



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116063445 A

(43) 申请公布日 2023. 05. 05

(21) 申请号 202111299989.7

(22) 申请日 2021.11.04

(71) 申请人 北京大学

地址 100871 北京市海淀区颐和园路5号

(72) 发明人 王文恭 吴崇阳 易霞 唐颢

(74) 专利代理机构 北京三高永信知识产权代理

有限责任公司 11138

专利代理师 邢少真

(51) Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 1/14 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

权利要求书2页 说明书16页

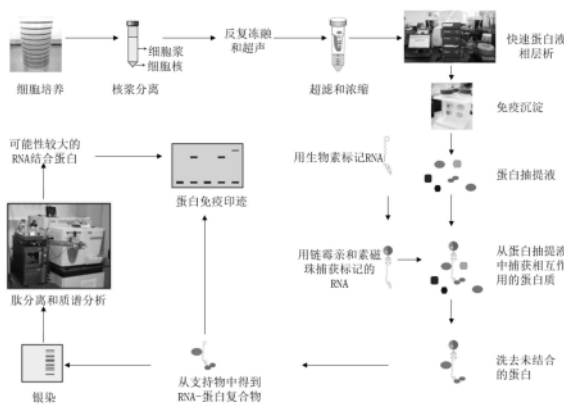
序列表2页 附图8页

## (54) 发明名称

RNA结合蛋白的预处理方法和分离方法

## (57) 摘要

本公开提供了一种RNA结合蛋白的预处理方法和分离方法,涉及生物学领域。该预处理方法包括:获取胞浆提取物;将胞浆提取物超声破碎,对所得混合物进行离心以获取上清液;用快速蛋白液相层析法(FPLC)处理上述离心步骤所得的上清液,以获得包含靶RNA结合蛋白的流分;从所述FPLC所得流分中分离与靶RNA分子特异性结合的RNA结合蛋白(即,靶RNA结合蛋白)。通过采用该预处理方法处理细胞,提高了从细胞分离RNA结合蛋白过程中的特异性蛋白筛选效率,降低了非特异性蛋白的存在量。



1. 一种RNA结合蛋白的预处理方法,其特征在于,所述方法包括:  
获取不含细胞核的胞浆提取物;和  
超声破碎和/或反复冻融所得胞浆提取物,  
任选地,所述预处理方法包括对超声破碎和/或反复冻融所得胞浆提取物进行蛋白层析(例如,快速蛋白液相层析)并收集含有RNA结合蛋白的流分,  
进一步任选地,所述预处理方法包括从含有RNA结合蛋白的流分中去除细胞骨架蛋白的步骤。
2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述方法包括:  
获取胞浆提取物;  
将所述胞浆提取物超声破碎,对所得混合物进行离心以获取上清液;  
用快速蛋白液相层析法(FPLC)处理离心所得的上清液,以获得包含靶RNA结合蛋白的流分共混物,其中,所述靶RNA结合蛋白是与靶RNA分子特异性结合的RNA结合蛋白;  
从所述FPLC所得流分中分离所述靶RNA结合蛋白。
3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述获取胞浆提取物的步骤包括:  
收集细胞;  
用胰酶消化所述细胞,然后进行离心,弃上清;  
加入含有蛋白酶抑制剂的HEPES缓冲液,冰上孵育,而后加入NP-40;  
离心,保留上清液以获得所述胞浆提取物。
4. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,在所述获取胞浆提取物的步骤之后,所述方法还包括:  
将所获取的胞浆提取物于-80℃下反复冻融3-5次。
5. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,将所述胞浆提取物超声破碎,对所得混合物进行离心以获取上清液的步骤包括:  
以3-8秒的间隔和3-8秒的超声持续时间,对所述胞浆提取物进行超声破碎4-6分钟;  
在4℃下,以10,000-12,000rpm的速度对所得混合物进行离心5-20分钟,保留上清液。
6. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,将所述胞浆提取物超声破碎,对所得混合物进行离心以获取上清液的步骤后,所述方法还包括:  
对离心所得的上清液进行过滤;  
将经过滤的上清液在4℃下,以12,000rpm离心10-20分钟以获得浓缩液。
7. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述用FPLC处理离心所得的上清液,以获得包含靶RNA结合蛋白的流分共混物的步骤进一步包括:  
按时间顺序收集FPLC处理后的多个流分;  
对所述多个流分进行SDS-PAGE凝胶电泳,然后银染以获得所述多个流分中不同分子量的蛋白质的分布图;  
根据所述分布图,确定所述靶RNA结合蛋白所在的一个或多个流分,将所述一个或多个流分进行合并以获得所述包含靶RNA结合蛋白的流分共混物。
8. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,在所述从FPLC所得流分中分离所述靶RNA结合蛋白的步骤之后,所述方法还包括:  
通过免疫沉淀法去除所述包含靶RNA结合蛋白的流分中的骨架蛋白,所述骨架蛋白选

自肌动蛋白、GAPDH、 $\alpha$ -微管蛋白、 $\beta$ -微管蛋白、IgG中的至少一种。

9. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述从FPLC所得流分中分离所述靶RNA结合蛋白的步骤进一步包括:

将标记有生物素的靶RNA分子固定在链霉亲和素偶联的磁珠上;

将固定有所述靶RNA分子的磁珠与从FPLC所得流分共孵育;

洗涤以去除未与所述靶RNA分子结合的蛋白;

收集所述磁珠上与所述靶RNA分子特异结合的蛋白,从而实现所述靶RNA结合蛋白的分离,示例性地,所述靶RNA分子选自p21、p16、载脂蛋白APOE中的至少一种。

10. 一种RNA结合蛋白的分离方法,其包括权利要求1-9中任一项所述的预处理方法的步骤。

## RNA结合蛋白的预处理方法和分离方法

### 技术领域

[0001] 本公开涉及生物医学领域,更具体地,涉及一种RNA结合蛋白的预处理方法和分离方法。

[0002] 背景领域

[0003] RNA结合蛋白(RNA binding proteins,RBPs)是指细胞中能够与双链或单链RNA结合并形成RNA-蛋白复合机器的一大类蛋白。通过识别并结合RNA,RBPs可调控RNA稳定性、选择性剪接、成熟转运乃至功能,进而影响相关生理与病理过程。

[0004] 中国科学院广州生物医药与健康研究院的Miguel A.Esteban等人设计了RICK(Newly Transcribed RNA interactome using click chemistry)技术,利用核酸标记技术,巧妙地将新合成的RNA标记上生物素,通过链霉亲和素偶联的磁珠,分离得到相应被标记RNA分子和与其相结合的蛋白分子。

[0005] CN106093436A公开了一种简便检测RNA与蛋白互作的试剂盒及其使用方法,该试剂盒包括标记有生物素的UTP、ATP、CTP、GTP混合物;T7 RNA聚合酶;细胞裂解液;链霉亲和磁珠;洗液和蛋白洗脱液。其中,用RNA去捕获与之相互作用的蛋白质,首先把已知序列的RNA进行标记(例如biotin),依靠这个标记将RNA固定到磁珠上,再和含有蛋白的物质共孵育,之后去掉未与RNA作用的上清并收集从磁珠上洗下来的蛋白,得到的蛋白可做质谱或免疫印迹实验。

[0006] 然而,尽管现有技术中通常会利用特异性结合来分离RBPs,在采用现有方法从细胞中分离特定RNA结合蛋白的过程中,往往出现存在大量的非特异性蛋白的情形,从而导致背景噪声高,筛选效率低下而错失与诱饵RNA相互作用的RNA结合蛋白的问题。

[0007] 本公开的发明人经过长期不懈的研究发现,现有技术的上述缺陷和本领域技术人员对于细胞样品的预处理认知不清相关。

### 发明内容

[0008] 为了克服现有技术的缺陷,本公开提供了一种RNA结合蛋白的预处理方法和分离方法。具体地,本公开提供了以下技术方案。

[0009] 本公开提供了一种从细胞分离RNA结合蛋白的预处理方法,其包括如下步骤:

[0010] (1) 获取不含细胞核的胞浆提取物;

[0011] (2) 超声破碎和/或反复冻融所得胞浆提取物。

[0012] 进一步地,上述预处理方法可包括对超声破碎和/或反复冻融所得胞浆提取物进行蛋白层析,并收集含有RNA结合蛋白的流分。

[0013] 更进一步地,上述预处理方法可包括从含有RNA结合蛋白的流分中去除细胞骨架蛋白的步骤。

[0014] 在本公开中,超声破碎和反复冻融可交替进行或者顺序进行。例如,在每次冻融过程中执行一次超声破碎。亦或,超声破碎后,执行反复冻融,反之亦然。

[0015] 示例性地,本公开中的反复冻融是指进行两次或两次以上的冻融,例如3-5次。更

具体地,在一个方面中,本公开实施方案提供了一种从细胞分离RNA结合蛋白的预处理方法,其特征在于,所述方法包括:

- [0016] 获取胞浆提取物;
- [0017] 将所述胞浆提取物超声破碎,对所得混合物进行离心以获取上清液;
- [0018] 用快速蛋白液相层析法(FPLC)处理离心所得的上清液,以获得包含靶RNA结合蛋白的流分共混物,其中,所述靶RNA结合蛋白是与靶RNA分子特异性结合的RNA结合蛋白;
- [0019] 从FPLC所得流分中分离所述靶RNA结合蛋白。
- [0020] 在一些实施方案中,所述获取胞浆提取物的步骤包括:
  - [0021] 收集细胞;
  - [0022] 用胰酶消化所述细胞,然后进行离心,弃上清;
  - [0023] 加入含有蛋白酶抑制剂的HEPES缓冲液,冰上孵育,而后加入NP-40;
  - [0024] 离心,保留上清液以获得所述胞浆提取物。
- [0025] 在一些实施方案中,在所述获取胞浆提取物的步骤之后,所述方法还包括:
  - [0026] 将所获取的胞浆提取物于低温(例如-80℃)下反复冻融,例如冻融3-5次。
- [0027] 在一些实施方案中,所述将所述胞浆提取物超声破碎,对所得混合物进行离心以获取上清液的步骤包括:
  - [0028] 以3-8秒的间隔和3-8秒的超声持续时间,对所述胞浆提取物进行超声破碎4-6分钟;
  - [0029] 在4℃下,以10,000-12,000rpm的速度对所得混合物进行离心5-20分钟,保留上清液。
- [0030] 在一些实施方案中,在所述将所述胞浆提取物超声破碎,对所得混合物进行离心以获取上清液的步骤后,所述方法还包括:
  - [0031] 对离心所得的上清液进行过滤;
  - [0032] 将经过滤的上清液置于蛋白浓缩柱中,在4℃下,以12,000rpm离心10-20分钟;
  - [0033] 取浓缩液,用适量PBS重悬所述浓缩液以获取合适浓度的浓缩的上清液。
- [0034] 在一些实施方案中,所述用FPLC处理离心所得的上清液,以获得包含靶RNA结合蛋白的流分共混物的步骤进一步包括:
  - [0035] 按时间顺序收集FPLC处理后的多个流分;
  - [0036] 对所述多个流分进行不连续SDS-PAGE凝胶电泳,然后银染以获得所述多个流分中不同分子量的蛋白质的分布图;
  - [0037] 根据所述分布图,确定所述靶RNA结合蛋白所在的一个或多个流分,将所述一个或多个流分进行合并以获得所述包含靶RNA结合蛋白的流分共混物。
- [0038] 在一些实施方案中,在所述从FPLC所得流分中分离所述靶RNA结合蛋白的步骤之后,所述方法还包括:
  - [0039] 通过免疫沉淀法去除所述包含靶RNA结合蛋白的流分中的骨架蛋白,所述骨架蛋白包括肌动蛋白、GAPDH、 $\alpha$ -微管蛋白、 $\beta$ -微管蛋白、IgG中的至少一种。
- [0040] 在一些实施方案中,所述从FPLC所得流分中分离所述靶RNA结合蛋白的步骤进一步包括:
  - [0041] 将标记有生物素的靶RNA分子固定在链霉亲和素偶联的磁珠上;

