

www.frasergen.com

武汉菲沙基因信息有限公司
Wuhan Frasergen Bioinformatics Co., Ltd.
武汉市东湖高新技术开发区高新大道666号 邮编:430075
T:027-87224696 F:027-87224785 E:support@frasergen.com

武汉菲沙基因组医学有限公司
Wuhan Frasergen Genomic Medicine Co., Ltd.
武汉市东湖高新技术开发区高新大道666号B8栋 邮编:430075
Building B8, 666 Gaoxin Road, East Lake High-tech Zone, Wuhan, China 430075

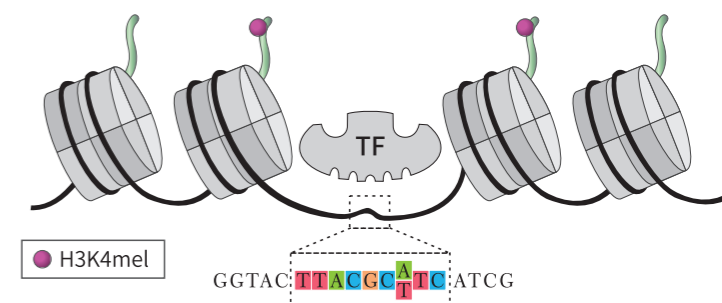
北京研发中心
Beijing Research Center
北京市海淀区中关村南大街12号科技综合楼 邮编:100081
12 Zhongguancun South St., Haidian District, Beijing, China 100081



扫码关注更多信息

三维基因组创新技术联盟

ATAC-seq

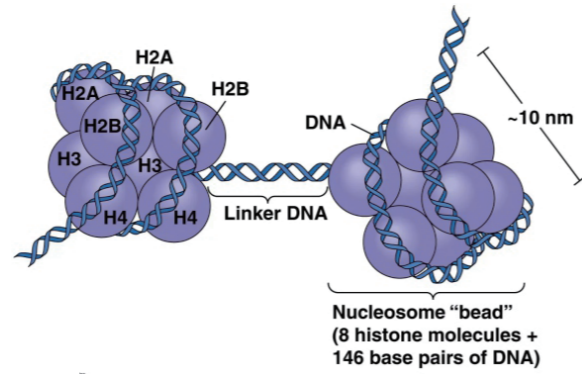


Frasergen 菲沙基因

核小体是真核细胞染色质的基本结构单位，由 DNA 和组蛋白构成。每个核小体由 146bp 的 DNA 缠绕在八聚体的组蛋白上形成，两个核小体之间通过一段连接 DNA 相连，DNA 与组蛋白的结合可以发生动态变化。

缠绕在组蛋白上的 DNA 不易被核酸酶消化，也不易与其它蛋白结合，这些 DNA 通常处于表达抑制的状态。而没有核小体结合的 DNA 区域容易被核酸酶消化，也易于与调控蛋白相结合，这些开放的 DNA 序列则可以使其下游的基因处于活跃表达的状态。细胞通过改变 DNA 与组蛋白的结合位置，从而调控基因的表达。

因此，获得处于开放状态的 DNA 序列可以用于研究基因表达的调控机制，是表观遗传学研究的热点，而 ATAC-seq 则是用于这类研究的最佳利器！



技术简介

该技术由美国斯坦福大学的研究人员开发，2013年首次发表在 Nature Methods (Buenrostro et al., 2013)。ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high throughput sequencing) 是使用高通量测序对 Tn5 转座酶易接近性染色质区域进行测序分析的一种表观遗传学研究技术。

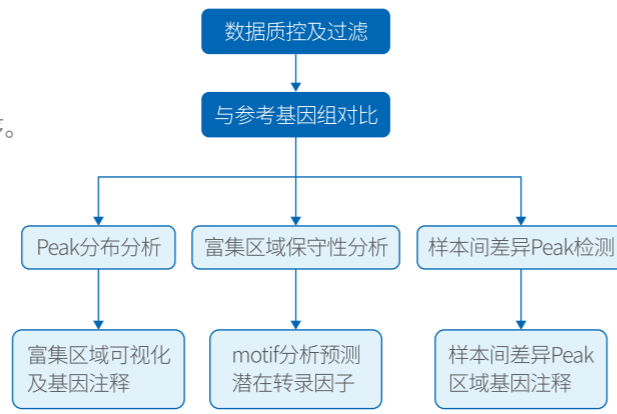
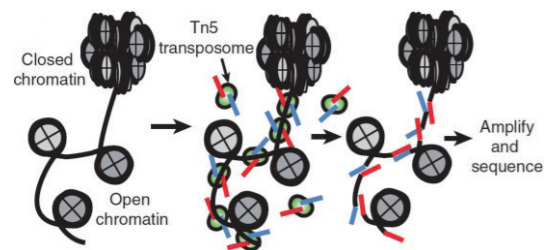
该技术有两大特点：

