(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110998332 B
(45)授权公告日 2024.04.09

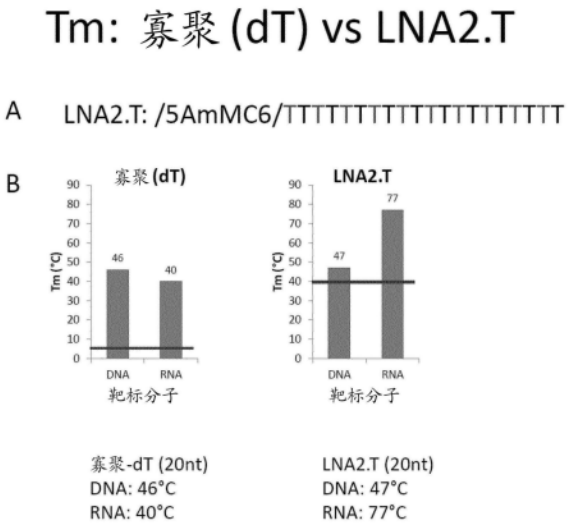
(21)申请号 201880053251.2
(22)申请日 2018.08.17
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110998332 A
(43)申请公布日 2020.04.10
(30)优先权数据
17186948.0 2017.08.18 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.02.17
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/072348 2018.08.17
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/034783 EN 2019.02.21
(73)专利权人 欧洲分子生物学实验室
地址 德国海德堡
(72)发明人 乔尔·伊格纳齐奥·佩雷斯-佩里
马蒂亚斯·W·亨茨
比吉特·罗格尔
(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
专利代理师 王达佐 洪欣
(51)Int.Cl.
G01N 33/68(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)
(56)对比文件
CN 1918292 A,2007.02.21
EP 2253639 A1,2010.11.24
Birgit Rogell 等.Specific RNP capture with antisense LNA/DNA mixmers.《RNA》.2017,第23卷(第8期),第1290-1302页.
Benedikt M Beckmann.RNA interactome capture in yeast.《Methods》.2016,第118-119卷第82-92页.
Thomas Conrad 等.Serial interactome capture of the human cell nucleus.《nature communications》.2016,第7卷第1-11页.
审查员 林晓烨
权利要求书1页 说明书21页
序列表5页 附图21页

(54)发明名称

增强的RNA相互作用组捕获(eRIC)

(57)摘要

本发明涉及检测细胞、组织或生物体中的RNA结合蛋白(RBP)的改进的方法,包括利用在其序列中包含锁核酸(LNA)-核苷酸类似物的寡核苷酸。



CN 110998332 B

1.检测细胞、组织或生物体中的RNA结合蛋白的方法,其包括:

a)利用UV光辐照使包含RNA结合蛋白的细胞、组织或生物体的内容物共价交联,以产生包含交联的核糖核苷酸复合物的生物物质;

b)溶解包含所述交联的核糖核苷酸复合物的所述生物物质;

c)于37℃-40℃的温度下,使所述交联的核糖核苷酸复合物与和所述生物物质的至少一种特异性的靶标RNA互补的至少一种寡核苷酸接触,其中所述寡核苷酸在其序列中包含至少一个锁核酸-核苷酸,并且其中所述寡核苷酸与固体支持物偶联;

c')于40℃-77℃,在纯水中进行严格的预洗脱;

d)利用所述固体支持物分离包含所述至少一种寡核苷酸的复合物;

e)从所述分离的复合物酶促释放所述RNA结合蛋白和RNA片段,以产生释放的RNA结合蛋白;以及

f)检测所述释放的RNA结合蛋白。

2.如权利要求1所述的方法,其中在变性条件下,溶解所述细胞。

3.如权利要求1或2所述的方法,还包括在分离所述复合物之前,剪切基因组DNA的步骤。

4.如权利要求1或2所述的方法,其中所述预洗脱进行5至10分钟。

5.如权利要求1或2所述的方法,其中通过RNA酶A和RNA酶T1的消化,释放所述RNA结合蛋白。

6.如权利要求1或2所述的方法,还包括离心和/或真空浓缩所述RNA结合蛋白样品的步骤。

7.如权利要求1或2所述的方法,其中分析所述释放的RNA结合蛋白包括通过单罐固相增强的样品制备和定量质谱法来制备。

8.如权利要求1或2所述的方法,其中所述寡核苷酸的长度为15-25个碱基。

9.如权利要求1或2所述的方法,其中所述寡核苷酸在所述寡核苷酸的每隔一个位置处包括锁核酸。

10.如权利要求1或2所述的方法,还包括当相比于对照样品或在不同实验条件下获得的样品时,检测所述RNA结合蛋白的RNA结合的改变。

11.包括进行权利要求1-10中任一项所述的方法的物质的试剂盒用于检测细胞中的RNA结合蛋白的用途,所述试剂盒包括与所述细胞的至少一种特异性的靶标RNA互补并且包含至少一个锁核酸-核苷酸的至少一种合适的寡核苷酸、适合于RNA消化的酶、缓冲液、试剂和/或使用说明书。

增强的RNA相互作用组捕获(eRIC)

[0001] 本发明涉及检测细胞、组织或生物体中的RNA结合蛋白(RBP)的改进的方法,包括利用在其序列中包含锁核酸(LNA)-核苷酸类似物的寡核苷酸。

背景技术

[0002] 从合成到衰变,RNA结合蛋白(RBP)均与RNA结合,形成称为核糖核蛋白(RNP)的动态复合物。RBP控制RNA的命运,并因此在基因表达中起核心作用。诸如免疫沉淀联合微阵列或下一代测序的技术的实施,使得可以对由单独RBP控制的RNA网络进行更深入的研究。然而,如通过HeLa和HEK293细胞的mRNA相互作用组所判断的,RNA生物学中涉及的蛋白质的范围仍然不清楚,并且似乎在以前被低估了。

[0003] 先前已经使用多种方法研究了RNA相互作用组,即RNA结合蛋白的集合。在两项不同的研究中使用了全基因组原阵列(protoarrays)和荧光RNA探针来系统地鉴定酵母RBP(Scherrer,T.,Mittal,N.,Janga,S.C.&Gerber,A.P.A screen for RNA-binding proteins in yeast indicates dual functions for many enzymes.PLoS One 5,e15499(2010);Tsvetanova,N.G.,Klass,D.M.,Salzman,J.&Brown,P.O.Proteome-wide search reveals unexpected RNA-binding proteins in Saccharomyces cerevisiae.PLoS One 5(2010))。固定的RNA探针也被用作诱饵,以在体外捕获特异性的RBP,然后进行定量质谱法(Butter,F.,Scheibe,M.,Morl,M.&Mann,M.Unbiased RNA-protein interaction screen by quantitative proteomics.Proc Natl Acad Sci U S A 106,10626-10631(2009))。

[0004] 然而,这些方法并未将由各自多肽的生化特性促进的非生理性RNA-蛋白质相互作用与在活细胞中发生的那些区分开。已使用计算机模拟算法来识别候选RBP,搜索细胞蛋白组中的RNA结合结构域(RBD)或与RNA相关的酶活性(Anantharaman,V.,Koonin,E.V.&Aravind,L.Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism.Nucleic Acids Res 30,1427-1464(2002))。这些方法将另外的蛋白质鉴定为潜在的RBP,其与先前已知的RNA结合剂具有相似的结构和功能特征。

[0005] 然而,如最近发表的RNA相互作用组数据集所说明的,这些分析无法识别非常规的RBP(Baltz,A.G.et al.The mRNA-Bound Proteome and Its Global Occupancy Profile on Protein-Coding Transcripts.Mol Cell 46,674-690(2012);Castello,A.et al.Insights into RNA Biology from an Atlas of Mammalian mRNA-Binding Proteins.Cell 149,1393-1406(2012))。

[0006] US2013-123123公开了以下方法,其包括:a)利用热稳定的交联剂交联细胞的内容物以产生交联的核糖核苷酸复合物;b)将交联的核糖核苷酸复合物片段化以产生包含蛋白质、RNA片段,以及任选地基因组DNA片段的复合物;c)在包括较高温度在内的高严格性条件下使复合物与包含亲和标签的且与细胞的特异性的靶标RNA互补的多种非重叠的寡核苷酸接触;d)利用亲和标签分离含有寡核苷酸的复合物以产生分离的复合物;e)从分离的复合物酶促释放蛋白质、RNA片段和/或基因组DNA片段,以产生释放的组分,而不逆转交联;以及f)分析所释放的组分。

[0007] WO 2015/191780涉及锌指蛋白CCCTC结合因子(CTCF)RNA相互作用组。WO 2016/149455涉及多梳相关的RNA、那些RNA的文库和片段、抑制性核酸和方法及用于靶向RNA的组合物,以及以上的使用方法。

[0008] WO 2009/024781公开了用于分离与靶标核酸序列结合的多肽和多肽复合物的方法。方法包括以下步骤:获得包含靶标核酸序列以及与该靶标核酸序列结合的一种或多种多肽的样品;使样品与包含与至少一部分的靶标核酸序列互补且能够与之杂交的序列的至少一种寡核苷酸探针接触,其中所述寡核苷酸探针包含至少一个锁核酸(LNA)核苷酸,并且其中所述寡核苷酸探针还包含至少一种亲和标签;使所述至少一种寡核苷酸探针与所述靶标核酸序列彼此杂交,以便形成探针-靶标杂合物;通过与至少一种亲和标签结合的分子来固定所述探针-靶标杂合物而从样品分离所述探针-靶标杂合物;以及洗脱与靶标核酸序列结合的一种或多种多肽。还提供了用于筛选方法的探针。

[0009] US8748354公开了RNA相互作用组分析的方法,包括:a)利用热稳定交联剂交联细胞的内容物以产生交联的核糖核苷酸复合物;b)将交联的核糖核苷酸复合物片段化以产生包含蛋白质、RNA片段和任选地基因组DNA片段的复合物;c)在包括较高温度在内的高严格性条件下使复合物与包含亲和标签的且与细胞的特异性的靶标RNA互补的多种非重叠的寡核苷酸接触;d)利用亲和标签分离含有寡核苷酸的复合物以产生分离的复合物;e)从分离的复合物酶促释放蛋白质、RNA片段和/或基因组DNA片段以产生释放的组分,而不逆转交联;以及f)分析释放的组分。

[0010] Rogell等人(Rogell et al.“Specfic RNP capture with antisense LNA/DNA mixmers”,RNA,第23卷,编号8,2017年5月5日,第1290-1302页)公开了“特异性的核糖核蛋白(RNP)捕获”——用于确定体外和细胞系统中的与特异性的转录物结合的蛋白质的方法。特异性的RNP捕获使用UV辐照来共价稳定在“零距离”处发生的蛋白质-RNA相互作用。然后通过与共价偶联至磁性树脂上的反义锁核酸(LNA)/DNA寡核苷酸杂交来捕获与靶标RNA结合的蛋白质。在严格洗涤之后,通过定量质谱法确定相互作用的蛋白质。方法揭示出了先前未知的RNA结合蛋白。

[0011] Beckmann(Benedikt M.Beckmann:“RNA interactome capture in yeast”,Methods,第118-119卷,2016,第82-92页)公开了酵母RNA相互作用组捕获方案,其采用RNA标记、RNA和蛋白质在365nm波长处的共价UV交联(可光激活的核糖核苷酸增强的交联,PAR-CL),以及最终纯化与蛋白质结合的mRNA。

[0012] Conrad等人(Conrad et al.“Serial interactome capture of the human cell nucleus”,Nature Comm.,第7卷,2016年4月4日,第1-11页)公开了“系列RNA相互作用组捕获”(serIC)——一种能够进行紫外交联的聚(A)-RNA-蛋白质复合物的整个RBP检测的多纯化程序。

[0013] 最新开发的方法(System-wide identification of RNA-binding by interactome capture.Castello A,Horos R,Strein C,Fischer B,Eichelbaum K,Steinmetz LM,Krijgsveld J,Hentze MW.Nat Protoc.2013Mar;8(3):491-500)改善了现状,但仍然需要能够提供令人满意的结果的方法。

[0014] 根据其第一个方面,通过检测细胞中的RNA结合蛋白(RBP)的方法解决了以上目标,其包括以下步骤:a)利用合适的辐照使包含RBP的细胞、组织或生物体的内容物共价交

联,以产生交联的核糖核苷酸复合物;b)溶解包含所述交联的核糖核苷酸复合物的所述物质;c)在0℃以上,优选在至少15℃和15℃以上的温度,在合适的条件下,使所述交联的核糖核苷酸复合物与和所述细胞的至少一种特异性的靶标RNA互补的至少一种寡核苷酸接触,其中所述寡核苷酸在其序列中包含至少一个锁核酸(LNA)-核苷酸类似物,并且其中所述寡核苷酸与固体支持物偶联;d)利用所述固体支持物分离包含所述至少一种寡核苷酸的复合物;e)从所分离的复合物酶促释放RBP以产生释放的RBP;以及f)分析所述释放的RBP。该方法通常在体外进行,例如,利用分离的细胞和/或组织,例如应用于来源于生物体的细胞或组织以确定体内发生的蛋白质-RNA相互作用。

[0015] 发明人开发了基于RNA相互作用组捕获的改进方案,用于公正地鉴定在体内与聚(A)RNA相互作用的蛋白质。与其先前的方法相比,锁核酸(LNA)核苷酸类似物的使用允许对该方案进行修改(包括更严格的捕获和洗涤条件,以及更特异性的洗脱)。基于LNA的相互作用组捕获可大大减少污染,包括基因组DNA和非聚腺苷酸RNA。本发明的新方案已经成功地应用于先前方法表现不佳的细胞类型,并为不同实验条件下的比较分析提供了显著的优势。

[0016] 有利地,本发明的方法包括利用寡聚(dT)探针,其中一些碱基被锁核酸(LNA)取代。LNA-T对互补聚(A)束显示出更高的亲和力,并允许应用更严格的条件,减少污染而又不损害或甚至增强聚(A)RNA的捕获。

[0017] 此外,通过在20-mer(LNA2.T)的每隔一个位置处掺入例如LNA-T,发明人已经能够在约37-40℃的温度,而不是该技术以前版本中的4℃下执行整个方案,包括捕获和所有洗涤。

[0018] 另外,发明人还加入了在约40℃的优选纯的(例如,双蒸的(bidest)、三蒸的(tridest))水中进行清洗的高严格性的预洗脱步骤,以便洗脱对LNA探针具有较低亲和力或与固体支持物(例如磁珠)非特异性地相互作用的污染物核酸或蛋白质。这类预洗脱与经典的寡聚(例如,寡聚(dT))探针不兼容。

[0019] 当与先前的方案相比时,随着方案增加的温度联合增加的预洗脱步骤可以大大减少基因组DNA和非聚腺苷酸化的RNA的污染。

[0020] 最后,现在可以通过对RNA结合的物质特异性的RNA酶消化和/或热洗脱来实现洗脱,其在与所有先前方案中所采用的相同或更低的温度,并且在较低严格性的盐条件下进行,以确保可能残留的污染蛋白质不被共洗脱。

[0021] 总之,鉴于上文所述,发现与早期方法相比,新方法引起污染蛋白质水平的降低,鉴定出更多的RBP,并提高鉴定出的蛋白质的可靠性。

[0022] 优选的是根据本发明的方法,其中所述辐照选自UV光,例如约254nm或约365nm。

[0023] 在本发明的上下文中,术语“约”应当意指给定值的+/-10%的变化,除非另有指示。

[0024] 在根据本发明的方法的上下文中,在变性条件下溶解细胞。这样的条件从文献中是已知的,例如,如本文中所述的和目前的工艺水平。优选的是包含约500mM氯化锂和约0.5%十二烷基硫酸锂的缓冲液。

[0025] 其他优选的是根据本发明的方法,其还包括在分离所述复合物之前剪切基因组DNA的步骤。可以如本领域已知的那样进行剪切,例如,使样品分别通过22G针(gauge 0.7mm

直径)的注射器3-5次,随后通过27G针(gauge 0.4mm直径)的注射器5-10次。

[0026] 为了减少可能在捕获条件下存留的蛋白质-蛋白质相互作用,本发明人还加入了在裂解和剪切处理后于约60℃任选地孵育约10-15分钟。在该步骤后进行离心(于约4℃,约230-500x g,约3-5分钟),以去除不溶性物质,例如推测是在先前的方案中污染样品的基因组DNA的片段和膜结构,从而损害了其质量。

[0027] 优选地,根据根据本发明的方法,所述接触步骤c)于约37℃至约40℃进行。发明人在执行整个方案(包括捕获和所有洗涤)时,已经成功纯化了聚(A)RNA,包括于37-40℃而不是如先前技术版本中的4℃(冷室)下的捕获和所有洗涤。

[0028] 特别优选的是,根据本发明的方法,其还包括在约40℃的水中进行的严格的预洗脱,优选进行约5至约10分钟。LNA寡聚(A)RNA双链体的高稳定性允许加入于40℃在纯水中所进行的高严格性的预洗脱步骤。降低盐浓度会降低RNA-DNA和RNA-RNA双链体的稳定性,因此洗脱出对LNA探针亲和力较小的污染物核酸。重要的是要注意,这类预洗脱将与经典的寡聚(dT)探针不兼容。

[0029] 优选的是,根据本发明的方法,其中所述寡核苷酸洗脱是对RNA结合的物质特异性的,并且以与用于先前的方法的步骤相同的或更低的温度,并且在更低严格性的盐条件下进行,从而确保潜在的污染蛋白质不被共洗脱。

[0030] 优选的是,根据本发明的方法,其中通过适当的酶促消化,优选根据本领域的方法的合适的RNA消化来释放所述RBP。优选的是RNA酶A和/或T1。为了提高洗脱的特异性并减少共洗脱污染物的可能性,发明人用对RNA结合的物质特异性的于约37℃的基于RNA酶的洗脱(约30-60分钟)来代替热洗脱。

[0031] 根据本发明的方法还任选地包括离心和/或真空浓缩,优选真空浓缩RBP样品的步骤。这在浓缩后将样品回收率增加至几乎100%。

[0032] 最后,根据本发明的方法包括分析所释放的RBP。所述分析可以包括利用单罐固相增强的样品制备(Single-Pot Solid-Phase-enhanced Sample Preparation,SP3)、测序和定量质谱法进行制备。SP3在例如Hughes CS et al.,Ultrasensitive proteome analysis using paramagnetic bead technology.Mol Syst Biol.2014年10月30日;10:757或WO 2015/118152中有公开。核糖核苷酸复合物包含RNA和蛋白质,可以例如通过免疫印迹或质谱分析来分析所述核糖核苷酸复合物中的蛋白质,可以利用热洗脱以及例如测序或使用PCR来分析所述RNA。方法是技术人员已知的,并且在本领域有描述,例如在Marchese D.,et al.,Advances in the characterization of RNA-binding proteins.Wiley Interdiscip Rev RNA.2016Nov;7(6):793-810中。

[0033] 与寡核苷酸杂交的靶标RNA可能存在很大差异。在优选的情况下,寡核苷酸与聚(A)RNA杂交,其包括mRNA和长的非编码RNA。

[0034] 根据本发明,在方法的不同步骤,如杂交和洗涤步骤中使用了“高严格性条件”。如本文所用的高严格性条件是指适于产生具有足够的互补性的核酸,例如探针和靶标的结合对,而不适于在具有不足的互补性的结合成员之间形成结合对以提供所需的特异性的条件。在某些情况下,“高严格性”包括与高盐缓冲液,例如具有500mM的LiCl和0.1-0.5%(w/v)LiDS的缓冲液一起孵育。使用的条件应足以允许寡核苷酸与RNA靶标的高严格性杂交,但不能逆转样品的交联。例如,于约37-40℃洗涤捕获的复合物,用裂解缓冲液洗涤一次,并用

缓冲液1、2和3(见下文)中的每一种洗涤两次。然后将磁化的珠子于40℃于纯水中进行严格的预洗脱约5-10分钟。在另一方面,高严格性的条件包括在例如约40℃的温度下的低盐条件(例如,纯水),以使不需要的RNA-DNA和RNA-RNA双链体,以及RNA/DNA与固体支持物(例如磁珠)的非特异性相互作用不稳定,以便将污染物核酸洗脱出来。由于聚(A)束与含LNA的探针的相互作用被证明在甚至更严格的条件下是稳定的,因此,本发明还包括使用较高的,例如约3-5M或4M的含硫氰酸胍的缓冲液。

[0035] 优选的是,根据本发明的方法,其中所述寡核苷酸的长度为15-25个碱基,优选为20个碱基。可以合成LNA寡聚(T)捕获探针,并与其他长度和不同程度的LNA取代一起使用。用LNA-T取代DNA寡聚(dT)20寡核苷酸会导致所有LNA寡聚(T)设计中的热双链体稳定性显著提高,对应于每LNA胸苷单体,解链温度增加+2.8至+6.0℃。完全取代的LNA-T20具有高于95℃的TM,即具有极高的热稳定性。相比之下,例如,如本文所述的寡聚LNA2.T显示出77℃的TM,并因此相比所有DNA参照和/或对照探针增加37℃。因此,优选的是根据本发明的方法,其中所述寡核苷酸包括在所述寡核苷酸的每隔一个位置处的LNA,如LNA-T。本发明还考虑使用含有不同比例的LNA胸苷的寡聚(T)探针。

[0036] 在本发明的另一方面,根据本发明的方法还包括检测当与对照样品或在不同实验条件下获得的样品相比时,所检测的RBP的RNA结合的变化。因此,在某些实施方案中,可以使用上述方法获得两个或更多个不同样品中RNA的相互作用特征,并进行比较。在这些实施方案中,从上述方法获得的结果可以例如相对于对照RNA进行标准化,并进行比较。

[0037] 这可以通过比较比率或通过任何其他方式来完成。在特定实施方案中,可以比较两个或更多个不同样品的相互作用特征,以鉴定与特定疾病或病况相关的相互作用(例如,由疾病或病症诱导的并因此可以是该疾病或病况中所涉及到的通路的一部分的相互作用)。不同的样品可以由“实验”样品即目标样品以及可以与实验样品进行比较的“对照”样品组成。

[0038] 本发明的方法可用于各种诊断、药物发现和研究应用中,包括但不限于疾病或病况(其中RNA的相互作用的特征为该疾病或病况提供了标记物)的诊断或监测、药物靶标(其中特定的特征在疾病或病况中存在差异并且可被靶向以用于药物治疗)的发现、药物筛选(其中通过评估相互作用的特征来监测药物的作用)、确定药物敏感性(其中药物敏感性与相互作用的特定特征相关联)和基础研究(可适于确定与特定样品中的RNA的相互作用,或者在某些实施方案中,确定两个或更多个样品中的特定相互作用的相对水平)。

