

文章编号: 1674-7054(2013)04-0365-04

一种快速鉴定 Femu2p-C₂H₂ 蛋白与 TTGGGT BOX 相互作用的 EMSA 实验法

费小雯¹ 吴小霞² 范新照² 邓晓东²

(1. 海南医学院 基础医学部 海南 海口 571101; 2. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所 海南 海口 571101)

摘要: 分析了电泳迁移率(EMSA)技术研究进展及其优缺点,并在此基础上进行实验方法改进。通过检测 TTGGGT Box 及其突变体与 Femu2p-C₂H₂ 蛋白的相互作用,探索并总结出一套快速、简便、经济适用的 EMSA 实验法,该方法可用于 DNA 结合蛋白和其相关的 DNA 结合序列相互作用的特异性竞争反应分析。

关键词: 电泳迁移率(EMSA)实验法; Femu2p-C₂H₂ 蛋白; TTGGGT Box; 特异性竞争反应

中图分类号: Q 816

文献标志码: A

凝胶迁移或电泳迁移率实验(electrophoretic mobility shift assay, 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,是目前检测核转录因子最常用的方法^[1]。传统的电泳迁移率实验为放射性 EMSA^[2]。随着化学和分子生物学技术的发展,先后出现了使用地高辛或生物素标记 DNA 探针的化学发光 EMSA^[3-5]、荧光染料标记 DNA 或对凝胶中的 DNA 或蛋白质进行荧光染色的荧光 EMSA^[6-7]、以及最新的用近红外荧光素 Cy5.5、Cy7、IRDye680、IRDye800CW 标记 DNA 的近红外荧光(near-infrared fluorescence, NIRF) EMSA(NIRF-EMSA)^[8-10]。这些技术虽然灵敏性高,但是具有放射性污染、稳定性差、操作繁琐、成本较高等缺点。因此,探索操作简便、经济有效的 EMSA 技术是必要的。本实验以验证 Femu2p-C₂H₂ 蛋白与其相关的 DNA 结合序列相互作用为例,介绍一种快速有效、经济适用的 EMSA 实验法。

1 材料与方法

1.1 材料

1) Femu2p-C₂H₂ 蛋白是由本实验室保存的。2) 原始序列 TTGGGT Box 是本实验室通过 PCR 中介随机筛选得到的。3) DNA 结合缓冲液试剂——poly(dI-dC)、牛血清白蛋白(BSA)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、HEPES(pH7.5)、KCl、ZnSO₄、MgCl₂、Nonidet-40(NP-40)、二硫苏糖醇(DTT)、甘油、非变性聚丙烯酰胺凝胶(Native-PAGE)试剂——丙烯酰胺、过硫酸铵(APS)、Tris、EDTA、硼酸、TEMED、溴酚蓝(BPB)、Goldview 等试剂的购买于上海生工生物工程技术服务有限公司(简称上海生工),序列合成也在上海生工。电泳仪及电泳槽购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 双链 Box 序列的制备 按照表 1 的序列信息合成 5 对 24 bp 的单链寡核苷酸,其中 Box1 为 TTGGGT Box 四聚体,Box2 为其突变体 CCGGGT Box 四聚体,Box3 为突变体 TTAAGT Box 四聚体,Box4 为突

收稿日期: 2013-08-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31360051、31160050、30860028); 海南重大科技项目(ZDZX2013023-1); 中央级公益性科研院所基本科研业务费(1630052013009、JTBB110507、J130305)

作者简介: 费小雯(1973-)女,四川乐山人,海南医学院,博士,副教授, E-mail: feixw 2000@hotmail.com

通信作者: 邓晓东(1969-)男,博士,微生物生理生化, E-mail: Xiaodong 9deng@hotmail.com

变体 TTGGAC Box 四聚体, Box5 为突变体 TTAAAT Box 四聚体。将 5 对单链(Box1 - p1 和 Box1 - p2, Box2 - p1 和 Box2 - p2, Box3 - p1 和 Box3 - p2, Box4 - p1 和 Box4 - p2, Box5 - p1 和 Box5 - p2) 分别等量混合, 95 °C 变性 5 min, 自然冷却至室温形成 5 个双链 Box(Box1 ~ Box5)。