- [0042] 将固定有所述靶RNA分子的磁珠与从FPLC所得流分共孵育；
- [0043] 洗涤以去除未与所述靶RNA分子结合的蛋白；
- [0044] 收集所述磁珠上与所述靶RNA分子特异结合的蛋白，从而实现所述靶RNA结合蛋白的分离。
- [0045] 在一些实施方案中，所述靶RNA分子包括：p21、p16、载脂蛋白APOE。
- [0046] 本公开还提供了一种从细胞中分离RNA结合蛋白的方法，其包括本公开所述的预处理方法的各个步骤。
- [0047] 进一步地，本公开中所述的从细胞中分离RNA结合蛋白的方法还包括从预处理的样品中通过RNA捕获并分离RNA结合蛋白的步骤。例如，通过固定RNA的磁珠捕获并分离RNA结合蛋白。
- [0048] 在另一些方面中，本公开实施方案提供了一种试剂盒，其用于实现如上文的方面中任一实施方案所述的预处理或分离方法。
- [0049] 在本公开实施方案所提供的的预处理方法中，通过对细胞进行核浆分离以获得胞浆提取物，对所述胞浆提取物超声破碎并且离心以获取上清液，进一步结合快速蛋白液相层析法处理所得的上清液，获得了包含靶RNA结合蛋白的流分共混物。在后续利用体外转录、生物素标记的靶RNA片段为诱饵，分离通过上述预处理过程获得的流分共混物中的特定RNA结合蛋白时，提高了从细胞分离RNA结合蛋白过程中的特异性蛋白筛选效率，降低了非特异性蛋白的存在量和背景噪音。
- [0050] 可以在本公开的多个实施方案中独立实现各特征、功能和优点，或可以在另一些实施方案中组合各特征、功能和优点，其进一步详情可以参考下面的描述和附图。

## 附图说明

- [0051] 图1示出了根据本公开的RNA结合蛋白的鉴定方法的实验设计流程图。
- [0052] 图2示出了HeLa细胞核浆分离后，通过免疫印迹实验验证了核浆分离效果的图。
- [0053] 图3示出了通过FPLC处理后，按时间顺序收集的不同流分经SDS-PAGE凝胶电泳分离后的银染的检测结果图。其中，(A)针对的是FPLC流分中15-41组样品(奇数)；(B)针对的是FPLC流分中16-42组样品(偶数)；(C)针对的是FPLC流分中39-51组样品。
- [0054] 图4示出了胞浆蛋白通过快速蛋白液相层析系统(FPLC)滤出峰。
- [0055] 图5示出了包含目标RNA结合蛋白的FPLC流分经三轮抗体免疫沉淀后的Western blot检测结果图。其中，(A)针对的是FPLC流分中第31+33+35+37组的混合样品；(B)针对的是FPLC流分中第30+32+34+36+38组的混合样品。
- [0056] 图6示出了p21 mRNA相关探针的制备。其中，(A)示出了p21 mRNA的结构示意图；(B)示出了p21的编码区(CR) PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图；(C)示出了p21的3' UTR PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图。
- [0057] 图7示出了在不同处理方式的样品中捕获的p21的编码区(CR)和3' UTR的结合蛋白的银染图。其中，(A)示出了在HeLa全细胞提取物中富集的p21的编码区(CR)和3' UTR的结合蛋白的银染图(即，未经核浆分离、反复冻融、超声破碎、超滤浓缩和FPLC以及免疫沉淀等步骤)；(B)示出了在纯化的HeLa胞浆提取物中富集的p21的编码区(CR)和3' UTR的结合蛋白的银染图(即，仅经过核浆分离，但未经反复冻融、超声破碎、超滤浓缩和FPLC以及免疫沉淀等

步骤)；(C)示出了在纯化的HeLa胞浆提取物经反复冻融、超声破碎、超滤浓缩和FPLC滤出并收集第30+32+34+36组流分、经三轮免疫沉淀去除骨架蛋白后所收集的上清液中捕获的p21的编码区(CR)和3' UTR的结合蛋白的银染图；(D)示出了在纯化的HeLa胞浆提取物(经反复冻融、超声破碎、超滤浓缩和FPLC滤出)并收集第35+36组流分、经三轮免疫沉淀去除骨架蛋白后所收集的上清液中捕获的p21的编码区(CR)和3' UTR的结合蛋白的银染图。

[0058] 图8示出了在不同处理方式的样品中捕获的p21的编码区(CR)和3' UTR的结合蛋白的银染图。其中，(A)示出了在HeLa胞浆提取物未经过反复冻融和超声破碎，而仅经过超滤浓缩和FPLC系统滤出并收集第30+32+34+36+38组流分、经三轮免疫沉淀去除骨架蛋白后所收集的上清液中捕获的p21的编码区(CR)和3' UTR的结合蛋白的银染图；(B)示出了在HeLa胞浆提取物未经超声破碎，而仅经过反复冻融、超滤浓缩和FPLC滤出并收集第30+32+34+36+38组流分、经三轮免疫沉淀去除骨架蛋白后所收集的上清液中捕获的p21的编码区(CR)和3' UTR的结合蛋白的银染图。

[0059] 图9示出了采用根据本公开的方法获得的p21的3' UTR富集的RNA结合蛋白。其中，(A)、(B)、(C)别为三次独立实验(组1至组3)获得的质谱结果；(D)为三次实验取交集后得到的蛋白质(其中标粗体和下划线的是先前文献中报到过的p21 3' UTR的特异性结合蛋白。

[0060] 图10示出了利用RNA结合实验和免疫印迹实验对图7所得到的代表性RNA结合蛋白ELAVL1(HuR)、HNRNPD进行验证的图。

[0061] 图11示出了采用p16的编码区(CR)和3' UTR作为探针所富集到的RNA结合蛋白的图。其中，(A)示出了在纯化的HeLa胞浆提取物经FPLC滤出并收集第30+32+34+36+38组流分、经三轮免疫沉淀去除骨架蛋白后所收集的上清液中捕获的p16的编码区(CR)和3' UTR的结合蛋白的银染图；(B)示出了通过对银染条带切胶回收的蛋白进行质谱分析后鉴定出的p16 3' UTR的相关RNA结合蛋白。

[0062] 图12示出了采用小鼠载脂蛋白APOE mRNA的编码区(CR)和3' UTR、5' UTR作为探针所富集到的RNA结合蛋白的图。其中，(A)示出了在纯化的Hepa1-6胞浆提取物经FPLC滤出并收集第30+32+34+36+38组流分、经三轮免疫沉淀去除骨架蛋白后所收集的上清液中捕获的APOE mRNA的CR、3' UTR、5' UTR的结合蛋白的银染图；(B)示出了通过对银染条带切胶回收的蛋白进行质谱分析后鉴定出的APOE 3' UTR的相关RNA结合蛋白；(C)示出了利用RNA结合实验和免疫印迹实验对代表性RNA结合蛋白进行验证的图。

## 具体实施方式

[0063] 以下描述的多个示例在本质上仅是说明性的，并且绝非旨在限制本公开、其应用或用途。另外，下文描述的示例和实施方案提供的优点在本质上是说明性的并且并非所有示例和实施方案提供了相同优点或同样程度的优点。

[0064] 该具体实施方式包括接下来的以下部分：(1)定义；(2)概述；以及(3)实施例。

[0065] 定义

[0066] 除非另有说明，否则以下定义适用于本文。

[0067] 当与数值结合使用时，“约”意指所修饰的数值的 $\pm 5\%$ 。

[0068] “包括”、“包含”和“具有”(及其变形)可互换使用，意指包括但不必限于此，为开放式术语，其并不意图排除其他未引用的要素或方法步骤。

[0069] 如“第一”、“第二”和“第三”等的术语用于区分或识别组中的各个成员等,而不意图对顺序或数值进行限制。

[0070] “快速蛋白液相色谱(Fast protein liquid chromatography,FPLC)”是一种蛋白液相色谱,其原理与高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography,HPLC)类似,是由经典的液体柱层析引入气相色谱理论,并且对相体进行了改进,配用高压输液泵,采用高灵敏检测器、梯度洗脱装置、自动收集装置和微机发展起来的现代液相色谱。它不但保持了HPLC的快速、高分辨率等特性,而且还具有柱容量大、回收效率高及不易使生物大分子失活等特性。

[0071] “p21”是目前已知的具有最广泛CDK抑制活性的细胞周期抑制蛋白,其具有广泛抑制cyclin-复合物、负性调节CDK的功能,并且在抑制肿瘤方面发挥作用。

[0072] “p16”是重要的抑癌基因,其抑制细胞周期蛋白依赖性激酶CDK4和6,是细胞周期G1/S期转换的调控基因。

[0073] “载脂蛋白APOE(apolipoprotein E)”是血浆脂蛋白中的一个重要组成部分,对血浆脂质代谢发挥着重要的调节作用,其基因可以调节许多生物学功能,与许多疾病发病有关。

[0074] “肌动蛋白(actin)”是一类细胞骨架蛋白,是分子量大约在42,000的球状蛋白质。除了已经知道的线虫类精子细胞之外,在所有的真核细胞中均发现有该蛋白质。肌动蛋白是生物体中微丝的两个单体亚基之一,而微丝则是细胞骨架三大组成结构之一,肌动蛋白还构成了肌细胞中具有收缩功能的组织。所以,肌动蛋白对于细胞活动起到很大的作用,比如肌肉的收缩,细胞的转移、分裂和原质的流动、囊泡和胞器的运动、细胞间信息的传递、细胞的形状和连结的建立和维持等。

[0075] “微管蛋白(tubulin)”是一类细胞骨架蛋白,含有多个成员的蛋白质家族。其最常见的成员是 $\alpha$ -微管蛋白和 $\beta$ -微管蛋白,它们是组成微管的主要成分。微管由 $\alpha$ -微管蛋白和 $\beta$ -微管蛋白所形成的二聚体为单位聚集而成。细胞内微管蛋白的聚集程度会影响微管的长度,并进一步影响细胞形态。

[0076] 概述

[0077] 总体上来讲,如本文中所描述的从细胞分离RNA结合蛋白的预处理方法和试剂盒能够以较低的背景噪音、高效地实现RNA结合蛋白分离、筛选与捕获,降低了非特异性蛋白的存在量。

[0078] 在根据现有方法(如CN106093436A)检测RNA与蛋白的相互作用时,发明人发现,该方法难以实现有效的RNA结合蛋白筛选与鉴定。本发明人推测其原因在于:1)常规细胞或组织裂解方法难以破碎胞浆中的某些细胞器或大分子复合体,使胞浆蛋白不能完全释放,影响蛋白捕捉效果;2)源自细胞骨架的蛋白、非RNA结合蛋白以及其它未知RNA与靶RNA相互作用带来的非特异信号造成了干扰。这些潜在难题极大程度地限制了筛选和鉴定靶RNA结合蛋白过程中的准确性与可靠性。

[0079] 在本公开实施方案所提供的的预处理方法中,通过对细胞进行核浆分离以获得胞浆提取物,对所述胞浆提取物超声破碎并且离心以获取上清液,进一步结合快速蛋白液相层析法处理所得的上清液,获得了包含靶RNA结合蛋白的流分共混物。在后续利用体外转录、生物素标记的靶RNA片段为诱饵,分离通过上述预处理过程获得的流分共混物中的特定



