

# OCTET分子相互作用仪器培训

张财辉 13918182485  
caihui\_zhang@pall.com

This presentation is the Confidential work product of Pall Corporation and no portion of this presentation may be copied, published, performed, or redistributed without the express written authority of a Pall corporate officer.



简介

原理以及应用

定量测试

动力学基础

实验设计与结果分析

仪器维护

应用案例

- ForteBio公司成立于2001年，总部设在美国旧金山，2012年加入Pall公司
- 2015年进入DANAHER集团
- 全球范围装机量超过1500台
- 2009年进入中国市场，安装数量**约170台**
- 目前为**全球最大的分子互作技术厂商之一**



中科院生物物理所

中科院遗传发育所

中科院昆明植物所

中科院生物物理所

中科院上海生化细胞所

清华大学

北京大学

上海交通大学

武汉大学

华东理工大学

吉林大学

中国农业大学

南京农业大学

暨南大学

南方医科大学

中科院深圳先进院

广东工业大学

中检院 ( CFDA )

中科院武汉病毒所

军事医学科学院

中国医科大学

昆明医学生物学研究所

广东健康研究院

中国药科大学

南京中医药大学

中医研究院基础研究所

青海大学藏医学院

第三军医大学

浙江省医科院

复旦大学医学院

大连医科大学

上河北海市肺科医院

北京儿童医院

北京胸科医院

诺和诺德中国研发中心

北京神州细胞

百济神州

诺华中国研发中心

齐鲁制药

金赛药业

信达生物

药明康德

恒瑞医药

中信国建

睿智化学

金凯生物

百奥泰

香雪制药

菲鹏生物

中山康方

东阳光.....

2012至今，中国用户共计发表SCI文献约200篇

**上海交通大学医学院，瑞金医院上海血研所，王侃侃 教授 2016**

Blood, 2016 Jan 14;127(2):233-42. doi: 10.1182/blood-2015-03-626671. Epub 2015 Nov 6.

**Genome-wide studies identify a novel interplay between AML1 and AML1/ETO in t(8;21) acute myeloid leukemia.**

Li Y<sup>1</sup>, Wang H<sup>1</sup>, Wang X<sup>1</sup>, Jin W<sup>1</sup>, Tan Y<sup>1</sup>, Fang H<sup>2</sup>, Chen S<sup>3</sup>, Chen Z<sup>4</sup>, Wang K<sup>4</sup>.

**清华大学 李海涛教授 2014**

Nature, 2014 Apr 10;508(7495):263-8. doi: 10.1038/nature13045. Epub 2014 Mar 2.

**ZMYND11 links histone H3.3K36me3 to transcription elongation and tumour suppression.**

Wen H<sup>1</sup>, Li Y<sup>2</sup>, Xi Y<sup>3</sup>, Jiang S<sup>4</sup>, Stratton S<sup>4</sup>, Peng D<sup>4</sup>, Tanaka K<sup>4</sup>, Ren Y<sup>5</sup>, Xia Z<sup>6</sup>, Wu J<sup>7</sup>, Li B<sup>7</sup>, Barton MC<sup>8</sup>, Li W<sup>9</sup>, Li H<sup>5</sup>, Shi X<sup>8</sup>.

**清华大学 施一公教授 2014**

Cell Res, 2014 Apr;24(4):497-500. doi: 10.1038/cr.2014.18. Epub 2014 Feb 11.

**Crystal structure and biochemical analysis of the heptameric Lsm1-7 complex.**

Zhou L<sup>1</sup>, Zhou Y<sup>2</sup>, Hang J<sup>3</sup>, Wan R<sup>4</sup>, Lu G<sup>4</sup>, Yan C<sup>3</sup>, Shi Y<sup>1</sup>.

**中科院生化细胞所 李琳研究员 2013**

Nat Chem Biol, 2013 Sep;9(9):579-85. doi: 10.1038/nchembio.1309. Epub 2013 Jul 28.

**Small-molecule modulation of Wnt signaling via modulating the Axin-LRP5/6 interaction.**

Wang S<sup>1</sup>, Yin J, Chen D, Nie F, Song X, Fei C, Miao H, Jing C, Ma W, Wang L, Xie S, Li C, Zeng R, Pan W, Hao X, Li L.

**上海交通大学 陈国强教授 2012**

Nat Chem Biol, 2012 Apr 8;8(5):486-93. doi: 10.1038/nchembio.935.

**Adenanthin targets peroxiredoxin I and II to induce differentiation of leukemic cells.**

Liu CX<sup>1</sup>, Yin QQ, Zhou HC, Wu YL, Pu JX, Xia L, Liu W, Huang X, Jiang T, Wu MX, He LC, Zhao YX, Wang XL, Xiao WL, Sun HD, Chen GQ.

**中科院上海生化细胞所 周兆才研究员 2012**

Cell Res, 2012 Oct;22(10):1440-52. doi: 10.1038/cr.2012.126. Epub 2012 Sep 4.

**Structural insights into SUN-KASH complexes across the nuclear envelope.**

Wang W<sup>1</sup>, Shi Z, Jiao S, Chen C, Wang H, Liu G, Wang Q, Zhao Y, Greene MI, Zhou Z.

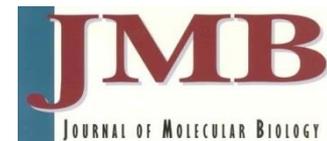
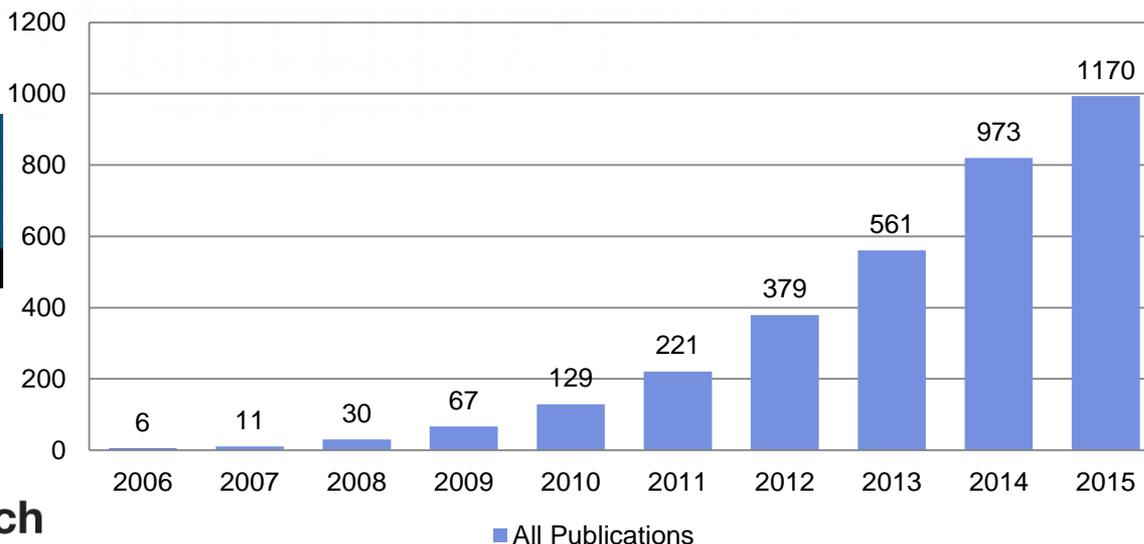


Science, Nature,  
Cell Research, Blood等

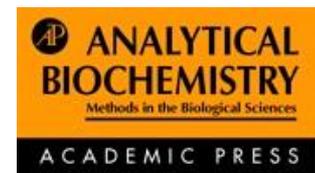
截止目前，应用ForteBio在国际期刊上发表的文献 **约1200篇**



## Publications Citing Pall ForteBio Platforms



PROTEIN|SCIENCE

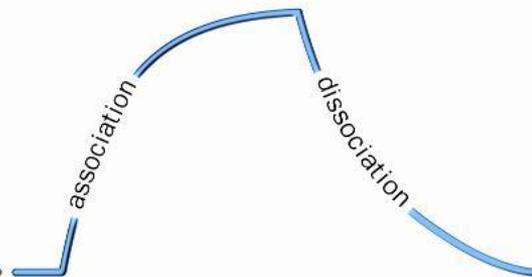


Cancer Research



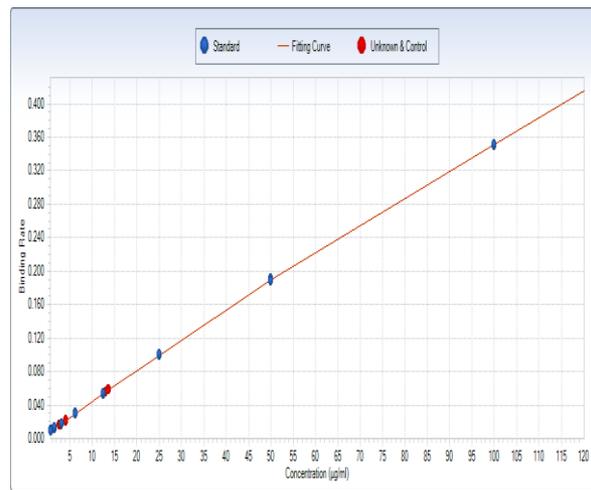
## 动力学测定

- 是否存在特异性结合 ( Yes / No )
- 结合亲和力 ( Affinity, KD )
- 结合、解离速率 ( Kon , Koff )
- 筛选与排序 ( Screening / Ranking )
- 竞争实验 ( Competition Assay )
- 抗原表位配对 ( Epitope binning )



