

剪接因子 SRSF7 和 mRNA 的相互作用测试

The Interaction Detection between Serine/arginine-rich Splicing Factor 7 and mRNA

侯敬丽^{1, *}, 陈红²

¹ 分析测试中心, 上海交通大学, 上海

² 系统生物医学研究院, 上海交通大学, 上海

*通讯作者邮箱: hopic00@sjtu.edu.cn

摘要

富含丝氨酸/精氨酸的剪接因子7 (SRSF7) 是一种已知的剪接因子, 已被发现可在许多癌症中调节致癌基因的 mRNA 输出, 并调节与细胞增殖和迁移相关的 mRNA 上的 m6A 修饰, 但其作用机制尚不清楚[1]。在本实验案例中, 我们纯化制备了 SRSF7 蛋白, 合成生物素标记的 ssRNA-m6A 和未修饰的 ssRNA, 使用表面等离子共振仪 Biacore 8K 对这些核酸分子分别与 SRSF7 蛋白进行亲和力和动力学检测。测试结果表明 SRSF7 有选择性地与 ssRNA-m6A 结合, 其亲和力比对照组 ssRNA 高 2 倍[2]。

关键词: 表面等离子共振仪, mRNA, SRSF7 蛋白, Biacore

研究背景

目前有很多方法可以用来研究RNA与蛋白之间的相互作用，包括电泳迁移率测定、RNA pull down、RNA 足迹、RNA免疫沉淀、紫外线诱导交联免疫沉淀等[3]。这些方法虽然在很多方面能够解决RNA与蛋白之间的相互作用分析问题，但都存在步骤繁琐、耗时费力、检测弱相互作用能力弱、信息量偏少等缺点。为了验证ssRNA-m6A和SRSF7之间的直接结合，我们利用表面等离子体共振（SPR）技术分析它们之间的相互作用。SPR检测技术具有实时检测、高效快速、亲和力测试动态范围宽等特点，可以获得RNA与蛋白之间亲和力常数等全面的互作信息。

Biacore是基于SPR技术来实时跟踪记录生物分子间相互作用的表面等离子共振仪。SPR检测原理是光在棱镜与金属膜表面发生全反射现象时会形成消逝波进入金属介质，而在金属介质内存在表面等离子波，当消逝波与表面等离子波的传播常数相匹配时，引起金属膜内自由电子产生共振，即表面等离子体共振。发生SPR时，入射光能量被表面等离子体吸收，使反射光的能量急剧减少甚至接近为0。这种最小化发生时的入射光角度称为SPR角。分子间的结合/解离造成金膜附近折光率的实时变化，导致SPR角的变化，这一现象被Biacore实时记录。

Biacore检测RNA与蛋白之间相互作用的原理为生物素标记的ssRNA-m6A和ssRNA可以偶联在含有链霉亲和素的SA芯片上，偶联在芯片上的分子称为配体分子。链霉亲和素-生物素是自然界中最强的非共价相互作用之一，生物素标记的配体分子可以稳定的结合在SA芯片上而不被洗脱。当分析蛋白分别流过偶联了ssRNA-m6A和ssRNA芯片时，若蛋白与ssRNA-m6A或ssRNA有相互作用，则蛋白结合在芯片上，导致SPR角的变化，仪器产生上升的响应信号。当分析蛋白停止流过芯片时，由于蛋白与RNA形成自发解离，仪器产生下降的响应信号。因此Biacore可以获取RNA与蛋白反应过程中它们相互作用的特异信号，从而实现相互作用的实时动态检测。

本文描述的方法适用于所有生物素标记的RNA与蛋白之间的相互作用研究，经过简单优化也适用于DNA与蛋白之间的相互作用研究。比如在DNA与蛋白的相互作用测试时，缓冲液和样品都不需要添加RNase Inhibitor，溶液配制不需要DEPC水，只需超纯水。总之，Biacore 8K具有高通量、高灵敏度、实时监测等特点，特别适合核酸与蛋白的相互作用检测。

材料与试剂

1. 重组 SRSF7 蛋白（上海交通大学系统院陶生策课题组制备）
2. S 系列 SA 芯片（Cytiva, Series S Sensor Chip SA, 产品目录号：BR100531）
3. ssRNA: Biotin-5'-CGUCUCGGACUCGGACUGCU-3';