RNA结合蛋白时,提高了从细胞分离RNA结合蛋白过程中的特异性蛋白筛选效率,降低了非特异性蛋白的存在量和背景噪音。

[0080] 在一些实施方案中,本公开实施方案提供了一种从细胞分离RNA结合蛋白的预处理方法,所述方法包括:

[0081] 获取胞浆提取物;

[0082] 将所述胞浆提取物超声破碎,对所得混合物进行离心以获取上清液;

[0083] 用快速蛋白液相层析法(FPLC)处理离心所得的上清液,以获得包含靶RNA结合蛋白的流分共混物,其中,所述靶RNA结合蛋白是与靶RNA分子特异性结合的RNA结合蛋白;

[0084] 从FPLC所得流分中分离所述靶RNA结合蛋白。

[0085] 在一些实施方案中,所述获取胞浆提取物的步骤包括:

[0086] 收集细胞;

[0087] 用胰酶消化所述细胞,然后进行离心,弃上清;

[0088] 加入含有蛋白酶抑制剂的HEPES缓冲液,冰上孵育,而后加入NP-40;可选地,使NP-40彻底分散均匀后,于4℃,500g,离心3-5分钟,优选5分钟;

[0089] 离心,保留上清液以获得所述胞浆提取物。

[0090] 本发明人发现,通过增加核浆分离步骤来获得胞浆提取物,可以有效去除核蛋白对RNA的非特异结合,从而有效降低RNA结合背景。进一步地,通过用FPLC对浓缩后的蛋白进行分离,可以去除体系中的蛋白-蛋白、RNA-蛋白复合体,尽可能地获取游离状态的蛋白,从而提高筛选效率并降低非特异结合。

[0091] 在一些实施方案中,在所述获取胞浆提取物的步骤之后,所述方法还包括:

[0092] 将所获取的胞浆提取物于-80℃下反复冻融3-5次。

[0093] 在一些实施方案中,所述将所述胞浆提取物超声破碎,对所得混合物进行离心以获取上清液的步骤包括:

[0094] 以3-8秒的间隔和3-8秒的超声持续时间,对所述胞浆提取物进行超声破碎4-6分钟;

[0095] 在4℃下,以10,000-12,000rpm的速度对所得混合物进行离心5-20分钟,保留上清液。

[0096] 本发明人发现,通过将胞浆提取物反复冻融和超声破碎,能够破坏细胞质中的细胞器,充分释放胞浆蛋白,提高筛选效率。本发明人进一步发现,当将胞浆提取物在-80℃下反复冻融3-5次,优选地3-4次,然后用超声波破碎机超声4-6分钟(以3-8秒的间隔和超声持续时间),然后于4℃,12,000rpm离心5-20分钟,可选地,5-15分钟,优选地,10-15分钟时,最终的银染结果图表现出最优的分离效果,其中背景噪音降低水平和所捕获的蛋白种类之间具有较好平衡。

[0097] 在一些实施方案中,在所述将所述胞浆提取物超声破碎,对所得混合物进行离心以获取上清液的步骤后,所述方法还包括:

[0098] 对离心所得的上清液进行过滤;

[0099] 将经过滤的上清液置于蛋白浓缩柱(如3K蛋白浓缩柱)中,在4℃下,以12,000rpm,采用离心10-20分钟,优选地10-15分钟;

[0100] 取浓缩液,用适量PBS重悬所述浓缩液以获取合适浓度的浓缩的上清液。

[0101] 在一些实施方案中,所述用FPLC处理离心所得的上清液,以获得包含靶RNA结合蛋白的流分共混物的步骤进一步包括:

[0102] 按时间顺序收集FPLC处理后的多个流分;

[0103] 对所述多个流分进行SDS-PAGE凝胶电泳,然后银染以获得所述多个流分中不同分子量的蛋白质的分布图;

[0104] 根据所述分布图,确定所述靶RNA结合蛋白所在的一个或多个流分,将所述一个或多个流分进行合并以获得所述包含靶RNA结合蛋白的流分共混物。

[0105] 本发明人发现,通过对FPLC流分进行行SDS-PAGE凝胶电泳,然后银染以获得所述多个流分中不同分子量的蛋白质的分布图,并根据该分布图来选择合适的流分共混物,有助于获得丰度高、蛋白复合物少,并且整体蛋白分子量大小处于200KD以下的预处理样品。优选地,选择整体分子量处于200KD以下的流分组进行合并。在一些实施方案中,可以在第30-38组流分中选择其中的任意2、3、4、5、6、7、8、9组流分进行混合,来获得所述流分共混物。在一些优选的实施方案中,可以在第35-38组流分中选择其中的任意2、3、4组流分进行混合,来获得所述流分共混物。

[0106] 在一些实施方案中,在所述从FPLC所得流分中分离所述靶RNA结合蛋白的步骤之后,所述方法还包括:

[0107] 通过免疫沉淀法去除所述包含靶RNA结合蛋白的流分中的骨架蛋白,所述骨架蛋白包括肌动蛋白、GAPDH、 $\alpha$ -微管蛋白、 $\beta$ -微管蛋白、IgG中的至少一种。

[0108] 本发明人发现,用免疫沉淀的方法去除流分中的骨架蛋白如actin、GAPDH、tubulin等,可以更好地去除非特异的结合,降低背景噪音。

[0109] 在一些实施方案中,所述从FPLC所得流分中分离所述靶RNA结合蛋白的步骤进一步包括:

[0110] 将标记有生物素的靶RNA分子固定在链霉亲和素偶联的磁珠上;

[0111] 将固定有所述靶RNA分子的磁珠与从S3所得流分共孵育;

[0112] 洗涤以去除未与所述靶RNA分子结合的蛋白;

[0113] 收集所述磁珠上与所述靶RNA分子特异结合的蛋白,从而实现所述靶RNA结合蛋白的分离。

[0114] 通过采用生物素标记的靶RNA,可以选择性地分离并捕获、富集鉴定与靶RNA分子或片段结合的RNA结合蛋白。

[0115] 在一些实施方案中,所述靶RNA分子包括:p21、p16、载脂蛋白APOE。

[0116] 在另一个方面中,本公开实施方案提供了一种试剂盒,其用于实现上文任一实施方案的预处理方法和分离方法。

[0117] 本公开实施方案所提供的预处理方法和分离方法,既可用于筛选与特定RNA结合的RNA结合蛋白,也可用于筛选鉴定新的RNA结合蛋白。

[0118] 实施例

[0119] 下面通过具体实施例对本发明进行说明,但本发明并不局限于此,凡在本发明的精神和原则之内所做的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

[0120] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法;下述实施例中所用的试剂、材料等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

- [0121] (一) 仪器、材料及实际配制
- [0122] 1. 主要仪器:
- [0123] CO<sub>2</sub> 孵箱: 美国 Thermo 公司产品;
- [0124] 细胞培养洁净工作台: 美国 Thermo 公司产品;
- [0125] 移液器: 德国 Eppendorf 公司;
- [0126] 高速冷冻离心机: 德国 Eppendorf 公司;
- [0127] 全波长扫描多功能读数仪: 美国 Thermo 公司;
- [0128] -80℃ 超低温冰箱: 美国 Thermo 公司;
- [0129] -20℃ 超低温冰箱: 中国美菱公司;
- [0130] 恒温加热台: 德国 Eppendorf 公司;
- [0131] 扫描仪: 日本 Epson 公司;
- [0132] DNA 琼脂糖电泳仪: 美国 Bio-Rad 公司;
- [0133] Image master 凝胶成像系统及图象分析软件: 瑞典 Pharmacia 公司;
- [0134] MVS-1 涡旋混和器: 北京北德科学仪器有限公司;
- [0135] 水平摇床: 海门市其林贝尔仪器制造有限公司;
- [0136] 垂直摇床: 海门市其林贝尔仪器制造有限公司;
- [0137] PCR 仪: 美国 Bio-Rad 公司;
- [0138] 电子天平: 上海精密科技仪器公司;
- [0139] 垂直板电泳仪: 美国 Bio-Rad 公司;
- [0140] 电转仪: 美国 Bio-Rad 公司;
- [0141] 梯度凝胶电泳系统: 美国 Invitrogen 公司;
- [0142] HWI 恒温水浴箱: 北京医疗设备厂;
- [0143] 倒置相差显微镜: 日本 Olympus 公司;
- [0144] Vibra Cell 超声破碎仪: 美国 Sonics 公司;
- [0145] ÄKTA™ pure 色谱系统: 美国 GE Health Care;
- [0146] Superose 6 10/300: 美国 GE Health Care;
- [0147] UV 紫外交联仪: 美国 Hoefer 公司;
- [0148] 磁力架: 美国 Invitrogen 公司。
- [0149] 2. 主要试剂和耗材:
- [0150] 细胞培养试剂: DMEM (4.5g/L 葡萄糖, 含 L-谷氨酰胺) 细胞培养基、胎牛血清均为美国 Hyclone 公司产品。胰蛋白酶购于迈晨科技 (北京) 有限公司。青霉素、链霉素购于 Thermo 公司, 细胞培养皿和细胞培养板购于 BD 公司, 细胞刮和细胞铲为美国 Corning 公司产品;
- [0151] DNA 琼脂糖凝胶电泳试剂: 普通琼脂糖购自北京鼎国生物技术公司;
- [0152] Trans2K plus Marker 购自北京全式金生物科技有限公司;
- [0153] DL2000 购自于日本 Takara 公司;
- [0154] 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 购自美国 Invitrogen 公司;
- [0155] Dynabeads M-280 链霉亲和素购自美国 Invitrogen 公司;
- [0156] 蛋白酶抑制剂 Cocktail 购自瑞士罗氏公司;
- [0157] Biotin-11-UTP 购自美国 Biotium 公司;