[0039] 本发明的另一方面涉及试剂盒,其包含用于进行根据本发明的方法的物质,例如与所述细胞的至少一种特异性的靶标RNA互补并且包含至少一个锁核酸(LNA)-核苷酸的至少一种合适的寡核苷酸、缓冲液、试剂和/或使用说明书。

[0040] 本发明的另一方面涉及根据本发明的试剂盒用于检测细胞中的RNA结合蛋白(RBP)的用途,例如,在检测如上文所述的RBP的RNA结合的变化的情况中。

[0041] 尽管先前版本的RNA相互作用组捕获技术已成功应用于数种细胞模型,但发明人已观察到,对于相当多的不同细胞类型,其不能适当地运行,显示出较高水平的污染物,如基因组DNA和非聚腺苷酸化的RNA。这些污染物及其相关蛋白质的共纯化会损害数据的质量和解释。

[0042] 当采用相对较小体积的细胞,例如白细胞和白血病细胞(其可能比最初开发RNA相

互作用组捕获的HeLa细胞小约20倍)时,先前技术的性能欠佳尤其明显。与以前的版本相反,本发明的增强的RNA相互作用组捕获方案已被证明是成功的,即使当将其应用于具有挑战性的细胞类型(包括上述类型)时,提供了更清洁的结果,大大减少了污染物DNA/非聚(A)RNA及其相关蛋白。

[0043] 更详细地,发明人的方法是基于RNA相互作用组捕获,其允许无偏倚地识别与细胞RNA结合的蛋白质组。在先前的技术中,通过以254nm或365nm的0.15J cm^{-2}(PAR-CL)UV光辐照细胞来在体内将RNA结合蛋白(RBP)与RNA共价交联。随后,在变性条件下将细胞溶解,并使用与磁珠偶联的寡聚(dT)来纯化核糖核蛋白复合物。对捕获的复合物进行连续数轮的严格洗涤,然后加热洗脱(50-55℃,5分钟)。然后通过RNA酶消化来释放蛋白质,使用Amicon超离心过滤器(例如Millipore)浓缩,最后通过定量质谱法进行鉴定。

[0044] 本发明的方法"增强的RNA相互作用组捕获"是基于寡聚(dT)探针的利用,其中一些核苷酸被称为锁核酸(LNA)的一类核苷酸类似物所取代。LNA-T对互补聚(A)束显示出更高的亲和力,并允许应用更严格的条件,减少污染,而不损害或甚至增强聚(A)RNA的捕获。

[0045] 通过在20-mer(LNA2.T)的每隔一个位置处掺入例如LNA-T,发明人已经能够于37-40℃,而非以前的技术中的4℃,执行包括捕获和所有洗涤在内的整个方案时成功纯化聚(A)RNA。

[0046] 另外,发明人通过在40℃,于纯水中加入高严格性的预洗脱步骤,来利用高稳定性的LNA2.T-聚(A)RNA双链体(降低盐浓度降低了RNA-DNA和RNA-RNA双链体的稳定性,因此这里洗脱了对LNA2.T探针具有较低亲和力的污染物核酸)。重要的是要注意,这类预洗脱将与经典的寡聚(dT)探针不兼容。与先前的方案相比,随方案增加的温度联合增加的预洗脱步骤,导致基因组DNA和非多聚腺苷酸化的RNA如28S和18SrRNA的污染大大减少了数百倍。

[0047] 在先前版本的RNA相互作用组捕获中,捕获和洗涤于4℃进行,而洗脱在50-55℃进行。温度的这种突然升高可能导致污染物的共洗脱(包括与用于下拉(pull down)的珠子非特异性结合的蛋白质)。为了提高洗脱的特异性并减少共洗脱污染物的可能性,发明人通过在约37℃的基于RNA酶的洗脱(约30-60分钟)来代替热洗脱。因此,现在可以在与以前整个方案所采用的温度相同或更低的温度下,并且在较低严格性的盐条件下,实现洗脱,以确保污染物蛋白质不被共洗脱。此外,由于RNA酶介导的洗脱是对RNA结合的物质特异性的,因此其避免了通过生物物理方法如升高的温度洗脱与珠子基质结合的污染物的问题。

[0048] 在发明人的新方案中,优选使用SpeedVac对蛋白质样品进行真空浓缩。使用先前采用的Amicon超离心过滤器(Millipore)可能仍然是合适的,但通常与蛋白质损失有关。因此,新方案可将浓缩后的样品回收率提高到几乎100%。

[0049] 尽管先前版本的RNA相互作用组捕获已成功应用于各种细胞模型,但发明人和其他人观察到,其对于多种不同的细胞类型不能适当地进行,显示出较高水平的污染物,如基因组DNA和非聚腺苷酸化的RNA。这些污染物及其相关蛋白质的共纯化可能损害数据的质量和解释。当采用相对较小体积的细胞,例如,白细胞和白血病细胞(其可能比最初开发RNA相互作用组捕获的HeLa细胞小约20倍)时,先前技术的性能欠佳尤其明显。与以前的版本相反,新的增强的RNA相互作用组捕获方案已被证明是成功的,即使当应用于具有挑战性的细胞类型(包括上述提到的类型)时,提供了更清洁的结果,大大减少了污染物DNA/非聚(A)RNA及其相关蛋白。

[0050] 由于捕获/洗涤的更高的严格性和洗脱的更高的特异性,在根据本发明的方法中污染物蛋白质显著减少。为了在相互作用组捕获测定中被视为命中,通常需要相对于未交联但以其他方式相同处理的对照(noCL)富集交联的样品中的蛋白质。通过降低noCL对照中的污染物蛋白质水平,基于LNA的相互作用组导致鉴定出更可靠的RBP和更高数量的RBP,并有助于鉴定那些蛋白质在不同实验条件下的RNA结合的变化——发明人称之为"比较RNA相互作用组捕获"的方法。

[0051] 本发明在所谓的"发现应用"(例如靶标鉴定、药物作用研究等,另见上文)中特别有用,其中高度的敏感性和低背景水平至关重要。

[0052] 本发明的每个方面的优选特征经必要的修改与每个其他的方面相似。本文中提及的现有技术文件在法律允许的最大范围内被并入。尽管已经详细描述了本发明及其优点,但是应该理解,在不脱离所附权利要求书所限定的本发明的精神和范围的情况下,可以在本文中进行各种改变、替换和变更。在下面的实施例中将进一步说明本发明,给出这些实施例仅用于说明目的,且不旨在以任何方式限制本发明。

[0053] 图1显示了当与其靶标DNA或RNA序列杂交时,常规的dT 20mer寡核苷酸的解链温度相比于所示的LNA寡聚物的比较。

[0054] (A)用于增强的相互作用组捕获的LNA2.T探测的方案。黑色和红色T分别代表DNA和LNA胸腺嘧啶碱基。还描述了所采用的5AmMC6柔性连接子。(B)当与DNA和RNA互补链结合时,预测的LNA2.T与相同长度的标准DNA寡核苷酸的解链温度(Tm)的比较。LNA2.T-RNA双链体在高得多的温度下仍保持稳定(Tm=77℃对比40℃)。LNA2.T在预期的-RNA和不良的-DNA双链体之间也表现出更大的解链温度差异(ΔTm=+30℃对比-6℃)。水平的红线表示先前的方法(4℃)相对于增强的相互作用组捕获(37-40℃)中所采用的捕获和洗涤温度。使用Exiqon(www.exiqon.com)提供的专用工具计算Tm。假定盐浓度(Na+)为115mM,且pH为中性(pH 7-8)。

[0055] 图2显示了通过增强的相互作用组捕获所捕获的RNA的分析。使用6000Pico生物分析仪来分析通过先前的方法(寡聚(dT))或增强的相互作用组捕获(LNA2.T)获得的洗脱液。增强的相互作用组捕获导致非聚(A)(和高度丰富的)RNA 18S和28S rRNA的数量减少,但其导致更高水平的预期的mRNA大小范围的RNA。注意,在增强的相互作用组捕获中并入利用纯水的预洗脱步骤(pre-elu)导致有效洗脱rRNA,尤其是28S rRNA,而不会影响聚(A)RNA的捕获。在右图中显示了代表性的电泳图。通过增强的相互作用组捕获,洗脱液中rRNA对比总RNA的分数从约35%降低到约3%。

[0056] 图3显示了通过增强的相互作用组捕获所捕获的RNA的分析。使用6000Pico生物分析仪分析了通过先前的方法(寡聚(dT))或增强的相互作用组捕获(LNA2.T)获得的洗脱液的代表性电泳图。将样品也与用于LNA2.T的相同珠子一起孵育,但其未与任何寡聚物偶联,并进行增强的相互作用组捕获方案(珠子)。用未偶联的珠子未捕获到大量的RNA,这表明通过增强相互作用组捕获来下拉(pull down)RNA是通过与LNA2.T探针的相互作用而不是通过与固体支持物的非特异性的相互作用来实现的。注意在"珠子"电泳图中较小的比例。

[0057] 图4显示了通过增强的相互作用组捕获来有效捕获聚(A)RNA。使用SuperScript™II逆转录酶试剂盒(Thermo)对通过先前的方法(寡聚(dT))或增强的相互作用组捕获(LNA2.T)获得的洗脱液进行逆转录,并在QuantStudio™7Flex实时PCR系统

(Thermo)中通过QPCR确定所示的mRNAs的丰度。设计引物以防止基因组DNA的扩增。所采用的引物的序列为:

[0058] GAPDH Fw:TGGAGATTGTTGCCATCAACGA (SEQ ID NO:1);

[0059] GAPDH Rv:CCCATTCTCGGCCTTGACTGT(SEQ ID NO:2);

[0060] β肌动蛋白Fw:TCACCGGAGTCCATCACGAT(SEQ ID NO:3);和

[0061] β肌动蛋白Rv:CGCGAGAAGATGACCCAGAT(SEQ ID NO:4)。

[0062] 图5显示了通过增强的相互作用组捕获而耗尽了特异性的rRNA。使用SuperScript™II逆转录试剂盒(Thermo)对通过先前的方法(寡聚(dT))或增强的相互作用组捕获(LNA2.T)获得的洗脱液进行逆转录,并在QuantStudio™7Flex实时PCR系统(Thermo)中通过QPCR进行分析。所用引物的序列为:

[0063] 28S Fw TTA CCC TAC TGA TGA TGT GTT GTT G(SEQ ID NO:5)。

[0064] 28S Rv CCT GCG GTT CCT CTC GTA(SEQ ID NO:6)。

[0065] 18S Fw GAAACTGCGAATGGCTCATTAAA(SEQ ID NO:7)。

[0066] 18S Rv CACAGTTATCCAAGTGGGAGAGG(SEQ ID NO:8);

[0067] 5S Fw GGC CAT ACC ACC CTG AAC GC(SEQ ID NO:9);和

[0068] 5S Rv CAG CAC CCG GTA TTC CCA GC(SEQ ID NO:10)。

[0069] 图6显示了增强的相互作用组捕获导致DNA污染的显著减少。通过在QuantStudio™7Flex实时PCR系统(Thermo)中的QPCR分析通过先前的方法(寡聚(dT))或增强的相互作用组捕获(LNA2.T)获得的洗脱液,而无需进行逆转录。分析了广泛的基因类别,包括基因组中具有众多拷贝的常见污染物基因。分析的基因包括核蛋白编码基因TBP3、PABP、RPS6和ZNF80、45S rDNA、逆转座子L1.3和线粒体蛋白编码基因CYTB。使用相同的引物测定ZNF80 gen和mRNA的水平。在用TURBO DNA酶(Thermo)消化DNA并使用SuperScript™II逆转录试剂盒(Thermo)进行逆转录后,测定ZNF80 mRNA水平。所用引物的序列为:

[0070] 45S Fw:TCGCTGCGATCTATTGAAAG(SEQ ID NO:11);

[0071] 45S Rv:AGGAAGACGAACGGAAGGAC(SEQ ID NO:12);

[0072] L1.3 Fw:TGAAAACCGGCACAAGACAG(SEQ ID NO:13);

[0073] L1.3 Rv:CTGGCCAGAACTTCCAACAC(SEQ ID NO:14);

[0074] CYTB Fw:ACCCCCTAGGAATCACCTCC(SEQ ID NO:15);

[0075] CYTB Rv:GCCTAGGAGGTCTGGTGAGA(SEQ ID NO:16);

[0076] ZNF80_Fw:CTGTGACCTGCAGCTCATCCT(SEQ ID NO:17);

[0077] ZNF80_Rv:TAAGTTCTCTGACGTTGACTGATGTG(SEQ ID NO:18);

[0078] TBP3 Fw:GTGAGAAGATGGATGTTGAGTTG(SEQ ID NO:19);

[0079] TBP3 Rv:GATAGCAGCACGGTATGAGC(SEQ ID NO:20);

[0080] RPS6 Fw:TGAAGTGGACGATGAACGCA(SEQ ID NO:21);

[0081] RPS6 Rv:CCATTCTTCACCCAGAGCGT(SEQ ID NO:22);

[0082] PABPC1 Fw:CCAGGCTCACCTCACTAACC(SEQ ID NO:23);和

[0083] PABPC1 Rv:CTGGCTGGTAGGGGTTGATT(SEQ ID NO:24);

[0084] 图7显示了通过增强的相互作用组捕获来有效捕获RNA结合蛋白。通过SDS-PAGE和银染分离通过先前的方法(寡聚(dT))或增强的相互作用组捕获(LNA2.T)所捕获的蛋白质

(A),或对其进行针对特异性的真正RBP的蛋白质印迹(B)。(A)+UV样品中独特的谱带特征表明通过两种方案捕获不同的蛋白质。黑色和蓝色箭头表示与寡聚(dT)相比在LNA2.T中耗尽或富集的特异性的条带的实例。(B)蛋白质印迹表明,通过增强的相互作用组捕获,对RBP UnR、Nono和HuR的捕获更大。

[0085] 图8显示了通过增强的相互作用组捕获减少的蛋白质污染和提高的RBP检测。将通过先前的方法(寡聚(dT))或增强的相互作用组捕获(LNA2.T)捕获的蛋白质在SpeedVac浓缩器系统(Thermo)中进行真空浓缩,通过SP3处理,分馏,并通过定量蛋白质组学进行分析。(A)显示在未辐照对照中检测到的蛋白质分布的火山图。当应用LNA2.T时,污染蛋白质的数量和量大大减少。(B)用寡聚(dT)和LNA2.T捕获的蛋白质的维恩(Venn)图。LNA2.T识别更多的蛋白质(638对比583)。基因本体论(GO)分析表明,其中许多是已知的mRNA相互作用子。另外,LNA2.T缺乏9种主要与rRNA而非mRNA代谢相关的蛋白质,表明通过LNA2.T减少了蛋白质污染。这些蛋白质以及富含LNA2.T的真正RBP的实例如图8的C中所示。

[0086] 图9显示eRIC以高特异性捕获多聚腺苷酸化的RNA和共价交联的蛋白质。(a)eRIC程序的示意图。通过用254nm UV光照射细胞,来在体内将RBP与RNA交联。采用LNA修饰的探针分离交联的蛋白质,在高温和低盐条件下严格洗涤,用RNA酶洗脱,并通过MS鉴定。右图中示出了与以前的RIC方案的比较。(b、c)使用6000Pico生物分析仪(b)或通过RT-qPCR(c)分析通过eRIC、RIC或使用随eRIC方案的未偶联的珠子(“珠子”)分离的核酸。注意,在eRIC中并入的预洗脱步骤(“Pre-elu”)导致有效地预洗脱rRNA,尤其是28S rRNA,而不会影响聚(A)RNA的捕获。数据显示为来自至少三个生物学独立的实验的平均值+标准差。(d、e)通过SDS-PAGE分离分离的蛋白质并银染(d),或通过蛋白质印迹用阳性对照RBP UNR、NonO和HuR的抗体进行分析(e)。Re-elu:在RNA酶处理后进行热洗脱。注意,HuR的一小部分似乎与非聚腺苷酸化的RNA[38]相关。

[0087] 图10显示了eRIC在RBP检测中的优越性能。(a)eRIC和RIC的比较分析的工作流程方案。(b)显示通过eRIC(右图)和RIC(左图)鉴定的蛋白质的交联的相比未交联的样品的log2倍数变化(FC)(x轴)和P值(y轴)的火山图。p值<0.05且FC≥2的蛋白质被认为是显著富集的,并以红色表示。(c)通过eRIC(红色)和RIC(蓝色)鉴定的蛋白质的辐照的和非辐照的样品之间的log2-FC的密度。(d)比较通过eRIC(y轴)和RIC(x轴)检测到的蛋白质的辐照的相比未辐照的样品的平均log2-FC的散点图。通过eRIC和RIC回收的命中均以绿色显示,对于eRIC或RIC独有的命中分别为洋红色和蓝色,而通过两种方法鉴定为背景的蛋白质以黑色显示。(e)比较通过eRIC和RIC鉴定的命中数的维恩图。(f)通过eRIC专门鉴定的97个命中的辐照的和未辐照的样品的归一化信号总和。***表示p<0.001(Wilcoxon符号秩检验)。(g)通过eRIC和RIC鉴定的已知RBP、酶、enigmRBP[4]和代谢酶的数量。(h)显示这里提出的eRIC和RIC实验与先前发表的RBP数据集之间的交集的UpSet图。b-h中显示的数据对应于两个生物学独立的实验。

[0088] 图11显示了利用eRIC进行的差异RBP富集。(a)在eRIC和RIC之间其在辐照的相比未辐照的样品中的富集差异显著(p值<0.05且FC>2,144种蛋白质)的蛋白质的无监督聚类和GO分析。观察到三个主要的簇,其包含优选通过RIC(上图)或eRIC(中图和下图)回收的RBP。显示了针对每个簇富集的生物过程GO术语。上图:“核糖体生物发生”(-log10(p值)=39.95;富集=40.6),中图:“mRNA加工”(18.36;14.85),下图:“通过剪接体的mRNA剪接”

(33.48;52.4)、“mRNA运输”(8.52;30.85)和“mRNA稳定性的调节”(4.04;17.08)。(b)通过eRIC和RIC捕获的代表性实例RBP的辐照的相比未辐照的样品的倍数变化。数据显示为来自两个生物学独立实验的平均值和标准偏差。

[0089] 图12显示了eRIC在RBP响应的比较分析中的优越性能。(a)实验设计:将Jurkat细胞与0.5mM的DMOG或媒介物DMSO一起孵育6小时。辐照后,将细胞溶解,并将裂解液均分用于进行eRIC或RIC分析。n=2个独立实验。(b)总结RNA结合的蛋白质组对通过eRIC(右图)或RIC(左图)确定的DMOG处理的反应的饼图。显示了在DMOG后显示恒定的(灰色)、增加的(绿色)或减少的(紫色)RNA结合的蛋白质的数量和百分比。(c)比较通过每种方法鉴定的DMOG响应性RBP的数量的维恩图。(d)显示通过eRIC(右图)和RIC(左图)检测到的蛋白质的DMOG对比媒介物处理和辐照的样品的p值(y轴)和log2倍变化(FC)(x轴)的火山图。p值<0.05且每个重复中的至少10%为一致的FC的蛋白质被视为命中,并以红色表示。(e)通过eRIC(红色)和RIC(蓝色)鉴定的蛋白质的DMOG相比媒介物处理的样品中log2-FC的密度。(f)检测的蛋白质的比较两个独立实验的log2比率(DMOG/媒介物)的散点图。(g)显示eRIC/RIC命中的蛋白质log2比率(DMOG/媒介物)的热图。根据其在eRIC和/或RIC中的出现来对命中进行分离,并聚类。(h)在通过eRIC和/或RIC鉴定的DMOG响应性RBP中富集的代表性生物过程和细胞成分。(i)对具有统计学意义的DMOG有反应的蛋白质复合物或功能相关蛋白质的实例。

[0090] 图13显示eRIC可鉴定出体内对m6A响应的RBP。(a)使用两种独立的抗体(抗体1:Abcam,抗体2:SySy),用0.5mM DMOG或媒介物处理6小时的Jurkat细胞的m6A点印迹。(b)通过eRIC/RIC鉴定的DMOG响应性RBP与先前由Edupuganti et al.[21]或Arguello et al.[20]报告的m6A调节的RBP之间的重叠。方括号之间是与先前的报道一致的DMOG诱导的变化的具有方向的蛋白质数量。(c)报告的m6A读数器(左图)、m6A排斥的RBP(中图)和对m6A不敏感的RBP(右图)的代表性实例的eRIC和RIC样品的标准化信号总和。eRIC和RIC值相对于各自未处理的对照(-UV、DMSO)表示。数据显示为来自两个生物学独立实验的平均值和标准偏差。*表示FDR<0.05。

[0091] SEQ ID NO:1-25显示了如本发明的文中所用的寡核苷酸的序列。

实施例

[0092] 简介

[0093] 本发明的增强的RNA相互作用组捕获(eRIC)允许在体内全面和无偏倚地鉴定与聚(A)RNA相关的蛋白质。该方法依赖于寡聚(T)探针的利用,其中一些碱基被锁核酸(LNA)取代,后者是其中糖环的构象被亚甲基桥锁住的一类核苷酸类似物。

[0094] 详细地,本发明的方法的一个实施方案包括一系列步骤,如下所示:

[0095] 将UV光(通常为254nm或365nm波长)应用于培养的细胞、组织或生物体,以在体内将RNA结合蛋白(RBP)与RNA共价交联。

[0096] 随后,在包括500mM氯化锂和0.5%的十二烷基硫酸锂(参见以下的溶解缓冲液组分)在内的变性条件下溶解物质。

[0097] 为了剪切基因组DNA并降低粘度,将样品分别通过22G针(gauge0.7mm直径)的注射器3-5次并通过27G针(gauge 0.4mm直径)的注射器5-10次。将裂解物于60℃孵育10-15分钟,并通过离心澄清(230-500xg,3-5分钟,4℃)。通过在37-40℃下将澄清的提取物与固体

支持物如磁珠偶联的带有LNA的寡聚(T)一起孵育30-60分钟来捕获聚(A)RNA-蛋白质复合物。

[0098] 然后,将捕获的复合物于37-40℃洗涤,用裂解缓冲液洗涤一次,并用缓冲液1、2和3(参见下面的组成)中的每一种洗涤两次。将磁珠磁化,并在40℃的纯水中进行5-10分钟的严格的预洗脱。

