

Gel Shift Assay Systems

日本語プロトコール No. TB110J

2000年9月作製

カタログ番号 E3050 および E3300

目次

I.	はじめに	2
II.	キットの構成部品	2
III.	コンセンサスオリゴヌクレオチドの標識	
	A. オリゴヌクレオチドのリン酸化	3
	B. 取り込み率の決定	3
IV.	取り込まれていないラベルの除去	
	A. クロマトグラフィー	4
	B. エタノール沈殿	4
V.	ゲルシフトアッセイ	
	A. ゲルの調整	5
	B. HeLa Nuclear Extractを用いたDNA結合反応	6
	C. AP2 Extractを用いたDNA結合反応	7
	D. DNA-タンパク質複合体の電気泳動	7
VI.	コントロール反応の予想される結果	8
VII.	精製した転写因子を用いるゲルシフトアッセイ	8
VIII.	トラブルシューティング	9
IX.	参考文献	13
X.	付録	
	A. バッファーおよび溶液の組成	14
	B. 転写因子の特徴	14
	C. 関連製品	15
XI.	簡易プロトコール	16

I. はじめに

ゲルシフトアッセイ、あるいは電気泳動移動度シフト(electrophoretic mobility shift)アッセイは、DNA結合タンパク質を検出するための簡単かつ迅速な手法です(1)。この手法は、転写因子のような配列特異的DNA結合タンパク質の研究において広く使われています。このアッセイは、タンパク質-DNA複合体がフリーのDNA断片(あるいは2本鎖オリゴヌクレオチド)より非変性ポリアクリルアミドゲルにおける移動度がより小さいという観察に基づいています。ゲルシフトアッセイは精製したタンパク質、あるいはタンパク質の複雑な混合液(例えば核または細胞抽出液)を、タンパク質結合サイトと考えられる配列を含む³²Pで末端標識されたDNA断片とインキュベートすることで行ないます。反応産物はそれから非変性のポリアクリルアミドゲルで分析されます。結合サイトと思われる配列に対するDNA結合タンパク質の特異性は、試験するタンパク質への結合サイトを含むDNA断片またはオリゴヌクレオチド、あるいは他の関係ないDNA配列を用いてコンペティション試験をすることによって決定されます。

プロメガは、標的オリゴヌクレオチド、DNA結合タンパク質を含むコントロール抽出液、結合バッファー、およびオリゴヌクレオチドのリン酸化試薬を含む“Gel Shift Assay Systems”を開発しました。コアシステムには組み換えAP2タンパク質を含む大腸菌抽出液(AP2 Extract)およびAP2コンセンサスオリゴが含まれます。AP2は結合活性が安定しており、強いゲルシフトを起こすので、ゲルシフトアッセイを経験するための信頼できるシステムです。さらに、コアシステムにはSP1 Consensus Oligo、Gel Shift Binding 5 × Buffer、および20回のコントロール反応に十分なHeLa Nuclear Extractが含まれます。完全版のシステムには、特定された結合サイトのコンセンサス配列にあたる、さらに5つの2本鎖オリゴヌクレオチドが含まれます(セクションX.B、表3)。これらのオリゴヌクレオチドは、末端標識が可能で、タンパク質特異的プローブまたはコンペティション試験における特異的あるいは非特異的コンペティターDNAとしてお使いいただけます。

II. キットの構成

製品名	カタログ番号
Gel Shift Assay Core System	E3050

各キットには20回のコントロールアッセイ用の抽出液を含む100回分のゲルシフトアッセイに十分な試薬が含まれます。

• 40µl	HeLa Nuclear Extract	• 100u	T4 Polynucleotide Kinase (PNK)
• 100µl	T4 Polynucleotide Kinase 10X Buffer	• 200µl	Gel Shift Binding 5X Buffer
• 20µl	AP2 Extract	• 35pmol	AP2 Consensus Oligo (1.75pmol/µl)
• 35pmol	SP1 Consensus Oligo (1.75pmol/µl)	• 1	Protocol

製品名	カタログ番号
Gel Shift Assay System	E3300

各キットにはGel Shift Assay Core Systemの全ての試薬に加え、次のコンポーネントが含まれます。

• 35pmol	AP1 Consensus Oligo (1.75pmol/µl)	• 35pmol	OCT1 Consensus Oligo (1.75pmol/µl)
• 35pmol	CREB Consensus Oligo (1.75pmol/µl)	• 35pmol	NF- B Consensus Oligo (1.75pmol/µl)
• 35pmol	TFIID Consensus Oligo (1.75pmol/µl)	• 1	Protocol

保存条件 : HeLa Nuclear Extract と AP2 Extract は分注して -70 に保存し、繰り返し凍結 / 融解しないでください。その他の構成部品は-70 か-20 に保存してください。すべての構成部品は適正な保存および取り扱いをしていただいた場合、購入後から少なくとも6ヶ月は安定です。

