

Dot Blot 实验报告

闫皓铭

2300017744

2025 年 2 月 21 日

1 实验目的

本实验旨在通过 Dot Blot 技术，利用 BP 探针 (BP Probe) 和 BA 探针 (BA Probe) 对 RNA 进行标记，并比较其效果。通过使用这两种不同的探针，评估其在标记 RNA 分子中的灵敏度以及与空白对照组的差异。通过实验，我们将可以了解 BP 探针和 BA 探针在 RNA 标记中的应用表现。

2 实验原理

2.1 APEX2 酶标记 RNA

利用 APEX2 催化过氧化氢 H_2O_2 与探针 (Biotin-phenol and Biotin-aniline) 反应，生成高度反应性的自由基，这些自由基可以与周围的 RNA 分子进行共价结合。两种探针的结构式如图 1 所示 [2]。

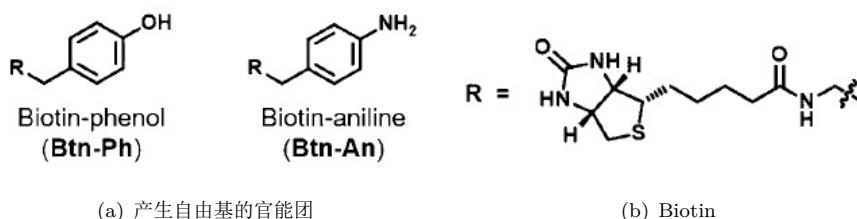


图 1: 探针结构 [2]

后续的显色过程借助了 SA-HRP 蛋白。这是 Streptavidin 与 Horseradish Peroxidase 的融合蛋白，前者负责与 Biotin 特异性结合，也就是和目标 RNA 特异性结合，后者用于催化发光液显色 [1]。

2.2 RNA 纯化与浓度测定

经过 APEX2 酶标记反应的 RNA 需要经过纯化之后再点样。纯化的方式使用了商用试剂盒，大体上先将 RNA 吸附于柱子之上，然后用漂洗液洗去蛋白等杂质，最终用水洗脱。后续浓度测定使用 NanoDrop 仪器，主要根据 260nm 处的吸光度换算而来。A260 与 A280 的比值在 1.8 到 2 之间表面蛋白杂质较少。

