

改造核酶优化RNA的体外制备

复旦大学 程延 陈煜琛

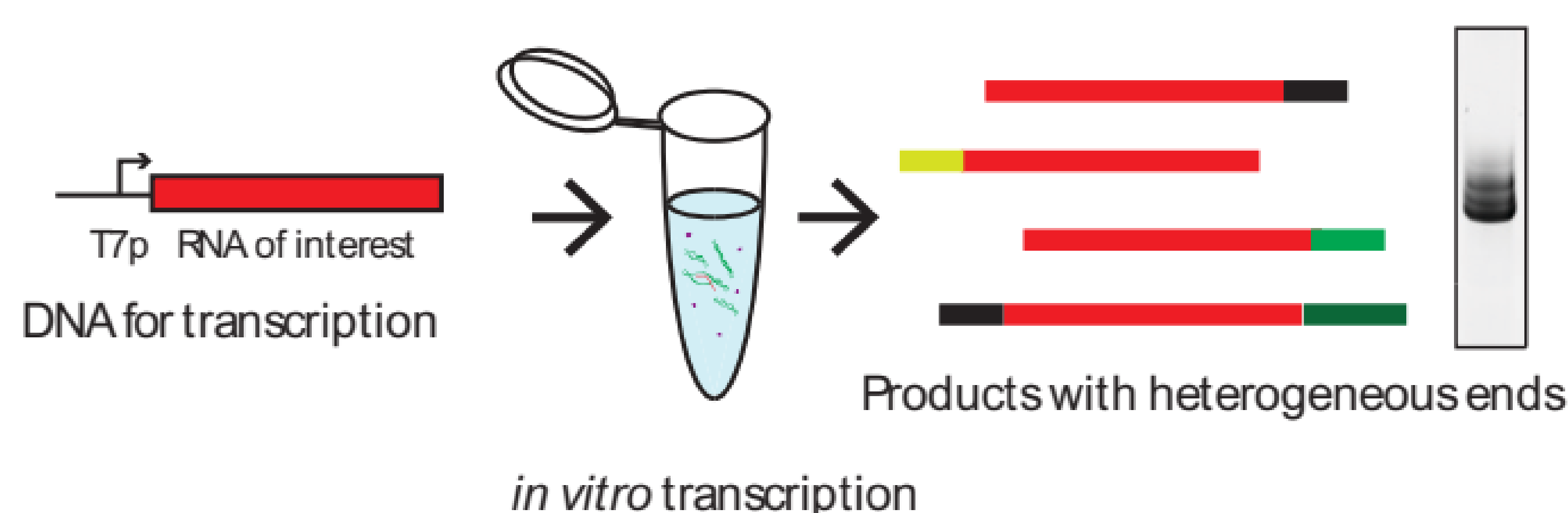
指导老师 林金钟

> 体外转录系统制备RNA

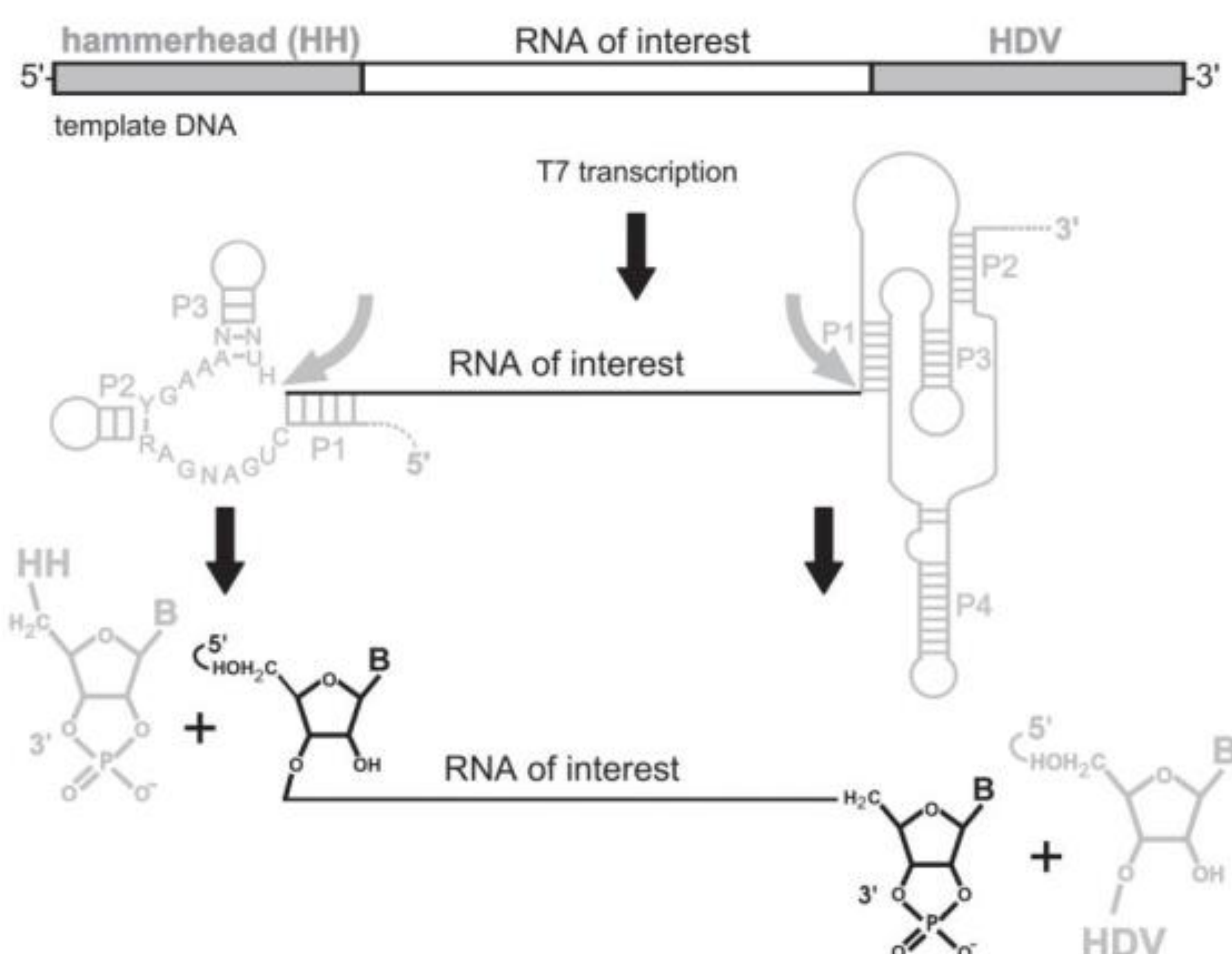
RNA体外制备是生物学研究领域一项非常重要的实验技术。在长片段、高产量、低成本的要求下，主要选择利用体外转录系统进行生物合成。体外转录系统即将转录所需原料AUCG，纯化的RNA聚合酶，转录模板DNA置于一定离子环境和温度下，于试管中直接发生RNA的生物合成。

> 末端异质性问题与现有解决方法

体外转录系统中RNA聚合酶（如T7 RNA聚合酶）会在RNA片段两端随机加入多余的序列，且难以仅通过大小分离，这在制备tRNA，RNA连接和晶体结构研究中是不容忽视的问题。