4. ssRNA-m6A: Biotin-5'-CGUCUCGG(m6A)CUCGG(m6A)CU-3' (金斯瑞公司合成, 南京, 中国)
5. 96 孔板 (Cytiva, 产品目录号: BR100503)
6. 96 孔板封膜 (Cytiva, 产品目录号: 28975816)
7. 10× HBS-P 缓冲液 (Cytiva, 产品目录号: BR100671)
8. 50 mM NaOH 溶液 (Cytiva, 产品目录号: BR100358)
9. 1.5 mL EP 管 (Axygen, 产品目录号: BCT-150-C)
10. NaOH 固体 (Cytiva, 产品目录号: 306576)
11. NaCl 固体 (Sigma, 产品目录号: S7653)
12. 异丙醇 (CNW, 产品目录号: CAEQ-4-013493-4000)
13. RNase Inhibitor (翌圣, 产品目录号: 10701ES10)
14. DEPC 水 (Sigma, 产品目录号: 693520)
15. 1.0× HBS-P 缓冲液 (见溶液配方)
16. 配体分子母液 (见溶液配方)
17. SRSF7 蛋白母液 (见溶液配方)
18. 5 M NaCl (见溶液配方)
19. 1 M NaOH 溶液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 纯水仪 (密理博, Milli Q)
2. 表面等离子共振仪 (Cytiva, Biacore 8K)
3. 台式离心机 (赛默飞, Micro21R)

实验步骤

一、实验准备

打开 Biacore 8K 仪器和控制软件 Biacore 8K Control Software (版本号 4.0.8.20368), 输入软件登录密码。
流动池和样品舱的温度均设置为 25 °C。

用 DEPC 水稀释 10× HBS-P 缓冲液, 制备 1.0× HBS-P 缓冲液。

将仪器右侧标记 Buffer A 的管路插入 1.0× PBS 缓冲液试剂瓶里，将标记 Buffer BCD、Water 和 Reagent 的管路插入超纯水的试剂瓶。

在 Biacore 8K Control Software 的 System setup 模块，点击 Change chip，点击右侧 undock chip，芯片舱打开，拿出维护芯片，按照芯片盒箭头指示方向放入新的 SA 芯片，关闭芯片舱。在仪器控制软件右侧选择 New chip，填写芯片相关信息，然后点击 Dock chip。

在 Biacore 8K Control Software 的 System setup 模块，点击 Change solutions，选择 Buffer position A，其余默认设置，点击 Ready to start。缓冲液会以较高的流速冲洗仪器整个内部流路系统，整个过程耗时 6 分钟。

二、配体偶联

1. 计算配体偶联量

根据以下公式计算配体目标偶联量：

$$R_{\max} = \frac{\text{analyte MW}}{\text{ligand MW}} \times R_L \times S_m$$

其中，R_{max} 为芯片表面最大结合容量，通常设为 100 RU；analyte MW 为 SRSF7 蛋白分子量，ligand MW 为 ssRNA 或 ssRNA-m6A 分子量；S_m 为化学计量比，通常设为 1；R_L 为配体偶联水平，配体目标偶联量通常为 1.5 倍的 R_L。在本研究案例中，SRSF7 分子量为 27.4 kDa，ssRNA 和 ssRNA-m6A 分子量约 6.7 kDa。经公式计算，SRSF7 目标偶联量为 40 RU。由于 ssRNA 和 ssRNA-m6A 容易降解，提高目标偶联量为 60~100 RU。

2. 配体偶联过程

将 ssRNA 或 ssRNA-m6A 粉末用 DEPC 水溶成 200 nM 母液，并加入 1 μL RNase Inhibitor。用 DEPC 水稀释 10× PBS 缓冲液，制备 1.0× PBS 缓冲液。使用 1.0× PBS 缓冲液稀释 ssRNA 或 ssRNA-m6A 母液制备 5nM 的配体分子。