III. コンセンサスオリゴヌクレオチドの標識

準備するもの

(溶液の組成はセクションX.Aに説明があります)

- [γ - 32 P]ATP (3,000Ci/mmol at 10mCi/ml)
- 0.5M EDTA
- TEバッファ
- 0.5M Na₂HPO₄ (pH 6.8)
- Whatman® DE81 2.3cm circular filters
- Nuclease-Free Water (カタログ番号P1193)

A. オリゴヌクレチドのリン酸化

1. 滅菌した微量遠心チューブに以下の反応液を用意する。

Consensus Oligonucleotide (1.75pmol/μl)	2μl
T4 Polynucleotide Kinase 10X Buffer	1μl
[γ - 32 P] ATP (3,000Ci/mmol at 10mCi/ml)	1μl
Nuclease-Free Water	5μl
T4 Polynucleotide Kinase (5–10u/μl)	1μl
トータル液量	10μl

2. 37 °Cで10分間インキュベート。
3. 0.5M EDTA、1μlを加え反応を止める。
4. 89μlのTEバッファを加える。望まれる場合は次のセクションに記載される方法で標識反応液の一部を取り、取り込み率を決定する。行なわない場合は、直接セクションIVに進む。

B. 取り込み率の決定

1. 1μlの標識オリゴヌクレオチド(セクションIII.Aから)を4枚のWhatman® DE81 2.3cm circular filtersにそれぞれスポットする。
2. フィルターを熱ランプの下で短時間乾かす。2枚のフィルターはサンプル中のトータルカウントの測定用に用いる。
3. 他の2枚のフィルターは50mlの0.5M Na₂HPO₄ (pH 6.8)で5分間ずつ2度洗い、取り込まれなかったRIを除去する。
4. 洗浄したフィルターを熱ランプの下で乾かす。
5. フィルターをそれぞれのバイアルに入れ、適当な液体シンチレーションカクテルを加え、シンチレーションカウンターでカウントする。
6. トータル量および取り込み量のそれぞれのフィルターにつき、カウントの平均値を計算する。

$$\text{取り込み率} = \frac{\text{取り込まれた cpm 値}}{\text{全 cpm 値}} \times 100$$

上記のラベリング条件では、5'末端標識反応により通常50%以上のRIが取り込まれます。取り込み率が30%以上のオリゴヌクレオチドを使用することをお勧めします。取り込み率が30%未満の場合は、ゲルシフトアッセイで弱いシグナルしか得られない可能性があります。上記の方法以外のラベリング条件を用いる場合は標識されていることを確認するために比活性を求めることを推奨します。標識オリゴヌクレオチドの比活性は、10~100fmolあたり5,000~20,000cpmが理想です。

備考: すでにこのキットを使用したことがある方のためにこのプロトコールの最後に簡易プロトコールがあります。

備考: 高い比活性を持つプローブが必要な場合は、末端との比率が1:1となる10μlの反応当たり2.2μlまでATP量を増やすことができます。

IV. 取り込まれていないラベルの除去

準備するもの

(溶液の組成はセクションX.Aにあります)

- G-25スピンカラム
- 酢酸アンモニウム (5Mと1M)
- 100%エタノール
- TEバッファー

DNAプローブから取り込まれていないヌクレオチドを除去するステップはオプションですが、ゲルシフトの質を改善する可能性があります。ただし、小さいサイズのオリゴヌクレオチド(18mer未満)をエタノール沈殿した場合、低い回収率しか得られない可能性があります。そのため、このようなオリゴヌクレオチドの精製にはクロマトグラフィーを使うことを推奨します。大きなサイズのオリゴヌクレオチドやDNA断片は、エタノール沈殿で精製できます。

A. クロマトグラフィー

ラベルされたオリゴヌクレオチドは、TEバッファーで平衡化したG-25スピンカラムを用いるクロマトグラフィーで取り込まれていないヌクレオチドから分離することができます(1)。

B. エタノール沈殿

1. 1/4量の5M酢酸アンモニウムをセクションIII.Aステップ4のサンプルに加え、混合する。
2. 2倍量の100%エタノールを加え、混合する。 -70°Cに1時間置く。 -20°Cで一晩インキュベートすると回収率を上げることができます。
3. 12,000 × gで30分間遠心する。上清を注意しながら取り除く。
4. DNAを100µlの1M酢酸アンモニウムに再懸濁し、攪拌する。
5. 上記のステップ2、3の記述のようにエタノール沈殿と遠心を行なう。
6. 沈殿を真空乾燥する。DNAペレットを100µlのTEバッファーに懸濁する。必要な場合は、1µlのオリゴヌクレオチドをシンチレーションカウンターでカウントする。標識オリゴヌクレオチドプローブは-20°Cで保存できます。Gel Shift Assayでは標識直後のオリゴヌクレオチドを用いることが重要です。

