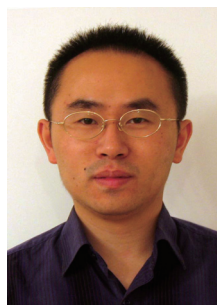


DOI: 10.13376/j.cblls/2014032

文章编号: 1004-0374(2014)03-0207-07



叶克穷 研究员

叶克穷领导的研究组主要从事和 RNA 相关的结构生物学研究。在各种生物体中已经发现了大量非编码 RNA, 它们不翻译成蛋白质, 却在结构、催化和基因调控中发挥重要作用, 这些非编码 RNA 通常和蛋白质形成复合物行使功能。实验室目前研究的重点在真核生物核糖体的组装、RNA 修饰和 RNA 沉默等领域、主要利用晶体学、核磁共振, 电镜、生化、酵母遗传操作等技术手段。

利用CLIP技术研究蛋白质和RNA的相互作用

周德健^{1,2}, 叶克穷^{1,2*}

(1 北京生命科学研究所以, 北京 102206; 2 北京协和医学院研究生院和中国医学科学院, 北京 100730)

摘要: 紫外交联免疫共沉淀 (CLIP) 技术能揭示 RNA 结合蛋白在体内的 RNA 结合位点。将讨论该技术的基本原理和一些新的发展, 这些新发展显著地提高了技术的特异性、灵敏度和应用范围。

关键词: 紫外交联; 蛋白质 RNA 相互作用; 深度测序

中图分类号: Q-33 **文献标志码:** A

CLIP techniques in studying protein-RNA interactions

ZHOU De-Jian^{1,2}, YE Ke-Qiong^{1,2*}

(1 National Institute of Biological Sciences, Beijing 102206, China; 2 Graduate School of Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

Abstract: Ultraviolet-crosslinking and immunoprecipitation (CLIP) techniques can provide key information about the *in vivo* RNA-binding site of protein. This review will discuss the basic principles and recent developments of CLIP techniques. These new developments have significantly improved the specificity, sensitivity and application range of the technique.

Key words: UV crosslinking; protein-RNA interaction; deep sequencing

蛋白质和 RNA 的相互作用在生命活动中发挥着广泛而重要的作用。在 mRNA 的转录、剪切、出核、定位、翻译和降解等过程中, mRNA 要和一系列蛋白质结合并受它们的调控。很多结构性 RNA, 如核糖体 RNA、剪切体 RNA、snoRNA, 只有和蛋白质形成复合物后才能发挥功能。利用实验手段确定蛋白质结合哪些 RNA 以及结合的位点无疑是理解该蛋白质功能的重要内容。

CLIP (UV-crosslinking and immunoprecipitation) 是研究蛋白质和 RNA 相互作用的重要技术, 它利用了蛋白质和 RNA 在 256 nm 紫外光照射下会发生共价交联的特性。早在 20 世纪 60~70 年代, 人们

收稿日期: 2013-10-23

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”项目)
(2010CB835400)

*通信作者: E-mail: yekeqiong@nibs.ac.cn

就发现紫外照射会导致蛋白质和核酸交联，但对光交联的机理目前还不是很清楚。有理论认为核酸的碱基在紫外光照射下会接受单个光子被激发，激发态的碱基可以和数埃范围内的氨基酸通过自由基机制或者电子转移机制发生光交联反应。所有 20 种氨基酸都有可能同核酸发生交联反应，但蛋白质中的芳香族氨基酸以及 RNA 中的尿嘧啶更容易发生交联反应。

Darnell 实验室于 2003 年在研究 RNA 结合蛋白 Nova 时开发了 CLIP 技术，2005 年又改进了部分实验流程^[1-2]。在应用 CLIP 的过程中还出现了多种变体，但所有 CLIP 技术的基本流程都是相似的，图 1 显示的是 CLIP 的一种衍生技术—CRAC 的基本流程，它包括：(1) 在体内用紫外光交联蛋白质和 RNA；(2) 用核酸酶部分降解 RNA，获得合适长度的片段；(3) 通过抗体纯化交联的蛋白质-RNA 复合物 (RNP)；(4) 对 RNA 进行同位素标记和两端接头序列的连接；(5) 利用 SDS-PAGE 分离纯化交联的 RNP，降解 RNP 中的蛋白质；(6) 通过反转录 PCR 获得并扩增相应的 cDNA 用于测序分析。近 10 年来，CLIP 技术被广泛应用，并取得了丰富的成果^[3]。CLIP 技术本身在特异性和灵敏度上也在不断地改进^[4-6]。CLIP 技术同高通量测序相结合，可