在 Biacore 8K Control Software 里，选择 Method，点击 New，选择 Empty methods，打开 Empty immobilization method 方法。方法里包含四个步骤。第一步 Method definition，设置 Chip type 为 SA，点击 add step，选择默认的 Immobilization in Fc2 activate/deactivate in 1，选择 SA-biotin capture，点击 Enter custom mode。设置 NaCl/NaOH 的 Contact time 为 60 s；设置 Ligand 的 Contact time 为 420 s，Channel 选择 1~2，输入 ligand name 分别为 ssRNA 和 ssRNA-m6A。第二步 Positioning and plate layout，显示了 96 孔板里样品放置位置和需要体积，按照要求将样品加到 96 孔板里。Volume 的体积必须≥系统显示体积。

在 Biacore 8K Control Software 的 Instrument control 界面，Hotel door 处点击 open，把样品架从样品舱里取出来，把加好样品的 96 孔板放置到样品架上，然后放到仪器里面，把样品舱的门关闭。

点击第二步 Positioning and Plate layout 后面的 Send to queue, 查看样本板位置是否放置正确, 在 Buffer position 处点击 Bottle A, 查看系统要求的溶液体积是否满足需求, 点击 Ready to start 和 Save, 方法开始运行。

运行结束后, 结果显示 ssRNA 或 ssRNA-m6A 偶联了约 80 RU。

三、ssRNA 或 ssRNA-m6A 与 SRSF7 的亲力和动力学测试

1. 结合测试

接下来, 研究者使用 Biacore 8K 对 ssRNA 或 ssRNA-m6A 与 SRSF7 蛋白的结合能力进行了检测, 目的是初步确定 ssRNA 或 ssRNA-m6A 与 SRSF7 是否存在相互作用; 若存在相互作用, 确定进行动力学和亲和力测试时分析物的浓度范围, 以及再生试剂和条件。

将仪器右侧标记 Buffer B 的管路插入 1.0× HBS-P 缓冲液试剂瓶里, 将标记 Buffer CD、Water 和 Reagent 的管路插入超纯水的试剂瓶。

在 Biacore 8K Control Software 的 System setup 模块, 点击 Change solutions, 默认设置, 点击 Ready to start。

在 Biacore 8K Control Software, 点击 New method, 选择 Kinetics/affinity, 在 Antibody/general 里选择 Kinetics/affinity, 打开 Multi-cycle kinetics/affinity 方法。第一步 Method definition, 将 Concentration unit 改成 nM, Running Buffer 设置为 HBS-P, 去除 Startup 步骤。在 Analysis 里, Analyte 的 Contact time 设置成 120 s, Dissociation time 设置成 120 s, 流速 30 μ L/min。Regeneration 的 solution 设置为 Glycine 2.5, contact time 设置为 30 s, 流速 30 μ L/min。第二步 Variables and positioning, 在 Analysis 里, 编辑 cycle 数为 5 个, 将 Analyte Solution 改为抗体蛋白名称, 浓度分别设置成 0、0、0、500、500 nM。第三步 Cycle overview 不需要做任何改动。第四步 Plate layout, 将样品配好加到 96 孔板里, 其中 0 浓度和 HBS-P 为 1× HBS-P 缓冲液。96 孔板放到仪器里, 点击 Send to queue, 点击 Ready to start 和 Save, 方法开始运行。

运行结束后, 结果表明 (1) ssRNA 或 ssRNA-m6A 和 500 nM SRSF7 蛋白互作时的结合响应满足测试需求, 因此用 500 nM SRSF7 蛋白 2 倍梯度稀释, 共 9 个浓度点。(2) Glycine 2.5 能够将系统再生完全, 且对配体分子活性影响较小, 因此选择 Glycine 2.5 做为再生试剂, 再生时间 30 s, 流速 30 μ L/min。

