

不同缓冲液对凝胶迁移试验的影响

郑海霞,王玉国,冯智富

(山西农业大学 农学院,山西 太谷 030801)

摘要:凝胶迁移(EMSA)实验在理论上较简单,但在实际操作中需要对试验测定系统进行优化,缓冲液的选择是需要优化的因素之一。通过用 T7RNA 聚合酶与 T7 启动子 DNA 的结合反应来选择合适的缓冲液,结果表明,不同的缓冲液会影响凝胶迁移试验的结果,5 ×Buffer1 结合缓冲液的效果较好;TBE 电泳缓冲液比 TAE、TGE 的电泳效果好,同时在 3 种不同浓度的 TBE 缓冲液中,0.2 ×的 TBE 效果最好。

关键词:凝胶迁移;缓冲液;条件优化

中图分类号:S665.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2009)06-0178-03

Effect of the Different Buffer on Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

ZHENG Hai-xia, WANG Yu-guo, FENG Zhi-fu

(College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: The test of Electrophoretic Mobility Shift Assay is very simple in theory. But to successfully carry out gel shift experiments, it needs to optimize the parameters. Through a combination of T7 RNA polymerase and T7 Promoter for testing proper buffer was selected. The experimental results showed 5 ×binding-Buffer 1 was more suitable for the test; TBE running-buffer was better than TAE and TGE buffer; 0.2 ×TBE buffer was the best concentration among there electrophoresis buffer.

Key words: EMSA; Buffer; Optimize

启动子 DNA 结合蛋白的研究是从转录水平上研究基因表达的调节,以寻找新的蛋白质为手段,了解其对转录调节作用为目的。凝胶迁移或电泳迁移率检测(Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)是研究启动子结合蛋白的经典方法,是一种用于定性和定量分析核酸蛋白相互作用的技术,其基本原理是末端标记的核酸探针可以与蛋白质结合,电泳时这种复合物相对没有结合蛋白的探针在凝胶中移动的速度慢,即表现为相对滞后。该方法不仅简单迅速而且灵敏度高;另一方面它可以用竞争性试验来评价蛋白和核酸结合的特性。目前用于检测 DNA 结合蛋白、RNA 结合蛋白,并可通过加入特异性的抗体来检测特定的蛋白质,结合蛋白双向电泳(2D gel electrophoresis)及质谱技术(Mass spectrometry)进行未知蛋白的鉴定分析。该技术已被广泛应用于许多农作物的研究中。

凝胶迁移(EMSA)试验在理论上较简单,但在实际操作中需要对试验测定系统进行优化,缓冲液的

选择是需要优化的因素之一。本研究通过 T7RNA 聚合酶与 T7 启动子 DNA 的结合反应进行预试验,筛选合适的蛋白-DNA 结合缓冲液与电泳缓冲液,旨在为今后运用 EMSA 试验研究启动子结合蛋白奠定一定的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

T7RNA 聚合酶、T7 启动子 DNA (40 bp) (T7DNA 序列: TAATACGACTCACTATAGGGTAATACGACTCACTATAGGG)。

1.2 方法

1.2.1 T7 启动子 DNA 的准备 通过公司合成两条单链 T7 启动子 DNA oligo,把待退火的 DNA oligo 用经灭菌重蒸水配制成 50 μmol/L。退火反应体系设置如下。

ddH₂O 50 μL; Annealing Buffer for DNA oligos (5 ×) 20 μL; DNA oligo A (50 μmol/L) 10 μL; DNA oli-

收稿日期:2009-06-10

基金项目:山西农业大学科技创新基金(2006026)

作者简介:郑海霞(1979-),女,山西孝义人,助教,硕士,主要从事生物技术及生物信息方面的研究。

go B (50 μmol/L) 20 μL ;总体积 100 μL。

按照上述顺序依次加入各种试剂,混匀。然后设置 PCR 仪进行退火反应:95 变性 10 min,缓慢冷却到室温约 1 h。最后在 - 20 冻存备用。

1.2.2 蛋白与 DNA 的结合反应 设置反应体系如下:5 × binding Buffer 2 μL;T7 promoter oligo (53 ng/μL)0.5 μL;T7 RNA polymerase 5 μL;ddH₂O 2.5 μL;总体积 10 μL。将该反应体系混匀,在 37 反应 30 min。

