



用微流体平台测量生物分子相互作用

小组成员：徐丹云
张舒梦

2012.10.29



- 微流体平台的研究背景和意义
- 微流体平台的特性阐述
- 微流体平台的应用



在系统与合成生物学中，研究者采用的计算机模型和工程学方法来研究生物学，他们需要依靠精细定量的数据。

这些精细定量的数据来自哪里？



微流体设备（ k-MITOMI ）



研究背景和意义

尽管现在已知的蛋白质-蛋白质互作和蛋白质-DNA互作的数量已经很可观了，但这样的生物信息本质上是定性的和二元的，远不足以模拟复杂的生物进程。在现代的生物学研究中，我们需要更加精细定量的生物信息。

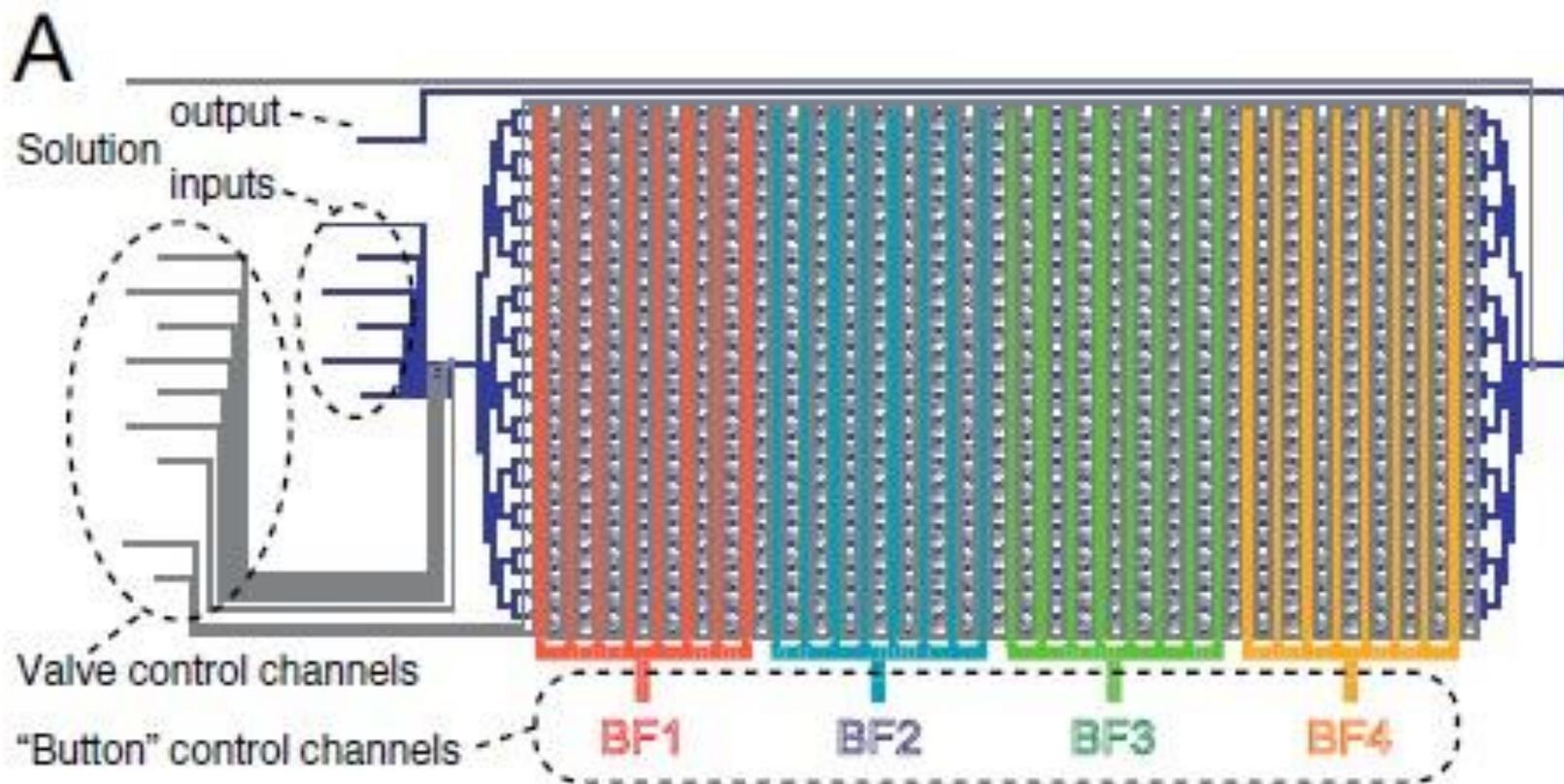
k-MITOMI能贡献于系统生物学的定量理解和加速工程系统的发展和对其特性的描述。