以在全基因组范围内捕获生物体内真实的蛋白质-RNA 的相互作用，深度获得有价值的序列信息^[3]。最新的 CLASH 技术还能探测 RNA 和 RNA 相互作用^[4,7]。

但是 CLIP 是较难掌握的一种技术。由于紫外交联的效率很低 (1%~5%)，交联的 RNA 含量很少，只有用放射性同位素标记后才能观测到，很容易被来源于细胞和试剂的非特异 RNA 污染。另外 RNA 容易降解，RNA 连接效率低，实验流程复杂 (~100 步) 等因素都增加了应用 CLIP 的难度。本文主要讨论 CLIP 的基本流程和一些技术细节，并介绍最近一些重要的技术发展，希望对想使用该技术的读者有所裨益。读者如果要深入了解详细的实验流程需要参考其他文献^[1,5-6,8-9]，CLIP 的一些应用实例可以在相关综述论文中找到^[3,10]。

1 CLIP基本流程

1.1 紫外交联

在 CLIP 实验中，首先使用近紫外光照射细胞或者组织，在蛋白质和 RNA 之间产生共价交联。利用紫外交联蛋白质和 RNA 有诸多优点：(1) 它使用波长 250~270 nm 的紫外光，设备易于获得；(2) 由于紫外光能穿透数层细胞，交联可以在活体细胞