1.2.3 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 凝胶制备:准备 40 %凝胶单体贮液 (38 %丙烯酰胺,2 %甲叉双丙烯酰胺);6 % 非变性凝胶贮液 100 mL (40 %凝胶单体贮液 15 mL,10 ×TBE 10 mL,ddH₂O 100 mL)。取干燥后的玻璃板,放入硅胶框内,并固定在电泳槽中,用 1 %的琼脂封边;灌入 6 %的非变性凝胶聚合约 1 h。

电泳:将蛋白与 DNA 的反应液在 200 V,6 %非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳 20 min,电泳结束后用 SYBR Gold 染料染色 10 min,然后进行检测。

2 结果与分析

2.1 不同的蛋白-DNA 结合缓冲液对试验结果的影响

准备 3 种不同的蛋白-DNA 结合缓冲液,配制如下。

5 ×Buffer 1:50 mmol/L HEPES (pH 7.9),250 mmol/L KCl,5 mmol/L DTT,5 mmol/L EDTA,50 % glycerol;

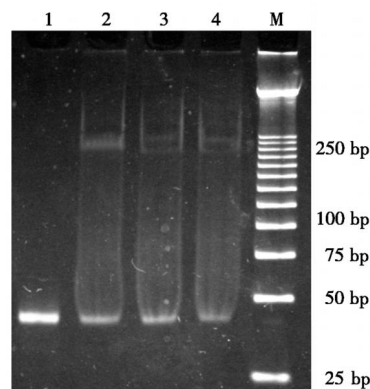
5 ×Buffer 2:20 % glycerol,5 mmol/L MgCl₂,2.5 mmol/L EDTA,2.5 mmol/L DTT,250 mmol/L NaCl,50 mmol/L Tris-HCl,pH 7.5;

5 ×Buffer 3:200 mmol/L Tris-HCl (pH 7.9,25),30 mmol/L MgCl₂,50 mmol/L DTT,50 mmol/L NaCl,10 mmol/L spermidine (transcription buffer)。

分别采用不同的结合缓冲液测试 T7RNA 聚合酶与 T7 启动子 DNA 的结合情况 (图 1),由图 1 可知,5 ×Buffer 1 结合效果比较好。

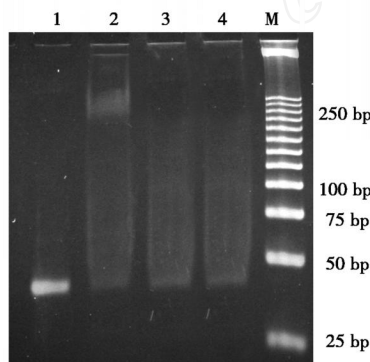
2.2 不同的电泳缓冲液对试验结果的影响

采用浓度不同的电泳缓冲液测试 T7RNA 聚合酶与 T7 启动子 DNA 的结合情况,结果表明,电泳缓冲液的浓度与成分均会影响蛋白与 DNA 的结合。咱 TBE 缓冲液中,蛋白与 DNA 能结合,在缓冲液 TAE 与 TGE 中几乎不结合 (图 2);在不同浓度 0.2 ×,0.5 ×与 1 ×的 TBE 中,0.2 ×的 TBE 效果最好 (图 3)。



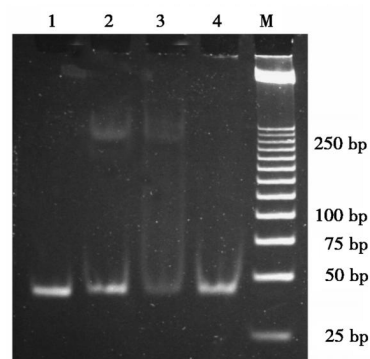
1. 阴性对照;2. 结合缓冲液 1;3. 结合缓冲液 2;4. 结合缓冲液 3;
M. 25 bp DNA Marker。
1. Negative control;2. Buffer 1;3. Buffer 2;4. Buffer 3;
M. 25 bp DNA Marker.

图 1 不同的蛋白-DNA 结合缓冲液对试验的影响
Fig.1 Effect of binding Buffer on gel shift



1. 阴性对照;2. TBE;3. TAE;4. TGE;M. 25 bp DNA Marker。
1. Negative control;2. TBE;3. TAE;4. TGE; M. 25 bp DNA Marker.

图 2 电泳缓冲液的成分对结果的影响
Fig.2 Effect of running Buffer on gel shift



1. 阴性对照;2~4. TBE 浓度分别为 0.2 ×,0.5 ×,1 ×;
M. 25 bp DNA Marker。
1. Negative control;2 - 4. TBE conc. 0.2 ×,0.5 ×,1 ×;
M. 25 bp DNA Marker.