- [0158] RiboLock RNase抑制剂购自美国Thermo公司；
- [0159] 无菌针头式滤器购自美国Pall公司；
- [0160] 超滤浓缩管购自美国Millipore公司。
- [0161] 3. 主要试剂盒：
- [0162] BCA蛋白定量试剂盒购自美国Thermo公司；
- [0163] 琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司；
- [0164] RNA纯化试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司；
- [0165] RNA反转试剂盒购自北京全式金生物科技有限公司；
- [0166] T7体外转录试剂盒购自美国Thermo公司；
- [0167] 细胞核蛋白和胞浆蛋白制备试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司；
- [0168] 凝胶过滤校准试剂盒购自美国GE Health Care公司；
- [0169] ECL发光试剂盒购自北京博奥龙免疫技术有限公司；
- [0170] 银染试剂盒购自美国Thermo公司。
- [0171] 4. 主要试剂及配制：
- [0172] (1) 细胞培养相关试剂
- [0173] 1) PBS溶液:NaCl 8.5g,KCl 0.2g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 2.85g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.27g,调节pH值至7.0,定容至1000mL三蒸水。高压灭菌,4℃储存备用。
- [0174] (2) Western blot试剂
- [0175] 1) 三去污细胞裂解液:50mM Tris-HCl (pH 8.0),150mM NaCl,0.1%SDS,1%NP-40,0.5%去氧胆酸钠；
- [0176] 2) 30%丙烯酰胺:29.2g丙烯酰胺,0.8g N,N'-亚甲双丙烯酰胺,加蒸馏水至100mL,滤纸过滤,棕色瓶中4℃存放；
- [0177] 3) 10%分离胶(10mL):4.0mL蒸馏水,3.3mL 30%丙烯酰胺,2.5mL 1.5M Tris-HCl (pH 8.8),0.1mL 10%SDS,0.1mL 10%过硫酸胺,0.004mL TEMED；
- [0178] 4) 5%浓缩胶(5mL):3.4mL蒸馏水,0.83mL 30%丙烯酰胺,0.63mL 1.5M Tris-HCl (pH 8.8),0.05mL 10%SDS,0.05mL 10%过硫酸胺,0.005mL TEMED；
- [0179] 5) 6×上样缓冲液:300mM Tris-HCl (pH 6.8),12%SDS,0.6%溴酚兰,60%甘油,6%-巯基乙醇；
- [0180] 6) Tris-HCl-甘氨酸电泳缓冲液:25mM Tris-HCl (pH 8.3),250mM甘氨酸,0.1% SDS；
- [0181] 7) 电转缓冲液:39mM甘氨酸,48mM Tris-HCl,0.037%SDS,20%甲醇；
- [0182] 8) 考马斯亮兰脱色液:45mL甲醇,45mL蒸馏水,10mL冰醋酸,混合均匀；
- [0183] 9) 封闭液:5%脱脂奶粉,以TBST配制；
- [0184] 10) TBST:100mM Tris-HCl (pH 7.5),0.9%NaCl,0.1%Tween 20；
- [0185] 11) 显影液:取2.54g显影粉小包粉剂,加入300mL三蒸水中,避光搅拌待其完全溶解,后加入32.4g大包粉剂,搅拌混匀溶解,三蒸水定容至500mL,常温避光保存备用；
- [0186] 12) 定影液:取11.52g定影粉小包粉剂,加入300mL三蒸水中,避光搅拌待其完全溶解,后加入42.62g定影粉大包粉剂,搅拌混匀溶解,三蒸水定容至500mL,常温避光保存备用；

- [0187] 13) 胞浆胞核蛋白提取缓冲液:
- [0188] 缓冲液A的配方:10mM HEPES (PH7.9),10mM KCl,1.5mM MgCl<sub>2</sub>,加蛋白酶抑制剂/DTT (5mM);
- [0189] 缓冲液B的配方:20mM HEPES (PH7.9),0.45M NaCl,1mM EDTA,加蛋白酶抑制剂/DTT (5mM)。
- [0190] (3) RNA pull-down实验试剂:
- [0191] 1) 2×TENT缓冲液:20mM Tris-Hcl (PH=8.0),2mM EDTA (PH=8.0),500mM NaCl,1%TritonX-100;
- [0192] 2) 溶液A:0.1M NaOH,0.05M NaCl;
- [0193] 3) 溶液B:0.1M NaCl。
- [0194] (二) 实验方法:
- [0195] 1. 利用Trizol进行总RNA提取,具体方法参见Sigma公司Trizol的说明书。
- [0196] 2. 利用全式金RNA反转试剂盒反转录合成cDNA:
- [0197] (1) 反应体系如下:
- [0198] RNA溶液2μg
- [0199] 2×TransScript混合物10μL
- [0200] TransScript酶1μL
- [0201] 随机引物 (0.5μg/μl) 1μL
- [0202] DEPC水补齐至20μL。
- [0203] (2) 轻轻混匀,离心后,25℃10分钟,42℃30分钟,85℃5分钟,4℃终止,产物-20℃保存。
- [0204] 3. 引物设计:
- [0205] 根据p21序列设计CR和3' UTR片段的引物,在所有上游引物的5' 端加上T7启动子序列:5' -CCAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGAGA-3' (SEQ ID NO:1)
- [0206] p21 (CR) -F:ATGTCAGAACCGGCTGGG (SEQ ID NO:2)
- [0207] p21 (CR) -R:TTAGGGCTTCTCTTGGAGAAGA (SEQ ID NO:3)
- [0208] p21 (3' UTR) -F:TCCGCCACAGGAAG (SEQ ID NO:4)
- [0209] p21 (3' UTR) -R:AAGTAAAGTCACTAAGAATCATTTATTG (SEQ ID NO:5)。
- [0210] 4. PCR扩增:
- [0211] 反应体系参照NEB公司超保真PCR试剂盒说明书:
- |             |        |
|-------------|--------|
| cDNA        | 1 μL   |
| 正向引物        | 1 μL   |
| [0212] 反向引物 | 1 μL   |
| 2×Mix       | 10 μL  |
| 补灭菌水至       | 20 μL。 |
- [0213] 将其放入PCR仪中进行PCR,设置程序如下:

- 95°C, 10 分钟;
- 95°C, 30 秒;
- [0214] 50-60°C, 30 秒;
- 72°C, 按 1 kb/30sec 调整延伸时间;
- 72°C, 10 分钟;
- 4°C, 保持。
- [0215] 5. 利用天根琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒回收PCR产物:
- [0216] (1) DNA琼脂糖凝胶电泳:
- [0217] 使用琼脂糖与TBE溶液 (0.045mol/L Tris-硼酸, 0.001mol/L EDTA) 配置适当浓度的琼脂糖凝胶, 将PCR产物进行电泳。关注所需条带的电泳情况。
- [0218] (2) 切取目的条带, 回收PCR产物, 具体步骤参照试剂盒说明书。取部分DNA溶液测序鉴定, 经测序鉴定无误后即可作为转录模板使用。
- [0219] 标记探针
- [0220] 使用T7体外转录 (Thermo) 试剂盒。参照产品说明, 按如下体系加入反应试剂:
- [0221] NTP混合物:
- |                              |        |
|------------------------------|--------|
| 10 mM ATP                    | 1 μL   |
| 10 mM CTP                    | 1 μL   |
| [0222] 10 mM TTP             | 1 μL   |
| 10 mM UTP                    | 0.5 μL |
| Biotin-11-UTP (Biotium Inc.) | 0.5 μL |
- [0223] In vitro转录反应混合物:
- |                         |       |
|-------------------------|-------|
| DNA 模板                  | 1 μg  |
| 5×反应缓冲液                 | 4 μL  |
| NTP 混合物                 | 4 μL  |
| [0224] T7 RNA 聚合酶       | 1 μL  |
| 100 mM DTT              | 2 μL  |
| RNasin                  | 1 μL  |
| DEPC H <sub>2</sub> O 至 | 20 μL |
- [0225] 37°C, 4hr; 加入1μL DNase I, 37°C, 30min; 进行探针纯化。
- [0226] 6. 使用天根RNA纯化试剂盒进行探针纯化, 纯化后的探针放在-20°C备用, 具体步骤参照试剂盒说明书。
- [0227] 7. 胞浆核蛋白提取:
- [0228] 1) 弃掉细胞培养皿培养基, 用PBS清洗两遍;
- [0229] 2) 用适量胰酶消化几分钟 (一定不能消化过), 使细胞脱落;
- [0230] 3) 加入和胰酶等体积的PBS中和胰酶, 吹打混匀, 吸取至离心管 (EP管) 中, 4°C, 3000rpm, 2-3分钟离心收集细胞;

- [0231] 4) 离心完成后,弃掉上清用PBS清洗两遍,4℃,3000rpm,2-3分钟;
- [0232] 5) 彻底去除上清后,加入缓冲液A重悬细胞团:100μL/6cm培养皿;200μL/10cm培养皿,缓冲液A在使用前事先加入蛋白酶抑制剂cocktail (cocktail为含有各种蛋白酶抑制剂的混合物);
- [0233] 6) 混匀后冰上孵育15分钟;
- [0234] 7) 按每200μL体系加入25μL 2.5%的NP-40 (用缓冲液A稀释至2.5%);
- [0235] 8) 弹离心管 (EP管) 使NP-40彻底分散均匀后,4℃,500g,离心5分钟,以避免NP-40过分裂解核膜;
- [0236] 9) 取上清即为胞浆提取物 (含胞浆蛋白和胞浆RNA等),胞浆提取物可直接用于Western blot等常规蛋白分析,沉淀即为胞核成分;
- [0237] 10) 反复冻融和超声:取适量胞浆胞核蛋白提取步骤9) 中的胞浆提取物,先将所得上清于冰箱反复冻融多次,然后再用超声波破碎仪 (美国Sonics或宁波新芝生物科技股份有限公司) 超声多次,破坏细胞质中的细胞器,让胞浆蛋白充分释放出来,然后于4℃,12,000rpm离心10-15分钟,最终的上清即为胞浆蛋白质。
- [0238] 11) 超滤和浓缩:取5-10mL上述胞浆蛋白用美国Pall公司0.45μm无菌针头式滤器对胞浆蛋白进行过滤,滤过的上清再用美国Millipore公司3k超滤浓缩管进行超滤浓缩,4℃,12,000rpm,离心10-20分钟,得到终体积为0.5-1mL的胞浆蛋白质。
- [0239] 8. 快速蛋白液相色谱分析 (FPLC),详细步骤具体见美国GE Health Care公司的ÄKTA™ pure色谱系统说明书。
- [0240] 9. 免疫沉淀:
- [0241] 收集FPLC洗脱流分,以洗脱流分30、32、34、36为例,合并4个洗脱流分,加入2μgα-微管蛋白、β-微管蛋白、β-肌动蛋白、GAPDH、IgG-重链、IgG-轻链抗体,和10-40μL蛋白A/G磁珠,4℃缓慢摇晃孵育2h,用磁力架吸附磁珠收集上清,重复上述步骤三次,尽可能通过免疫沉淀去除相应的骨架蛋白和内参蛋白。将得到的上清蛋白等体积分为二等份备用。
- [0242] 10. Biotin Pull-down实验
- [0243] 吸取40μL Dynabeads M-280亲和素磁珠 (Invitrogen),用600μL溶液A (0.1M NaOH,0.05M NaCl) 洗两遍,用600μL溶液B (0.1M NaOH) 洗一遍;加入30μL 1×TENT缓冲液 (2×TENT缓冲液:20mM pH 8.0Tris-HCl,2mM pH 8.0EDTA,500mM NaCl,1%v/v Triton X-100),放置于冰上待用;
- [0244] 按如下体系配制反应工作液:
- |        |        |
|--------|--------|
| RNasin | 2.5 μL |
| RNA 探针 | 2 μg   |
- [0245] 胞浆蛋白 150-200 μL
- |            |         |
|------------|---------|
| 2×TENT 缓冲液 | 200 μL  |
| DEPC 水至    | 400 μL。 |
- [0246] 室温混悬30分钟后,加入40μL预洗过的磁珠,室温继续混悬30分钟;用预冷的PBS洗五遍,加入40μL 1×银染蛋白上样缓冲液,70℃保温10分钟,银染分析产物。
- [0247] 11. 银染

