技术方法

文章编号:1000-5404(2009)04-0368-02

一种基于ODYSSEY红外荧光染料的凝胶迁移滞后实验方法

郝玉通,王虚步,杨学森,张 伟,余争平 (第三军医大学军事预防医学院劳动卫生学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 寻求一种新的凝胶迁移滞后实验(electrophoretic mobility shift assays,EMSA)方法。**方法** 利用先进的ODDSEY红外荧光成像系统,把探针进行了红外荧光的标记,优化了EMSA实验的程序以及时间过程。**结果** 寻找到了一种更加精确安全有效的EMSA方法。**结论** 基于红外荧光染料的凝胶迁移滞后实验安全,方便,效率高,是一种值得推广的新的实验方法。

凝胶迁移滞后实验(electrophoretic mobility shift assays,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。其基本原理是蛋白质可以与末端标记的核酸探针结合,电泳时这种复合物比无蛋白结合的探针在凝胶中泳动的速度慢,即表现为相对滞后。该方法可用于检测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,还可进行未知蛋白的鉴定[1]。近年来,这项技术被广泛应用于转录分子的实验研究。在以往的实验中我们发现,采用化学发光自显影技术的EMSA方法,存在着实验周期长,显影时间不稳定,对实验人员健康有影响等不利因素。因此本实验利用先进的ODYSSEY红外荧光成像系统,优化了EMSA实验的程序以及时间过程,提供了一种更加精确安全有效的EMSA方法。

1 材料与方法

1.1 细胞核蛋白提取

取约3×10^6个N9细胞,5 ml冰PBS冲洗,收集细胞。加入0.25 ml核蛋白提取A液重悬,冰浴15 min;加入25 μl 1% NP-40,震荡10 s;16 000×*g*离心30 s,4 ℃;将沉淀重悬于50 μl核蛋白提取液(配方中含有二硫苏糖醇和蛋白酶抑制剂)中,震荡10 s;置于摇床中冰浴30 min,150次/min;再次震荡30 s,16 000×*g*离心10 min,4 ℃;取上清即为核蛋白,于-70 ℃保存,Lowrry法测定蛋白质浓度。

1.2 制胶及预电泳

制5%的聚丙烯酰胺凝胶,在0.5×TBE中预电泳30 min。(胶大小:8 cm×8 cm×0.1 cm)制胶所用配方如下顺序,分别加入5×TBE 1 ml,双蒸水6.2 ml,30%聚丙烯酰胺1.7 ml,甘油1 ml,10%过硫酸胺100 μl,四甲基二乙胺(TEMED)5 μl。配置胶凝后,拔下梳子,用0.5×TBE冲洗胶孔。然后倒满电泳液,用100伏电压在0.5×TBE电泳液中预电泳30~60 min。

1.3 配置反应体系(通常在预电泳的同时进行)

本实验的探针序列:STAT3(signal transducer and activator of transcription) Consensus Oligonucleotide1: 5′-GATCCTTCTGGGAATTCCTAGATC-3′, 3′-CTAGGAAGACCCTTAAGGA-TCTAG-5′。按照以下配方配制反应混合液:首先加入2 μl 10×的结合缓冲液(包括100 mmol/L Tris, 500 mmol/L氯化钾, 10 mmol/L二硫苏糖醇; pH值为7.5),然后按照次序分别加入2 μl的25 mmol/L含有2.5%吐温20的二硫苏糖醇,Poly (dIdC) 1 μl,1% NP-40 1 μl,100 mmol/L氯化镁($MgCl_2$)2 μl。将上述反应体系加入EP管中,最后加DNA探针进行结合反应,30 ℃孵育20 min。分别按照浓度梯度取2.5、5、10、12.5 μg核蛋白,加入反应混合液,ddH_2O补足20 μl总体积。冷探针:加入1 μl 20 pmol/L未标记探针。

1.4 电泳

加入2 μl 10×Orange Loading Dye,上样后,5%聚丙烯酰胺凝胶100 V电泳约1 h,全程避光。

1.5 扫描

设扫描焦点为3.0 mm,在ODYSSEY红外凝胶成像仪上在700 nm波长扫描。

2 结果

根据预先设计的浓度梯度分别加入2.5、5、10、12.5 μg核蛋白(图1),其中5泳道为100倍的冷竞争探针,6泳道为来自于细胞质的蛋白。我们发现经过微波处理后的细胞出现了明显的STAT3的DNA结合条带,其中在上样核蛋白量为10以及12.5 μg时条带非常清晰。而突变的STAT3寡核苷酸不能竞争抑制STAT3与探针的结合,在来自于细胞质的蛋白中也不出现结合条带。本实验结果说明微波处理可以激活STAT3核转位,在细胞核内发挥功能。

