

A/U 富集片段 RNA 结合蛋白的固相纯化与鉴定*

孙达权 王莹 刘定干**

(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, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 RNA 与细胞靶蛋白结合是 RNA 发挥其生物学功能的重要基础, 因此, 分离和鉴定 RNA 结合蛋白是研究 RNA 功能的必要步骤。目前, RNA 结合蛋白的分离和鉴定方法较多, 但各有优缺点。本实验利用可溶性碳二亚胺(EDC)介导的缩合反应, 将 A/U 富集片段 RNA 共价偶联到固相介质 amine M-270 上, 再用固定化 RNA 经亲和层析从细胞抽提物中分离纯化 RNA 结合蛋白, 并以 SDS-PAGE 联合质谱分析和 Western blotting 等方法鉴定 RNA 特异性结合蛋白。最后通过荧光原位杂交和共聚焦显微镜证明这些 RNA 特异性结合蛋白确与 RNA 在细胞内结合。实践证明这一方法简单、高效、易于掌握。

关键词 C/EBP β 3'UTR, A/U 富集 RNA, hnRNPC, 核酸-蛋白质相互作用

学科分类号 Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00309

RNA 与蛋白质相互作用是 RNA 行使其生物学功能的基础^[1]。因此, 分离和鉴定细胞内的 RNA 结合蛋白是研究 RNA 分子生物学功能的首要任务。之前, 我们发现 C/EBP β 3'UTR RNA 具有肿瘤抑制功能^[2-4]。当其中一段 A/U 富集序列缺失时, 其肿瘤抑制功能明显下降^[5-6]。进一步研究发现, 该 A/U 富集片段 RNA 也具有肿瘤抑制作用。为研究这段 A/U 富集片段 RNA 在肿瘤抑制中的分子机制, 首先需要获取与这段序列相结合的胞内蛋白质。但是, RNA 本身不稳定、易降解的特性, 对用 RNA 来获取其结合蛋白造成了阻碍。目前, 用于 RNA-蛋白质结合的实验方法有以下几种, 它们各有适用范围和优缺点: a. RNA 免疫共沉淀(RIP), 这一方法可运用于 RNA 已知结合蛋白或验证某一特定蛋白是否结合在 RNA 上, 但需要该蛋白质特异性抗体^[7-8]; b. RNA 凝胶迁移阻滞法(RNA-EMSA), 这一方法需要先用同位素标记 RNA^[9-10]; c. RNA 亲和层析, 这一方法需要先标记 RNA 如地高辛或生物素等, 再通过偶联有抗地高辛或链霉亲和素的固相介质吸附标记 RNA, 或者事先将 RNA 通过与预先固定化的 DNA 退火偶联到固相介质上^[11-15]。2005 年, Liu(刘定干)等^[15]将 RNA 通过退火连接到一段事先已偶联到氨基硅烷化的玻璃粉 DNA 臂上, 从而将 RNA 间接偶联到

在固相支持介质上, 通过 RNA 亲和层析将 RNA 结合蛋白分离出来。

在本实验中, 我们利用零长度双功能偶联剂 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(可溶性碳二亚胺, EDC), 通过 RNA 5'端磷酸基上的—OH 和氨基磁珠上的伯氨基(—NH₂)的缩合反应, 将 A/U 富集片段 RNA 化学偶联到固相支持介质磁珠上, 再用固定化的 RNA 经亲和层析获取该 RNA 结合蛋白。然后用 SDS-PAGE 结合质谱分析和 Western blotting 等方法鉴定 RNA 特异性结合蛋白, 如 hnRNPC。利用荧光原位杂交和共聚焦显微镜证实该片段 RNA 在细胞内与 hnRNPC 共定位。此方法具有简单、高效、容易掌握等优点, 故在此介绍。

1 材料与方法

1.1 材料

RNA 用大规模体外转录试剂盒(Promega 公

* 国家自然科学基金(30970585, 31170722)和分子生物学国家重点实验室开放课题组运行费资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 021-54921235, E-mail: dgliu@sibcb.ac.cn

收稿日期: 2012-06-21, 接受日期: 2012-10-11

司)进行制备. EDC 和 N- 羟基琥珀酰亚胺(NHS)购自上海晶纯试剂有限公司. Sephadex G-50、lipofectamine 2000、氨基磁珠 Amine M-270 购自 Invitrogen 公司; RNase inhibitor 和碱性磷酸酯酶购自 Takara 公司; 蛋白酶抑制剂 cocktail 购自 Sigma 公司; SMMC-7721 肝癌细胞来自中国科学院细胞库. 新生牛血清购自杭州四季青公司. A/U 富集片段 RNA 的分子信标由上海闪晶生物技术公司合成. PVDF 膜购自 Millipore 公司; hnRNPC 特异性单克隆抗体购自 Epitomics 公司; 二抗购自 Bioworld 公司; 细胞培养基购自 GIBCO 公司; 共聚焦显微镜为 Leica TCS SP5.

