

细胞 RNA Pulldown 实验——利用体外合成带生物素标记的 RNA 检测细胞裂解液中与目标 RNA 互作的蛋白的方法

RNA Pulldown Assay

桑凌杰, 瞿蕾, 陈怡君, 林爱福*

生命科学学院遗传与再生研究所, 浙江大学, 杭州市, 浙江省

*通讯作者邮箱: linaifu@zju.edu.cn

引用格式: 桑凌杰, 瞿蕾, 陈怡君, 林爱福. (2021). 细胞 RNA Pulldown 实验——利用体外合成带生物素标记的 RNA 检测细胞裂解液中与目标 RNA 互作的蛋白的方法. *Bio-101* e1010807. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010807.

How to cite: Sang, L. J., Qu, L., Chen, Y. J. and Lin, A. F. (2021). RNA Pulldown Assay. *Bio-101* e1010807. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010807. (in Chinese)

摘要: RNA 能结合特定的蛋白质, 从而引起蛋白质电荷改变、空间结构变化等进而影响蛋白质的功能。对 RNA 的特异性结合蛋白的鉴定是了解 RNA 功能的重要途径。RNA pull down 实验是一种鉴定 RNA 结合蛋白的实验方法。使用体外转录法标记生物素 RNA, 然后与胞浆蛋白提取液孵育, 形成 RNA-蛋白质复合物。该复合物可与链霉亲和素偶联的磁珠结合, 从而与孵育液中的其他成分分离; 复合物洗脱后, 通过 Western Blot 实验检测特定的 RNA 结合蛋白是否与 RNA 互相作用。使用该方案还可以联合蛋白质组技术, 实现 RNA 结合蛋白的系统筛选与鉴定。

关键词: RNA pull down, RNA 蛋白结合, 生物素标记 RNA, RNA-蛋白互作

材料与试剂

1. 1.5 ml EP 管 (上海生工生物, catalog number: F601620-9001)
2. cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche, catalog number: 04693124001)
3. 5x SDS loading buffer (Beyotime, P0015L)
4. Biotin RNA labeling mix: (Roche, catalog number: 11685597910)

5. MEGAscript™ SP6/T7 Transcription Kit (Invitrogen™, catalog number: AM1330/AM1333)
6. Dynabeads™ M-280 Streptavidin (Invitrogen™, catalog number: 11206D)
7. Tris-HCl (上海生工生物, catalog number: B041188)
8. KCl (国药, CAS 7447-40-7)
9. MgCl₂ (麦克林, CAS 7786-30-3)
10. DTT (北京索莱宝科技有限公司, CAS 3483-12-3)
11. NP-40 (Beyotime, catalog number: P0013F)
12. Na₂HPO₄·12H₂O (国药集团化学试剂有限公司 CAS 10039-32-4)
13. KH₂PO₄ (国药集团化学试剂有限公司 CAS: 7778-77-0)
14. DNase I (Invitrogen, catalog number: AM2238)
15. EDTA (Sigma, catalog number: E9884)
16. RNA Clean and Concentrator-5 kit (Zymo Research, catalog number: R1013)
17. BCA 定量蛋白试剂盒 (Beyotime, catalog number: P0009)
18. RIP buffer (见溶液配方)
19. NT2 buffer (见溶液配方)
20. NT2 high salt buffer (见溶液配方)
21. 10x PBS buffer (见溶液配方)

仪器设备

1. 小型低温离心机
2. 移液器
3. 移液枪
4. 磁力架
5. 旋转仪
6. 伯乐电泳仪
7. 伯乐转膜仪
8. 恒温金属浴震荡仪

实验步骤

1. 体外转录:

1.1 体外转录 RNA 的 Biotin 标记

加样体系

1 μg of linearized plasmid	x μl
Biotin RNA labeling mix	2 μl
10x transcription buffer	2 μl
RNase-free water	x μl to total 20 μl
RNA polymerase (T7 or Sp6, 产生正义或者反义的 RNA)	2 μl