[0099] 通过于37℃用RNA酶A和T1进行RNA消化来释放与聚(A)RNA结合的RBP,然后通过SpeedVac浓缩以最大程度减少样品损失。最后,通过单罐固相增强的样品制备(SP3)来制备蛋白质样品,并进行定量质谱法分析。

[0100] 材料和方法

[0101] 细胞培养。在37℃和5%CO_2的湿润孵育器中,在175cm^2烧瓶(Falcon,353028)中,于补充有10%热灭活的胎牛血清(Gold,GE Healthcare)和青霉素/链霉素(Sigma-Aldrich,P4333)的RPMI 1640培养基(Thermo Fisher Scientific,21875034)中,将Jurkat细胞(DSMZ,ACC-282)作为悬浮培养物来进行维持。

[0102] LNA修饰的寡核苷酸与羧化的磁珠的偶联。捕获探针(HPLC纯的;Exiqon)由5'端的伯胺、柔性C6连接子和20个胸腺嘧啶核苷酸组成,其中每隔一个的核苷酸为LNA:/5AmMC6/+TT+TT+TT+TT+TT+TT+TT+TT+TT+TT(+T:LNA胸腺嘧啶,T:DNA胸腺嘧啶)[10]。将探针重悬于无核酸酶的水(Ambion)中,使其终浓度为100mM,并按如下所述在DNA低结合管(Eppendorf)中通过5'胺将其与羧化的磁珠(Perkin Elmer,M-PVA C11)偶联,或保持在-20℃直到偶联。用5体积的50mM 2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)缓冲液(pH 6),将50mg/mL的珠子浆液洗涤3次。新鲜制备了20mg/mL的于MES缓冲液中的N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC-HCl;Sigma-Aldrich)的溶液。将5体积与1体积的100mM探针溶液合并,并将其加入到来自1体积的珠子浆液的沉淀的洗涤珠子中(对于一次捕获:1.5mL EDC溶液+300mL探针溶液+300mL珠子浆液)。在50℃和800rpm下进行偶联5h,偶然会有沉淀。然后将珠子用PBS洗涤两次,然后与200mM乙醇胺pH 8.5一起在37℃、800rpm孵育1小时,以灭活任何残留的羧基残留物。最后用1M的NaCl将偶联的珠子洗涤3次,并在4℃储存在0.1%PBS-Tween中。

[0103] LNA2.T包被的珠子的回收。偶联的珠子可重复使用多次。为此,与LNA探针相互作用的聚(A)延伸(预期对RNA消化具有抗性)必须通过其他方式洗脱。另外,必须消除来自洗脱液的任何痕量的RNA酶。珠子在这项工作中被重复使用了数次,并且在其他工作中被重复使用了至少8次,效果最佳。

[0104] 将用于捕获的偶联的珠子(300mL)重悬于400mL无核酸酶的水(Ambion)中,转移至1.5mL管中,并在95℃、800rpm孵育5-10分钟。此后立即于珠子浆液冷却之前,通过磁力收集珠子,并丢弃上清液。然后将珠子用5体积的水洗涤3次,并用5体积的裂解缓冲液洗涤3次,并在4℃储存在0.1%PBS-Tween中直至使用。

[0105] 使用eRIC分离RBP。细胞裂解。每份样品以约1-1.5x 10^6细胞/mL的密度使用1.0-1.3x 10^8增殖的Jurkat细胞。在进行处理之前,将0.5mM DMOG(Cayman Chemical Company,71210)或等体积的二甲基亚砜(DMSO)(媒介物,Merck 1.02950.0500)添加到培养基中6小时。培养基中的DMSO浓度为0.023%v/v。在4℃以400g离心5分钟来收集细胞,重悬于40mL冷PBS中,并分入到两个145x 20mm培养皿(Greiner Bio-One,639102)中,将其沉积在预先在冰上冷却的金属板上,并在Spectrolinker XL-1500(Spectronics Corporation)中于

254nm UV光下以150mJ/cm^2照射。在-UV对照中省略了辐照。在持续保持4℃的同时,将细胞转移到50mL锥形离心管中,以400g沉淀5分钟,并溶解在7.5-10mL补充了cOmplete蛋白酶抑制剂混合物(Roche,11873580001)的冰冷裂解缓冲液(见以下组分)中。为了提高均质性,将样品分别通过22Gauge针(0.7mm直径)的注射器3-5次以及27Gauge针(0.4mm直径)的注射器6-10次,在液氮中速冻,并保持在-80℃数天,直到进一步处理。

[0106] RNP复合物的捕获。将细胞裂解物在37℃水浴中融化,在60℃孵育15分钟,在冰上迅速冷却,并以最大速度和4℃澄清5分钟。将额外的5mM的DTT添加到样品中。将LNA2.T偶联的珠在裂解缓冲液中平衡(3次缓冲液交换,每次3体积的裂解缓冲液)。在保存100mL作为输入后,将裂解液与300mL平衡的LNA2.T偶联的珠子一起在37-40℃(在培养箱内)孵育1小时,并轻轻旋转以捕获RNA-蛋白质复合物。用磁铁收集珠子,并将上清液转移到新管中进行第二轮捕获。对珠子进行连续数轮洗涤,每轮在轻轻旋转下,于37-40℃(在培养箱内),用10mL预热至37-40℃的相应的缓冲液进行5分钟。发明人用裂解缓冲液进行一次洗涤,并用缓冲液1、2和3(见以下组分)中的每一种进行两次连续的洗涤。在220mL无核酸酶的水(Ambion)中于40℃和800rpm进行5分钟的预洗脱。然后,将珠子悬液分成两等份,一份为200mL,用于RNA酶介导的洗脱以用于蛋白质分析,且一份为20mL,其经热洗脱以用于RNA/DNA分析。对于RNA酶介导的洗脱,将珠子重悬于150mL的1x RNA酶缓冲液(见以下组分)、5mM DTT、0.01%NP40、~200U RNA酶T1(Sigma-Aldrich,R1003-100KU)和~200U RNA酶A(Sigma-Aldrich,R5503)中,并在37℃以800rpm孵育30-60分钟。然后用磁铁收集珠子,并将上清液转移到新管中,将其再次放在磁铁上(以完全除去任何痕量的珠子),然后保存上清液。将洗脱液保持在冰上直至完成第二轮捕获。然后,将合并的洗脱液补充2mL的10%SDS,并使用SpeedVac浓缩直至体积小于100mL(30-45分钟,37℃),速冻,并在-80℃下保存。在95℃、800rpm的条件下,用15mL洗脱缓冲液(见以下组分)对专门保留的珠子进行热洗脱5分钟。立即收集珠子,并迅速回收上清液(在温度下降之前)。如前所述,通过第二轮收集消除了任何痕量的珠子。

[0107] 缓冲液:

[0108] 裂解缓冲液:20mM Tris-HCl(pH 7.5),500mM LiCl,1mM EDTA,5mM DTT,0.5%(w/v)LiDS。

[0109] 缓冲液1:20mM Tris-HCl(pH 7.5),500mM LiCl,1mM EDTA,5mM DTT,0.1%(w/v)LiDS。

[0110] 缓冲液2:20mM Tris-HCl(pH 7.5),500mM LiCl,1mM EDTA,5mM DTT,0.02%(v/v)NP40。

[0111] 缓冲液3:20mM Tris-HCl(pH 7.5),200mM LiCl,1mM EDTA,5mM DTT,0.02%(v/v)NP40。

[0112] 洗脱缓冲液:20mM Tris-HCl(pH 7.5),1mM EDTA。

[0113] 10x RNA酶缓冲液:100mM Tris-HCl(ph 7.5),1.5mM NaCl。

[0114] 使用RNA相互作用组捕获(RIC)进行RBP分离。如eRIC一样进行细胞裂解,并如先前所述[2,31]实现了RBP分离。简言之,将裂解物在37℃水浴中融化,并在采用100μL作为输入后,于轻轻旋转下,将其与300μL平衡的寡聚(dT)25磁珠(NEB)一起在4℃下孵育1小时。用10mL冰冷的缓冲液洗涤珠子。将RNP复合物在165μL的洗脱缓冲液中于55℃和800rpm洗脱5分钟。取等分试样15μL,并用于RNA/DNA分析。将剩余的150μL与10x RNA酶缓冲液、1M DTT和1%

NP40(终浓度:1xRNA酶缓冲液、5mM DTT、0.01％NP40)和～200U RNA酶T1和RNA酶A(Sigma-Aldrich)合并。将RNA在37℃下消化60分钟。进行两轮捕获,并将合并的洗脱液浓缩,并按照针对eRIC所述的进行存储。将RIC洗脱液的最终体积调整为相应的eRIC洗脱液的体积。

[0115] 用于质谱分析和TMT标记的样品制备。将捕获的蛋白质在56℃,在于50mM HEPES(pH 8.5)中的10mM二硫苏糖醇中还原30分钟,并在黑暗中,于RT,在50mM HEPES(pH 8.5)中用20mM 2-氯乙酰胺烷基化30分钟。使用SP3方案[11]制备样品。将蛋白质于37℃ ON,以1:50的酶与蛋白质的比例,通过胰蛋白酶(Promega)进行消化。根据厂商的说明书,使用TMT10plex Isobaric标记试剂(Thermo Fisher Scientific)对肽进行标记。为了进一步清洁样品,使用了OASIS HLBμ洗脱板(Waters)。在配有Gemini C18柱(3μm,110 Å,100x 1.0mm,Phenomenex)的Agilent 1200Infinity高效液相色谱系统上进行离线高pH反相分级。

[0116] 质谱数据采集。采用配有捕集盒(μ-Precolumn C18 PepMap 100,5μm,300μm i.d.x 5mm,100 Å)和分析柱(nanoEase™M/Z HSS T3柱75μm x 250mm C18,1.8μm,100 Å,Waters)的UltiMate 3000RSLC nano LC系统(Dionex)。用恒定流速的溶剂A(于水中的0.1％甲酸)以30μL/min在捕集柱上进行捕集6分钟。随后,以0.3μL/min的恒定流速,以4min内2％-4％、2min内4％-8％、96min内8％-28％,以及最后10min内28％-40％的递增百分比的溶剂B(于乙腈中的0.1％甲酸),经分析柱洗脱肽。使用正离子模式的proxeon纳米流源,将分析柱的出口直接偶联至QExactive plus质谱仪(Thermo Fisher Scientific)。

[0117] 通过Pico-Tip Emitter 360μm OD x 20μm ID;10μm tip(New Objective),施加2.3kV的喷涂电压,将肽引入QExactive plus中。毛细管温度设定在320℃。在FT中以概况(profile)模式和70000的分辨率,以350-1400m/z的质量范围获取全质量扫描。填充时间设置为最大100ms,极限为$3x10^6$个离子。将Orbitrap的分辨率设置为35000,以填充时间为120ms,且极限为$2x10^5$个离子,来进行依赖数据的采集。应用32的归一化的碰撞能量。仪器设置为在MS和依赖数据的基于MS/MS的采集之间交替,每个周期最多10个MS/MS事件。使用的最小AGC触发为2e2,且动态排除时间为30s。肽匹配算法设置为“首选”,且电荷排除设置为“未分配”,电荷状态+1,且+5至+8被排除。MS/MS数据是在概况模式下获取的。

[0118] 质谱数据分析。将IsobarQuant32 and Mascot(v2.2.07)用于处理获取的数据,针对Uniprot智人蛋白质组数据库UP000005640搜索该数据,所述数据库包含常见的污染物和反向序列。以下修饰被包括在搜索参数中:脲甲基化(C)和TMT10(K)(固定的修饰)、乙酰基(N端)、氧化(M)和TMT10(N末端)(可变修饰)。全扫描(MS1)和MS/MS光谱的质量误差容差分别设置为10ppm和0.02Da。允许最多两次错过的切割,并且最小的肽长度设定为7个氨基酸。至少需要两个独特的肽来鉴定蛋白质。肽和蛋白质水平的错误发现率设置为0.01。使用R编程语言(ISBN 3-900051-07-0)来分析IsobarQuant的原始输出数据。使用limma包[33]去除潜在的批次效应。使用vsn包[34]对原始数据进行方差稳定化归一化处理。估计了交联和非交联条件的单个归一化系数。在DMOG相对于DMSO比较期间,为方案(RIC或eRIC)选择了另外的组块因子。使用limma包测试标准化数据的差异表达。复制因子包括在线性模型中。为了进行交联的vs非交联的之间的比较,将命中定义为错误发现率低于5％且倍数变化大于2的那些蛋白质。在eRIC/RIC比较实验中,首先测试了蛋白质相比-UV对照的富集,并在相应的+UV样品中比较在至少一种条件下富集的蛋白质的强度。采用R包fdrtool[35]来计算使用来自limma

输出的t值的错误发现率。错误发现率小于5%且每次重复的一致倍数变化至少为10%的蛋白质被定义为命中。ggplot2 R包([36])用于生成图示。

[0119] 命中分类和GO分析。基于人类RIC研究的精选集[5]和RBP的精选集[12],按先前所述对在“单点”eRIC/RIC实验中确定的RBP进行分类。与其他RIC数据集的重叠显示在UpSet图[37]中。

[0120] 使用Venny 2.1.0(Oliveros,J.C.(2007-2015),http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html),进行通过eRIC和RIC鉴定的DMOG响应的命中与先前报道的m6A调控的RBP[20,21]的比较。分析仅限于通过eRIC/RIC比较实验检测到的那些蛋白质。将Fisher's精确检验用于计算eRIC和RIC样品间m6A响应的蛋白的富集。

[0121] 利用AmiGO 2(由PANTHER提供支持)进行GO术语富集分析,使用了以下参数:分析类型:PANTHER过表达检验;参考文献列表:智人(数据库中的所有基因);注释数据集:如所示,GO生物过程完整或GO细胞组件完整;检验类型:Fisher's精确,FDR多重检验校正。手动编排了过多代表的GO术语,且由于空间限制,在主要图片中仅包含了选定的术语。将ggplot2 R包([36])用于生成图示。

[0122] 生物分析仪和实时PCR。使用NanoDrop分光光度计(Thermo Fisher Scientific)估算捕获的RNA(热洗脱)的浓度。为了确定捕获的RNA的概况,将每个样品1μL稀释至5-10ng/μL,并按照制造商的指示,使用RNA 6000Pico试剂盒在Agilent 2100生物分析仪系统中进行分析。使用Quick-RNA MicroPrep试剂盒(Zymo)纯化来自全细胞裂解物的总RNA,并进行了类似的分析。

[0123] 根据制造商的说明,使用SuperScript II(Life Technologies)和随机六聚体(Life Technologies)将2-5μL未稀释的捕获RNA反转录为cDNA。使用SYBR Green PCR Master Mix(Life Technologies,4309155),在QuantStudio 6Flex系统(Life Technologies)中进行实时定量PCR,使用了以下引物(均为5'-3',正向:f,反向:r):28S rRNA(f:TTACCCTACTGATGATGTGTTGTTG(SEQ ID No.5),r:CCTGCGGTTCCTCTCGTA(SEQ ID No.6)),RPS6(f:TGAAGTGGACGATGAACGCA(SEQ ID NO.21),r:CCATTCTTCACCCAGAGCGT(SEQ D No.22)),ZNF80(f:CTGTGACCTGCAGCTCATCCT(SEQ ID No.17),r:TAAGTTCTCTGACGTTGACTGATGTG(SEQ ID NO.18))。

[0124] 来自[2]:β-肌动蛋白(r:CGCGAGAAGATGACCCAGAT(SEQ ID No.4),f:TCACCGGAGTCCATCACGAT(SEQ ID No.3)),GAPDH(f:GTGGAGATTGTTGCCATCAACGA(SEQ ID No.25),r:CCCATTCTCGGCCTTGACTGT(SEQ ID No.2))和18S rRNA (f:GAAACTGCGAATGGCTCATTAAA (SEQ ID No.7),r:CACAGTTATCCAAGTGGGAGAGG(SEQ ID No.8))。

[0125] 来自[3]:L1.3(f:TGAAAACCGGCACAAGACAG(SEQ ID No.13),r:CTGGCCAGAACTTCCAACAC(SEQ ID No.14))。

[0126] 蛋白质印迹和银染。eRIC/RIC质量控制。通过SDS-PAGE分离通过eRIC或RIC共纯化的或存在于全细胞裂解液(输入)中的蛋白质,并按照标准程序进行银染,或转移至硝酸纤维素膜上,并通过蛋白质印迹进行分析。使用了针对以下蛋白质的一抗:含有冷休克结构域的蛋白质E1(CSDE1)/UNR(Proteintech,13319-1-AP)、含非POU结构域的八聚体结合蛋白(NonO)(Novus Biologicals,NBP1-95977)、ELAV样蛋白1(ELAVL1)/Hu-抗原R(HuR)

(Proteintech,11910-1-AP)。作为二抗,采用了山羊抗兔IgG HRP(Santa Cruz Biotechnology)。

[0127] DMOG效果分析。将增殖的Jurkat细胞以约1x10^{6}细胞/mL的密度与0.5mM DMOG(Cayman Chemical Company,71210)或等体积的二甲基亚砜(DMSO)(媒介物,Merck 1.02950.0500)一起孵育6小时。随后,将细胞沉淀(400g、5min、4℃),用冰冷的PBS洗涤,并溶解在冰冷的补充有蛋白酶抑制剂(Roche,11873580001)和磷酸酶抑制剂(Sigma-Aldrich,04906845001)的RIPA缓冲液(50mM Tris-HCl,pH 7.4,1%NP-40,0.5%脱氧胆酸钠,0.1%SDS,150mM NaCl,2mM EDTA,50mM NaF)中。澄清后,通过SDS-PAGE分离蛋白质,并转移至硝酸纤维素膜上。使用了针对以下蛋白质的一抗:抗-GAPDH(Sigma-Aldrich,G9545),其余均来自细胞信号传导:磷-4EBP1(Ser65)(9451S)、4EBP1(9644S)、磷-p70 S6激酶(Thr389)(9205)、p70 S6激酶(2708)、磷-ULK1(Ser757)(14202)、ULK1(8054)、磷-mTOR(Ser2448)(5536P)、mTOR(2983)。山羊抗兔IgG HRP(Santa Cruz Biotechnology)被用作二抗。

[0128] m6A斑点印迹。使用与通过MS(-UV对照)分析的相同的eRIC样品的热洗脱的RNA的等分试样来估计m6A水平。将RNA在65℃孵育10分钟,并立即置于冰上。用NanoDrop分光光度计(Thermo Fisher Scientific)估算浓度,并准备系列稀释液以获得100、50、25和12.5ng/μL。将每种稀释液1μL直接移至Zeta探针膜(Bio-Rad)上,风干约10分钟,并在Spectrolinker XL-1500(Spectronics Corporation)中以120mJ/cm^{2}在254nm交联两次。将膜用0.05%PBS-Tween(PBS-T)洗涤,并用5%脱脂牛奶在PBS-T中封闭1小时。将一抗在封闭溶液中于4℃孵育过夜,然后用PBS-T冲洗3次,将二抗在封闭溶液中于RT孵育1小时,用PBS-T洗涤3次,并使用ECL(Millipore,WBKLS0500)显影。使用的抗体是:抗m6A(Abcam,ab151230,1:2000和Synaptic Systems,202 003,1:2000)和山羊抗兔IgG-HRP(Abcam,1:20000)。

[0129] 聚(A)尾介导的RBP捕获:注意事项

[0130] 有了合适的从头进行RBP发现的工具在手,发明人希望基于RIC的原理建立和开发一种在比较研究中表现优异的方法。为了达到这个目的,发明人旨在减少可能有助于无意中共纯化蛋白质并增加背景RBP的DNA和rRNA污染。

[0131] 为了使抵抗变性捕获条件的蛋白质-蛋白质相互作用最小化,发明人在60℃将细胞裂解物预孵育10-15分钟[7],然后离心去除不溶物(图9的a)。通过使用带有锁核酸(LNA)的修饰的探针(其可最佳地定位寡核苷酸以与RNA杂交),发明人极大地提高了捕获探针与聚(A)尾部之间的解链温度(从约40℃至约77℃),这允许使用更严格的纯化条件。以前已表明在每隔一个位置处带有LNA-T(LNA2.T)的20-mer可有效捕获mRNA[10]。探针设计还包括柔性C6连接子和5'端的伯氨基,其被用于将LNA寡聚物与羧基化的磁珠偶联(详细程序见方法)。利用该探针,可以在37-40℃而非4℃执行方案的所有步骤,包括捕获和所有洗涤(图9的a)。由于盐稳定了RNA-RNA和RNA-DNA双链体,并因此有利于污染核酸的下拉(pull down),因此发明人利用了LNA2.T-聚(A)RNA双链体的稳定性,并加入了在40℃用纯水预洗脱的步骤(图9的a)。该步骤被证明有助于有效消除诸如rRNA和基因组DNA等污染物核酸,而不会干扰聚(A)的捕获(见下文)。

[0132] 在RIC中,RNA会下拉(pull down),并且在4℃进行洗涤,以避免干扰寡聚(dT)/聚

(A)杂交。接下来是在50-55℃的温度介导的洗脱(图9的a)。洗脱温度的升高可能引起污染物的共洗脱,包括与下拉(pull down)所用珠子直接相关的蛋白质。为了提高洗脱的特异性并减少背景污染物,发明人用37℃的RNA酶处理代替了热洗脱(图9的a)。该洗脱策略对RNA结合的蛋白更具特异性,并且在比洗涤低的温度执行。发明人将这种方法称为“增强的RNA相互作用组捕获(eRIC)”,其涉及使用LNA2.T探针、增加的捕获和洗涤温度、预洗脱和特异性的基于RNA酶的洗脱。发明人使用Jurkat细胞直接比较了RIC和eRIC的性能,Jurkat细胞是一种以相对于相对中等的细胞质体积的大核为特征的细胞类型。所有实验均平行进行。