微流体平台

MITOMI是一个多功能整体性的平台。它能够同步测量768个生物分子互作的动力学特征，能够在很广的范围内测量生物分子的相互作用，包括蛋白质与蛋白质，蛋白质与DNA，蛋白质与RNA以及蛋白质和小分子。该方法的整体特性允许大规模的芯片合成、纯化和描述蛋白质的特性。

微流体平台设计图





k-MITOMI应用于转录因子（TF）—DNA互作的动力学分析，详细测量老鼠的TF Zif268的动力学特征，还有酵母TFs TYE 7p, Yox1p, 和 Tbf1p。通过表达、纯化和在一个单一设备上平行描述额外27个酵母转录因子，阐明了k-MITOMI的整体特性。

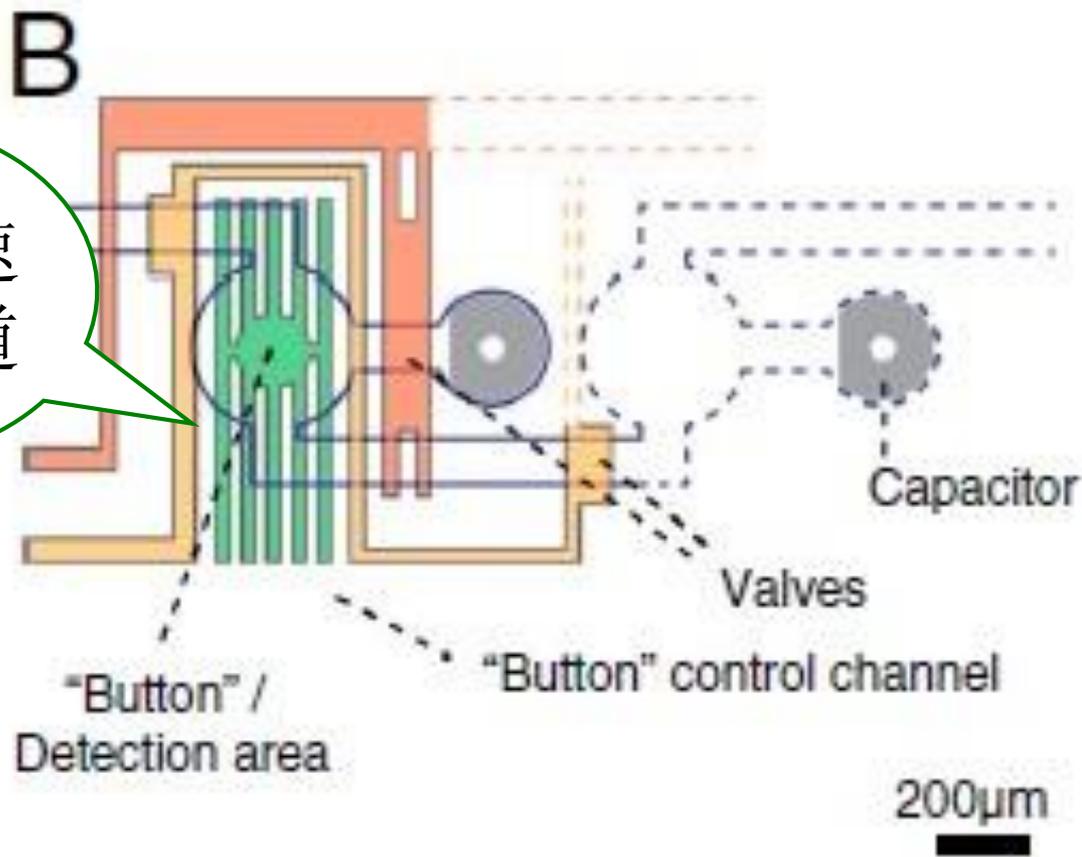


为什么要用TF-DNA互作来阐述？

对比抗原抗体几小时的半衰期，TF-DNA互作有相当高的结合速率和解离速率常数（在秒到分范围内的半衰期控制的），所以TF-DNA互作速率测量是向动力学测量挑战。

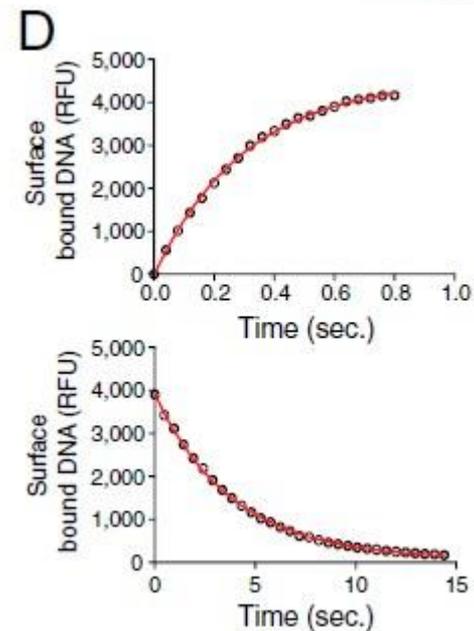
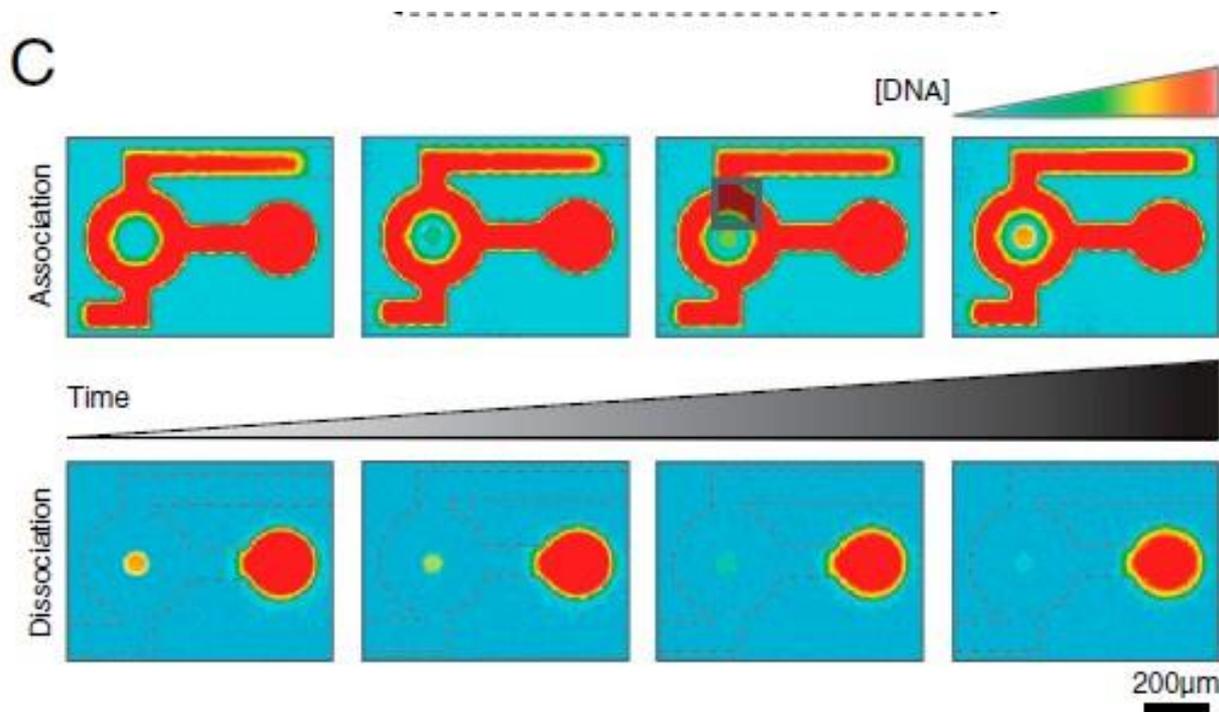


