

易于使用

值得信赖

专业权威

RNA 检测与可视化

研究方法 with 实验方案

RNA Detection and Visualization
Methods and Protocols

Jeffrey E. Gerst

实验室解决方案

RNA Detection and Visualization

Methods and Protocols

RNA 检测与可视化

研究方法与实验方案

Edited by

Jeffrey E. Gerst

Department of Molecular Genetics, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel

科学出版社

北 京

图字：01-2012-6962 号

This is an annotated version of

RNA Detection and Visualization: Methods and Protocols

Edited by Jeffrey E. Gerst.

Copyright © Humana Press, a part of Springer Science + Business Media, LLC 2011
ISBN: 978-1-61779-004-1

All rights reserved.

No part of this publication may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopy, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher.

This reprint has been authorized by Springer-Verlag (Berlin/Heidelberg/New York) for sale in the People's Republic of China only and not for export therefrom.

本版本由 Springer 出版公司（柏林/海德堡/纽约）授权，仅限在中华人民共和国境内销售，不得出口。

图书在版编目(CIP)数据

RNA 检测与可视化：研究方法与实验方案 = RNA Detection and Visualization: Methods and Protocols: 英文/ (以) 格斯特 (Gerst, J.) 主编. ——北京：科学出版社，2013. 1

(实验室解决方案)

ISBN 978-7-03-035926-1

I. ①R… II. ①格… III. ①核糖核酸—生物技术—研究—英文
IV. ①Q522

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 258826 号

责任编辑：李小汀 田慎鹏 / 责任印制：钱玉芬

封面设计：耕者设计工作室

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码：100717

<http://www.sciencep.com>

双青印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013 年 1 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

2013 年 1 月第一次印刷 印张：32 1/2

字数：770 000

定价：168.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

《RNA 检测与可视化》——第一本核酸可视化领域的参考书

南京大学著名生化教授郑集先生，在 1961 年生化专业入学本科生的见面会上，讲到他对生命科学发展历程的看法。他认为，几百年来，生物学从整体水平的研究，逐步转移到器官、组织、细胞水平的研究。到 20 世纪 60 年代，生物学的主流已进入了分子水平。当然随着分子水平研究的发展，生命科学研究又将会回到细胞水平、再到整体生物水平。这就是一种螺旋式的发展途径。在以后的半个世纪里，大量研究工作都是在试管中，在无细胞状态下进行。研究者知道 mRNA 可以被转录出来，但不知道转录出来的 mRNA 定位在哪个亚细胞部位。虽然有些时候，如结合核质分离等技术，可以粗略地了解 mRNA 等生物大分子大概分布在何处，但很难做到这些生物大分子的精确定位。因此，研究人员在赞美技术发展，使人们了解了很多生命活动过程中的分子变化时，不无遗憾地追忆早期在整体生物水平的生命研究时代，可以直接看到坏死的组织和器官，一切生命的变化都可直接呈现在研究者的视野里。即使在细胞水平研究时，人们还可以通过显微镜看到细胞内的变化。但是当研究进入分子水平时，我们不再能直接看到研究对象。于是开始有人研究生物大分子的可视化问题。随着 21 世纪的到来，生命研究开始从分子水平的研究向细胞水平，甚至向整体生物水平研究回归时，研究人员更迫切希望做到细胞内或整体生物内生物大分子的可视化。

20 世纪 60 年代，分子生物学、组织化学及细胞学相结合而产生了原位杂交技术（In situ hybridization, ISH）。它的基本原理是利用核酸分子间的碱基配对原理，将有放射性或非放射性的外源核酸（即探针）与组织、细胞或染色体上待测 RNA（或 DNA）配对成专一的核酸杂交分子。经一定的检测手段将待测核酸在组织、细胞或染色体上的位置显示出来。在原位杂交技术基础上，Bauman 于 1980 年通过使用荧光素标记探针，建立了荧光原位杂交（FISH）技术。这是最早的生物大分子可视化技术。此后，FISH 技术进一步发展成多色 FISH 多基因位点同时检测，从基因检测发展到基因组、染色体、活细胞中转录产物 mRNA 原位检测以及组织水平的核酸检测。并且在今后的研究中该技术还有可能应用到整个生物体的检测。