1.2 方法

1.2.1 RNA 体外转录与化学偶联. 以限制性内切酶线性化的质粒为模板用大规模体外转录试剂盒转录合成 A/U 富集片段 RNA, 其序列为(ppp)UUUU-GUUUUGUUUUGUUUUUUGGUCUUUUUUUGU-AUUUAUAAAAUAAUCUAUUUCUAUGAG(-OH) (C/EBP β 3'UTR RNA 的 A/U 富集序列, 其 5'端带有 3 个磷酸基团). 转录非 A/U 富集 RNA 作为对照 RNA, 其序列为 (ppp)GGUACGCCUGCAG-GUACCGGUCCGGAAUUCGCGGUCGACGAGC-UCACUAGUCGGCGGCCGCUCUAGAGGAUCCA(-OH) (来源于质粒 pSV-SPORT). 经 Sephadex G-50 过柱和乙醇沉淀纯化转录的 RNA. 取热变性处理的 90 μ g RNA 与 200 μ l 磁珠 Amine M-270 混合, 加入 0.2 g 可溶性碳二亚胺(EDC)和 0.18 g N 羟基琥珀酰亚胺(NHS), 并加入终浓度 0.1 mol/L MES 缓冲液(pH 6.5), 反应体积定容至 400 μ l, 25 $^{\circ}$ C 下旋转反应 2 h(通过 RNA 5'端磷酸基上的“—OH”和磁珠上的伯氨基“—NH $_2$ ”发生缩合反应). 反应结束后用 DEPC 水清洗磁珠 3 次, 加入 200 μ l 50%甘油保存于-80 $^{\circ}$ C 冰箱.

1.2.2 RNA 沉降(pull down)、SDS-PAGE 和质谱分析. 取 7×10^6 细胞, 用预冷的 1 ml 细胞裂解/结合液(25 mmol/L HEPES pH 7.2, 100 mmol/L KCl, 5 mmol/L MgCl $_2$, 1 mmol/L EGTA, 15%甘油)吹打, 将细胞充分吹散混匀, 并加入 40 μ l 蛋白酶抑制剂 cocktail 和 100U RNase 抑制剂, 超声破碎细胞. 细胞抽提物在 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液加入 40 μ l RNA 偶联的磁珠, 在 4 $^{\circ}$ C 下旋转反应过夜. 用细胞裂解/结合液清洗磁珠 6 次, 每次 5 min. 弃上清液后在磁珠中添加 20 μ l SDS 上样

缓冲液, 沸水煮沸 5 min 后取上清液进行 SDS-PAGE. 电泳结束后对变性胶进行考马斯亮蓝 R-250 染色. 用干净的手术刀片切取染色特异性条带进行质谱分析鉴定, 获取对应蛋白质.

1.2.3 蛋白质印迹(Western blotting). 按 1.2.2 方法再次获取 RNA 结合蛋白进行 Western blotting. 转移缓冲液为 0.22% CAPS, 10%甲醇, pH 10.5; 转移电流为 0.5A, 转移时间为 30 min. 转移后的 PVDF 膜用 5%脱脂牛奶在 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h. 封闭的 PVDF 膜在一抗中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 再在辣根过氧化物酶标记的二抗中 4 $^{\circ}$ C 孵育 4 h. 用化学发光法在 LAS4000 中显影成像.

1.2.4 细胞转染、荧光原位杂交和共聚焦显微镜观察. 按 lipofectamine 2000 说明书对铺于盖玻片上的 SMMC-7721 细胞转染 A/U 富集片段 RNA, 转染 24 h 后, 用 4%多聚甲醛(pH 7.2)在室温下固定 30 min, 用核酸封闭剂在 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h 后加入 RNA 分子信标, 75 $^{\circ}$ C 放置 15 min 后室温冷却 30 min. 用 5%脱脂牛奶在 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h, 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 用 FITC 标记的二抗 4 $^{\circ}$ C 孵育 4 h. DAPI 染色后抗荧光猝灭封片剂封片. 共聚焦显微镜观察和获取图片.