最大流速
控制渠道

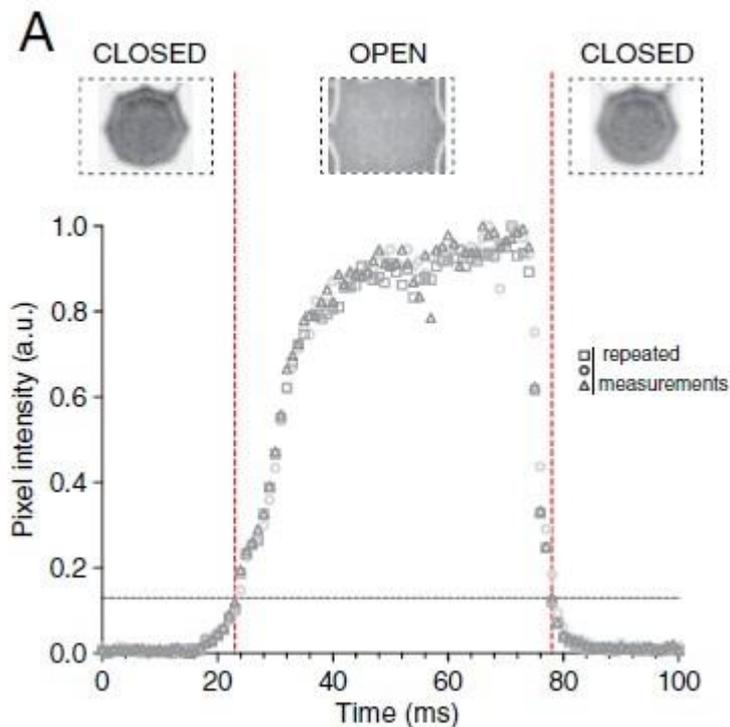


流体性电容器
可以缓冲按钮关闭
所产生的压力

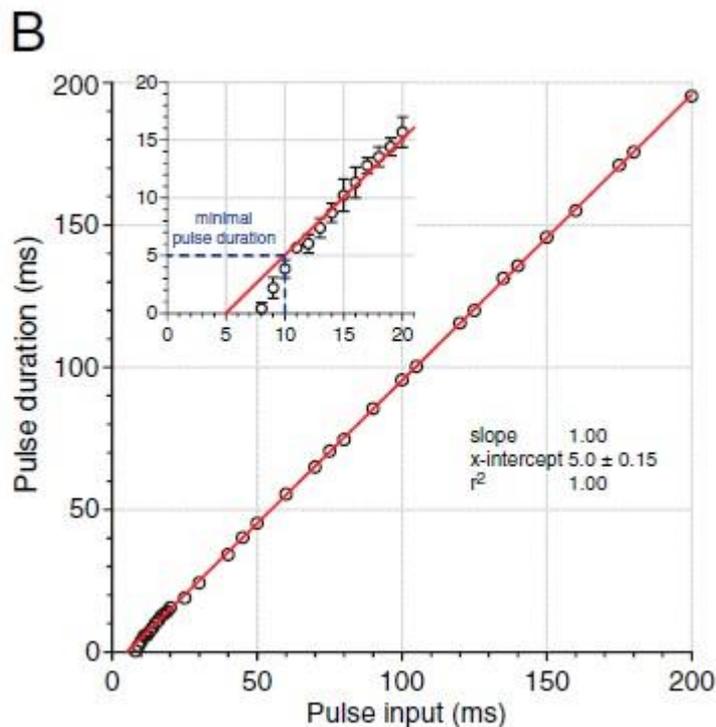
k-MITOMI平台使用了能快速重复的MITOMI按钮激活来测定结合到固定化的TF表面的荧光标记的寡核苷酸的结合和解离信号。



单位细胞平衡时，按钮短暂开启，这断时间内分子可能与表面束缚蛋白结合或解离。按钮的关闭终止每一个脉冲，结果是冻结所有**768**个反应。因此定义“**脉冲持续时间**”为按钮处于开启状态，结合和解离发生的时间。然后整个设备能够描述在**768**个单位细胞中结合到每个细胞表面固定蛋白的**DNA**分子数量。这个过程重复多次来得到结合曲线。同样的，分子结合上表面固定蛋白时，解离曲线能够通过相同的途径产生。