1962 年，日本下村修等人在一种水母中发现绿色荧光蛋白。绿色荧光蛋白的发光机理比荧光素的原理简单得多。荧光素发光需要荧光素酶，一种荧光素酶只能与相对应的一种荧光素合作发光，而绿色荧光蛋白却只需要用蓝光照射，就能自己发光。马丁·查尔菲于 1993 年通过基因重组的方法使水母以外的其他生物也能产生绿色荧光蛋白，建立了利用绿色荧光蛋白研究基因表达的方法。此后，美籍华人钱永健系统地研究了绿色荧光蛋白的工作原理。他还对其进行化学改造，增强了它的发光效率，发展出红色、蓝色、黄色的荧光蛋白。导入荧光蛋白的可视化技术得到了不断完善、配套，并成为生物领域研究中极其重要的技术。其应用的范围也得到了迅速扩大。瑞典皇家科学院曾将绿色荧光蛋白的发现和改造（如荧光可视化技术）与显微镜的发明相提并论。他们的研究大大推动了可视化技术的发展。2008 年下村修、马丁·查尔菲和钱永健三人，因为他们从事有关“绿色荧光蛋白质的发现，表达和发展”并取得重要成就，而获得诺贝尔化学奖。这是继 PCR 技

术后又一项生命科学技术获得了诺贝尔化学奖。而本书就是提供最新的、用于检测和 mRNA 可视化的基本方法和操作程序。它们可以用于从细菌到哺乳动物细胞的固定细胞和活细胞。

《RNA 检测与可视化》分六部分，共 28 章，各章概要如下：

第一部分 mRNA 的原位可视化

- 第 1 章 用 50 种互补于同种靶 mRNA 不同区段的相同荧光标记探针，与靶 mRNA 结合时，细胞成明显的荧光点。用不同颜色的荧光探针组对不同靶 mRNA，就可同时检测多种靶 mRNA。用自动图像处理程序，对细胞中各 mRNA 表达量分别进行计量，得到单细胞中各 mRNA 的表达谱。
- 第 2 章 介绍当荧光蛋白很难在待测细胞中表达时，用直接免疫染色技术进行的 FISH 技术。
- 第 3 章 组织特异性表达是特异细胞表型及功能的决定因素，也是多细胞生物发育平衡的决定性因素。该章提供了满足高分辨率要求的 FISH 技术。
- 第 4 章 轴的形成和组织分化，源于卵内母系 mRNA 定位与翻译，发育分叉的结果。用膜与大分子复合物标记技术及高灵敏度、高分辨率的 FISH 技术联用，研究母系 mRNA 定位并锚定于海鞘卵和晶胚中的皮层结构。
- 第 5 章 用体内 mRNA 可视化技术（荧光标记 mRNA 转录物、显微注射爪蟾卵、共聚焦显微镜成像技术）研究爪蟾卵中 mRNA 的转运机制。
- 第 6 章 检测基因的时空表达谱是理解基因功能的关键途径。提供一种可靠的同时检测斑马鱼胚胎中 mRNA 和蛋白质表达的方法。
- 第 7 章 特殊 mRNA 定位于树突和/或轴突，使特定蛋白富集于功能位点，并影响神经的发育、可塑性和修复。用地高辛或荧光素标记的寡核苷酸测定在神经元树突等部位的 mRNA；或用地高辛标记的 RNA 探针、再用酪胺放大体内定位于树突的低丰度 mRNA，两种方法均可使 mRNA 可视化，并可定量检测因各种刺激而产生的定位变化。
- 第 8 章 介绍一种脊椎动物轴突中 mRNA 的原位杂交技术，以及含皮层 RNA 结构域的结构与分子计算机保存的指导原则。

第二部分 用分子探针或重组荧光蛋白进行活体 mRNA 的可视化

- 第 9 章 用于体内 mRNA 检测的小分子探针：用两种计算程序（mfold 和 RNAstructure）选择作为分子探针结合的短的高丰度靶区。探针再次设计成小发夹，并以 2'-O-甲基 RNA/LNA（锁核酸）的嵌合形式合成探针。这些探针必须在细胞环境中稳定，并且与靶 RNA 有高亲和性。使用合适的合成程序、与多种荧光素交联的探针，可以检测到低丰度、高结构的 RNA，以及小 RNA。
- 第 10 章 过去的十年间，大量寡核苷酸探针已成功进入活细胞，直接使 RNA 可视化。这些方法学已被广泛用于活细胞中 RNA 表达和定位、癌细胞的检测、病毒感染研究等。
- 第 11 章 发展了基于荧光蛋白的 RNA 探针，将其用于活的单细胞中 mRNA 的定位检测和动力学研究。
- 第 12 章 介绍可以在大肠杆菌中调控 RNA 合成和可视化的系统。标记的 RNA 与小蛋白

