

# 凝胶迁移实验 (EMSA)

凝胶迁移或电泳迁移率实验 (EMSA) 可以：(1) 研究 DNA 结合蛋白和其相关的 DNA 结合序列相互作用；(2) 可用于 DNA 定性和定量分析；(3) 用于研究 RNA 结合蛋白和特定的 RNA 序列的相互作用。

## 1 实验方法和原理

凝胶迁移或电泳迁移率实验 (EMSA-electrophoretic mobility shift assay) 是一种研究 DNA 结合蛋白和其相关的 DNA 结合序列相互作用的技术，可用于定性和定量分析。这一技术最初用于研究 DNA 结合蛋白，目前已用于研究 RNA 结合蛋白和特定的 RNA 序列的相互作用。

通常将纯化的蛋白和细胞粗提液和  $^{32}\text{P}$  同位素标记的 DNA 或 RNA 探针一同保温，在非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳上，分离复合物和非结合的探针。DNA-复合物或 RNA-复合物比非结合的探针移动得慢。同位素标记的探针依研究的结合蛋白的不同，可是双链或者是单链。当检测如转录调控因子一类的 DNA 结合蛋白，可用纯化蛋白，部分纯化蛋白，或核细胞抽提液。在检测 RNA 结合蛋白时，依据目的 RNA 结合蛋白的位置，可用纯化或部分纯化的蛋白，也可用核或胞质细胞抽提液。竞争实验中采用含蛋白结合序列的 DNA 或 RNA 片段和寡核苷酸片段（特异），和其它非相关的片段（非特异），来确定 DNA 或 RNA 结合蛋白的特异性。在竞争的特异和非特异片段的存在下，依据复合物的特点和强度来确定特异结合。

## 2 实验材料、试剂、仪器耗材

DNA 样品

[ $\gamma$ -32P]ATP、T4 多聚核苷酸激酶、Nuclease-Free Water、T4 多聚核苷酸激酶缓冲液、醋酸铵、TE、无水乙醇、TBE buffer、重蒸水、甲叉双丙烯酰胺、丙烯酰胺、甘油、过硫酸铵、TEMED（四甲基乙二胺）、EMSA Gel-Shift 结合缓冲液、溴酚蓝等

水浴锅、PCR 仪、离心机、电泳仪、电泳槽等

### 3 实验步骤

#### 一、探针的标记

1. 如下设置探针标记的反应体系：

- (1) 待标记探针 (1.75 pmol/微升) : 2 微升。
- (2) T4 Polynucleotide Kinase Buffer (10X) : 1 微升。
- (3) Nuclease-Free Water : 5 微升。
- (4) [ $\gamma$ -32P]ATP(3 000 Ci/mmol at 10 mCi/ml) : 1 微升。
- (5) T4 Polynucleotide Kinase (5-10 u/微升) : 1 微升。
- (6) 总体积: 10 微升
- (7) 按照上述反应体系依次加入各种试剂，加入同位素后，Vortex 混匀，再加入 T4 Polynucleotide Kinase，混匀。

2. 使用水浴或 PCR 仪，37°C反应 10 分钟。

3. 加入 1 微升探针标记终止液，混匀，终止探针标记反应。

4. 再加入 89 微升 TE，混匀。此时可以取少量探针用于检测标记的效率。通常标记的效率在 30%以上，即总放射性的 30%以上标记到了探针上。为实验简便起见，通常不必测定探针的标记效率。

