DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.01.056
第23卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 1
2001年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2001


文章编号:1000-5404(2001)01-0119-02

技术方法

# 一种改进的核转录因子的电泳迁移率改变分析法

# A modified electrophoretic mobility shift assay

王 勇,黄文华 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 建立一种简便、实用、成功率高的电泳迁移率改变分析法。方法 参照国内外介绍的实验方法并加以改进,并结合本室的实际情况。主要步骤为核蛋白快速抽提与定量,探针标记与纯化,DNA与蛋白质的结合,电泳及显影。结果 此方法操作时间较短,简化了核蛋白抽提,且省去了繁锁的干胶步骤,图像清晰,有可比性及重复性。结论 此方法本室运用过多次,稳定可靠,值得应用与推广。

电泳迁移率改变分析法(Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)是一种运用非变性聚丙烯酰胺电泳及放射自显影技术分析细胞内核转录因子结合活性的方法。目前国内外的方法操作较繁锁,不易掌握,因此寻找更简便、稳定、可靠的EMSA方法是研究细胞信号转导途径中应重点解决的问题之一。我们参照国内外介绍的实验操作技术,结合本室的情况,经反复实践与摸索,建立了一种简便、经济、稳定、成功率高的EMSA操作方法,现介绍如下,并与其它的方法进行了简要的对比。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂及配制

1.1.1 缓冲液 A:10 mmol/L Hepes-NaOH(pH7.8)。15 mmol/L KCl, 1 mmol/L $MgCl_2$。0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 1 μg/ml Leupeptin。B:20 mmol/L Hepes-NaOH(pH7.9)。1.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.42 mol/L NaCl, 0.2 mmol/L EDTA, 25%甘油, 0.5 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF, 1 μg/ml Leupeptin。

1.1.2 DNA结合缓冲液 1 mol/L Tris-HCl(pH8.0) 10 μl, 1 mol/L NaCl 50 μl, 0.5 mol/L EDTA(pH8.0) 1 μl, 1 mol/L DTT 1 μl, 1 mol/L $MgCl_2$ 1 μl, 甘油40 μl, Poly(dI-dC)(1 μg/μl) 25 μl。无核酶双蒸水872 μl→总体积1 000 μl。

### 1.2 操作步骤及方法

1.2.1 核蛋白抽提 ①细胞(1~5)×$10^6$,用PBS(pH7.2)洗1次,以下在4 ℃左右操作。②弃上清,细胞压积加缓冲液A 100 μl,混悬,冰上肿胀15 min,再加10% NP-40 10 μl,涡动10 s。③10 000× g,离心20 s(室温)。④仔细弃全部上清,加缓冲液B 50~100 μl,混悬,冰浴30 min,间以搅拌。⑤4 ℃,12 000× g,4 min,吸取上清,分装,-70 ℃保存。

1.2.2 核蛋白定量 参照本室改进的Branford酶标仪蛋白定量法,步骤略。

1.2.3 探针标记 分别设A、B两管,如下:

| | A | B |
|---|---|---|
| 寡聚核苷酸单链探针 | $P_1$ 1 μl=10 pmol | $P_2$ 1 μl |
| $T_4$ 多聚核苷酸激酶(Promega) | 1 μl=10 u | 1 μl=10 u |
| 10×$T_4$ buffer | 2 μl | 2 μl |
| γ-$^{32}$P-ATP | 2.5 μl=25 μCi(比活度:5000 Ci/mmol) | 2.5 μl |
| 无核酶 $ddH_2O$ | 13.5 μl | 13.5 μl |

两管于37 ℃孵化1 h,68 ℃、10 min灭活$T_4$多聚核苷酸激酶,再将两管混合,37 ℃ 1 h以结合成双链探针,-20 ℃保存。

1.2.4 探针的同位素掺入率 步骤略。

1.2.5 乙醇沉淀法纯化探针 步骤略。

1.2.6 探针与核蛋白的结合及电泳

| 样本测定管: | 特异性竞争管: |
|---|---|
| DNA结合缓冲液16 μl | DNA结合缓冲液16 μl |
| 核蛋白3 μg | 核蛋白3 μg |
| 标记探针1 μl=1 ng | 未标记探针1 μl=100 ng |
| 37 ℃ 30 min | 37 ℃ 10 min |
| ↓ | ↓ |
| 加上样buffer 4 μl,总体积25 μl | 加1 μl标记探针,继续孵育20 min后,再加3 μl上样buffer,总体积25 μl |