- 转座酶更容易对开放的染色质区域进行切割；
- 转座酶可以同时切割下来的DNA片段的两端添加测序接头。

因此，回收切割下来的DNA片段经PCR扩增后可以直接上机测序，获得在特定时空下全基因组的活性调控序列。后续对这些序列进行分析，挖掘这些开放位点的潜在结合转录因子，结合基因表达水平数据，发现关键的转录因子。

技术流程

- 1 收集细胞或组织，制备细胞悬液；
- 2 加入细胞膜裂解液，获得细胞核；
- 3 加入 Tn5 转座酶，对处于开放状态的 DNA 进行酶切；
- 4 回收酶切下来的 DNA 片段，PCR 扩增后进行二代高通量测序。

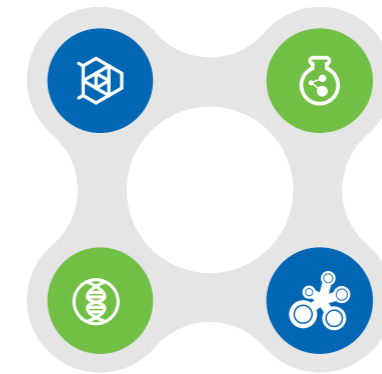


参考文献：
Buenrostro JD, et al. (2013) Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. Nature Methods. 10(12):1213-1218.

应用方向

获得在特定时空下基因组中所有处于开放状态的序列，分析调控元件。

样本间差异开放区比较分析结合转录组差异表达数据，寻找关键调控蛋白。



分析染色质开放区域的 motif 获得潜在的与其结合的转录因子等调控蛋白。

联合 Hi-C 染色质互作网络及三维结构变化，深入揭示基因转录的调控机制。

结果示例

基因活性调控序列图谱分析

通过 ATAC-Seq 实验，分析 reads 的分布和 Peak 检测结果，绘制出每个样品在整个基因组水平的活性调控图谱并进行差异比较。

不同样本间基因活性调控序列图谱

motif 分析预测转录因子结合蛋白

分析 ATAC-seq 获得的染色质开放区域的 motif，推测其结合的转录因子等调控蛋白。

Motif	% Targets	% Background enriched	Fold	P value
SOX	36.49	14.02	2.60	$P < 10^{-178}$
OCT4	14.05	2.75	5.11	$P < 10^{-138}$
ZIC	22.48	8.99	2.50	$P < 10^{-92}$

motif 分析预测转录因子结合蛋白

与转录组联合寻找关键调控元件

ATAC-seq 与 RNA-seq 联合分析，分析基因结构开放状态与基因表达水平的关系，寻找关键调控元件。

基因结构开放状态与基因表达水平关联分析

应用案例

案例一 巨噬细胞极化调节 (菲沙项目文章)