表 1 EMSA 实验检测 Femu2p-C₂H₂ 蛋白结合寡聚核苷酸序列
Tab. 1 Detection of oligonucleotide sequence of Femu2p-C₂H₂ by EMSA

名称 Name	序列 Sequence
Box1	Box1 - p1 5' - TTGGGT TTGGGT TTGGGT TTGGGT - 3'
	Box1 - p2 5' - ACCCAA ACCCAA ACCCAA ACCCAA - 3'
Box2	Box2 - p1 5' - CCGGGT CCGGGT CCGGGT CCGGGT - 3'
	Box2 - p2 5' - ACCCGG ACCCGG ACCCGG ACCCGG - 3'
Box3	Box3 - p1 5' - TTAAGT TTAAGT TTAAGT TTAAGT - 3'
	Box3 - p2 5' - ACTTAA ACTTAA ACTTAA ACTTAA - 3'
Box4	Box4 - p1 5' - TTGGAC TTGGAC TTGGAC TTGGAC - 3'
	Box4 - p2 5' - GTCCAA GTCCAA GTCCAA GTCCAA - 3'
Box5	Box5 - p1 5' - TTAAAT TTAAAT TTAAAT TTAAAT - 3'
	Box5 - p2 5' - ATTTAA ATTTAA ATTTAA ATTTAA - 3'

1.2.2 双链 Box 与 Femu2p-C₂H₂ 蛋白的结合实验 将双链 Box1 分别与 10, 20, 30, 40 μg 的 Femu2p-C₂H₂ 蛋白混合(以 GST 蛋白作为对照), 并在混合体系中加入 1/10 体积的 DNA 结合缓冲液, 22 °C 结合反应 20 min。加入 1 μL 10 × DNA Loading Buffer, 上样于预先制备好并冷却的 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶^[11] 在冰上, 100 V 电泳至 Loading Buffer 带至胶板 2/3 处(约 1.5 h)。电泳结束, 将凝胶拆出并浸入 0.1 μg · mL⁻¹ 的 Goldview/TBE 溶液中, 室温染色 30 min, 紫外检测。5 个 Box 与 Femu2p-C₂H₂ 蛋白的结合实验——将 5 个双链 Box 与 20 μg Femu2p-C₂H₂ 蛋白结合反应, 方法同上。

2 结果与分析

2.1 双链 Box 序列的获得 5 对 Box 单链引物退火形成 5 个双链 Box, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 1。所有的双链 Box 均为 24 bp, 在琼脂糖凝胶上与其对应的单链相比较, 大小相当, 浓度较高, 表示 5 对双链制备成功。因该退火体系只含目的基因和去离子水, 所以无需纯化即可用于后续结合实验。

2.2 EMSA 检测 Femu2p-C₂H₂ 蛋白与双链 Box 的结合 以 GST 蛋白作为对照, Box1 分别与不同量的 Femu2p-C₂H₂ 蛋白反应, 结果见图 2。对照 GST 蛋白不与 Box1 结合, Femu2p-C₂H₂ 蛋白因含量增加, 凝胶显示阻滞带愈滞后, 表明 Femu2p-C₂H₂ 蛋白与 Box1 成功结合且其结合具有竞争性。

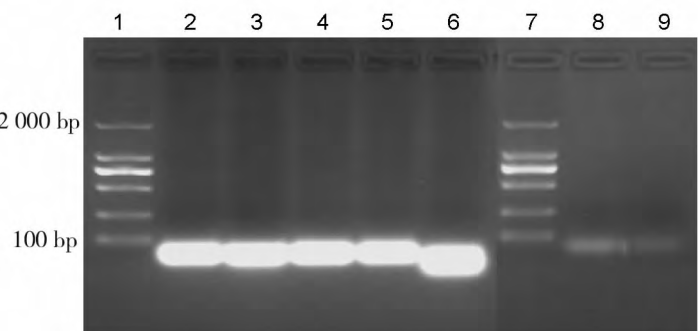


图 1 单链引物退火的琼脂糖凝胶电泳结果

1, 7: Maker DL2000 相对分子质量标准; 2 ~ 6: 分别为双链 Box1, Box2, Box3, Box4, Box5; 8 ~ 9: 单链 Box1 - p1 和 Box1 - p2

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis results of annealed single strand DNA

