

## EMSA/Gel-Shift 化学发光法 EMSA 试剂盒

产品编号	产品名称	包装规格
NBS8042	EMSA/Gel-Shift 化学发光法 EMSA 试剂盒	100T

### 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。

### 保存条件:

1-4 组分 -20°C 保存, 其他组分 4°C 保存, 1 年有效。

如果长期不用, 整个试剂盒可 -20°C 保存, -20°C 可以保存更长时间。

### 产品组成:

组分	名称	规格
NBS8042-1	EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液 (5X)	200ul
NBS8042-2	EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液 (无色, 10X)	200ul
NBS8042-3	EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液 (蓝色, 10X)	200ul
NBS8042-4	Streptavidin-HRP 偶联物	100ul
NBS8042-5	洗涤液 (5X)	250ml
NBS8042-6	检测平衡液	250ml
NBS8042-7	ECL 发光液 A	50ml
NBS8042-8	ECL 发光液 B	50ml
NBS8042-9	无蛋白封闭液	380ml

## 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  $1 \times 10^7$  细胞, 加入 1ml 1xPBS 洗涤一次, 1000rpm 离心 5min 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;  $4^{\circ}\text{C}$ , 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;  $4^{\circ}\text{C}$ , 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;  $4^{\circ}\text{C}$ , 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  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。

注意: 避免反复冻融蛋白, 分装保存于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

#### (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

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)	2ul	2ul	2ul	2ul	2ul	1x
蛋白提取物或纯 化后的转录因子	1-5ul	-	1-5ul	1-5ul	1-5ul	5-25ug
生物素标记探针	1ul	1ul	1ul	1ul	1ul	20fmol
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	-	-	-	-	0.5-1ul	0.5-1ug
ddH <sub>2</sub> O	Up to 10ul					

## (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
5XTBE 缓冲液	1ml
ddH <sub>2</sub> O	6.5ml
40% Acr/Bis (39:1)	1.25ml

20% 甘油	1.25ml
10% APS	75ul
TEMED	5ul

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 $\mu$ 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：100V（恒压），建议按照 10V/cm 进行电泳

缓冲液：0.5XTBE 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 0.5XTBE 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 0.5XTBE 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：100mA 恒流（或约 390mA），4 $^{\circ}$ C 转膜约 60min（缓冲液：0.5XTBE）。

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 30-60min，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：120mJ/cm<sup>2</sup>，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 15min。

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

c. 洗涤：将 5X 洗涤液 25ml 用蒸馏水或者 milliQ 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 5min）。

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 ECLA/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 1-5min，显影定影，或者直接用化学发光图像分析系统中扫描成像。

### 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 20-40bp。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

本产品仅用于生命科学研究，不得用于医学诊断及其它用途！

## 相关产品:

产品编号	产品名称	包装规格
<u>NBS8042</u>	<u>EMSA/Gel-Shift 化学发光法 EMSA 试剂盒</u>	100T
<u>NB8043-1ml</u>	<u>4xEMSA/Gel-Shift 上样缓冲液 (无色)</u>	1ml
<u>NBS8044-1ml</u>	<u>4xEMSA/Gel-Shift 上样缓冲液 (蓝色)</u>	1ml
<u>NBS3019-100ml</u>	<u>超敏 ECL 化学发光显色液</u>	2×50ml
<u>NBS3020-100ml</u>	<u>特超敏 ECL 化学发光显色液</u>	2×50ml
<u>NBS3121-100ml</u>	<u>极超敏 ECL 化学发光显色液</u>	2×50ml
<u>NBS5325-25ml</u>	<u>6xDNA 上样缓冲液</u>	25x1ml