5. 标记好的探针最好立即使用，最长使用时间一般不宜超过 3 天。标记好的探针可以保存在-20℃。

## 二、 探针的纯化

通常为实验简便起见,可以不必纯化标记好的探针。在有些时候,纯化后的探针会改善 EMSA 的电泳结果。如需纯化,可以按照如下步骤操作

1. 对于 100 微升标记好的探针，加入 1/4 体积即 25 微升的 5 M 醋酸铵，再加入 2 体积即 200 微升的无水乙醇，混匀。
2. 在-70℃至-80℃沉淀 1 小时，或在-20℃沉淀过夜。
3. 在 4℃，12 000 g-16 000 g 离心 30 分钟。小心去除上清，切不可触及沉。
4. 在 4℃，12 000 g-16 000 g 离心 1 分钟。小心吸去残余液体。微晾干沉淀，但不宜过分干燥。
5. 加入 100 微升 TE，完全溶解沉淀。标记好的探针最好立即使用，最长使用时间一般不宜超过 3 天。标记好的探针可以保存在 -20℃。

## 三、 EMSA 胶的配制

1. 准备好倒胶的模具。可以使用常规的灌制蛋白电泳胶的模具，或其它适当的模具。最好选择可以灌制较薄胶的模具，以便于干胶等后续操作。为得到更好的结果，可以选择可灌制较大 EMSA 胶的模具。
2. 按照如下配方配制 20 毫升 4%的聚丙烯酰胺凝胶(注意:使用 29:1 等不同比例的 Acr/Bis 对结果影响不大)。

(1) TBE buffer (10X): 1 毫升。

重蒸水: 16.2 毫升。

(2) 39:1 acrylamide/bisacrylamide (40%,w/v): 2 毫升。

(3) 80% 甘油： 625 微升。

(4) 10% 过硫酸铵 (ammonium persulfate) : 150 微升。

(5) TEMED : 10 微升

3. 按照上述次序加入各个溶液，加入 TEMED 前先混匀，加入 TEMED 后立即混匀，并马上加入到制胶的模具中。避免产生气泡， 并加上梳齿。如果发现非常容易形成气泡，可以把一块制胶的玻璃板进行硅烷化处理。

#### **四、EMSA 结合反应**

1. 如下设置 EMSA 结合反应

阴性对照反应：

(1) Nuclease-Free Water : 7 微升。

(2) EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X) : 2 微升。

(3) 细胞核蛋白或纯化的转录因子： 0 微升。

(4) 标记好的探针 : 1 微升。

(5) 总体积 : 10 微升。

样品反应：

(1) Nuclease-Free Water : 5 微升。

(2) EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X) : 2 微升。

(3) 细胞核蛋白或纯化的转录因子 : 2 微升。

(4) 标记好的探针： 1 微升。

(5) 总体积： 10 微升。

探针冷竞争反应：

(1) Nuclease-Free Water : 4 微升。

(2) EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X) : 2 微升。

(3) 细胞核蛋白或纯化的转录因子: 2 微升。

(4) 未标记的探针: 1 微升。

(5) 标记好的探针: 1 微升。

(6) 总体积 : 10 微升。

突变探针的冷竞争反应:

(1) Nuclease-Free Water : 4 微升。

(2) EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X) : 2 微升。

(3) 细胞核蛋白或纯化的转录因子 : 2 微升。

(4) 未标记的突变探针: 1 微升。

(5) 标记好的探针: 1 微升。

(6) 体积 : 10 微升

Super-shift 反应:

(1) Nuclease-Free Water: 4 微升。

(2) EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X) : 2 微升。

(3) 细胞核蛋白或纯化的转录因子: 2 微升。

(4) 目的蛋白特异抗体 : 1 微升。

(5) 标记好的探针: 1 微升。

(6) 总体积 : 10 微升。

2. 按照上述顺序依次加入各种试剂, 在加入标记好的探针前先混匀, 并且室温(20-25℃)

放置 10 分钟, 从而消除可能发生的探针和蛋白的非特异性结合, 或者让冷探针优先反应。

然后加入标记好的探针, 混匀, 室温(20-25℃)放置 20 分钟。

3. 加入 1 微升 EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液(无色, 10X), 混匀后立即上样。注意: 有些时候溴酚蓝会影响蛋白和 DNA 的结合, 建议尽量使用无色的 EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液。如果对于使用无色上样缓冲液在上样时感觉到无法上样, 可以在无色上样缓冲液里面添加极少量的蓝色的上样缓冲液, 至能观察到蓝颜色即可。