2 结 果

2.1 A/U 富集片段 RNA 与 hnRNPC 在体外特异性结合

Liu 等^[16]研究发现 5'端带有磷酸基的单链 DNA 在 EDC 介导下能够偶联到带有伯氨基的石墨电极上. 同时, Gilham^[17]指出多核苷酸的 5'端无论是单个磷酸根或者是多个磷酸根, 均不影响 EDC 介导的多核苷酸与支持介质之间的化学偶联. 多年来, 碳二亚胺类双功能交联剂如早期的二环己基碳二亚胺(DCC)和近年来的可溶性碳二亚胺(EDC)广泛用于氨基酸间和蛋白质-蛋白质间的共价交联, 同时也用于核苷酸与蛋白质或其他固相介质间的共价交联^[18]. 但就我们所知, 除我们外尚未见利用 EDC 直接介导 RNA 和固相介质形成磷酸氨基酯键共价交联的文献报道.

在本工作中, 利用 EDC 介导的伯氨基和磷酸羟基间缩合反应的原理^[19], 我们将体外转录的 RNA 通过其 5'端磷酸基团上的“—OH”与氨基磁珠(amine M-270)上的伯氨基“—NH $_2$ ”进行共价偶联. 在反应过程中, 首先使 RNA 5'端的磷酸基与

EDC 反应, 生成能与氨基反应的中间产物“intermediate 1”(图 1a), 但该产物极不稳定, 因此需要使该中间产物进一步和 N- 羟基琥珀酰亚胺(NHS)反应, 将其转变成比较稳定而又保留反应活性的“intermediate 2”(图 1a). “intermediate 2”再与氨基磁珠上的伯氨基发生反应, 生成磷酸氨基酯键, 从而将 RNA 固定到磁珠上(图 1a). 由于除磁珠外的反应物和反应副产物均极易溶于水, 经 DEPC 处理水多次清洗和沉淀磁珠后可获得 RNA 偶联的磁珠. 在这一过程中, EDC 是缩合反应的主要活化试剂, 而 NHS 虽然不是必需的, 但它可通过使不稳定的中间产物转变成稳定的中间产物, 从而大大提高反应效率^[20-21].

RNA 之间连接核糖核苷酸的磷酸二酯键中的磷酸基团也有—OH 存在, 这些—OH 能否参与 EDC 介导的偶联反应? 我们尚未见到这方面的文献报道, 但我们的实验中, 用 5' 端去磷酸化的 RNA(碱性磷酸酯酶处理)与氨基磁珠在相同的条件下进行交联, 分光光度计检测结果显示并未得到明显的交联产物, 这提示 RNA 的链内磷酸二酯键中磷酸基团的—OH 至少不是形成共价交联的主要位置. 此外, 对于体外转录的 RNA 其 5' 端第一个核苷上的 α 和 β 位磷酸是否参与磷酸氨基酯键形成尚不清楚, 也没有找到相应的文献报道, 但这并不影响体外转录的 RNA 连接到氨基磁珠上^[17].