V. ゲルシフトアッセイ

新しいIDNA結合活性を調べている場合は、このアッセイの全てのパラメーターの最適化が必要となることがあります。これらのパラメーターには、抽出液の調整(プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、ホスファターゼのコンタミにより標的タンパク質やプローブDNAが分解されることがある)、結合条件(塩濃度、温度、pH、および結合活性への亜鉛やカドミウムなどの金属イオンの必要性など)、界面活性剤の添加、ゲルの泳動条件(pH、温度、ポリアクリルアミドの濃度、およびイオン強度など)が含まれます。これらのポイントについて書かれた包括的な実験デザインの例には、参考文献の(2)をご参照ください。

準備するもの

(溶液の組成はセクションX.Aにあります)

- 4% 非変性アクリルアミドゲル(表1を参照)
- Nuclease-Free Water (カタログ番号P1193)
- gel loading 10 × バッファー
- TBE 0.5 × バッファー

A. ゲルの調整

セクションV.BおよびV.C(下記)の反応は、Novex™ 6% DNA retardationゲルを用いて解析できます。代わりの方法として、これらの反応を10 × 12cm、厚さ0.75mmの非変性4%アクリルアミドゲルで解析することもできます。様々なDNA-タンパク質複合体の解析のため、他のサイズのゲルを用いることもできます。表1にしたがってゲルを調整してください。すべてのガラスプレートの洗浄は蒸留水のみで行なってください。プレートにイオン性界面活性剤が付着していないことが重要です(例: SDS)。

表1. ゲルの組成 (20ml) : 4% アクリルアミド、60:1 アクリルアミド: ビスアクリルアミド

組成	容量
TBE 10 × バッファー	1.0 ml
37.5:1 アクリルアミド/ビスアクリルアミド (40%,w/v)	1.25 ml
40% アクリルアミド (w/v)	0.75 ml
80% グリセロール	625 µl
dH ₂ O	16.2 ml
TEMED*	10 µl
10% APS**	150 µl

*N,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine

**ammonium persulfate (dH₂O では 10% in distilled water)

備考: アクリルアミドとビスアクリルアミドの比率が60:1のゲルは非常に柔らかく、重合に時間がかかるため、最適な結果を得るためには一晩かけて重合させてください。40:1の比率のゲルもお使いいただけます(1)。この配合ではよりしっかりとしたゲルが作れることと、重合の時間が少なくて済む(1~2時間)という利点があります。

B. HeLa Nuclear Extract を用いた DNA 結合反応

下記の例では、SP1コンセンサスオリゴをHeLa Nuclear Extractに含まれるSP1結合活性を検出するためのプローブとして用いています。同様の反応を別のコンセンサスオリゴを用いてもセットアップできます。プロメガでは4つの反応のセットアップを推奨します。ネガティブ・コントロール、ポジティブ・コントロール、および結合の特異性を示すための2つのコンペティションアッセイです。

1. 滅菌した微量遠心チューブに下記の順番でコンポーネントを加え反応液を調整する。

反応 #1 (ネガティブ・コントロール)	反応 #2 (ポジティブ・コントロール)
7µl Nuclease-Free Water	5µl Nuclease-Free Water
2µl Gel Shift Binding 5 × Buffer	2µl Gel Shift Binding 5 × Buffer
0µl HeLa Nuclear Extract	2µl HeLa Nuclear Extract
9µl トータル液量	9µl トータル液量
反応 #3 (特異的コンペティター)	反応 #4 (非特異的コンペティター)
4µl Nuclease-Free Water	4µl Nuclease-Free Water
2µl Gel Shift Binding 5 × Buffer	2µl Gel Shift Binding 5 × Buffer
2µl HeLa Nuclear Extract	2µl HeLa Nuclear Extract
1µl 非標識コンペティターオリゴ (1.75pmol) (例: SP1 Consensus Oligo)	1µl 非標識ノンコンペティターオリゴ (1.75pmol) (例: AP2 Consensus Oligo)
9µl トータル液量	9µl トータル液量

2. 反応液を室温で10分間インキュベートする。次に、1µlの³²P標識されたSP1 Consensus Oligoを各反応に加える。
3. 反応液を室温で20分間インキュベートする。
4. 1µlの室温のgel loading 10 × バッファーを各反応液に加え、反応産物をセクシオンV.Dの記述にしたがい解析する。

備考: gel loading バッファー中のダイは、タンパク質のDNAへの結合を妨げる可能性があります。このような結合障害が起こった場合は、gel loading バッファーをネガティブコントロールにのみ加えることをお勧めします。