[0133] 通过eRIC极大减少了rRNA和基因组DNA污染

[0134] 发明人首先比较了两种方案的RNA捕获特性。尽管eRIC洗脱本身是由RNA酶介导的,但一小部分纯化的eRIC物质被热洗脱以进行RNA分析。在生物分析仪中评估RIC和eRIC热洗脱液的等分试样,或使用可扩增cDNA而非基因组DNA的内含子敏感引物将其反转录并进行qPCR。通过eRIC下拉(pull down)的聚(A)RNA是特异性的和捕获探针介导的,因为当使用未偶联的珠子时未检测到RNA (图9的c)。与RIC相比,eRIC表现出了截然不同的RNA洗脱特征(图9的b、图9的c)。尽管通过RIC洗脱的总RNA中的约30%对应于rRNA,但在eRIC样品中仅为约3%。实际上,eRIC的生物分析仪模式由在约500-4,000种核苷酸之间的均匀分布的涂片所主导,发明人将其归因于聚腺苷酸化的RNA,而RIC洗脱液则主要显示了rRNA带(图9的b)。rRNA的捕获是不依赖UV的,并且有趣的是,与18S rRNA相比,28S rRNA的消耗更为剧烈(图9的b、图9的c)。这些数据表明18S rRNA可以通过与捕获探针结合的足够长的聚(A)延伸或者通过将rRNA与聚(A)RNA中的互补序列杂交的方式与聚(A)RNA共纯化。出于这些考虑,通过降低聚(A)RNA产量实现了进一步减少18S rRNA污染的努力。qPCR结果表明,在eRIC方案中使用的较高温度与RNA降解无关(图9的c)。

[0135] 然后通过qPCR分析评估RIC和eRIC洗脱液等分试样上的多个基因的DNA污染,而无需事先进行逆转录。结果表明,eRIC将基因组DNA的污染大大降低了10-100倍(图9的c,下图)。相比之下,RIC中的DNA污染可以达到低表达水平基因的cDNA水平,如ZNF80的基因组DNA和cDNA水平所表明的(图9的c)。

[0136] 总之,这些结果突出了eRIC引起rRNA和基因组DNA污染的显著减少,而不会损害并且可能增强聚(A)RNA的捕获。由于出于显而易见的原因,RNA分析需要加热而非eRIC样品的RNA酶洗脱,因此,在原始eRIC方案的基于RNA酶的洗脱之后,eRIC样品的纯度甚至可能更高。

[0137] 通过RIC相对于eRIC鉴定的RBP的分析

[0138] 然后,发明人对根据两种方案洗脱的蛋白质进行了下游分析。在eRIC之后,洗脱液使用SpeedVac代替RIC所采用的且通常与蛋白质损失和尺寸偏差有关的Amicon过滤器来进行真空浓缩。为排除技术偏差,还将SpeedVac介导的浓缩应用于RIC样品(见下文)。洗脱蛋白的SDS-PAGE和银染显示出与输入样品截然不同且在未经辐照的对照中缺乏的模式,这表明通过RIC和eRIC在UV交联后特异性的RBP的富集(图9的d)。有些出乎意料的是,eRIC和RIC洗脱液的条带模式存在显著差异(图9的d),包括与RIC相比,通过eRIC更有效地捕获的蛋白质,并且反之亦然。发明人还注意到,在eRIC样品的基于RNA酶的洗脱之后的热(重新)洗脱产生了一些蛋白质,其迁移与从RIC样品洗脱的蛋白质相似(图9的d),表明这些蛋白质并非结合RNA的。因此,对于真正的RBPs而言,RNA酶介导的洗脱似乎更具特异性。

[0139] 在RIC和eRIC样品中,均通过蛋白质印迹证实了已知的RBP UnR、Nono和HuR的特异性的富集。相比RIC,通过eRIC的RBP的下拉(pull down)至少等效(图9的e)。

[0140] 为了最大程度地减少分析前样品的损失,发明人引入了高度灵敏的单罐固相增强的样品制备(SP3)方案[11]。SP3可最大程度地回收用于质谱分析的肽,并且与整个程序中使用的去污剂兼容,直至最终的洗涤。为了便于在RIC和eRIC方案的所有其他方面之间进行比较,并且如浓缩步骤所述的,将SP3应用于eRIC和RIC样品。因此,发明人对两种方法使用了相等的细胞数量,聚焦于RNP捕获本身的差异。

[0141] 将来自两个独立生物学实验(每个遵循两种不同的方案)的蛋白洗脱液通过10重串联质谱标签(TMT)进行标记,并进行液相色谱-串联质谱分析(LC-MS/MS)(图10的a)。与-UV对照相比,在交联的样品中被显著富集的蛋白质(错误发现率(FDR)0.05和倍数变化(FC)>2)被视为“命中”。应用此标准,发明人分别在eRIC和RIC样品中鉴定出683和588种RBP(图10的b、图10的d至图10的e)。发明人已经预料到,更严格的eRIC纯化程序可能会减少鉴定的RBP的数量,但观察到相反的结果。详细的数据分析揭示出,在RIC样品中也检测到了独特的eRIC命中,但是-UV对照中较高的背景水平排除了它们在+UV RIC样品中的富集,并且将它们排除为具有统计学意义的命中(图10的c)。当发明人比较eRIC特有的97种命中的辐照的和未辐照的样品的强度时,相对于RIC,在eRIC的-UV对照中,这97种蛋白质的归一化信号总和显著降低,而在辐照的样品中则观察到相反的情况(图10的f)。因此,eRIC产生了双重好处,减少了背景,并增强了交联后的特异性的下拉(pull down)。

[0142] 发明人接下来研究了RIC和eRIC命中的本体。虽然通过两种方法相似地鉴定了经典的RBP(如Gerstberger et al.[12]所定义的)(图10的g),但eRIC回收了更多的非传统RBP,包括酶且尤其是代谢酶RBP[4,5](图10的g)。对于碳代谢的酶,包括糖酵解途径和TCA循环,以及参与脂质、雌激素和肌苷5’-磷酸代谢的酶,这种富集尤其显著。这些酶中的至少一些的RNA结合活性先前已被证实[4,13]。

[0143] 为了评估eRIC是否检测到新的RBP,发明人将eRIC命中的列表与先前在人细胞中进行的RIC实验的命中[1-4,14,15]进行了比较。eRIC产生了30种候选RBP,其在以前的实验中或在来自本文中分析的Jurkat细胞的RIC数据集中均未检测到(图10的h)。总之,发明人确定了144种命中(图11),其在eRIC和RIC之间存在显著差异(与-UV对照进行富集比较,FDR 0.05,FC>2)。这些蛋白质的无监督聚类分析和后GO分析揭示出与mRNA相关的术语的较高富集,如在通过eRIC优先回收的蛋白质中的“mRNA加工”、“mRNA剪接”和“mRNA运输”(图11的a)。相反,RIC富集了大多数与rRNA相关术语相关的蛋白质,如“核糖体生物发生”和“rRNA加工”(图11的a)。通过eRIC和RIC差异捕获的RBP的代表性实例如图11的b所示。因此,通过eRIC和RIC回收的RBP的模式反映了利用每种方法捕获的RNA的性质(图9)。

[0144] eRIC提高了RNA结合的蛋白质组内的生物反应的检测

[0145] 开发eRIC的主要动机是需要一种优化的方法来检测RNA结合的蛋白质组对不同实验条件的动态生物学反应,并且发明人选择评估Jurkat细胞对α-酮戊二酸酯拮抗剂二甲基草酰甘氨酸(DMOG)的反应作为测试案例,因为RNA脱甲基酶需要α-酮戊二酸作为辅因子([16,17]),并且发明人好奇探索DMOG诱导的RNA结合的蛋白质组的变化。为了减少次级效应的影响,发明人将具有中等浓度(0.5mM)的DMOG的增殖的Jurkat细胞孵育仅6小时。在交联和裂解后,发明人使用两组完整的生物学重组比较了eRIC和RIC(图12的a)。eRIC导致分别在

DMSO和DMOG处理的细胞中鉴定出716和710种RBP,而通过RIC在相同的处理条件下鉴定出了673和662种RBP,证实了通过eRIC增强了RBP的检测。

[0146] 以0.05的FDR,在来自UV处理的细胞的样品中定义了DMOG响应的RBP,在每个重复中的一致性的倍数变化为至少10%。与通过RIC确定的13种和24种反应性RBP(图12的b)相比,eRIC回收了在DMOG处理后20种具有增加的RNA结合的RBP和41种具有减少的RNA结合的RBP的特异性的组(图12的b)。通过两种方案获得的命中显示出惊人的差异,并且只有适度的重叠(图12的c)。为了更好地理解这些差异,发明人比较了eRIC和RIC洗脱液中差异离子强度的分布。这些分析表明,对于通过eRIC捕获的RBP,信号散射降低并且实验再现性更高(图12的d至图12的f),其提高了检测RNA结合的蛋白质组变化的敏感性。

[0147] 对于仅能通过RIC回收的22种差异命中(图12的c),发明人因其在eRIC样品中的完全缺乏反应而感到震惊(图12的g)。GO分析揭示了与rRNA相关的术语,以及核糖体、核糖体前体和细胞核的组分的富集(图12的h),表明它们不直接与聚(A)RNA结合,并且可能与污染的rRNA共纯化(图9)。RIC和eRIC之间共有的命中的GO分析显示与mRNA翻译相关,尤其是对于eIF3和eIF4(图12的h、图12的i)。相反,富集了与mRNA相关的功能,如mRNA运输和mRNA剪接的eRIC特异性的命中,或者其属于调节mRNA代谢的复合物/结构,如剪接体复合物和应激颗粒(图12的h、图12的i)。

[0148] 综上所述,eRIC有助于对逃离RIC的mRNA结合的蛋白质组的变化进行敏感的比较分析。

[0149] eRIC揭示了eIF3和eIF4与mRNA的结合减弱,并暗示通过DMOG抑制mTOR通路。

[0150] DMOG处理大大减少了数种翻译起始因子,尤其是eIF3和eIF4的RNA结合(图12的i)。由于已经报道了DMOG对mTOR激酶(其使抑制蛋白4EBP磷酸化)的活性具有负影响[18],因此发明人检查了4EBP磷酸化的蛋白质印迹。实际上,在用0.5mM DMOG处理6小时后,4EBP的磷酸化严重降低。另外,发明人观察到mTOR靶标S6K和ULK1以及TOR自身的丝氨酸2448(与TOR活化相关)的磷酸化降低。这些结果表明,DMOG抑制mTOR,并因而激活4EBP,抑制翻译起始,并解释了eIF3和eIF4的RNA结合减少。这些发现例证了eRIC数据对阐明生物过程的价值。

[0151] eRIC鉴定了逃离RIC的m6A响应性RBP

[0152] RNA脱甲基酶是α-酮戊二酸依赖性双加氧酶,其可被DMOG19抑制。预期这种抑制作用会增加N6-甲基腺苷(m6A)的稳态水平。发明人使用斑点印迹测定法,在从用0.5mM DMOG(或DMSO)处理6小时的Jurkat细胞纯化的聚(A)RNA上测试了这种可能性。该分析表明,DMOG孵育确实增加了聚(A)RNA的m6A修饰(图13的a)。因此,发明人好奇地想知道与m6A生物学相关的RBP是否也对DMOG处理有反应,特别是因为最近显示m6A影响不同RBP的RNA结合[20,21]。令人惊讶的是,在eRIC命中之中,对m6A敏感的RBP明显富集(Fisher's精确检验,p值=0.00016)。在发明人通过eRIC鉴定的61种DMOG调节的RBP中,至少有18种(30%)先前显示受m6A影响[20,21](图13的b)。相反,通过RIC仅发现了这些中的2种(图13的b)。DMOG引起的变化的方向与基于先前报告[20,21]的预测(图13的b中的括号中的数字)非常吻合。图13的c中显示了以前报道的m6A阅读器(YTHDF3、CPSF6、PUF60、SRSF7)和m6A排斥的蛋白(CAPRIN1、HDLBP、EIF4A1、G3BP2),以及预期对m6A不敏感的蛋白的代表性实例。

[0153] 这些结果表明,eRIC可以识别出与通过RIC遗漏的稳态m6A水平的升高相一致的与聚(A)RNA结合的蛋白质组的变化,这进一步支持了eRIC在比较研究中的卓越性能。

[0154] 引用的参考文献

[0155] 1.Baltz,A.G.et al.The mRNA-bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts.Mol Cell 46,674-90(2012).

[0156] 2.Castello,A.et al.Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins.Cell 149,1393-406(2012).

[0157] 3.Conrad,T.et al.Serial interactome capture of the human cell nucleus.Nat Commun 7,11212(2016).

[0158] 4.Beckmann,B.M.et al.The RNA-binding proteomes from yeast to man harbour conserved enigmRBPs.Nat Commun 6,10127(2015).

[0159] 5.Hentze,M.W.,Castello,A.,Schwarzl,T.&Preiss,T.A brave new world of RNA-binding proteins.Nat Rev Mol Cell Biol 19,327-341(2018).

[0160] 6.Reichel,M.et al.In Planta Determination of the mRNA-Binding Proteome of Arabidopsis Etiolated Seedlings.Plant Cell 28,2435-2452(2016).

[0161] 7.Sysoev,V.O.et al.Global changes of the RNA-bound proteome during the maternal-to-zygotic transition in Drosophila.Nat Commun 7,12128(2016).

[0162] 8.Liepelt,A.et al.Identification of RNA-binding Proteins in Macrophages by Interactome Capture.Mol Cell Proteomics 15,2699-714(2016).

[0163] 9.Milek,M.et al.DDX54 regulates transcriptome dynamics during DNA damage response.Genome Res 27,1344-1359(2017).

[0164] 10.Jacobsen,N.et al.Direct isolation of poly(A)+RNA from 4 Mguanidine thiocyanate-lysed cell extracts using locked nucleic acid-oligo(T) capture.Nucleic Acids Res 32,e64(2004).

[0165] 11.Hughes,C.S.et al.Ultrasensitive proteome analysis usingparamagnetic bead technology.Mol Syst Biol 10,757(2014).

[0166] 12.Gerstberger,S.,Hafner,M.&Tuschl,T.A census of human RNA-binding proteins.Nat Rev Genet 15,829-45(2014).

[0167] 13.Chang,C.H.et al.Posttranscriptional control of T cell effector functionby aerobic glycolysis.Cell 153,1239-51(2013).

[0168] 14.Castello,A.et al.Comprehensive Identification of RNA-BindingDomains in Human Cells.Mol Cell 63,696-710(2016).

[0169] 15.Kramer,K.et al.Photo-cross-linking and high-resolution massspectrometry for assignment of RNA-binding sites in RNA-binding proteins.Nat Methods 11,1064-70(2014).

[0170] 16.Gerken,T.et al.The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase.Science 318,1469-72(2007).

[0171] 17.Maity,A.&Das,B.N6-methyladenosine modification in mRNA:machinery, function and implications for health and diseases.FEBS J 283,1607-30(2016).

[0172] 18.Duran,R.V.et al.HIF-independent role of prolyl hydroxylases in thecellular response to amino acids.Oncogene 32,4549-56(2013).

[0173] 19.Elkashef,S.M.et al.IDH Mutation,Competitive Inhibition of FTO,and RNA Methylation.Cancer Cell 31,619-620(2017).

[0174] 20.Arguello,A.E.,DeLiberto,A.N.&Kleiner,R.E.RNA ChemicalProteomics Reveals the N(6)-Methyladenosine(m(6)A)-Regulated Protein-RNA Interactome.J Am Chem Soc 139,17249-17252(2017).

[0175] 21.Edupuganti,R.R.et al.N(6)-methyladenosine(m(6)A)recruits andrepels proteins to regulate mRNA homeostasis.Nat Struct Mol Biol 24,870-878(2017).

[0176] 22.Singh,G.,Pratt,G.,Yeo,G.W.&Moore,M.J.The Clothes Make themRNA:Past and Present Trends in mRNP Fashion.Annu Rev Biochem 84,325-54(2015).

[0177] 23.Bao,X.et al.Capturing the interactome of newly transcribed RNA.Nat Methods 15,213-220(2018).

[0178] 24.Huang,R.,Han,M.,Meng,L.&Chen,X.Transcriptome-widediscovery of coding and noncoding RNA-binding proteins.Proc Natl Acad SciU S A 115,E3879-E3887(2018).

[0179] 25.He,C.et al.High-Resolution Mapping of RNA-Binding Regions inthe Nuclear Proteome of Embryonic Stem Cells.Mol Cell 64,416-430(2016).

[0180] 26.Burger,K.et al.4-thiouridine inhibits rRNA synthesis and causes anucleolar stress response.RNA Biol 10,1623-30(2013).

[0181] 27.Boom,R.et al.Rapid and simple method for purification of nucleicacids.J Clin Microbiol 28,495-503(1990).

[0182] 28.Jourdain,A.A.et al.A mitochondria-specific isoform of FASTK ispresent in mitochondrial RNA granules and regulates gene expression andfunction.Cell Rep 10,1110-21(2015).

[0183] 29.Popow,J.et al.FASTKD2 is an RNA-binding protein required formitochondrial RNA processing and translation.RNA 21,1873-84(2015).

[0184] 30.Patil,D.P.,Pickering,B.F.&Jaffrey,S.R.Reading m(6)A in theTranscriptome:m(6)A-Binding Proteins.Trends Cell Biol 28,113-127(2018).

[0185] 31.Castello,A.et al.System-wide identification of RNA-binding proteinsby interactome capture.Nat Protoc 8,491-500(2013).

[0186] 32.Franken,H.et al.Thermal proteome profiling for unbiasedidentification of direct and indirect drug targets using multiplexed quantitativemass spectrometry.Nat Protoc 10,1567-93(2015).

[0187] 33.Ritchie,M.E.et al.limma powers differential expression analyses forRNA-sequencing and microarray studies.Nucleic Acids Res 43,e47(2015).

[0188] 34.Huber,W.,von Heydebreck,A.,Sultmann,H.,Poustka,A.&Vingron,M.Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression.Bioinformatics 18Suppl 1,S96-104(2002).

[0189] 35.Strimmer,K.fdrtool:a versatile R package for estimating local and

tail area-based false discovery rates.Bioinformatics 24,1461-2(2008).

[0190] 36.Ginestet,C.ggplot2:Elegant Graphics for Data Analysis.Journal of the Royal Statistical Society Series a-Statistics in Society 174,245-245 (2011).

[0191] 37.Conway,J.R.,Lex,A.&Gehlenborg,N.UpSetR:an R package for the visualization of intersecting sets and their properties.Bioinformatics 33, 2938-2940(2017).

[0192] 38.Noh,J.H.et al.HuR and GRSF1 modulate the nuclear export and mitochondrial localization of the lncRNA RMRP.Genes Dev 30,1224-39(2016).

[0193] 引用的另外的参考文献

[0194] Jacobsen N.,et al.,Direct isolation of poly(A)+RNA from 4M guanidine thiocyanate-lysed cell extracts using locked nucleic acid-oligo(T) capture.Nucleic Acids Res.2004Apr 19;32(7):e64.

[0195] Jacobsen N.,et al.,Efficient poly(A)+RNA selection using LNA oligo(T) capture.Methods Mol Biol.2011;703:43-51.

[0196] Castello A,et al.Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins.Cell.2012Jun 8;149(6):1393-406.doi:10.1016/ j.cell.2012.04.031.Epub 2012May 31.

[0197] Castello A,et al.System-wide identification of RNA-binding proteins by interactome capture.Nat Protoc.2013Mar;8(3):491-500.