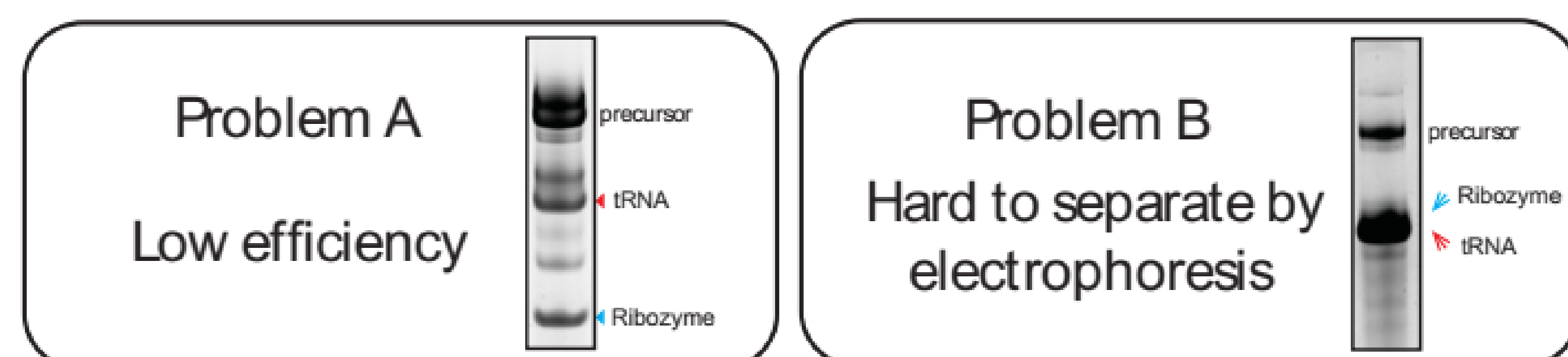


现有的常用解决方法之一是在目的RNA两端连接核酶hammerhead与HDV，合成后发生自我剪切从而得到末端一致的RNA产物。