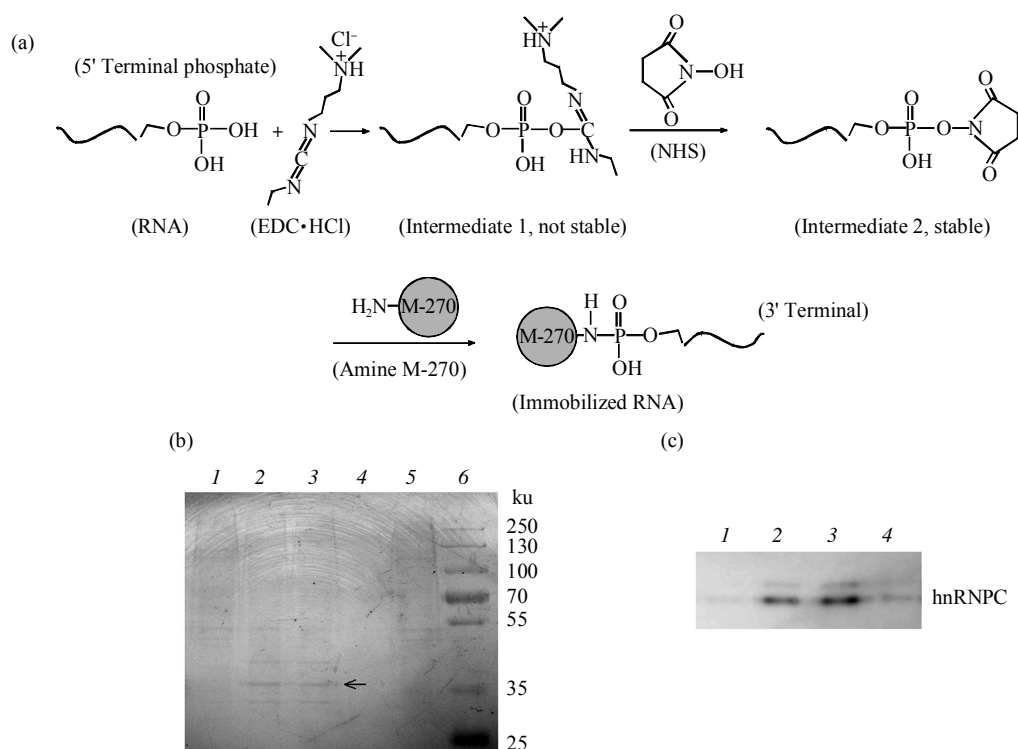


Fig. 1 A/U-rich RNA of C/EBP β 3'UTR bound specifically with RNA binding protein hnRNP in RNA affinity chromatography

(a) RNA transcribed *in vitro* was immobilized on amine M-270 magnetic beads with phosphamide ester linking mediated by EDC and NHS. RNA 5'terminal must be the phosphate and if there are three phosphates, conjunction between RNA and Amine M-270 beads still occurs. EDC·HCl is the reagent N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride. NHS is the reagent N-hydroxysuccinimide. (b) Coomassie bright blue R-250 staining results showed that the A/U rich RNA bound specifically with cellular protein (black arrow) in RNA affinity chromatography. Lane 1 represented those proteins that bound with control RNA immobilized on M-270 magnetic beads(Control RNA/M-270); lane 2 and 3 represented those proteins that bound with A/U-rich RNA immobilized on M-270 magnetic beads(A/U-rich RNA/M-270); lane 4 was a blank control representing no protein(Blank); lane 5 represented those proteins that bound with M-270 magnetic beads(M-270 beads); lane 6 was a molecular mass. Arrow, specific binds. (c) RNA affinity chromatography and Western blotting results showed that the A/U rich RNA bound specifically with hnRNP. Lane 1 represented that hnRNP did not bind with M-270 magnetic beads (M-270 beads); lane 2 and 3 represented that hnRNP bound with A/U-rich RNA immobilized on M-270(A/U-rich RNA/M-270); lane 4 represented that hnRNP did not bind with control RNA immobilized on M-270(Control RNA/M-270).

将化学偶联获得的固定化 RNA 与 SMMC-7721 细胞抽提物在 4℃ 进行 RNA 亲和层析, 获取 RNA 结合蛋白. 这些蛋白质经 SDS-PAGE 分离后, 其变性胶用考马斯亮蓝 R-250 染色, 结果显示大约在 40 ku 处有一明显的染色特异性条带, 证明 C/EBP β 3'UTR RNA 上的 A/U 富集片段能够与细胞内蛋白质发生特异性结合(图 1b). 切取该染色特异性条带后进行蛋白质谱分析, 其结果显示该特异性 A/U 富集片段 RNA 结合蛋白可能是核不均一核糖核蛋白 C(hnRNP C). 再次用 RNA 亲和层析获取 A/U 富集片段 RNA 的结合蛋白, 并用 hnRNP C 特异性抗体进行免疫印迹反应, 对质谱分析结果进行验证, 证明该 RNA 特异性结合蛋白确实是 hnRNP C(图 1c).

2.2 A/U 富集片段 RNA 与 hnRNP C 在细胞内共定位

前面我们用 RNA 亲和层析证实 C/EBP β 3'UTR RNA A/U 富集片段能够与 RNA 结合蛋白 hnRNP C 发生特异性结合. 为验证在细胞生理状态下该 RNA 与 hnRNP C 在细胞内同样发生结合, 我们对肝癌细胞 SMMC-7721 进行 RNA 转染和荧光原位杂交分析(RNA 分子信标和荧光免疫抗体). 共聚焦显微镜结果显示, A/U 富集片段 RNA(红色荧光)和 RNA 结合蛋白 hnRNP C(绿色荧光)在肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞的细胞质和细胞核内均有分布, 并主要分布在细胞核内, 同时, 该 A/U 富集 RNA 和 hnRNP C 在细胞内共定位(黄色荧光), 为 A/U 富集片段 RNA 和 hnRNP C 在细胞内相互结合提供了有力的证据(图 2).