[0001] 序列表

[0002] <110> 欧洲分子生物学实验室(EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY (EMBL))

[0003] <120> 增强的RNA相互作用组捕获

[0004] <130> E31892WO

[0005] <150> EP 17186948.0

[0006] <151> 2017-08-18

[0007] <160> 25

[0008] <170> PatentIn version 3.5

[0009] <210> 1

[0010] <211> 22

[0011] <212> DNA

[0012] <213> 智人(Homo sapiens)

[0013] <400> 1

[0014] tggagattgt tgccatcaac ga 22

[0015] <210> 2

[0016] <211> 21

[0017] <212> DNA

[0018] <213> 智人(Homo sapiens)

[0019] <400> 2

[0020] cccattctcg gccttgactg t 21

[0021] <210> 3

[0022] <211> 20

[0023] <212> DNA

[0024] <213> 智人(Homo sapiens)

[0025] <400> 3

[0026] tcaccggagt ccatcacgat 20

[0027] <210> 4

[0028] <211> 20

[0029] <212> DNA

[0030] <213> 智人(Homo sapiens)

[0031] <400> 4

[0032] cgcgagaaga tgacccagat 20

[0033] <210> 5

[0034] <211> 25

[0035] <212> DNA

[0036] <213> 智人(Homo sapiens)

[0037] <400> 5

[0038] ttaccctact gatgatgtgt tgttg 25

[0039] <210> 6

[0040] <211> 18

[0041] <212> DNA

[0042] <213> 智人(Homo sapiens)

[0043] <400> 6

[0044] cctgcggttc ctctcgta 18

[0045] <210> 7

[0046] <211> 23

[0047] <212> DNA

[0048] <213> 智人(Homo sapiens)

[0049] <400> 7

[0050] gaaactgcga atggctcatt aaa 23

[0051] <210> 8

[0052] <211> 23

[0053] <212> DNA

[0054] <213> 智人(Homo sapiens)

[0055] <400> 8

[0056] cacagttatc caagtgggag agg 23

[0057] <210> 9

[0058] <211> 20

[0059] <212> DNA

[0060] <213> 智人(Homo sapiens)

[0061] <400> 9

[0062] ggccatacca ccctgaacgc 20

[0063] <210> 10

[0064] <211> 20

[0065] <212> DNA

[0066] <213> 智人(Homo sapiens)

[0067] <400> 10

[0068] cagcacccgg tattcccagc 20

[0069] <210> 11

[0070] <211> 20

[0071] <212> DNA

[0072] <213> 智人(Homo sapiens)

[0073] <400> 11

[0074] tcgctgcgat ctattgaaag 20

[0075] <210> 12

[0076] <211> 20

[0077] <212> DNA

[0078] <213> 智人(Homo sapiens)

[0079] <400> 12

[0080] aggaagacga acggaaggac 20

[0081] <210> 13

[0082] <211> 20

[0083] <212> DNA

[0084] <213> 智人(Homo sapiens)

[0085] <400> 13

[0086] tgaaaaccgg cacaagacag 20

[0087] <210> 14

[0088] <211> 20

[0089] <212> DNA

[0090] <213> 智人(Homo sapiens)

[0091] <400> 14

[0092] ctggccagaa cttccaacac 20

[0093] <210> 15

[0094] <211> 20

[0095] <212> DNA

[0096] <213> 智人(Homo sapiens)

[0097] <400> 15

[0098] acccccctagg aatcacctcc 20

[0099] <210> 16

[0100] <211> 20

[0101] <212> DNA

[0102] <213> 智人(Homo sapiens)

[0103] <400> 16

[0104] gcctaggagg tctggtgaga 20

[0105] <210> 17

[0106] <211> 21

[0107] <212> DNA

[0108] <213> 智人(Homo sapiens)

[0109] <400> 17

[0110] ctgtgacctg cagctcatcc t 21

[0111] <210> 18

[0112] <211> 26

[0113] <212> DNA

[0114] <213> 智人(Homo sapiens)

[0115] <400> 18

[0116] taagttctct gacgttgact gatgtg 26

[0117] <210> 19

[0118] <211> 23

[0119] <212> DNA

[0120] <213> 智人(Homo sapiens)

[0121] <400> 19

[0122] gtgagaagat ggatgttgag ttg 23

[0123] <210> 20

[0124] <211> 20

[0125] <212> DNA

[0126] <213> 智人(Homo sapiens)

[0127] <400> 20

[0128] gatagcagca cggtatgagc 20

[0129] <210> 21

[0130] <211> 20

[0131] <212> DNA

[0132] <213> 智人(Homo sapiens)

[0133] <400> 21

[0134] tgaagtggac gatgaacgca 20

[0135] <210> 22

[0136] <211> 20

[0137] <212> DNA

[0138] <213> 智人(Homo sapiens)

[0139] <400> 22

[0140] ccattcttca cccagagcgt 20

[0141] <210> 23

[0142] <211> 20

[0143] <212> DNA

[0144] <213> 智人(Homo sapiens)

[0145] <400> 23

[0146] ccaggctcac ctcactaacc 20

[0147] <210> 24

[0148] <211> 20

[0149] <212> DNA

[0150] <213> 智人(Homo sapiens)

[0151] <400> 24

[0152] ctggctggta ggggttgatt 20

[0153] <210> 25

[0154] <211> 23

[0155] <212> DNA

[0156] <213> 智人(Homo sapiens)

[0157] <400> 25

[0158] Gtggagattg ttgccatcaa cga 23

[0159] 1

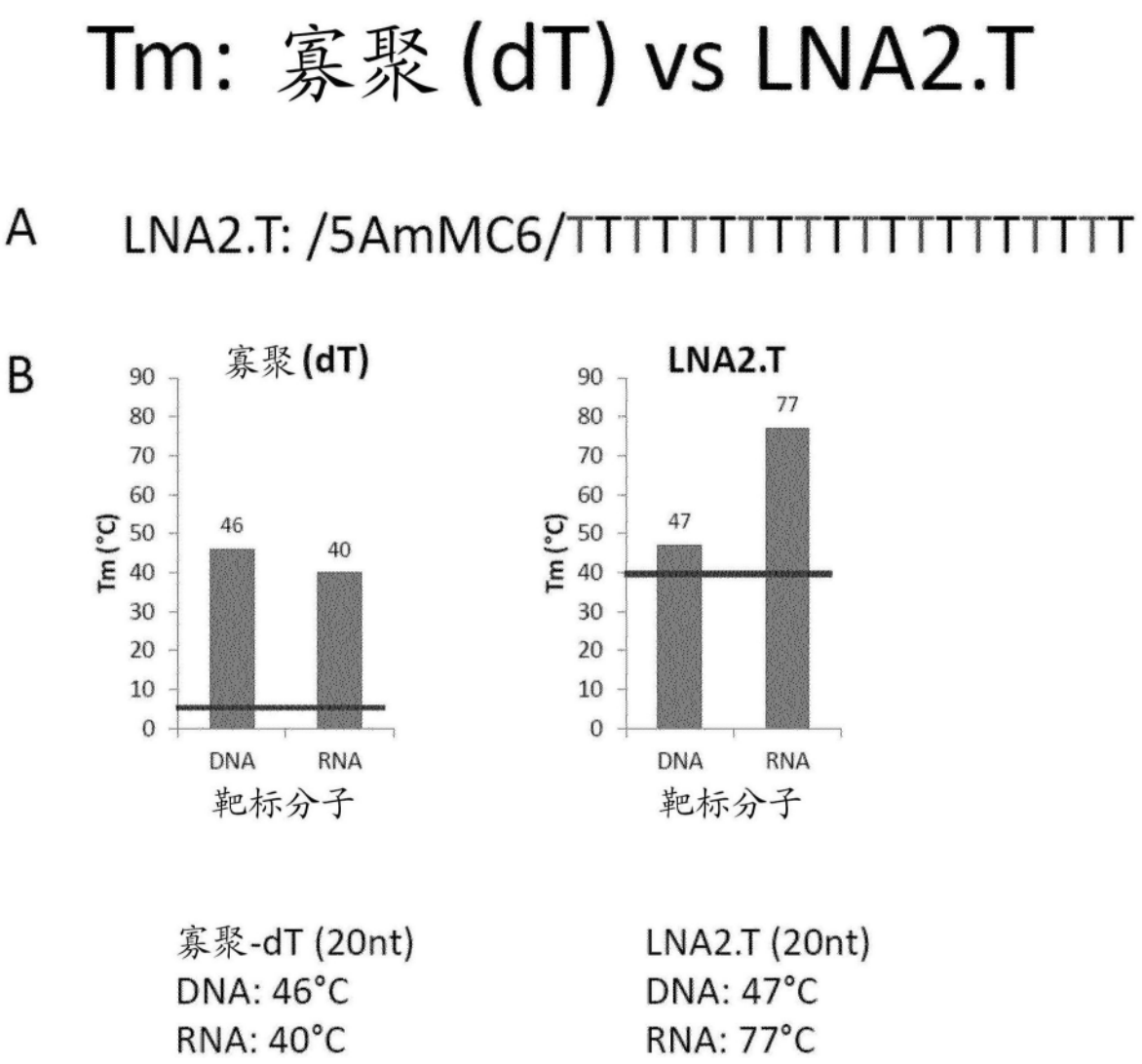

Tm: 寡聚 (dT) vs LNA2.T
A
LNA2.T: /5AmMC6/TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
B
寡聚 (dT)
Tm (°C)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
46
40
DNA
RNA
靶标分子
LNA2.T
47
77
DNA
RNA
靶标分子
寡聚-dT (20nt)
DNA: 46°C
RNA: 40°C
LNA2.T (20nt)
DNA: 47°C
RNA: 77°C

图1

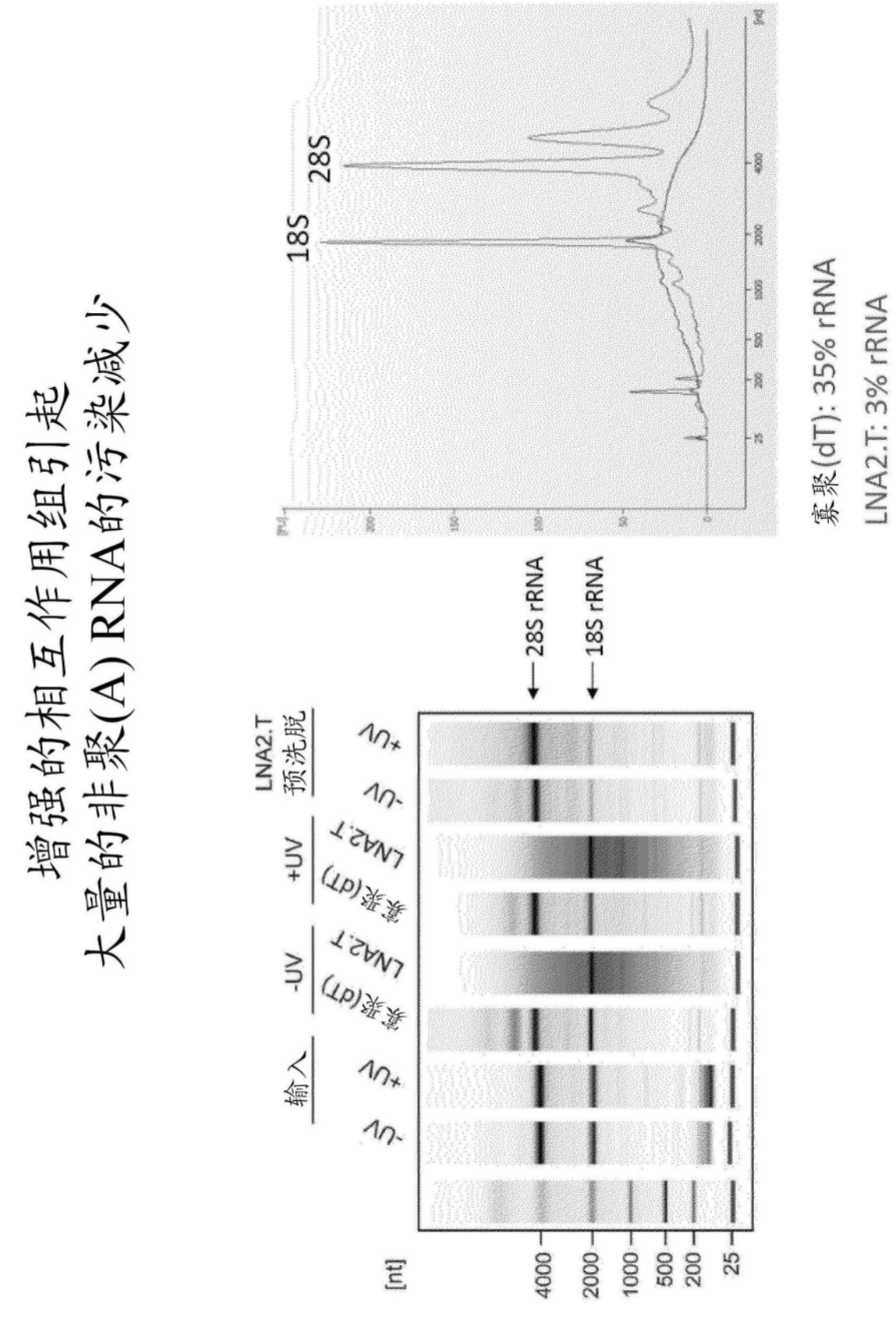

增强的相互作用组引起
大量的非聚(A) RNA的污染减少
LNA2.T
预洗脱
输入
-UV
+UV
寡聚(dT)
LNA2.T
-UV
+UV
寡聚(dT)
LNA2.T
-UV
+UV
[nt]
4000
2000
1000
500
200
25
28S rRNA
18S rRNA
18S
28S
寡聚(dT): 35% rRNA
LNA2.T: 3% rRNA

图2

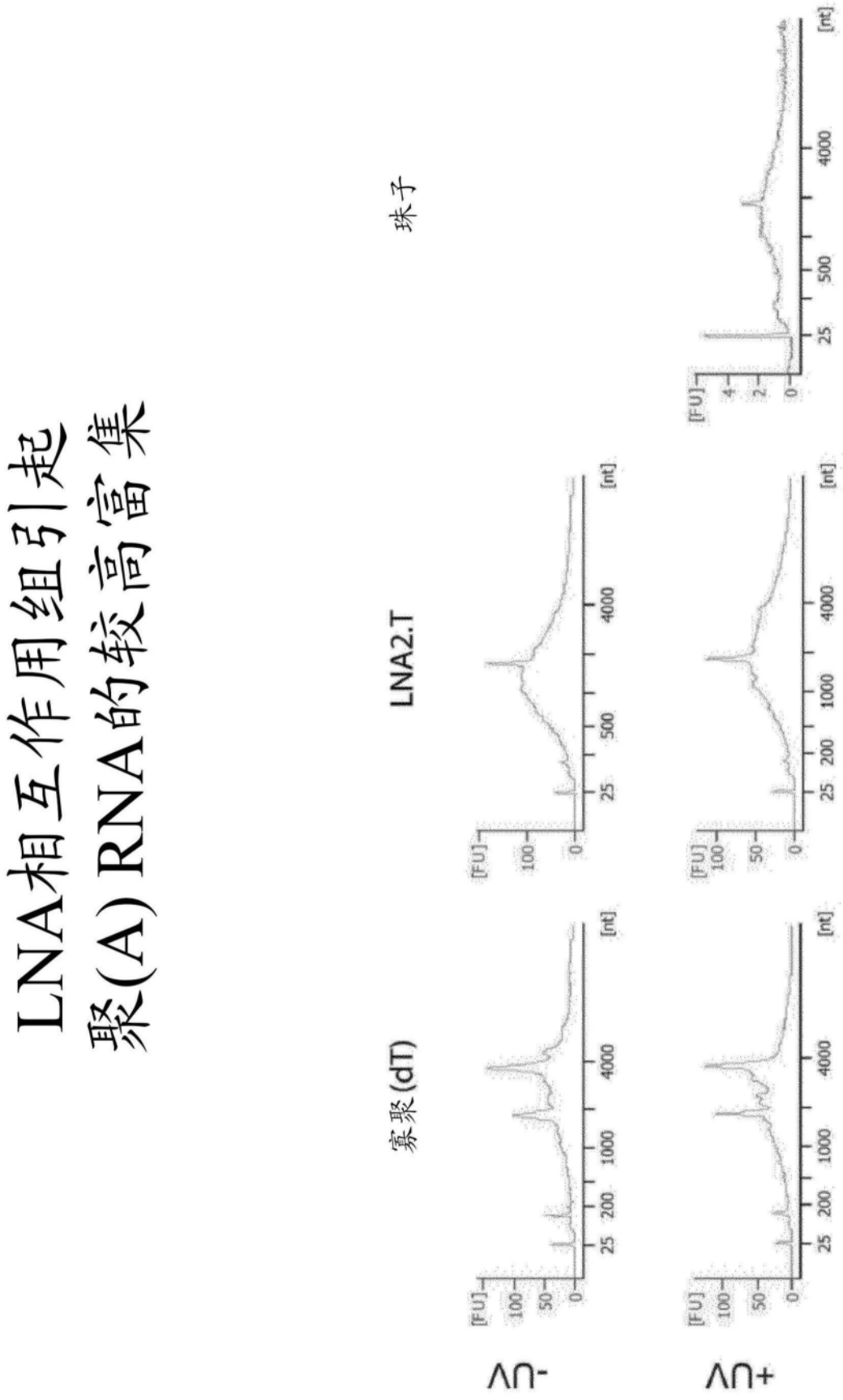


图3

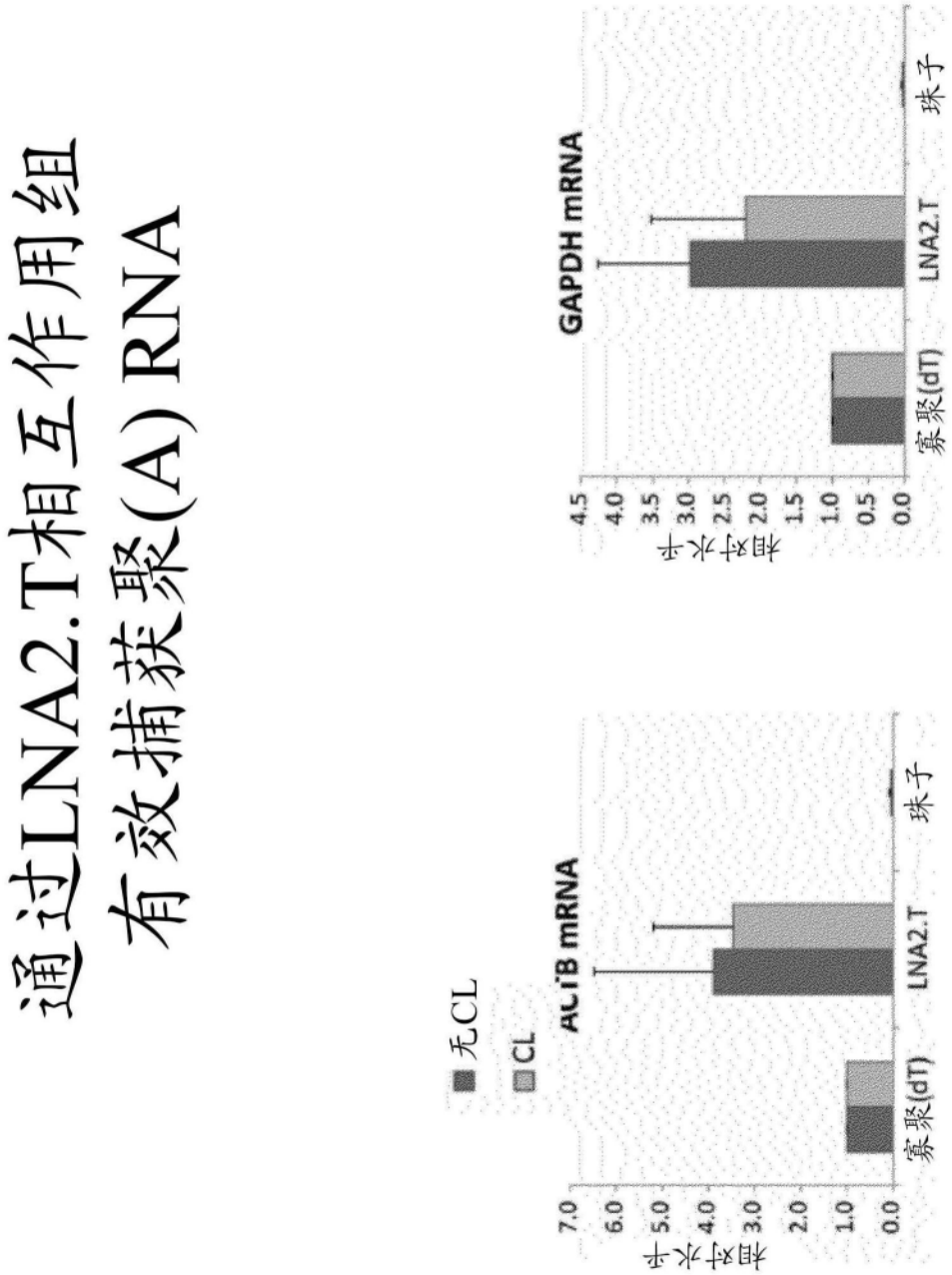

通过LNA2.T相互作用组
有效捕获聚(A) RNA
无CL
CL
ACTB mRNA
GAPDH mRNA
寡聚(dT)
LNA2.T
珠子
相对丰度
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0

图4

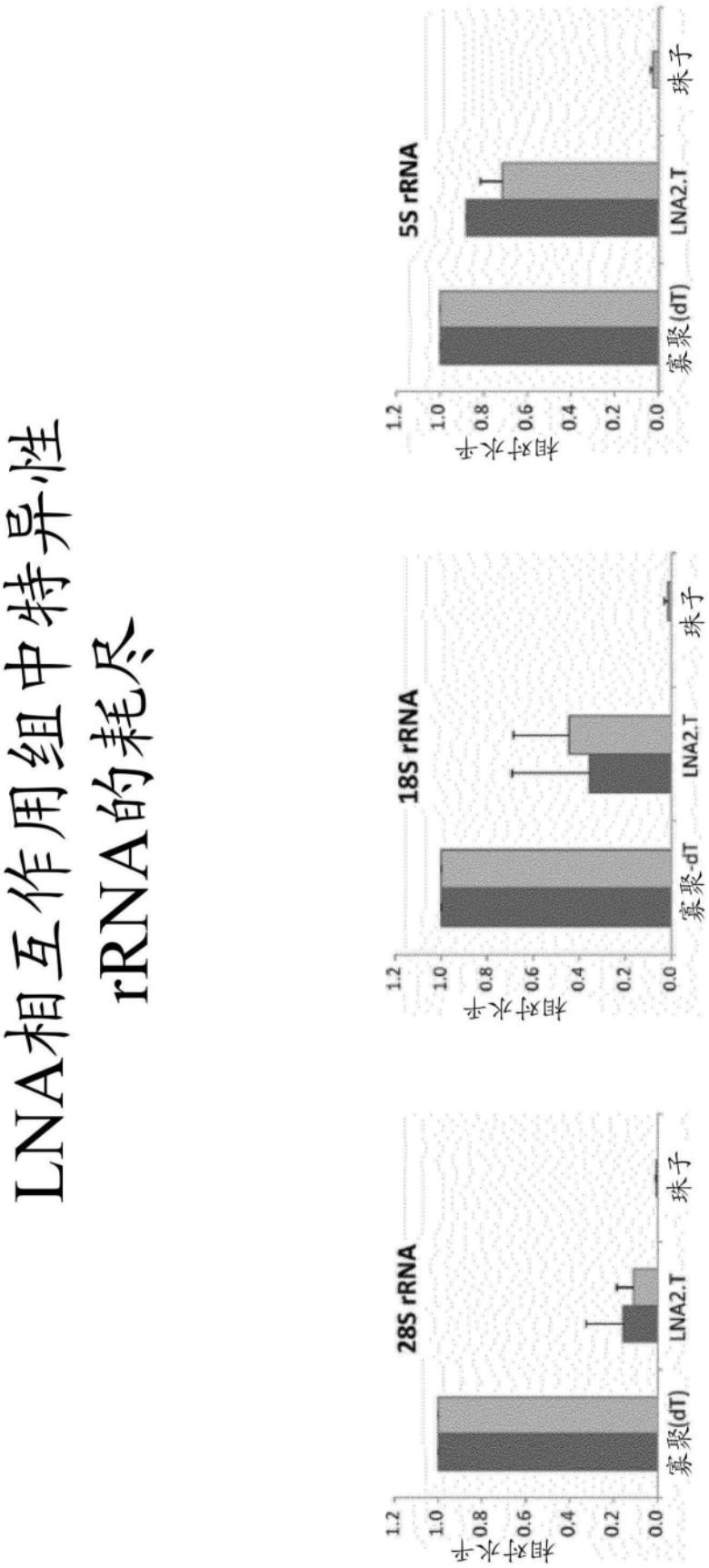

LNA相互作用组中特异性
rRNA的耗尽
28S rRNA
18S rRNA
5S rRNA
相对丰
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
寡聚(dT)
寡聚-dT
LNA2.T
珠子

