

EMSA/Gel-Shift 试剂盒 (化学发光法)

货号: EM001

存储条件: 1-4 组分 -20℃保存, 其他组分 4℃保存, 一年有效。

产品组分

货号	组分名称	规格	Sample
EM001-1	EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液 (5X)	200 μ L	20 μ L
EM001-2	上样缓冲液 (无色, 10X)	200 μ L	20 μ L
EM001-3	上样缓冲液 (蓝色, 10X)	200 μ L	20 μ L
EM001-4	Streptavidin-HRP 偶联物	100 μ L	10 μ L
EM001-5	洗涤液 (5X)	250 mL	25 mL
EM001-6	检测平衡液	250 mL	25 mL
E1070-A	ECL 发光液 A	50 mL	5 mL
E1070-B	ECL 发光液 B	50 mL	5 mL
P1203	无蛋白封闭液	380 mL	50 mL

产品简介:

本试剂盒基于电泳迁移率变动实验 (EMSA/Gel-Shift), 结合化学发光检测技术, 用于快速、高灵敏度地检测蛋白质与核酸 (DNA/RNA) 的特异性相互作用, 如转录因子、核酸结合蛋白等的结合活性分析。试剂盒包含 EMSA 检测所需要的结合缓冲液, 适用于基础研究、药物筛选及分子机制研究。

自备试剂

1. 探针
2. 提取用蛋白裂解液
3. 蛋白酶抑制剂
4. 带正电荷的尼龙膜或 NC 膜
5. EMSA 电泳相关试剂

操作步骤 (供参考):

1. 样品制备

(1) 蛋白提取

a. 细胞样本:

收集 1×10^7 细胞, 加入 1ml 1xPBS 洗涤一次, 1000rpm 离心 5 min 去除上清, 收集细胞; 加入预冷裂解液 1ml, 同时按比例添加蛋白酶抑制剂, 重悬细胞, 剧烈涡旋 10 秒充分混匀, 置于冰上 30 分钟, 可每 10 分钟充分吹打一次; 4℃, 12000-16000g 离心 15 分钟, 将裂解产物

(上清) 转移到一个新的预冷管中, 丢弃沉淀。

b. 动物组织:

将 0.1g 的组织切成非常细小的碎片, 在冰浴条件下充分匀浆, 用 100um 的细胞筛等收集细胞悬液, 可加 1xPBS 冲洗;

4℃, 1500g 离心 5min, 弃上清收集细胞沉淀; 沉淀中添加预冷的裂解液 200ul (需添加蛋白酶抑制剂) 可额外添加 10ul DTT, 重悬细胞后, 剧烈涡旋 10 秒充分混匀, 置于冰上 30 分钟, 可每 10 分钟充分吹打一次;

4℃, 12000-16000g 离心 15 分钟, 将裂解产物 (上清) 转移到一个新的预冷管中, 丢弃沉淀。

c. 植物组织和不易匀浆的动物组织:

去植物样本约 0.2g, 液氮研磨; 加入 500-1000ul 预冷的裂解液 (添加蛋白酶抑制剂) 进行裂解, 为了提高裂解效率, 可加入 200ul 玻璃粉 (可选) 按照 600-800g 离心力充分震荡 30min, 裂解完成后 12000 rpm, 离心 30min, 吸取上清置于新的离心管中, 弃去沉淀。

d. 原核/真核表达蛋白:

诱导蛋白表达并鉴定表达形式, 要求表达的蛋白为上清表达; 纯化诱导表达的蛋白;

e. 考马斯亮蓝或 BCA 测定蛋白样本浓度;

f. 样本分装为约 40ul/管, 保证每管含有 5-25ug 蛋白, 液氮速冻后 -80℃保存。

注意: 避免反复冻融蛋白, 分装保存于 -80℃。

(2) 探针标记

使用生物素或荧光标记的 DNA/RNA 探针。

注意: 探针需退火形成双链, 避免核酸酶污染。

2. 结合反应

(1) 反应体系配制

(见下页)



根据以下表格配置不同组别的 EMSA 反应：

组分	实验组	阴性对照	野生型冷 探针对照	突变型冷 探针对照	Super- shift	终浓度
结合缓冲液 (5X)	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L	1x
核蛋白提取 物或纯化后 的转录因子	1-5 μ L	-	1-5 μ L	1-5 μ L	1-5 μ L	5-25 μ g
生物素 标记探针	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L	20 fmol
竞争性探针 (野生)	-	-	-	50-200x	-	1-4pmol
竞争性探针 (突变)	-	-	50-200x	-	-	1-4pmol
目的蛋白 抗体	-	-	-	-	0.5-1 μ L	0.5-1 μ g
ddH ₂ O	Up to 10 μ L					

(2) 反应条件

按照以上顺序添加各试剂，加入未标记的探针或者抗体后混匀，并在 PCR 仪上 37°C 反应 20min，让冷探针和抗体优先反应；

加入标记好的探针混匀，在 PCR 仪上 37°C 反应 20min。

注：a. 避免剧烈震荡，防止复合物解离。

b. 如需做 super-shift 反应需自备抗体

c. 若蛋白为原核表达，经纯化后每个反应体系终含量为：25ng-75ng

d. 竞争性探针野生型和突变型的使用量均为生物素标记探针的 50-200 倍

3. DNA-EMSA 非变性凝胶电泳配置

(1) 按照以下比例配置 5% 非变性 PAGE 胶，总体积 10ml (可按比例扩大)

