

凝胶阻滞(EMSA)

EMSA Protocol

王鹏，杨莹，余四斌*

作物遗传改良国家重点实验室，华中农业大学，武汉

*通讯作者邮箱: ysb@mail.hzau.edu.cn

引用格式：王鹏，杨莹，余四斌. (2018). 凝胶阻滞 (EMSA). *Bio-101* e1010132. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010132.

How to cite: Wang, P., Yang, Y. and Yu, S. B. (2018). EMSA protocol. *Bio-101* e1010132. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010132. (in Chinese)

实验原理：Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)是一种研究 DNA 结合蛋白或 RNA 蛋白质与其相关的 DNA 结合序列或 RNA 序列相互作用的技术，可以用于定量或者定性分析(Hellman and Fried, 2007)。将纯化的蛋白或细胞粗提液和 ^{32}P 同位素 3' 末端标记的 DNA 或 RNA 核酸探针一同温育，然后在非变性的聚丙烯凝胶电泳时这种复合物比无蛋白结合的探针在凝胶中移动的速度慢，出现相对滞后的条带(图 1)。通常可以用来作为验证转录因子和启动子特异元件直接结合调控转录的 *in vitro* 证据。

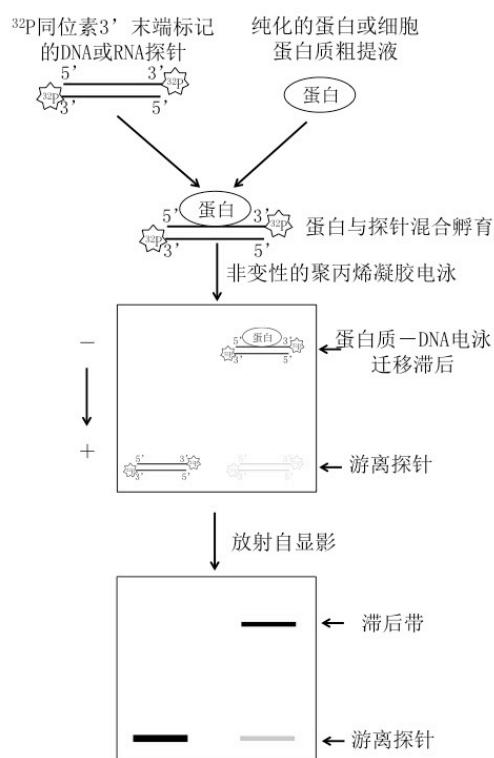


图 1. 凝胶阻滞实验基本原理图

实验目的：体外分析 DNA 或 RNA 探针与特异性蛋白质或蛋白复合体之间的互动。

关键词：DNA—蛋白互动，凝胶阻滞，电泳，放射自显影

材料与试剂

1. 离心管
2. 滤纸
3. 保鲜膜
4. X 光片
5. 大片段 DNA 聚合酶 (Large Fragment DNA Polymerase I) (Invitrogen, USA, catalog number: 18012-021)
6. dNTP* (专用), 由 dATP, dTTP, dGTP (Takara, Japan, catalog numbers: D4026A, D4027A, D4029A) 1:1:1 配制, 即各取 1 μl , 再加入 497 μl 灭菌 ddH₂O 混匀
7. 10x M buffer (TaKaRa, catalog number: CA1401B) (Takara 酶切试剂中附带的紫盖 buffer)
8. 10x Loading Buffer (TakaRa, catalog number: CA2601A) (Takara 酶切试剂中附带)

9. 30% Acrylamide
10. Tris base
11. HCl
12. SDS
13. AP (过硫酸胺)
14. TEMED
15. 甘油
16. α ³²P dCTP
17. MgCl₂
18. NaCl
19. EDTA
20. DTT
21. 甘氨酸 (Glycine)
22. BSA
23. 分离胶 (见溶液配方)
24. 10x binding Buffer (见溶液配方)
25. 电泳缓冲液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 蛋白质分离胶电泳仪 (同位素室配置)
2. 离心机
3. 盖革计数器
4. 同位素室
5. 暗室
6. 红光灯

实验步骤

1. 实验设计

实验设置	组成
阴性对照反应	4 μ l 稀释的标记探针, 10x binding Buffer 2 μ l, 补充 ddH ₂ O 至总体积 20 μ l
阳性对照反应	4 μ l 稀释的标记探针, 10x binding Buffer 2 μ l, 已知和标记探针存在互作的纯化蛋白 200-500 ng, 补充 ddH ₂ O 至总体积 20 μ l
样品反应	4 μ l 稀释的标记探针, 10x binding Buffer 2 μ l, 细胞核提取物(3-20 μ g)或纯化蛋白 200-500 ng, 补充 ddH ₂ O 至总体积 20 μ l
探针冷竞争反应	4 μ l 稀释的标记探针, 4 μ l 稀释的未标记探针, 10x binding Buffer 2 μ l, 细胞核提取物(3-20 μ g)或纯化蛋白 200-500 ng, 补充 ddH ₂ O 至总体积 20 μ l
突变探针冷竞争反应	4 μ l 稀释的标记探针, 4 μ l 稀释的未标记突变探针, 10x binding Buffer 2 μ l, 细胞核提取物(3-20 μ g)或纯化蛋白 200-500 ng, 补充 ddH ₂ O 至总体积 20 μ l

2. 制分离胶 (溶液配方 1)。注意凝胶内不能产生气泡以免影响样品电泳和放射自显影结果。该步骤可不在同位素室制备, 电泳时利用同位素室配置的电泳仪进行操作。

3. 标记探针

探针	4 μ l
dNTP*(专用)	2 μ l
10x M buffer	2 μ l
大片段 DNA 聚合酶	1 μ l
ddH ₂ O	9 μ l
α ³² P dCTP	2 μ l
20 μ l 总体积	