注: 此处的正义或者反义的带标记的 RNA, 分别在 2 个 EP 管内制备, 反义 RNA 将作为实验的负对照组。

1.2 将上述样品混合物短暂混合并离心, 在 37 °C 孵育 2 h。加入 2 μl DNase I (Ambion), 在 37 °C 下孵育 15 min。加入 2 μl 0.2 M EDTA 混合。混合后亦可在 -80 °C 下保存, 后续待用。

1.3 使用 RNA Clean and Concentrator-5 kit (Zymo Research) 纯化体外转录的 RNA, 详细步骤参见试剂盒说明书; 或用苯酚/氯仿抽提 RNA, 然后用乙醇沉淀。不同长度及序列特征的 RNA 转录效果不同, 一般建议 20 μl 水洗脱进行尝试。

2. 制备细胞裂解液:

2.1 取 1 盘 10 cm 培养皿细胞, 细胞汇合度约为 90%, 加入 3 ml 预冷的 PBS 清洗细胞, 然后用移液枪吸去 PBS。

2.2 加入 1 ml RIP buffer (含 1x cOmplete 及 2 μl RNase Inhibitor), 冰上裂解 15-30 min。用移液枪轻吹打, 使细胞从培养皿中轻轻脱落, 将细胞裂解液从细胞培养皿里转移到 1.5 ml EP 管中。

2.3 4 °C 离心机 15,000 $\times g$ 离心 10 min, 将上清液用移液枪转移到新的 1.5 ml 的离心管中, 用 BCA 法进行蛋白定量。取 10 μl 上述上清液留作 western blot 的 "Input"。其余细胞裂解液置冰上备用。

3. 准备 beads:

3.1 取 20 μl Streptavidin beads 于 1.5 ml 离心管中, 将盛有 beads 的离心管放到

- 磁力架上，静置 1min，吸出 beads store buffer。
- 3.2 加入 1 ml PBS，上下颠倒混匀 6-8 次，短暂离心后，将离心管放置在磁力架上，静置 1 min，去掉上层液。
 - 3.3 重复步骤 2。
 4. 预清洗蛋白裂解液：
 - 4.1 将第二步中准备好的细胞裂解液加入到盛有 20 μ l beads 的离心管中，室温 10 rpm 旋转仪上旋转孵育 1 h。
 - 4.2 短暂离心后将 1.5 ml EP 管置于磁力架上，收集上清液用于后续的 RNA pull down。向 beads 中加入 500 μ l NT2 buffer，待与步骤 7 中 beads 一起清洗作为"beads"阴性对照。
 5. RNA-蛋白孵育：
 - 5.1 取预清洗好的包含有 1mg 蛋白的细胞裂解液各 1 mg 于两个新 1.5 ml EP 管中，加 2 μ l RNase Inhibitor，再分别加 2 μ g Biotin 标记的正义及反义对照 RNA (sense 与 antisense)。
 - 5.2 4 °C 10 rpm 条件下于旋转仪上旋转孵育 1 h。
 6. RNA Pulldown：

同 3 中准备两份 20 μ l beads，加入到 5 中两个 1.5 ml EP 管中。4 °C 10 rpm 旋转孵育 1 h。
 7. 洗涤 beads：
 - 7.1 在 1.5 ml 的 EP 管中加入 500 μ l NT2 buffer，4 °C 10 rpm 旋转仪旋转洗涤 5 min，短暂离心，将 1.5 ml EP 管放置在磁力架上，静置 1 min，去上清。
 - 7.2 重复步骤 1，共洗涤 3 次。
 - 7.3 在 1.5 ml EP 管中加入 500 μ l NT2 high salt buffer，4 °C 10 rpm 于旋转仪旋转洗涤 5 min，短暂离心，将 1.5 ml EP 管放置在磁力架上，静置 1 min，去上清。
 8. Pulldown 蛋白检测：
 - 8.1 每份 beads 加 40 μ l PBS 与 10 μ l 5x SDS loading buffer (步骤 2 中 Input 样品若需用于后续 WB 分析，也可进行此步操作) 100 °C 煮样 5-10 min，用于后续 Western Blot 检测目标蛋白。
 - 8.2 如用于质谱蛋白组检测，增加细胞至 10 盘 (10 cm 细胞培养皿)，Biotin-RNA

