

专题介绍

RNA 的免疫共沉淀分离及检测

荷兰涛 赵 爽 刘默芳*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所 RNA 研究技术平台, 上海 200031)

非编码 RNA 的发现使得 RNA 领域再次成为了生命科学研究关注的焦点。因为 RNA 是一种不稳定的生物大分子, 绝大多数的 RNA 都需要与特定的 RNA 结合蛋白质结合形成 RNA/ 蛋白复合物才能稳定存在于细胞中; 不仅如此, RNA 与 RNA 结合蛋白之间的动态关联贯穿和伴随了 RNA 的转录合成、加工和修饰、胞内运输和定位、功能发挥及降解的整个生命循环。鉴于此, 利用 RNA 结合蛋白分离或发现鉴定功能性 RNA 分子是 RNA 研究领域中一个不可或缺的研究方法。简单地说, 就是利用 RNA 结合蛋白的抗体免疫沉淀 RNA/ 蛋白复合物, 再从沉淀的 RNA/ 蛋白复合物中分离得到特定 RNA 结合蛋白的 RNA; 分离得到的 RNA 可以通过末端标记和变性胶电泳对 RNA 分子的大小进行鉴定, 也可以利用高通量 RNA 测序方法对 RNA 序列进行分析。

●全部所用的溶液试剂均经过 DEPC 处理或由 DEPC 水配制。

●RNA 抽提过种中乙醇漂洗步骤可以省略。

●RNA 样品溶解与保存:

TE (pH 8.0) 缓冲液 -80 °C (如果下一步操作涉及酶反应)

100% de-ionic Formamide (如果下一步是电泳检测)

●熟练的 RNA 操作非常重要。RNase 的污染可通过使用 RNazap 处理操作环境得到降低。

1 由组织或细胞裂解液免疫沉淀 RNP 复合物

(1)可预先UV照射组织和细胞固定RNA/结合蛋白复合物。

(2)使用预先冰浴冷却的 PBS 洗组织或细胞两次。

(3)将裂解液加入组织样品中进行匀浆(细胞样品匀浆步骤可省略)。

裂解液:

25 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 150 mmol/L KCl, 2 mmol/L EDTA, 0.5% NP40, 1 mmol/L NaF, 1 mmol/L DTT, 100 U/ml RNasin 核糖核酸酶抑制剂, EDTA-free 蛋白酶抑制剂。

(4)样品裂解液在 4 °C 下 14 000 r/min (16 000 g) 离心 10 min, 上清液将用于免疫沉淀。

(5)将预平衡的 Protein A/G Sepharose beads 与适量的抗体混匀, 于 4 °C 旋转混匀 6 h 左右。

(6)将第 3 步骤中准备的上清液样品加入 beads-

抗体混合液中于 4 °C 旋转混匀 6 h 以上或过夜。结合时间也取决抗体本身的质量和效率。

(7)将混匀液于 4 °C, 1 000 r/min 离心 10 s, 弃上清液, 用冰浴冷的低盐漂洗液洗 beads 两次, 每次 5 min, 冰上或 4 °C 进行。随后再用高盐漂洗液洗 beads 两次, 每次 5 min, 冰上或 4 °C 进行。

低盐漂洗液: (高盐漂洗液使用 300 mmol/L 的 NaCl)

50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 150 mmol/L NaCl (300 mmol/L), 1 mmol/L MgCl₂, 0.05% NP40, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 100 U/ml RNasin 核糖核酸酶抑制剂。

2 小分子 RNA 的抽提

(1)用 Proteinase K 溶液重悬 beads, 55 °C 消化 10 min。

(2)再用常规的 TRIzol 法抽提 RNA, 用乙醇沉淀。

3 RNA 5' 端标记和电泳检测

(1)用 Calf Intestinal Phosphatase 处理抽提得到的 RNA, 以去掉 5' 端磷酸基团。

(2)经酚氯仿抽提和乙醇沉淀后, 使用 γ -³²P ATP 标记 RNA 分子的 5' 末端。

(3)将标记后的 RNA 分子通过 15% 聚丙烯酰胺尿素变性胶进行电泳分离, 随后经放射自显影进行检测。

4 Solexa 高通量 RNA 测序

* 通讯作者。Tel: 021-54921146, Fax: 021-54921011, E-mail: mfliu@sibs.ac.cn