## 浓度测定

- 抗体或重组蛋白定量
- 抗生素或毒素检测
- ELISA定量替代实验
- 免疫原性、残留蛋白A、HCP检测等



简介

原理以及应用

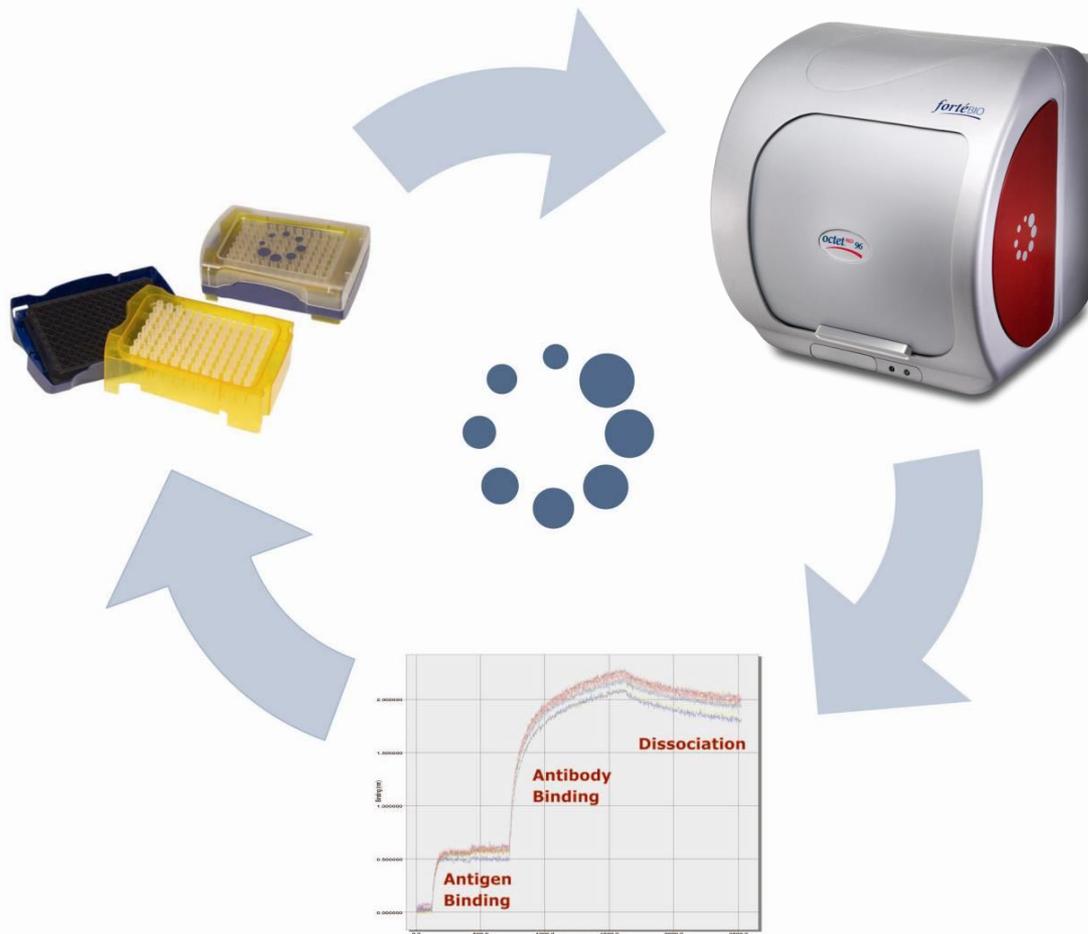
定量测试

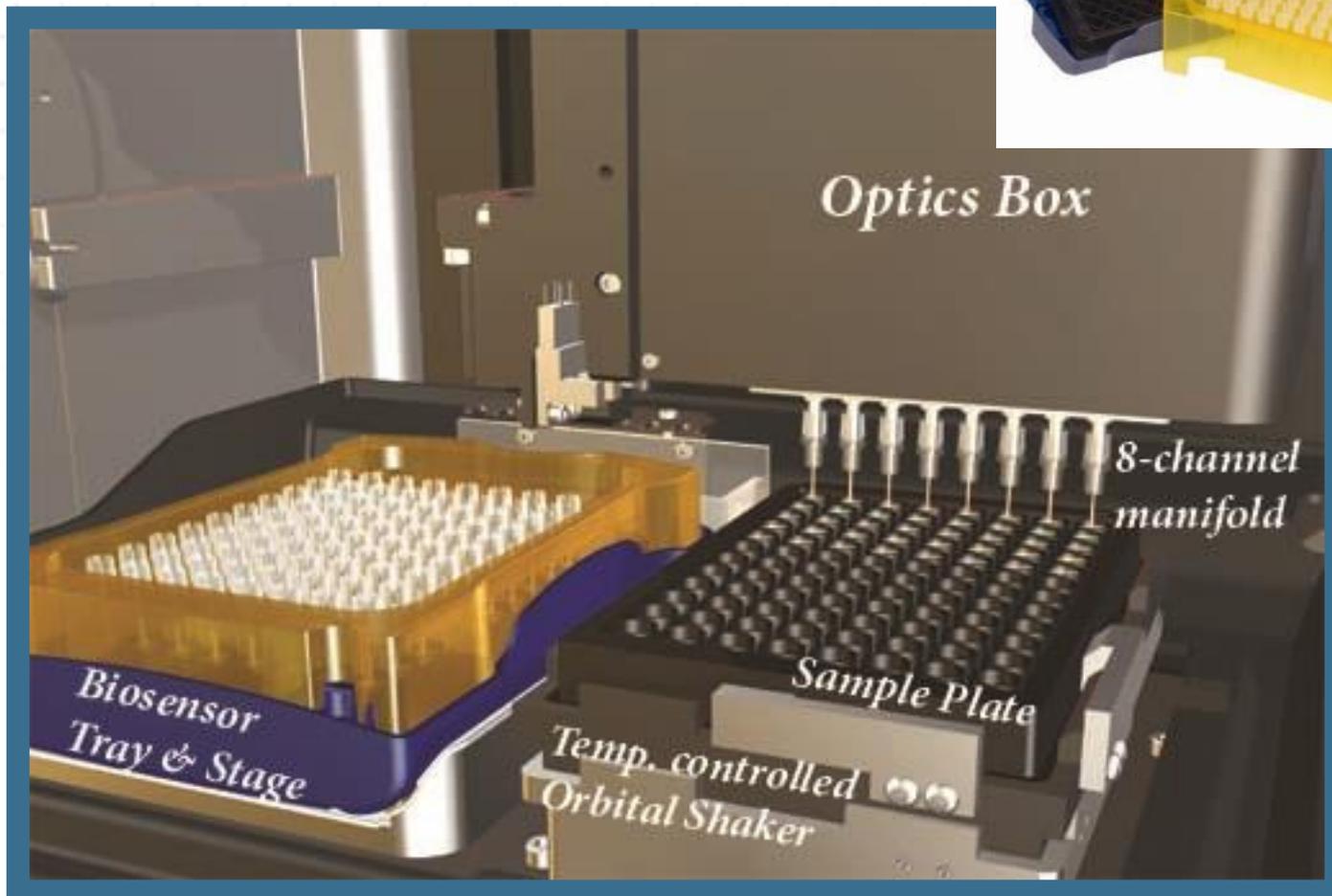
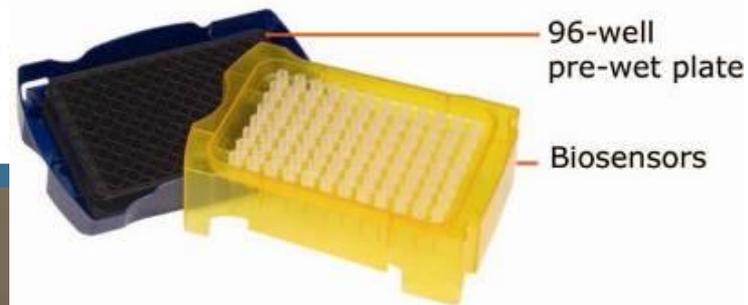
动力学基础

实验设计与分析

仪器维护

应用案例





**样品耗量少**

**无损检测**

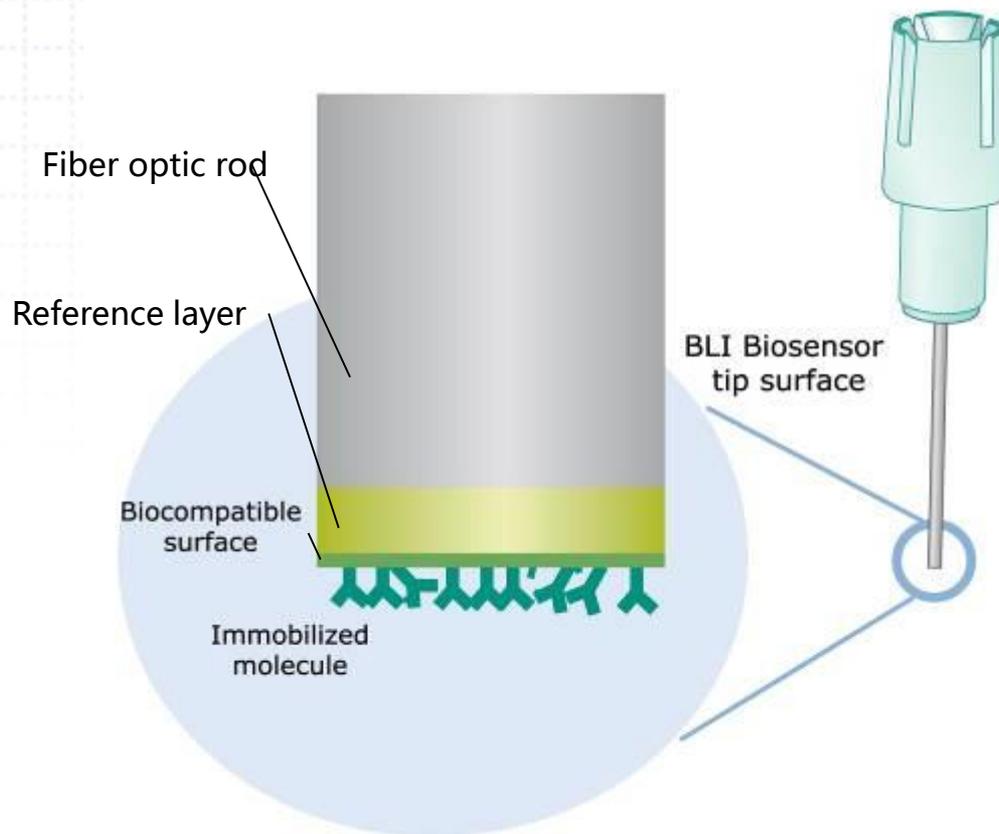
**样品不需要  
复杂预处理**

**实时数据**

**维护使用简单**

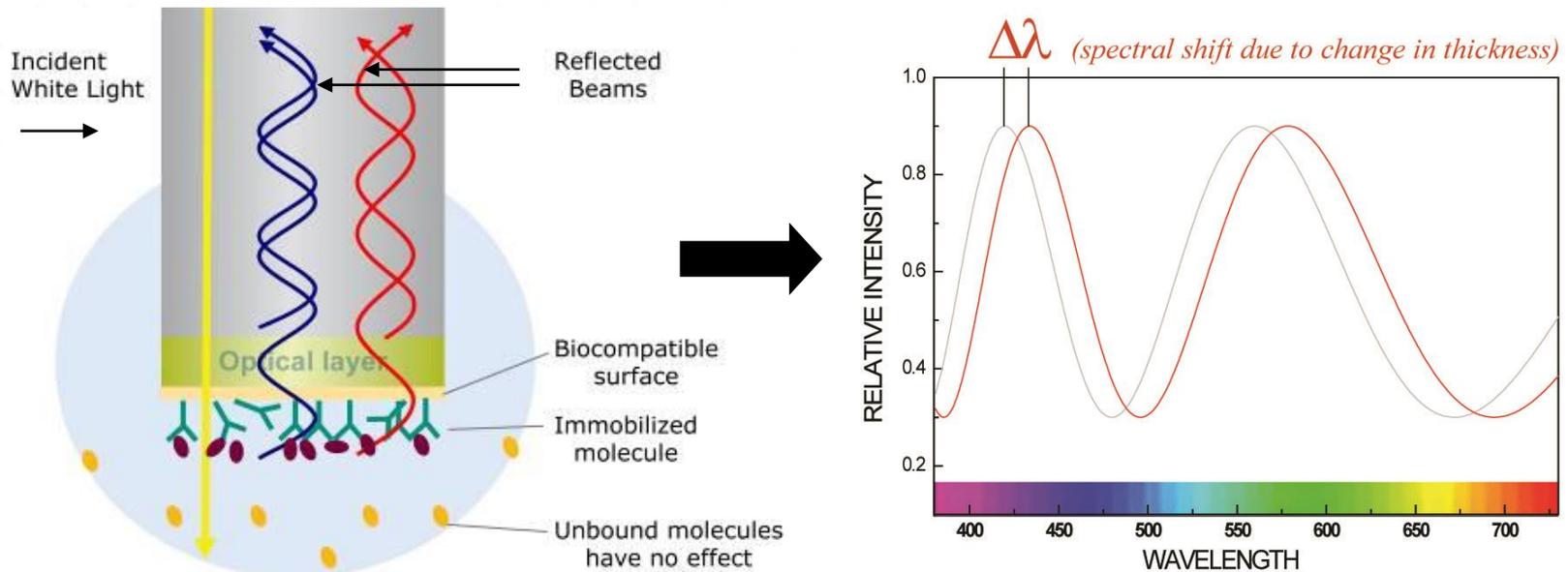
**检测速度快**

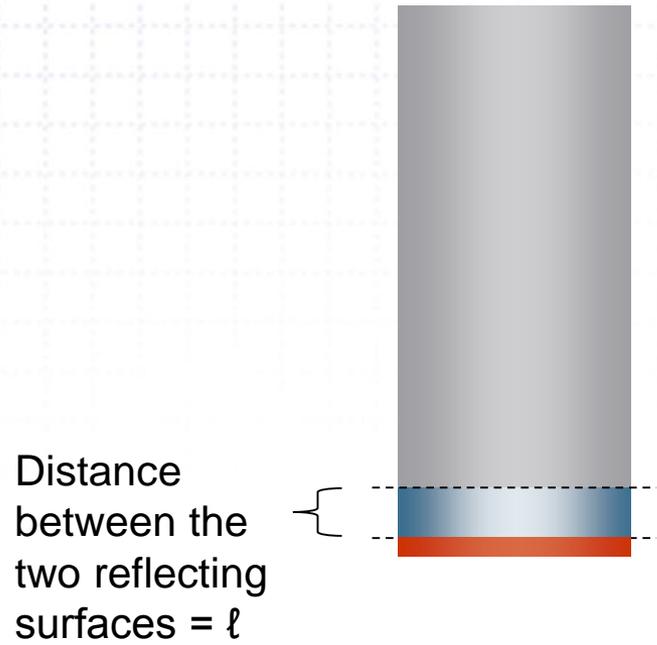
**耗材相对便宜，大多数可以再生**



固化方式与固化（检测）物质的不同，创造出了不同传感器。

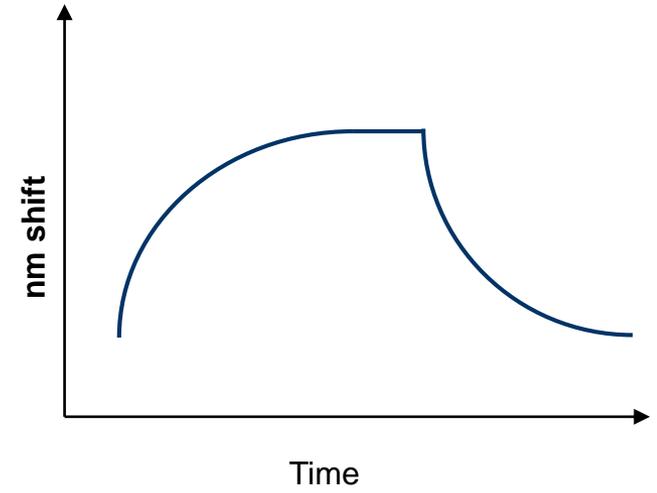
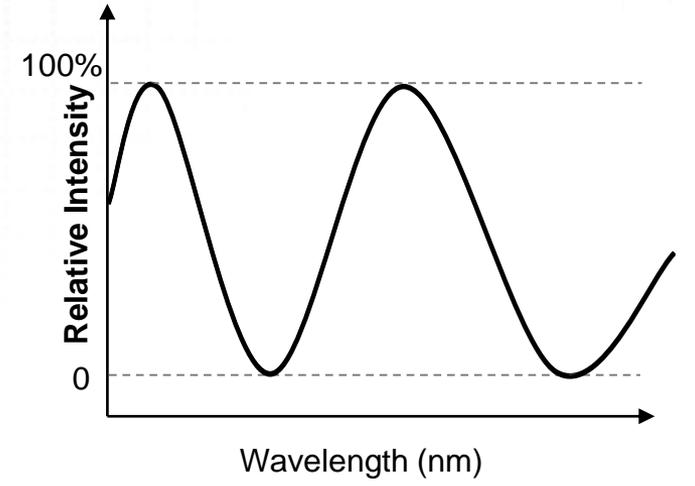
- 一束可见光穿过光纤，在传感器末端的光学膜层的两个界面会形成两束反射光谱，叠加形成一束干涉光谱
- 分子结合导致膜层厚度变化，并通过干涉光谱的位移值而体现





**Intensity**  $I_{\lambda} = f(\lambda, l)$

Function of density and optical thickness



## 通用型：

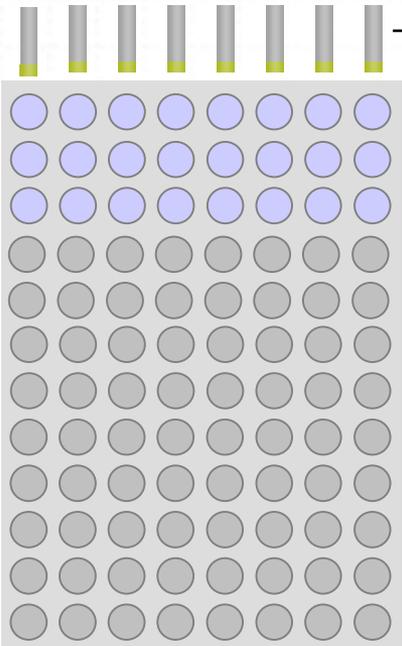
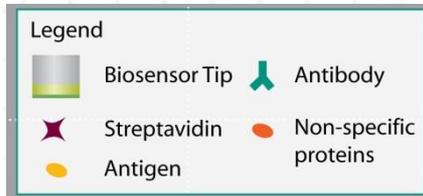
- Streptavidin (SA)
- Super Streptavidin (SSA)
- High Precision Streptavidin (SAX)
- Amine Reactive 2nd Generation (AR2G)
- Aminopropylsilane (APS)