備考: 実験の再現性を高めるためにはインキュベーション温度をコントロールすることを推奨します。

C. AP2 Extract を用いた DNA 結合反応

4つの反応のセットアップを推奨します。ネガティブコントロール、ポジティブコントロール、および結合の特異性を示すための2つのコンペティションアッセイです。

1. 滅菌した微量遠心チューブに下記の順番でコンポーネントを加え反応液を調整する。

反応 #1 (ネガティブコントロール)	反応 #2 (ポジティブコントロール)
7µl Nuclease-Free Water	6µl Nuclease-Free Water
2µl Gel Shift Binding 5 × Buffer	2µl Gel Shift Binding 5 × Buffer
0µl AP2 Extract	1µl AP2 Extract
9µl トータル液量	9µl トータル液量

反応 #3 (特異的コンペティター)	反応 #4 (非特異的コンペティター)
5µl Nuclease-Free Water	5µl Nuclease-Free Water
2µl Gel Shift Binding 5 × Buffer	2µl Gel Shift Binding 5 × Buffer
1µl AP2 Extract	1µl AP2 Extract
1µl 非標識コンペティターオリゴ (1.75pmol) (例: AP2 Consensus Oligo)	1µl 非標識ノンコンペティターオリゴ (1.75pmol) (例: SP1 Consensus Oligo)
9µl トータル液量	9µl トータル液量

2. 反応液を室温で10分間インキュベートする。次に、1µlの³²P標識したAP2 Consensus Oligoを各反応に加える。
3. 反応液を室温で20分間インキュベートする。
4. 1µlの室温のgel loading 10 × バッファーを各反応液に加え、反応産物をセクションDの記述にしたがい解析する。

備考: 実験の再現性を高めるために、インキュベーション温度をコントロールすることをお勧めします。

D. DNA-タンパク質複合体の電気泳動

1. 4%のゲルを用いる場合は、0.5 × TBE バッファー中で350V、10分間、サンプルをロードする前に泳動する。Novex™ 6% DNA retardationゲルを用いる場合は、前もって泳動する必要はありません。サンプルをロードした後、4%ゲルでは0.5 × TBE バッファー中で350V、6% DNA retardationゲルでは0.5 × TBE バッファー中で、250~350Vで室温でbromophenol blueダイがゲルの4分の3の位置に来るまで泳動する。20分はかかりません。ゲルの温度は30 未満に維持する。
2. ゲルプレートを開き、ゲルをWhatman® 3MM filter paperに載せる。プラスチックラップで覆い、ゲルドライヤーで乾かす。ゲルを増感紙を用いて-70 で1時間から一晩X線フィルムに感光させる。あるいは、ホスフォイメージャーなどでゲルを解析する。

備考: ここに記載されている泳動条件はプロメガのAP2およびSP1 Consensus Oligosを用いたシフト用に最適化されています。その他の因子やDNAプローブは、全く別の条件を必要とする可能性があります。新しいシステムを試されるときは、常に泳動条件と露出時間を最適化することをお勧めします (2)。

VI. コントロール反応からの予想される結果

1. 結合していないコンセンサスオリゴはダイフロントの近くを流れます。
2. 複合体が特異的な場合は、非標識の特異的コンペティターの添加によりバンドの強さの減少が見られます。非標識の非特異的コンペティターの存在下では、特異的なバンドは残るはずです。
3. 非特異的複合体は、特異的コンペティターの存在下で残るか、不特定のDNAの添加によりバンドの強さが減少します。
表2は、HeLa抽出液を異なるコンセンサスオリゴでインキュベートしたときの予想されるバンドパターンを表します。

表2. HeLa Nuclear Extracts をそれぞれのコンセンサスオリゴとインキュベートしたときの予想されるバンドパターン

コンセンサスオリゴ	予想される結果
AP1	コンペティター(配列特異的)の非存在下では1つのシフトした主要なバンド
AP2	弱い配列特異的なバンド CREB 配列特異的なゲルシフトが起こる。1つまたは2つのバンド
NF- B	複数の配列特異的なバンドが見られる*
OCT1	少なくとも1つの配列特異的なバンドが見られる。1つまたは2つのバンド
SP1	1つの非常に際立った配列特異的なバンドが、1つか2つのバンドと共に見られる
TFIID	非常に弱いバンドが見られる。しかし、TFIID 配列特異的バンドとの確認はない

*これらのバンドの強さは非標識のNF- Bオリゴの添加により減少する。

VII. 精製した転写因子を用いるゲルシフトアッセイ

精製した転写因子を使う場合は、前述のゲルシフトのプロトコールの修飾が必要となる可能性があります。プロメガではセクションVのプロトコールを少し変えただけで、プロメガの組み換え体転写因子による該当するコンセンサスオリゴのシフトに成功しています。下記に様々な因子の推奨するアッセイ条件を示します。