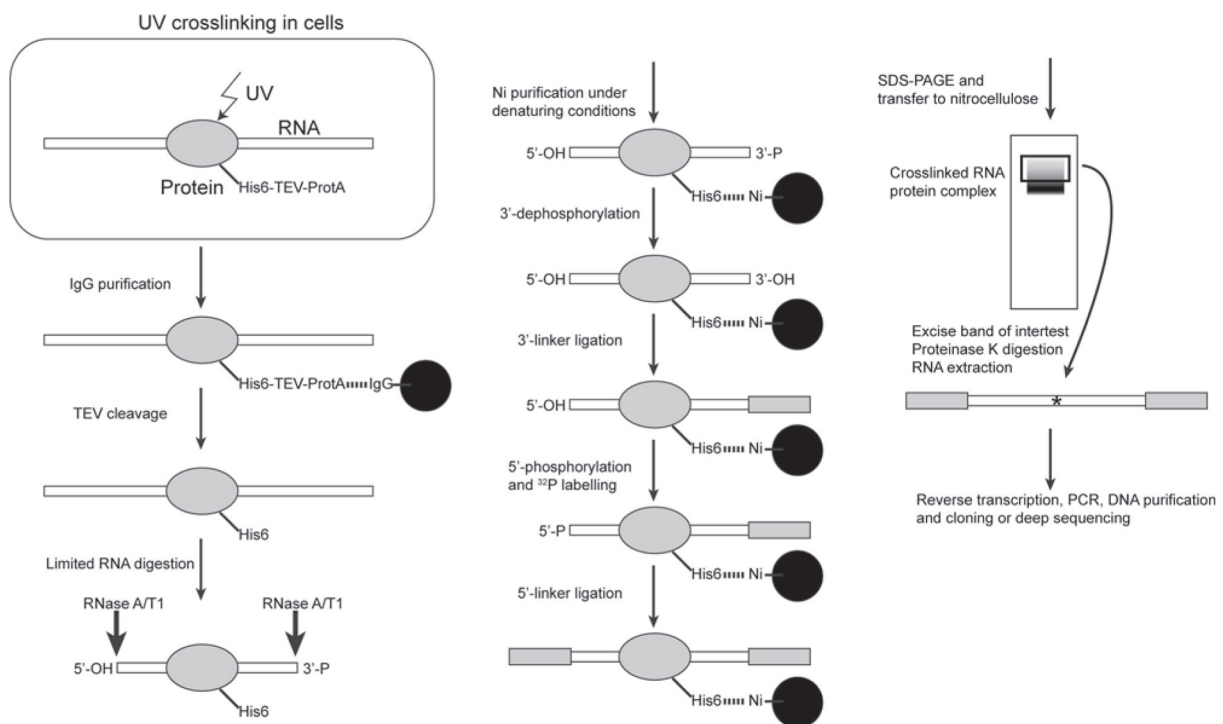


图1 CRAC技术的基本流程

内发生, 这保持了体内复合物相互作用的真实状态, 甚至能捕捉体内的瞬时相互作用, 在体内的交联还避免了细胞裂解和纯化过程中 RNA 的丢失以及形成非特异的蛋白质-RNA 复合物; (3) 可以直接使用天然的核苷酸, 不需外加修饰的核苷酸; (4) 交联发生在“零距离”的氨基酸分子和核苷酸之间, 反映直接相互作用的信息; (5) 由于蛋白质和 RNA 之间形成稳定的共价交联产物, 在后续纯化交联 RNP 产物时可以使用严苛甚至变性的条件, 以减少杂质污染对于结果的不良影响; (6) 交联对 RNA 逆转录的影响不大, 可能出现的突变还能帮助确定交联位点。

紫外交联的效率很低, 据估计只有 1%~5% 的 RNA 能交联蛋白质。紫外交联的效率同照射剂量相关, 在具体操作中, 需要通过预实验确定所需的最少照射剂量, 以减少辐射损伤对结果可能的不利影响。另外紫外交联能否发生和蛋白质的具体结合方式有关, 有些 RNA 结合蛋白无法成功交联^[11]。

1.2 RNA的部分消化

同蛋白质交联的 RNA 一般很长, 要用核酸酶消化到适合的长度以便于后续的测序分析。消化时由于蛋白质的位阻作用, 交联位点附近的 RNA 会得到更多的保护。核酸酶消化可以在细胞裂解液或在纯化的中间阶段进行。在预实验时, 通常要设置多个核酸酶的浓度, 用来确定合适的消化条件。消化后 RNA 的长度为 20~100 nt 较为合适, 该长度的序列可以方便地进行高通量测序, 而且包含足够的信息进行基因组定位。

RNase A 和 RNase T1 是最常用的用来消化 RNA 的核酸内切酶。RNase A 特异切割胞嘧啶 C 和尿嘧啶 U 的 3' 端磷酸二酯键, RNase T1 则特异地作用于鸟嘌呤 G 的 3' 端, 它们都产生含 5'-羟基和 2',3'-环磷酸的末端。这两个核酸酶通常联合使用, 这样可以避免由于消化序列特异性造成的偏倚。也有人使用没有序列特异性的 RNase I, 它能水解单链的 RNA 生成 5'-羟基和 3'-磷酸末端^[9]。

1.3 蛋白质-RNA交联复合物的纯化

蛋白质-RNA 交联复合物要使用免疫共沉淀或者其他方法从细胞裂解液中纯化。纯化可以利用识别目标蛋白质的特异性单抗、多抗或者抗血清, 抗体通过直接或者间接的方法偶联到基质上。纯化也可以利用目标蛋白质上带的标签, 使用商品化的偶联有标签抗体或者特异结合配体的亲和纯化基质。在不影响目标蛋白结合的前提下, 应尽量使用严谨的纯化条件, 以去除杂蛋白以及非特异性结合的

RNA。可以通过增加洗脱缓冲液中盐离子的浓度, 加入 NP-40、Tween-20、脱氧胆酸盐、SDS 和尿素等来改善纯化效果。

1.4 接头序列的连接

为了 RT-PCR 扩增需要, 交联 RNA 的两端需要分别连接 5' 和 3' 接头序列 (adapter)。接头序列是通过化学合成的特定序列的 RNA, 它除了包含高通量测序所需的序列外, 还可以包含条码信息, 这样可以混合多个带不同条码的样品一起进行高通量测序, 降低成本, 充分利用高通量测序的信息量。在设计接头序列和连接策略时要考虑到连接效率和避免非特异的连接。