2. 动力学/亲和力测试

接下来, 使用 Biacore 8K 对 ssRNA 或 ssRNA-m6A 和 SRSF7 的亲力和动力学进行检测。

用 DEPC 水稀释 10× HBS-P 缓冲液, 制备 1.0× HBS-P 缓冲液。

分别使用 1× HBS-P 溶液稀释 SRSF7 至 500 nM, 再用 1× HBS-P 溶液配制蛋白浓度梯度, 2 倍稀释, 共 9 个浓度点。

在 Biacore 8K Control Software, 点击 New method, 选择 Kinetics/affinity, 在 Antibody/general 里选择 Kinetics/affinity, 打开 Multi-cycle kinetics/affinity 方法。第一步 Method definition, 将 Concentration unit 改成 nM, Running Buffer 设置为 HBS-P。在 Analysis 里, Analyte 的 Contact time 设置成 400 s, Dissociation time 设置成 600 s。将 Startup 里的 Analyte 设置成和 Analysis 里完全一样的实验条件。第二步 Variables and positioning, 在 Analysis 里, Add cycle 至 13 个循环, 将 Analyte Solution 改为分析物名称 SRSF7, SRSF7 浓度分别设置成 0、0、1.95、3.9、7.8、15.6、31.25、31.25、62.5、125、250、500、0 nM; 在 Startup 里, Add cycle 至 5 个循环。第三步 Cycle overview 不需要做任何改动。第四步 Plate layout, 将样品配好加到 96 孔板里, 其中 0 浓度和 HBS-P 为 1×HBS-P 缓冲液。96 孔板放到仪器里, 点击 Send to queue, 点击 Ready to start 和 Save, 方法开始运行。

使用 Biacore 8K 仪器一次可以做 8 个配体分子的动力学测试。在本实验案例中, 由于 Channel 1-2 分别固定 ssRNA 或 ssRNA-m6A 蛋白, 2 个配体分子和 1 个 SRSF7 蛋白分子只需要使用 Biacore 8K 仪器做一轮实验。

实验注意要点

1. 配体偶联:

对于蛋白和小分子相互作用实验, 配体蛋白偶联量约 10,000 RU 即可开展实验。如果不确定配体蛋白的实际偶联效果, 可以在 Immobilization 方法里先去掉封闭 Ethanolamine 这步, 等蛋白偶联量达到预期后, 再使用 Immobilization 方法单独运行 Ethanolamine 这步。

2. 小分子药物溶液配制:

很多小分子药物溶解性不好, 需要 DMSO 助溶。小分子药物配成最高实验浓度后, 需要离心观察是否有沉淀, 如果离心后没有看到沉淀, 则取上清液做浓度梯度稀释, 如果离心后看到沉淀, 则需要降低小分子药物的最高实验浓度。在表面等离子共振仪实验中, 小分子药物做分析物, 其浓度必须是准确的, 否则会影响亲和力 KD 的数值。

3. 小分子药物 A-B-A 竞争抑制实验的浓度设置:

Solution A 为小分子药物, 如果小分子药物和芯片上的蛋白有一定的结合信号, 小分子药物的浓度需要设置为能使芯片上蛋白位点饱和的浓度, 数值通常比较高, 如 100 μ M 或 200 μ M, 并且小分子药物的结合信号可以通过设置 A-A-A 作为零浓度进行扣减。

Solution B 中蛋白的浓度通常设为蛋白和蛋白亲和力 KD 同样数量级的浓度。

由于很多小分子药物是快结合快解离的模式, 因此 Solution B 中需要同样添加和 Solution A 中一样浓度的小分子药物。

结果与数据分析

1. SRSF7 与 ssRNA 或 ssRNA-m6A 的亲力和动力学检测：

使用 Biacore 8K 的分析软件 Biacore Insight Evaluation software 对结果进行分析。在 Create new evaluation 界面，找到要处理的文件，点击 Select evaluation method，在 Predefined 界面，选择 Kinetics/affinity 里的 Antibody/general，双击 Multi-cycle kinetics-Evaluation method。仪器默认会把进样前后的部分曲线截掉，如果不想截掉，点击图右侧的小齿轮，在 Remove range 里，去掉勾选的 Remove ranges at start and end of injections。在 Settings 中选择 Serial，在 Kinetics/Affinity mode 点击 Kinetics，Fit models 选择 1:1 binding 模型，在 Initial values 里，Rmax 选择 Fit local，点击 Perform fit，即得到拟合结果，包括结合速率 k_a ，解离速率 k_d ，Rmax 和亲和力 K_D 。

如图 1，结果显示 SRSF7 有选择性地与 ssRNA-m6A 结合，其亲和力比对照组（ssRNA）高 2 倍，表明 SRSF7 蛋白是具有 m6A 修饰的 mRNA 的潜在阅读器。