AP1: (c-jun) 反応には最終濃度0.01mg/mlのpoly(dI-dC)•poly(dI-dC)を用いる(3)。他のコンペティターオリゴ(たとえばAP2)をpoly(dI-dC)•poly(dI-dC)の代わりに用いることもできます。DTTを最終濃度5mMでbinding bufferに加えることにより、c-junの*in vitro*におけるDNA結合能を高めることができます。ほかの全てのバッファー構成試薬の濃度はGel Shift Binding 1 × Bufferに示される濃度と同じです。通常1~2 fpu (footprinting units)のタンパク質が強いゲルシフトを得るための十分量です。

NF- B: (p49またはp50) 10mM HEPES (pH 7.9)、50mM KCl、0.1mM EDTA、2.5mM DTT、10% glycerolおよび0.05% NP-40に0.28pmol NF- B Consensus Oligoを含む20µlの反応液を準備します。250~300ngのタンパク質量が強いゲルシフトを得るための十分量です。25°Cで30分間インキュベート。gel loadingバッファーはネガティブコントロールにのみ加えます。タンパク質-DNA複合体はNovex™ 6% TBEゲルで分離します。0.5% TBE中で、300V、15分間ゲルを泳動します。

VII. 困った時には...

トラブルの症状	可能性のある原因	コメント
シフトが観察されない	タンパク質量が不十分	<p>結合反応に用いるタンパク質の量をタイトレーションにより(濃度勾配実験を行ない)最適化する。</p> <p>核抽出液では: 調整された抽出液、プローブに対する結合能、抽出液の質やその他の因子によって、最適なシフトを与えるために必要な抽出液の量は大きく変化します。一般的には1、2、5、10、および20μgの抽出液を用います。</p> <p>精製した因子では: ほとんどの精製したタンパク質、特に組み換え体タンパク質は100%活性があるわけではありません。ほとんどのタンパク質で、DNAに対するモル比1:1から5:1まで注意深く濃度勾配実験を行なう必要があります。もし入手が可能であれば、目的のプローブに対するポジティブコントロールタンパク質を用いてください。</p>
	プローブの比活性が低い	<p>標識には新しい³²Pを用いる。プローブの標識は正しく行ない、標識反応の取り込み率を調べる。</p>
	プローブが変性している	<p>ターゲットDNAが2本鎖であることを確認する。</p>
Binding bufferに必要な成分が含まれていない		<p>塩とグリセロールの濃度を最適化する。タンパク質によってはDNAとの結合にZn、Mgまたは他の重金属イオンなどの因子を必要とするものがあります。結合のためには他のタンパク質が必要なこともあります。</p>
DNA-タンパク質複合体が不安定		<p>結合反応と電気泳動を4で行なうか、TGEなど、別のランニングバッファーを用いる(1)。gel loadingバッファー中のbromophenol blueは、タンパク質によってはDNAとの結合を妨げることがあります。この場合は、ネガティブコントロールの反応にのみダイ入りのloadingバッファーを加えてください。</p>
非特異的コンペティターDNAまたは不適当なコンペティターDNAの量が多すぎる		<p>結合反応によってはpoly(dI-dC)•poly(dI-dC)などの非特異的コンペティターDNAが必要な場合があります。しかし、これは全ての場合に当てはまるわけではありません。例えば、TFIIDのゲルシフトではpoly(dG-dC)•poly(dG-dC)を使うことができます。calf thymus DNAなどのほかのタイプのコンペティターDNAは、試験するタンパク質の結合サイトを含む可能性があるため、使用を避ける必要があります。プローブ-タンパク質複合体とコンペティター-タンパク質複合体の解離率についても考慮する必要があります(4)。</p> <p>核抽出液には: 一般的にはpoly(dI-dC)•poly(dI-dC)などの非特異的コンペティター0.1μgを2-3μgの抽出液に対して用います。</p> <p>精製したタンパク質には: 多くの精製した因子は非特異的コンペティターを必要としません。もし使う場合は、量を慎重にタイトレーションする必要があります。標準的な結合反応においては、コンペティターの最終量は50~100ngを超えないようにします。</p>

困った時には...(つづき)

