组酶介导两条链的DNA交换或染色体易位

摘要

Broad-scale protein–protein interaction mapping is a major challenge given the cost, time, and sensitivity constraints of existing technologies. Here, we present a massively multiplexed yeast two-hybrid method, **CrY2H-seq**, which uses a Cre recombinase interaction reporter to intracellularly fuse the coding sequences of two interacting proteins and **next-generation DNA sequencing** to identify these interactions *en masse*. We applied CrY2H-seq to investigate sparsely annotated *Arabidopsis thaliana* transcription factors interactions. By performing **ten independent screens testing** a total of 36 million binary interaction combinations, and uncovering a network of 8,577 interactions among 1,453 transcription factors, we demonstrate CrY2H-seq’s improved screening capacity, efficiency, and sensitivity over those of existing technologies. The deep-coverage network resource we call **AtTFIN-1** recapitulates one-third of previously reported interactions derived from diverse methods, expands the number of known plant transcription factor interactions by three-fold, and reveals previously unknown family-specific interaction module associations with plant reproductive development, root architecture, and circadian coordination.

研究目的

- 通过CrY2H-seq方法研究拟南芥转录因子的相互作用，并验证该方法的可行性与先进性

研究材料

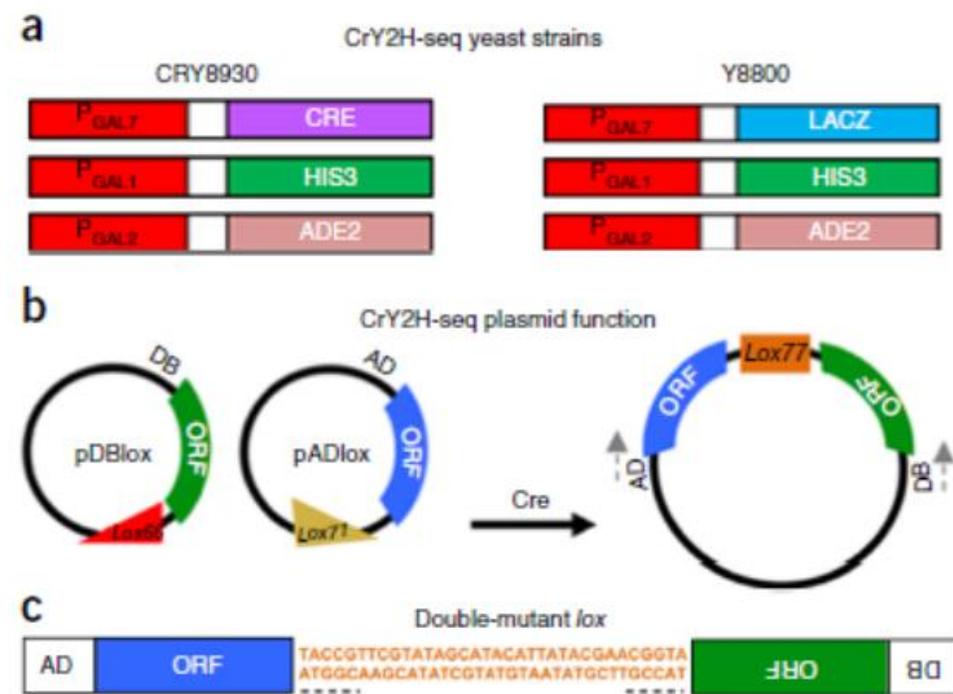
- 通过基因克隆构建的1956个拟南芥转录因子文库

研究方法

CrY2H-seq、HT-Y2H、wNAPPA等

研究结果与分析

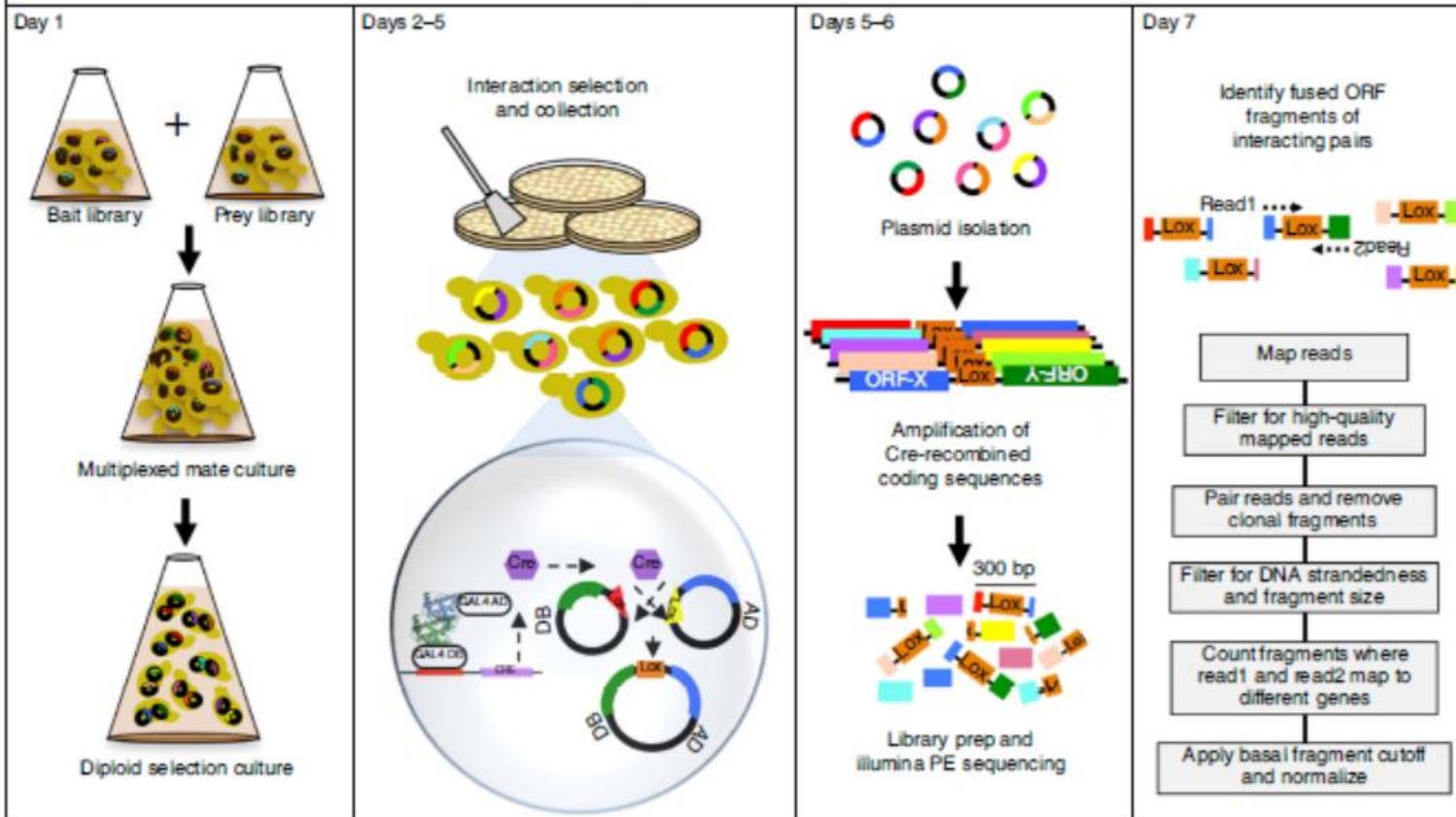
构建了CrY2H-seq方法所需
菌株与质粒载体



CrY2H-seq技术与目前多复用Y2H技术的区别比较

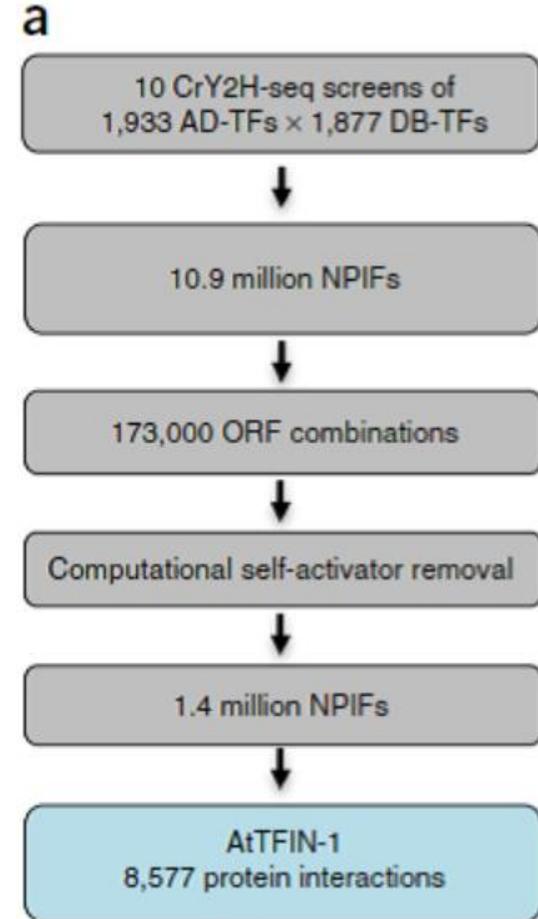
- 第一：cr方法检测需要两个报告基因（GAL1：HIS3、cre）平行激活；
- 第二：cr利用互作蛋白编码序列自身形成胞内的DNA识别子。

CrY2H-seq screening pipeline



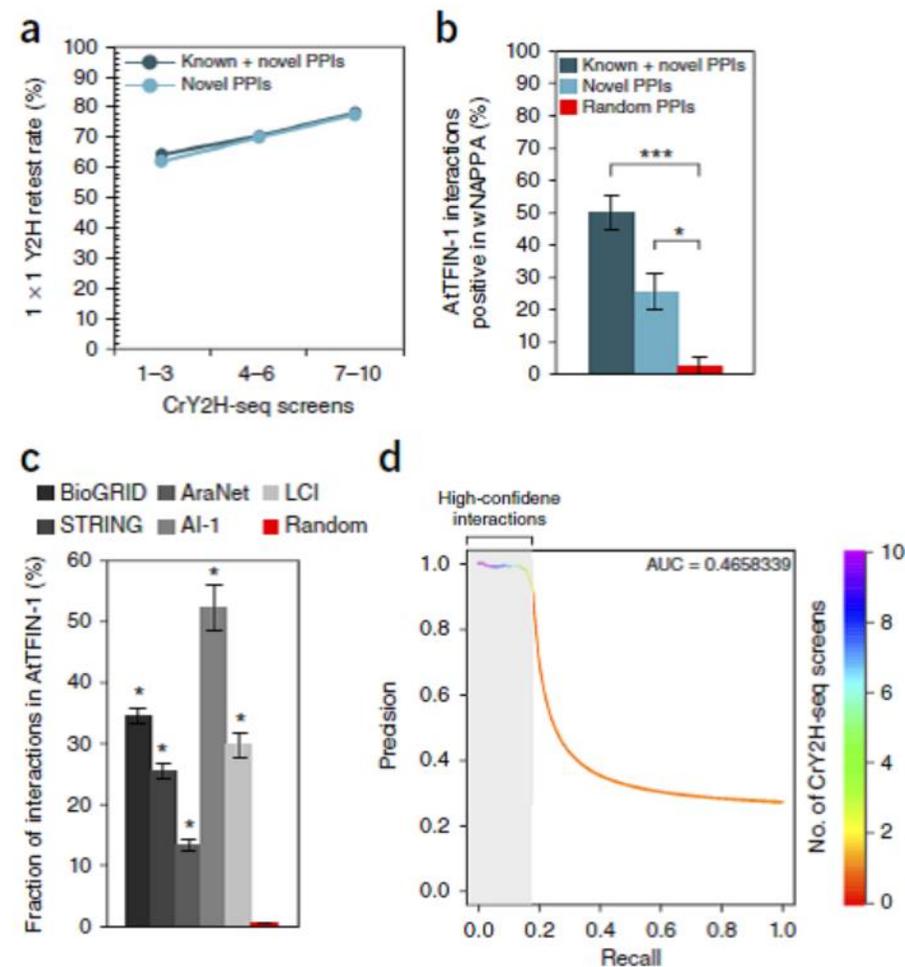
拟南芥转录因子ORF组的深度互作筛选

- 将1956个拟南芥TFs载入到CrY2H-seq流程，对最终的诱饵（BD）和猎物（AD）库，分别包括1877和1933个独特的酵母克隆进行了十组全面筛选。
- 对每组筛选进行了质粒的多模板PCR扩增后，我们随机修剪PCR产物至大约300bp，生成标准的以Illumina为基础的DNA序列文库