交联 RNA 通常先和 3' 接头连接, 然后和 5' 接头连接。目前有两种常用的方法连接 3' 接头。一种方法利用 T4 RNA 连接酶, 它在 ATP 存在的条件下连接交联 RNA 的 3' 羟基和 3' 接头的 5' 磷酸根。交联 RNA 在经过核酸酶处理后 3' 末端有个磷酸根, 磷酸根需要用磷酸酶处理去除后才能和接头 RNA 连接。另据报道, RNA 连接反应中加入 PEG 6000 可大大提高连接的效率^[9]。另一种方法利用 T4 RNA 连接酶 2 的截短片突变体 Rnl2 (1-247)/K227Q, 它能在不需要 ATP 的条件下特异连接交联 RNA 的 3' 羟基和 5' 腺苷活化的 3' 端接头序列^[6]。后一种方法可以提高 3' 接头的连接效率和特异性, 它最早被用于小 RNA 的克隆^[12]。

在连接 3' 接头后, 要利用 T4 多聚核苷酸激酶在交联 RNA 的 5' 末端加上磷酸基团, 然后利用 T4 RNA 连接酶连接带 3' 羟基的 5' 接头。为了在下步 SDS-PAGE 纯化过程中追踪交联的 RNP, 在磷酸化交联 RNA 时还要掺入放射性同位素 ³²P。

在文献报道的不同实验方案中, 接头序列的连接可以在溶液中进行, 也可以在纯化基质上进行, 或者分步在基质和溶液中进行。在纯化基质上进行的好处是可以方便转换反应体系, 减少操作时间和样品在中间纯化步骤中的损失。有些实验方案还包括用胶纯化连接的中间体的过程, 以减少连接序列串联体的形成, 提高 cDNA 文库的质量。

为了阻止接头 RNA 参与不需要的副反应, 可以在其不参与连接的末端进行化学修饰, 比如 5' 接头的 5' 端用反向双脱氧腺嘧啶 (inverted dideoxy-T) 进行纯化修饰, 3' 接头序列的 3' 末端用 puromycin 或双脱氧核苷 (dideoxy-nucleotide) 进行封闭^[1,6]。

1.5 交联RNP的电泳分离和纯化

交联 RNP 从基质洗脱后, 在变性条件下用 SDS-

PAGE 进行电泳分离, 并转移到硝酸纤维素膜上。利用放射自显影确定 ^{32}P 标记的 RNP 的位置, 然后从硝酸纤维素膜切取大小合适的 RNP。电泳可以通过分子量大小将目的蛋白同杂蛋白分开, 这是一步高分辨率的纯化步骤。在电泳分离交联 RNP 时需要使用特殊的 NuPAGE 预制胶, 因为实验室配的普通胶在电泳时 pH 值将上升到 9.0, 引起 RNA 的碱水解, 而 NuPAGE 胶在电泳过程中可以保持 pH 在 7.0 附近。另外转膜过程还可以减少非特异 RNA 的干扰, 因为自由 RNA 不能结合硝酸纤维素膜。

用放射自显影检测交联的 RNP 是整个 CLIP 实验中关键的质量控制步骤, 它能确定交联的效果和确定目标 RNP 的位置。目标条带的信号应该在无 UV 交联处理组、缺失靶蛋白或亲和和标签的阴性对照组中不存在。蛋白质在交联 RNA 后分子量会增加, 在电泳上迁移位置滞后。RNP 在电泳胶上的位置和形状和核酸酶的处理强度有关: 低剂量核酸酶处理后, 交联 RNA 较长且大小不均匀, RNP 呈现弥散的条带; 而在高剂量核酸酶处理后, 结合的 RNA 很短, RNP 接近于原始蛋白质的位置, 呈现集中的条带。在切取 RNP 条带时, 要选取主带上方区域, 那里对应的 RNA 长度在 20~100 nt 之间, 要避免最浓的主带, 因为那里结合的 RNA 长度太短。

1.6 逆转录扩增和测序

从硝酸纤维素膜切取合适大小的交联 RNP 后, 用蛋白酶 K 完全降解其中的蛋白质, 然后纯化 RNA, 以 RNA 为模板利用带接头序列的引物进行反转录和 PCR 扩增。经过蛋白酶 K 的降解后, RNA 碱基上还会连接至少一个氨基酸残基, 形成 RNA-氨基酸的加合物 (adduct)。共价连接的氨基酸不会完全阻止逆转录酶的活性, 但是会经常造成逆转录时交联碱基序列的缺失或突变, 这个信息可以用来确定精确的交联位点和区分污染的 RNA^[6]。

