

此为临时链接，仅用于预览，将在短期内失效。

如何选择 RNA 修饰抗体的正确对照

abcam abcam 2018-11-15

请关注： [↑Abcam 助您尽快实现研究使命](#)



[小提示：建议收藏本文](#)

RNA修饰抗体当您使用RNA修饰抗体时，必须确保它们是特异性的 - 仅与正确的修饰结合。由于RNA修饰的性质，它们的化学结构通常非常相似。为了确保从抗体中获得最准确的结果，您需要在模式系统中彻底测试它们。RNA修饰抗体的对照可以使用一系列实验应用来完成。下文我们会介绍一些高级对照和技巧来使您的RNA修饰研究变得更为简单。

RNase 处理

不管您是在进行 ICC/IHC 或斑点印迹，在您的实验样品之外，还必须要有一组 RNase 处理的对照。使用 RNA 修饰抗体时，确认您所取得的并非来自 DNA 的非特定背景信号。例如，如果您在您的实验 IHC 样品中，看到一个清晰明亮的信号，但是在您 RNase 处理的对照样品中未获得信号时，您就可以确信您所获得的信号来自于 RNA，而不是来自于一个非特定来源的背景信号。这意味着抗体已识别出 RNA 而非 DNA 的修饰。

您可以迅速地在您一般的 RNA 修饰 IHC、RIP 或斑点印迹的实验方案中，增加一个 RNase 处理步骤。1.重要的是不要将样品留在RNase溶液中太长时间，因为这会导致DNA降解，这使得难以进行 DAPI等复染。对于每种不同的样品类型，您应该测试不同浓度的RNase，并尝试将样品留在不同的时间长度。例如，根据组织类型，IHC可能需要长达一小时的RNA酶时间，而ICC将需要更少的时间 - 尝试10-30分钟作为起点。

DNase 处理

除了 RNase 处理的对照之外，您应该进行 DNase 处理的对照。如果您担心您 RNA 修饰抗体会识别出 DNA 中类似的修饰时，进行此项检测的最佳方式是使用 DNase 来处理您的样品。许多修饰会同时出现在 RNA 及 DNA 中，所以这是一个常见的问题。例如，DNA 中的 5mC 和 DNA 中的 m5C 具有相同的化学修饰。

如果您使用 RNA 修饰抗体进行 IHC，最好将 DNase 处理的对照与实验样品一起进行。如果您从实验样品中获得一个清晰而强烈的信号，但是您的 DNase 处理的对照并无信号时，这意味着您的抗体已结合到 DNA 的修饰中。针对这个类型的对照，优化条件也相当重要。您的样品如果在 DNase 的处理中太久时，可能会造成 RNA 的退化，因此请确认要检测不同的 DNase 浓度及处理的时间长度。

竞争性检测

另一种确保您 RNA 修饰抗体的特异性方式是使用竞争性检测。竞争性检测使用包含寡核苷酸的合成修饰，这可使用您的抗体事先培养。2. 当您使用事先培养的抗体进行应用时，例如 ICC/IHC 或斑点印迹，在和只是使用抗体进行样品染色相比较时，您会看到获得的信号会减弱。您可以尝试将竞争性寡核苷酸加到您的浓度提高的抗体溶剂中。您看到信号的梯度递减反映了您添加到抗体中的竞争性寡核苷酸数量。例如，尝试梯度为 0 ng、10 ng、100 ng 及 1 μ g 竞争性寡核苷酸²。

斑点印迹

使用 RNA 修饰的抗体进行斑点印迹，是一种可以快速简便地检测其特异性的方式。斑点印迹的运作就如同是蛋白质印迹的简化版本。这个技术是将样品直接点到膜上，交联反应后进行印迹。如要了解更详细的内容请在此处参考我们的斑点印迹实验方案。如果您可取得包含目标修饰的合成 RNA 分子，这可以作为完美的阳性对照。2. 类似地，上样一个未经修饰的分子或一个包含不同修饰的分子可以，作为阴性对照，并可以帮助您测量任何非特异性结合或交叉反应性²。

