

RNA pulldown 结果解读

| 专注 | 品质 | 诚信 |

提供核酸和蛋白的整体研究方案

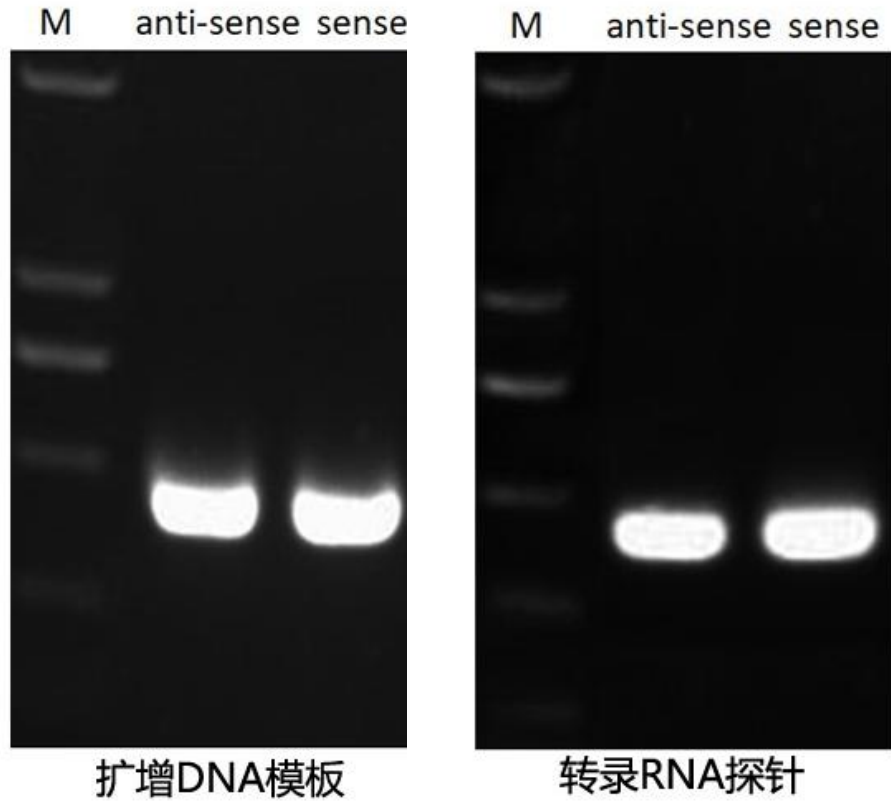
>>>

实验前的准备



- 1、转录法和探针法的选择，主要由诱饵RNA的长度决定，通常300~1500bp以内优先考虑转录法；太长或太短的转录难度会比较大，则选择探针法；特别短的比如在60bp以下，可以直接合成带标记的诱饵RNA本体；
- 2、探针法的原理，是合成带标记的能够与诱饵RNA互补的短链RNA探针，探针结合诱饵RNA后，间接地富集出能够与诱饵RNA结合的猎物蛋白或其他猎物RNA，通常以另一条随机的短链RNA作为对照；
- 3、转录法的原理，是先扩增出诱饵RNA的DNA模板，再体外转录并标记诱饵RNA的本体，直接富集出能够与诱饵RNA结合的猎物蛋白或其他猎物RNA，通常以与诱饵RNA反向互补的另一条RNA链作为对照；
- 4、探针法和转录法原理上的不同，决定了转录法的特异性和结果的可靠性都要强于探针法，因为合成的RNA探针不能太长，这导致探针可能会非特异性的结合到其他的非诱饵RNA上，最终富集出的猎物也可能不是我们诱饵RNA所特异性结合的；
- 5、在正式实验前，建议先通过qPCR或WB检测预期的猎物RNA或蛋白的本底表达量，如果表达水平太低，pull down后可能检测不到而误判成假阴性结果，建议样本中过表达后再尝试，同时也可以借此判断样本中蛋白或RNA是否已发生降解。

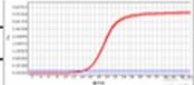
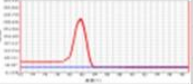
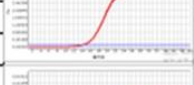
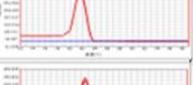
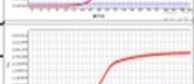

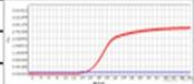
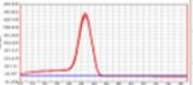
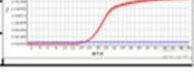
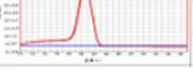
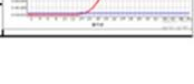
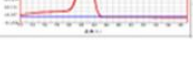
转录法前期质控