扩增得到的 DNA 通常用 PAGE 或琼脂糖凝胶纯化, 然后选择合适长度的扩增片段插入到克隆载体进行 Sanger 法测序, 或者直接用于高通量测序。在成功的 CLIP 实验结果中, 扩增的 DNA 在胶上应呈现弥散的分布, 其分布范围和交联 RNA 加上两端接头序列后的预期长度一致, 而信号很强的条带往往来源于污染的连接序列多聚体。

2 CLIP技术的新发展

2.1 CLIP和高通量测序技术的结合

高通量测序技术的普及已经极大的提高了对核

酸序列的分析能力, 高通量测序和 CLIP 技术的组合通常被称为 HITS-CLIP (high throughput sequencing-CLIP) 或者叫 CLIP-seq^[3]。高通量测序对于分析复杂 RNA 结合谱特别适用, 它可以在全基因组范围获取蛋白质的 RNA 结合位点以及结合 RNA 的丰度信息。高通量测序甚至能捕获瞬时或低频的相互作用。我们在研究核糖体加工因子 Rrp7 结合核糖体前体时利用了高通量测序分析 CLIP 结果, 发现大部分能定位到酵母基因组的交联序列 (92.75%) 来源于核糖体 RNA, 这反映了 Rrp7 的主要结合位点^[13]。另外测序结果还鉴定到少量 (0.42%) 来源于 snoRNA 的序列, 有意思的是这些序列的 63.6% 来自于一条 snR10 RNA, 该交联信号可能反映了 Rrp7 和 snR10 在结合核糖体时空上相互接近, 从而引发低频的交联。

2.2 提高交联效率的PAR-CLIP

蛋白质和 RNA 发生紫外交联的频率很低 (1%~5%), 这成了应用 CLIP 技术的主要瓶颈之一。为了提高紫外交联效率, Hafner 等^[5] 利用一些核苷酸衍生物, 如 4-硫-脲嘧啶 (4-thiouridine) 的光交联效率远高于普通核苷酸的特性, 开发了 PAR-CLIP (photoactivatable-ribonucleoside-enhanced CLIP) 技术。他们用 4-硫-脲嘧啶标记哺乳动物的细胞培养物, 使用 365 nm 的紫外光引发交联反应。同传统的 254 nm 紫外光照射天然核酸相比, PAR-CLIP 可以将交联效率提高 100~1 000 倍。在测序结果中他们发现大量 T 突变成 C, 推测 4-硫-脲嘧啶的第 4 位的硫原子交联氨基酸后, 造成其碱基形成氢键的方式和胞嘧啶 C 一致, 因此这些突变位点提供了精确的交联位点信息。

2.3 高特异性的CRAC技术

传统的 CLIP 在非变性条件下纯化蛋白质, 当目标蛋白质属于多元 RNP 复合物中的组分时, 就难以避免复合物中其他蛋白质的干扰。虽然纯化洗脱液中含有去垢剂, 但通常不足以打破稳定的复合物。另外, 抗体特异性不高和 RNA 污染也是影响 CLIP 结果真实性的的重要因素。最近 Tollervey 实验室发展了称为 CRAC (crosslinking and analysis of cDNAs) 的技术, 显著提高了 CLIP 的特异性^[6]。

该技术的关键是在目标蛋白质 C 末端融合一个称为 HTP(His₆-TEV-Protein A) 的标签, 该标签由多聚组氨酸、TEV 酶切位点和蛋白 A 串联构成 (图 1)。如果标签融合在蛋白质的 N 末端, 多聚组氨酸和蛋白 A 的位置要交换成为 PTH (Protein A-TEV-His₆) 标

签。带 HTP 或 PTH 标签的目标蛋白质首先利用免疫球蛋白 IgG 结合标签中的蛋白 A, 然后用 TEV 蛋白酶切下目标蛋白质, 再利用 Ni 基质结合组氨酸标签。第二步亲和纯化步骤在含 6 mol/L 盐酸胍的变性条件下进行, 可有效地解聚和目标蛋白质结合的其他蛋白质。这两步亲和纯化, 尤其第二步在变性条件下的纯化, 能显著地提高结果的信噪比。