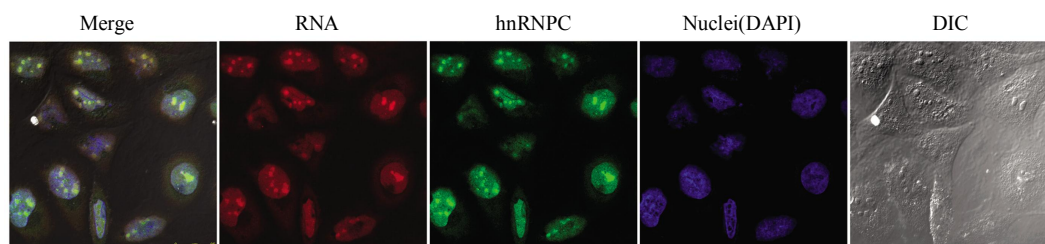


Fig. 2 A/U-rich RNA co-localized with RNA binding protein hnRNP C in SMMC-7721 cells

Red color, the A/U-rich RNA, hybridized by RNA molecular beacon; green color, hnRNP C, fluorescence *in situ* hybridization by monoclonal anti-hnRNP C antibody; blue color, nuclei, stained by DAPI.

3 讨 论

在本实验中, 我们发现体外转录的 RNA 在 EDC 和 NHS 作用下易与氨基磁珠进行化学偶联, 其反应条件温和、反应时间短、偶联效率高, 有利于维护 RNA 的稳定. 用此法固相化 RNA 能够结合足量的 RNA 结合蛋白, 一般一次亲和层析获得的 RNA 结合蛋白(考马斯亮蓝染色特异性胶带)足够一次质谱分析使用的量, 成功率较高. 同时, 该偶联方法能够将 5'端带有磷酸基团的 RNA 进行固相化, 而对于 5'端是羟基的 RNA, 可通过 T4 Polynucleotide Kinase 和 ATP 添加磷酸基团后再进行 RNA 固相化. 因此, 我们觉得上述方法值得介绍和推广.

致谢 浙江理工大学赵辅昆研究员提供质谱分析, 本所细胞分析技术平台于洋、王艳、涂溢晖等技术人员指导共聚焦显微镜使用, 特此感谢.

参 考 文 献

- [1] Abdelmohsen K, Gorospe M. RNA-binding protein nucleolin in disease. *RNA Biol*, 2012, **9**(6): 799-808
- [2] Liu D, Li Z, Akira S, *et al.* Overexpression of a reversion-related protein in the revertant RR C11. *Sci China C Life Sci*, 1996, **39**(3): 300-309
- [3] Liu D G, Jiang Q H, Wei Y Y, *et al.* Gene expression profile favoring phenotypic reversion: a clue for mechanism of tumor suppression by NF-IL6 3'UTR. *Cell Res*, 2003, **13**(6): 509-514
- [4] Wang Y, Sun D Q, Liu D G. Tumor suppression by RNA from C/EBP β 3'UTR through the inhibition of protein kinase C δ activity. *PLoS One*, 2011, **6**(1): e16543
- [5] Wang H, Wang Y, Sun L, *et al.* Sequences near both termini of the