结合后发出荧光。

第三部分 使用适体和完整的荧光蛋白进行活体 mRNA 的可视化

- 第 13 章 在固定细胞中，可以用靶向特异转录物的荧光探针进行 FISH，来确定 mRNA 的位置。可用双向系统检测 mRNA 在活细胞中的动力学变化。
- 第 14 章 mRNA 的转运造成细胞及器官中蛋白质的不均匀分布。介绍了能检测 RNA 在细胞中运动的一种基于 U1A 的标签 RNA 系统。
- 第 15 章 介绍一种简单的用于 mRNA 定位的方法。用同源重组在任何酵母基因的编码区与 3'UTR 区间，插入 MS2-CP 与 GFP 共表达片段。此时，内源表达的 mRNA 可在第一时间被可视化。
- 第 16 章 描述了在哺乳类细胞中实时监控 mRNA 动力学而建立活细胞系统所需要的方法学。
- 第 17 章 介绍一种用 mRNA-MS2/MS2CP-FP 系统研究果蝇卵子发生期的 mRNA 转运技术。

第四部分 使用细胞分选来证明 RNA 的亚细胞定位

- 第 18 章 提供了用于研究真核细胞生物学的两种独立方法：分离多核糖体及内胞质网结合的多核糖体的方法。描述了从酵母中分离线粒体和 RNA 纯化的程序、标记程序和 DNA 芯片杂交程序。
- 第 19 章 提供了用于研究真核细胞生物学的两种独立方法：分离多核糖体及内胞质网结合的多核糖体的方法。
- 第 20 章 用密度梯度离心与亲和纯化联用的技术获得高度富集过氧化酶的组分，可用于结合在此组分上的，可进行 RT-PCR 的 mRNA。
- 第 21 章 提供了可满足轴突 mRNA 含量分析的，从成年背根神经元中分离轴突的一种方法。
- 第 22 章 用多孔聚碳酸酯滤膜分离转移性肿瘤细胞的假足，以满足纯化，鉴定这些亚细胞部分中的 RNA 和蛋白。

第五部分 mRNA 的亲纯化及反式因子的鉴定

- 第 23 章 用特殊抗体纯化内源 RNA 结合蛋白-mRNA 复合物，与 DNA 芯片鉴定复合物中的 RNA 的技术合成（即 RIP-Chip 技术），鉴定被 RNP-马达转运到特定亚细胞区域的 mRNA。
- 第 24 章 介绍一种简单有效的 RNA 纯化鉴定方法（RaPID）。它可用于酵母和哺乳动物细胞中纯化特殊感兴趣的 mRNA，然后分别用质谱和 RT-PCR 分析结合蛋白和 mRNA。
- 第 25 章 一种用特殊抗体捕获 RNA 结合蛋白上的 mRNA 的技术。
- 第 26 章 结合链霉素的 RNA 适体进行 RNA 及 RNA-蛋白复合物的纯化和定位研究。

第六部分 使用生物信息学鉴定 RNA 中的顺式作用模块和结构

- 第 27 章 介绍一种预测 RNA 二级结构、鉴定定位信号和全基因组范围搜寻类似定位信号的计算机方法。
- 第 28 章 介绍可预测涉及转录后调控过程的 RNA 结构模块的计算机程序 RNApromo。

从整体角度看，本书有如下特点：

- I. 前沿性。本书囊括了至今可视化技术的方方面面，以及各种生物大分子可视化技术的操作程序。它是 RNA 检测与可视化领域第一本最完整的研究工具书、实验手册。
- II. 易读性。每章开头，有摘要提出要点，有导言简述与该章内容有关的背景知识。每章后面提供了必要的参考文献，以帮助读者进行扩展性阅读。
- III. 实用性。本书是一本实验方法及操作程序手册。它很适合于研究人员照章进行 RNA 可视化实验。

本书是一本 RNA 可视化领域的优秀参考书。合适的读者群包括对 RNA 可视化感兴趣的生命科学各学科（特别是生物化学、分子生物学、化学生物学领域）、医学和药学领域的在校大学生、研究生、博士后、初、中、高各级教辅人员，以及上述领域中正在从事科研工作的初、中、高各级研究人员。