对于结合高丰度 RNA 的蛋白质, 在测序结果中如何区分信号和噪音是个重要问题, 比如占总 RNA 含量 98% 的核糖体 RNA 通常是测序结果中的主要污染物。由于 CRAC 技术具有很高信噪比, 它已经成功地用于定位多个核糖体加工因子在核糖体 RNA 上的结合位点^[11,13-15]。

2.4 能探测RNA和RNA相互作用的CLASH技术

RNA 和 RNA 分子之间的识别在 RNA 修饰、基因调控等过程中发挥广泛的作用。C/D snoRNP 是由 C/D snoRNA 和多个蛋白质构成的复合物, 主要催化底物 RNA 特定位点上的核糖甲基化。C/D snoRNA 中含有一段向导序列, 它能够通过碱基互补配对的原理结合底物 RNA 修饰位点附近的序列, 从而确定反应的特异性。Tollervey 实验室在利用 CRAC 技术研究 C/D snoRNP 蛋白的 RNA 结合时, 在深度测序结果中意外发现少量的 (1%) 杂合 RNA (chimera)^[4]。这些杂合 RNA 通常由一段 C/D snoRNA 的向导序列和一段互补配对的底物 RNA 拼接组成, 这两段序列看起来在实验过程中被 RNA 连接酶连接上, 又被紫外交联到蛋白质上。因此, 杂合 RNA 代表了两段相互作用的 RNA, 作者把这种捕获 RNA 之间相互作用的技术称为 CLASH (crosslinking, ligation, and sequencing of hybrids)。

最近 CLASH 技术被应用到研究 miRNA 与 mRNA 的相互作用^[7]。miRNA 是调控 mRNA 翻译活性的重要分子, 主要结合在 mRNA 的 3' UTR 非翻译区域。长期以来缺乏直接探测 miRNA 和 mRNA 结合的实验手段, 而是通过生物信息学预测 miRNA 的结合位点。但 miRNA 和 mRNA 序列匹配程度低, 预测结果的可靠程度低, 一直阻碍了对 miRNA 功能的理解。miRNA 和 mRNA 的作用发生在它们和 AGO 蛋白结合的环境下。Helwak 等^[7]利用 N 端融合 PTH 标签的 AGO 进行紫外交联和纯化, 并优化了实验流程以促进 mRNA 和 miRNA 分子间的连接。他们在深度测序结果中发现了约 2% 的杂合 RNA, 其中包括 399 条 miRNA 和 6 959 条 mRNA 之间发生的 18 514 对相互作用。这是首次获得如此

大规模的 miRNA-mRNA 直接相互作用的数据, 对这些数据的分析还揭示了 miRNA 结合的新模式。

3 结束语

CLIP 技术的优势在于能捕获体内原位蛋白质和 RNA 相互作用, 共价交联的复合物可以经受严格的纯化过程, 从而使得结果更为真实可靠。但 CLIP 实验受到紫外交联的低效、非特异 RNA 污染、复杂的实验步骤和 RNA 不稳定性等因素影响。最近的一些技术发展部分克服了这些限制因素的影响, CRAC 技术在变性条件纯化共价交联的复合物而提高了结果的信噪比, PAR-CLIP 利用核苷酸衍生物提高紫外交联效率, 而 CLASH 技术显示紫外交联还能捕获 RNA 和 RNA 之间的相互作用。这些新发展拓展了 CLIP 的应用范围, 相信未来会看到更多 CLIP 相关技术在蛋白质-RNA 相互作用的研究中发挥作用。

[参 考 文 献]