## 捕获型：

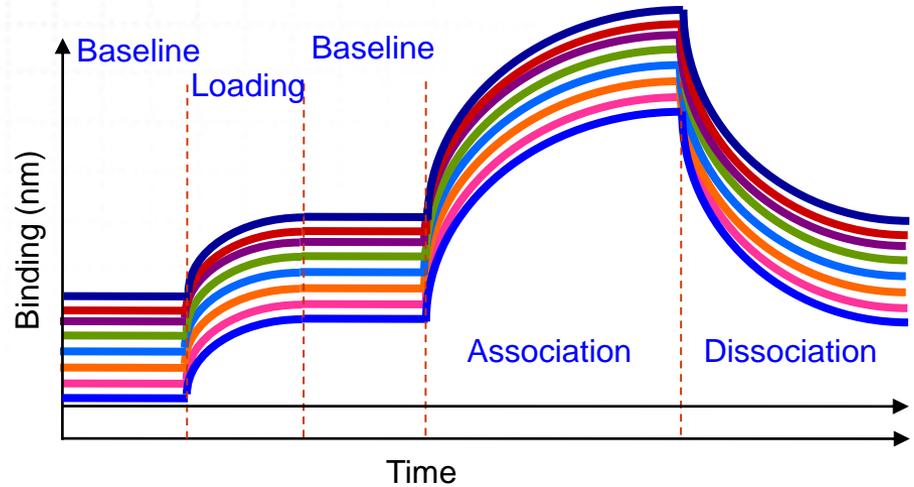
- Anti-Penta-HIS (HIS)
- Ni-NTA (HIS)
- Anti-GST

## 抗体类：

- Anti-Human IgG Fc (AHQ)
- Anti-Human IgG Fc (AHC)
- Anti-Murine IgG Fv (AMQ)
- Anti-Murine IgG Fc (AMC)
- Anti human IgG Fab ( FAB2G )
- Protein A
- Protein G
- Protein L



传感器  
缓冲液  
固化物  
分析物



- 所有数据是实时的
- 反应的时间，位置，转速，温度，步骤可以自行设定
- 获得KD,  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  等动力学参数

## 动力学分析：

- 蛋白——蛋白
- 蛋白——小分子
- 脂类——蛋白/抗体
- 糖类——蛋白
- 肽类——蛋白
- 病毒样颗粒——蛋白
- DNA适配子
- 蛋白聚合物

## 蛋白定量检测：

- 蛋白/抗体定量
- ELISA定量替代实验
- 粗提样品中蛋白定量
- 病毒滴度分析
- 抗生素、毒素定量
- 残留蛋白A检测
- HCP检测
- 免疫原性分析

## 筛选实验：

- 晶体研究中蛋白筛选
- DNA适配子筛选
- 小分子片段筛选
- 次级筛选及Hit验证
- 噬菌体展示技术
- 蛋白/多肽/小分子抑制试验
- 细胞克隆筛选
- 蛋白表达监测
- 生物反应器监测
- 抗原表位配对

## 实验开发：

- 培养基研发
- 生产工艺开发
- 抗体亚型分析
- 抗体配对

简介

原理以及应用

定量测试

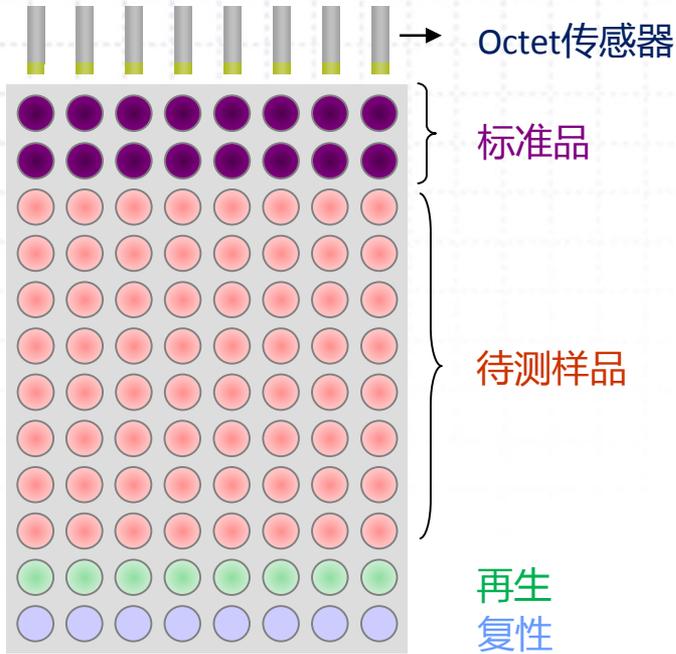
动力学基础

实验设计与分析

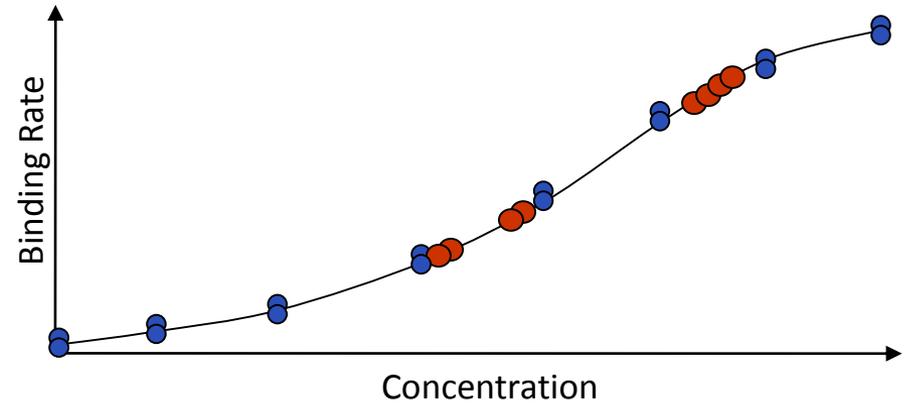
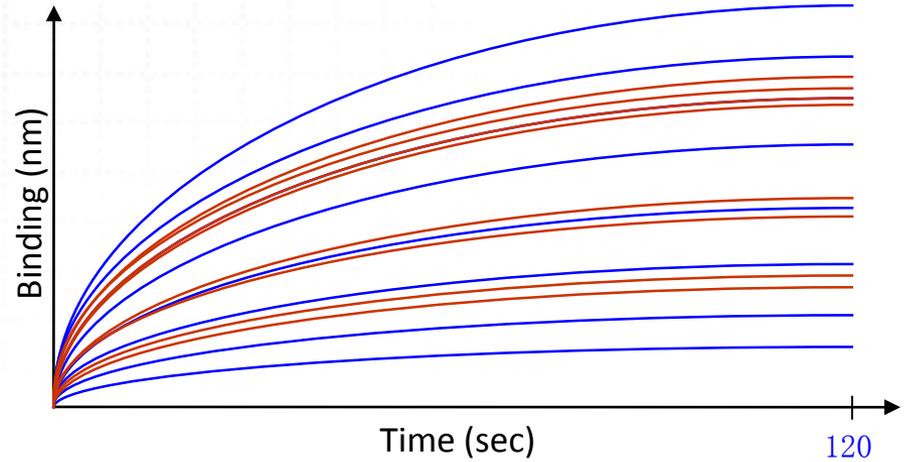
仪器维护

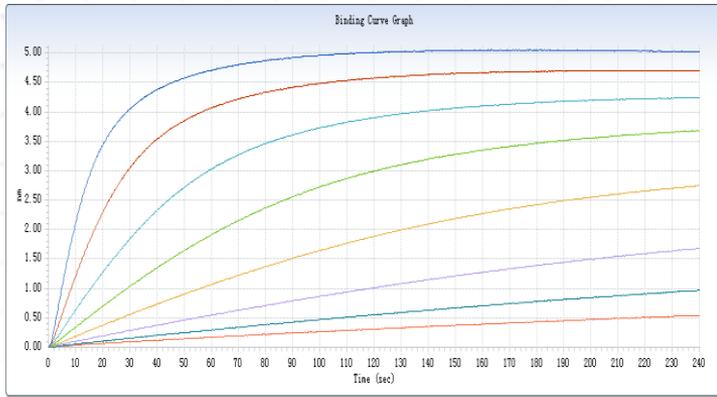
应用案例

# 抗体蛋白定量检测流程



- 样品结合速率与样品浓度成正比。
- 96个样品15-30分钟即可完成。
- 标准曲线可重复使用。

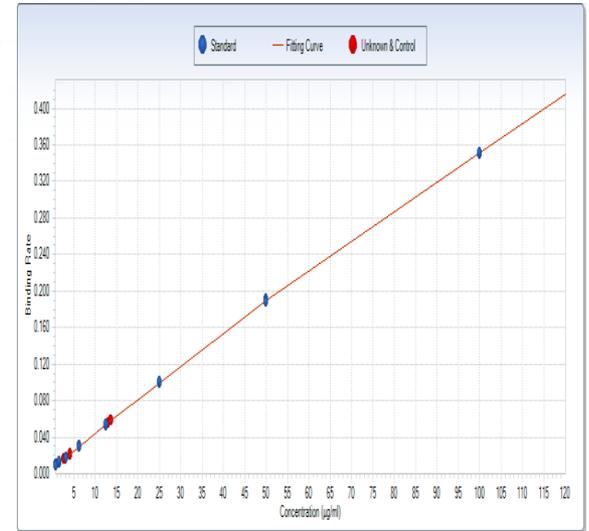




Binding Rate Equation:

- Initial Slope
- Initial Slope
- R equilibrium

Read Time: 240.00 secs



Standard Curve Equation

- Linear Point to Point
- Linear Point to Point
- Dose Response - 4PL (Default; Unw
- Dose Response - 4PL (Weighted Y<sup>2</sup>)
- Dose Response - 4PL (Weighted Y)
- Dose Response - 5PL (Default; Wei
- Dose Response - 5PL (Unweighted)
- Dose Response - 5PL (Weighted Y)

Load

Save

Use standards from loaded file

简介

原理以及应用

定量测试

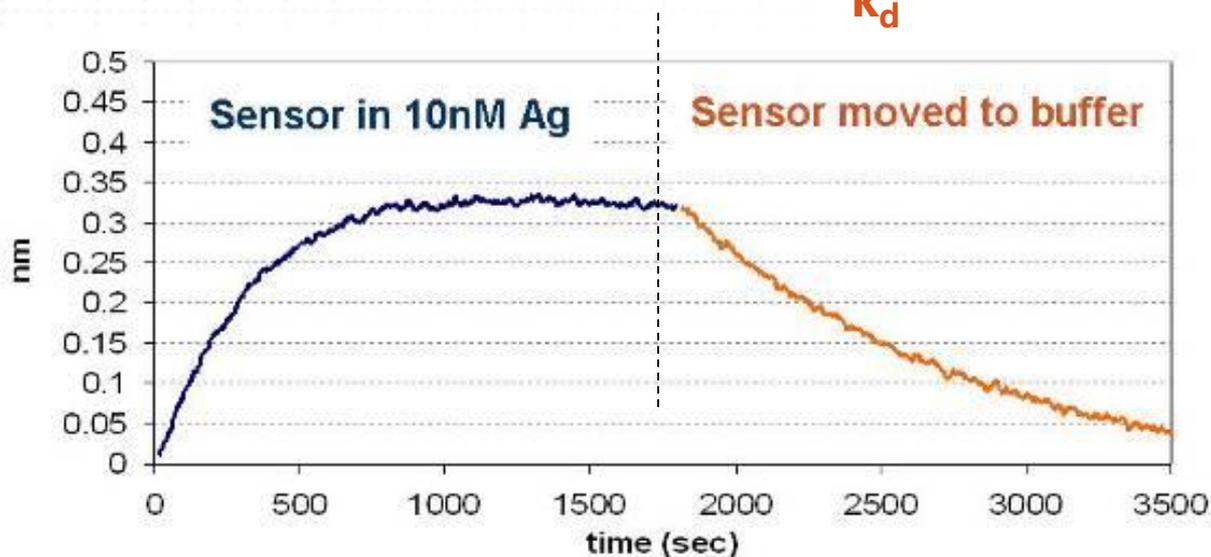
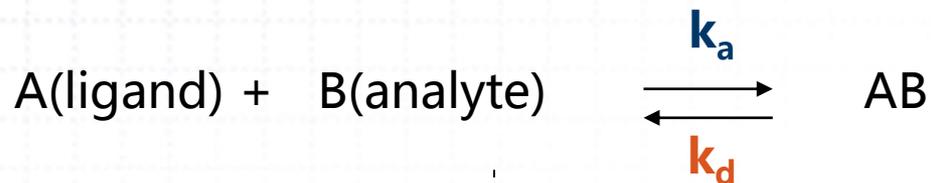
动力学基础

实验设计与分析

仪器维护

应用案例

## 1:1 binding模型:



$k_a$  = 结合常数, Kon

$k_d$  = 解离常数, Koff

$$K_D = \frac{k_d}{k_a}$$

## 动力学参数的定义与特性:

### – 结合常数, $k_a$ :

- 复合物 ( AB ) 的形成速率, 在1M的A或B下, 每秒产生的复合物数量
- 单位为  $M^{-1}s^{-1}$ , 一般从  $10^3$  到  $10^7 M^{-1}s^{-1}$