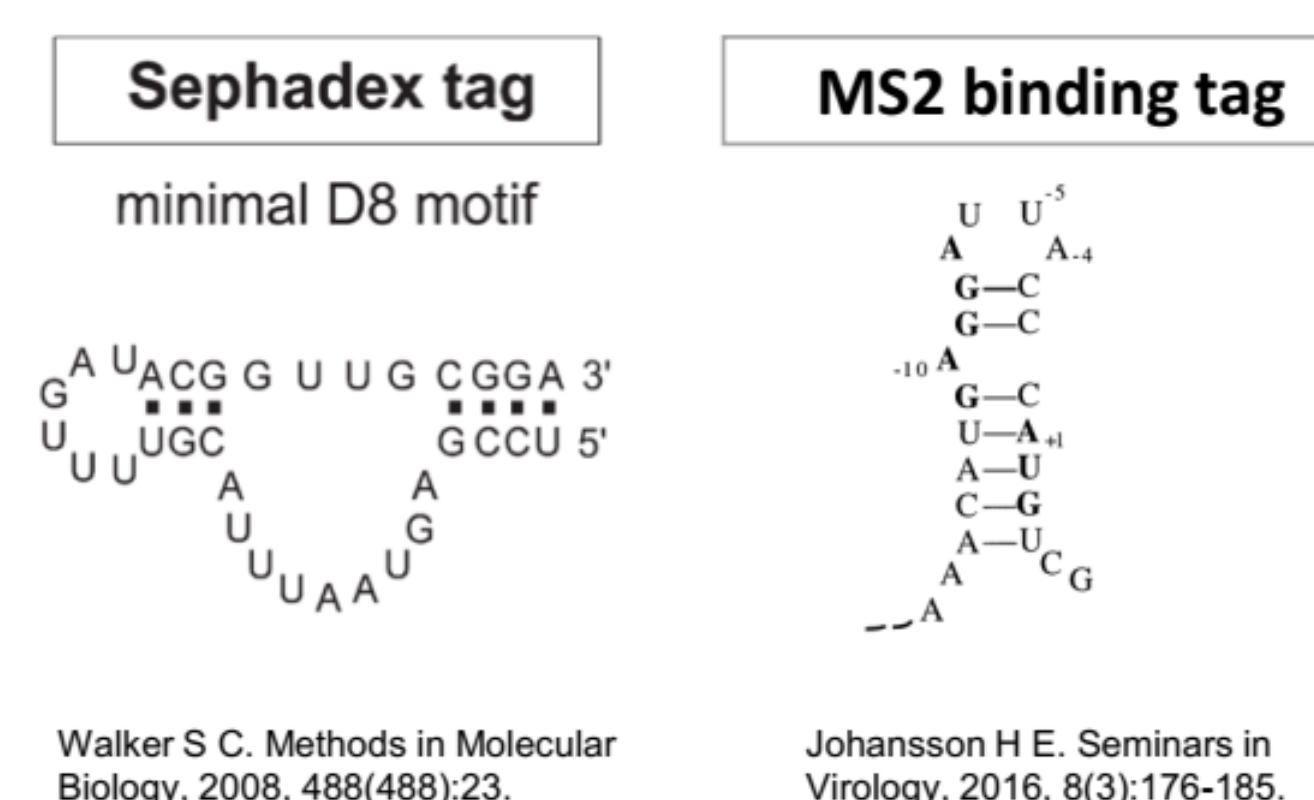
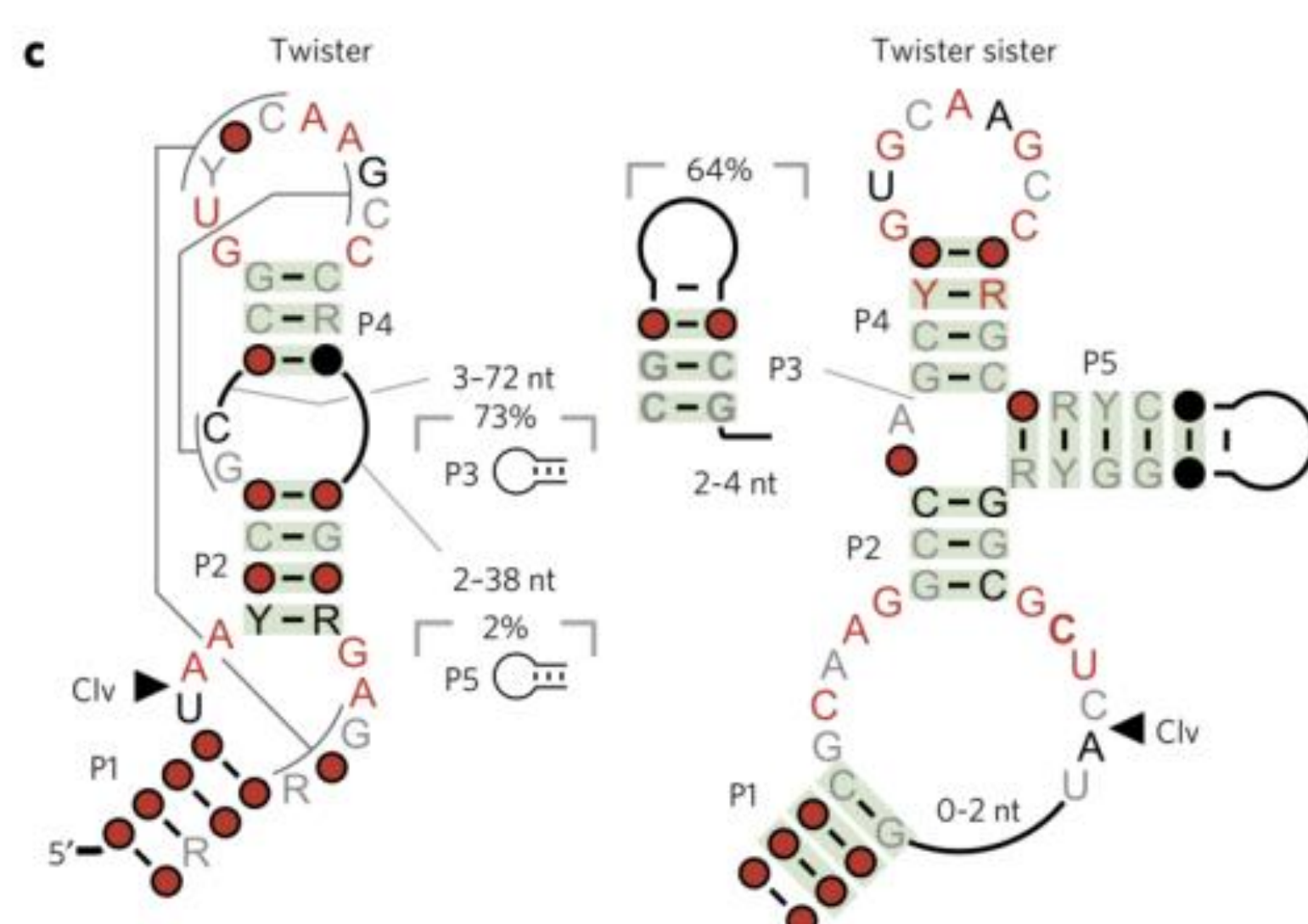