5%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳缓冲液为0.25× TBE, pH8.3,电压110 V,电流15 mA,稳流稳压,电泳100 min或溴酚蓝在凝胶中部时停止电泳。

1.2.7 显影 用保鲜膜包好,暗室内压片,-70 ℃过夜后,显影、定影、水洗、晾干。

## 2 结果

用Branford法蛋白定量,核蛋白的产量为50~60 μg/$10^6$细胞。经Beckman液体闪烁计数仪测量,探针的同位素掺入率为68%,标记探针的放射性强度为(24~36)×$10^5$ Bq。

EMSA图像显示,有浓黑的标记探针自由带及深浅不一的DNA-蛋白质结合带。样本中无核蛋白的阴性对照仅有自由带,无结合带。特异性竞争中结合带消失,表明该探针与核蛋白的结合是特异的,其后不同的灰度及面积的结合带提示了相应的核转录因子活性的差异,见图1、2。

作者简介:王 勇(1970-),男,湖南省吉首市人,硕士,主治医师,主要从事烧伤免疫方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68754135
收稿日期:2000-03-15;修回日期:2000-10-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

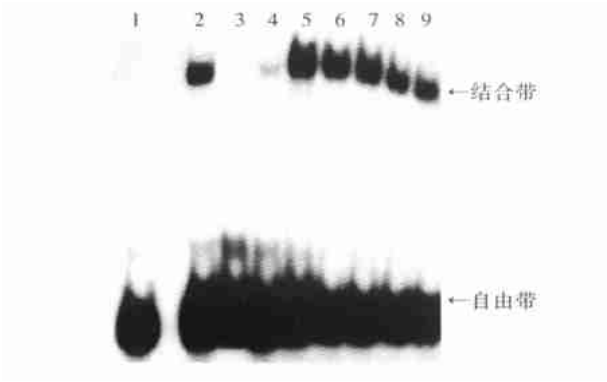



图 1 严重烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞内 NF-κB 的活性
1: 阴性对照; 2: 非特异性竞争; 3: 100 倍特异性竞争; 4: 正常对照; 5: 伤后 2 h; 6: 伤后 6 h; 7: 伤后 12 h; 8: 伤后 24 h; 9: 伤后 48 h

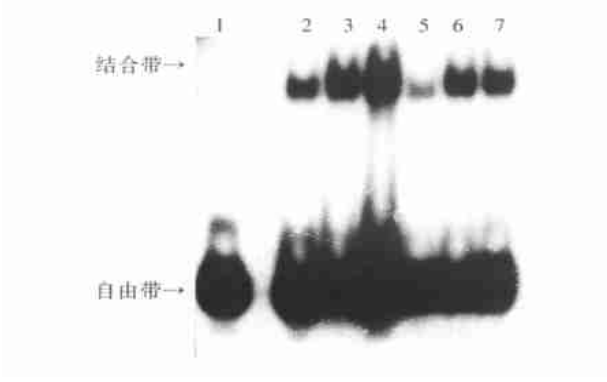



图 2 严重烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞内 AP-1 的活性
1: 阴性对照; 2: 正常对照; 3: 伤后 2 h; 4: 伤后 6 h; 5: 伤后 12 h; 6: 伤后 24 h; 7: 伤后 48 h