基因差异表达并开放性增加的区域通过招募重要因子促进巨噬细胞 M2 极化

Cell Death & Differentiation
https://doi.org/10.1038/s41418-020-00714-7

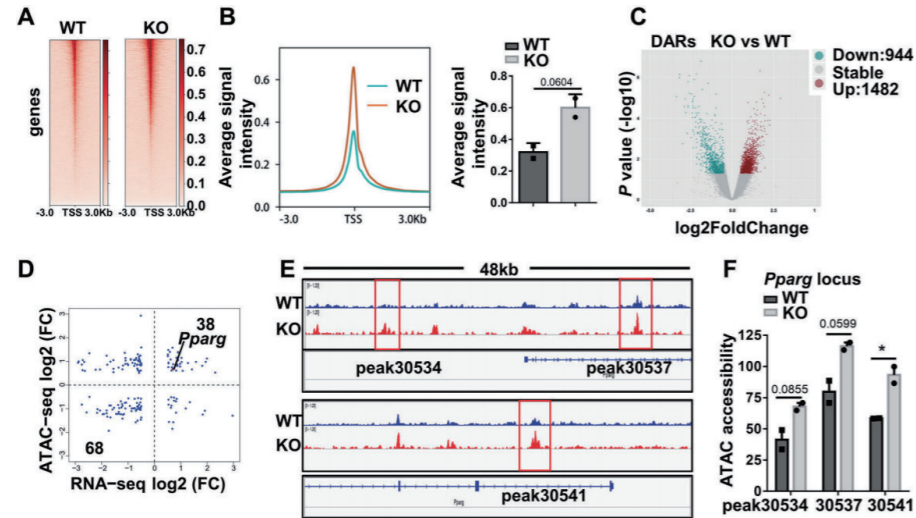
ARTICLE

Kdm2a deficiency in macrophages enhances thermogenesis to protect mice against HFD-induced obesity by enhancing H3K36me2 at the *Pparg* locus

Longmin Chen¹ · Jing Zhang¹ · Yuan Zou¹ · Faxi Wang¹ · Jingyi Li¹ · Fei Sun¹ · Xi Luo¹ · Meng Zhang^{1,2} · Yanchao Guo^{1,2} · Qilin Yu¹ · Ping Yang¹ · Qing Zhou¹ · Zhishui Chen^{1,3} · Huilan Zhang¹ · Quan Gong⁴ · Jiajun Zhao⁵ · Decio L. Eizirik⁶ · Zhiguang Zhou⁷ · Fei Xiong¹ · Shu Zhang¹ · Cong-Yi Wang¹

高脂型饮食导致的肥胖会招致慢性炎症。Kdm2a催化H3K36me2去甲基化, 参与了许多生物学过程, 如细胞增殖、分化、凋亡和肿瘤发生, 但是它在肥胖中的作用研究有待进一步探索。

ATAC-seq分析显示, KO组(Kdm2a^{-/-})中差异表达的Pparg的3个特定位点出现明显的开放性增加, 该富集区域的H3K36me2受Kdm2a负调控, Arg1基因座(M2型吞噬细胞标志物)开放性增加, 并且ChIP-qPCR分析显示Kdm2a^{-/-}有助于招募对于M2程序很必要的转录因子Stat6。因此Kdm2a缺失后, Pparg基因座的H3K36me2增强, 开放性增加, 招募更多的Stat6, 助力巨噬细胞的M2极化, 氧化代谢网络启动以及脂肪酸吸收加快, 高脂肪饮食的小鼠从而免于肥胖。



参考文献

Chen L, Zhang J, Zou Y, et al. Kdm2a deficiency in macrophages enhances thermogenesis to protect mice against HFD-induced obesity by enhancing H3K36me2 at the Pparg locus[J]. Cell Death & Differentiation, 2021: 1-20.

参考文献:

Van der Burg et al. Contrasting Roles of Transcription Factors Spineless and EcR in the Highly Dynamic Chromatin Landscape of Butterfly Wing Metamorphosis. Cell Reports, 2019.