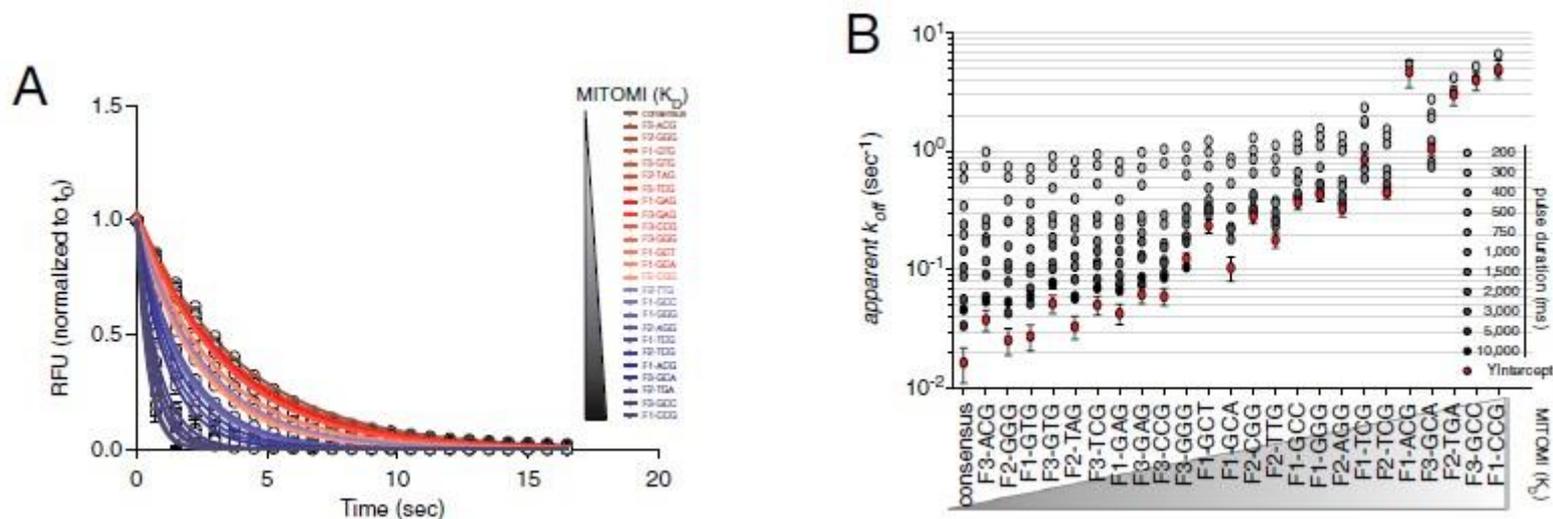
按钮的激活速度决定了测量的瞬时分辨力，这限制了能被准确测量的最大结合和解离速率。上图，研究者用短片记录了按钮升起和按下的次数在2000帧每秒情况下。按钮需要 10.8 ± 1.0 ms升起， 7.2 ± 0.4 ms按下。