金由辛 中科院上海生科院生化与细胞研究所

上海大学生科院

金 言 中科院深圳先进技术研究院医药所抗体中心

前 言

在所有生物分子中，RNA 也许是最复杂的，且受到最广泛的调控。从它在被控制的情况下转录出来开始，各种 RNA 都经历了加工、出核膜、移位、细胞内定位、翻译、储存、沉默，直到最后被降解的过程。全过程中都有互作蛋白、其他 RNA 分子参与其间。尽管大部分 RNA 的生命周期实际上处于细胞质内，但还需要工具使它们处于原位或者定位于活体内（后者更适宜）进行可视化。此外，我们还需要从细胞中纯化出 RNA，及鉴定结合蛋白和互作 RNA。最后，还需要生物信息学工具挖掘与 RNA 定位有关的序列和结构模块。当联合使用上述方法，研究者就能探究一系列问题，如 RNA 定位在哪里以及如何定位在那里，定位是否适合于翻译调控、蛋白定位和复合物的装配，以及 RNA 的稳定性等。

本书的目的在于提供最新的、用于检测和 mRNA 可视化的基本方法和操作程序，它们可以用于从细菌到哺乳动物细胞的固定细胞和活细胞，这本书既是为新手写的，也是为专家写的。它涵盖了经典的原位杂交和先进的活体成像技术、细胞分选和亲和纯化的操作程序，以及生物信息学工具，从而为研究者提供了最完整的、最大规模的研究工具。本书由 28 章组成，分为 6 个部分：1. mRNA 的原位可视化；2. 用分子探针或重组荧光蛋白进行活体 mRNA 的可视化；3. 使用适体和完整的荧光蛋白进行活体 mRNA 的可视化；4. 使用细胞分选来证明 RNA 的亚细胞定位；5. mRNA 的亲和纯化及反式因子的鉴定；6. 使用生物信息学鉴定 RNA 中的顺式作用模块和结构。本书的撰稿人是一些优秀的研究者，有的已经成名，有的还非常年轻。他们在 RNA 定位研究或 RNA 定位在生物加工过程中的重要性方面，已作出有影响的工作。最后，我衷心感谢本书的撰稿人，他们努力使这本书成为唯一一本汇集 RNA 检测方法和实验方案的手册，为其他研究者提供帮助。

Rehovot, Israel

Jeffrey E. Gerst

（金由辛 金 言 译）

Preface

Of all biological molecules, RNA has perhaps the most complex and extensively regulated metabolism. Beginning with control at the transcriptional level, RNAs undergo nuclear processing, export, transport and localization, translation, storage, silencing and, ultimately, decay, all of which are mediated by cohorts of interacting proteins and additional RNA molecules. However, as most of the RNA life cycle actually occurs within the cytoplasm, it is imperative to have tools that allow for the localization of RNAs to be observed either in an *in situ* setting or, preferably, under *in vivo* conditions. In addition, there is a requisite need for tools that allow for both RNA purification from cells and the identification of bound interacting proteins and accessory RNAs. Finally, bioinformatic tools are requisite for mining the sequence and structural motifs necessary for RNAs to localize. When used in combination, these approaches can allow researchers to ask complex questions regarding where and how RNAs localize, and whether localization pertains to translational control, protein localization and complex assembly, and RNA stability.

The aim of this volume is to provide an up-to-date and in-depth description of basic methods and protocols used for detecting and visualizing mRNAs in both fixed and live cells, from bacteria to mammals. Written for novices and experts alike, this mix of classic *in situ* hybridization and advanced live imaging techniques, cell fractionation and affinity purification procedures, and bioinformatic tools is to give researchers the most complete and extensive array of research aids possible. This volume is composed of twenty eight chapters separated into six subject areas: (1) Visualizing mRNAs *in situ*; (2) Visualizing mRNAs *in vivo* using molecular probes or reconstituted fluorescent proteins; (3) Visualizing mRNAs *in vivo* using aptamers and intact fluorescent proteins; (4) Use of cell fractionation to demonstrate the subcellular localization of RNA; (5) Affinity purification of mRNAs and the identification of *trans*-acting factors; and (6) Use of bioinformatics to identify *cis*-acting motifs and structures in RNAs. Chapters have been contributed by some of the best and brightest investigators, established or young, that have made an impact in the study of RNA localization and its importance in biological processes. Finally, I offer my sincere gratitude to the authors who have endeavored to make this book a unique and extensive collection of useful RNA detection methods and protocols for the benefit of other researchers.