室温放置 40 min-1 h, 在第 4 步使用时需另补充 30 μ l ddH₂O 稀释标记好的探针以降低过于强烈的目标信号和背景噪音。在同位素室的有机玻璃防护设施内进行。

4. 蛋白与探针混合孵育

细胞核提取物, 3-20 μ g, 如是纯化蛋白, 200-500 ng

10x binding Buffer 2 μ l

补 ddH₂O 至 16 μ l

轻弹混匀后低速离心 1 min, 将稀释后的探针(第 3 步) 4 μ l 加到 1.5 ml 离心管管底

(同位素室操作),用手指轻弹混匀。室温中放置,将探针与 DNA 混合孵育 15-20 min。
该步骤在同位素室的有机玻璃防护设施内进行。

5. 预电泳。在上样品之前,将制好的分离胶放入同位素室的电泳仪进行预电泳。
 - a. 先加缓冲液,再取下分离胶上的梳子。
 - b. 用 1 ml 移液枪或者胶头吸管吸取缓冲液对每个梳孔进行反复吸打,以清理干净残胶,避免对样品的迁移产生影响。
 - c. 在每个梳孔上样约 5 μ l 的 10x loading buffer。在 80-90 V 电泳约 1 个小时。因为溴酚蓝显示蓝色,可作为电泳迁移时的指示剂用于指示电泳进行的情况,比如胶的密度的一致性和导电性情况。如果蓝色条带粗,扩散和弯曲状,说明胶有问题,需要重新制胶。
6. 点样。使用同位素室的有机玻璃防护设施内的电泳仪进行电泳分离复合物和非结合的探针。
 - a. 先用 EMSA 设施内的 20 μ l 移液枪分装 10x loading buffer 2-3 μ l 到每个样品的试管内壁上,作为指示剂。
 - b. 再用同一移液枪吸取内壁指示剂和管底所有样品进行点样到制好的凝胶的梳孔内。电压设置为 80-90 V,用新制备的电泳缓冲液进行电泳约 1.5-2.0 h。当缓冲液中的蓝色染料溴酚蓝迁移至胶的下缘 1/4 处时,可停止电泳。

7. 压 X 光片

电泳结束后,将含有凝胶的玻璃板从电泳仪上卸下。分开胶板后,用比玻璃板略大的一块滤纸对准 EMSA 凝胶,缓慢小心将 EMSA 胶从胶板上粘下,再用另一块同样大小的滤纸将凝胶的另一面盖住,轻轻把滤纸和胶压紧,然后用单层保鲜膜将含有胶的滤纸包好压在暗夹内。在暗室的有机玻璃防护设施后将 X 光片放置到暗夹内的凝胶上面。封好暗夹后暗室放置 4-5 h。

Tip: 由于放射性同位素的衰变,如果使用为新订购回来的新同位素,压片时间可以缩短为一半时间: 2-3 h。

7. 显影

在暗室内,准备三个盆子,分别装显影液、水、定影液。取出 X 光片,在显影液浸泡几秒钟,待有清晰的游离探针出现时,迅速在水中清洗几秒钟,同时放在红灯上迅速观察滞后带的信号情况,放入定影液进行定影。

Tip: 根据阳性对照的信号情况, 可以对显影时间进行稍微延长或缩短。这有利于控制和降低 X 光片的背景噪音信号。

注意事项

1. 预电泳时, 电泳缓冲液内可以加入特定的小分子添加试剂。如果该添加剂对 DNA 的特异性或者蛋白-DNA 的稳定性有帮助。
2. DNA 和蛋白的互作稳定性受到孵育缓冲液里的盐浓度和 pH 的影响。因此可以尝试不同的缓冲液 (Hellman and Fried, 2007)。
3. 与 DNA 互作的粗体蛋白和纯化蛋白的浓度在随着实验进行, 需要被优化。因为过多或者过少的蛋白浓度都会对信号结果的读取产生影响。
4. 一般情况下, 在本实验的分离胶中和所设置的电压下, 指示剂与最终显影结果中的游离探针的位置相近。由于最终 X 光片上需要保留游离探针信号作为观察对比 DNA-蛋白的结合强度因此不能让指示剂跑出胶外。
5. 跑胶的两块小玻璃板被放射性同位素污染, 必须在同位素室有机玻璃挡板后的水龙头上反复冲洗, 用盖革计数器检测残留信号后, 再带回实验室的特定抽屉放置, 以备下次重复利用。

溶液配方

1. 分离胶配方 (6% SDS-PAGE) (8 ml)

ddH ₂ O	4.24 ml
30% Acrylamide	1.60 ml
1.5 M Tris-HCl (PH 8.8)	2.00 ml
10% SDS	0.08 ml
10% AP	0.08 ml
TEMED	0.0064 ml
2. 10x binding Buffer

80%甘油	62.5 μ l
0.1 M MgCl ₂	10.0 μ l
5 M NaCl	10.0 μ l
1 M Tris-HCl (pH = 8.0)	10.0 μ l

0.5 M EDTA	2.0 μ l
1 M DTT	1.0 μ l
ddH ₂ O	4.5 μ l
至总体积	100.0 μ l

3. 电泳缓冲液

甘氨酸(Glycine) 18.8 g

Tris 粉 3.02 g, 加单蒸水定容至 1 L

BSA 终浓度为 0.1 mg ml⁻¹ 或更少

参考文献

1. Hellman, L. M. and Fried, M. G. (2007). [Electrophoretic mobility shift assay \(EMSA\) for detecting protein-nucleic acid interactions.](#) *Nat Protoc* 2(8): 1849-1861.