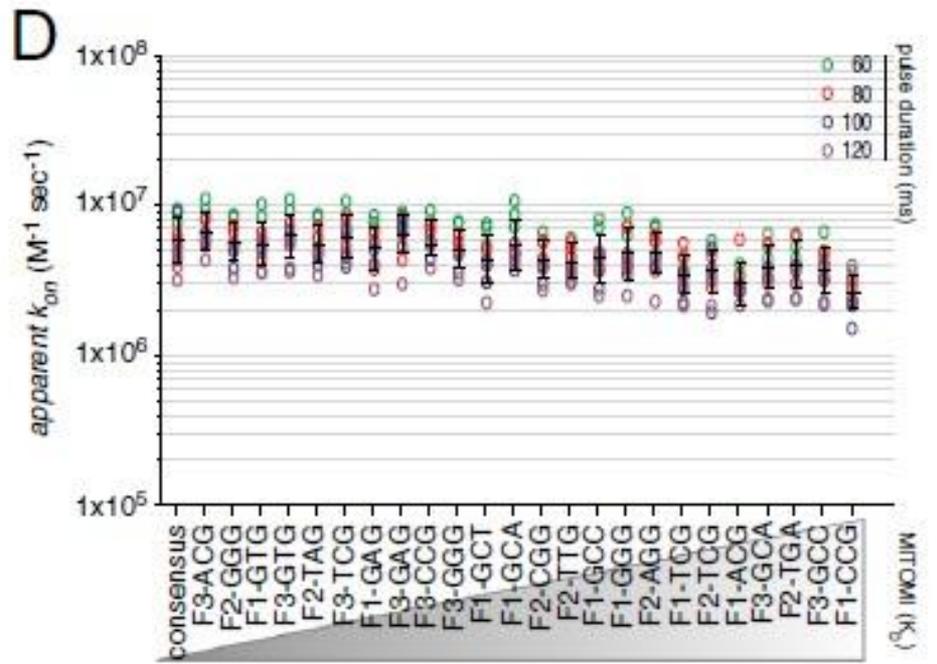
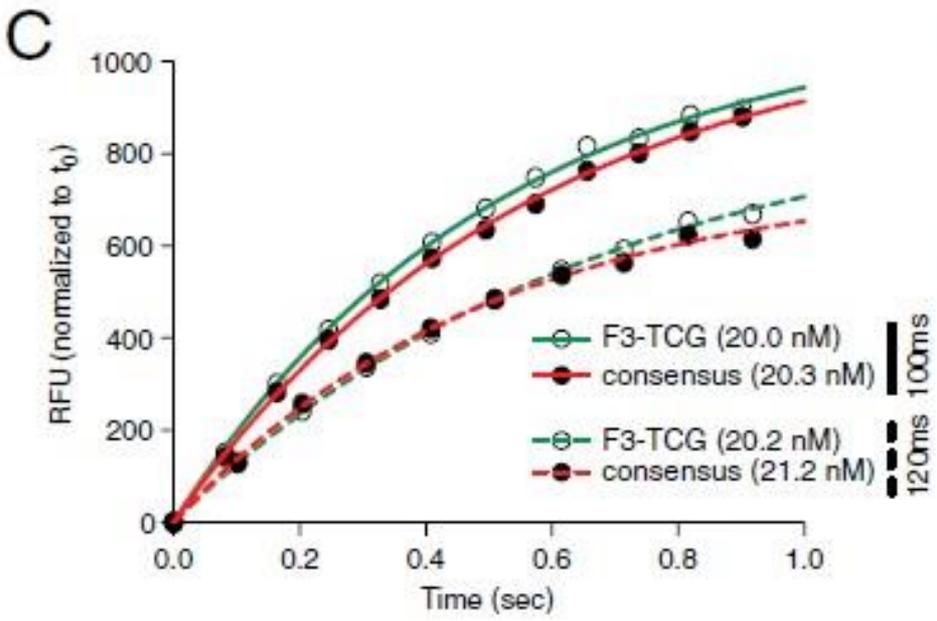
理论上的10ms允许我们去测量解离速率常数在 $10s^{-1}$ 阶层，因此可以假设在衰竭发生前能够获得最少10个数据点。