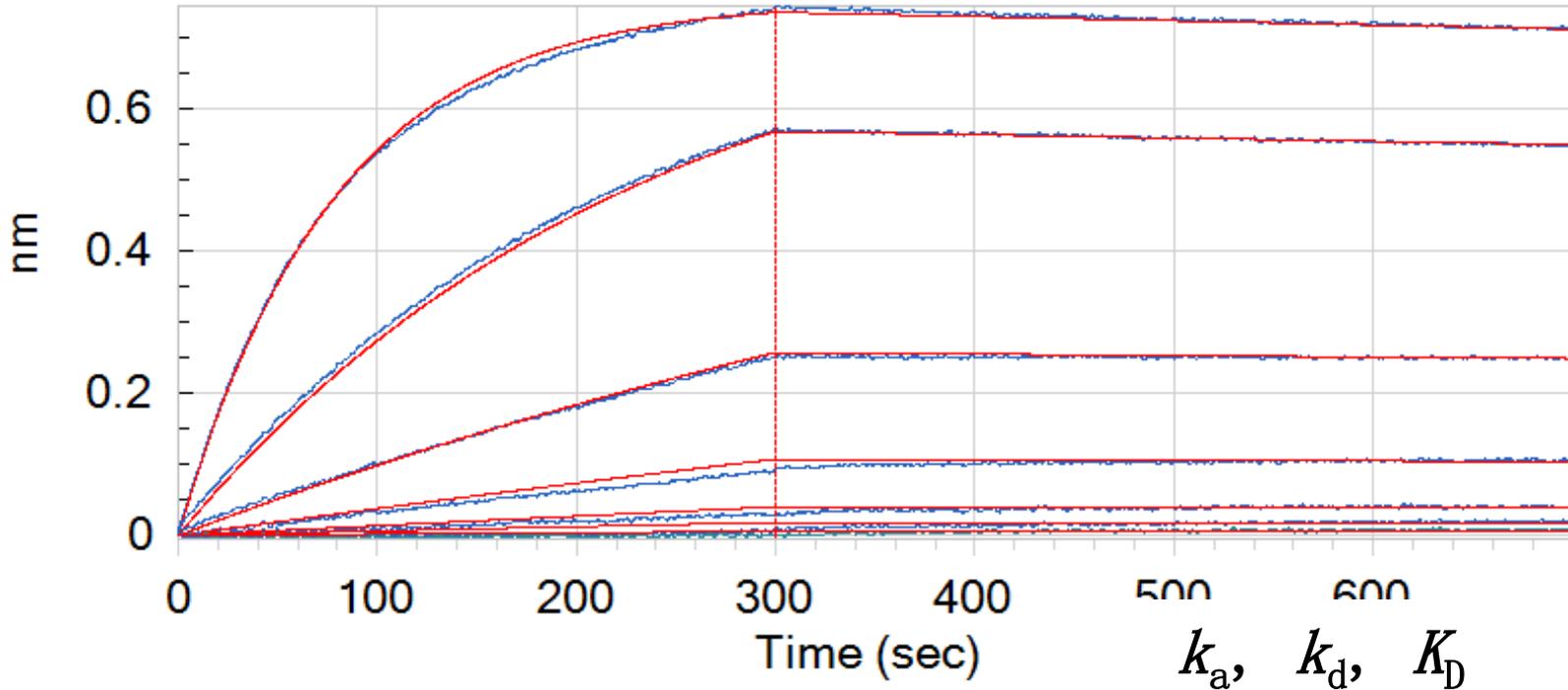
### – 解离常数, $k_d$ :

- 反应了复合物的稳定性, 每秒中解离的复合物的百分比
- $k_d = 0.01 s^{-1}$  = 每秒钟有1%的复合物解离
- $K_d$ 越大, 解离越快
- 单位为  $s^{-1}$ , 一般在  $10^{-2}$  至  $10^{-5} s^{-1}$ .

### – 亲和常数, $K_D$ :

- $k_d/k_a$ 的比值. 是平衡常数的倒数。当浓度为  $K_D$  时, 平衡信号  $R_{eq}$  为  $R_{max}$  的一半。
- 表示了相互作用亲和能力的大小。

Fitting View



1:1 binding模型:

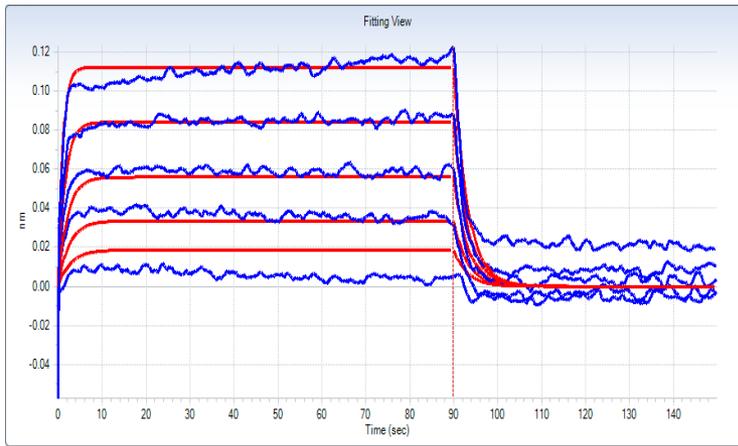


$k_a$  = 结合常数, Kon  
 $k_d$  = 解离常数, Koff

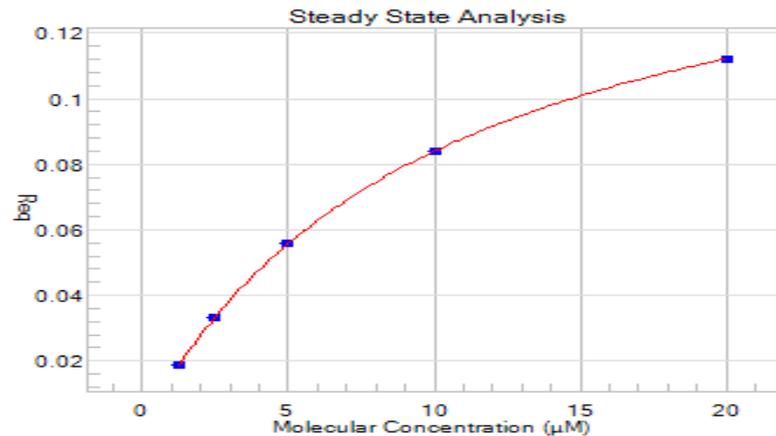
$$K_D = \frac{k_d}{k_a}$$

# 动力学参数的计算--steady state

- $R_{eq} = R_{max} [B] / (K_D + [B])$
- $R_{max}$ 为传感器表面所有位点被占据后所能达到的信号值。  
即浓度无限大，结合步骤无限长时的最终信号。
- Steady state计算 $K_D$ 值无法得到 $K_{on}$ 和 $K_{off}$ ，一般不适用于大多数相互作用。



$K_D = 1.01 \times 10^{-5}$



$K_D = 1.0 \times 10^{-5}$

简介

原理以及应用

定量测试

动力学基础

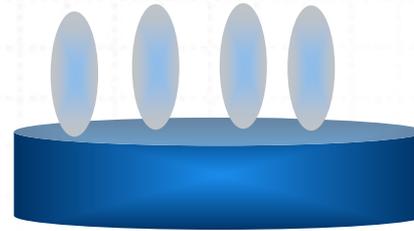
实验设计与分析

仪器维护

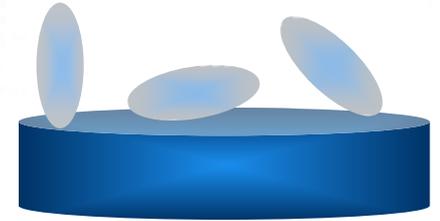
应用案例

# 配体的固化

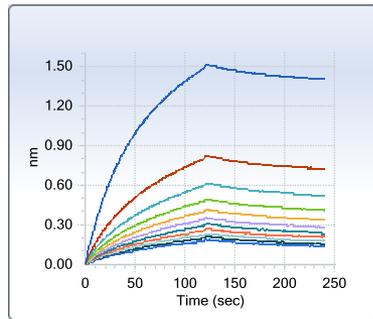
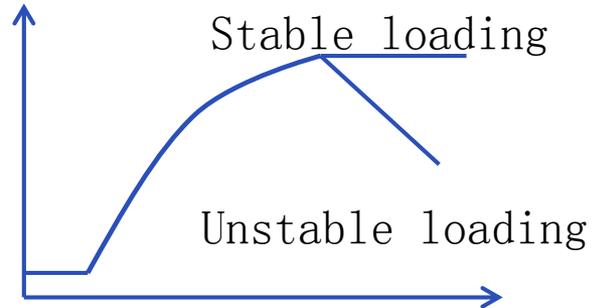
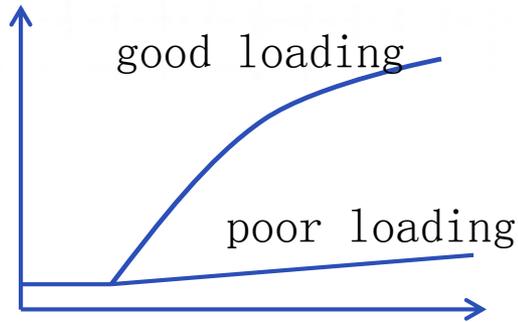
- 固化高度
- 固化的稳定性
- 配体的均一性
- 再生



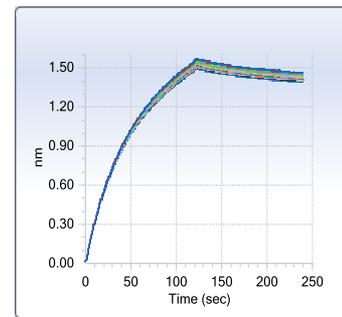
配体均一



配体不均一

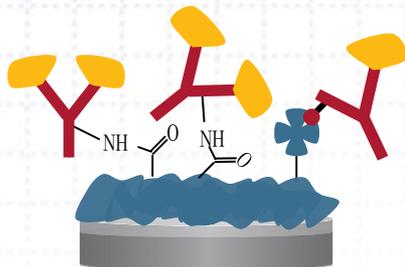


Decay regeneration



good regeneration

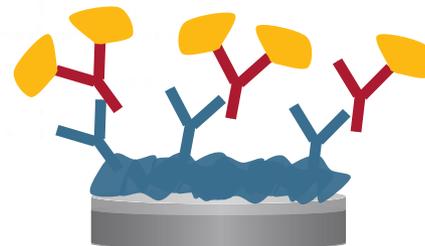
## 直接固化



### AR or Streptavidin 传感器

- 优点:
  - 非常稳定的固化
  - 所有蛋白都可以进行固化
- 缺点:
  - 需要纯化的蛋白
  - 无序的固化
  - 产生共价键，可能对蛋白活性有影响
  - 再生时需要考察固化蛋白的耐受性

## 抓取固化



### AMC, AHC传感器结合抗体Fc

- 优点:
  - 不会产生共价键，易于保持蛋白活性
  - 可以固化在粗样品的蛋白
  - 固化的有序性
  - 将固化蛋白与分析蛋白一并再生，回到传感器原始状态
- 缺点:
  - 固化的密度少于前者
  - 固化稳定性弱于前者

- **DNA/RNA的固化**：合成时带上生物素，然后用SA传感器固化。
- **多糖**：可以利用氨基或者羧基，偶联在AR2G传感器上，也可以通过生物素化进行固化。
- **多肽**：合成时带上生物素，然后用SA传感器固化。
- **酸性蛋白**：APS传感器疏水固化或生物素化后固化。
- **化合物**：固化非常困难，一般合成时带上生物素。
- **纳米材料**：APS传感器疏水固化。
- **病毒**：APS传感器疏水固化，或者生物素化用SA传感器固化。
- **脂质体**：APS传感器疏水固化。
- **其他多聚物**：利用氨基，羧基或者醛基固化在AR2G或者APS传感器上。

- Baseline,association,dissociation的缓冲液（基质）必须一致（非常重要）。
- 必要的时候在association的缓冲液中添加BSA和去污剂，盐等以去除非NSB。  
（0.02% tween20,0.1% BSA,PBS pH7.4），但是固化物质是脂质体时，不得加入去污剂。
- 一般需要对非特异性进行考察，即观察没有ligand的传感器直接与analyte直接作用的信号是否可以忽略。
- 结合步骤一定要加入reference well（0浓度，即只有缓冲液）。

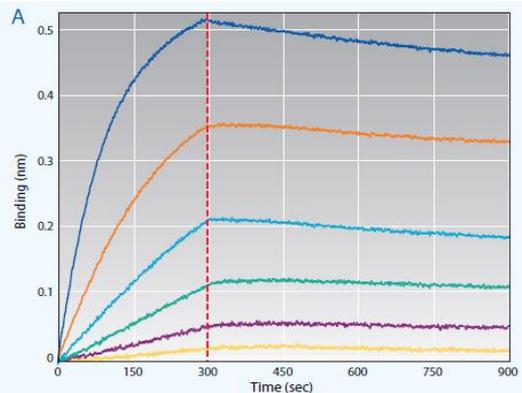


- 最高浓度有弯曲状出现，选择的浓度需要有很好的分散性 (信号从低到高均匀分布)。

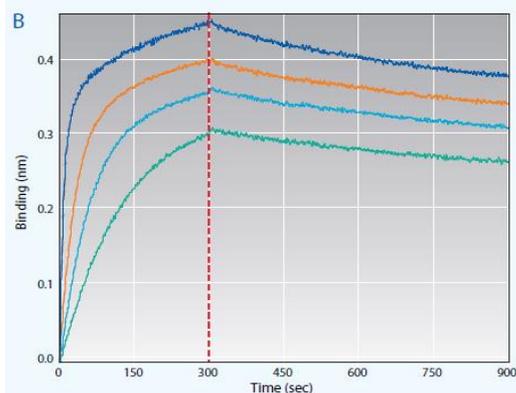
参考浓度范围：

- 最高浓度10 x *KD*，7 个 2 倍浓度梯度
- 在不知道KD值的情况下，建议在预实验中，测试多个范围比较宽的浓度，比如1000 nM，100 nM，10 nM，1 nM。然后根据结合有无信号以及起始斜率再进一步收窄浓度。
- Use global fitting