- [0248] 1) 将Biotin Pull-down后获得的蛋白上预制胶,用专用1.5 $\mu$ L Sharp Marker跑电泳;
- [0249] 2) 电泳时为80V;
- [0250] 3) 胶用三蒸水洗5分钟,洗两遍;
- [0251] 4) 用30%无水乙醇:10%醋酸:60%三蒸水固定胶15分钟,中间换固定液一次;
- [0252] 5) 用10%乙醇洗胶5分钟 $\times$ 2遍,然后用三蒸水洗5分钟 $\times$ 2遍;
- [0253] 6) 准备Sensitizer工作溶液(50 $\mu$ L Sensitizer于25mL水中),严格增敏1分钟;
- [0254] 7) 用水洗1分钟 $\times$ 2遍;
- [0255] 8) 准备Stain工作溶液(0.5mL Enhancer于25mL stain中),染胶30分钟;
- [0256] 9) 准备Developer工作溶液(0.5mL Enhancer在25mL Developer中),洗20s $\times$ 2遍(用三蒸水),然后增敏2-3分钟,直到条带显现;
- [0257] 10) 在5%乙酸中终止反应约10分钟;
- [0258] 11) 换成三蒸水,拍照、切胶、送质谱。
- [0259] 12. 质谱鉴定结果在RNA结合蛋白数据库中进行比对:
- [0260] 根据已有文献及数据库,将现有的RNA结合蛋白整理并录入Excel文档,每次质谱鉴定的结果用Python进行数据分析和对比,三次独立重复试验结果用在线工具<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>聚类取交集得到相应的RNA结合蛋白。
- [0261] 13. Western blot:参照常规Western blot实验方法。
- [0262] 实施例1. 从HeLa细胞分离RNA结合蛋白的预处理:
- [0263] 试验例1-2:
- [0264] 收集一定量的HeLa细胞,进行核浆分离,得到胞浆提取物。将胞浆提取物反复冻融和超声破碎,充分释放细胞中的胞浆蛋白。对胞浆蛋白进行超滤浓缩,用快速蛋白液相层析系统(FPLC)对浓缩后的蛋白进行分离。然后,选取适宜的流分,用免疫沉淀的方法去除流分中的骨架蛋白如肌动蛋白、GAPDH、微管蛋白等,从而获得预处理样品。
- [0265] 其中,对试验例1-2中各步骤的完成情况进行了验证。其中,HeLa细胞核浆分离后,通过免疫印迹实验验证了核浆分离效果(图2)。可以看出,细胞浆抽提液未出现可检出量的Lamin A/C,说明所分离的胞浆蛋白纯度很好,未出现明显的核蛋白污染,可用于后续实验。
- [0266] 对核浆分离后获得的细胞浆进行反复冻融和超声破碎、超滤浓缩以及FPLC处理后,按时间顺序收集了不同流分,对各流分进行SDS-PAGE凝胶电泳分离,然后通过银染观察分析各流分中不同分子量蛋白的分布(图3)。图3中的(A)针对的是FPLC流分中15-41组样品(奇数);(B)针对的是FPLC流分中16-42组样品(偶数);(C)针对的是FPLC流分中39-51组样品。胞浆蛋白通过FPLC系统后的滤出峰示于图4。
- [0267] 收集通过FPLC滤出得到的适宜流分,加入不同骨架蛋白的抗体。经三轮免疫沉淀后,利用Western blot检测不同流分中骨架蛋白的去除效果(图5)。可以看出,利用不同骨架蛋白的抗体有效去除了流分中的骨架蛋白,由此可以避免后续实验的非特异结合。在图5中,(A)针对的是FPLC流分中第31+33+35+37组的混合样品;(B)针对的是FPLC流分中第30+32+34+36+38组的混合样品。
- [0268] 对比例1-4:
- [0269] 作为试验例1和2的对比,在对比例1中,制备HeLa全细胞提取物作为预处理样品。



即,该预处理样品未经核浆分离、反复冻融、超声破碎、超滤浓缩和FPLC以及免疫沉淀。

[0270] 在对比例2中,制备HeLa胞浆提取物作为预处理样品。即,该预处理样品仅经过了核浆分离步骤,但未经反复冻融、超声破碎、超滤浓缩和FPLC以及免疫沉淀等步骤。

[0271] 在对比例3中,制备经过超滤浓缩、FPLC滤出、免疫沉淀处理的HeLa胞浆提取物作为预处理样品。即,该预处理样品未经反复冻融和超声破碎,而仅经过超滤浓缩和FPLC滤出,而后,通过对第30+32+34+36+38组FPLC流分进行三轮免疫沉淀去除骨架蛋白获得了该预处理样品。

[0272] 在对比例4中,制备经过反复冻融、超滤浓缩、FPLC滤出、免疫沉淀处理的HeLa胞浆提取物作为预处理样品。即,该预处理样品未经超声破碎,而仅经过反复冻融、超滤浓缩和FPLC滤出,而后,通过对第30+32+34+36+38组FPLC流分进行三轮免疫沉淀去除骨架蛋白获得了该预处理样品。

[0273] 实施例2.RNA结合蛋白的分离和捕获:

[0274] 进一步地,针对不同处理方式获得的样品进行p21的编码区(CR)和3' UTR的结合蛋白的Biotin Pull-down实验和银染。

[0275] 用生物素(biotin)标记靶RNA,并将生物素标记的靶RNA固定在链霉亲和素偶联的磁珠上。所制备的p21 mRNA相关探针如图6所示。其中,图6中的(A)示出了p21 mRNA的结构示意图;(B)示出了p21的编码区(CR) PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图;(C)示出了p21的3' UTR PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图。

[0276] 将所制备的固定有p21 mRNA的磁珠(Dynabead)分别与上述试验例1-2和对比例1-4的方法获得的预处理样品共同孵育。孵育一定时间后,进行多次洗涤,以去除未与目的RNA结合的蛋白质,收集特异结合在磁珠上的蛋白,进行银染跑胶。其中,以p21的CR和仅磁珠富集的蛋白为参照物,去除非特异结合,切取3' UTR特有条带进行后期质谱测序。

[0277] 结果:

[0278] 根据对比例1-2获得的预处理样品进行银染的结果参见图7的(A)和(B);根据试验例1-2获得的预处理样品进行银染的结果参见图7的(C)和(D);根据对比例3-4获得的预处理样品进行银染的结果参见图8的(A)和(B)。

[0279] 根据对比例1-2和试验例1-2的银染结果对比可以看出,采用未经核浆分离的全细胞提取物、或仅经分离但未经反复冻融、超声破碎、超滤浓缩和FPLC以及免疫沉淀等步骤的胞浆提取物进行靶RNA结合蛋白捕获时,体系中产生了非常大量的非特异性蛋白,导致捕获和筛选效率非常低。而在经过本公开预处理步骤对HeLa细胞进行了处理后,有效地去除了核蛋白对RNA的非特异结合,从而有效降低了非特异性结合导致的背景噪音、提高了筛选效率。

[0280] 根据对比例3-4和试验例1-2的银染结果对比可以看出,在HeLa胞浆裂解液未经反复冻融和超声破碎,或只经过冻融但未经超声破碎的情况下,细胞器内的蛋白质暴露不充分,p21的CR、3' UTR孵育后富集的蛋白并不理想。由此可见,通过对胞浆提取物进行反复冻融和超声破碎,可以有效破坏细胞质中的细胞器,充分释放胞浆蛋白,从而提高了筛选效率。

[0281] 实施例3.RNA结合蛋白的质谱鉴定:

[0282] 对实施例2中,在试验例1获得的银染结果中,切取p21的3' UTR探针捕获到的特异

性蛋白银染条带,然后进行质谱鉴定。通过将质谱鉴定结果与RNA结合蛋白数据库进行比对,确认了根据本公开方法捕获的p21 3' UTR的特异性RNA结合蛋白。

[0283] 其中,图9示出了捕获的特异蛋白质,结果来自三次独立重复实验,其中标红的已有文献报到是p21 3' UTR特异结合蛋白质。其中,图9中的(A)、(B)、(C)分别为三次独立实验(组1至组3)获得的质谱结果;(D)为三次实验取交集后得到的蛋白质(其中标粗体和下划线的是先前文献中报到过的p21 3' UTR的特异性结合蛋白)。

[0284] 然后,进一步通过免疫印迹实验或表面等离子共振等技术对所鉴定出的RNA结合蛋白与靶RNA的相互作用进行验证。其中,利用RNA结合实验和免疫印迹实验对图9的(D)中所得到的代表性RNA结合蛋白ELAVL1(也称为HuR)、HNRNPD进行了验证(图10)。

[0285] 根据上述试验结果可以看出,通过采用本公开提供的预处理方法对细胞进行预处理,然后对RNA结合蛋白进行分离,能够显著降低非特异性蛋白的存在,降低背景噪声,显著提高特异性RNA结合蛋白的筛选效率。

[0286] 实施例4.针对其他靶RNA富集RNA结合蛋白:

[0287] 除p21以外,本发明人以p16的编码区(CR)为对照,采用了3' UTR作为探针来筛选和富集对应的特异性RNA结合蛋白(图11)。其中,图11中的(A)示出了在纯化的HeLa胞浆提取物经FPLC滤出并收集第30+32+34+36+38组流分、经三轮免疫沉淀去除骨架蛋白后所收集的上清液中捕获的p16的编码区(CR)和3' UTR的结合蛋白的银染图;(B)示出了通过对银染条带切胶回收的蛋白进行质谱分析后鉴定出的p16 3' UTR的相关RNA结合蛋白。

[0288] 根据上述结果可以看出,采用本文公开的预处理和分离方法,同样可以鉴定出之前报道过的与p16 3' UTR结合的RNA结合蛋白:AUF1、HuR、NSun2等,参见Wang W.于2012年发表的Regulatory RNA-binding proteins in senescence. Ageing Res Rev. 2012, 11(4): 485-49。

[0289] 进一步地,本发明人还采用了小鼠载脂蛋白APOE mRNA的编码区(CR)和3' UTR、5' UTR作为探针来筛选和富集对应的未知的特异性RNA结合蛋白(图12)。其中,图12的(A)示出了在纯化的Hepa1-6胞浆提取物经FPLC滤出并收集第30+32+34+36+38组流分、经三轮免疫沉淀去除骨架蛋白后所收集的上清液中捕获的APOE mRNA的CR、3' UTR、5' UTR的结合蛋白的银染图;(B)示出了通过对银染条带切胶回收的蛋白进行质谱分析后鉴定出的APOE 3' UTR的相关RNA结合蛋白,其中以鉴定出一些新的RNA结合蛋白:如GRSF1、HnRNPF等;(C)示出了利用RNA结合实验和免疫印迹实验对代表性RNA结合蛋白进行验证的图。

[0290] 根据上述试验结果可以看出,本公开所提供的预处理方法能够针对多种靶RNA的RNA结合蛋白富集过程显著提高蛋白筛选效率并且显著降低非特异性蛋白的存在。此外,上述结果还证实了:本文所提供的预处理方法和分离方法,既可用于筛选与特定RNA结合的RNA结合蛋白,也可用于筛选鉴定新的RNA结合蛋白。

[0291] 实施例5.试验条件的进一步改进:

[0292] 本发明人还进一步测试了“(一)仪器、材料及实际配制部分”的“7.胞浆胞核蛋白提取”中“10)反复冻融和超声”步骤的条件。其中,下表1给出了各测试例的具体参数:

[0293] 表1.各测试例的具体参数

	冻融温度	冻融次数	总超声时间	单次超声时间 vs 超声间隔	离心条件	分离结果评分
测试例 1	-196°C (液氮)	3 次	4 分钟	3 秒 vs 3 秒	4°C, 12,000 rpm, 15 分钟	4
测试例 2	-80°C	3 次	4 分钟	3 秒 vs 3 秒	4°C, 12,000 rpm, 15 分钟	5
测试例 3	-40°C	3 次	4 分钟	3 秒 vs 3 秒	4°C, 12,000 rpm, 15 分钟	4
测试例 4	-20°C	3 次	4 分钟	3 秒 vs 3 秒	4°C, 12,000 rpm, 15 分钟	3
测试例 5	-80°C	2 次	4 分钟	3 秒 vs 3 秒	4°C, 12,000 rpm, 15 分钟	3
测试例 6	-80°C	4 次	4 分钟	3 秒 vs 3 秒	4°C, 12,000 rpm, 15 分钟	5
测试例 7	-80°C	5 次	4 分钟	3 秒 vs 3 秒	4°C, 12,000 rpm, 15 分钟	5
测试例 8	-80°C	6 次	4 分钟	3 秒 vs 3 秒	4°C, 12,000 rpm, 15 分钟	2
[0294] 测试例 9	-80°C	3 次	2 分钟	3 秒 vs 3 秒	4°C, 12,000 rpm, 15 分钟	3
测试例 10	-80°C	3 次	6 分钟	3 秒 vs 3 秒	4°C, 12,000 rpm, 15 分钟	5
测试例 11	-80°C	3 次	8 分钟	3 秒 vs 3 秒	4°C, 12,000 rpm, 15 分钟	4
测试例 12	-80°C	3 次	10 分钟	3 秒 vs 3 秒	4°C, 12,000 rpm, 15 分钟	2
测试例 13	-80°C	3 次	4 分钟	5 秒 vs 5 秒	4°C, 12,000 rpm, 15 分钟	5
测试例 14	-80°C	3 次	4 分钟	8 秒 vs 8 秒	4°C, 12,000 rpm, 15 分钟	5
测试例 15	-80°C	3 次	4 分钟	10 秒 vs 10 秒	4°C, 12,000 rpm, 15 分钟	4
测试例 16	-80°C	3 次	4 分钟	15 秒 vs 15 秒	4°C, 12,000 rpm, 15 分钟	5
测试例 17	-80°C	3 次	4 分钟	3 秒 vs 3 秒	4°C, 12,000 rpm, 1 分钟	3
测试例 18	-80°C	3 次	4 分钟	3 秒 vs 3 秒	4°C, 12,000 rpm, 5 分钟	4
测试例 19	-80°C	3 次	4 分钟	3 秒 vs 3 秒	4°C, 10,000 rpm, 10 分钟	5
测试例 20	-80°C	3 次	4 分钟	3 秒 vs 3 秒	4°C, 10,000 rpm, 20 分钟	5

[0295] 由表1中所示的各条件下的分离结果评分可以看出,当将胞浆提取物在-80°C下反复冻融3-4次,然后再用超声波破碎仪超声4-6分钟(以3-8秒的间隔和超声持续时间),然后于4°C,12,000rpm离心10-15分钟时,最终的银染结果图表现出最优的分离效果,其中背景噪音降低水平和所捕获的蛋白种类之间具有较好平衡。

[0296] 本公开的上述内容可以涵盖具有独立效用的多个不同示例。尽管已经以其一个或多个优选形式公开了这些示例中的每一个,然而本文公开和说明的特定实施方案不应被认为是限制性的,因为可以实行多种变化。在某种程度上说,本公开所使用的章节标题仅用于组织目的。本公开的主题包括在本文中公开的多种要素、特征、功能和/或特性的所有新的和非显而易见的组合及子组合。以下权利要求书特别指出了被认为是新的且非显而易见的某些组合和子组合。在要求本申请或相关申请的优先权的申请中,可以要求保护特征、功能、要素、和/或特性的其他组合和子组合。无论在范围上比原始权利要求书更广、更窄、相等还是不同,此类权利要求均被认为包括在本公开的主题内。

## 序列表

<110> 北京大学

<120> RNA结合蛋白的预处理方法和分离方法

<130> 21SGIF5316

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> T7启动子

<400> 1

ccaagcttct aatacgactc actatagga ga 32

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> p21 CR 正向引物

<400> 2

atgtcagaac cggctggg 18

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> p21 CR 反向引物

<400> 3

ttagggcttc ctcttgaga aga 23

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> p21 3'UTR 正向引物

<400> 4

tccgccaca ggaag 15

---

<210> 5  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> p21 3' UTR 反向引物  
<400> 5  
aagtaaagtc actaagaatc atttattg 28