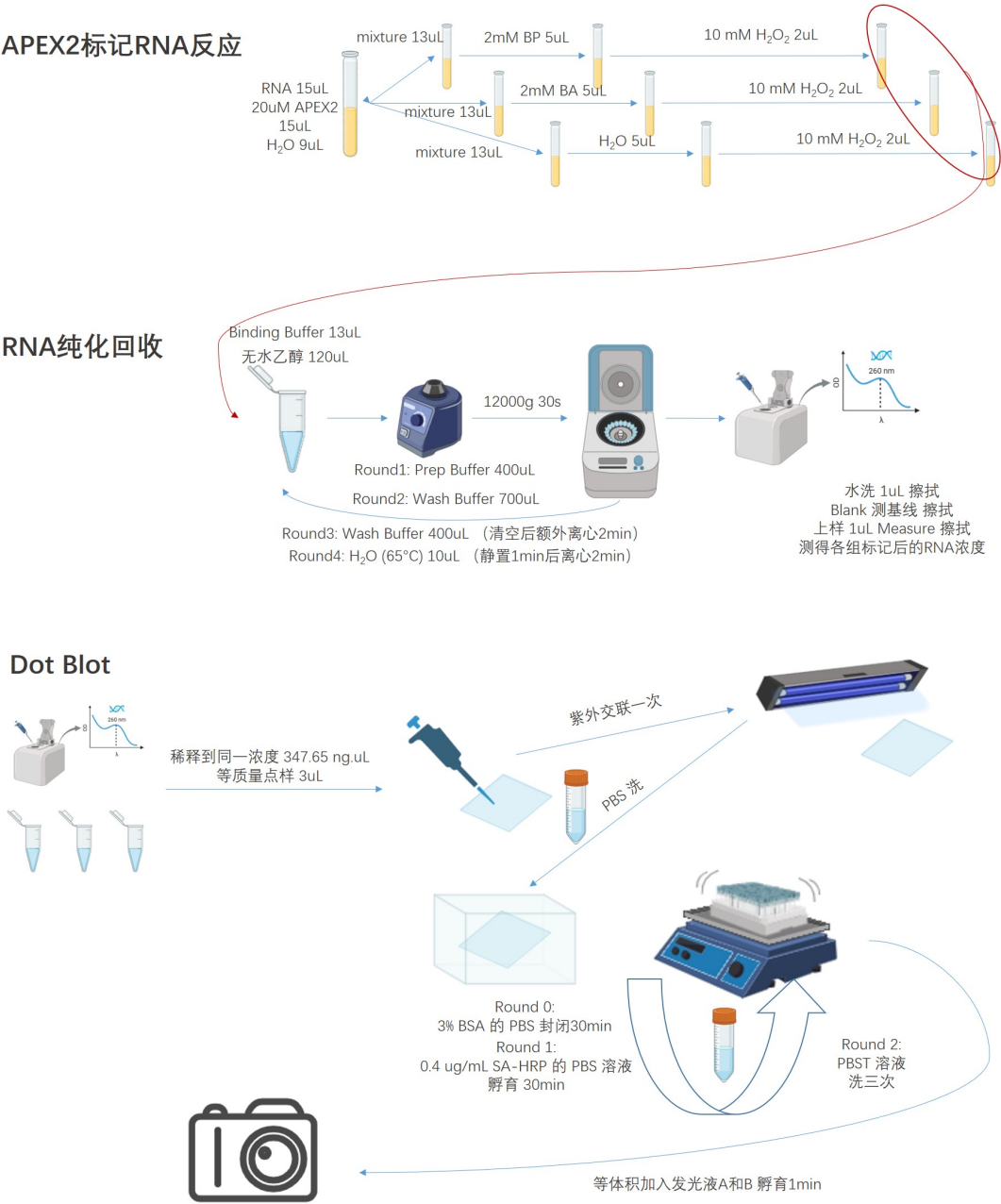


图 2: 实验流程图

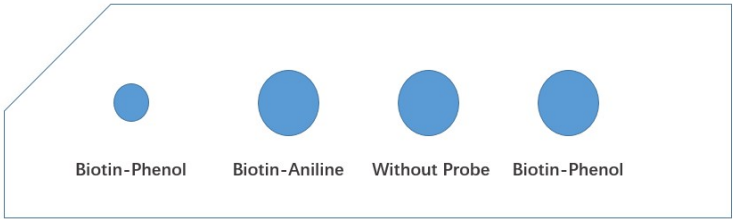


图 3: 点样顺序与位置

2.3 Dot Blot

RNA 的 Dot Blot 相当于 Southern Blot 的简化版本（核酸没有经过分离）。首先是点样到 Nylon 膜上。由于 RNA 溶于高盐溶液，被点到 Nylon 膜上之后，并没有形成共价连接，并不稳定。所以需要在 UV 紫外光下进行共价交联。

共价交联之后用 PBS（Phosphate-Buffered Saline）清洗杂质蛋白，而后用含有 BSA（Bovine Serum Albumin）的 PBS 溶液进行“封闭”（BSA 作为阻断剂），这样可以用 BSA 蛋白覆盖住没有点样的区域，从而阻止杂质蛋白的结合。经过封闭后，用含有 SA-HRP 蛋白的 PBS 溶液孵育随后用 PBST（Phosphate-Buffered Saline with Tween-20）缓冲液清洗掉非特异性结合样品点的 SA-HRP，这样可以使后续样品点可视化。上述的 PBST 中含有的 Tween-20 是一种非离子型表面活性剂，降低表面张力有助于洗脱非特异性结合的蛋白。