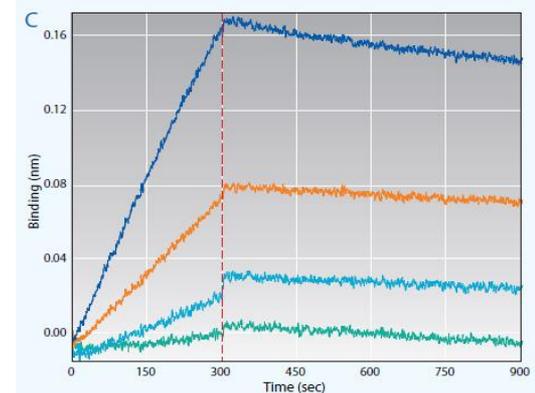
√

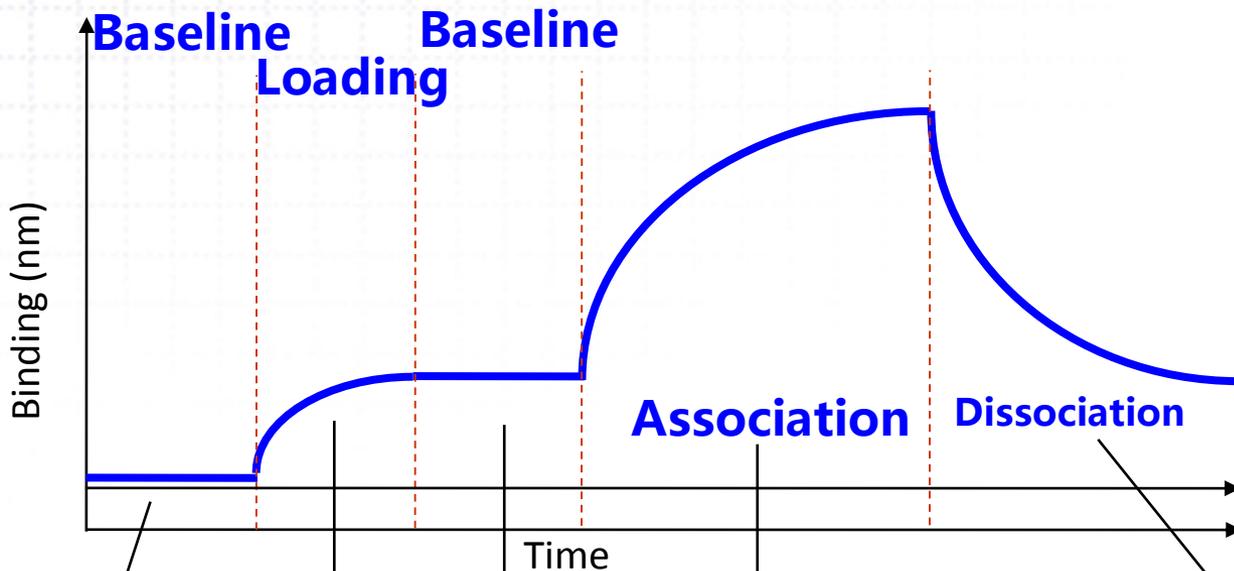


X



X





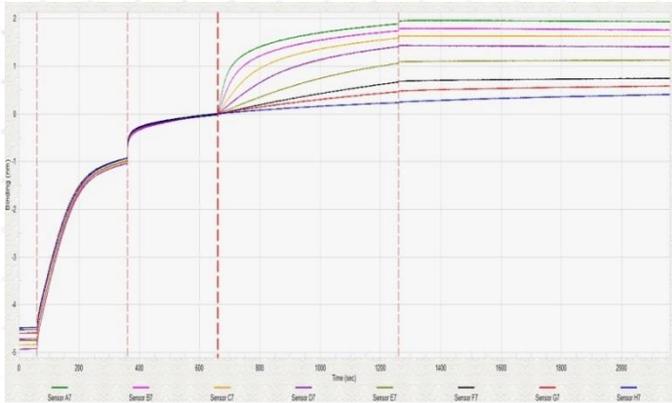
达到饱和，~10ug/ml

基线越平越好，反应3-5分钟

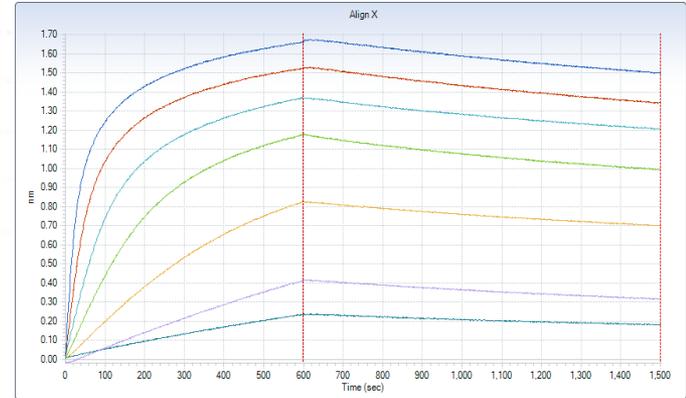
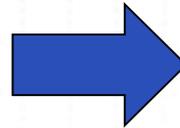
明显的解离，最高浓度解离10%，5-30分钟。

使用与loading相同的缓冲液，反应1-3分钟。

最高浓度有弯曲状出现，5-10分钟。



原始数据



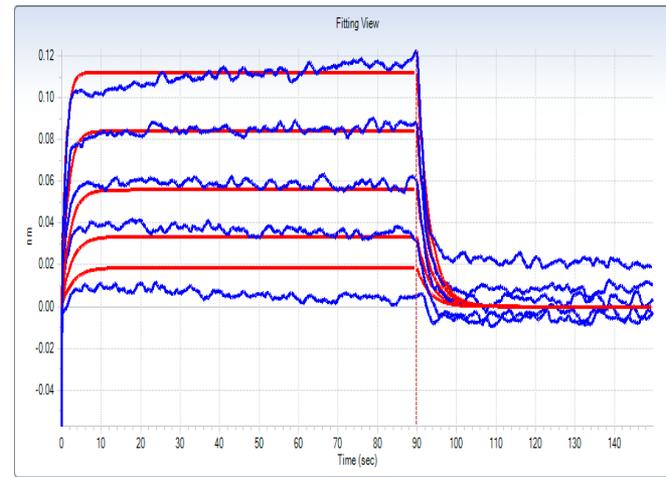
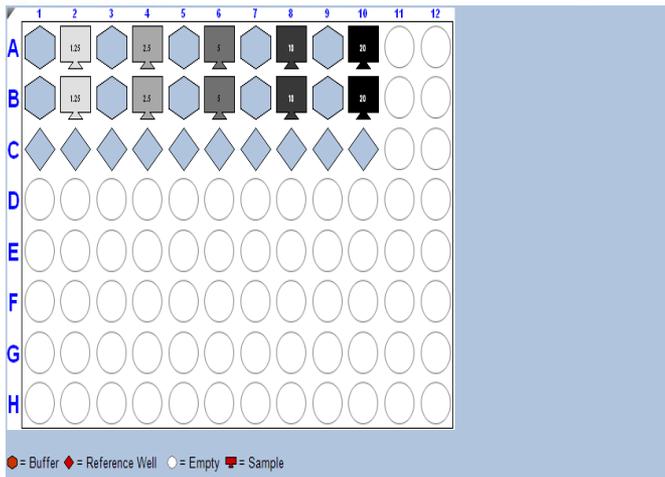
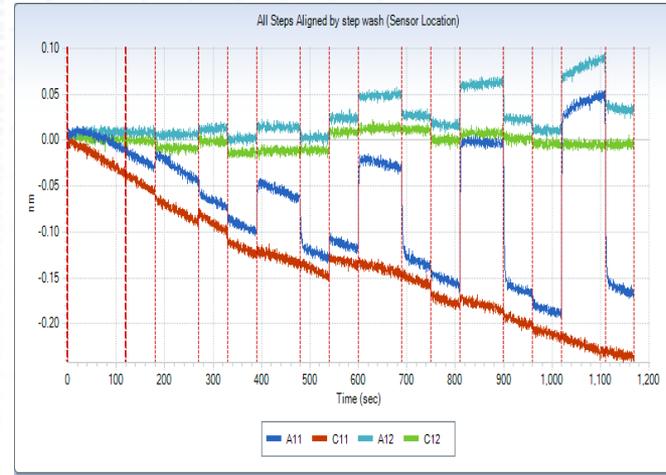
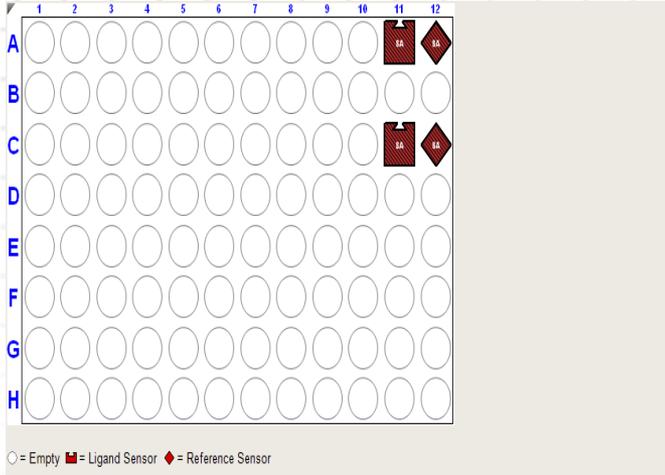
处理后数据

1. association/dissociation步骤的提取；
2. 起始信号的归零；
3. reference well的扣除；
4. reference sensor的扣除；
5. “gap” 的调整。

**Reference well** : association 步骤为零浓度 ( buffer ) , 但是与其他传感器一样loading。

**Reference sensor** : association 步骤为测试浓度 ( buffer ) , 无loading。

# 小分子实验 ( 双扣除 )



Reference well和Reference sensor

(A11-C11)-(A12-C12)

## Local fitting&global fitting

### Local fitting

| Conc. (nM) | KD (M)    | kon(1/Ms) | kdis(1/s) | Color |
|------------|-----------|-----------|-----------|-------|
| 50         | 1.032E-10 | 2.775E05  | 2.865E-05 |       |
| 25         | 1.340E-10 | 2.773E05  | 3.716E-05 |       |
| 12.5       | 1.881E-10 | 2.579E05  | 4.851E-05 |       |
| 6.25       | 2.531E-10 | 1.214E05  | 3.072E-05 |       |
| 3.13       | <1.0E-12  | 1.194E05  | <1.0E-07  |       |
| 1.56       | <1.0E-12  | 6.383E05  | <1.0E-07  |       |
| 0.7813     | <1.0E-12  | 1.817E06  | <1.0E-07  |       |

### global fitting

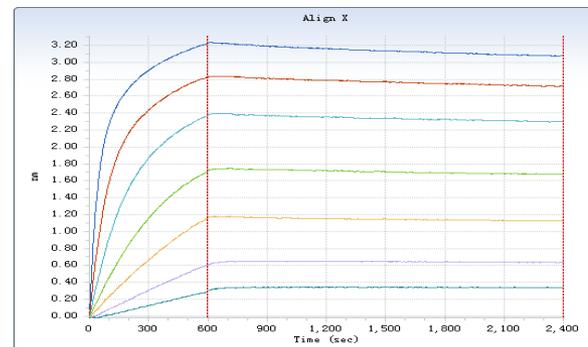
| Index | Include | Conc. (nM) | KD (M)    | kon(1/Ms) | kdis(1/s) | Color |
|-------|---------|------------|-----------|-----------|-----------|-------|
| 0     | x       | 50         | 1.127E-10 | 2.724E05  | 3.070E-05 |       |
| 1     | x       | 25         | 1.127E-10 | 2.724E05  | 3.070E-05 |       |
| 2     | x       | 12.5       | 1.127E-10 | 2.724E05  | 3.070E-05 |       |
| 3     | x       | 6.25       | 1.127E-10 | 2.724E05  | 3.070E-05 |       |
| 4     | x       | 3.13       | 1.127E-10 | 2.724E05  | 3.070E-05 |       |
| 5     | x       | 1.56       | 1.127E-10 | 2.724E05  | 3.070E-05 |       |
| 6     | x       | 0.7813     | 1.127E-10 | 2.724E05  | 3.070E-05 |       |

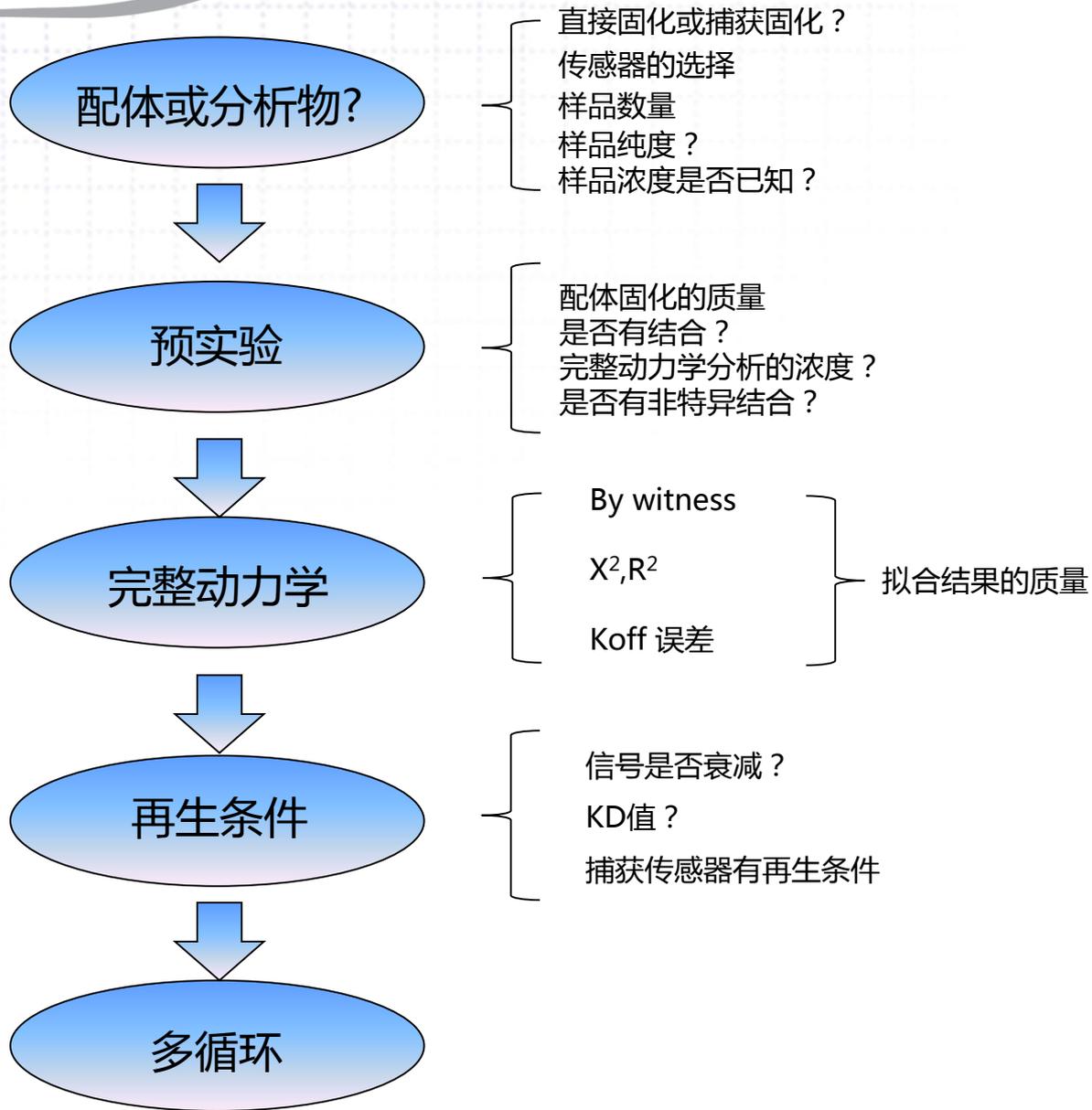
Local fitting:每个曲线单独拟合得到一组动力学常数。

Global fitting:所有浓度的曲线拟合得到一组动力学常数。

- 信号的大小呈浓度依赖关系 ( dose response )
- 信号的分散度(separation)比较好
- 目测拟合曲线与实测曲线较为一致
- $R^2$  和  $X^2$  值的考察
  - »  $R^2$  表示拟合曲线与实测曲线的相似度，越接近与1越好.  $X^2$  表示了拟合曲线与实测曲线的误差，越小越好。
- 计算的误差值，应该比计算值小一个数量级（比如Kon值为  $10^5$ ，那么Kon error应该小于  $10^4$ ）。