1、DNA模板扩增以及转录出RNA后通过凝胶电泳，判断扩增和转录是否完全；

2、注意：DNA sense链转录出的RNA记为对照组，antisense链转录出的RNA记为实验组。

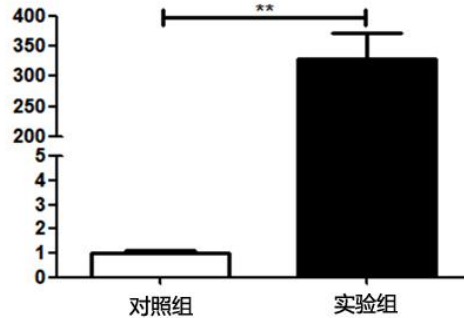
探针法前期质控

	Ct值	扩增曲线	溶解曲线
诱饵RNA	14.190		
	14.280		
	14.400		
GAPDH	14.840		
	14.820		
	14.790		

1、探针法由于是通过标记探针结合诱饵RNA后，再间接富集猎物，因此必须在实验前检测诱饵RNA的表达水平，最好CT值在25以下，如果诱饵RNA的表达水平不够高，可以考虑在样本中做过表达；

2、正式实验前可做一次小量的富集实验，验证探针对诱饵RNA的富集效果，如左下图所示，确保实验组探针的富集效果要显著高于对照组，否则需重新设计探针，探针富集效果检测可以避免因探针问题导致珍贵样本的浪费，并增加最终结果的可信度。