## 五、电泳分析

1. 用 0.5XTBE 作为电泳液。按照 10V/厘米的电压预电泳 10 分钟。预电泳的时候如果有空余的上样孔, 可以加入少量稀释好的 1X 的 EMSA 上样缓冲液(蓝色), 以观察电压是否正常进行。
2. 把混合了上样缓冲液的样品加入到上样孔内。在多余的某个上样孔内加入 10 微升稀释好的 1X 的 EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液 (蓝色), 用于观察电泳进行的情况。
3. 按照 10 V/厘米的电压电泳。确保胶的温度不超过 30℃, 如果温度升高, 需要适当降低电压。电泳至 EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液中的蓝色染料溴酚蓝至胶的下缘 1/4 处, 停止电泳。
4. 剪一片大小和 EMSA 胶大小相近或略大的比较厚实的滤纸。小心取下夹有 EMSA 胶的胶板, 用吸水纸或普通草纸大致擦干胶板边缘的电压液。小心打开两块胶板中的上面一块(注: 通常选择先移走硅烷化的那块玻璃板), 把滤纸从 EMSA 胶的一侧逐渐覆盖住整个 EMSA 胶, 轻轻把滤纸和胶压紧。滤纸被胶微微浸湿后(大约不足 1 分钟), 轻轻揭起滤纸, 这时 EMSA 胶会被滤纸一起揭起来。把滤纸侧向下, 放平, 在 EMSA 胶的上面覆盖一层保鲜膜, 确保保鲜膜和胶之间没有气泡。
5. 干胶仪器上干燥 EMSA 胶。然后用 X 光片压片检测, 或用其它适当仪器设备检测。

## 4 常见问题分析

## 1. 什么是凝胶迁移或电泳迁移率实验？

凝胶迁移或电泳迁移率实验（EMSA）是一种研究 DNA 结合蛋白和其相关的 DNA 结合序列相互作用的技术，可用于定性和定量分析。这一技术最初用于研究 DNA 结合蛋白，目前已用于研究 RNA 结合蛋白和特定的 RNA 序列的相互作用。

通常将纯化的蛋白和细胞粗提液和  $^{32}\text{P}$  同位素标记的 DNA 或 RNA 探针一同保温，在非变性的聚丙烯酰胺电泳上，分离复合物和非结合的探针。DNA 复合物或 RNA 复合物比非结合的探针移动得慢。同位素标记的探针依研究的结合蛋白的不同，可是双链或者是单链。当检测如转录调控因子一类的 DNA 结合蛋白，可用纯化蛋白，部分纯化蛋白，或核细胞抽提液。在检测 RNA 结合蛋白时，依据目的 RNA 结合蛋白的位置，可用纯化或部分纯化的蛋白，也可用核或胞质细胞抽提液。竞争实验中采用含蛋白结合序列的 DNA 或 RNA 片段和寡核苷酸片段（特异），和其它非相关的片段（非特异），来确定 DNA 或 RNA 结合蛋白的特异性。在竞争的特异和非特异片段的存在下，依据复合物的特点和强度来确定特异结合。

## 2. 实验中需要用到什么试剂？

凝胶迁移实验需要的结合蛋白，可来源于纯化或部分纯化的蛋白，或粗的核和胞质抽提液。还必须制备同位素标记的 DNA 或 RNA。一般，DNA 核苷酸探针用  $^{32}\text{P}$  和 T4 多核苷酸激酶来作末端标记，同位素标记的 RNA 用噬菌体 RNA 聚合酶和同位素标记的核苷酸在体外合成。Promega 公司的 Riboprobe/sup 系统 (a,b) 可用于同位素标记的 RNA 的体外合成，DNA 5'末端标记系统，用于制备 DNA 探针，结合反应所需的组分有：含盐的溶液（氯化镁，氯化钠，或氯化钾）、缓冲体系（Tris-HCl 或 HEPES）、还原剂（DTT）、甘油、非特异的竞争 DNA（poly (dl:dC) dl:dC），也可能含非离子去污剂。在结合蛋白和同位素标记的探针作用后，在非变性的聚丙烯酰胺电泳上，分离复合物，随后将凝胶干燥并放射自显影，或用 PhosphorImage/sup 分析。