トラブルの症状	可能性のある原因	コメント
タンパク質を加えるとプローブがウェルでくっついてしまう	タンパク質量が多すぎるか、非特異的コンペティター DNA の量が十分でない	タンパク質の量と非特異的コンペティターの量を最適化する。
	塩濃度が最適化されていない	binding buffer中の塩濃度をタイトレーションにより最適化する。高塩濃度やDNAプローブに不純物が混じっているとこのような問題が起こることがあります。
ネガティブコントロールの反応でバンドのシフトが起こる	プローブのアーティファクト	プローブとして大きなDNA断片が用いられた場合にこのような問題が起こることがあります。可能な場合はより小さなDNA断片を用いてください。プローブをプラスミドDNAの制限酵素消化により合成する場合は、DNAにニックがないことを確認してください。
	プローブが部分的に変性している	かなり短いプローブでは、電気泳動中に部分的に変性することがあります(特にATリッチ領域で)。過熱を最少にするために、ゲルを4 で流すか、長いプローブを用いてください。
タンパク質を加えると複数のシフトしたバンドが形成される	タンパク質が多量体を形成した	タンパク質量をタイトレーションにより最適化する。
	タンパク質が分解している	抽出液とbinding bufferにプロテアーゼ阻害剤を加える。抽出液あるいは精製した因子の凍結融解の繰り返しを避ける。そのタンパク質に対する抗体が入手できる場合は、ウェスタン解析によりタンパク質の分解を調べる。
	抽出液中の複数のタンパク質がDNA配列を認識する、あるいは試験するタンパク質に作用する	抗体のスーパーシフト反応(1)を用いて、試験するタンパク質を特定する。DNA断片 poly(dI-dC)•poly(dI-dC)、またはタンパク質結合サイトに点変異を持つオリゴヌクレオチドを用いてコンペティション解析を実施する。
フリーのDNAプローブのバンドが見られない	ゲルの泳動時間が長すぎた	泳動時間を短くする。フリーのプローブの移動度を予測するためにトラッキング用のダイを用いる。
ネガティブコントロールにはフリーのDNAプローブが見られるが、他の反応ではバンドが全く見られない	加えたタンパク質量が多すぎた	タンパク質のタイトレーションを行なう。
	核抽出液または調整したタンパク質にホスファターゼまたはDNase活性がある	抽出液または調整したタンパク質にこれらの活性があるかどうかを試験し、適当な阻害剤を含めるようにする。

困った時には...(つづき)

トラブルの症状	可能性のある原因	コメント
バンドがスメアになる	ゲルの重合が不十分	ゲルの重合時間を延長する。新しい ammonium persulfate solution(調整後1週間未満)を用いる。
泳動バッファの調整が正しくない	泳動バッファの調整が正しくない	新しい泳動バッファを用いる。沈殿が生じたTBEバッファは用いない。
電圧が違っている	電圧が違っている	ほとんどのタンパク質で、10~15V/cmの電圧を推奨します。しかし、DNAから急速に解離するタンパク質(例えばTBP)では、高電圧(30~35V/cm)と短い泳動時間が要求されます。
プレートに洗剤が残っている	プレートに洗剤が残っている	ゲルプレートに洗剤が残らないように徹底して洗浄・リンスする(例えば、NF-Bは洗剤に対する感受性が非常に高い)。
使用したタンパク質量が多すぎた	使用したタンパク質量が多すぎた	タンパク質の量をタイトレーションする。
泳動中のゲルの温度が高すぎる	泳動中のゲルの温度が高すぎる	ゲルの分離能を高めるため、ゲルを低温室で流す。
非特異的コンペティターの量が不十分	非特異的コンペティターの量が不十分	非特異的コンペティターの量を最適化する。
塩またはグリセロールの濃度が最適でない	塩またはグリセロールの濃度が最適でない	Binding buffer中の塩とグリセロールの濃度を最適化する。
精製したタンパク質でない	精製したタンパク質でない	目的のタンパク質を精製する必要がある。
DNA-タンパク質複合体が不安定	DNA-タンパク質複合体が不安定	『シフトが観察されない』の項のコメントを参照。

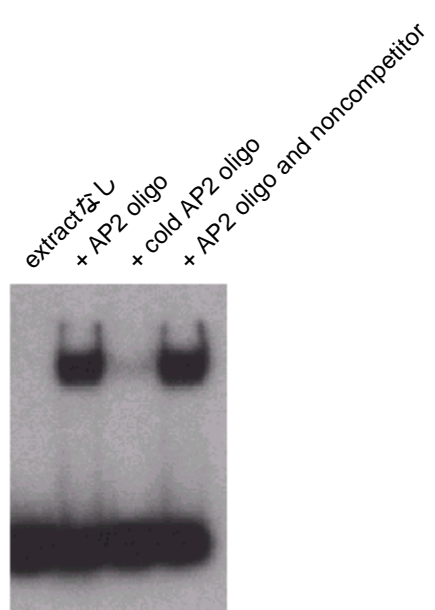


図1. AP2 抽出液を用いたゲルシフトアッセイ

AP2抽出液を用いてゲルシフトアッセイを実施した。レーン1、ネガティブコントロール。レーン2、ポジティブコントロール(³²P 標識 AP2 オリゴ)。レーン3、³²P 標識 AP2 オリゴと非標識 AP2 オリゴ(コンペティター)。レーン4、³²P 標識 AP2 オリゴと非標識 TFIID オリゴ(ノンコンペティター)。DNAの結合と電気泳動条件はセクションVに示されたとおり。