图5

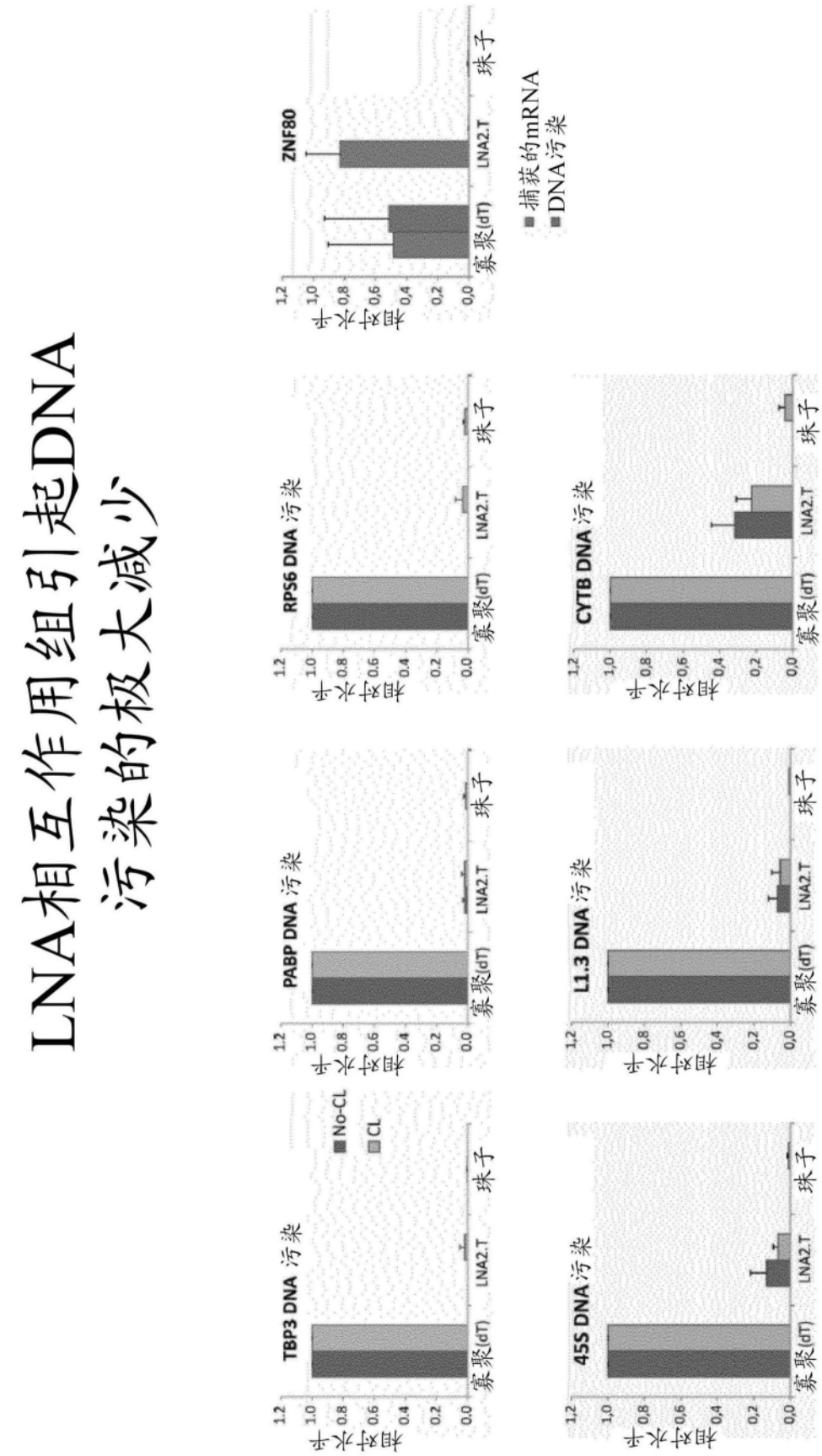

LNA相互作用组引起DNA
污染的极大减少
TBP3 DNA 污染
PABP DNA 污染
RPS6 DNA 污染
ZNF80
45S DNA 污染
L1.3 DNA 污染
CYTB DNA 污染
No-CL
CL
捕获的mRNA
DNA污染
寡聚(dT)
LNA2.T
珠子
相对水平

图6

通过LNA相互作用组有效捕获RNA结合蛋白

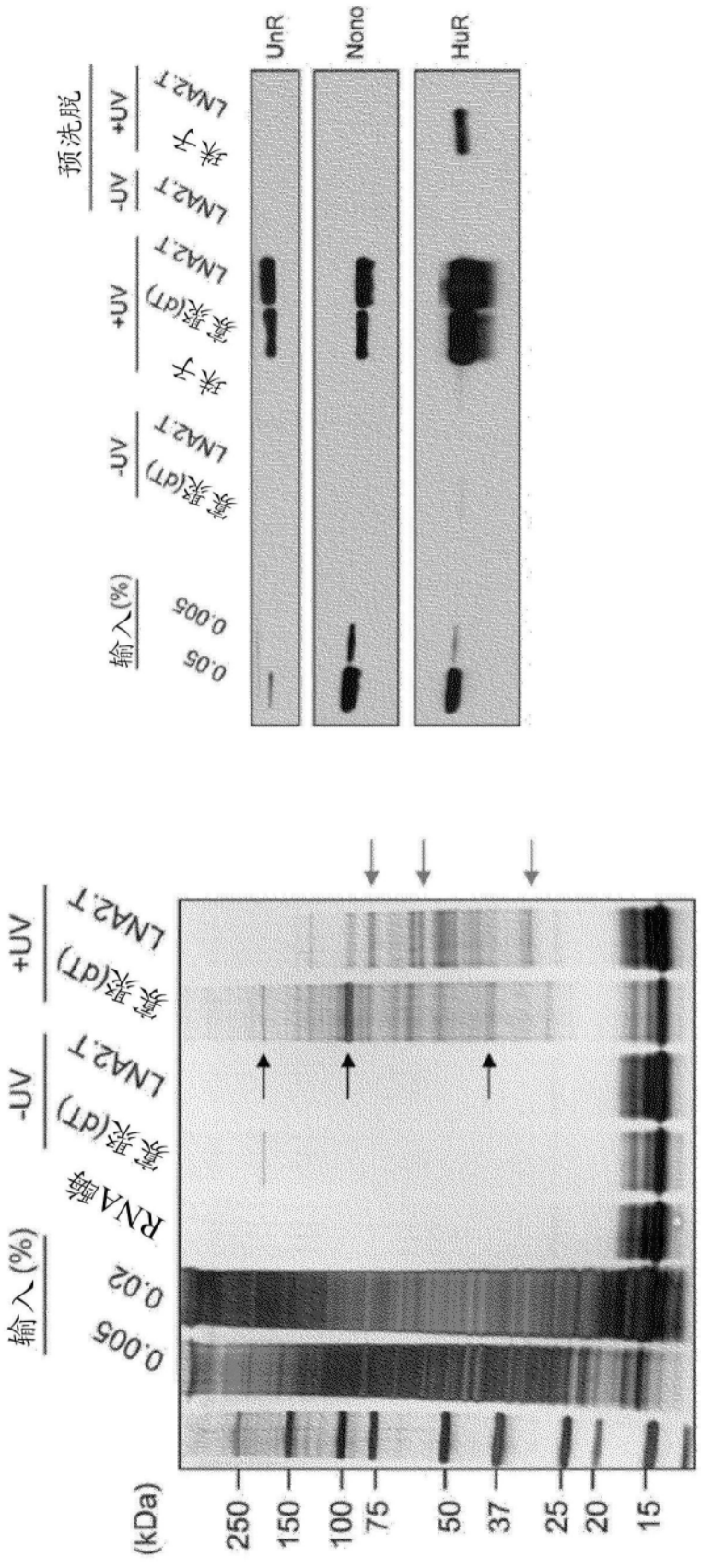


图7

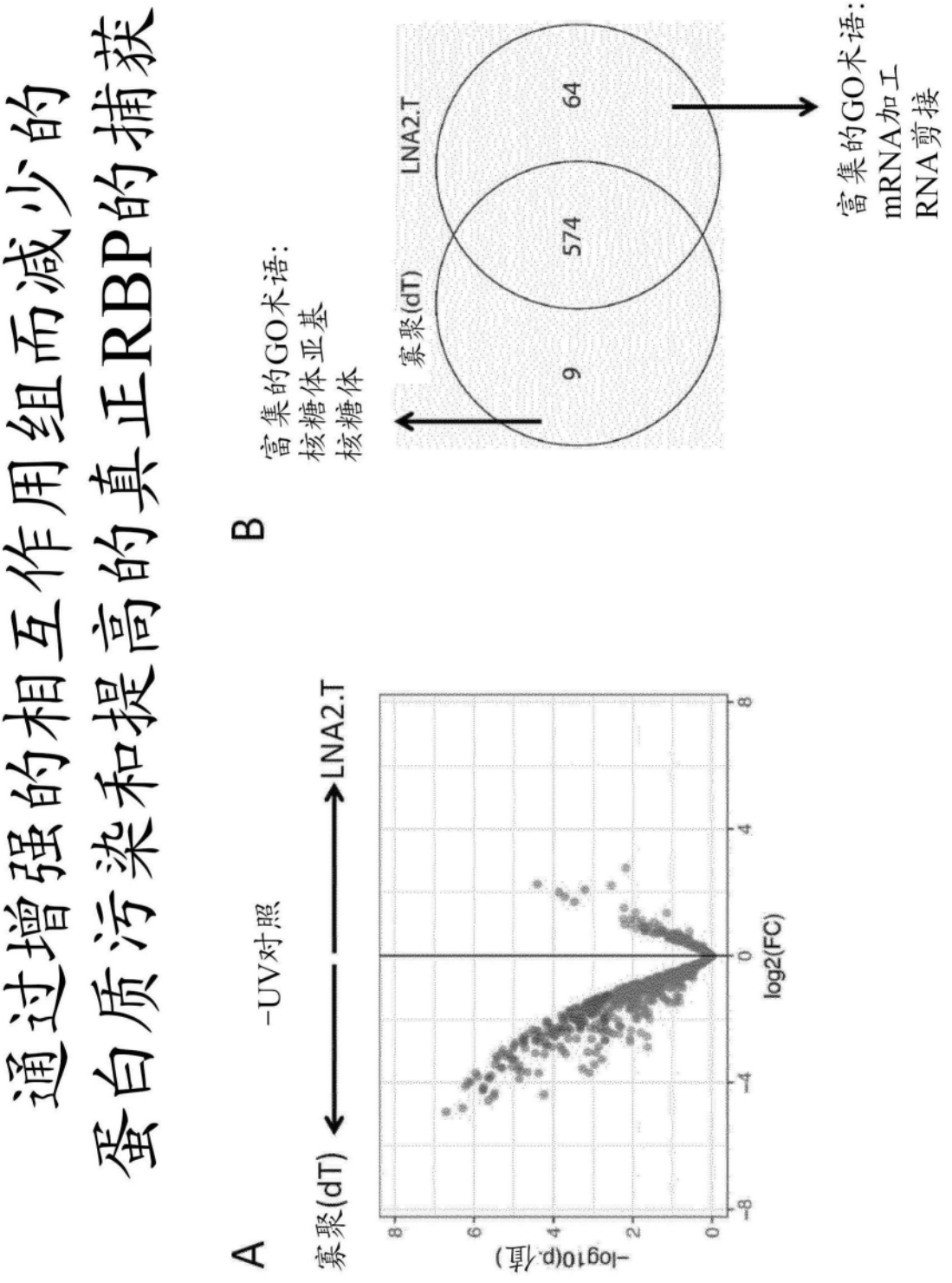

通过增强的相互作用组而减少的
蛋白质污染和提高的真正RBP的捕获
A
寡聚(dT)
-UV对照
LNA2.T
-log10(p.值)
log2(FC)
B
富集的GO术语:
核糖体亚基
核糖体
寡聚(dT)
LNA2.T
9
574
64
富集的GO术语:
mRNA加工
RNA剪接

图8

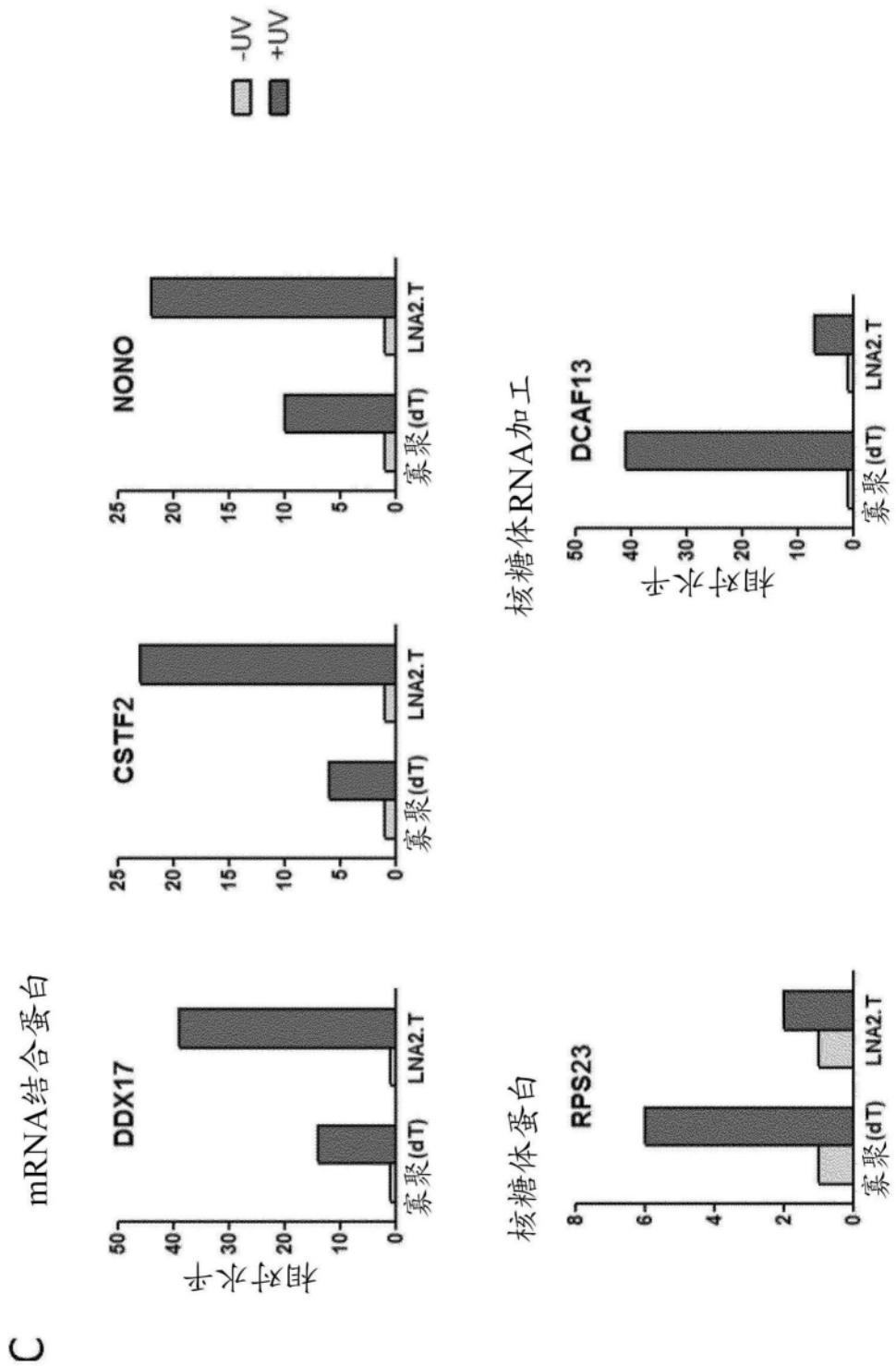

C
通过增强的相互作用组而减少的
蛋白质污染和提高的真正RBP的捕获
mRNA结合蛋白
核糖体蛋白
核糖体RNA加工
-UV
+UV
DDX17
CSTF2
NONO
RPS23
DCAF13
寡聚(dT)
LNA2.T
相对丰度

图8(续)

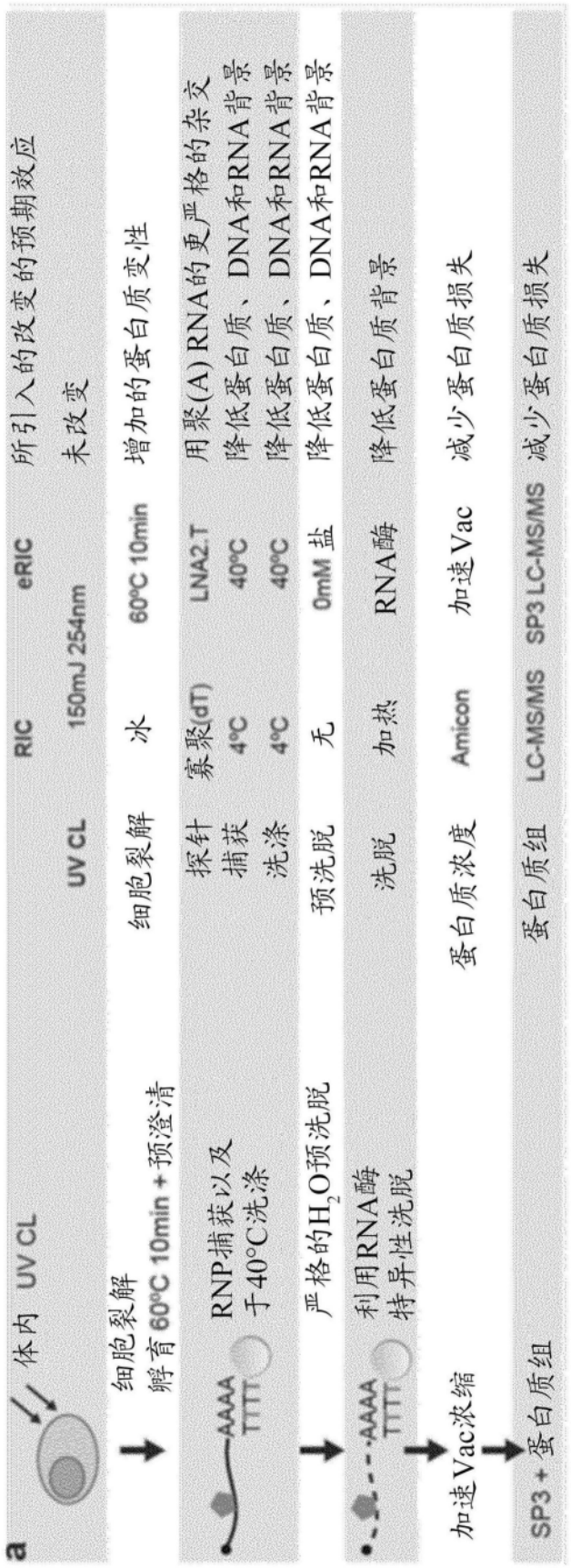

a
体内 UV CL
细胞裂解
孵育 60°C 10min + 预澄清
AAAA
TTTT
RNP捕获以及
于40°C洗涤
严格的H_2O预洗脱
利用RNA酶
特异性洗脱
加速Vac浓缩
SP3 + 蛋白质组
UV CL
细胞裂解
探针
捕获
洗涤
预洗脱
洗脱
蛋白质浓度
蛋白质组
RIC
150mJ 254nm
冰
寡聚(dT)
4°C
4°C
无
加热
Amicon
LC-MS/MS
eRIC
60°C 10min
LNA2.T
40°C
40°C
0mM 盐
RNA酶
加速Vac
SP3 LC-MS/MS
所引入的改变的预期效应
未改变
增加的蛋白质变性
用聚(A) RNA的更严格的杂交
降低蛋白质、DNA和RNA背景
降低蛋白质、DNA和RNA背景
降低蛋白质、DNA和RNA背景
降低蛋白质背景
减少蛋白质损失
减少蛋白质损失

图9

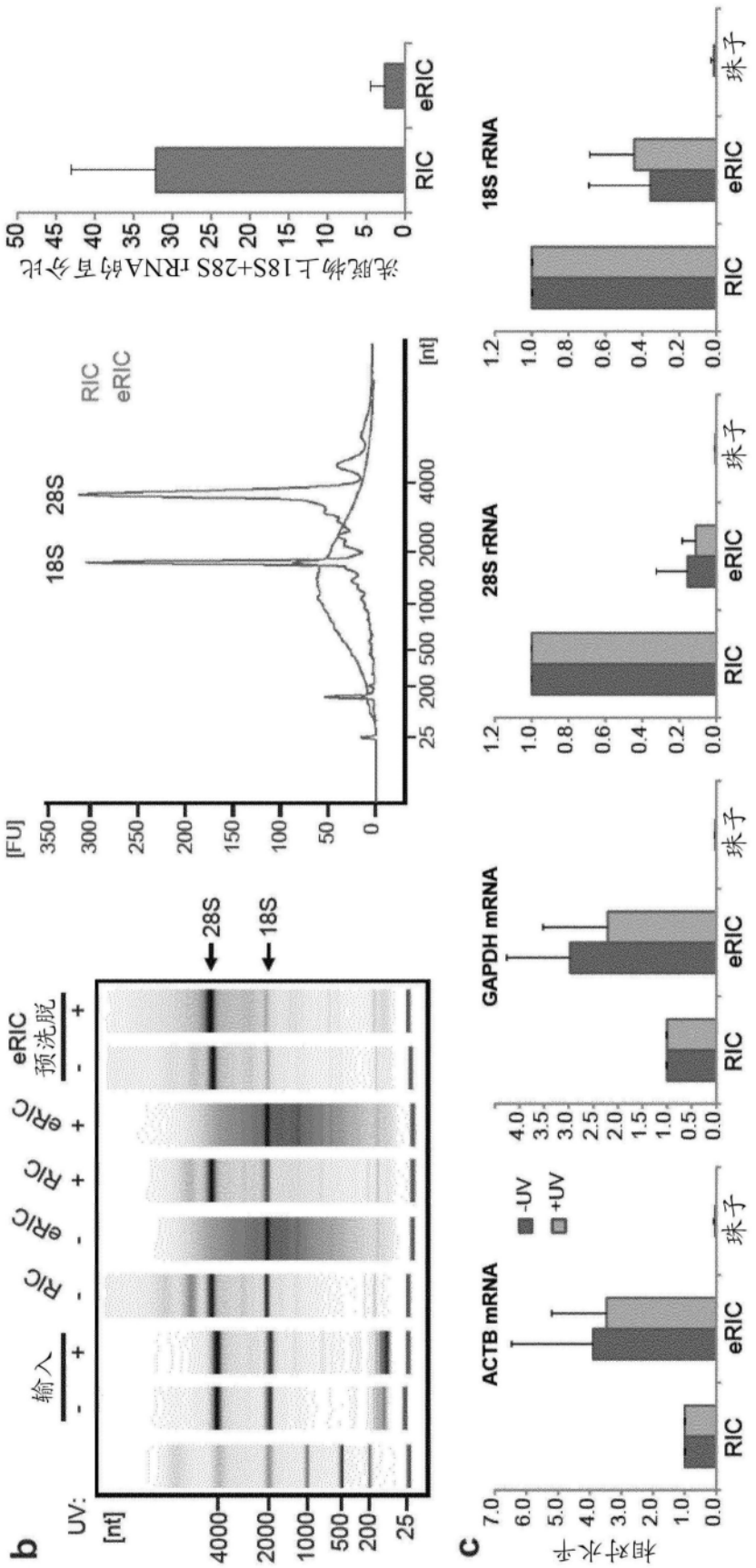

b
UV:
[nt]
输入
RIC
eRIC
RIC
eRIC
eRIC
预洗脱
28S
18S
[FU]
18S
28S
RIC
eRIC
[nt]
洗脱物上18S+28S rRNA的百分比
RIC
eRIC
c
相对丰度
ACTB mRNA
-UV
+UV
GAPDH mRNA
28S rRNA
18S rRNA
RIC
eRIC
珠子