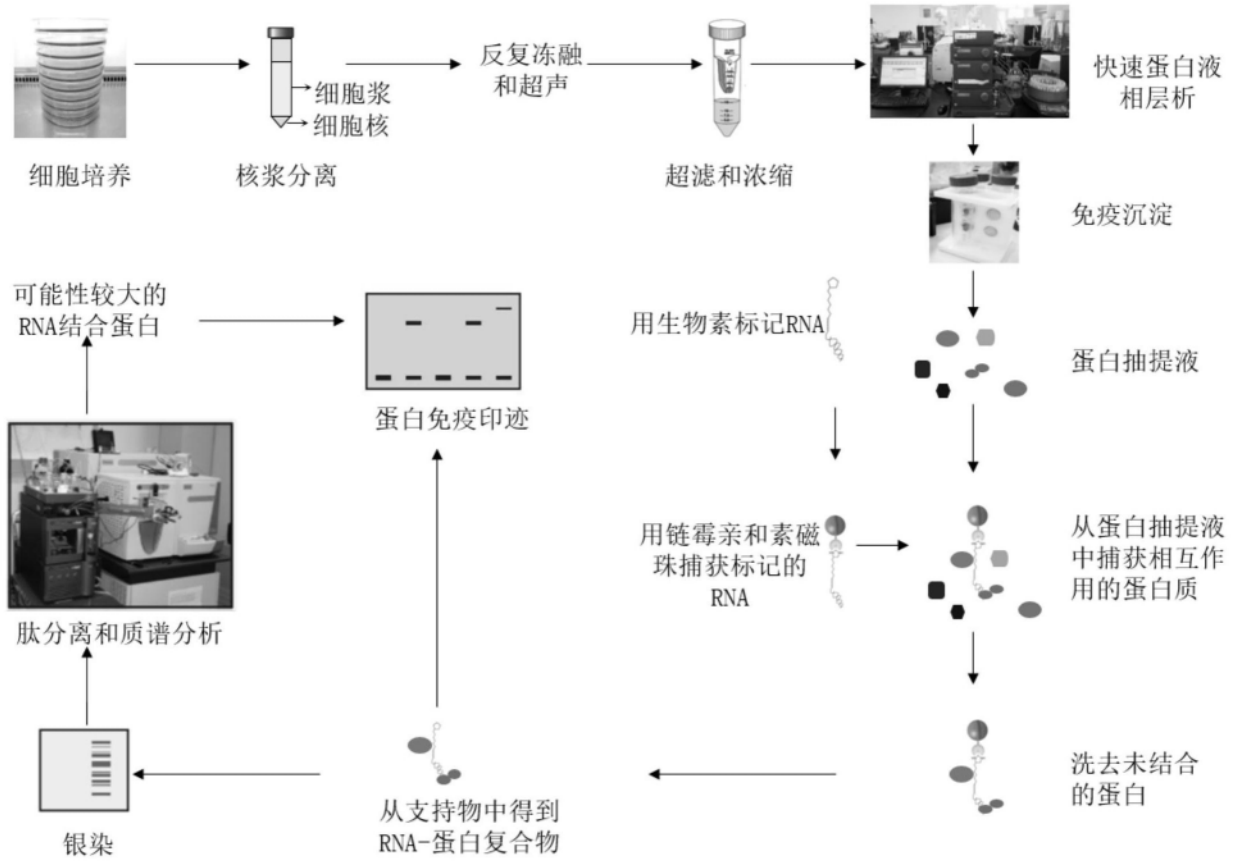


图1

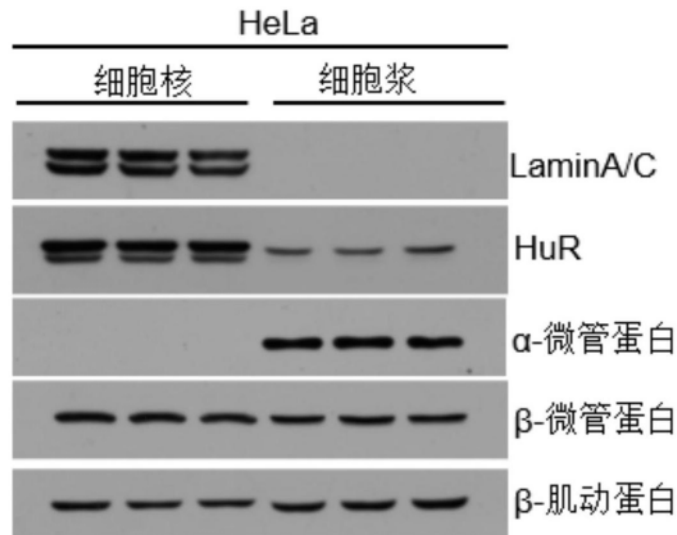


图2

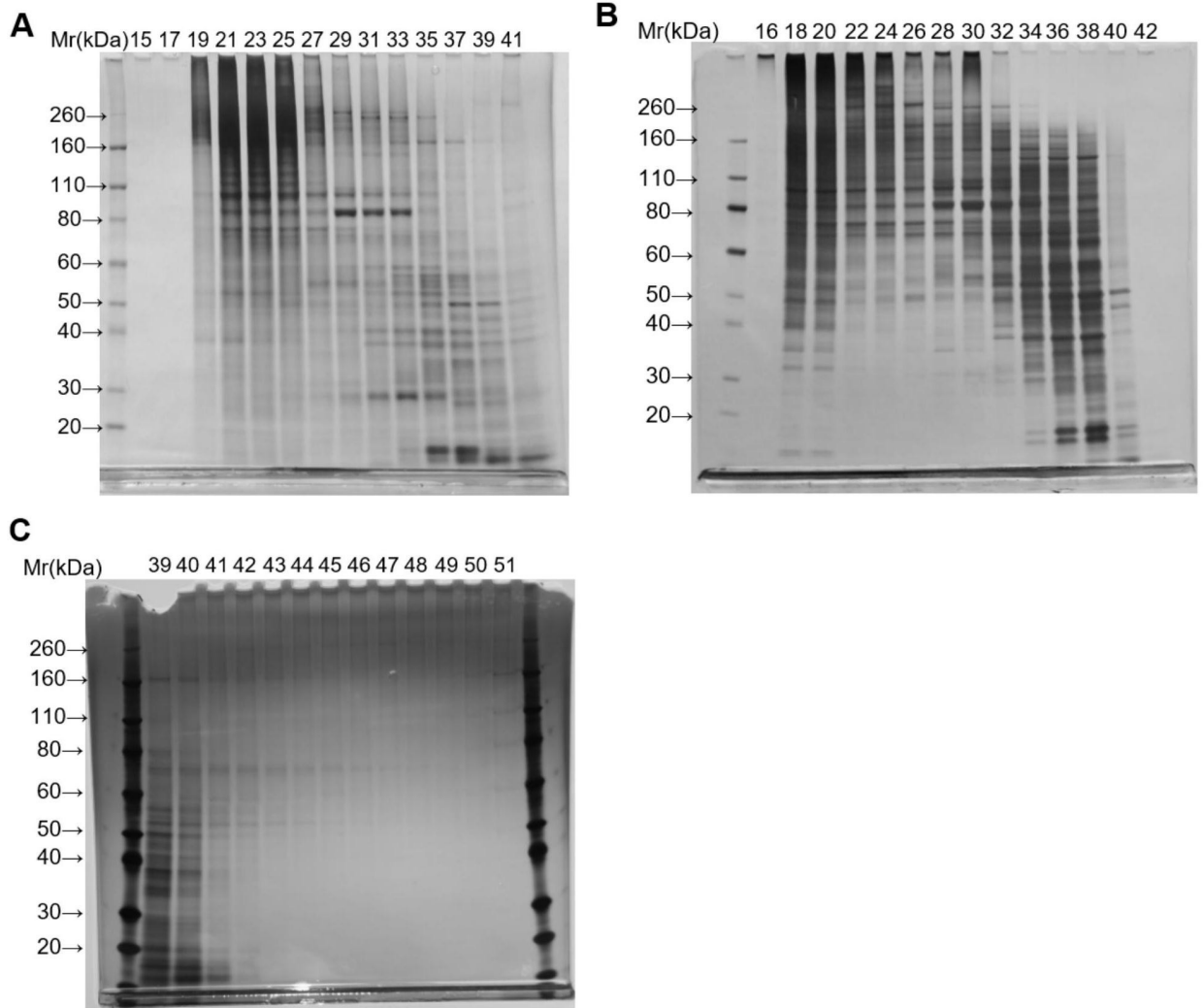


图3

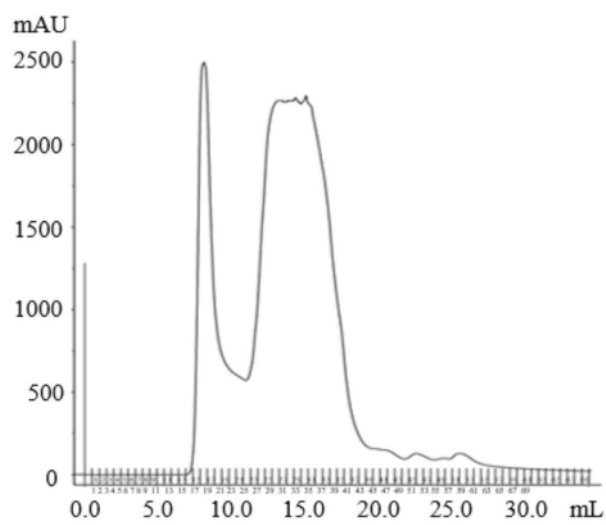


图4

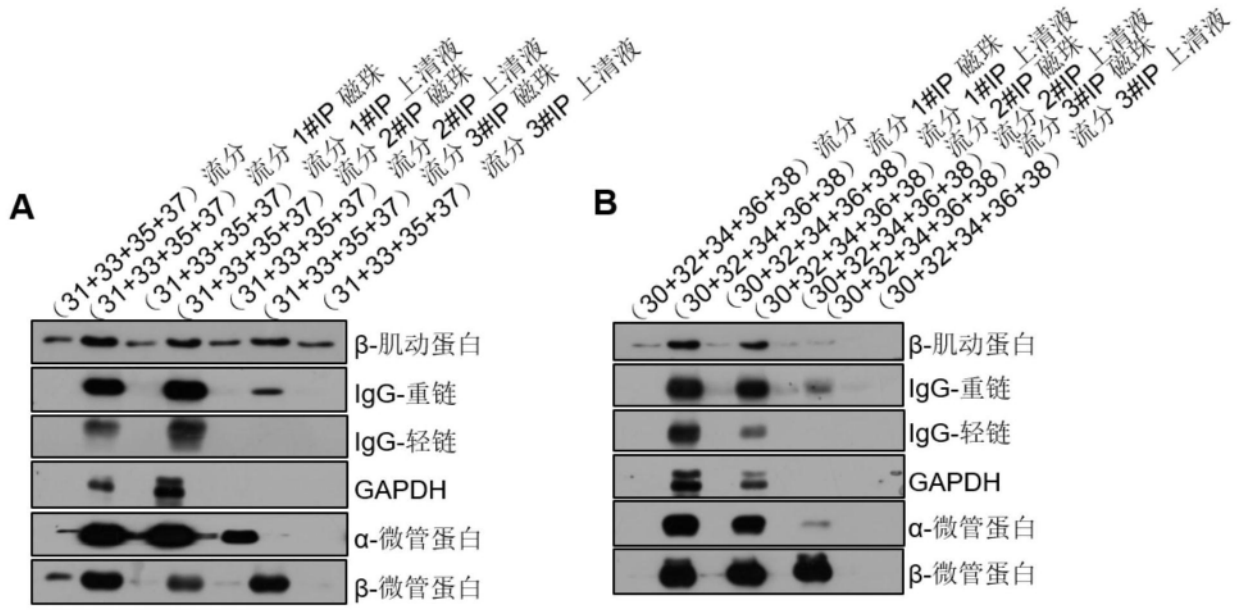


图5

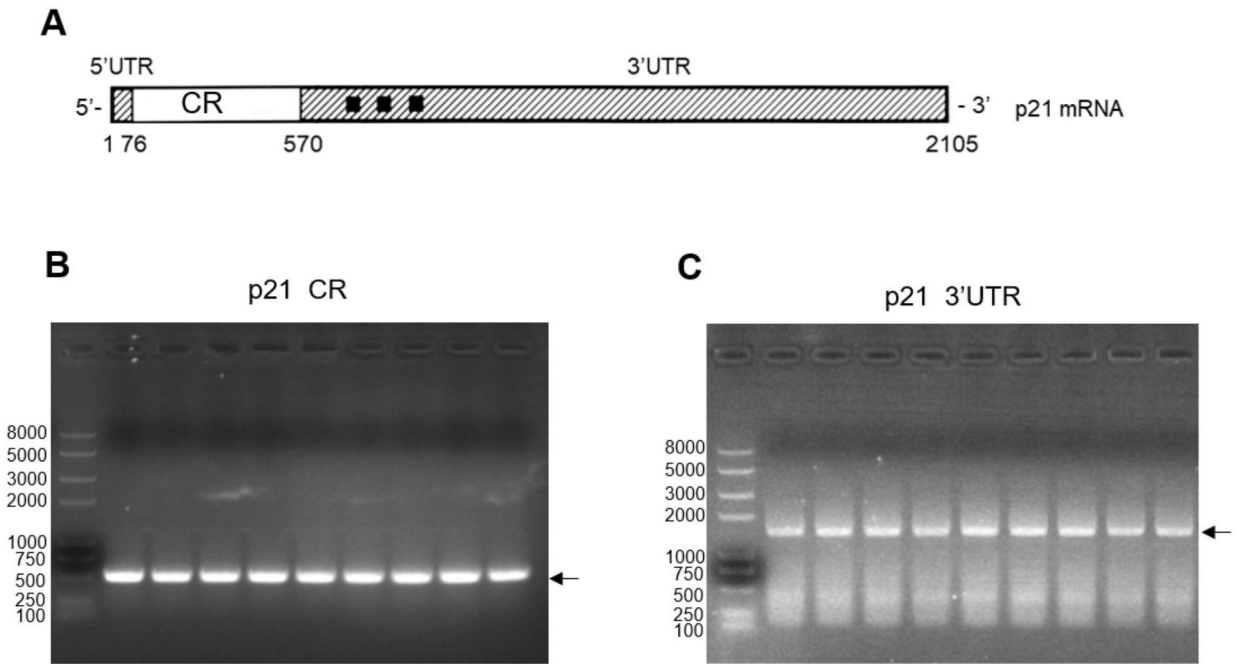


图6



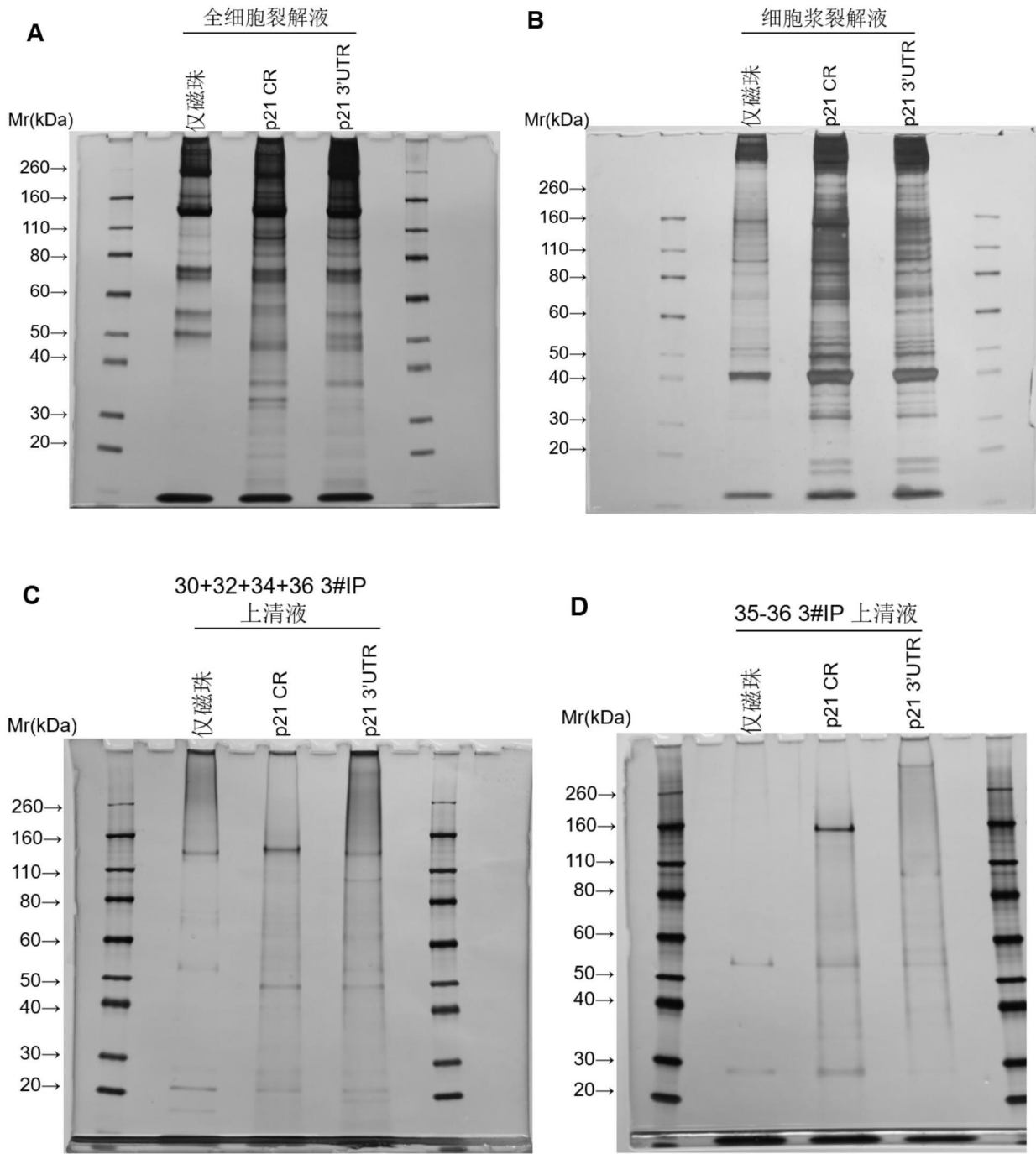


图7

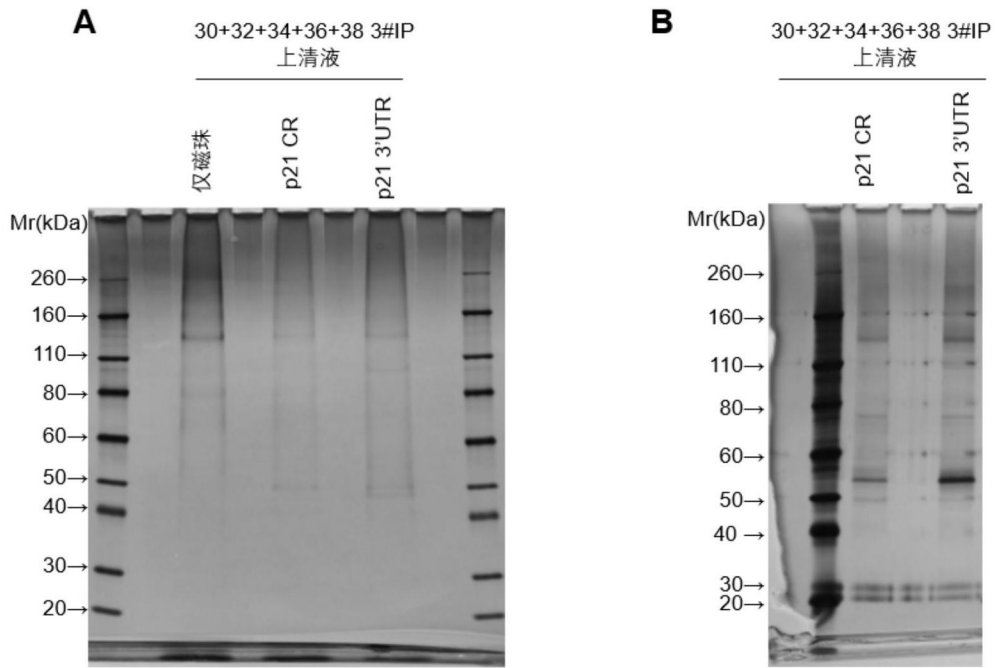


图8

A							B				C		
组 1							组 2				组 3		
ACAA2	EEF1A1	HNRNPAB	KRT18	PRDX1	RPL8	SUCLG1	ACTB	PABPC4	RPL5	SSB	ALDOA	MYH9	RPL8
ACTB	EIF2S1	HNRNPC	LGALS3	PRKRA	RPLP0	SYNCRIP	ALDOA	<b>PCBP1</b>	RPL6	SSR1	CSDA	NACA	RPLP0
ALB	EIF2S2	<b>HNRNPD</b>	MAPRE1	PUS1	RPS2	TBRG4	ANXA2	PRDX1	RPL7	TRAP1	DCD	NCL	RPS14
ALDOA	EIF4A1	HNRNPDL	MDH2	RAN	RPS25	TP1	DCD	PRKRA	RPL7A	TXN	DDX17	PABPC1	RPS23
ALYREF	EIF5	HNRNPH1	MRPL15	RBMS1	RPS3	TRAP1	DDX3X	RALYL	RPL8	YBX1	DDX3X	PABPC4	RPS25
ANXA2	<b>ELAVL1</b>	HNRNPK	MRPL44	RPL11	RPS3A	TSFM	<b>ELAVL1</b>	RAN	RPLP0	YWHAZ	<b>ELAVL1</b>	<b>PCBP1</b>	RPS4X
ASS1	FDP5	HNRNPL	MRPS27	RPL13	RPS4X	TUBB	ENO1	RBMS1	RPS14		EIF4A2	PRDX1	RPS9
ATP5A1	FKBP4	HNRNPR	MSI2	RPL14	RPS6	TWF2	HNRNPAB	RBMS2	RPS2		ENO1	PRMT1	SERPINH1
CALR	FSCN1	HSP90AA1	NAP1L1	RPL15	RPS9	TXN	HNRNPC	RBMS3	RPS23		GANAB	RAN	SRSF3
CLNS1A	FUBP1	HSP90AB1	NAP1L4	RPL18	RPSA	UBA1	<b>HNRNPD</b>	RPL11	RPS25		HNRNPA2B1	RBMS1	SSB
CPNE3	FUBP3	HSPA1A	NCL	RPL19	SARS2	YARS	HRNR	RPL13	RPS3		HNRNPAB	RPL11	TUFM