- [1] Ule J, Jensen K, Mele A, et al. CLIP: a method for identifying protein-RNA interaction sites in living cells. *Methods*, 2005, 37(4): 376-86
- [2] Ule J, Jensen KB, Ruggiu M, et al. CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science*, 2003, 302(5648): 1212-5
- [3] Darnell RB. HITS-CLIP: panoramic views of protein-RNA regulation in living cells. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2010, 1(2): 266-86
- [4] Kudla G, Granneman S, Hahn D, et al. Cross-linking, ligation, and sequencing of hybrids reveals RNA-RNA interactions in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(24): 10010-5
- [5] Hafner M, Landthaler M, Burger L, et al. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell*, 2010, 141(1): 129-41
- [6] Granneman S, Kudla G, Petfalski E, et al. Identification of protein binding sites on U3 snoRNA and pre-rRNA by UV cross-linking and high-throughput analysis of cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(24): 9613-8
- [7] Helwak A, Kudla G, Dudnakova T, et al. Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell*, 2013, 153(3): 654-65
- [8] Darnell R. CLIP (cross-linking and immunoprecipitation) identification of RNAs bound by a specific protein. *Cold Spring Harb Protoc*, 2012, 2012(11): 1146-60
- [9] Wang Z, Tollervey J, Briese M, et al. CLIP: construction of cDNA libraries for high-throughput sequencing from RNAs cross-linked to proteins *in vivo*. *Methods*, 2009, 48(3): 287-93
- [10] Ascano M, Hafner M, Cekan P, et al. Identification of RNA-protein interaction networks using PAR-CLIP. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2012, 3(2): 159-77

- [11] Granneman S, Petfalski E, Swiatkowska A, et al. Cracking pre-40S ribosomal subunit structure by systematic analyses of RNA-protein cross-linking. *EMBO J*, 2010, 29(12): 2026-36
- [12] Hafner M, Landgraf P, Ludwig J, et al. Identification of microRNAs and other small regulatory RNAs using cDNA library sequencing. *Methods*, 2008, 44(1): 3-12
- [13] Lin J, Lu J, Feng Y, et al. An RNA-binding complex involved in ribosome biogenesis contains a protein with homology to tRNA CCA-adding enzyme. *PLoS Biol*, 2013, 11(10): e1001669
- [14] Granneman S, Petfalski E, Tollervey D. A cluster of ribosome synthesis factors regulate pre-rRNA folding and 5.8S rRNA maturation by the Rat1 exonuclease. *EMBO J*, 2011, 30(19): 4006-19
- [15] Bohnsack MT, Martin R, Granneman S, et al. Prp43 bound at different sites on the pre-rRNA performs distinct functions in ribosome synthesis. *Mol Cell*, 2009, 36(4): 583-92

叶克穷报告讨论

伊成器 (北京大学生命科学学院)

Q: 您刚才提到蛋白质和 RNA UV 交联的时候, 其中有一个例子, 您提到是在 Box C/D RNP 里做 UV 交联后, 可以用其中两个骨架蛋白质 NOP56 和 NOP58 来做 IP 实验, 当然另一个选择也可以用另一个甲基转移酶 NOP1 做 IP, 以这个具体的例子为例两者有没有什么差别?

A: 我们刚才只是分析了它们均能和 Box C/D RNA 交联, 但它们交联的位置还是不一样的, 这与我们知道的结构信息还是吻合的, 现在的模型认为 NOP58 结合在 Box C/D 一头, 而 NOP56 结合在另一头 Box C'/D' 上。

Q: 以此例子延伸一下, 我想在做如 PAR-CLIP 等交联时, 如果目标是一个 mRNA 结合蛋白, 那这个实验比较好做, 如果是一个酶, 这个实验就很难成功, 根据你的经历有没有什么评论呢?

A: CLIP 技术的成功还是取决于目标蛋白质在体内结合 RNA 的强度和时间的长短, 如果研究目标是一个酶, 它结合的时间可能很短, 捕捉到 RNA 的概率就低得多。

付向东 (加州大学圣地亚哥分校)

Q: 现在 CLIP 这么多, 从您的角度, 如果您想做 CLIP, 您想选哪种方法?

A: 从我们角度我们选择 Tollervey 实验室发展的 CRAC, 因为我们做的大部分是 90S 核糖体前体结合蛋白质, 它们都形成很大的复合物, 但靶标比较简单, 都是核糖体 RNA, 我们想知道精确的结合位点。

Q: 我想 CLIP 相对于其他方法学是用的最多的, 我们刚从冷泉港会议中了解到其实大家都想用 CLIP 技术, 而真正会用的人还是很少, 那在座的各位有多少人想用, 我们开会也要产生一些效率, 我们可以找两三个 CLIP 做得比较成功的实验室, 把这个 CLIP 技术实验流程以及注意事项完善一下, 再给大家分享一下。

A: 这个跟个人的“手”有关系。

刘默芳 (中国科学院上海生命科学研究院生物化学和细胞生物学研究所)

Q: 刚才付老师已经把我想说的都说了, 我们就属于这种很想做 CLIP, 但是又做得不是特别好的实验室, 很需要你们这种富有经验的实验室的帮助, 我想问一下专业点的问题, 在做 CLIP 时, 需要用核酸酶处理 RNP 得到的 RNA 大概是多大呢?