图9(续)

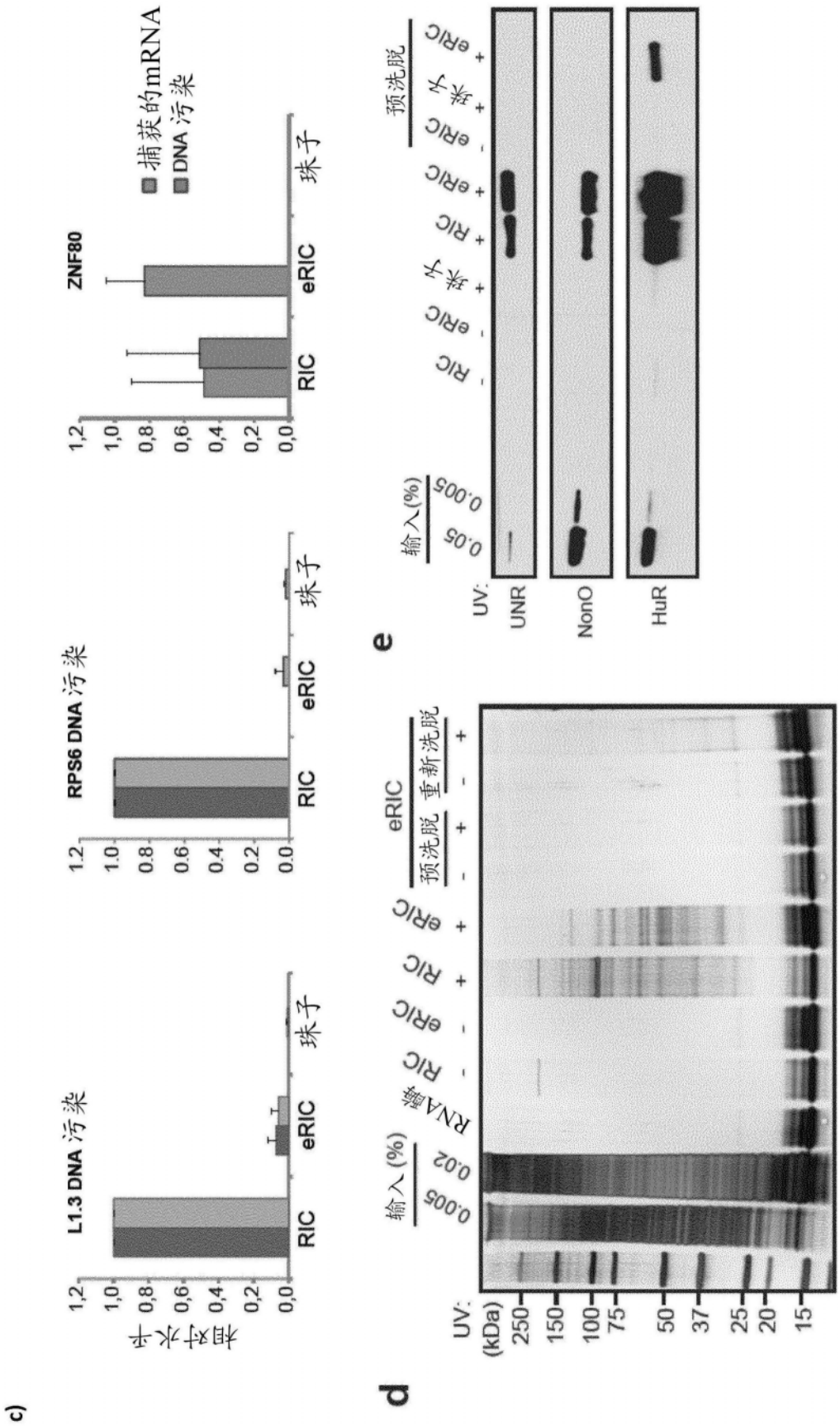

c)
L1.3 DNA 污染
RPS6 DNA 污染
ZNF80
捕获的mRNA
DNA 污染
相对丰富
RIC
eRIC
珠子
d
e
UV:
(kDa)
输入(%)
RNA酶
预洗脱
重新洗脱
UNR
NonO
HuR

图9(续)

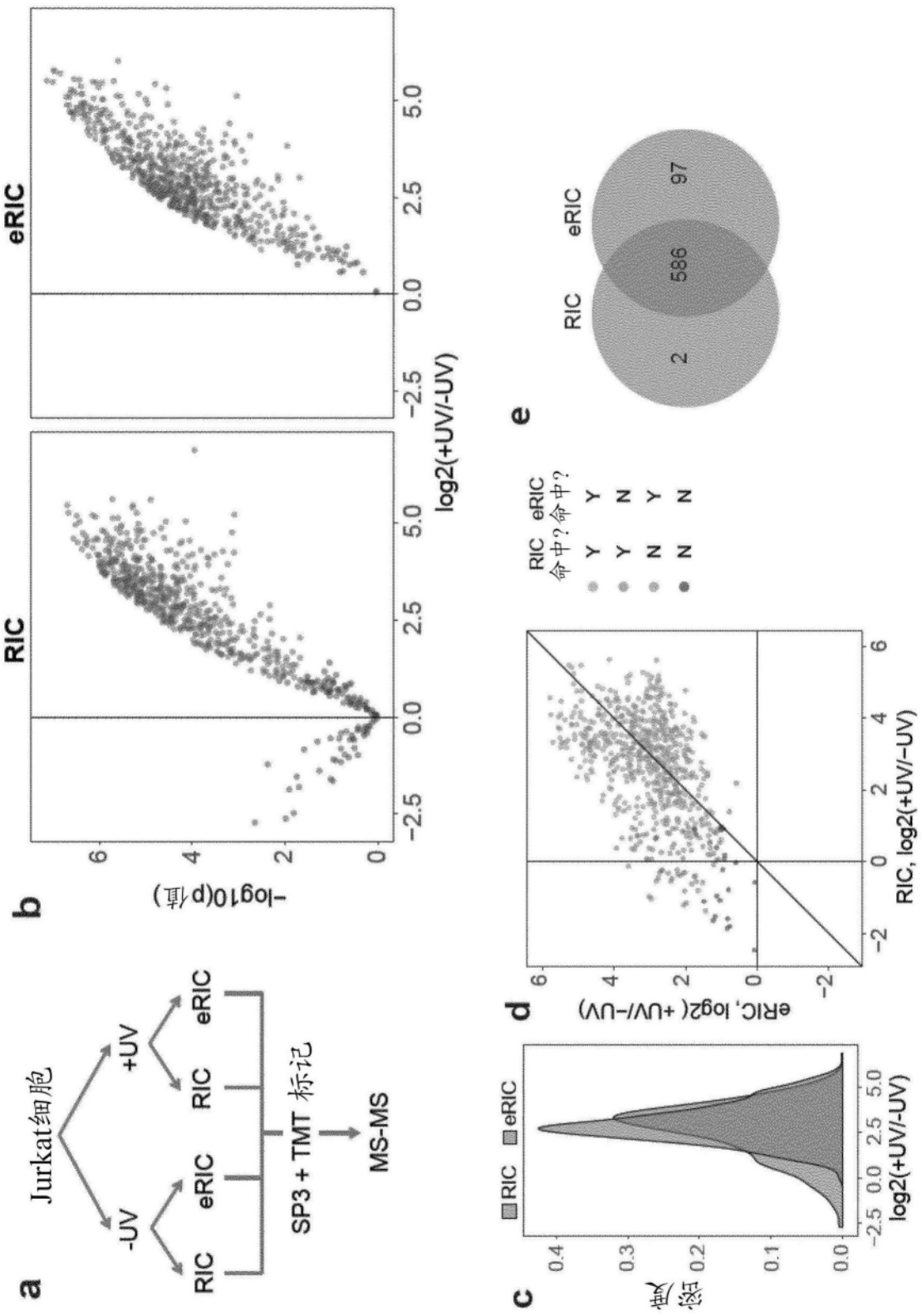

a
Jurkat细胞
-UV
+UV
RIC
eRIC
RIC
eRIC
SP3 + TMT 标记
MS-MS
b
RIC
eRIC
-log10(p值)
log2(+UV/-UV)
c
RIC
eRIC
密度
log2(+UV/-UV)
d
eRIC, log2(+UV/-UV)
RIC, log2(+UV/-UV)
e
RIC
eRIC
2
586
97
RIC 命中?
eRIC 命中?
Y Y
Y N
N Y
N N

图10

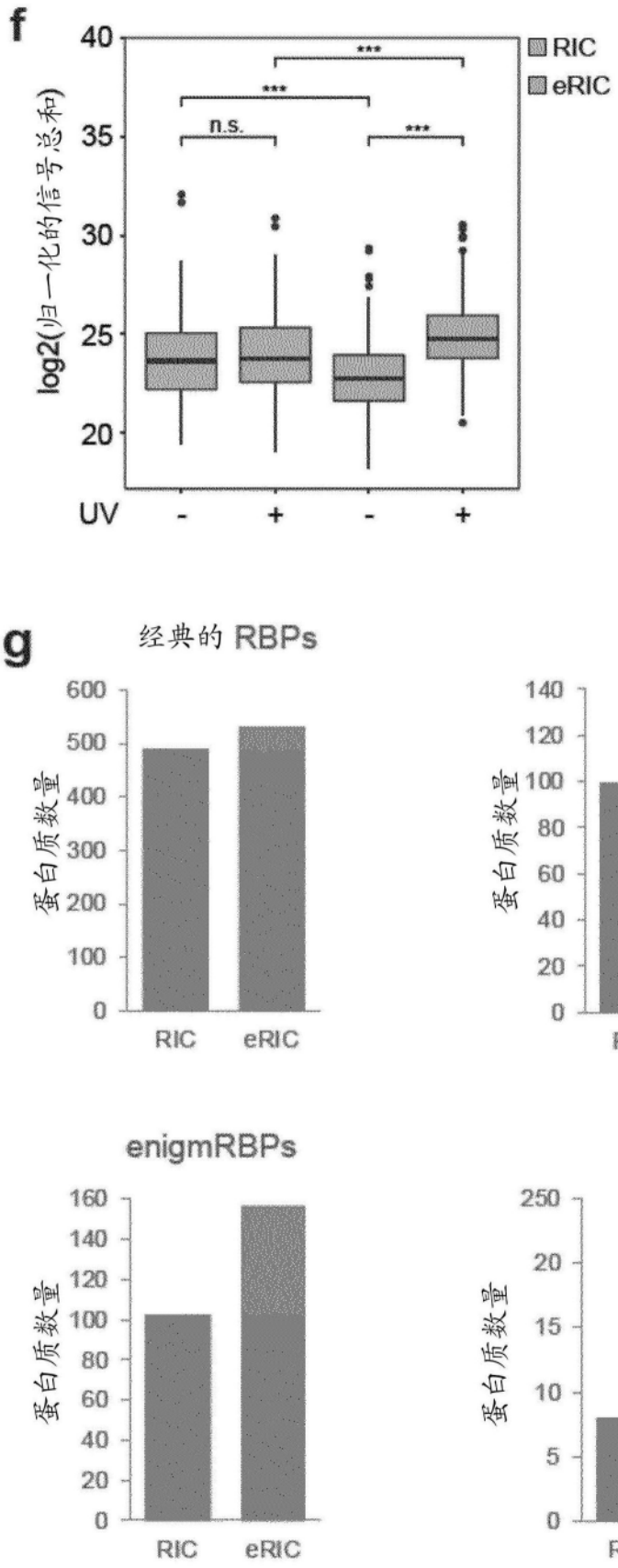

f
log2(归一化的信号总和)
40
35
30
25
20
UV
-
+
-
+
n.s.
***
***
***
RIC
eRIC
g
经典的 RBPs
蛋白质数量
600
500
400
300
200
100
0
RIC
eRIC
酶
蛋白质数量
140
120
100
80
60
40
20
0
RIC
eRIC
enigmRBPs
蛋白质数量
160
140
120
100
80
60
40
20
0
RIC
eRIC
代谢酶
蛋白质数量
250
20
15
10
5
0
RIC
eRIC

图10(续)

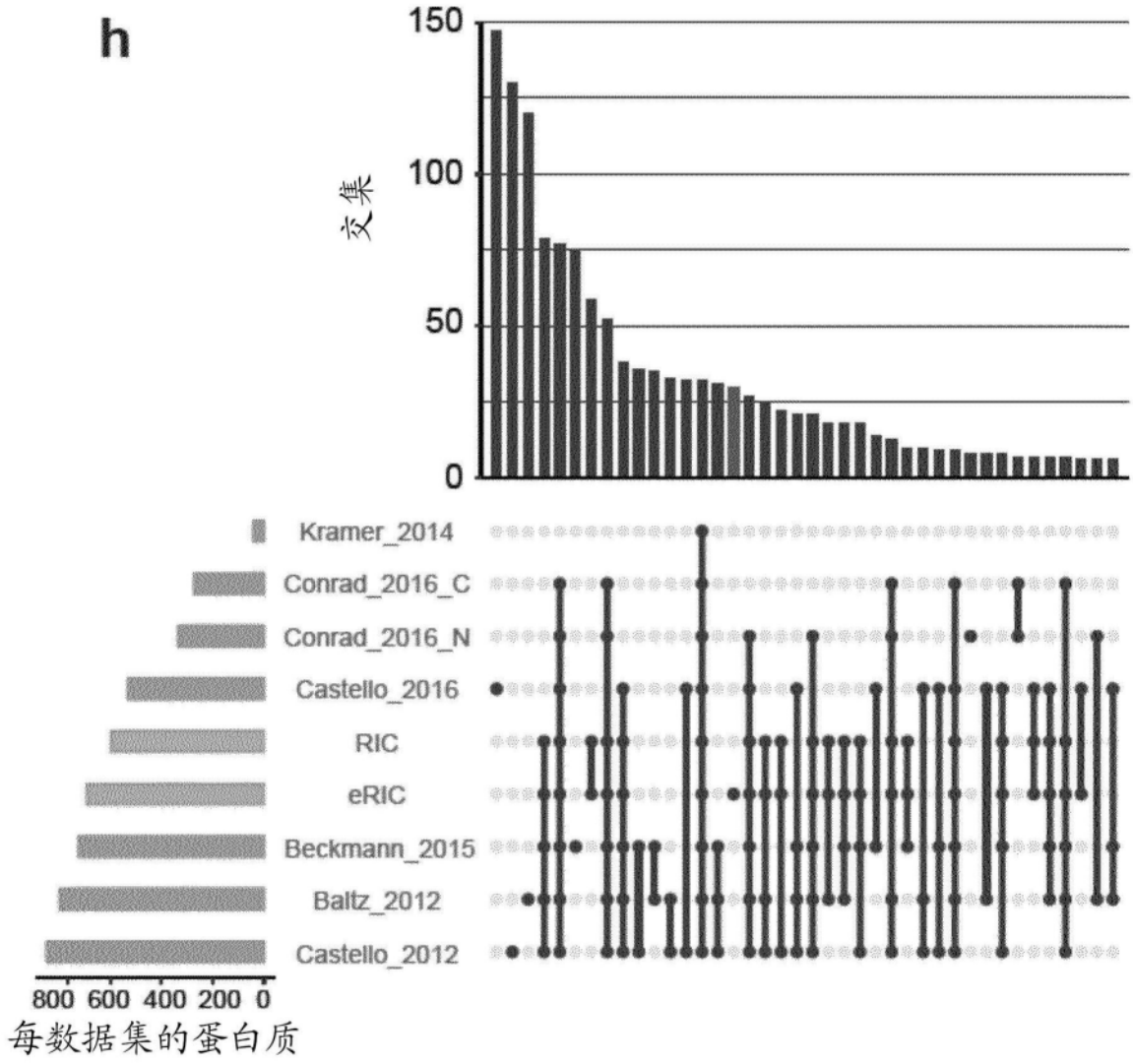

h
150
100
50
0
交集
Kramer_2014
Conrad_2016_C
Conrad_2016_N
Castello_2016
RIC
eRIC
Beckmann_2015
Baltz_2012
Castello_2012
800 600 400 200 0
每数据集的蛋白质

图10(续)

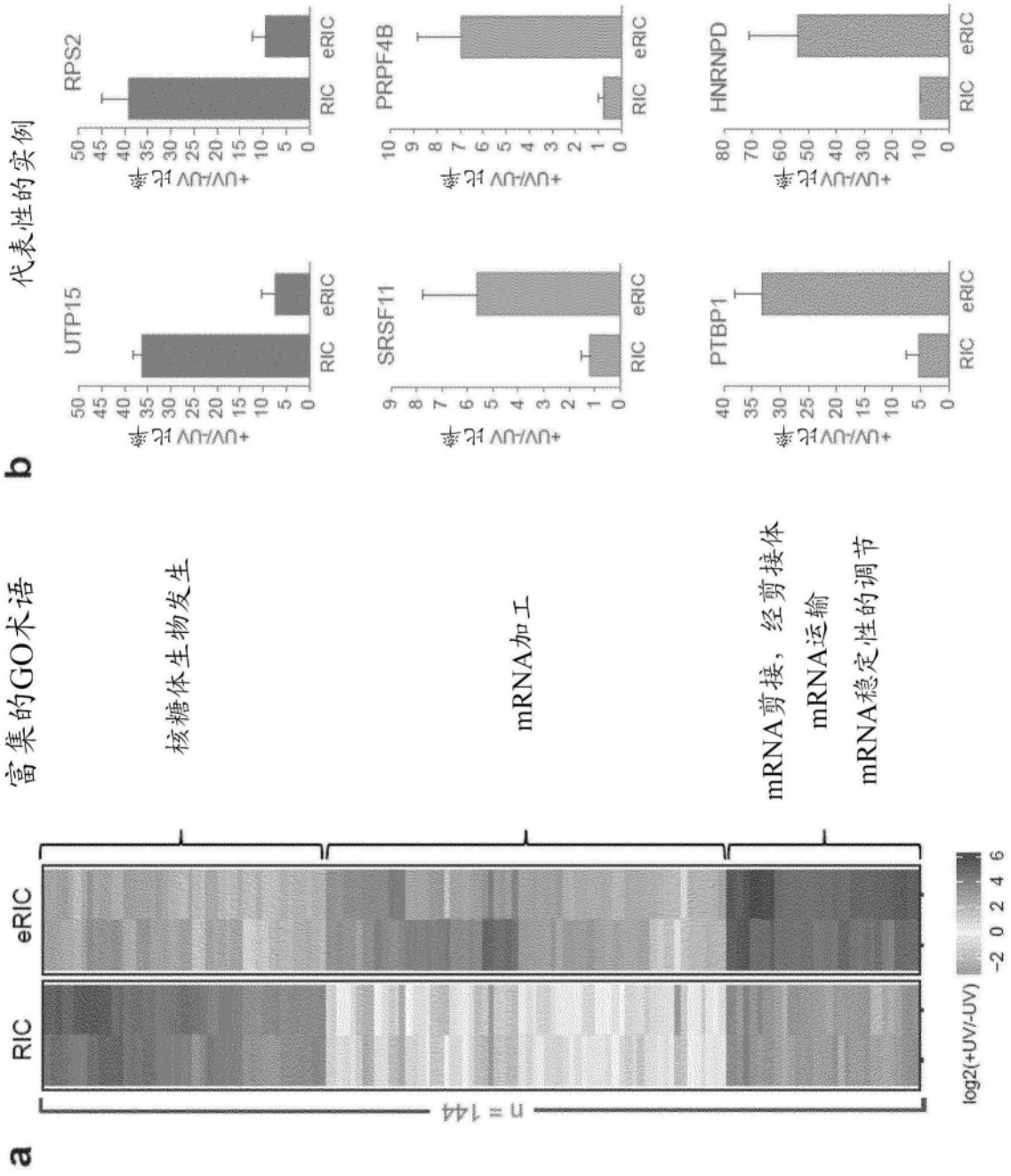

a
RIC
eRIC
n = 144
log2(+UV/-UV)
-2 0 2 4 6
富集的GO术语
核糖体生物发生
mRNA加工
mRNA剪接，经剪接体
mRNA运输
mRNA稳定性的调节
b
代表性的实例
RPS2
PRPF4B
HNRNPD
UTP15
SRSF11
PTBP1
+UV/-UV RC
RIC eRIC