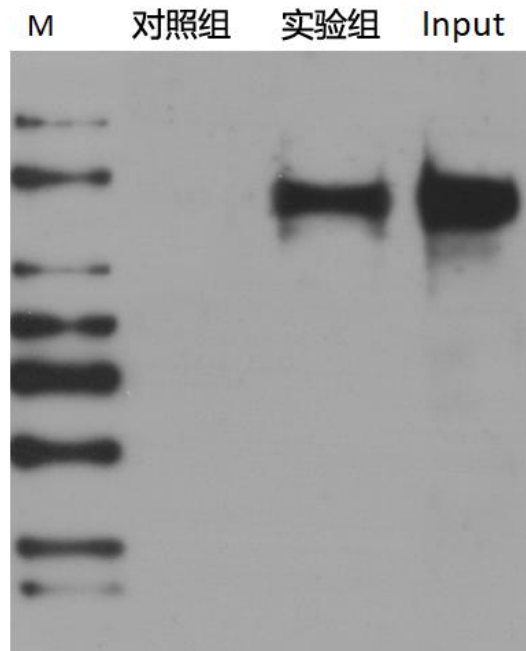
诱饵RNA本底表达检测



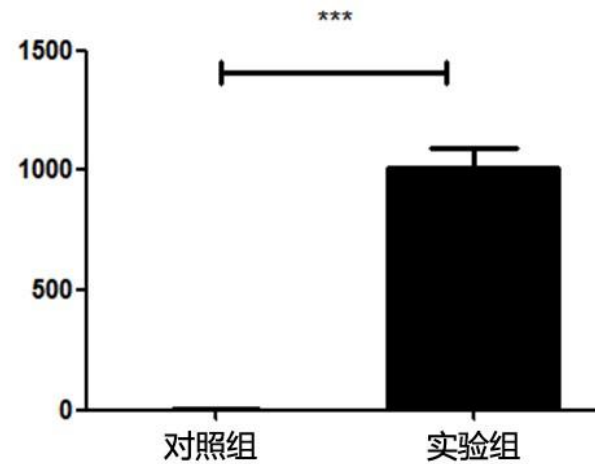
探针富集诱饵效果检测

Pull down后WB或qPCR

pull down后WB



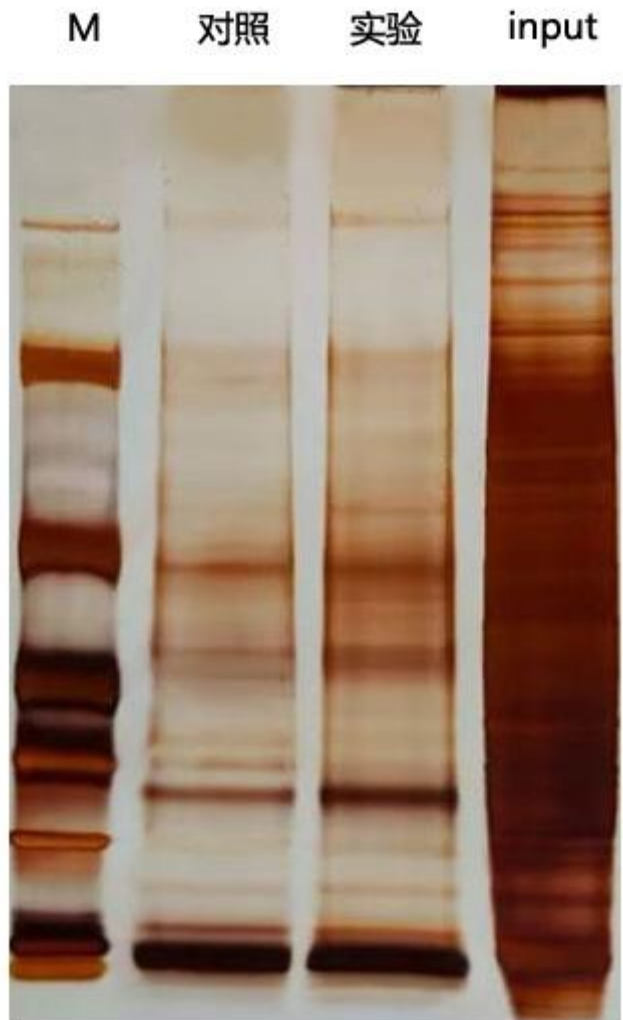
pull down后检测猎物RNA



1、pull down后通过WB检测猎物蛋白，若实验组能检测到猎物蛋白目的条带，而对照组没有，说明该蛋白能与诱饵RNA特异性结合；若都没有检测到，说明该蛋白不能与诱饵RNA结合；若对照组和实验组都能检测到，说明该蛋白也能与对照探针富集的其他RNA结合；

2、pull down后通过qPCR检测猎物RNA，若实验组相比于对照组有显著富集效果，说明诱饵RNA和猎物RNA有互作。

银染和质谱鉴定



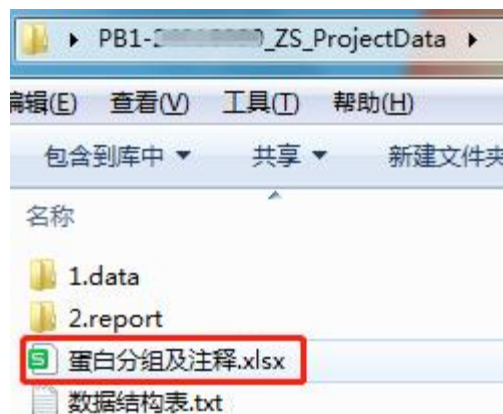
1、银染通常作为质谱送样上机前的质控，检测pull down后蛋白液的质量，或在知道预期蛋白大小的前提下切胶送质谱，减少杂蛋白的干扰；

2、在质谱结果中挑选候选蛋白时，建议选择IP组中iBAQ较高，且与研究方向相关的蛋白，如鉴定到的蛋白太多需要缩小选择范围，可以考虑优先选择实验组特有蛋白；

3、质谱在上机前会将蛋白酶解成肽段，而高丰度的肽段很可能会掩盖掉低丰度肽段的信号峰，因此质谱无法保证一定能鉴定到某一个或某一类蛋白；

4、由于对照组本身也是一段RNA，也可以富集到一些可以与之结合的其他RNA或蛋白，因此在质谱鉴定结果中有时会出现鉴定到的蛋白比实验组多，甚至丰度比实验组还高的情况，这是正常现象。