Rehovot, Israel

Jeffrey E. Gerst

Contributors

- YOAV ARAVA • *Technion – Israel Institute of Technology, Haifa, Israel*
- GANG BAO • *Department of Biomedical Engineering, Georgia Institute of Technology and Emory University, Atlanta, GA, USA*
- GARY J. BASSELL • *Departments of Cell Biology and Neurology, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA, USA*
- MONA BATISH • *Public Health Research Institute Center, New Jersey Medical School, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Newark, NJ, USA*
- KATSIARYNA BELAYA • *The Gurdon Institute, University of Cambridge, Cambridge, UK*
- AZRA BOROGOVAC • *Department of Biomedical Engineering, Center for Advanced Biotechnology, College of Engineering, Boston University, Boston, MA, USA*
- DIANA P. BRATU • *Biological Sciences Department, Hunter College, City University of New York, New York, NY, USA*
- CECILE BROCARD • *Max F. Perutz Laboratories, University of Vienna, Vienna, Austria*
- NATALIA E. BROUDE • *Department of Biomedical Engineering, Center for Advanced Biotechnology, College of Engineering, Boston University, Boston, MA, USA*
- ALDO CALLIARI • *Department of Proteins and Nucleic Acids, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Av. Italia 3318, CP 11600, Montevideo, Uruguay; Biophysics Area, School of Veterinary Sciences, UdelaR, Lasplaces 1550, Montevideo, Uruguay*
- LUCÍA CANCLINI • *Department of Proteins and Nucleic Acids, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Av. Italia 3318, CP 11600, Montevideo, Uruguay*
- IRINA E. CATRINA • *Biological Sciences Department, Hunter College, City University of New York, New York, NY, USA*
- PASCAL CHARTRAND • *Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada*
- ANTONY K. CHEN • *Department of Bioengineering, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA*
- JANET CHENEVERT • *Observatoire Océanologique, UPMC University of Paris 06, CNRS, UMR7009, Villefranche-sur-mer, France*
- SUNGLAN CHUNG • *Department of Cell Biology, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA*
- DANIEL COLÓN-RAMOS • *Yale Program in Cellular Neuroscience, Neurodegeneration and Repair, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA*
- SALVATORE CURRENTI • *College of Nanoscale Science and Engineering, Nanobioscience Constellation, University at Albany-SUNY, Albany, NY, USA*
- ILAN DAVIS • *Department of Biochemistry, University of Oxford, Oxford, UK*
- FRANCIS DOYLE • *College of Nanoscale Science and Engineering, Nanobioscience Constellation, University at Albany-SUNY, Albany, NY, USA*

- EREZ ELIYAHU • *Technion – Israel Institute of Technology, Haifa, Israel*
- VICTORIA ELIZONDO • *Department of Proteins and Nucleic Acids, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Av. Italia 3318, CP 11600, Montevideo, Uruguay*
- DAVID R. ENGELKE • *Department of Biological Chemistry, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA*
- JAMES A. GAGNON • *Department of Molecular Biology, Cell Biology and Biochemistry, Brown University, Providence, RI, USA*
- ALESSIA GALGANO • *Department of Chemistry and Applied Biosciences, Institute of Pharmaceutical Sciences, ETH Zurich, Zurich, Switzerland*
- FRANCK GALLARDO • *Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada*
- ANDRÉ P. GERBER • *Department of Chemistry and Applied Biosciences, Institute of Pharmaceutical Sciences, ETH Zurich, Zurich, Switzerland*
- JEFFREY E. GERST • *Department of Molecular Genetics, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel*
- THERESA A. GIPSON • *Department of Biological Chemistry, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA*
- PAUL D. GOOD • *Department of Biological Chemistry, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA*
- CHRISTINA GROSS • *Department of Cell Biology, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA, USA*
- LIORA HAIM-VILMOVSKY • *Department of Molecular Genetics, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel*
- RUSSELL S. HAMILTON • *Department of Biochemistry, University of Oxford, Oxford, UK*
- SUJATHA JAGANNATHAN • *Department of Cell Biology, Duke University Medical Center, Durham, NC, USA*
- SABARINATH JAYASEELAN • *College of Nanoscale Science and Engineering, Nanobioscience Constellation, University at Albany-SUNY, Albany, NY, USA*
- MICHAEL KERTESZ • *Department of Computer Science and Applied Mathematics, Weizmann Institute of Science, Rehoboth, Israel*
- ALEJANDRA KUN • *Department of Proteins and Nucleic Acids, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Av. Italia 3318, CP 11600, Montevideo, Uruguay; Department of Cell and Molecular Biology, School of Sciences, Universidad de la República (UdelaR), Igua 4225, Montevideo, Uruguay*
- ERIC LÉCUYER • *Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Ouest Montréal, QC, Canada*
- GIL LEVKOWITZ • *Department of Molecular Cell Biology, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel*
- YOSSY MACHLUF • *Department of Molecular Cell Biology, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel*
- SALVATORE A.E. MARRAS • *Department of Microbiology and Molecular Genetics, Public Health Research Institute, New Jersey Medical School, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Newark, NJ, USA*
- DANIEL MELAMED • *Faculty of Biology, Technion – Israel Institute of Technology, Haifa, Israel*