IX. 参考文献

1. Ausubel, F.M. *et al.* (1989) In: *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, John Wiley and Sons, New York.
2. Andersen, R.D. *et al.* (1990) Metal-dependent binding of a nuclear factor to the rat metallothionein-I promoter. *Nucl. Acids Res.* **18**, 6049.
3. Lin, B. (1992) Gel shift analysis with human recombinant AP1 (c-jun): The effect of poly d(I-C) on specific complex formation. *Promega Notes* **37**, 14.
4. Fried, M.G. and Crothers, D.M. (1984) Kinetics and mechanism in the reaction of gene regulatory proteins with DNA. *J. Mol. Biol.* **172**, 263.
5. Briggs, M.R. *et al.* (1986) Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science* **234**, 47.
6. Lee, W., Mitchell, P. and Tjian, R. (1987) Purified transcription factor AP-1 inter-acts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* **49**, 741.
7. Williams, T. *et al.* (1988) Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. *Genes and Development* **2**, 1557.
8. Lenardo, M.J. and Baltimore, D. (1989) NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* **58**, 227.
9. O'Neill, E.A. *et al.* (1988) Transcription factor OTF-1 is functionally identical to the DNA replication factor NF-III. *Science* **241**, 1210.
10. Roesler, W.J., Vandebark, G.R. and Hanson, R.W. (1988) Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. *J. Biol. Chem.* **263**, 9063.
11. Locker, J. and Buzard, G. (1990) A dictionary of transcription control sequences. *J. DNA Sequencing and Mapping* **1**, 3.

X. 付録

A. バッファーと溶液の組成

gel loading 10X buffer

250mM	Tris-HCl (pH 7.5)
0.2%	bromophenol blue
40%	glycerol

Gel Shift Binding 5X Buffer

20%	glycerol
5mM	MgCl ₂
2.5mM	EDTA
2.5mM	DTT
250mM	NaCl
50mM	Tris-HCl (pH 7.5)
0.25mg/ml	poly(dl-dC)•poly(dl-dC)

TE buffer

10mM	Tris-HCl (pH 8.0)
1mM	EDTA

T4 Polynucleotide Kinase 10X Buffer

700mM	Tris-HCl (pH 7.6)
100mM	MgCl ₂
50mM	DTT

TBE 10X buffer (1L)

107.80g	Tris base
~55g	boric acid
7.44g	disodium EDTA•2H ₂ O

上記のコンポーネントを上から順番に約800mlの蒸留水に加える。boric acidは、全量よりもやや少なめの量を加える。完全に溶けるまで攪拌し、pHを調べる。pHはboric acidを加え、8.3に調整する。蒸留水を加え、最終液量を1リットルにする。

B. 転写因子の特徴

表3. 提供しているオリゴヌクレオチドに対応する転写因子の特徴

転写因子 (参考文献)	オリゴヌクレオチド配列	因子の一般的な特徴
SP1 (5)	5'- ATT CGA TCG GGG CGG GGC GAG C -3' 3'- TAA GCT AGC CCC GCC CCG CTC G -5'	DNA結合ドメインの3つのZnフィンガーによる配列特異性を持つO-glycosylated転写因子。
AP1 (c-Jun) (6)	5'- CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA -3' 3'- GCG AAC TAC TCA GTC GGC CTT -5'	ロイシンジッパーの形成により、AP1ファミリーのほかのメンバーやc-fosとDNA結合ダイマーを形成する。
AP2 (7)	5'- GAT CGA ACT GAC CGC CCG CGG CCC GT -3' 3'- CTA GCT TGA CTG GCG GGC GCC GGG CA -5'	TPAおよびcAMP応答性エレメントとして独自に働く。AP2は特に、レチノイン酸への応答性が高く、形態形成に働いている可能性がある。
NF- B (8)	5'- AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C -3' 3'- TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G -5'	B細胞において ライトチェーンエンハンサーに結合し、B細胞以外の細胞では変形した細胞質型として存在する。
OCT1 (9)	5'- TGT CGA ATG CAA ATC ACT AGA A -3' 3'- ACA GCT TAC GTT TAG TGA TCT T -5'	哺乳類細胞に広く分布するOCTファミリーの1つ。2つに分かれたPOUドメインにはPOUボックスとホメオドメインが含まれる。
CREB (10)	5'- AGA GAT TGC CTG ACG TCA GAG AGC TAG -3' 3'- TCT CTA ACG GAC TGC AGT CTC TCG ATC -5'	cAMPへの応答性を与える。ダイマー形成のためのロイシンジッパーモチーフを含み、それに続くベーシックドメインはc-jun DNA結合ドメインとホモロジーを持つ。
TFIID (11)	5'- GCA GAG CAT ATA AGG TGA GGT AGG A -3' 3'- CGT CTC GTA TAT TCC ACT CCA TCC T -5'	一般的な転写因子複合体で、TATAボックスへの特異的なDNA結合能を示す。多くの遺伝子発現にTFIIDは必須で、RNAポリメラーゼIIと組み合わさるとベースの転写開始に十分である。

C. 関連製品の紹介

製品名	サイズ	カタログ番号
Gel Shift Binding 5 × Buffer	5 × 200µl	E3581
Core Footprinting System	50回分	E3730
Nuclease-Free Water	50ml(2 × 25ml)	P1193

転写因子

製品名	サイズ	カタログ番号
rhAP1 (c-Jun)	50fpu	E3061
rhNF- B (p49)	50gsu	E3820
rhNF- B (p50)	50gsu	E3770

fpu = footprint unit; gsu = gel shift unit.