质谱鉴定

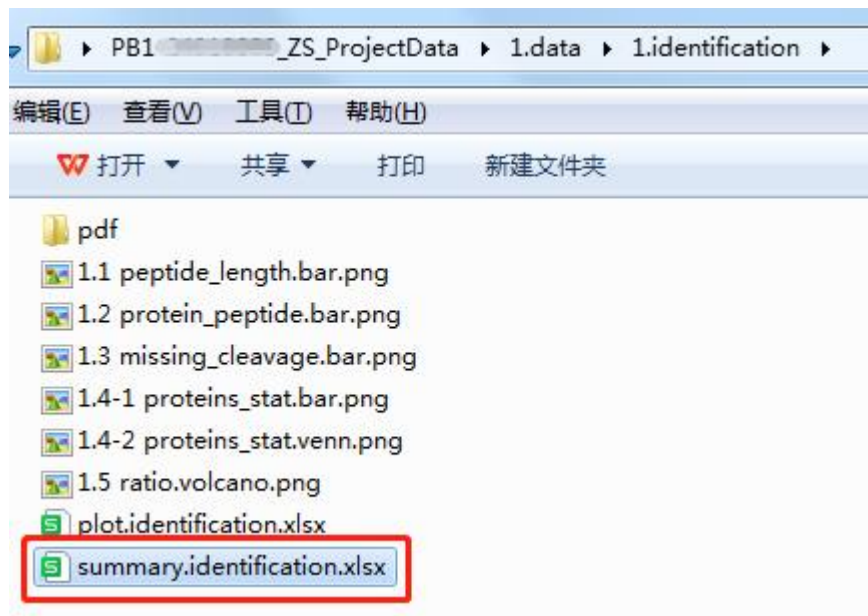


	A	B	C	D	E	F	
	Accession	Protein ID	Gene	Fasta description	Mw (kDa)	Length	Protein
3	P07814	SYEP_HUMAN	EPRS1	Bifunctional glutamyl-tRNA synthetase	170.591	1512	
4	P41252	SYIC_HUMAN	IARS1	Isoleucine--tRNA ligase	144.498	1262	
5	O95793	STAU1_HUMAN	STAU1	Double-stranded RNA-binding protein	63.182	577	Q9NUL3
6	P04843	RPN1_HUMAN	RPN1	Dolichyl-diphosphooligosaccharyl transferase	68.569	607	
7	Q12906	ILF3_HUMAN	ILF3	Interleukin enhancer factor 3	95.338	894	Q96SI9
8	Q86VP6	CAND1_HUMAN	CAND1	Cullin-associated NED5-like domain-containing protein 1	136.376	1230	
9	Q99623	PHB2_HUMAN	PHB2	Prohibitin-2 OS=Homo	33.296	299	
10	O75367	H2AY_HUMAN	MACROH2A1	Core histone macroH2A1	39.184	369	Q9POM6
11	P08238	HS90B_HUMAN	HSP90AA1	Heat shock protein 90 alpha class B member 1	83.264	724	P07900
12	P11388	TOP2A_HUMAN	TOP2A	DNA topoisomerase 2- α	174.385	1531	Q02880
13	P54652	HSP72_HUMAN	HSPA2	Heat shock-related 70 kDa protein	70.021	639	P11142
14	P55060	XPO2_HUMAN	CSE1L	Exportin-2 OS=Homo	110.417	971	

1、如图所示，我司质谱鉴定会将“对照组特有蛋白”、“实验组特有蛋白”、“共有蛋白”从data中挑出并单独制成表“蛋白分组及注释.xlsx”，包含蛋白功能注释、iBAQ等重点信息；

2、例图中“Unique.DZ”即对照组特有蛋白列表，“Unique.SY”即实验组特有蛋白列表，“common”即共有蛋白列表，实际sheet名称可能会根据项目不同有所变动。

质谱鉴定



表头信息如“Accession”等具体含义，总表中均有解释，文件路径如图所示，也可以百度一下，由于版面限制就不赘述了。



表单	条目	描述
help		各表单的表头解释
stat		本次项目的统计信息
	Sample	样品名
	Identified pr	鉴定到的蛋白数目
	Quantified p	定量到的蛋白数目
	Identified pe	鉴定到的肽段数目
	Quantified p	定量到的肽段数目
	Unique pept	“唯一匹配”的肽段数目
	Comparison	比较组编号
	Comparison	比较组名称
	Gx:Gy	分子组、分母组编号
	SampleX	分子组包含的样品
	SampleY	分母组包含的样品
	FC threshol	判定下调差异蛋白的比值边界
	FC threshol	判定上调差异蛋白的比值边界
	Log2 FC thr	下调边界对数转换后的值
	Log2 FC thr	上调边界对数转换后的值
	P value thre	比较组采用的T检验方式
	T test	比较组采用的T检验方式
	Down count	下调差异蛋白数目
	Up count	上调差异蛋白数目
	Total diff	所有差异蛋白数目
	No diff	非差异的蛋白数目
	NA	无法进行差异计算的蛋白数目
	Total	定量到的蛋白数目，等同于“Quantified proteins”
protein		蛋白结果
	Accession	蛋白条目的Uniprot数据库登记号
	Protein ID	蛋白条目的Uniprot数据库编号
	Gene	蛋白条目的基因名
	Fasta descr	蛋白序列数据库Fasta文件中对蛋白条目的描述信息

提供核酸和蛋白的整体研究方案

感谢聆听

提供核酸和蛋白的整体研究方案