对于您的实验样品，可以通过使用正确对照进行斑点印迹来测试您的 RNA 修饰抗体是否具有特异性。对于阴性对照，使用含有敲除 (KO) 的样品用于产生特定 RNA 修饰的酶，例如用于 m6A3 的 ALKBH5。如果将野生型和 KO 样品中的 RNA 加载到膜上进行斑点印迹，您应该看到两种样品之间存在明显差异。野生型样品将显示清晰的信号，当使用针对您感兴趣的 RNA 修饰的抗体染色膜时，KO 应显示为空白。

RIP-MS

如果您有进行液相色谱-质谱联用 (LC-MS/MS) ，那么这其实是检测 RNA 修饰抗体特异性的最佳方式。5.使用这个技术再搭配 RIP (RIP-MS) ，将使您得以确认您的抗体是否已结合到目标修饰，这也可以使您能够看到您的抗体是否和其它非特异性修饰结合。要了解更多关于 RIP 的信息，请在此处详参我们的RIP 实验方案。或详参我们的 miCLIP 实验方案，经过优化可和我们的 m6A 抗体一起使用6.

使用绝对或相对定量方法时，LC-MS/MS 可提供您来自于任何生物体及细胞类型的全部 RNA 中，所发现到的所有 RNA 修饰之并行量化。如果您生成 RIP 输入的 LC-MS/MS 数据及 pull-down 样品，相较于输出，您应该在 pull-down 样品中看到目标修饰的增加。您也可以使用这些相同的数据检测其它修饰，以观察您样品中是否有其它成份增加，以检测非特异性抗体的结合。现在已经有研发软件可以协助您进行此类分析7.

使用深获好评的抗体

许多模式系统中，大量 RNA 修饰的分布，例如 m6A 均有明确描述。如果您的目标修饰比较没有那么广为人知，那么您在许多应用中，可以使用例如 m6A 的修饰作为阳性对照。例如，您进行的是 RIP-qPCR，而您想要确认实验在技术上是成功的，在您的实验样品之外，就 m6A 您可以进行 RIP-qPCR，并选择之前显示含有 m6A 的转录组区域作为阳性对照区域。这将可帮助您在尝试新的修饰之前，确认您的缓冲液、其它试剂及方法，均可一切正常运作。

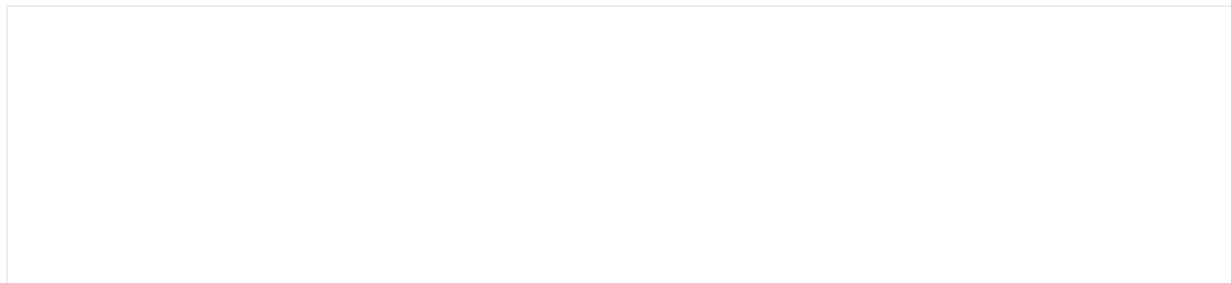
您可能感兴趣：

[大量RNA修饰新位点抗体上市](#)

[探索未知世界的钥匙：RNA修饰图谱](#)

[RNA 免疫沉淀 \(RIP\) 实验方案](#)

[“阅读原文”，查看全文](#)



[阅读原文](#)
此为临时链接，仅用于预览，将在短期内失效。