## 3 讨论

核转录因子(Nuclear transcription factor)是一类蛋白质,它们可与某些基因启动子(Promotor)区和增强子(Enhancer)区上的固定核苷酸序列相结合而启动基因的转录。常见的有 NF-κB、AP-1、CREB、$SP_1$ 等。目前,检测核转录因子活力最常用的方法为 EMSA,其基本原理为:具有 DNA 结合能力的核转录因子与特定序列的 DNA 探针结合而形成 DNA 蛋白质复合物,使其电泳迁移率减慢,于是在放射自显影的 X 光胶片上出现一条较游离探针带滞后的新条带,并可根据滞后的条带的强弱对样品中转录因子的活性进行半定量分析[1]。一个较完整的 EMSA 操作过程应包含核蛋白的抽提及定量,探针的标记与纯化,探针与蛋白质的结合,电泳与显影等。下面将某些技术改进处与旧的方法作简要的比较:①核蛋白抽提:我们曾用 Dignam[2] 的方法抽提过核蛋白,但在操作中发现,该法有几个缺点,比如操作时间长,需 1 d 时间。高速离心 4 次,每次至少 20 min。细胞需要量大,至少> $10^7$ /样本,且需繁琐的透析沉淀。哪一步稍有不慎,可导致整个核蛋白抽提失败。后来,我们参照 Andrews[3] 的方法并加以改进,建立了一种新的核蛋白抽提法,整个操作过程需 100 min,只要 2 个缓冲液,细胞数可减少至 $1\times 10^6$ /样本,产量与 Andrews 相当,每 $10^6$ 个细胞可收获 50 μg 核蛋白。②Poly(dI-dC)的用量:Poly(dI-dC)为探针聚合的模板,可催化探针与核蛋白结合。目前国内外多用 1~2 μg /样本,Promega 公司技术指南提示在 10 μl 的反应体系中用 0.5 μg。由于此试剂较贵,我们参照 Shenkar[4] 的方法,经多次实验发现,在 25 μl 反应体系中含 0.4 μg Poly(dI-dC)时图像较好。与 Promega 的方法相比,EMSA 的图像质量无明显差异,而 Poly(dI-dC)的用量减少了 7/10。这样,可节约实验的经费,最大限度地利用了试剂。③干胶:国内外常在电泳完后将凝胶经干胶机干燥后,压片,超低温放射自显影。我们在实验中发现干胶的步骤较繁锁。如冰醋酸的浸泡,滤纸的干燥,且需使用干胶机。但干胶机在一般的实验室并不具备。由于用于自显影的 $^{32}P$ 发射出的 β 粒子具有足以穿透深 6 mm 的水或塑料及完全穿透 X 线片的能量(1.7 MeV),所以,可将干胶的步骤省略。④自显影:我们用保鲜膜代替 Saran 包装膜,在曝光于底片前首先用保鲜膜将凝胶覆盖(注意勿使有大的气泡生成)。

在实验中,我们体会到 EMSA 成败的关键在于探针的标记。一般来讲,标记探针的放射性强度最好大于 $15\times 10^5$ Bq/μl,这样,在 DNA-蛋白质结合带上可清晰地看到较强的显影及差异。最初,我们曾用 Promega 公司的双链探针 NF-κB、AP-1,按 Promega 提供的技术指导标记探针。先后标记了 3 次,每次探针的放射性强度只有 $3\times 10^5$ Bq 以下,结合带上未见或仅见很淡的显影(失败的原因有待进一步研究)。后来,受到有关文献的启示[5],我们改为先标记单链探针,再将 5' 端标记上 $\gamma$-$^{32}$P-ATP 的两条互补单链探针溶液混在一起,37 ℃孵化 1 h,以结合为双链探针,这样,极大提高了探针的放射性强度,一般可达(24~36)$\times 10^5$ Bq/μl,保证了每次实验的成功。

关键词: 电泳迁移率改变分析法; 核转录因子; NF-κB
中图法分类号: R446.6 文献标识码: B

参考文献:

[1] 刘 浩, 刘志红, 章 精, 等. 雷公藤内酯醇降低 T 淋巴细胞核因子-κB 的活性[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1998, 7(4): 312-315.
[2] Dignam J D, Lebovitz R M, Roeder R G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluable extract from isolated mammalian nuclei [J]. Nucleic Acids Res, 1983, 11(5): 1 475-1 489.
[3] Andrews N C, Faller D V. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(9): 2 499.
[4] Shenkar R, Schwartz M D, Terada L S, *et al*. Hemorrhage activates NF-κB in murine lung mononuclear cells *in vivo*[J]. Am J Physiol, 1996, 270(5 Pt1): L 729-735.
[5] 蔡恩齐, 陈正堂, 伍伟玲. 脂多糖和抗炎药物对肺血管内巨噬细胞核因子 κB 的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1999, 22(5): 283-286.

(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net