1, 7: Molecular weight marker DL2000; 2 - 6: The agarose gel electrophoresis results of double strand DNA Box1, Box2, Box3, Box4 and Box5; 8 and 9: single strand DNA Box1 - p1 and Box1 - p2

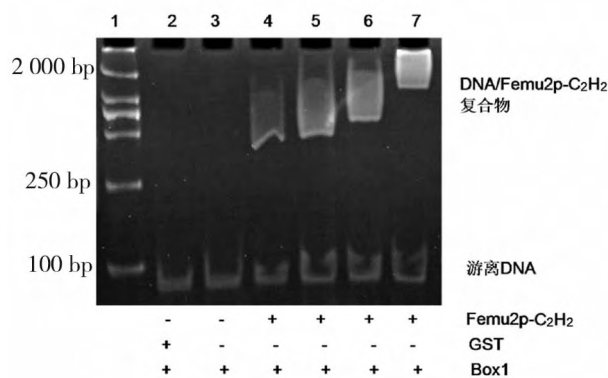


图2 不同量 Femu2p-C₂H₂ 蛋白与 Box1 相互作用的 EMSA 检测

1: Maker DL2000 相对分子质量标准; 2: 对照蛋白 GST (20 μg); 3 ~ 7: 分别为 0, 10, 20, 30 和 40 μg Femu2p-C₂H₂ 蛋白的特异性竞争反应

Fig. 2 The EMSA results of Box1 interacted with different amounts of Femu2p-C₂H₂

1: Molecular weight marker DL2000; 2: CK(20 μg GST); 3 - 7: Specific competitive response of Femu2p-C₂H₂ (0, 10, 20, 30 and 40 μg) and Box1.

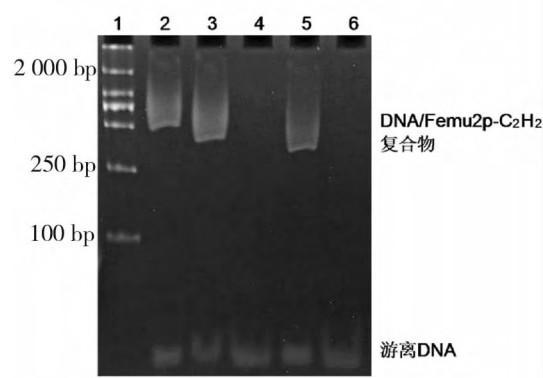


图3 Box1 ~ Box5 与 Femu2p-C₂H₂ 蛋白相互作用的 EMSA 检测

1: Maker DL2000 相对分子质量标准; 2 ~ 6: 分别为双链 Box1 ~ Box5 与 Femu2p-C₂H₂ 蛋白 (20 μg) 反应结果

Fig. 3 The EMSA results of Box1 to Box5 interacted with Femu2p-C₂H₂

1: Molecular weight marker DL2000; 2 - 6: Competitive response of Femu2p-C₂H₂ (20 μg) and Box1 - Box5

Box1 ~ Box5 分别与 Femu2p-C₂H₂ 蛋白进行结合反应, 结果见图 3。Box1, Box2 和 Box4 成功与 Femu2p-C₂H₂ 蛋白结合, 且 Box1 的阻滞带滞后于 Box2 和 Box4, 表明它与 Femu2p-C₂H₂ 蛋白的结合力与特异性强于 Box2 和 Box4; Box3 和 Box5 与 Femu2p-C₂H₂ 蛋白无结合现象产生。

3 结 论

Box1 与梯度含量 Femu2p-C₂H₂ 蛋白的结合反应的结果表明, Femu2p-C₂H₂ 蛋白与 TTGGGT Box 结合, 且该结合具有竞争性, 这也说明该方法可用于蛋白与 DNA 结合的竞争性检测。

Box1 ~ Box5 与 Femu2p-C₂H₂ 蛋白的结合反应的结果显示, Femu2p-C₂H₂ 蛋白与 TTGGGT Box 结合具有特异性。当 TTGGGT Box 突变为 CCGGGT Box 和 TTGGAC Box 时, Femu2p-C₂H₂ 蛋白仍能与之结合, 但在相同实验条件下其结合能力减弱; 当 TTGGGT Box 突变为 TTAAGT Box 和 TTAAAT Box 时, Femu2p-C₂H₂ 蛋白不能与之结合, 这说明 PCR 中介随机筛选的 TTGGGT Box 中核心序列 TGGG 对 Femu2p-C₂H₂ 蛋白的结合具有特异性。本实验结果表明此 EMSA 方法可用于蛋白与 DNA 结合的特异性检测。