- KIMBERLY L. MOWRY • *Department of Molecular Biology, Cell Biology and Biochemistry, Brown University, Providence, RI, USA*
- IVAN R. NABI • *Department of Cellular and Physiological Sciences, Life Sciences Institute, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada*
- CHRISTOPHER V. NICCHITTA • *Department of Cell Biology, Duke University Medical Center, Durham, NC, USA*
- CHRISTINE NWOSU • *Department of Cell Biology, Duke University Medical Center, Durham, NC, USA*
- TAKEAKI OZAWA • *Department of Chemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; Japan Science and Technology Agency, Saitama, Japan*
- ALEXANDRE PAIX • *Observatoire Océanologique, UPMC University of Paris 06, CNRS, UMR7009, Villefranche-sur-mer, France; University of Nice Sophia-Antipolis, Nice, France*
- MICHAL RABANI • *Department of Computer Science and Applied Mathematics, Weizmann Institute of Science, Rehoboth, Israel*
- ARJUN RAJ • *Department of Bioengineering, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA*
- WON JONG RHEE • *Department of Biomedical Engineering, Georgia Institute of Technology and Emory University, Atlanta, GA, USA*
- CHRISTIAN SARDET • *Observatoire Océanologique, UPMC University of Paris 06, CNRS, UMR7009 Villefranche-sur-mer, France*
- ERAN SEGAL • *Department of Computer Science and Applied Mathematics, Weizmann Institute of Science, Rehoboth, Israel*
- JAY SHANKAR • *Department of Cellular and Physiological Sciences, Life Sciences Institute, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada*
- YARON SHAV-TAL • *The Mina and Everard Goodman Faculty of Life Sciences and Institute of Nanotechnology, Bar-Ilan University, Ramat Gan, Israel*
- BORIS SLOBODIN • *Department of Molecular Genetics, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel*
- JOSÉ ROBERTO SOTELO • *Department of Proteins and Nucleic Acids, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Av. Italia 3318, CP 11600, Montevideo, Uruguay*
- JOSÉ ROBERTO SOTELO-SILVEIRA • *Department of Proteins and Nucleic Acids, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Av. Italia 3318, CP 11600, Montevideo, Uruguay; Department of Cell and Molecular Biology, School of Sciences. Universidad de la República (UdelaR), Igua 4225, Montevideo, Uruguay*
- DANIEL ST JOHNSTON • *The Gurdon Institute, University of Cambridge, Cambridge, UK*
- SHARON A. SWANGER • *Department of Cell Biology, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA, USA*
- PETER A. TAKIZAWA • *Department of Cell Biology, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA*
- SCOTT A. TENENBAUM • *Department of Nanobioscience, University at Albany, Albany, NY, USA*

ANDREW TSOURKAS • *Department of Bioengineering, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA*

JEFFERY L. TWISS • *Department of Biology, Drexel University, Philadelphia, PA, USA*

SANJAY TYAGI • *Public Health Research Institute Center, New Jersey Medical School, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Newark, NJ, USA*

YOSHIO UMEZAWA • *Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Musashino University, Tokyo, Japan*

JAMES UNIACKE • *Biology Department, Concordia University, Montreal, QC, Canada*

SCOTT C. WALKER • *Department of Biological Chemistry, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA*