案例三 植物中同源框基因的保守多效性

靶向顺式调控突变区域, 揭示基因保守的多效性



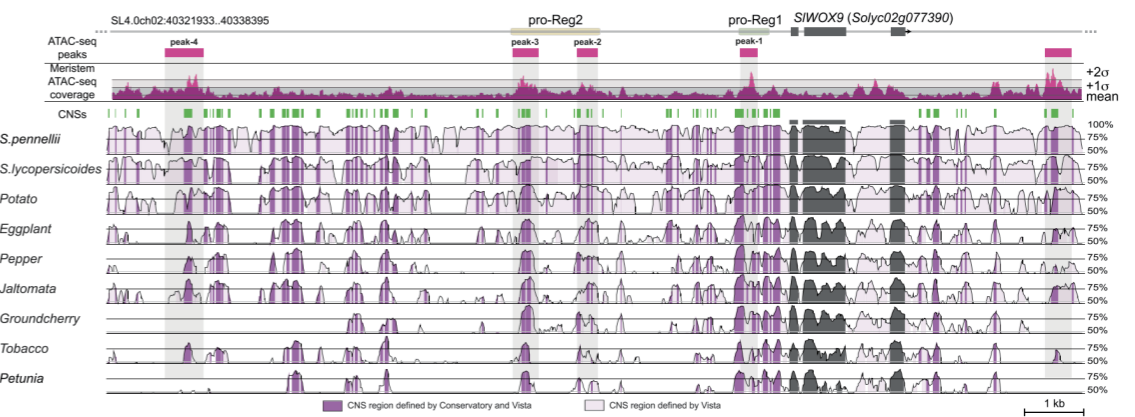
Article

Conserved pleiotropy of an ancient plant homeobox gene uncovered by cis-regulatory dissection

Anat Hendelman,¹ Sophia Zebell,^{1,2} Daniel Rodriguez-Leal,^{1,7} Noah Dukler,¹ Gina Robitaille,^{1,2} Xuelin Wu, Jamie Kostyun,⁴ Lior Tal,^{5,8} Peipei Wang,⁶ Madelaine E. Bartlett,⁴ Yuval Eshed,⁵ Idan Efroni,^{6,*} and Zachary B. Lippman^{1,2,9,*}

基因功能的差异是演化的一个标志, 少数可用于跨物种研究的等位基因可能掩盖了极其保守的多效性作用, 不能揭示基因的整体功能谱。WUSCHEL HOMEODOMAIN-BOX9 (WOX9)基因通过调控分生组织中干细胞群体的产生和成熟来控制植物的生长发育, 在胚胎和花序发育过程中有功能差异。

该研究利用CRISPR-Cas9系统编辑番茄中WOX9启动子, 构建全面的启动子区等位突变体以探究WOX9的多效性作用。通过ATAC-seq分析开放的染色质区域和保守的顺式调节序列, 确认了多效性活性的区域, 并且该区域在番茄的近缘物种地樱桃中功能保守。



十字花科拟南芥与番茄和地樱桃远缘相关, 在拟南芥中模拟这些等位基因, 发现拟南芥WOX9与茄科植物WOX9具有相同的营养和生殖功能, 新的花序表型出现, 进一步反映了WOX9多效性的保守性。因此, 靶向顺式调控突变可以揭示保守基因功能, 减少作物改良过程的不良影响。

参考文献:

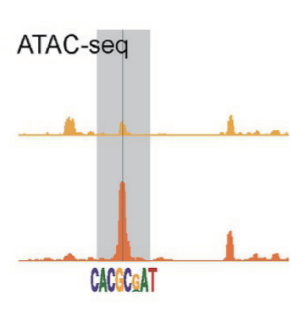
Hendelman A, Zebell S, Rodriguez-Leal D, et al. Conserved pleiotropy of an ancient plant homeobox gene uncovered by cis-regulatory dissection[J]. Cell, 2021, 184(7): 1724-1739. e16.

案例二 动物组织发育过程

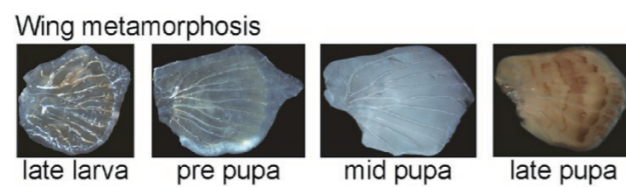
染色质开放区变化调控蝴蝶翅膀的形态建立

Cell Reports

Contrasting Roles of Transcription Factors Spineless and EcR in the Highly Dynamic Chromatin Landscape of Butterfly Wing Metamorphosis



Development



- Distinct factors associated with accessibility at different stages
- Spineless, not EcR, predicts accessibility

对不同发育时期的蝴蝶翅膀组织进行ATAC-seq和RNA-seq, 发现染色质开放状态呈现高度动态变化, 在不同的时期, 不同开放区的motif对应不同的转录因子, 发现转录因子Spineless可以结合到新打开的区域, 而转录因子EcR则持续结合在已经开放的区域, 并使用ChIP-seq进行了验证。这为研究昆虫组织形态发生过程中染色质动态变化及重塑因子提供了思路。