| Conc. (µM) | Response | KD (M)   | kon(1/Ms) | kon Error | kdis(1/s) | kdis Error | Rmax  | Rmax Error | kobs(1/s) | Req    | Req/Rmax(%) | Full X <sup>2</sup> | Full R <sup>2</sup> |
|------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|------------|-------|------------|-----------|--------|-------------|---------------------|---------------------|
| 1.25       | 0.0037   | 1.01E-05 | 3.17E+04  | 1.87E+03  | 3.20E-01  | 1.64E-02   | 0.169 | 0.0031     | 3.60E-01  | 0.0186 | 11          | 0.051747            | 0.953723            |
| 2.5        | 0.0348   | 1.01E-05 | 3.17E+04  | 1.87E+03  | 3.20E-01  | 1.64E-02   | 0.169 | 0.0031     | 4.00E-01  | 0.0335 | 19.8        | 0.051747            | 0.953723            |
| 5          | 0.0587   | 1.01E-05 | 3.17E+04  | 1.87E+03  | 3.20E-01  | 1.64E-02   | 0.169 | 0.0031     | 4.79E-01  | 0.0559 | 33.1        | 0.051747            | 0.953723            |
| 10         | 0.0864   | 1.01E-05 | 3.17E+04  | 1.87E+03  | 3.20E-01  | 1.64E-02   | 0.169 | 0.0031     | 6.37E-01  | 0.084  | 49.7        | 0.051747            | 0.953723            |
| 20         | 0.1159   | 1.01E-05 | 3.17E+04  | 1.87E+03  | 3.20E-01  | 1.64E-02   | 0.169 | 0.0031     | 9.53E-01  | 0.1122 | 66.4        | 0.051747            | 0.953723            |





简介

原理以及应用

定量测试

动力学基础

实验设计与分析

仪器维护

应用案例



**维护方法：**使用Kimwipe蘸  
30-70%乙醇或异丙醇擦  
洗。

简介

原理以及应用

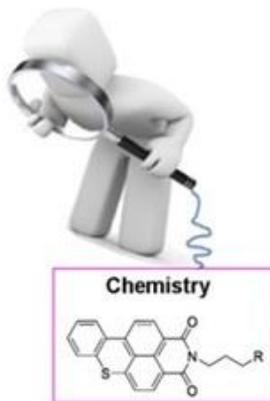
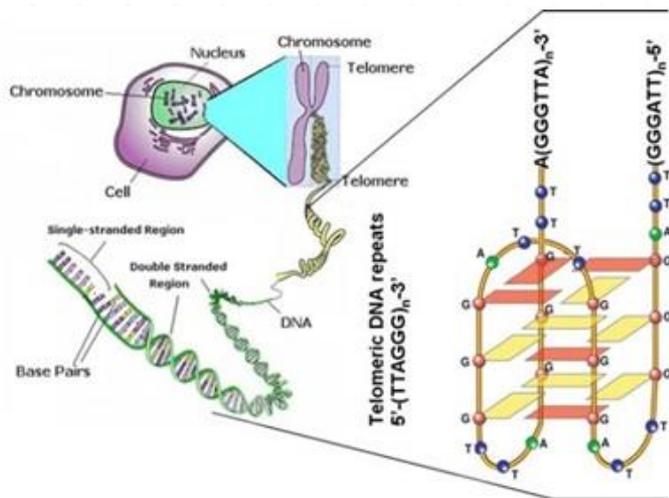
定量测试

动力学基础

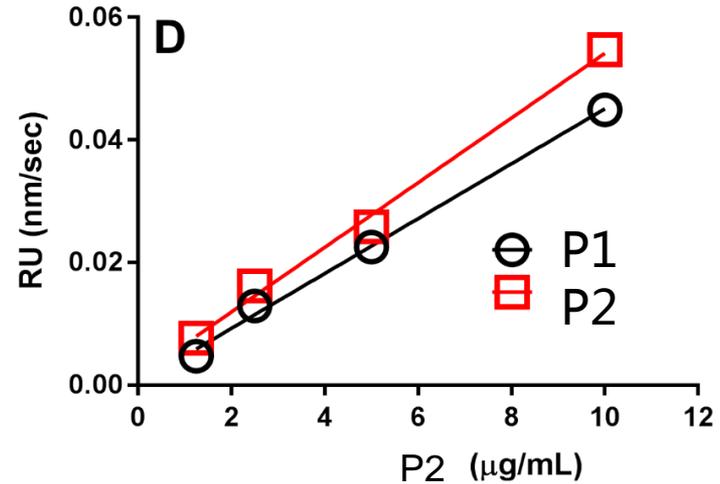
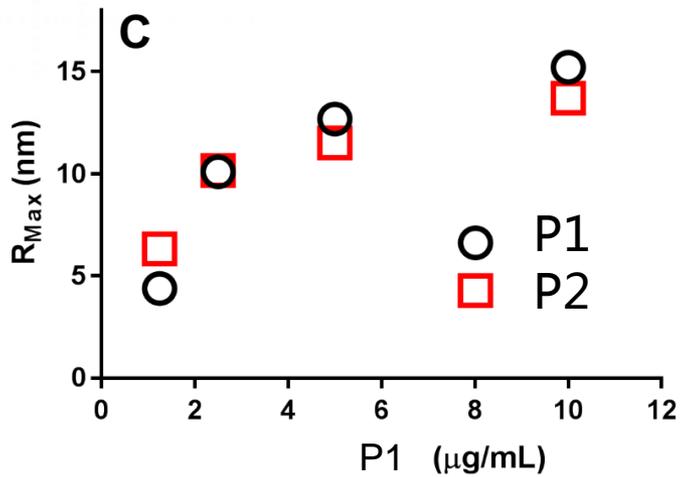
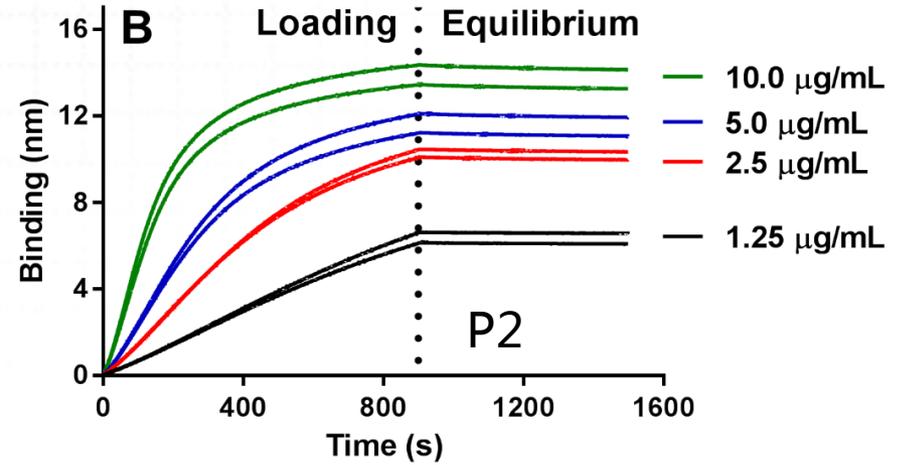
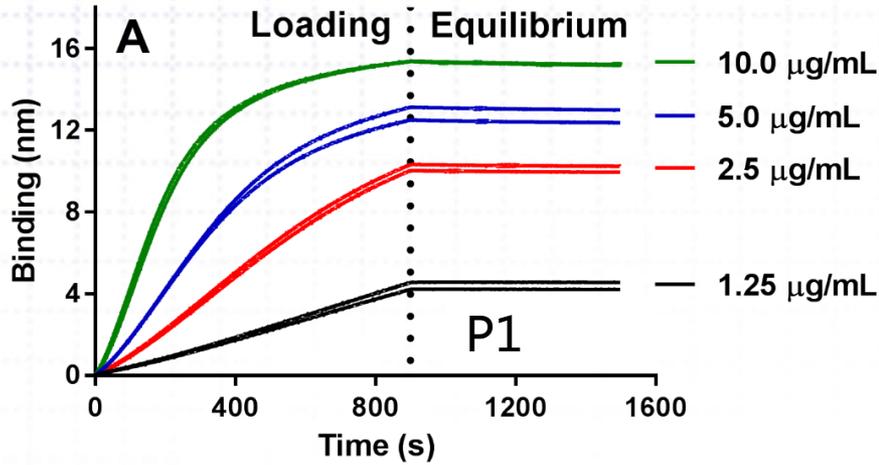
实验设计与分析

仪器维护

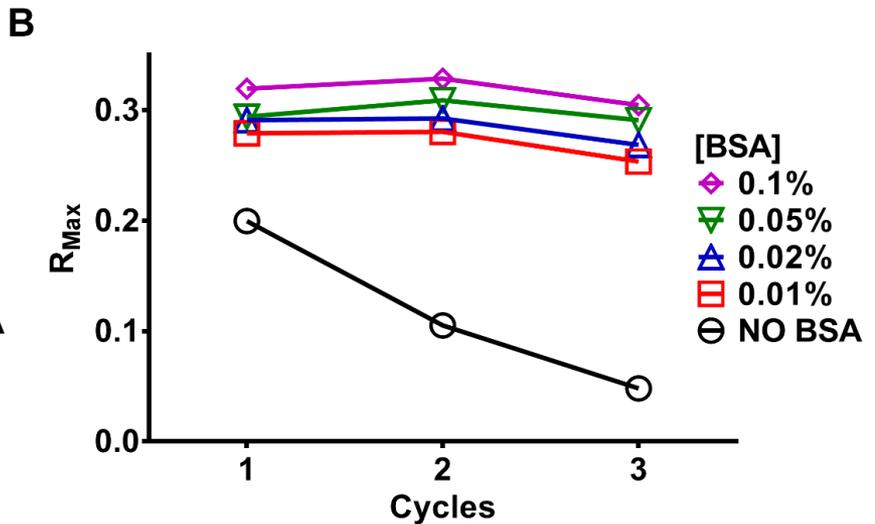
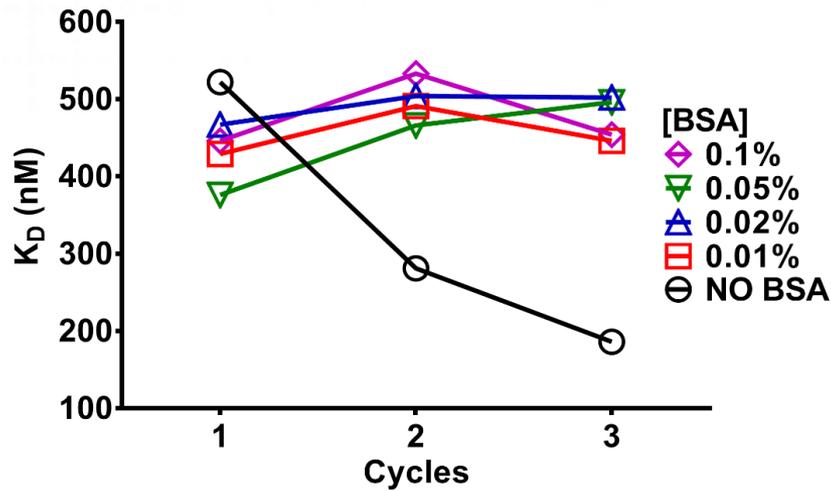
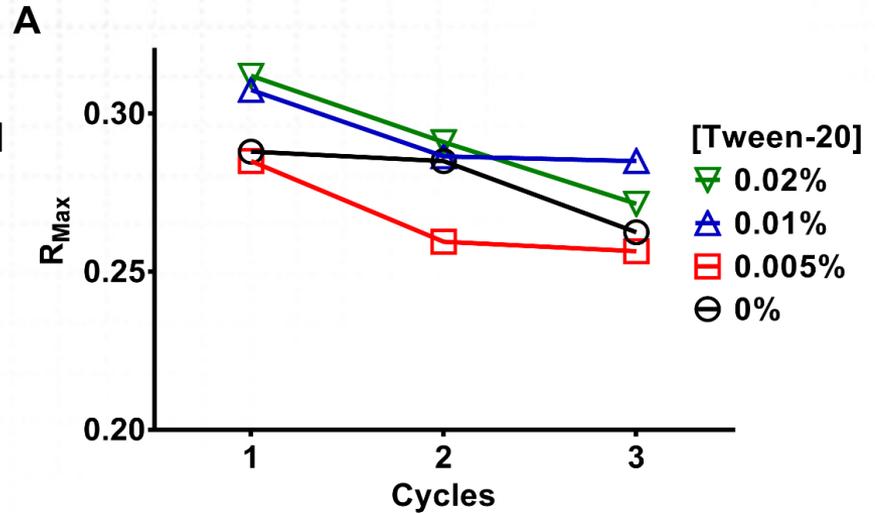
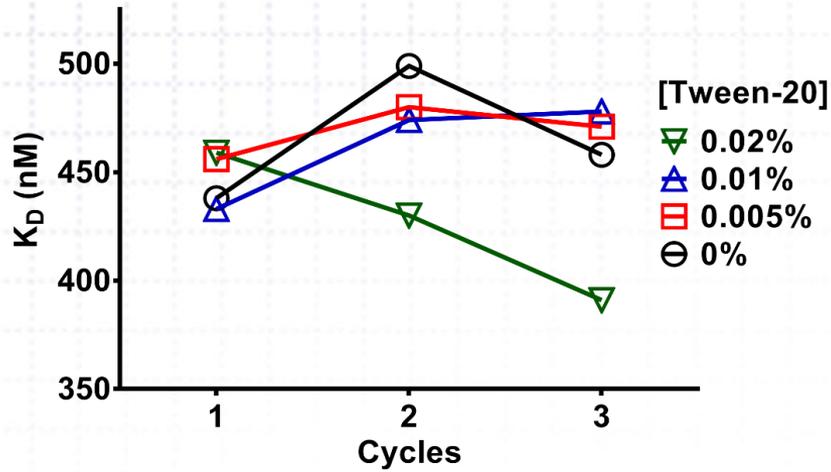
应用案例