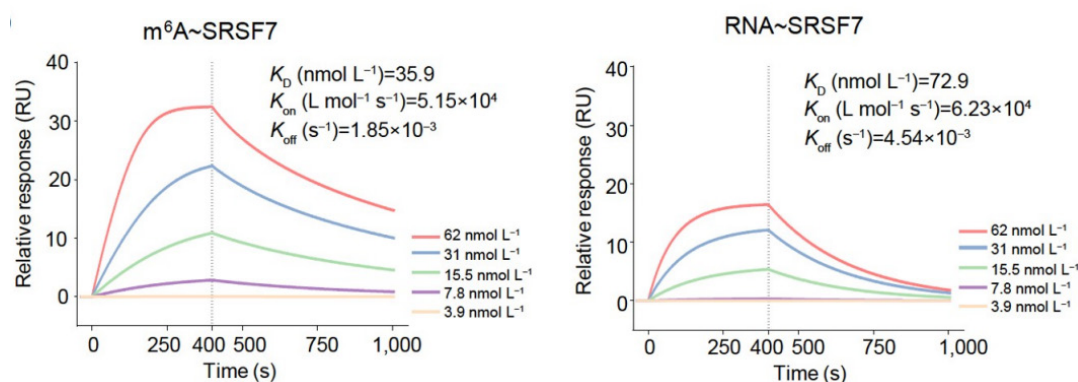


图 1 Biacore 8k 检测 SRSF7 蛋白与 ssRNA 和 ssRNA-m6A 互作的亲和力和动力学传感图。

溶液配方

1. 1.0× HBS-P 缓冲液

量取 100 mL 10× HBS-P 缓冲液，加 900 mL DEPC 水，使用 0.22 μ m 过滤器和循环水多用真空泵过滤到装缓冲液的瓶子里。

2. 配体分子母液

将 ssRNA 或 ssRNA-m6A 用 1.0× HBS-P 缓冲液溶成 200 nM 母液，加入 RNase Inhibitor 至终浓度为 1 U/mL。

3. SRSF7 蛋白母液

引用格式：侯敬丽，陈红. (2024). 剪接因子 SRSF7 和 mRNA 的相互作用测试. *Bio-101* e1011010. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011010.

How to cite: Hou, J. L. and Chen, H. (2024). The Interaction Detection between Serine/arginine-rich Splicing Factor 7 and mRNA. *Bio-101* e1011010. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011010. (in Chinese)

纯化的 SRSF7 蛋白，溶于 $1.0\times$ HBS 缓冲液，BCA 法测试蛋白浓度，加入 RNase Inhibitor 至终浓度为 1 U/mL。

4. 5 M NaCl

量取 2.9 克 NaCl 固体粉末，加入 9 mL DEPC 水溶解，定容至 10 mL。

5. 1 M NaOH 溶液

量取 0.4 G NaOH 固体粉末，加 9 mL DEPC 水溶解，定容至 10 mL。

致谢

感谢上海交通大学系统生物医学重点实验室（教育部）陶生策教授课题组，感谢陈红同学的帮助。

参考文献

1. Cun, Y., An, S., Zheng, H., Lan, J., Chen, W., Luo, W., Yao, C., Li, X., Huang, X., Sun, X., et al. (2021). Specific Regulation of m6A by SRSF7 Promotes the Progression of Glioblastoma. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. 21(4): 707–728. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2021.11.001>
2. Jiang, H. W., Chen, H., Zheng, Y. X., Wang, X. N., Meng, Q., Xie, J., Zhang, J., Zhang, C., Xu, Z. W., Chen, Z. Q., et al. (2023). Specific pupylation as IDentity reporter (SPIDER) for the identification of protein-biomolecule interactions. *Sci China Life Sci*. 66(8): 1869–1887. <https://doi.org/10.1007/s11427-023-2316-2>
3. Popova, V. V., Kurshakova, M. M. and Kopytova, D. V. (2015). Methods to study the RNA-protein interactions. *Mol Biol*. 49(3): 418–426. <https://doi.org/10.1134/s0026893315020107>