凝胶迁移实验常见问题

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 32P 同位素标记的 DNA 或 RNA 探针一同保温，在非变性的聚丙烯凝胶电泳上，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 32P 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（dI:dC）dI: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，在非变性的聚丙烯凝胶电泳上，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. 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（20μl）。为满足一般要求，结合缓冲液含 4%甘油，1mM MgCl2，0.5mM EDTA，0.5mM DTT，50mM NaCl，10mM Tris-HCl（pH7.5），0.05mg/ml poly dI:dC，或 10mM HEPES（pH7.9），50mM KCl，1mM DTT，1mM EDTA，10%甘油，0.05mg/ml poly dI:dC 可作为优化实验的起始。

4. 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。

5. 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。