Article

案例四 损伤组织再生的调控机制

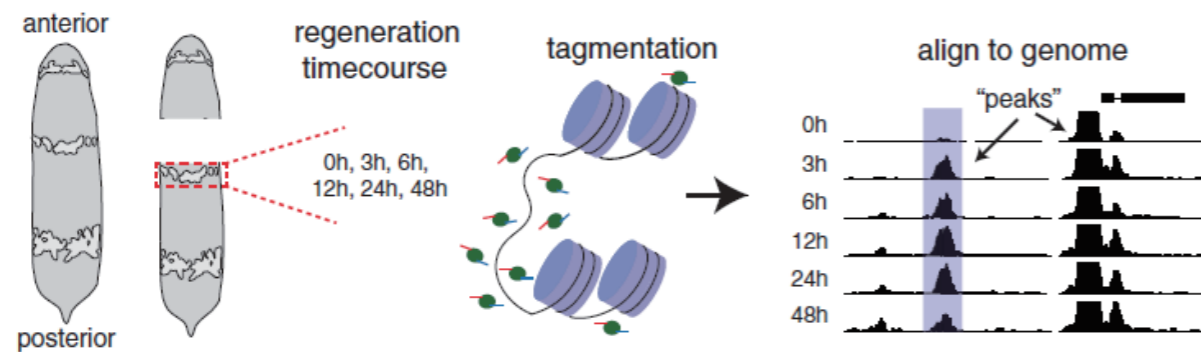
三带豹蠕虫的染色质开放状态调控全身组织再生

Science

Acoel genome reveals the regulatory landscape of whole-body regeneration

Andrew R. Gehrke, Emily Neverett, Yi-Jyun Luo, Alexander Brandt, Lorenzo Ricci, Ryan E. Hulett, Annika Gompers, J. Graham Ruby, Daniel S. Rokhsar, Peter W. Reddien and Mansi Srivastava

全身组织再生的过程伴随着一系列基因转录水平的变化，而转录水平受到染色质开放状态的调控，这种组织再生过程的转录调控机制还未被阐明。研究者以具有超强组织再生能力的无肠目动物 (acoel) 三带豹蠕虫 (*Hofstenia miamia*) 为研究对象，首先构建了其参考基因组序列，然后将虫体从中部截肢后，在0h、3h、6h、12h、24h、48h共6个时间点取损伤组织进行ATAC-seq和RNA-seq，揭示了上千个与再生应答相关的染色质开放区，并鉴定出动态的转录因子 motifs 结合位点。



参考文献：
Gehrke A R, Neverett E, Luo Y J, et al. Acoel genome reveals the regulatory landscape of whole-body regeneration[J]. Science, 2019, 363(6432).

案例五 胰腺导管腺癌预后

某种治疗方式下短期和长期存活患者癌细胞之间的染色质开放性差异和TF motifs



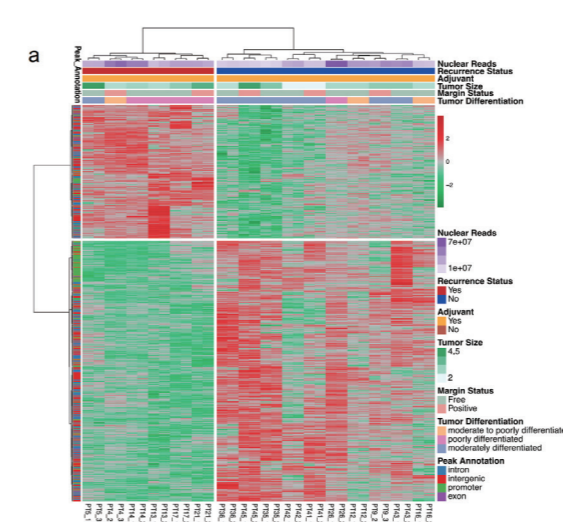
ARTICLE
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-23237-2> OPEN

Pancreatic cancer prognosis is predicted by an ATAC-array technology for assessing chromatin accessibility