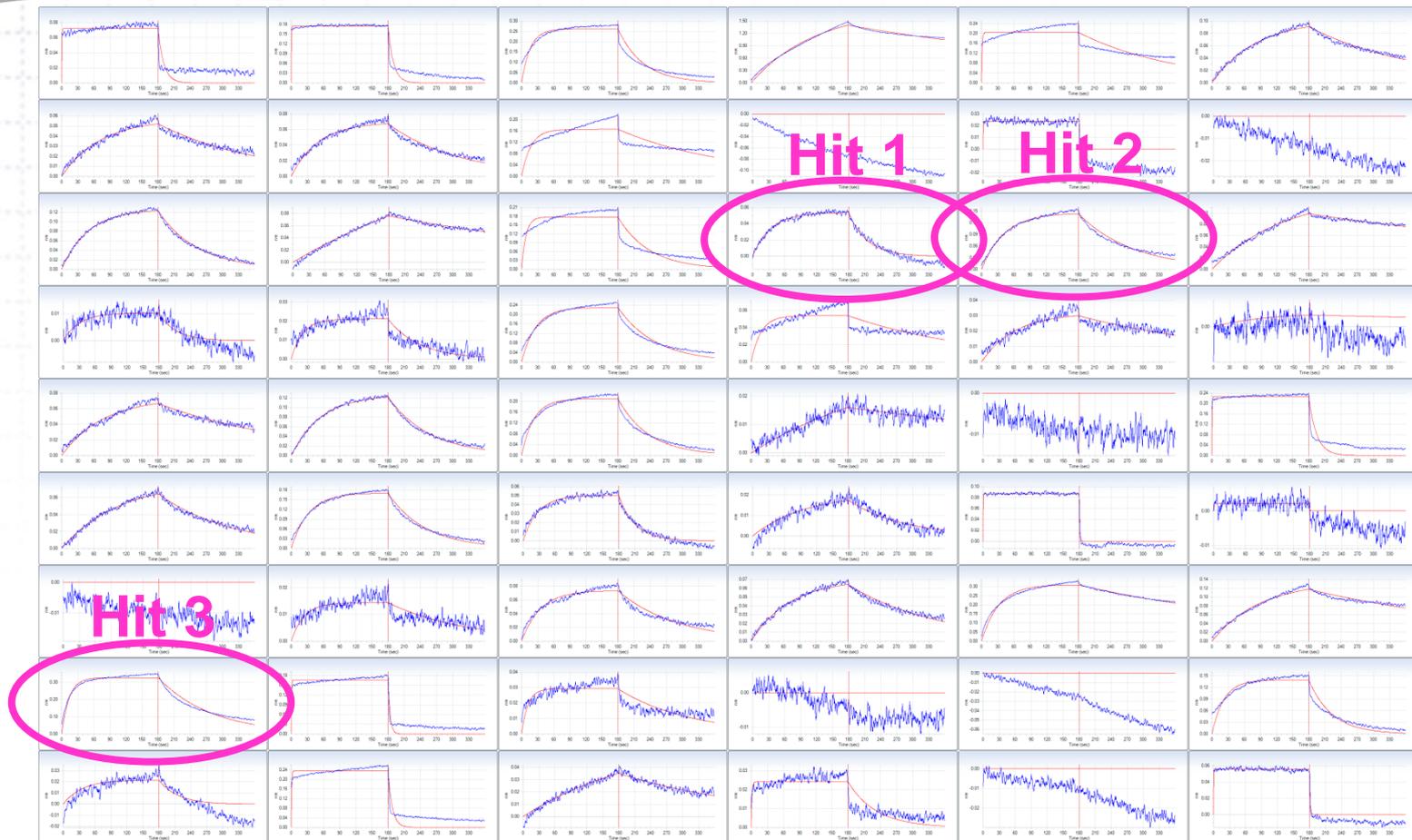
# 蛋白固化最大化 (SSA传感器)



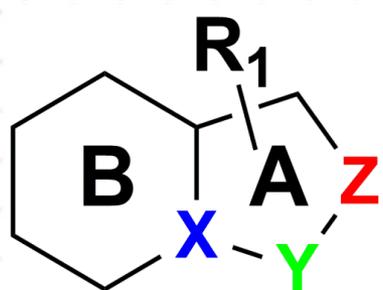
# BSA 和 Tween-20条件优化



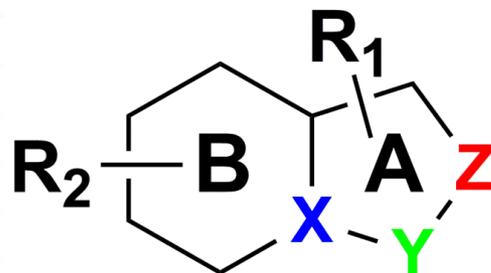
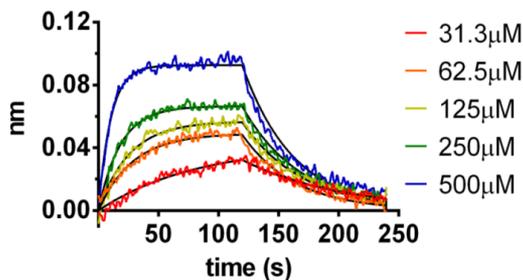
BSA : 提高固化后靶点蛋白稳定性



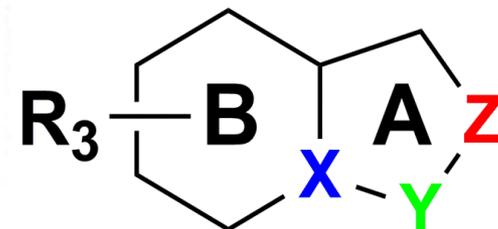
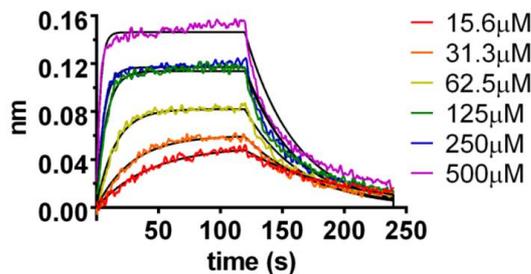
- 250 $\mu$ M, 0.5% DMSO, 2-3小时
- 苗头化合物标准: > 空白 + 3 SD
- 苗头化合物1, 2, 3具有相同母核结构



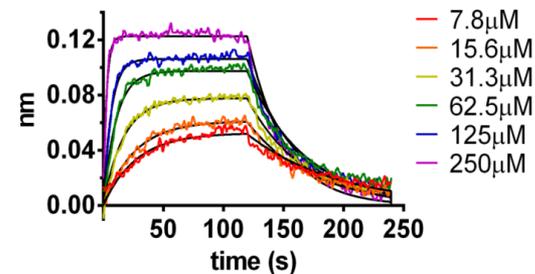
Hit1



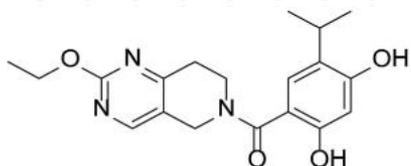
Hit2



Hit3



| CMPD  | MW  | K <sub>D</sub> (μM) | k <sub>on</sub> (1/Ms) | k <sub>dis</sub> (1/s) |
|-------|-----|---------------------|------------------------|------------------------|
| Hit 1 | 133 | 89.2                | 2.21E+02               | 1.97E-02               |
| Hit 2 | 210 | 42.5                | 5.57E+02               | 2.37E-02               |
| Hit 3 | 211 | 14.9                | 1.52E+03               | 2.27E-02               |



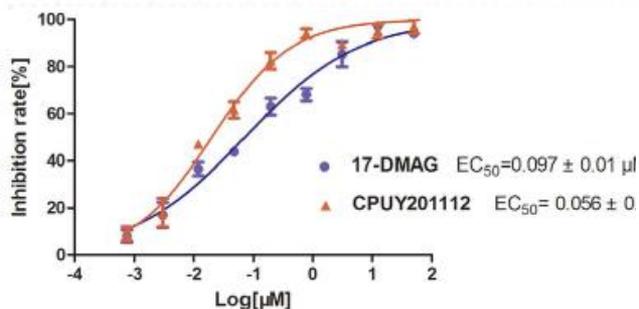
CPUY201112  
Molecular Weight: 324.17

CPUY201112, a novel synthetic small-molecule compound and inhibitor of heat shock protein Hsp90, induces p53-mediated apoptosis in MCF-7 cells

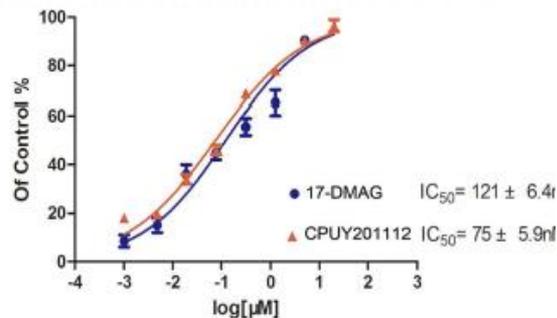
SCIENTIFIC REPORTS

中国药科大学, 2016

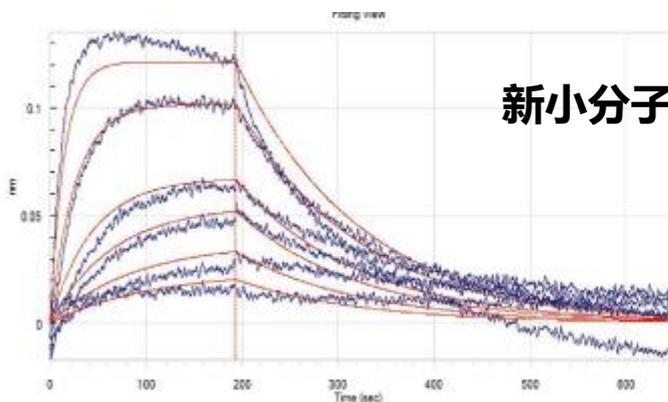
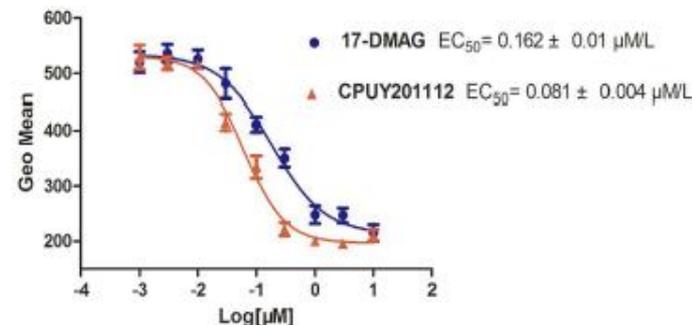
## 荧光偏振



## HTRF检测

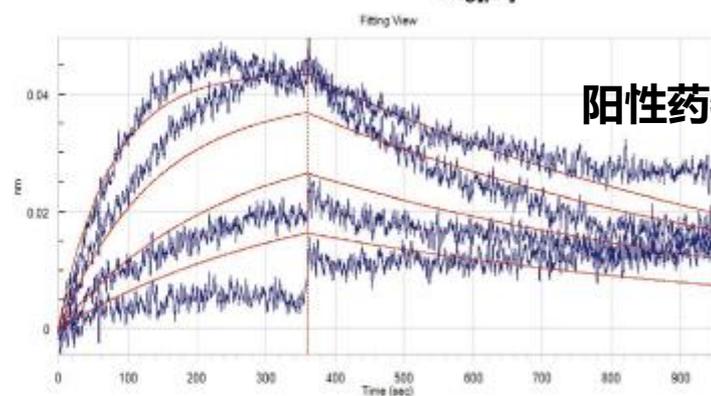


## 流式分析



CPUY201112  
Hsp90 Kd :  $0.027 \pm 0.002 \mu M$

新小分子



17-DMAG  
Hsp90 Kd :  $0.642 \pm 0.08 \mu M$

阳性药物

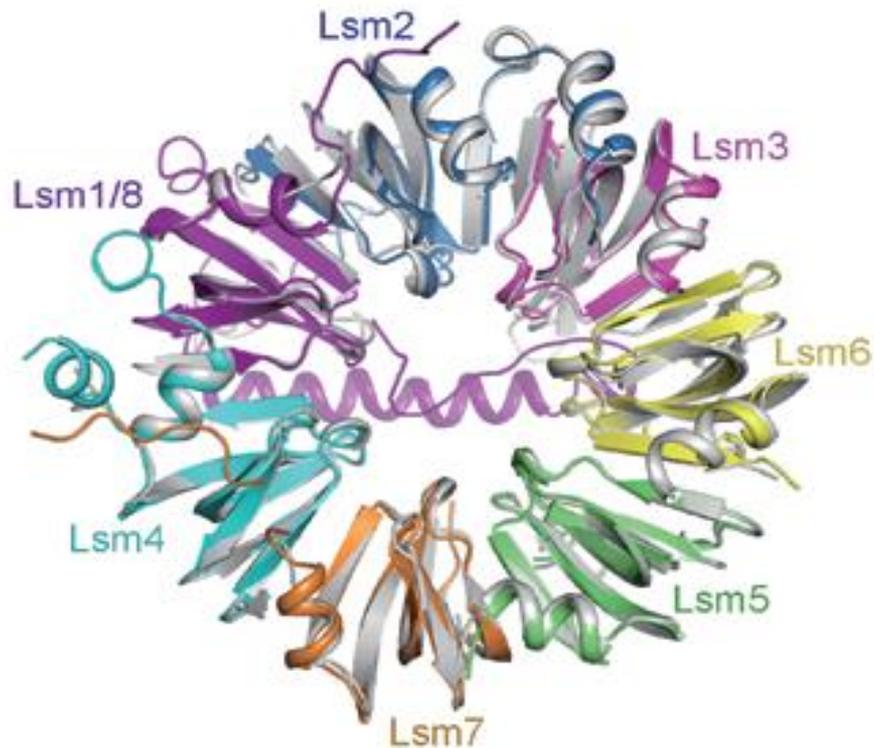
## Crystal structure and biochemical analysis of the heptameric Lsm1-7 complex.