DIANNA E. WILLIS • *Burke-Cornell Medical Research Institute, White Plains, NY, USA*

SHARON YUNGER • *The Mina and Everard Goodman Faculty of Life Sciences and Institute of Nanotechnology, Bar-Ilan University, Ramat Gan, Israel*

WILLIAM ZERGES • *Biology Department, Concordia University, Montreal, QC, Canada*

GADI ZIPOR • *Department of Molecular Genetics, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel*

目 录

前言	v
撰稿人	xi

第一部分 mRNA 的原位可视化

1. RNA 原位单分子成像	3
2. FISH 和衣滴虫的免疫荧光染色	15
3. 果蝇原位杂交中的高荧光分辨率	31
4. 原位杂交检测母系 mRNA 定位并锚定于海鞘卵和晶胚中的皮层结构	49
5. 爪蟾卵中 mRNA 定位的可视化	71
6. 斑马鱼胚胎中 mRNA 表达的可视化	83
7. 原位杂交检测失活和活体内神经元间隔中 mRNA 的高分辨率荧光	103
8. 脊椎动物轴突中 mRNA 的原位杂交定位	125

第二部分 用分子探针或重组荧光蛋白进行活体 mRNA 的可视化

9. 微分子信标用于活体内 mRNA 的检测	141
10. 活细胞成像和 RNA 分析中分子信标的导入	159
11. 用于活细胞中内源 mRNA 成像的遗传编码的荧光探针	175
12. 单个细菌细胞中诱导 RNA 的可视化	189

第三部分 使用适体和完整的荧光蛋白进行活体 mRNA 的可视化

13. 固定的和活酵母细胞中 mRNA 的可视化	203
14. 使用 UIA-标记 RNA 体系在活体内进行 RNA 的可视化	221
15. 使用 m-TAG (基于 PCR 的 RNA 适体融合) 和荧光显微成像标记 RNA 系统进行 活酵母内源 mRNA 的可视化	237
16. 哺乳类活细胞中 mRNA 的成像技术	249
17. 使用 mRNA-MS2/MS2CP-FP 系统研究果蝇卵子发生过程中 mRNA 的转运	265

第四部分 使用细胞分选来证明 RNA 的亚细胞定位

18. 基因组范围内分析从分离的线粒体中萃取的 RNA	287
19. 通过细胞分选分析定位于内质网膜的 mRNA	301
20. 用细胞分选和亲和纯化联合程序分离编码过氧化物酶 Peroxisomal 蛋白的 mRNA	323
21. 轴突 mRNA 转运的表达谱	335
22. 用多孔聚碳酸酯滤膜从肿瘤细胞中纯化 RNA	353

第五部分 mRNA 的亲纯化及反式因子的鉴定

23. RNA 结合蛋白免疫纯化-微阵列 (RIP-Chip) 分析定位 RNA 的表达谱.....	369
24. RaPID: 为了鉴定存在于核糖核蛋白复合物中的 RNA 和蛋白因子的一种基于适体 mRNA 的亲纯化技术	387
25. RIP: 一种 mRNA 的定位技术	407
26. RNA 与 RNA-蛋白复合物的亲纯化与定位研究中的 RNA 适体二重 (dual) 使用	423

第六部分 使用生物信息学鉴定 RNA 中的顺式作用模块和结构

27. 保守 RNA 定位信号的鉴定与搜寻	447
28. 计算机预测涉及转录后调控过程的 RNA 结构模块	467
索引	481

(金由辛 金 言 译)