正义/反义 各 10 μg , streptavidin-beads 各 100 μl 。

溶液配方

1. RIP buffer
 - 25 mM Tris-HCl pH 7.5
 - 150 mM KCl
 - 0.5 mM DTT
 - 0.05% NP-40
2. NT2 buffer
 - 50 mM Tris-HCl pH 7.4
 - 150 mM NaCl
 - 1 mM MgCl_2
 - 0.05% NP-40
3. NT2 high salt buffer
 - NT2 buffer added to 500 mM NaCl
4. 10x PBS buffer
 - NaCl 40 g
 - KCl 1 g
 - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 17.9 g
 - KH_2PO_4 1.35 g
 - 水定容至 500 ml

注：本实验中所有试剂均为用 DEPC 处理水配制，所有的实验用品都保证无 DNase RNase，实验操作前最好用 RNase 喷雾清除剂擦拭清洁手套、实验台、移液器、冰盒等需用到的材料和器械。在操作过程中要注意穿戴好干净的口罩、手套、实验服等，避免杂质掉落到裂解液中，导致质谱检测分析中出现大量的角蛋白污染等。

致谢

我们感谢中国自然科学基金 (81672791, 81872300) 和浙江省杰出青年自然科学基金 (LR18C060002) 对我们实验工作的支持，同时也感谢实验室各位成员之间在科研工作中的密切协作和配合，使得我们的实验能够顺利，稳定进行。已发表的引用该方法的论文如下：(Xing *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2016, 2017; Sang *et al.*, 2018, 2021).

参考文献

1. Lin, A., Hu, Q., Li, C., Xing, Z., Ma, G., Wang, C., Li, J., Ye, Y., Yao, J., Liang, K., Wang, S., Park, P. K., Marks, J. R., Zhou, Y., Zhou, J., Hung, M. C., Liang, H., Hu, Z., Shen, H., Hawke, D. H., Han, L., Zhou, Y., Lin, C. and Yang, L. (2017). [The *LINK-A* lncRNA interacts with PtdIns\(3,4,5\)P3 to hyperactivate AKT and confer resistance to AKT inhibitors](#). *Nat Cell Biol* 19: 238-251.
2. Lin, A., Li, C., Xing, Z., Hu, Q., Liang, K., Han, L., Wang, C., Hawke, D. H., Wang, S., Zhang, Y., Wei, Y., Ma, G., Park, P. K., Zhou, J., Zhou, Y., Hu, Z., Zhou, Y., Marks, J. R., Liang, H., Hung, M. C., Lin, C. and Yang, L. (2016). [The *LINK-A* lncRNA activates normoxic HIF1 \$\alpha\$ signalling in triple-negative breast cancer](#). *Nat Cell Biol* 18: 213-224.
3. Sang, L., Ju, H. Q., Yang, Z., Ge, Q., Zhang, Z., Liu, F., Yang, L., Gong, H., Shi, C., Qu, L., Chen, H., Wu, M., Chen, H., Li, R., Zhuang, Q., Piao, H., Yan, Q., Yu, W., Wang, L., Shao, J., Liu, J., Wang, W., Zhou, T. and Lin, A. (2021). [Mitochondrial long non-coding RNA GAS5 tunes TCA metabolism in response to nutrient stress](#). *Nat Metab* 3: 90-106.
4. Sang, L. J., Ju, H. Q., Liu, G. P., Tian, T., Ma, G. L., Lu, Y. X., Liu, Z. X., Pan, R. L., Li, R. H., Piao, H. L., Marks, J. R., Yang, L., Yan, Q., Wang, W., Shao, J., Zhou, Y., Zhou, T. and Lin, A. (2018). [LncRNA *CamK-A* regulates Ca²⁺-signaling-mediated tumor microenvironment remodeling](#). *Mol Cell* 72: 71-83 e77.
5. Xing, Z., Lin, A., Li, C., Liang, K., Wang, S., Liu, Y., Park, P. K., Qin, L., Wei, Y., Hawke, D. H., Hung, M. C., Lin, C. and Yang, L. (2014). [lncRNA directs cooperative epigenetic regulation downstream of chemokine signals](#). *Cell* 159: 1110-1125.