近年来关于 EMSA 的报道较多, 技术越来越先进, 但这些技术需要高昂的成本, 且操作繁琐, 并对人体伤害较大。本实验在探索 Femu2p-C₂H₂ 蛋白与其相关的 DNA 结合序列相互作用的过程中, 总结出一套简便的验证蛋白与 DNA 相互作用的 EMSA 实验法, 该方法快速、简便、经济适用, 且对人体无毒害作用, 值得推广应用。

参考文献:

- [1] HELLMAN L M, FRIED M G. Electrophoretic mobility shift assay(EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions [J]. Nat. Protocols, 2007(2): 1849 - 1861.
- [2] WOLF S S, HOPLEY J G, SCHWEIZER M. The application of 33P-labeling in the electrophoretic mobility shift assay [J]. Bio-techniques, 1994, 16: 590 - 592.
- [3] SUSKE G, GROSS B, BEATO M. Non-radioactive method to visualize specific DNA-protein interactions in the band shift assay [J]. Nucleic Acids Res., 1989, 17(11): 4405.
- [4] KASS J, ARTERO R, BAYLIES M K. Non-radioactive electrophoretic mobility shift assay using digoxigenin-ddUTP labeled probes [J]. Dros. Inf. Serv., 2000, 83: 185 - 188.

- [5] MITSUNAGA S , FUKUI K , OHYAMA H , et al. Detection of proteins binding to the promoter region DNA using a nonradioactive gel-retardation assay [J]. Biosci. Biotechnol. Biochem. , 1998 , 62: 1812 – 1814.
- [6] RUSCHER K , REUTER M , KUPPER D , et al. A fluorescence based non-radioactive electrophoretic mobility shift assay [J]. J. Biotechnol. , 2000 , 78: 163 – 170.
- [7] JING D , BEECHEM J M , PATTON W F. The utility of a two-color fluorescence electrophoretic mobility shift assay procedure for the analysis of DNA replication complexes [J]. Electrophoresis , 2004 , 25: 2439 – 2446.
- [8] SANO M , OHYAMA A , TAKASE K , et al. Electrophoretic mobility shift scanning using an automated infrared DNA sequencer [J]. Biotechniques , 2001 , 31: 1056 – 1062.
- [9] GAO J , LIU Y X , WANG J K. Experimental methods of near-Infrared fluorescence electrophoresis mobility shift assay [J]. Letters in Biotechnology 2011 (1) : 71 – 76
- [10] Instruction manual of electrophoretic mobility shift assay using IRDye oligonucleotides. Odyssey Infrared Imaging System. Lincoln , Nebraska 68504 , USA [EB/OL]. [http: //www. licor. com](http://www.licor.com).
- [11] ELSASSER S , SCHMIDT M , FINLEY D. Characterization of the proteasome using native gel electrophoresis [J]. Methods Enzymol. , 2005 , 398: 353 – 363.

A Quick Easy Electrophoresis Mobility Shift Assay Method for Identifying the Interaction Between Femu2p-C₂H₂ Protein and TTGGGT BOX

FEI Xiaowen¹ , WU Xiaoxia² , FAN Xinzha² , DENG Xiaodong²

1. Department of Basic Medicine , Hainan Medical College , Haikou 571101 , China;

2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology , CATAS , Haikou 571101 , China)

Abstract: The electrophoresis mobility shift assay (EMSA) is a standard technique for studying the interaction between proteins and DNA. The progress and advantages and disadvantages of the EMSA technology were briefly analyzed , based on which experiments were designed to improve the EMSA protocol for routine application. A set of quick , convenient and affordable EMSA experimental methods were explored and summarized through combination of Femu2p-C₂H₂ protein and TTGGGT Box including its mutants testing. This method can be used for specific competitive interaction and response analysis of DNA-binding protein and DNA binding sequence.

Key words: EMSA method; Femu2p-C₂H₂ protein; TTGGGT Box; specific competitive response