

# Homework 2

张广欣 2000012272

2022 年 11 月 30 日

使用 FUS-Gal4 融合蛋白进行凝胶迁移实验，并对实验结果进行半定量分析，体会蛋白质对不同底物的选择性，学习凝胶迁移实验的基本原理与各项操作。

## 题目 1.

简述凝胶迁移实验（EMSA）的实验原理

## 解答.

凝胶迁移实验是在聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶上对蛋白质-DNA 或蛋白质-RNA 复合物进行短时间电泳分离。控制对照组（在这里选用的是一段随机序列的 DNA）将显示几乎没有和蛋白质结合的 DNA（RNA）片段对应的单个条带。

如果蛋白质能够与核酸片段结合，存在复合物的泳道中的条带代表的是与蛋白质结合的质量更大、流动性更小的核酸探针复合物，在凝胶上向上“移动”（因为它移动得更慢了）。

在理想条件下，DNA（或 RNA）和蛋白质之间的相互作用是稳定的，凝胶上结合核酸与未结合核酸的比率反映了该结合反应进入凝胶时游离和结合探针分子的比例。这种稳定性部分是由于“笼罩效应（caging effect）”，因为被凝胶基质包围的蛋白质在重新结合之前无法从探针扩散开。

如果蛋白质和探针的初始浓度已知，并且复合物的化学计量已知，则可以确定蛋白质对核酸序列的表观亲和力。除非复合物在凝胶条件下寿命很长，或者考

虑了电泳过程中的解离，否则得出的数字是表观  $K_d$ 。如果蛋白质浓度未知但复杂的化学计量是已知的，则可以通过增加 DNA 探针的浓度来确定蛋白质浓度，直到进一步增加不会增加蛋白质结合的分数的。通过与在同一凝胶上运行的一组游离探针的标准稀释液进行比较，可以计算出蛋白质的摩尔数。

## 题目 2.

对 FUS-Gal4 蛋白的 EMSA 实验胶图进行分析，利用实验结果估算该蛋白的平衡解离常数

解答.