核抽出液

製品名	サイズ	カタログ番号
HeLaScribe® Nuclear Extract, Gel Shift Assay Grade	3 × 40µl	E3521

転写因子のコンセンサスオリゴ

製品名	サイズ	カタログ番号
AP1 Oligonucleotide	175pmol	E3201
	35pmol	E3202
AP2 Oligonucleotide	175pmol	E3211
	35pmol	E3212
TFIID Oligonucleotide	175pmol	E3221
	35pmol	E3222
SP1 Oligonucleotide	175pmol	E3231
	35pmol	E3232
OCT1 Oligonucleotide	175pmol	E3232
	35pmol	E3242
CREB Oligonucleotide	175pmol	E3281
	35pmol	E3282
NF- B Oligonucleotide	175pmol	E3291
	35pmol	E3292

XI. Gel Shift Assay Systems: 簡易プロトコール

この簡易プロトコールは、このアッセイを行なったことがある方が、簡単に実験プロセスを確認できるように作られています。Gel Shift Assay Systemを初めてお使いになる方は、完全版プロトコール(セクションIIIからV)にしたがってください。

リン酸化反応 (セクション III.A)

1. 滅菌した微量遠心チューブで次の反応コンポーネントを調整する。

Consensus Oligonucleotide (1.75pmol/μl)	2μl
T4 Polynucleotide Kinase 10X Buffer	1μl
[³² P]ATP (3,000Ci/mmol at 10mCi/ml)	1μl
Nuclease-Free Water	5μl
T4 Polynucleotide Kinase (5–10u/μl)	1μl
トータル液量	10μl

2. 37°Cで10分間インキュベート。

3. 1μlの0.5M EDTAを加え反応を止める。

4. 89μlのTEバッファーを加える。非標識のラベルは除去することをお勧めします(セクションIV)。

HeLa Nuclear Extract を用いた DNA 結合反応 (Section V.B)

1. 下記にSP1結合活性の検出例を示します。各コンセンサスオリゴにつき、ネガティブコントロール、ポジティブコントロール、2種類のコンペティションアッセイを含む4種類の反応をセットアップする。滅菌した微量遠心チューブに下記の順番でコンポーネントを加え、反応液を調整する。

反応 #1 (ネガティブコントロール)	反応 #2 (ポジティブコントロール)
7μl Nuclease-Free Water	5μl Nuclease-Free Water
2μl Gel Shift Binding 5X Buffer	2μl Gel Shift Binding 5X Buffer
0μl HeLa Nuclear Extract	2μl HeLa Nuclear Extract
9μl トータル液量	9μl トータル液量
反応 #3 (特異的コンペティター)	反応 #4 (非特異的コンペティター)
4μl Nuclease-Free Water	4μl Nuclease-Free Water
2μl Gel Shift Binding 5X Buffer	2μl Gel Shift Binding 5X Buffer
2μl HeLa Nuclear Extract	2μl HeLa Nuclear Extract
1μl 非標識コンペティターオリゴ (1.75pmol) (SP1 Consensus Oligo)	1μl 非標識ノンコンペティターオリゴ (1.75pmol) (例: AP2 Consensus Oligo)
9μl トータル液量	9μl トータル液量

2. 反応液を室温で10分間インキュベートする。次に、1μlの³²P標識SP1コンセンサスオリゴを加える。

3. 反応液を室温で20分間インキュベートする。

4. 反応当たり1μlのgel loading 10Xバッファーを加え、反応産物を解析する。

AP2 Extractを用いるコントロール反応では、AP2 Consensus Oligoをリン酸化する。AP2 Consensus Oligoを用い、1μlのAP2 Extractに代えて、2μlのHeLa Extractを使って上記のように反応をセットアップする。

gel loadingバッファーはネガティブコントロールにのみ加えることを推奨します。

XI. Gel Shift Assay Systems: 簡易プロトコール

電気泳動 (セクション V.D)

1. 4% TBE ゲルを用いる場合は、350V で10分間、0.5X TBE バッファー中で泳動する。
2. サンプルをロードした後、350V、室温で、bromophenol blue がゲルの4分の3の位置に来るまで泳動する。ゲルの温度は30 未満になるように維持する。
3. ゲルプレートを開き、ゲルを取り出し、ゲルドライヤーで乾かす。増感紙を用い、- 70 で一晩X線フィルムを感光させる。あるいは、ゲルをホスフォイメージャーなどを用いて解析する。