- C/EBP mRNA 3'untranslated region are important for its tumor suppression activity. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2009, **41** (6): 456-463
- [6] 王海震, 王莹, 孙达权, 等. C/EBP β mRNA 3' 非翻译区肿瘤抑制功能的分子机制——同时缺失 3 段短序列降低其肿瘤抑制活性. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(9): 1134-1140
Wang H Z, Wang Y, Sun D Q, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(9): 1134-1140
- [7] Selth L A, Gilbert C, Svejstrup J Q. RNA Immunoprecipitation to Determine RNA-protein Associations *in vivo*. USA: Cold Spring Harb Protoc, 2009, **6**: pdb.prot5234
- [8] Ortega A D, Sala S, Espinosa E, *et al.* HuR and the bioenergetic signature of breast cancer: a low tumor expression of the RNA-binding protein predicts a higher risk of disease recurrence. *Carcinogenesis*, 2008, **29**(11): 2053-2061
- [9] Reboll M R, Oumard A, Gazdag A C, *et al.* NRF IRES activity is mediated by RNA binding protein JKTBP1 and a 14-ntRNA element. *RNA*, 2007, **13**(8): 1328-1340
- [10] Sellak H, Lincoln T M, Choi C S. Stabilization of cGMP-dependent protein kinase G (PKG) expression in vascular smooth muscle cells: contribution of 3'UTR of its mRNA. *J Biochem*, 2011, **149**(4): 433-441
- [11] Hsu R J, Yang H J, Tsai H J. Labeled microRNA pull-down assay system: an experimental approach for high-throughput identification of microRNA-target mRNAs. *Nucleic Acids Res*, 2009, **37**(10): e77
- [12] Pollock C, Daily K, Nguyen V T, *et al.* Characterization of MRP RNA-protein interactions within the perinucleolar compartment. *Mol Biol Cell*, 2011, **22**(6): 858-867
- [13] Tan Y W, Hong W, Liu D X. Binding of the 5'-untranslated region of coronavirus RNA to zinc finger CCHC-type and RNA-binding motif 1 enhances viral replication and transcription. *Nucleic Acids Res*, 2012, **40**(11): 5065-5077
- [14] Rieder R, Reinhardt R, Sharma C, *et al.* Experimental tools to identify RNA-protein interactions in *Helicobacter pylori*. *RNA Biol*, 2012, **9**(4): 520-531
- [15] Liu D G, Sun L. Direct isolation of specific RNA-interacting proteins using a novel affinity medium. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(15): e132
- [16] Liu S H, Ye J N, He P G, *et al.* Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode. *Anal Chim Acta*, 1996, **335**(3): 239-243
- [17] Gilham P T. The covalent binding of Nucleotides, polynucleotides, and nucleic acids to cellulose. *Methods in Enzymology, Nucleic Acids(part D)*, 1997, **21**: 191-197
- [18] Suto R K, Whalen M A, Bender B R, *et al.* Synthesis of gamma-phosphate-linked nucleoside affinity chromatography resins for protein purification, including ribonucleoside triphosphate reductase. *Nucleosides Nucleotides*, 1998, **17**(8): 1453-1471
- [19] 喻平, 胡泉源, 祁小云, 等. EDC 在有机合成中的应用研究进展. *广州化工*, 2011, **39**(8): 9-23
Yu P, Hu Q Y, Qi X Y, *et al.* *Guangzhou Chemical Industry (China)*, 2011, **39**(8): 9-23
- [20] Staros J V, Wright R W, Swingle D M. Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Anal Biochem*, 1986, **156** (1): 220-222
- [21] Kuipers M E, Swart P J, Hendriks M M, *et al.* Optimization of the reaction conditions for the synthesis of neoglycoprotein-AZT-monophosphate conjugates. *J Med Chem*, 1995, **38**(6): 883-889

Purification and Analysis of A/U-rich RNA Binding Protein Using Immobilized RNA by EDC Crosslinking*

SUN Da-Quan, WANG Ying, LIU Ding-Gan**

(State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences,
Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract An important way for RNA to implement its biological function in cells is the binding to proteins. Thus the analysis of RNA binding proteins in cells is necessary for the investigation of RNA's functions. So far, there have been various methods to identify RNA binding proteins. In this study, we describe a novel method, *i.e.* to immobilize an A/U-rich RNA to a solid medium amine M-270 magnetic beads by coupling them in a direct condensation reaction using the soluble carbodiimide reagent EDC, and then to isolate RNA binding proteins from cell lysate by RNA affinity chromatography using the immobilized RNA. The RNA specific binding proteins were then identified by SDS-PAGE, mass spectrometry and Western blotting, such as hnRNP C which bound specifically to the A/U-rich RNA of C/EBP β 3'UTR. Colocalization *in vivo* between A/U-rich RNA and the identified protein hnRNP C was shown by fluorescence *in situ* hybridization using RNA molecular beacon and anti-hnRNP C antibody and confocal microscopy. Our results indicated that the direct immobilization of RNA with EDC is highly efficient, simple and easy.

Key words C/EBP β 3'UTR, A/U-rich RNA, hnRNP C, interaction between nucleic acid and protein

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00309

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30970585, 31170722) and The State Key Laboratory of Molecular Biology for Open Research Teams.

**Corresponding author.

Tel: 86-21-54921235, E-mail: dgliu@sibcb.ac.cn

Received: June 21, 2012 Accepted: October 11, 2012