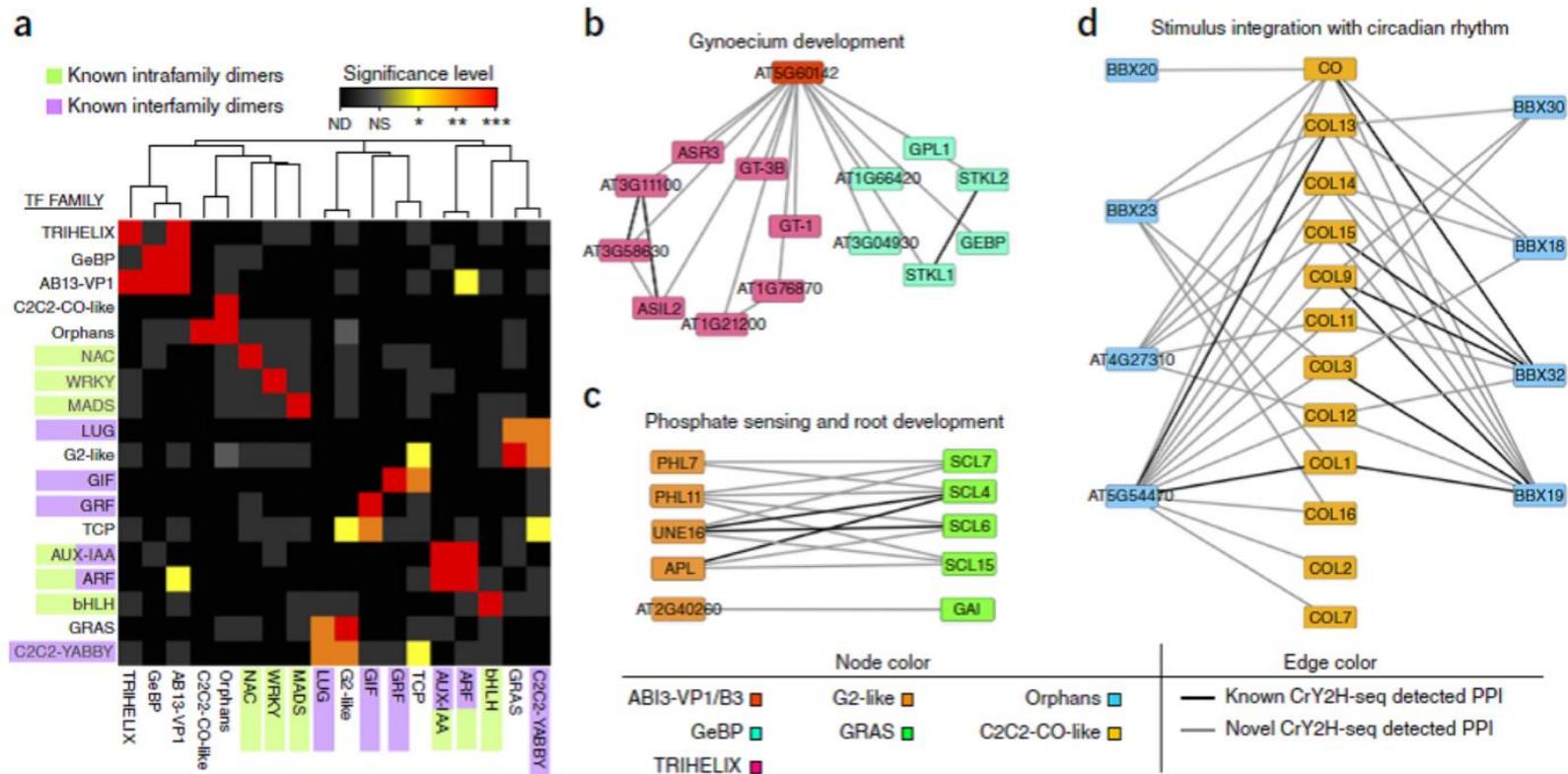
AtTFIN-1互作反应

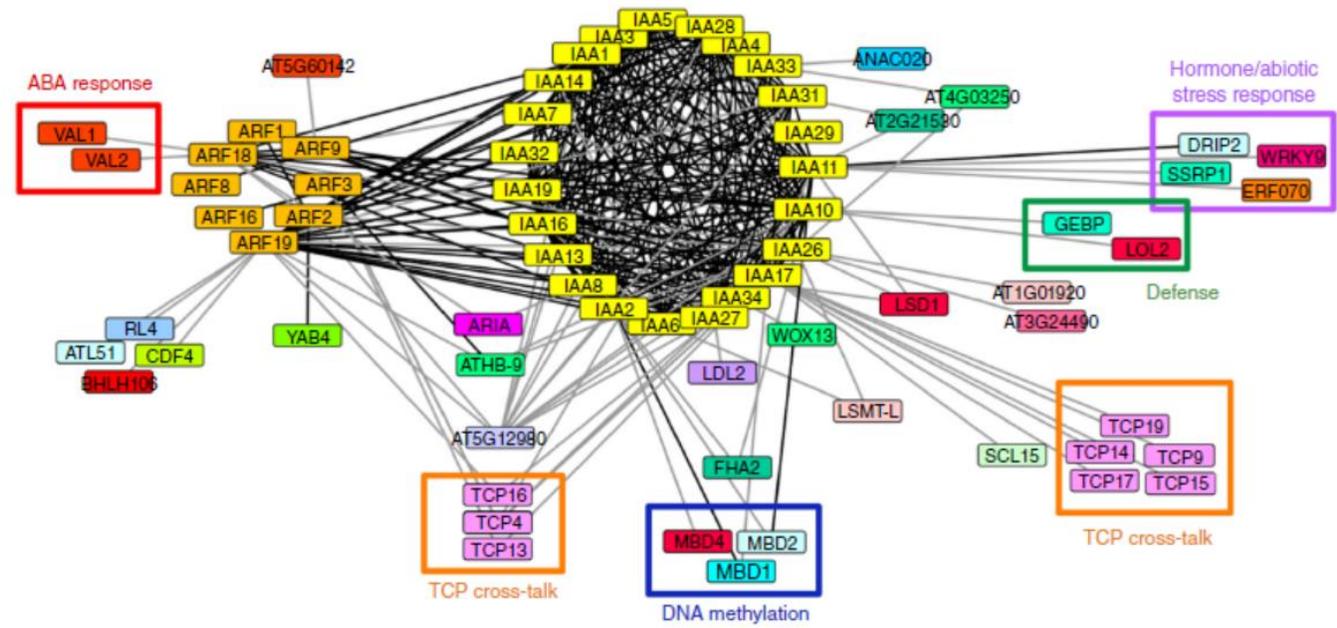
- 评价样品灵敏度
- 评价重复性
- 评价实验灵敏度
- CrY2H-seq比较高通量Y2H (HT-Y2H)
- 评价AtTFIN-1相互作用的生物相关性