微流体平台的应用

转录因子与DNA互作的动力学测量——测量特性良好的老鼠C2H2锌指TF Zif268 的结合动力学。

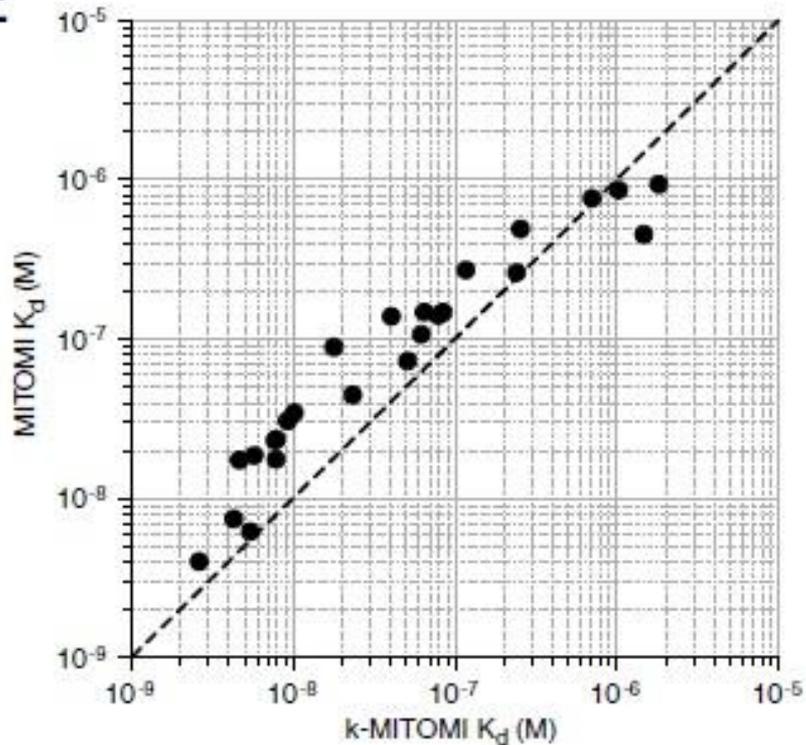


在11个不同的脉冲时间（200ms到10s）测量28个目标DNA的解离速率。



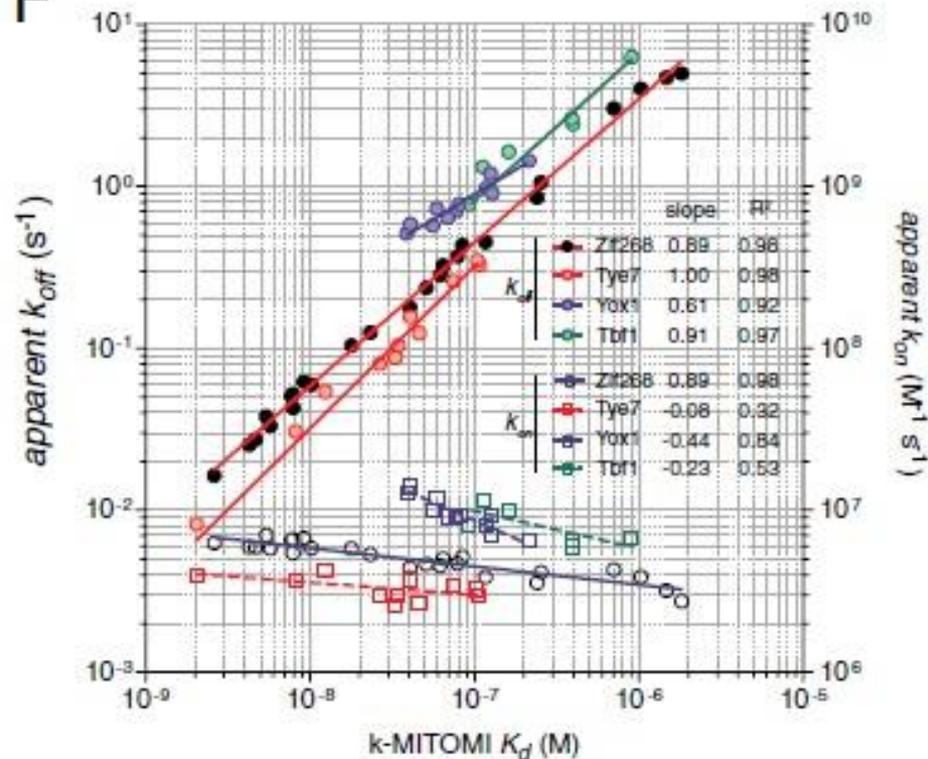
在3个不同的浓度下测定所有28个序列的结合速率。在四个不同的脉冲持续时间下，产生共336个结合曲线和4032个数据点。在测量结合速率常数时脉冲持续时间仅仅是一个可以忽略的影响因素。