图11

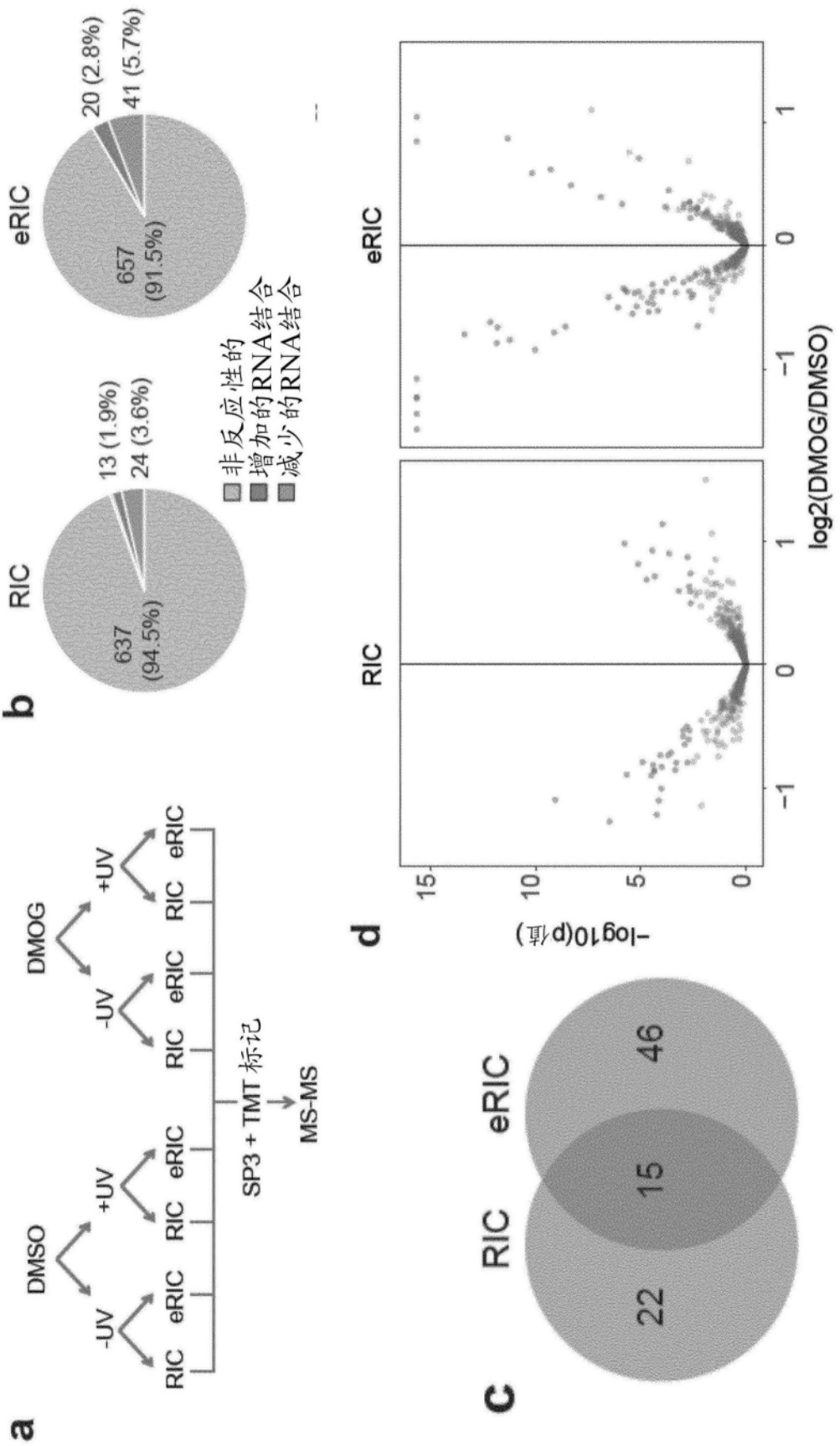

a
DMSO
DMOG
-UV
+UV
RIC
eRIC
SP3 + TMT 标记
MS-MS
b
RIC
eRIC
637 (94.5%)
13 (1.9%)
24 (3.6%)
657 (91.5%)
20 (2.8%)
41 (5.7%)
非反应性的
增加的RNA结合
减少的RNA结合
c
RIC
eRIC
22
15
46
d
RIC
eRIC
-log10(p值)
log2(DMOG/DMSO)

图12

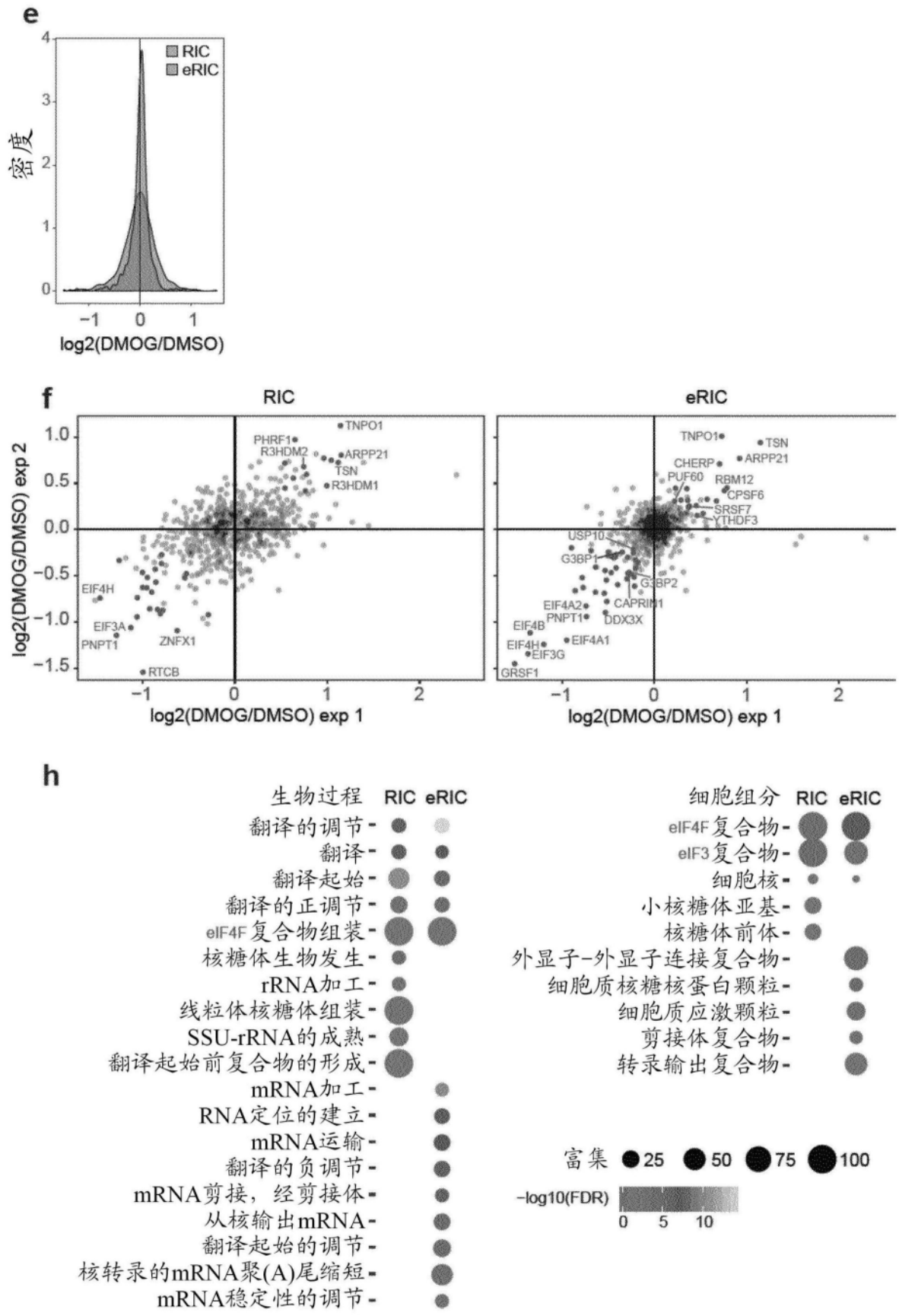

e
RIC
eRIC
密度
log2(DMOG/DMSO)
f
RIC
eRIC
log2(DMOG/DMSO) exp 2
log2(DMOG/DMSO) exp 1
TNPO1
PHRF1
R3HDM2
ARPP21
TSN
R3HDM1
EIF4H
EIF3A
PNPT1
ZNFX1
RTCB
CHERP
PUF60
RBM12
CPSF6
SRSF7
YTHDF3
USP10
G3BP1
G3BP2
EIF4A2
CAPRIN1
EIF4B
DDX3X
EIF4A1
EIF3G
GRSF1
h
生物过程 RIC eRIC
翻译的调节
翻译
翻译起始
翻译的正调节
eIF4F复合物组装
核糖体生物发生
rRNA加工
线粒体核糖体组装
SSU-rRNA的成熟
翻译起始前复合物的形成
mRNA加工
RNA定位的建立
mRNA运输
翻译的负调节
mRNA剪接，经剪接体
从核输出mRNA
翻译起始的调节
核转录的mRNA聚(A)尾缩短
mRNA稳定性的调节
细胞组分 RIC eRIC
eIF4F复合物
eIF3复合物
细胞核
小核糖体亚基
核糖体前体
外显子-外显子连接复合物
细胞质核糖核蛋白颗粒
细胞质应激颗粒
剪接体复合物
转录输出复合物
富集 25 50 75 100
-log10(FDR)
0 5 10

图12(续)

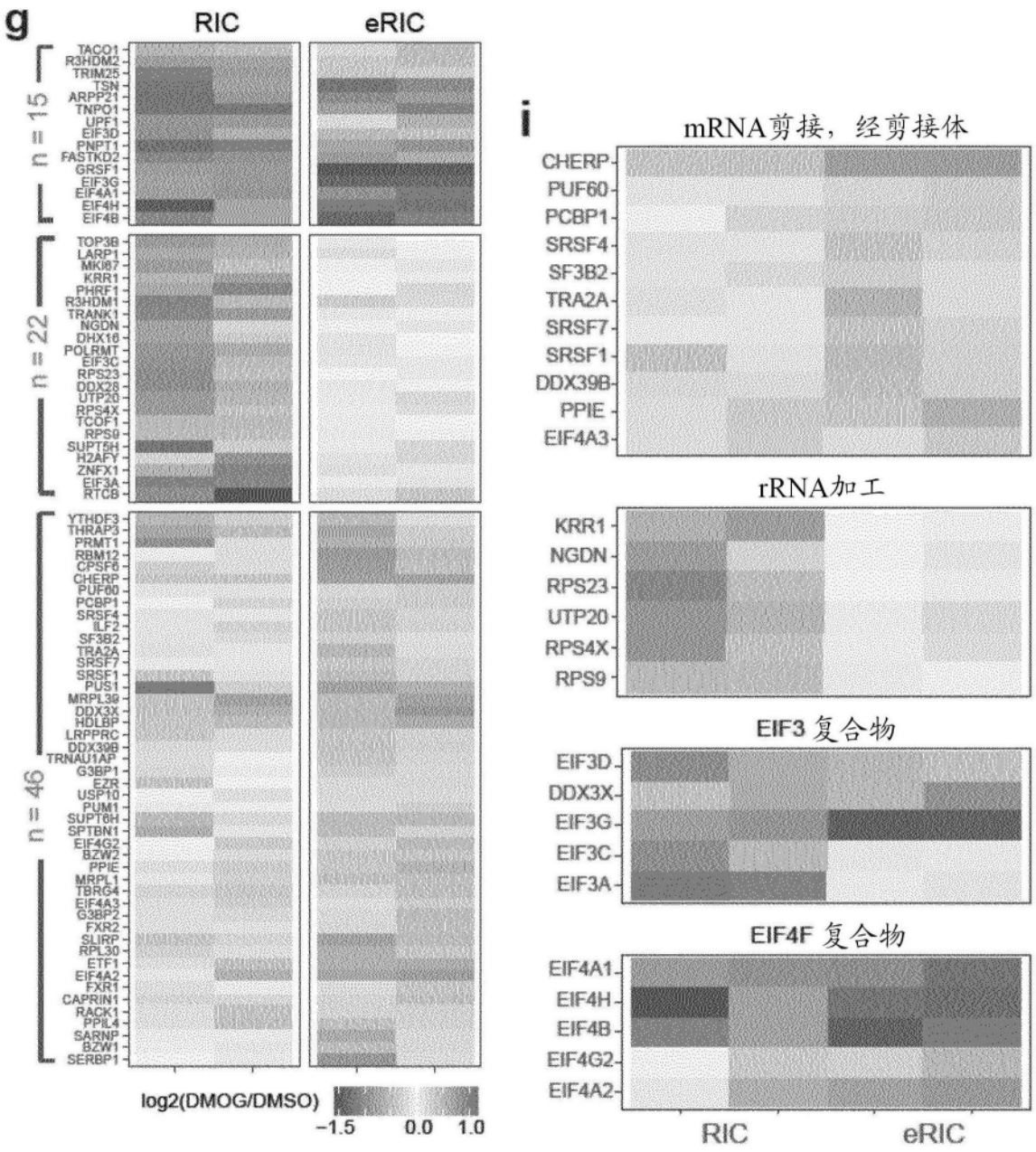

g
RIC
eRIC
n = 15
TACO1
R3HDM2
TRIM25
TSN
ARPP21
TNPO1
UPF1
EIF3D
PNPT1
FASTKD2
GRSF1
EIF3G
EIF4A1
EIF4H
EIF4B
n = 22
TOP3B
LARP1
MKI67
KRR1
PHRF1
R3HDM1
TRANK1
NGDN
DHX16
POLRMT
EIF3C
RPS23
DDX28
UTP20
RPS4X
TCOF1
RPS9
SUPT5H
H2AFY
ZNFX1
EIF3A
RTCB
n = 46
YTHDF3
THRAP3
PRMT1
RBM12
CPSF6
CHERP
PUF60
PCBP1
SRSF4
ILF2
SF3B2
TRA2A
SRSF7
SRSF1
PUS1
MRPL39
DDX3X
HDLBP
LRPPRC
DDX39B
TRNAU1AP
G3BP1
EZR
USP10
PUM1
SUPT6H
SPTBN1
EIF4G2
BZW2
PPIE
MRPL1
TBRG4
EIF4A3
G3BP2
FXR2
SLIRP
RPL30
ETF1
EIF4A2
FXR1
CAPRIN1
RACK1
PPIL4
SARNP
BZW1
SERBP1
log2(DMOG/DMSO)
−1.5
0.0
1.0
i
mRNA剪接，经剪接体
CHERP
PUF60
PCBP1
SRSF4
SF3B2
TRA2A
SRSF7
SRSF1
DDX39B
PPIE
EIF4A3
rRNA加工
KRR1
NGDN
RPS23
UTP20
RPS4X
RPS9
EIF3 复合物
EIF3D
DDX3X
EIF3G
EIF3C
EIF3A
EIF4F 复合物
EIF4A1
EIF4H
EIF4B
EIF4G2
EIF4A2
RIC
eRIC

图12(续)

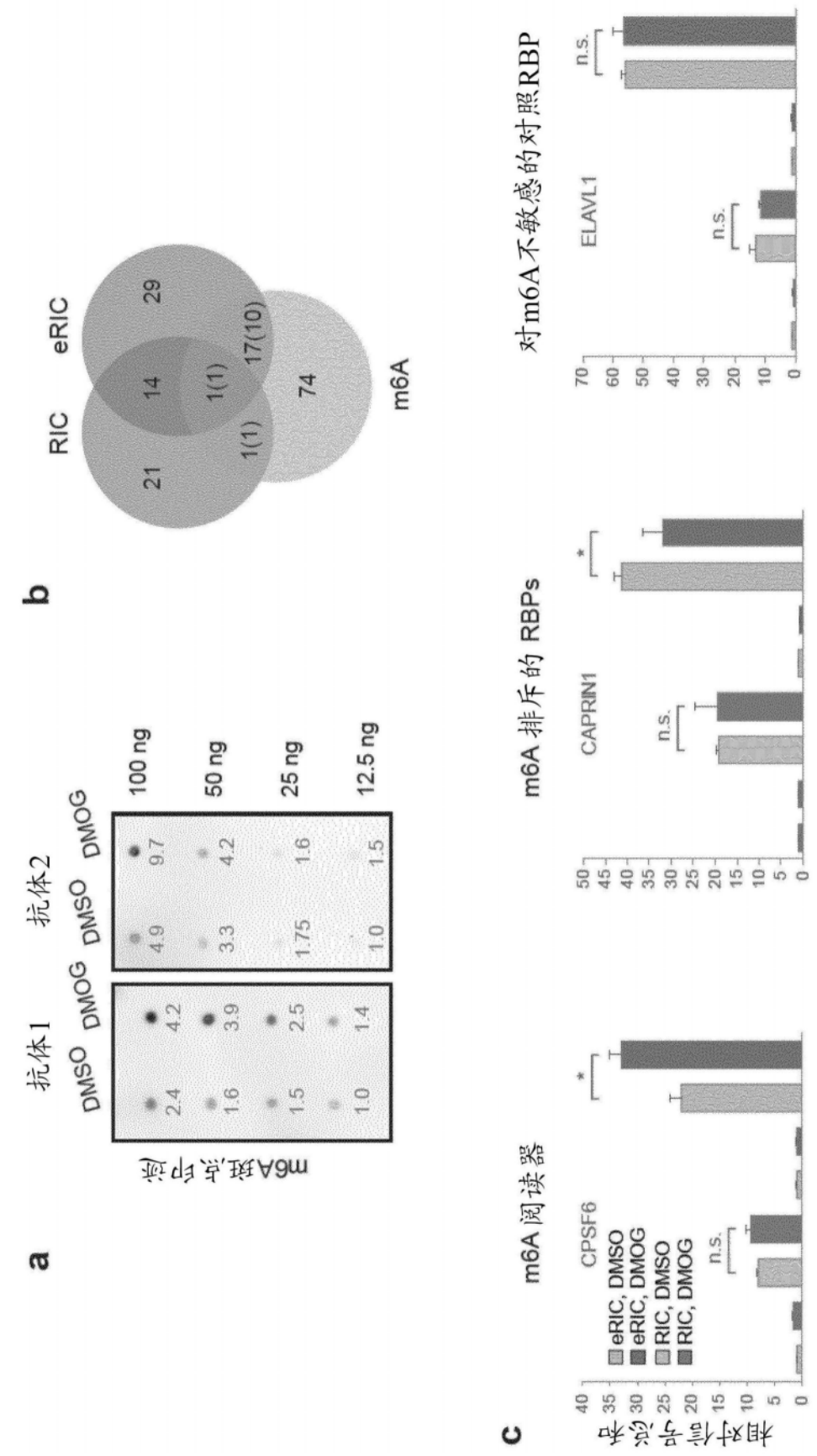

a
抗体1
抗体2
DMSO
DMOG
DMSO
DMOG
100 ng
50 ng
25 ng
12.5 ng
2.4
4.2
4.9
9.7
1.6
3.9
3.3
4.2
1.5
2.5
1.75
1.6
1.0
1.4
1.0
1.5
m6A斑点印迹
b
RIC
eRIC
21
14
1(1)
29
1(1)
17(10)
74
m6A
c
m6A 阅读器
m6A 排斥的 RBPs
对m6A不敏感的对照RBP
CPSF6
CAPRIN1
ELAVL1
n.s.
*
eRIC, DMSO
eRIC, DMOG
RIC, DMSO
RIC, DMOG
相对信号强度

图13

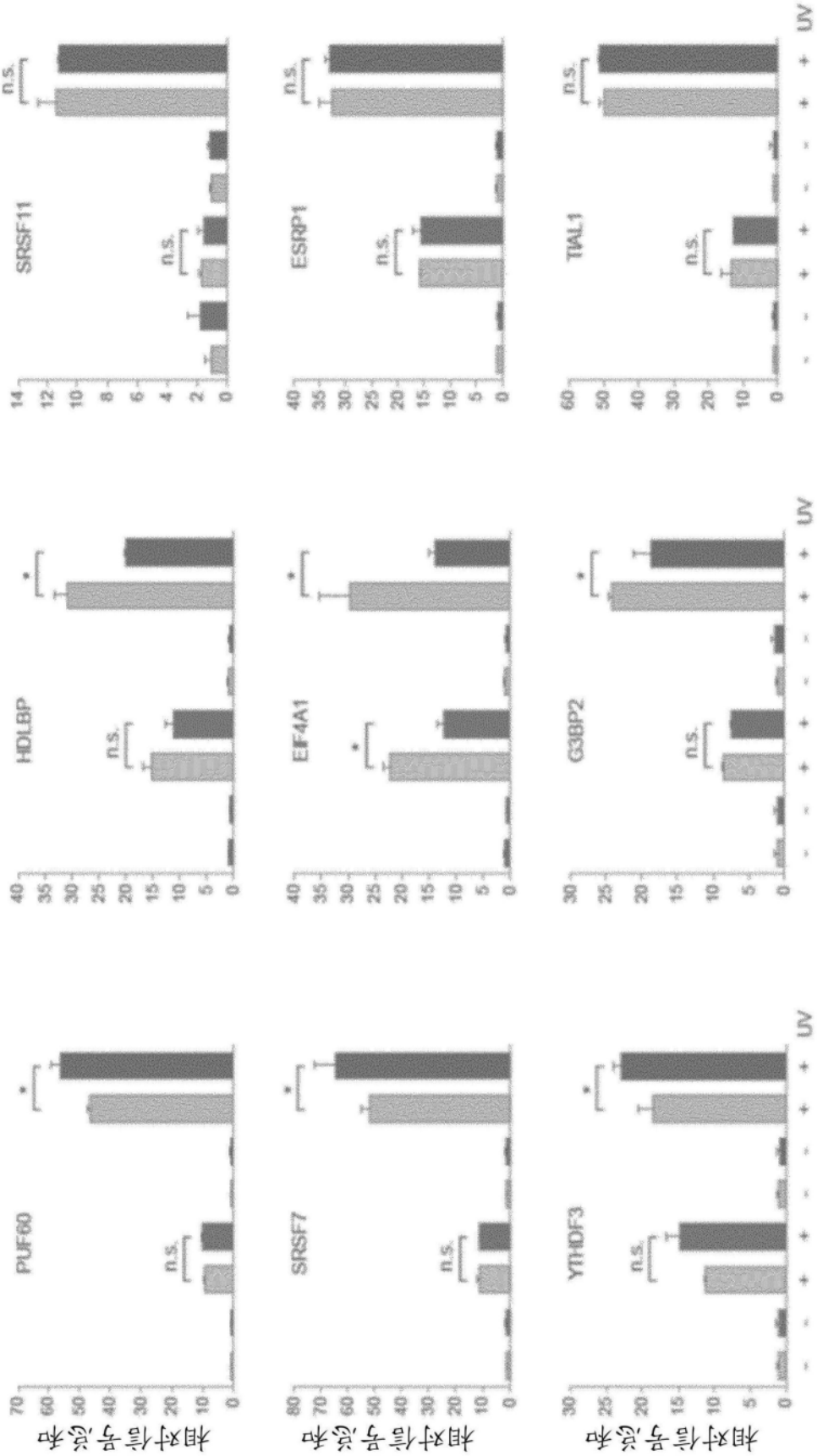

SRSF11
ESRP1
TIAL1
HDLBP
EIF4A1
G3BP2
PUF60
SRSF7
YTHDF3
n.s.
*
UV
相对信号,总和

图13(续)