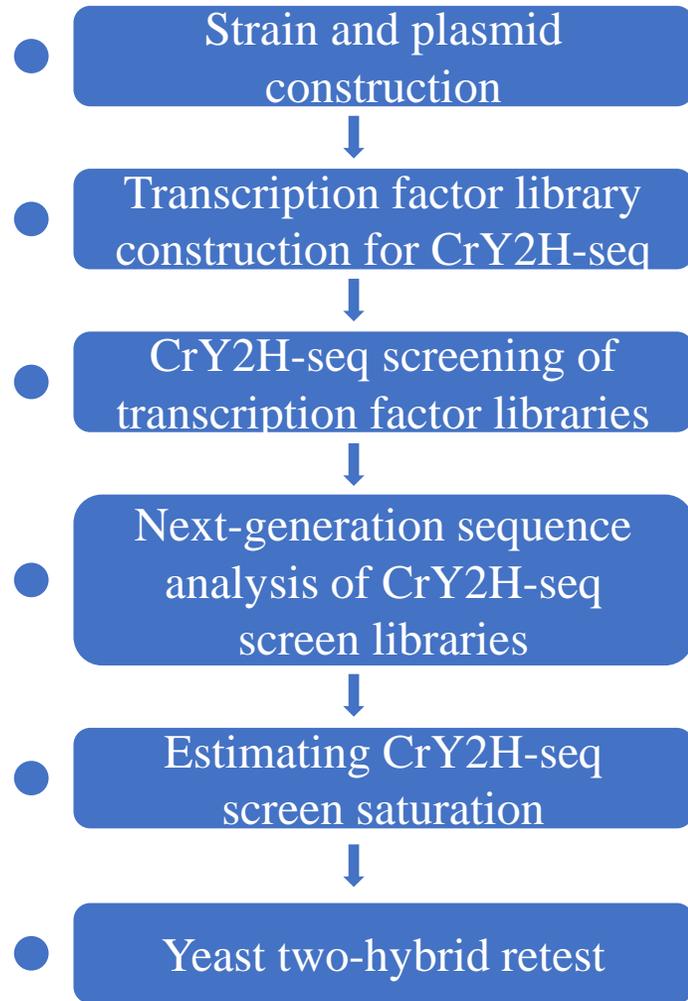
AtTFNIN-1扩展的家族特异性互作模块

- ‘优先’家族间及家族内的互作

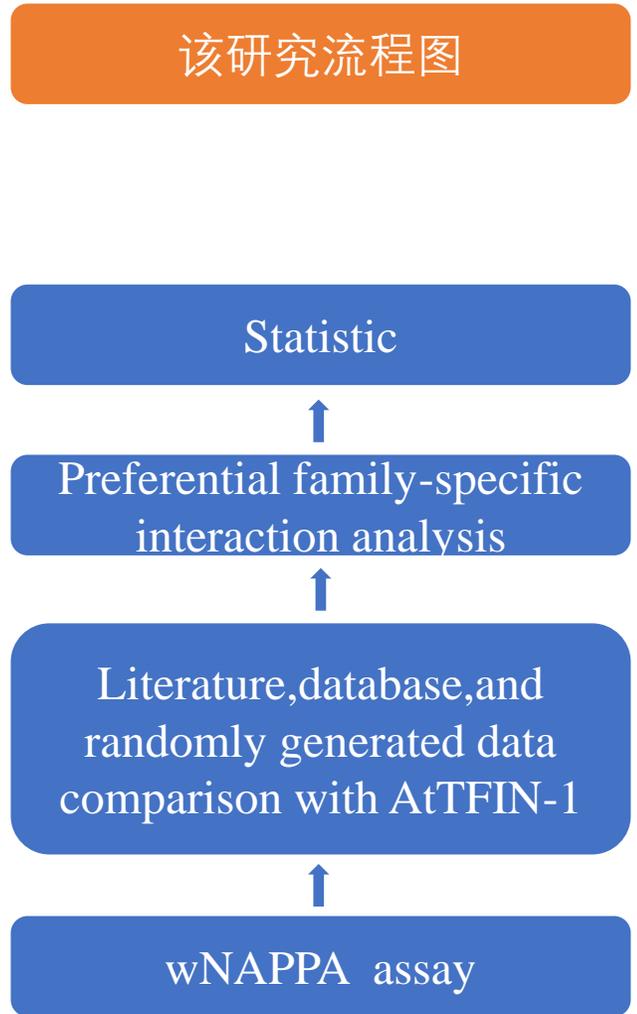




Node color				Edge color	
ABI3-VPI	■	FHA	■	TCP	■
AP2-EREBP	■	GRAS	■	TRAF	■
ARF	■	GeBP	■	TRIHILIX	■
AUX-IAA	■	HB	■	WRKY	■
C2C2-DOF	■	HMG	■	ZF	■
C2C2-YABBY	■	MBD	■	bHLH	■
		MYB related	■		
		NAC	■		
		ND	■		
		RCD1 like	■		
		SET-PcG	■		
		SWI-SNF-SW13	■		
				—	Known CrY2H-seq-detected PPI
				—	Novel CrY2H-seq-detected PPI



→



讨论

- 优点：独到的利用了Cre重组酶开发的系统，将AD与BD ORF融合到同一载体，然后利用测序的手段检测融合因子，进一步检测互作效应，减少了自激活的影响。
- 启发：在解决相应问题过程中，可以多在理论上找到解决办法，如：此研究在理论上用重组酶融合转录因子，减少自激活，构建了拟南芥的转录因子互作文库。
- 改进点：虽然此研究结果明确显示了自激活现象的减少，但缺乏理论和具体数据的支持，并且该方法虽然巧妙，但在实际操作过程中与普通Y2H同样操作繁琐，这是需要改进的地方。

The End

谢谢！

报告人：田鹏
2017.09.27