Zhou L<sup>1</sup>, Zhou Y<sup>2</sup>, Hang J<sup>3</sup>, Wan R<sup>4</sup>, Lu G<sup>4</sup>, Yan C<sup>3</sup>, Shi Y<sup>1</sup>.



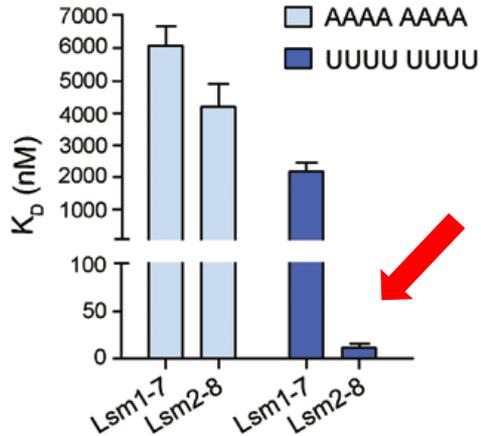
Cell Research

清华大学, 2014



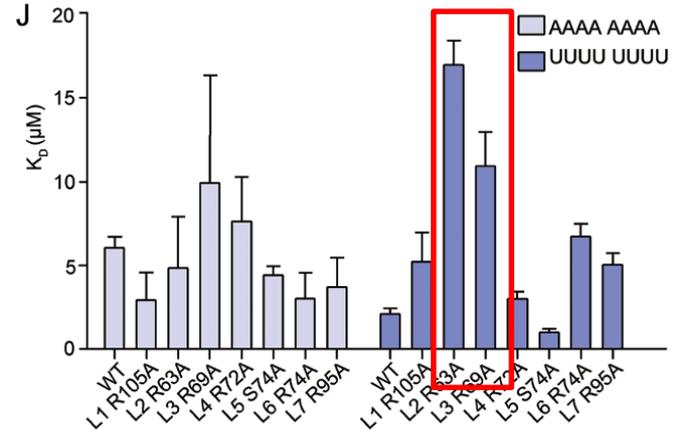
Lsm复合物在pre-mRNA的定向降解中起到非常重要的作用，有两种七聚体：Lsm1-7和Lsm2-8，分布在细胞核和细胞质中，可以结合3'末端的U6 snRNA（小核RNA），从而在RNA的代谢中起着重要作用。

BLI技术研究Lsm复合物与mRNA末端寡聚核糖核酸（AAAAAAAA和UUUUUUUU）的结合能力和机制。



Lsm1-7与8A和8U的亲和力分别为6uM和2uM，没有明显差别。

Lsm2-8与8U的结合明显强于8A（200倍，4uM与20nM），说明Lsm2-8与8U是选择性结合的。



## Lsm1-7 突变体与RNA的相互作用

L2，L3上的Arg突变后，Lsm1-7复合物与8U的结合能力显著下降

各种突变与与8A的结合能力无显著变化。

## Genome-wide studies identify a novel interplay between AML1 and AML1/ETO in t(8;21) acute myeloid leukemia

Yizhen Li,<sup>1\*</sup> Huanwei Wang,<sup>1\*</sup> Xiaoling Wang,<sup>1</sup> Wen Jin,<sup>1</sup> Yun Tan,<sup>1</sup> Hai Fang,<sup>2</sup> Saijuan Chen,<sup>1,2</sup> Zhu Chen,<sup>1-3</sup> and Kankan Wang<sup>1-3</sup>



上海血研所, 2016

Probes containing the short AML1 motifs

**S1:** 5'-TCCGGTGGTGC **TGTGGT** CTGCCCTGGAGA-3'  
3'-AGGCCACCACG **ACACCA** GACGGGGACCTCT-5'

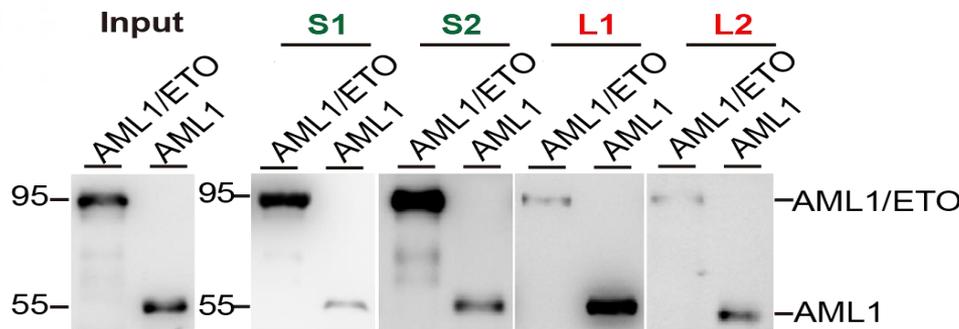
**S2:** 5'-ACCACCTGCATT **ACCACA** GCCTCCACGGTG-3'  
3'-TGGTGGACGTA **TGGTGT** CGGAGGTGCCAC-5'

Probes containing the long AML1 motifs

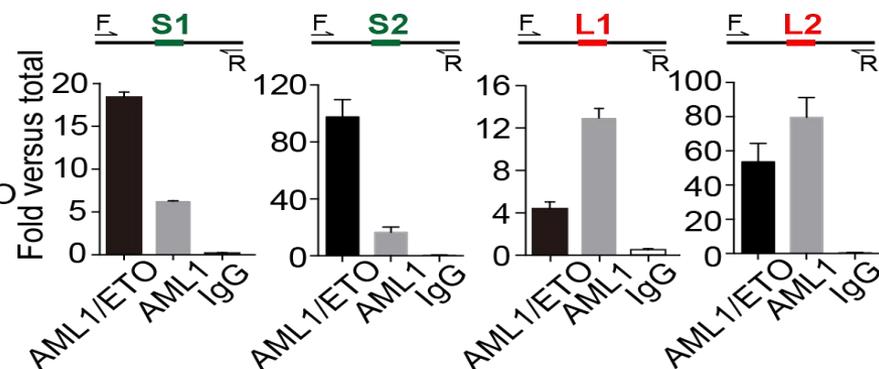
**L1:** 5'-GTGAGTACCCA **TGTGGTTT** AACGCTTGACT-3'  
3'-CACTCATGGGT **ACACCAA** ATTGCGAACTGA-5'

**L2:** 5'-GCAGAAGGAAGC **TGTGGTTT** CTGGTCTTCCT-3'  
3'-CGTCTTCCTTCG **ACACCAA** GACCAGAAGGA-5'

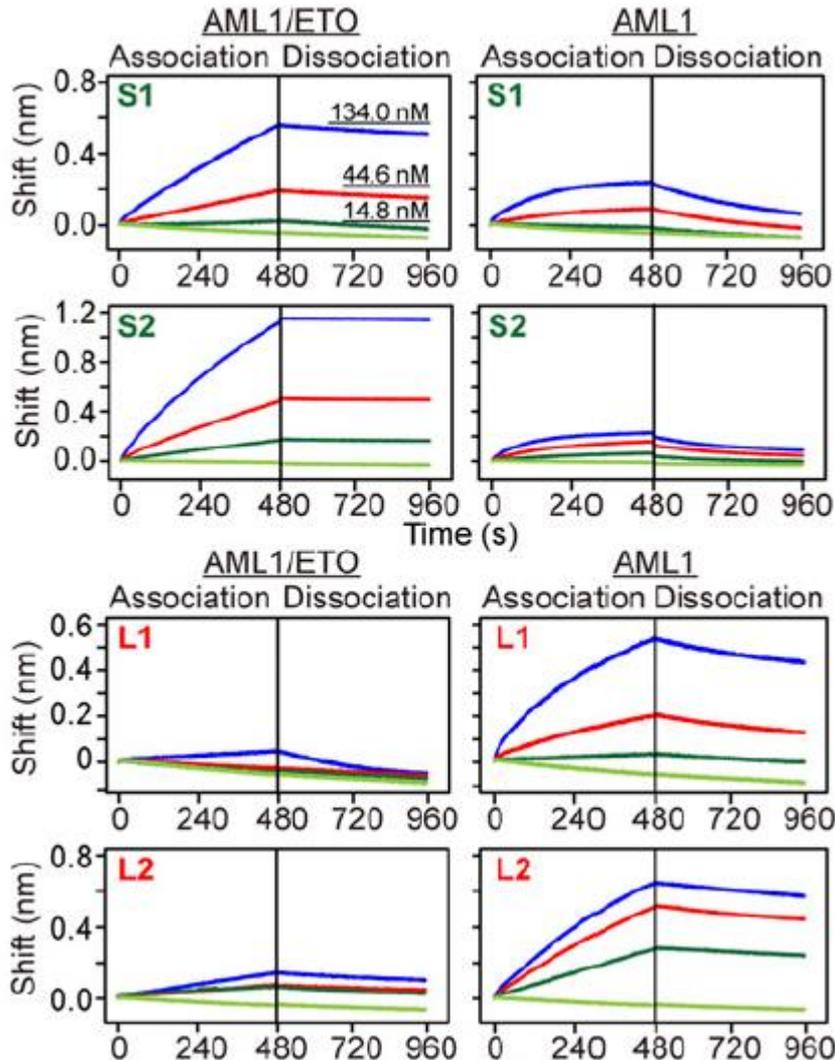
### In vitro DNA pull-down



### In vivo ChIP-qPCR



Blood审稿人要求提供亲和力数据，但是pull-down和ChIP可以定性结果，无法计算序列与AML1/ETO及AML1的具体亲和力

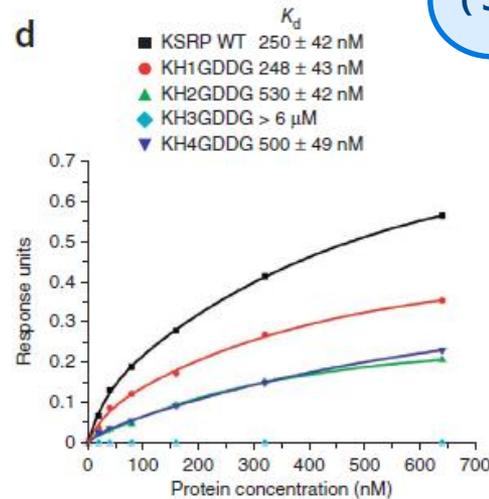
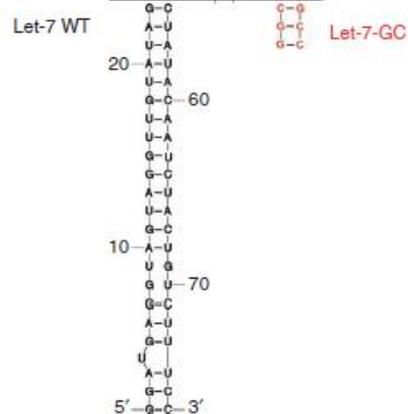
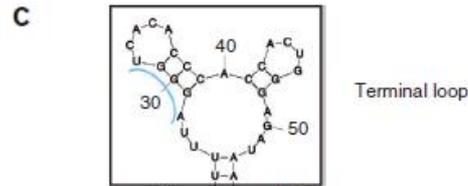
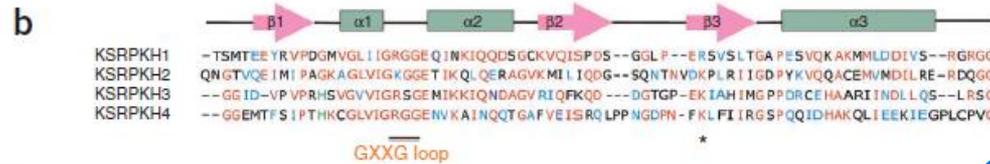
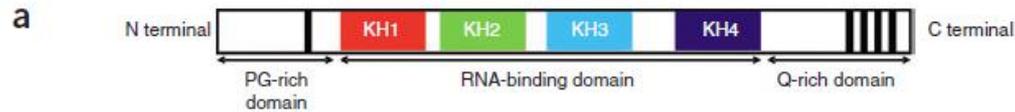


|           | KD (M)   |          |
|-----------|----------|----------|
|           | AML1/ETO | AML1     |
| <b>S1</b> | 2.37E-09 | 4.55E-06 |
| <b>S2</b> | 3.33E-10 | 6.70E-07 |
| <b>L1</b> | 1.32E-04 | 1.08E-06 |
| <b>L2</b> | 1.38E-07 | 2.57E-09 |

SA传感器固化biotin-AML1基序S1, S2, L1和L2, 分别与不同浓度AML1/ETO和AML1进行结合与解离得到KD。

发现AML1/ETO与S结合强于AML1, 而AML1与L结合强于AML1/ETO, 这个结合与传统方法的结果一致, 但是可以定量。

# Noncanonical G recognition mediates KSRP regulation of let-7 biogenesis



BLI结果显示：不同结构域的突变体与Let-7 miRNA的亲和力结果显示，KH3结构域在识别Let-7 miRNA中起主导作用。

- 资料库

<http://www.fortebio.com/literature.html>

- 联系方式：

联系电话：13918182485

个人邮箱：[caihui\\_zhang@pall.com](mailto:caihui_zhang@pall.com)

公共邮箱：[fortebioSH@ap.pall.com](mailto:fortebioSH@ap.pall.com)

- 培训视频：

[http://v.youku.com/v\\_show/id\\_XMjgwNTU3NzgyNA==.html?spm=a2hzp.8253876.0.0&f=49990304](http://v.youku.com/v_show/id_XMjgwNTU3NzgyNA==.html?spm=a2hzp.8253876.0.0&f=49990304) 密码：pall



**Thank You!**