### 1. 对胶图的分析:

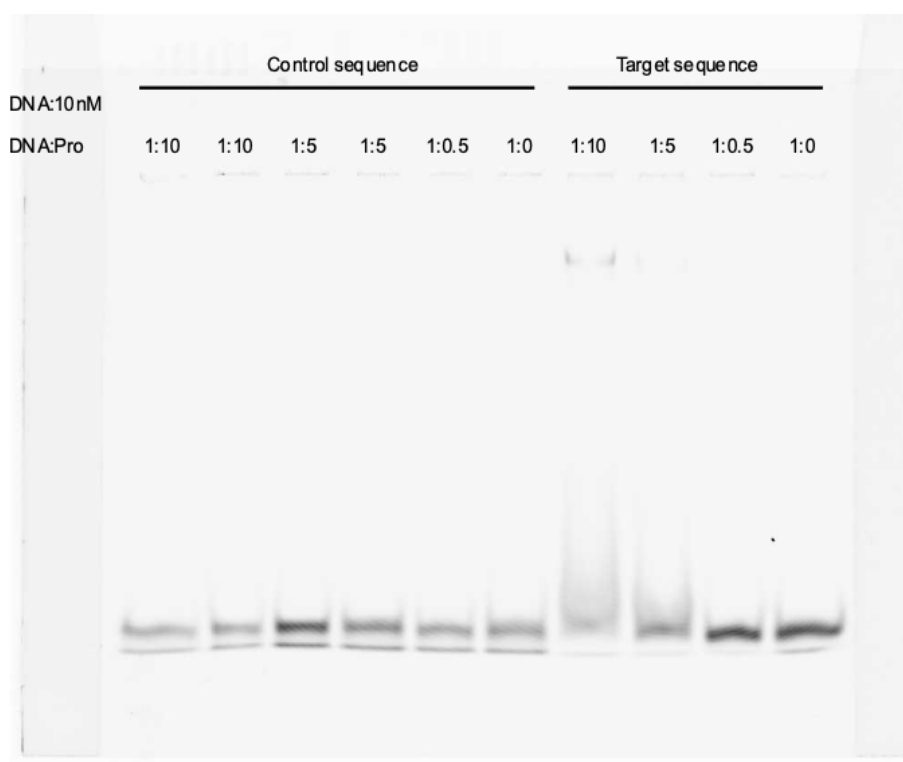


图 1: 实验所得胶图

其中，Target sequence 包含了 FUS-ERG 蛋白的高亲和序列 GGAA，因此其

与 FUS-Gal4 蛋白的结合能力更强。Control sequence: 是随机序列, 与 FUS-Gal4 蛋白亲和性更弱。

胶图中的 Control sequence 部分 [DNA]:[Pro] 的不同没有发生肉眼可查的变化, 印证了随机序列与该蛋白的亲合力远小于 Target sequence, 这是合理的。

从胶图中 Target sequence 部分可以看出, FUS-Gal4 蛋白和 Target sequence 的结合能力不强, 在 [DNA]:[Pro] = 1:5 时才能观察到比较弱的结合, 在 [DNA]:[Pro] = 1:10 时才能观察到比较明显的结合。由 EMSA 原理可知, DNA-蛋白质复合物在胶图中处在偏上的位置, 结合较好的泳道中可以看到明显的阴影, 下方会观察到“长尾”, 认为是 DNA-蛋白质复合物在加入凝胶后, 由于外界环境的影响发生的解离, 该胶图的最下方与其他泳道对应处, 为迁移速率正常, 即没有与蛋白质结合的 DNA。之后的解离常数据此计算。

## 2. 解离常数 $K_d$ :

在这里, 认为 Target DNA 与 FUS-Gal4 蛋白的反应为:  $[DNA] + [Pro] \rightleftharpoons [DNA-Pro]$  则:  $K_d = \frac{[DNA][Pro]}{[DNA-Pro]}$

选取 Target DNA 和蛋白质比例为 1:10 的情况进行计算:

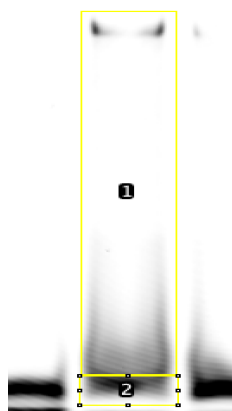


图 2: Target Sequence: [DNA] = 10 nM , DNA:Protein = 1:10

- (1) 使用 Fiji 软件修改胶图的对比度以方便观察
- (2) 除去背景噪音

(3) 圈定泳道中, 区域 2 为没有结合蛋白的 DNA, 区域 1 代表刚将混合溶液加入凝胶时的 DNA-蛋白质复合物, 其在凝胶中进行电泳时, 有一部分受到环境的影响发生解离。(要计算该反应的平衡解离常数, 我认为应考虑该体系刚刚加入凝胶时的平衡状态, 因此上述划分是合理的)

(4) 测量每个区域的平均灰度值和面积

$$\text{结合蛋白质的 DNA 占比: } \frac{2.776*1023.447}{2.776*1023.447+0.218*6910.689} = 0.6535$$

$$K_d = \frac{[DNA][Pro]}{[DNA-Pro]} = \frac{((1-0.6535)*10*10^{-9})*(10*10*10^{-9}-10*10^{-9}*0.6535)}{10*10^{-9}*0.6535} = 4.9557*10^{-8}M$$

### 参考文献

- [1] Ausubel, Frederick M. (1994). Current Protocols in molecular biology. Chichester: John Wiley Sons. pp. 12.2.1-11.
- [2] Fried MG, Liu G (1994). "Molecular sequestration stabilizes CAP- DNA complexes during polyacrylamide gel electrophoresis". Nucleic Acids Research. 22 (23): 5054-5059.
- [3] Fried MG (1989). "Measurement of protein-DNA interaction parameters by electrophoresis mobility shift assay". Electrophoresis. 10 (5-6): 366-376.