### 3. 凝胶迁移实验系统提供了什么试剂？

Promega 公司提供一种凝胶迁移实验系统检测 DNA 结合蛋白，系统可作为这类实验的一种阳性对照。系统包括目的寡核苷酸，对照 DNA 结合蛋白，结合缓冲液，用于寡核苷酸探针末端标记所需的试剂。Core 系统包括含重组 AP2 蛋白（AP2 抽提液）的大肠杆菌抽提液和 AP2 的同源寡核苷酸。AP2 抽提液是从表达 AP2 蛋白的大肠杆菌中提取的。另外，Core 系统还含 SP1 同源寡核苷酸，凝胶迁移结合缓冲液，和能作 20 次对照实验的 HeLa 核抽提液。Complete 系统含另外 5 个双链寡核苷酸，分别是 AP1、OCT1、CREB、NF- $\kappa$ B、TFIID 结合位点的同源序列。这些寡核苷酸可以在末端标记后用作特异性探针，或在竞争实验中用作非特异性探针。

### 4. 成功进行凝胶迁移实验，需要优化哪些因素？

凝胶迁移实验在理论上很简单也很快速，但要成功地进行凝胶迁移实验，需要优化一些参数，这主要受结合蛋白的来源和探针结合位点特点的影响。以下是需要优化的因素：抽提液的制备（核酸酶和磷酸酶污染会使探针降解），结合蛋白的浓度，探针的浓度，非特异性探针的浓度，缓冲液的配方和 pH，聚丙烯凝胶电泳的特点和电泳条件，保温时间和温度，载体蛋白，是否有辅助因子（比如锌，或镉等金属离子，或激素）。总之，反应总体积应最小（20 $\mu$ l）。为满足一般要求，结合缓冲液含 4%甘油，1mM MgCl<sub>2</sub>，0.5mM EDTA，0.5mM DTT，50mM NaCl，10mM Tris-HCl（pH7.5），0.05mg/ml poly dl:dC，或 10mM HEPES（pH7.9），50mM KCl，1mM DTT，1mM EDTA，10%甘油，0.05mg/ml poly dl:dC 可作为优化实验的起始。

### 5. 在 DNA 探针的选择上，要考虑哪些重要因素？

目的 DNA 的长度应小于 300bp，以有利于非结合探针和蛋白 DNA 复合物的电泳分离。双链的合成的寡核苷酸和限制性酶切片段可在凝胶迁移实验中用作探针。如目的蛋白已被鉴定，



则应用短的寡核苷酸片段（约为 25bp），这样结合位点可和其他因子的结合位点区别开。

长的限制性酶切片段可用于对推定的启动子/增强子区域内的蛋白结合位点定位。随后可用 DNaseI 印迹对蛋白结合的特异区域在 DNA 序列水平上作出分析。

6. 用以下一些转录调节因子和 HeLa 细胞核抽提物可形成哪些复合物：AP1, AP2, CREB, NFkB, Oct1, Sp1, TFIID, TFIIB。

当用 HeLa 细胞核抽提物作为结合蛋白的来源时，每 1 个转录调节因子和它相关的 DNA 同源序列结合形成特征型的结合形态。以下的文字描述了每一个单独的转录调节因子，包括识别的同源序列，因子的大小，特定的结合条件，以及和 HeLa 细胞核抽提物可形成的复合物的数目。