> 改造核酶优化RNA制备

核酶这一方法中有两个不容忽视的问题：核酶效率低，以及部分情况下无法用凝胶电泳分离目标片段。

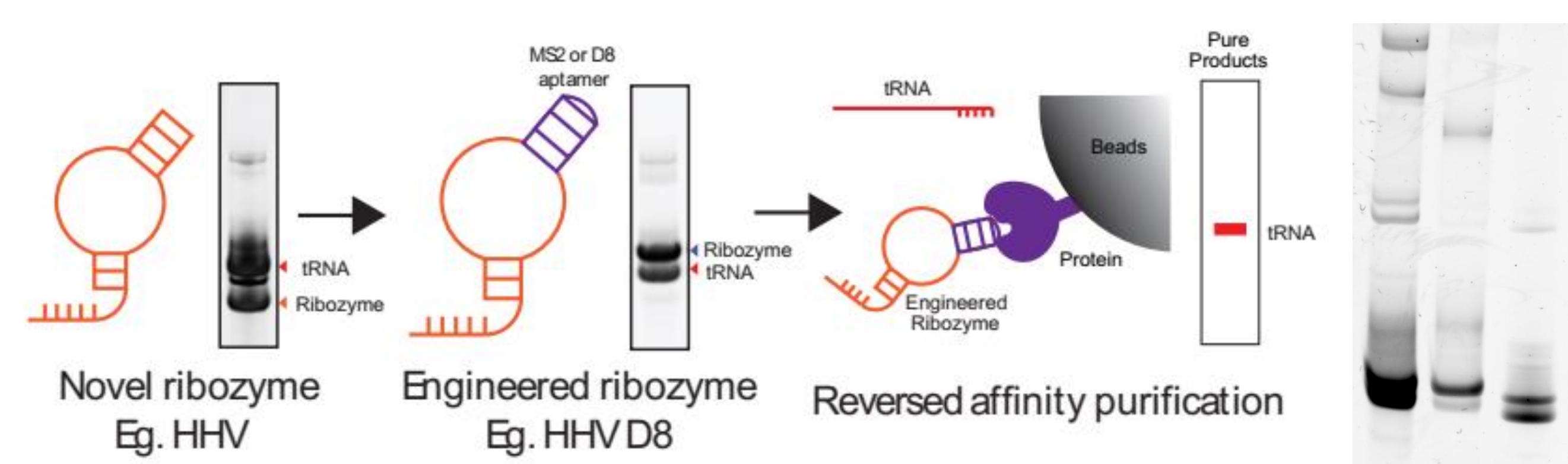


为解决效率的问题，近年，通过生物信息学的研究发现了具有高效自我剪切活性的新核酶，本课题对这些核酶进行大量效率检测，以筛选出更高效的核酶。



为解决纯化问题，本课题利用两种特殊的RNA motif改造核酶以达到反向亲和纯化的目的。

核心发现与讨论



最右边的图为MS2纯化结果。泳道1，总RNA；泳道2，孵育后流穿；泳道3，Beads上结合。

本课题通过大量体外筛选，找出切割效率达接近100%的新的可替代核酶。纯化实验中，MS2表现较多的非特异性结合，但是纯化效率可达到80%，而D8的亲和力则不够理想。纯化过程需要进一步优化，同时寻找其他的具有高亲和力和特异性的纯化策略。