DCD	FUS	HSPA5	NQO1	RPL22	SF3B4	YBX1	HSPA8	RPL14	RPS3A		<b>HNRNPD</b>	RPL18	YBX1
DDX19A	GOT2	HSPA8	NSUN2	RPL27A	SND1	YWHAE	HSPB1	RPL15	RPS4X		HNRNPH1	RPL22	
DDX39B	GRSF1	HSPA9	PA2G4	RPL29	SNRPA	YWHAZ	IGF2BP1	RPL19	RPS6		HNRNPK	RPL23	
DDX3X	HADHB	HSPB1	PABPC1	RPL3	SNRPA1		ILF2	RPL22	RPS8		HNRNPU	RPL23A	
DDX47	HIST1H4A	HSPD1	PABPC4	RPL4	SRSF1		KTN1	RPL24	RPS9		HRNR	RPL24	
DDX5	HNRNPA0	IGF2BP1	<b>PCBP1</b>	RPL5	SRSF2		MSI2	RPL27A	SLC25A11		HSPA8	RPL27A	
DDX6	HNRNPA1	IGF2BP3	PDIA3	RPL6	SRSF5		NACA	RPL29	SNRPN		HSPD1	RPL29	
DSP	HNRNPA2B1	ILF2	PDIA6	RPL7	SSB		NCL	RPL3	SRSF1		IGFBP2	RPL5	
DYNC1H1	HNRNPA3	KCTD12	PFN1	RPL7A	SSR1		PABPC1	RPL5	SRSF5		KHSRP	RPL7	

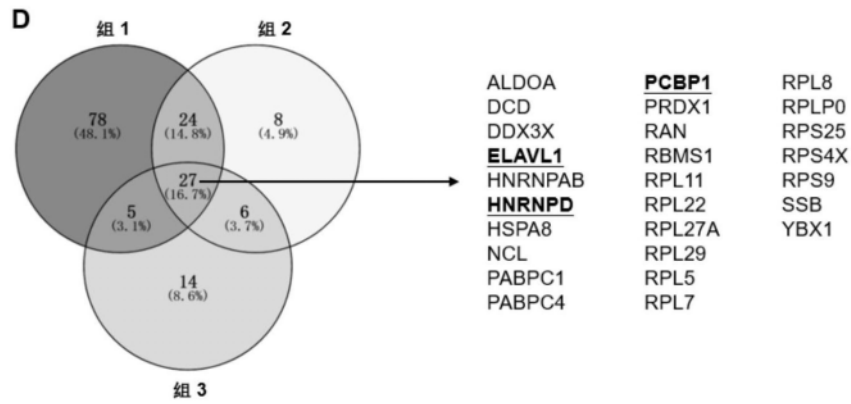


图9

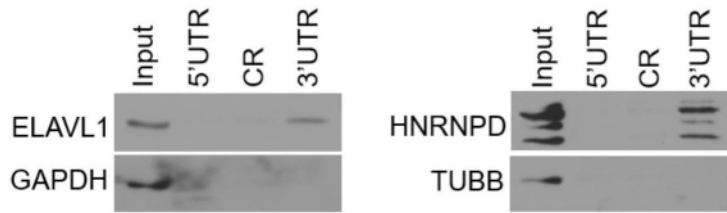
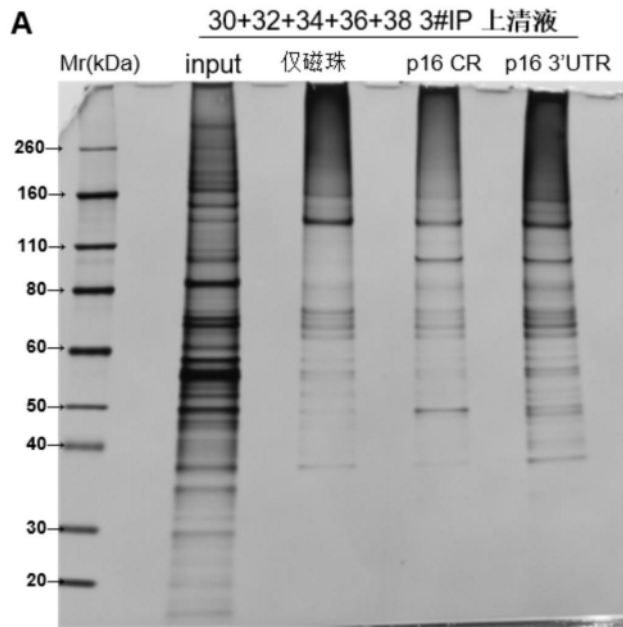


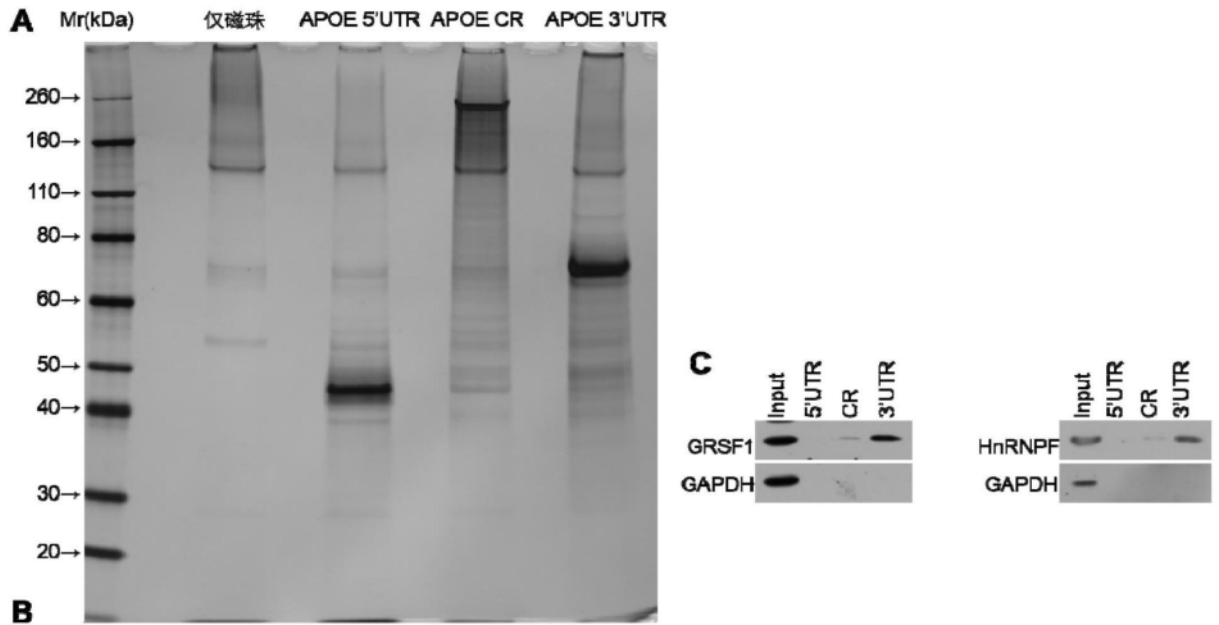
图10



**B**

蛋白名称的详细描述	鉴定到的肽段在蛋白上的覆盖度	蛋白数	此蛋白包含的特异性肽段数目	鉴定到不同肽段的总数目	肽段匹配到二级谱图的数目	质谱中峰的面积	该蛋白包含的氨基酸数目	理论分子量	理论等电点
HNRNPD(AUF1)	28.05	8	2	5	7	24377153.38	221	23.06221692	5.109863281
ELAVL1(HuR)	3.37	1	1	1	1	5187666.219	326	36.06915168	9.173339844
NSUN2	1.3	1	1	1	1	989917.8125	767	86.41580653	6.770996094

图11



蛋白名称的详细描述	鉴定到的肽段在蛋白上的覆盖度	蛋白数	此蛋白包含的特异性肽段数目	鉴定到不同肽段的总数目	肽段匹配到二级谱图的数目	质谱中峰的面积	该蛋白包含的氨基酸数目	理论分子量	理论等电点
Mus musculus GN=Grsf1	39.23	4	11	11	29	158873648.1	362	41.58368851	5.325683594
Mus musculus GN=Hnmpf	44.1	4	10	12	73	584526144	415	45.70091894	5.490722656

图12