3 实验流程

实验流程见图 2

其中点样的顺序与位置见图 3。

4 实验结果与分析

经过 ChemiDoc 成像系统成像的结果见图 4。这个实验结果是极其出乎意料，因而发人深省的。

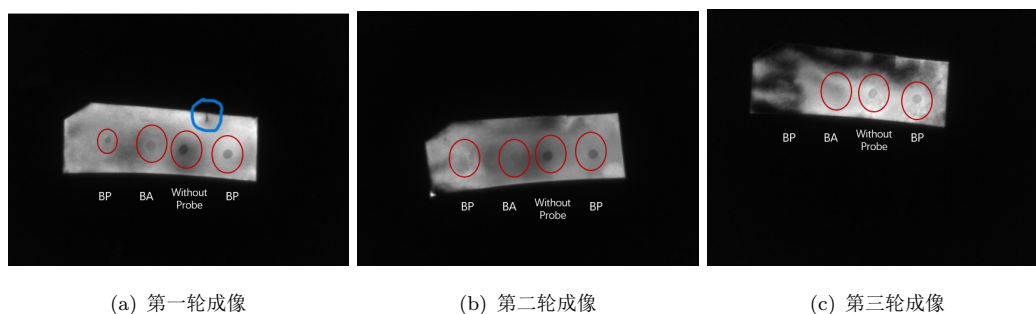


图 4: 实验结果

上面是三次成像的结果，首先有一些现象是符合预期的：

- Biotin-phenol 和 Biotin-aniline 上样点呈现出了和背景不同的颜色
 - 这说明探针有效的标记了 RNA
- Biotin-phenol 标记的上样点，经过三轮漂洗成像后仍然比较清晰
- 然而 Biotin-aniline 标记的上样点，经过三轮漂洗后比较模糊
 - 这说明 Biotin-phenol 特异性标记 RNA 的稳定性比较强
 - 相较之下，在本次实验中，Biotin-aniline 特异性标记 RNA 的稳定性要弱一些

然而对比之下，体现出的反常之处如下：

- 没有加探针的对照组颜色最深，呈现的标记效率竟然远远高于两个实验组。
- 没有上样的部分，成像黑白颜色不稳定。

- Biotin-aniline 样点，经过反复清洗成像后，与周围环境界限不清。
- 人眼观测，未上样区域呈现淡黄色，而上样点为白色。

可能的原因和改进方向如下：

- ChemiDoc 成像系统成像结果的黑与白，受多种因素的影响。
 - 比如图 4 中蓝色圆圈圈出的黑色竖线是由于物理上的裂口导致的，而不是有核酸或是蛋白。
 - 发光液浸泡 Nylon 膜，置于空气中本身也会引起 Nylon 膜颜色变深。这是直接观察的结果。
 - 反复的漂洗过程，进一步清除 SA-HRP 蛋白（主要清除非特异性结合的蛋白，但也削弱了特异性结合的蛋白）理论上也会引起颜色的改变。
 - 所以对照组颜色深可能是因为点样时候枪头刮到 Nylon 膜导致的。
 - 这一次对照组的结果大概率是干扰因素在其主导作用，应该废除重做。
- 没有上样的部分，成像黑白颜色不稳定。
 - 这可能由于防止 Nylon 膜时候产生的气泡导致
 - 同时也注意到，多种颜色压缩成黑白两色，黑不一定是同一种黑，而可能是其它颜色的干扰。
- 未上样区域可能受到环境污染
 - 应该延长封闭时间，从 30 min 延长到 1 hour，进一步阻断杂质蛋白的非特异性结合。
 - 紫外交联后的第一次清洗也可以使用含 BSA 的 PBS 溶液，这样可以进一步阻断杂质蛋白的结合。
- 反复涂抹发光液可能引发其它问题，以后应该一次性清洗彻底后再涂发光液。
- 与此同时，有必要增设一些平行实验，用以排除干扰因素。

参考文献

- [1] Wikipedia contributors. Horseradish peroxidase. https://en.wikipedia.org/wiki/Horseradish_peroxidase, 2025. Accessed: 2025-02-22.
- [2] Ying Zhou, Gang Wang, Pengchong Wang, Zeyao Li, Tieqiang Yue, Jianbin Wang, and Peng Zou. Expanding apex2 substrates for proximity-dependent labeling of nucleic acids and proteins in living cells. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(34):11763–11767, 2019.