Contents

<i>Preface</i>	v
<i>Contributors</i>	xi

PART I VISUALIZING mRNAs IN SITU

1 Single Molecule Imaging of RNA In Situ	3
<i>Mona Batish, Arjun Raj, and Sanjay Tyagi</i>	
2 FISH and Immunofluorescence Staining in <i>Chlamydomonas</i>	15
<i>James Uniacke, Daniel Colón-Ramos, and William Zerges</i>	
3 High Resolution Fluorescent In Situ Hybridization in <i>Drosophila</i>	31
<i>Eric Lécuyer</i>	
4 Localization and Anchorage of Maternal mRNAs to Cortical Structures of Ascidian Eggs and Embryos Using High Resolution In Situ Hybridization	49
<i>Alexandre Paix, Janet Chenevert, and Christian Sardet</i>	
5 Visualization of mRNA Localization in <i>Xenopus</i> Oocytes	71
<i>James A. Gagnon and Kimberly L. Mowry</i>	
6 Visualization of mRNA Expression in the Zebrafish Embryo.	83
<i>Yossy Machluf and Gil Levkowitz</i>	
7 High-Resolution Fluorescence In Situ Hybridization to Detect mRNAs in Neuronal Compartments In Vitro and In Vivo	103
<i>Sharon A. Swanger, Gary J. Bassell, and Christina Gross</i>	
8 Localization of mRNA in Vertebrate Axonal Compartments by In Situ Hybridization	125
<i>José Roberto Sotelo-Silveira, Aldo Calliari, Alejandra Kun, Victoria Elizondo, Lucía Canclini, and José Roberto Sotelo</i>	

PART II VISUALIZING mRNAs IN VIVO USING MOLECULAR PROBES OR RECONSTITUTED FLUORESCENT PROTEINS

9 Tiny Molecular Beacons for <i>in vivo</i> mRNA Detection	141
<i>Diana P. Bratu, Irina E. Catrina, and Salvatore A.E. Marras</i>	
10 Delivery of Molecular Beacons for Live-Cell Imaging and Analysis of RNA	159
<i>Antony K. Chen, Won Jong Rhee, Gang Bao, and Andrew Tsourkas</i>	
11 Genetically-Encoded Fluorescent Probes for Imaging Endogenous mRNA in Living Cells	175
<i>Takeaki Ozawa and Yoshio Umezawa</i>	
12 Visualization of Induced RNA in Single Bacterial Cells	189
<i>Azra Borogovac and Natalia E. Broude</i>	

PART III VISUALIZING mRNAs IN VIVO USING APTAMERS AND INTACT FLUORESCENT PROTEINS

- 13 Visualizing mRNAs in Fixed and Living Yeast Cells 203
Franck Gallardo and Pascal Chartrand
- 14 In Vivo Visualization of RNA Using the U1A-Based Tagged RNA System 221
Sunglan Chung and Peter A. Takizawa
- 15 Visualizing Endogenous mRNAs in Living Yeast Using m-TAG, a PCR-Based RNA Aptamer Integration Method, and Fluorescence Microscopy 237
Liora Haim-Vilmovsky and Jeffrey E. Gerst
- 16 Imaging mRNAs in Living Mammalian Cells 249
Sharon Yunger and Yaron Shav-Tal
- 17 Using the mRNA-MS2/MS2CP-FP System to Study mRNA Transport During *Drosophila* Oogenesis 265
Katsiaryna Belaya and Daniel St Johnston

PART IV USE OF CELL FRACTIONATION TO DEMONSTRATE THE SUB-CELLULAR LOCALIZATION OF RNA

- 18 Genome-Wide Analysis of RNA Extracted from Isolated Mitochondria 287
Erez Eliyahu, Daniel Melamed, and Yoav Arava
- 19 Analyzing mRNA Localization to the Endoplasmic Reticulum via Cell Fractionation 301
Sujatha Jagannathan, Christine Nwosu, and Christopher V. Nicchitta
- 20 Isolation of mRNAs Encoding Peroxisomal Proteins from Yeast Using a Combined Cell Fractionation and Affinity Purification Procedure 323
Gadi Zipor, Cecile Brocard, and Jeffrey E. Gerst
- 21 Profiling Axonal mRNA Transport 335
Dianna E. Willis and Jeffery L. Twiss
- 22 RNA Purification from Tumor Cell Protrusions Using Porous Polycarbonate Filters 353
Jay Shankar and Ivan R. Nabi

PART V AFFINITY PURIFICATION OF mRNAs AND THE IDENTIFICATION OF TRANS-ACTING FACTORS

- 23 RNA-Binding Protein Immunopurification-Microarray (RIP-Chip) Analysis to Profile Localized RNAs 369
Alessia Galgano and André P. Gerber
- 24 RaPID: An Aptamer-Based mRNA Affinity Purification Technique for the Identification of RNA and Protein Factors Present in Ribonucleoprotein Complexes 387
Boris Slobodin and Jeffrey E. Gerst
- 25 RIP: An mRNA Localization Technique 407
Sabarinath Jayaseelan, Francis Doyle, Salvatore Currenti, and Scott A. Tenenbaum