组分	体积
5X TBE 缓冲液	1 ml
ddH ₂ O	6.5 ml
40% Acr/Bis (39:1)	1.25 ml
20% 甘油	1.25 ml
10% APS	75 μ L
TEMED	5 μ L

依照上述次序依次加入各溶液，添加 TEMED 前需混匀，添加 TEMED 后需要立即混匀并灌胶。灌胶时避免气泡并添加梳齿。

注：如发现制胶时很容易出现气泡，怎可对制胶玻璃板进行硅烷化处理。

(2) 上样与电泳

每孔加入 1 μ L 10X 上样缓冲液 (无色) 混合样品后进行上样。

注：有些样品会受溴酚蓝影响，建议尽量使用无色的上样缓冲液

上样时在多余的上样孔中加入 10ul 稀释后的 1x 上样缓冲液 (蓝色) 用于观察电泳进行的情况。

电泳条件：

电压：100 V (恒压)，建议按照 10V/cm 进行电泳

缓冲液：0.5X TBE 缓冲液

时间：电泳至溴酚蓝迁移至距离胶底部 1/4 处。

注：低温电泳 (4°C) 可减少复合物解离，建议在电泳过程中观察电泳温度，确保温度不超过 30°C，如果温度升高需要适当降低电泳电压；

4. 转膜与检测

(1) 转膜 (尼龙膜/硝酸纤维素膜)

a. 取一张和 EMSA 胶大小相近的尼龙膜或 NC 膜，剪刀剪角做好标记，用 0.5X TBE buffer 浸泡 10min 以上；

注：尼龙膜或者 NC 膜请勿用手接触，全程用镊子夹取，且不能接触样品位置

b. 取 2 张转印用滤纸，用 0.5X TBE buffer 浸泡，滤纸大小与上面转印膜的大小相近或者略大

c. 将浸泡过的膜置于浸湿的滤纸上，小心的取出 EMSA 胶放置于膜上；

d. 建议用湿转的方式进行转膜，转膜条件：100 mA 恒流 (或约 390mA)，4°C 转膜约 60 min (缓冲液：0.5X TBE)。

e. 转膜结束后，用镊子小心取出膜，样品面向上，放置于干燥的滤纸上，轻轻吹掉表面比较明显的液体。立即进入交联 (步骤(2)) 步骤。

注：

a. 转膜时间建议在 30-60 min，如胶比较厚则应当适当延长转膜时间；

b. 结合膜的表面一定不能干燥！

c. 采用半干转膜仪建议按照 390mA，30min。

(2) 交联

a. 利用紫外交联时建议交联条件为：120 mJ/cm²，选择紫外波长 254nm，45-60s。

如无紫外交联仪可以使用普通的手提紫外灯进行交联，在距离膜 3-15cm 的位置照 3-15min，最佳交联条件需要根据标准品咨询过摸索；





b. 交联完成后进行检测, 也可用保鲜膜包裹膜后置于室温干燥条件存放, 可存放 3-5 天再进行检测。

(3) 封闭与孵育抗体

a. 封闭: 取封闭液 (P1203) 15ml, 加入适当容器中 (如抗体孵育盒), 再加入交联后的尼龙膜或者 PVDF 膜 室温摇育 15min。

注: 确保封闭液是完全溶解的状态再使用。

b. 取 7.5ul Streptavidin-HRP 稀释于 15ml 封闭液 (按照 1:2000 稀释), 将封闭后的膜加入封闭液中, 置于摇床 (水平或者侧摆皆可) 室温孵育 15 min。

注: Streptavidin-HRP 稀释液可以重复使用 3-4 次, 建议保存于 -20℃, 1 月内使用完。

c. 洗涤: 将 5X 洗涤液 25ml 用蒸馏水或者 milli Q 稀释至 1X (稀释后体积 25ml), 取稀释后的洗涤液 20ml 洗膜, 洗膜 4 次 (每次 5 min)。

d. 将膜转至含有 20-25ml 检测平衡液的孵育盒中, 在摇床上缓慢摇动 5 min。

(4) ECL 显色

a. 取 ECL 发光液 A 液和 B 液各 5ml 按 1:1 混合 ECL A/B 液制成发光工作液。

注: 发光液必须现用现配。

b. 将检测平衡液中的膜取出用吸水纸吸掉过多液体, 置于保鲜膜或者干净的容器内, 在膜表面添加发光工作液至覆盖全部的膜, 室温静置 2-3 min;

c. 将膜放于 2 片保鲜膜或者其他适当透光薄膜中间病故定于压片暗盒内部, 用 X 光胶片压片 1-5 min, 显影定影, 或者直接用化学发光图像分析系统中扫描成像。

三、注意事项

- 1、探针设计时要确保探针包含蛋白结合位点, 长度建议 20-40 bp。
- 2、本产品仅限专业人员用于科学研究, 不得用于临床诊断或治疗。
- 3、为了您的安全和健康, 请佩戴一次性手套进行操作。