E



上图显示，在k-MITOMI设备上测量的结合和解离速率常数与单独用MITOMI实时测量(SI)的值和之前发表的值很一致。

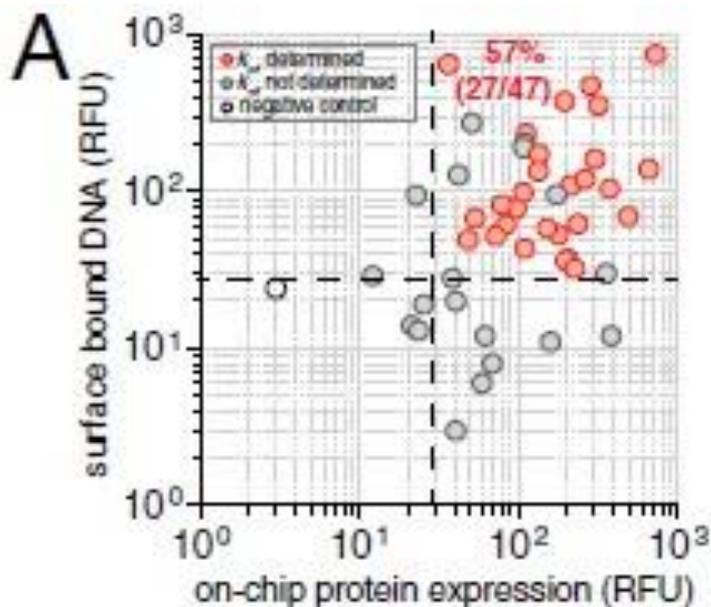
F



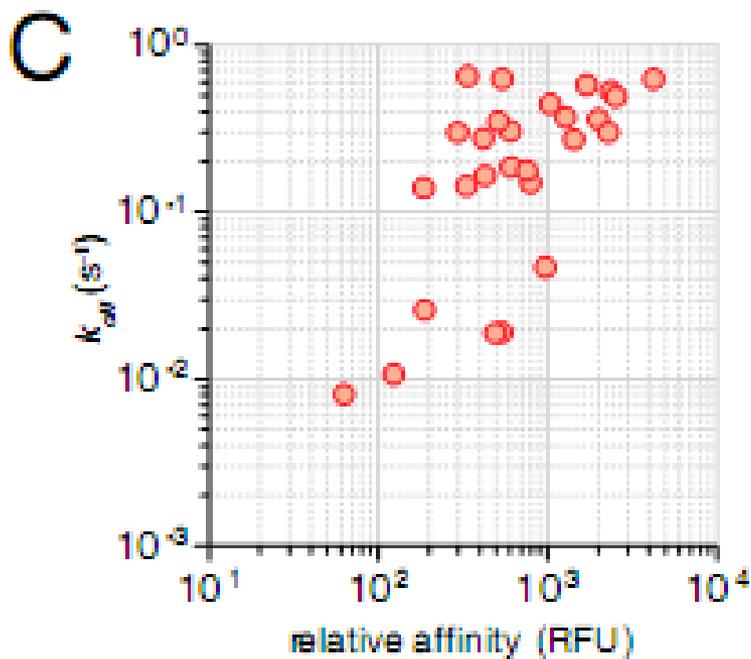
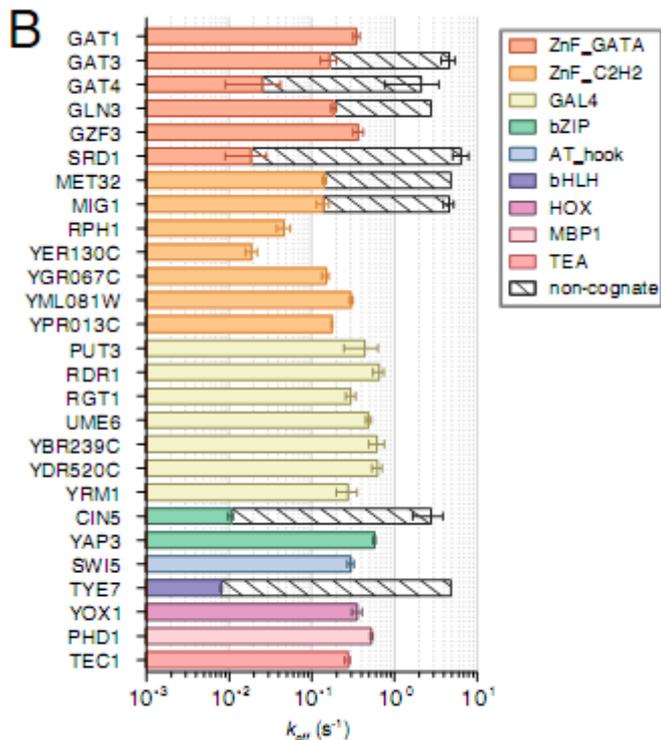
测量三个来自不同DBD家族的酵母TF: Tye7p, Yox1p 和 Tbf1的结合动力学来证明结论一般性。



结论：序列特异性亲和只是少量地决定于结合速率，解离速率应该是主要决定亲和特异性的。**TF-DNA**互作的动力学速率因此能相对轻松的在一个**k-MITOMI**设备上获得，仅需要解离速率大小。亲和常数和结合速率的测量普遍需要在不同配体浓度下多次测量，然而解离速率的测量与浓度无关。



每一k-MITOMI单位细胞能够线性表达模板和dsDNA分子并独立装载，随后在芯片上蛋白表达，纯化和特性描述。为了阐述k-MITOMI平台的整体特性，研究者在设备上装载了不同的DBD家族的47个编码TF的线性表达模板，得到1个相关同源和3个不同源序列，一共188个TF-DNA结合。33个TF（70%）在芯片上表达并结合DNA；我们能够测定这33个TF中的27个的解离速率（57%）。8个TF（17%）在芯片上表达但是仅少量结合DNA，6个TF（13%）不表达。



理解TF-DNA结合特异性的另外一个重要的参数是对不同源DNA的结合动力学。

B图：测量了8个非同源的TF-DNA互作，获取的解离速率常数在 $2.09s^{-1}$ 到 $6.49s^{-1}$ 之间。我们也观察剩余的非同源TF-DNA互作的DNA结合，但是这些互作的解离速率超出了在200ms脉冲时间瞬时分辨力。非特异性DNA的最小解离速率至少是 $2 s^{-1}$ 。

C图：解离速率常数在不同TF家族例如观察过的Zif268, Tye7p, Yox1p和Tbf1p 建立亲和性有重要作用。



总结

1. 大幅度地增加了平行测量动力学速率的产量。
2. 通过在单一平台上蛋白整体的表达纯化及特性描述简化和精简了整个实验步骤。
3. 通过描述大量的TF-DNA互作的结合动力学把k-MITOMI平台应用到相关的系统。
4. 在发展定量理解生物系统和设计生物系统的能力中有很重要的作用。



谢谢！