图 3 电泳缓冲液浓度对结果的影响

Fig.3 Effect of running Buffer concentration on gel shift

2.3 其他条件对试验的影响

除了电泳缓冲液与蛋白-DNA 的结合缓冲液对蛋白与 DNA 的结合有影响外,上样缓冲液的成分、紫外交联作用对试验都有不同程度的影响。研究表明,上样缓冲液成分中如有溴酚蓝,电泳时 T7RNA

聚合酶与 T7DNA 结合的复合物将会发生解离;在电泳之前先将 T7RNA 聚合酶与 T7DNA 的反应液在紫外灯下交联 2 min 可以提高蛋白与 DNA 的结合效果。

3 结论与讨论

本研究通过 T7RNA 聚合酶与 T7 启动子 DNA 的结合反应进行预试验,筛选合适的蛋白-DNA 结合缓冲液与电泳缓冲液,结果表明,不同的电泳缓冲液与蛋白-DNA 结合缓冲液均会影响凝胶迁移试验的结果,对于 T7RNA 聚合酶与 T7 启动子 DNA 的结合反应来说,5 ×Buffer 1 结合缓冲液的效果较好;TBE 电泳缓冲液比 TAE,TGE 的电泳效果好,同时在 3 种不同浓度的 TBE 缓冲液中,0.2 ×的 TBE 效果最好。

凝胶迁移试验较为复杂,这主要受结合蛋白的来源和探针结合位点特点的影响。不同的蛋白-DNA 结合,反应条件都不尽相同,需要根据特定的试验而定。除了本研究所分析的电泳缓冲液^[10]及蛋白-DNA 结合缓冲液外,还有许多需要优化的因素,即蛋白与核酸的浓度;聚丙烯凝胶电泳的电泳条件;蛋白是否需要辅助因子^[11](比如锌、镉等金属离子);反应总体积等。除此之外,该试验极为敏感,极易出现假阳性或假阴性结果,因此,务必要保证试验条件和操作的一致性,关键点包括试剂的品牌、批次、剂量,向反应体系中加入试剂的顺序,间隔时间(如加入蛋白和探针后的孵育时间)等。

本试验迁移条带比较弥散。可能的原因:聚丙烯酰胺凝胶聚合的不好;电泳的时间太长;电泳的温度不合适;离子浓度、pH 的问题导致 DNA 蛋白复合物有一定程度的解离。

参考文献:

[1] Fried M, Crothers D M. Equilibria and kinetics of lac repres-

sor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis [J]. Nucleic Acids Res, 1981, 9(23): 6505 - 6525.

- [2] 梁国栋. 最新分子生物学实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 4 - 9.
- [3] Debomoy K, Lahiri, Yuan-Wen Gea. Electrophoretic mobility shift assay for the detection of specific DNA protein complex in nuclear extracts from the cultured cells and frozen autopsy human brain tissue [J]. Brain Research Protocols, 2000, 5 (3): 257 - 265.
- [4] Lance M Hellman, Michael G Fried. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein nucleic acid interactions [J]. Nature Protocols, 2007, 2: 1849 - 1861.
- [5] Yue Li, Zhaozhao Jiang, Haixu Chen. A modified quantitative EMSA and its application in the study of RNA protein interactions [J]. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2004, 60(2): 85 - 96.
- [6] Woo A J, Dods J S, Susanto E, et al. A proteomics approach for the identification of DNA binding activities observed in the electrophoretic mobility shift assay [J]. Mol Cell Proteomics, 2002, 1: 472 - 478.
- [7] 杨红梅, 王 磊. 玉米转录因子 zmCBF1 的凝胶阻滞分析 [J]. 生物技术通报, 2005(6): 81 - 83.
- [8] 魏 刚, 雷 娟, 巩 威, 等. 拟南芥 QRA P2 基因的克隆、表达、DNA 结合能力及体外转录活性分析 [J]. 科学通报, 2005, 50(17): 1863 - 1868.
- [9] 王海华, 郝中娜, 吴坤陆, 等. 水稻 WRKY89 中的亮氨酸拉链结构增强蛋白与 W 盒元件的相互作用 [J]. 科学通报, 2005, 50(10): 970 - 978.
- [10] Karim Roder, Michael Schweizer. Running-buffer composition influences DNA-protein and protein-protein complexes detected by electrophoretic mobility-shift assay (EMSA) [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2002, 33: 209 - 214.
- [11] Masashi Ono, Philip W Tucker, J Donald Capra. Ku is a general inhibitor of DNA-protein complex formation and transcription [J]. Molecular Immunology, 1996, 33(9): 787 - 796.