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30470418)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470418)

作者简介:郝玉通,男,河北省张家口市人,博士研究生,主要从事微波生物效应与防护以及高压氧临床治疗方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)65463155, E-mail: tong0979@gmail.com

作者简介:余争平,电话:(023)68752290, E-mail: yuzping@yahoo.com

收稿日期:2008-05-09;**修回日期**:2008-07-15

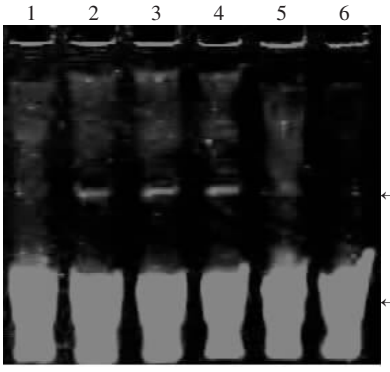


图 1　微波处理后的 STAT3 与 DNA 的结合活性

3　讨论

凝胶迁移或电泳迁移率实验是一种研究 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。既往的实验通常将纯化的蛋白和细胞粗提液和^{32}P 同位素标记的 DNA 或 RNA 探针一同孵育,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据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]。在制备同位素标记的 DNA 或 RNA 方面, DNA 核苷酸探针一般用 g-^{32}P 和 T_4 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。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分析[3]。这种传统的实验方法广泛应用于各种实验室。

LI-COR 生命科学公司的 ODYSSEY 的红外成像检测系统,主要用于双色 Western blot,凝胶 Western blot,微孔板 In-cell Western 分析,蛋白磷酸化双色分析,考马斯亮蓝蛋白凝胶分析,蛋白核酸相互作用检测,2-D 蛋白凝胶分析, BCA 文库分析,cDNA 微阵列分析等[4,5]。本实验利用 ODYSSEY 的红外成像检测系统这-先进的技术平台,将 LI-COR 公司研发的近红外荧光染料标记的 DNA 探针直接和蛋白结合,将抗体通过免疫反应结合到蛋白上,从而使细胞内的蛋白活性具有可见性。

一般的荧光染料激发和检测波长位于可见光范围内,易产生高背景荧光干扰,而红外波长下,常用的膜,生物分子或者药物化合物几乎不发光,这是红外荧光检测的一大优势。良好的信噪比使得该检测方法能够检测出微小的变化。ODYSSEY 红外成像检测系统检测 DNA 结合蛋白的特点在于,拥有高灵敏度,低背景,方法实用简单,大大缩短了实验时间,而且保证了实验人员避免接触同位素和化学荧光燃料的危险。

相比较以往的实验方法,我们的技术具有稳定性好,操作简单方便,结果可靠等非常明显的技术优势。说明我们采用的这一方法是一种非常理想的检测转录分子活性的好方法。

关键词: EMSA;优化;红外

中图法分类号: R394-33　　**文献标识码**: B

参考文献:

[1] Wolf S S, Hopley J G, Schweizer M. The application of ^{33}P-labeling in the electrophoretic mobility shift assay[J]. Biotechniques, 1994, 16(4): 590 - 592.

[2] Chuang Y J, Huang J W, Makamba H, *et al*. Electrophoretic mobility shift assay on poly(ethylene glycol)-modified glass microchips for the study of estrogen responsive element binding[J]. Electrophoresis, 2006, 27(21): 4158 - 4165.

[3] Moxley R A, Jarrett H W. Oligonucleotide trapping method for transcription factor purification systematic optimization using electrophoretic mobility shift assay[J]. J Chromatogr A, 2005, 1070(1-2): 23 - 34.

[4] Geddie M L, O'Loughlin T L, Woods K K, *et al*. Rational design of p53, an intrinsically unstructured protein, for the fabrication of novel molecular sensors[J]. J Biol Chem, 2005, 280(42): 35641 - 35646.

[5] Li Y, Ahmed F, Ali S, *et al*. Inactivation of nuclear factor kappaB by soy isoflavone genistein contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(15): 6934 - 6942.

(编辑　栾　嘉)

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神,血压计量单位恢复使用毫米汞柱(mmHg),但首次使用时应注明 mmHg 与千帕[斯卡](kPa)的换算系数(1 mmHg = 0.133 kPa)。

本刊编辑部