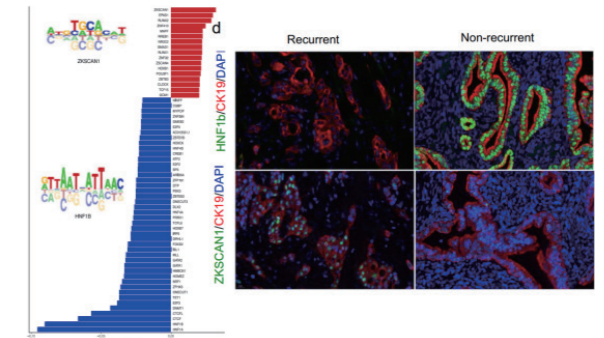
S. Dhara^{1,9}, S. Chhangawala^{2,3,9}, H. Chintalapudi¹, G. Askan⁴, V. Aveson^{4,5}, A. L. Massa¹, L. Zhang⁴, D. Torres¹, A. P. Makohon-Moore⁴, N. Lecomte⁴, J. P. Melchor⁴, J. Bermeo⁴, A. Cardenas III⁴, S. Sinha⁴, D. Glassman⁴, R. Nicolle⁶, R. Moffitt⁷, K. H. Yu⁴, S. Leppanen⁸, S. Laderman⁸, B. Curry⁸, J. Gui¹, V. P. Balachandran⁴, C. Iacobuzio-Donahue⁴, R. Chandwani⁵, C. S. Leslie^{3&8} & S. D. Leach^{1&9}

与其他恶性肿瘤不同，限制胰腺导管腺癌 (PDAC) 治疗的主要因素不是用于预测的分子标记，而是细胞毒性化疗反应。在已有的大规模差异基因表达谱的基础上，通过ATAC-seq分析某种治疗方案下肿瘤细胞内的染色质开放性，切除PDAC肿瘤后佐以(GEM)/Abraxane化学制剂，补充上此病的表观异质性。

从54个新切除的人类肿瘤中分选得到PDAC恶性上皮肿瘤细胞 (EPCAM+)，它们的染色质开放性结果显示，无病生存时间 (DFS) 小于1的和DFS大于1的患者之间有1092个差异开放性的染色质基因座。



转录因子 (TF) 结合 motifs 分析显示，短期和长期存活患者之间有两个具有不同核定位化信号的转录因子 (ZKSCAN1和HNF1B)。



参考文献：
Dhara S, Chhangawala S, Chintalapudi H, et al. Pancreatic cancer prognosis is predicted by an ATAC-array technology for assessing chromatin accessibility[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 1-9.

近期ATAC-seq文献列表 (节选)

物种	年份	期刊	IF(2020)	样本类型	科学问题
人	2021	Nature Communications	14.91	人的胶质瘤组织和细胞系	人脑胶质瘤的染色质开放性和活跃调控元件图揭示其病理机制
斑马鱼	2021	Developmental Cell	12.271	原始生殖细胞和体细胞	生殖细胞分化需要 Tdrd7蛋白依赖的染色质和转录组重编程
檀香	2021	Environmental and Experimental Botany (菲沙项目文章)	5.545	根组织和叶组织	染色质开放性结合转录组分析褪黑素有助于半寄生植物檀香的氮代谢和吸盘发育
人, 鼠	2021	Nature Communications (菲沙项目文章)	14.919	细胞系、PBMC	染色质开放性分析结合ChIP-seq分析系统红斑狼疮某个风险位点所在区域的特异性增强子
鼠	2021	Cell Death and Differentiation (菲沙项目文章)	15.828	脂肪组织	Kdm2a缺陷可以引起染色质开放性增加，招募促进巨噬细胞极化的转录因子
鸡	2021	Nature Communications	14.919	鸡胚胎	鸡胚的开放染色质可鉴定对近轴中胚层形成和轴延伸很重要的顺式调控元件
斑马鱼	2020	Nature	49.962	成年组织	斑马鱼中的顺式调控元件和三维基因组结构图
人	2020	Nature Communications	14.919	人脑细胞	常见的精神分裂症变异位点富集于人类谷氨酸能神经元的开放染色质区域
鼠	2020	Circulation Research	17.367	起搏细胞	ATAC-Seq揭示了调节窦房结发育和功能的Isl1增强子
鼠	2020	Nucleic Acids Research	16.971	原代神经细胞	eRNAs可预测增强子与基因之间的调节联系并且对于神经系统中的增强子功能至关重要
玉米	2020	Genome Biology	13.583	雌、雄穗	玉米三维基因组结构可协调雄穗和雌穗差异表达基因的反式和顺式调节
青鳉鱼	2020	Genome Research	9.043	胚胎	青鳉鱼胚胎形成的动态转录和染色质开放性图谱