A: 这从测序结果可以知道, 大概是 20~50 个碱基长度。

Q: 我想问一下我们实验室中遇到的问题, 我们实验室主要是做 piwi 蛋白质, 我们通过 CLIP 实验发现比 PIWI 蛋白质稍大的条带, 这可能是由于 PIWI 蛋白质与 RNA 结合后的条带迁移, 但是也发现一些比 PIWI 蛋白质更小的条带信号, 这是什么原因呢?

A: 蛋白质发生降解就会出现你所说的这种情况。

付向东 (加州大学圣地亚哥分校)

Q: 我觉得可能是蛋白质降解, 但也有另一种可能很有意思。很多蛋白质在 IP 时可能会形成复合物, 而在这个复合物中可能有不止一个的 RNA 结合蛋白质, 这样就会产生比较多的信号。我们实验室就正好

遇到了这种情况,歪打正着找到了一个新 RNA 结合蛋白质。其实 CLIP 技术已经过了起始阶段,大家需要利用 CLIP 技术做很多实验,比如把一个基因敲除,测试另一个蛋白质和 RNA 的结合,或是在不同条件下测试与 RNA 的结合,比如在激活或是抑制某种蛋白质情况下测试其与 RNA 的结合能力等,现在还发展到通过细胞分组,测试细胞质、细胞核、细胞膜等中蛋白质与 RNA 的结合,结果发现很多不同的条带,进一步分析发现有的是蛋白质的不同变体,有的却是不同的蛋白质,它们在一个复合物里,再分别测序,发现几者之间形成的模式都不一样,就是几种不同的作用方式,这种现象非常有意思,但是非常花钱。你们是在自己所里测序的吗?

A: 是的,其实我们实验室成功率也很低,今天给大家展示的也是成功的两个例子,失败的案例也很多。CLIP 成功的关键是操作者,整个实验 RNA 含量极低,需要同位素标记才能看到。

Q: 有经验表明在蛋白质核酸电泳后可以省略将样品从胶转移到膜上那一步,这样能把灵敏度提高几十倍。再说 PAR-CLIP 虽然能提高灵敏度很多,但是很多人也不喜欢用,因为它有很大的偏好性,包括 UV 交联也这样,如果蛋白质结合到含有 U 的 RNA 序列上这个实验就好做,相反如果它只结合到含嘌呤的 mRNA 序列上,这个实验就比较难,所以这 CLIP 实验技术还是有很多技巧有待研究。

沈晓骅(清华大学生命科学学院)

Q: 我有一个比较基本的问题,大家有没做过将 UV 254 交联和 PAR-CLIP 365 交联两者相结合做两步交联,另外,大家为什么都选择 UV 交联而不选择如甲醛交联等其它交联呢?

A(付向东): 两步交联还没做过,不过可以试一下。UV 交联是不可逆转的,而甲醛交联是热敏感的,可以逆转的。

Q: 甲醛交联效率与 UV 交联有何差别?

A(付向东): 甲醛交联效率比 UV 交联效率高很多,UV 交联效率最多 1%,这里面确实存在很多问题,这就要看化学家怎么解决这个难题了。

A(叶克穷): 这里我还要补充一下 UV 交联有什么好处,UV 交联能在完整的活细胞里完成,这真实地反映了活细胞内的相互作用,因为你把细胞破碎以后交联,你就不知道 RNA 结合蛋白质到底会结合什么杂质。

曹晓风(中国科学院遗传与发育生物学研究所)

Q: 我有一个问题,我们实验室做 UV 交联是从付向东等老师实验室学过来的,在做 UV 交联时要将细胞放在冰上,我们是做植物的,我们发现很多 RNA 结合蛋白质是和外界压力相关的,你们有没发现在冰上做 UV 交联拿到的数据是和外界刺激压力相关比如说冷刺激,这问题你们怎么看?

A: 其实在 UV 交联时,不一定要将细胞放在冰上,现在有一种技术可以直接在培养基中生长的细胞进行 UV 交联。