

基因
结构
和
功能
系列

CAT#:131039-100
低温运输, -20°C保存

TIANDZ

即用型 EMSA 试剂盒

Electrophoretic Mobility Shift Assay Kit

使用手册 V1.0

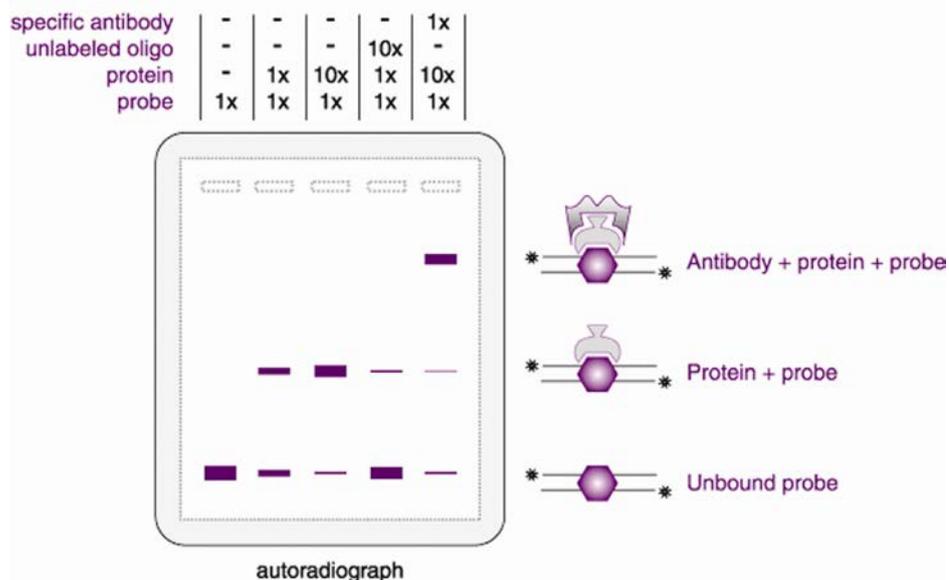
北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

产品及特点

凝胶迁移或电泳迁移率实验 (EMSA-electrophoretic mobility shift assay), 也称 gel shift, 是一种研究 DNA 结合蛋白和其相关的 DNA 结合序列相互作用的技术, 可用于定性和定量分析。这一技术最初用于研究 DNA 结合蛋白, 目前已用于研究 RNA 结合蛋白和特定的 RNA 序列的相互作用。通过 EMSA 可以研究目的蛋白和特定的 DNA 序列的结合情况, 从而可以研究细胞内一些转录因子的激活水平。其原理如下:



本产品具有下列特点:

1. 一站式, 使用方便, 本试剂盒提供了进行 EMSA 实验的探针标记、蛋白和 DNA 结合以及 EMSA 上样液等主要试剂, 使 EMSA 实验变得简单方便。
2. 非特异性结合低, EMSA 结合缓冲液中含有 poly(dI-dC) 等有效成分, 其中 poly(dI-dC) 的浓度经过优化, 可以很好的消除蛋白和标记探针间的非特异性结合, 同时又不会减弱目的转录因子和标记探针间的结合。
3. 用户需自备待标记的 EMSA 探针、用于探针标记的同位素、EMSA 胶配制的相关试剂。
4. 本试剂盒足够标记 10-20 次探针, 足够进行 100 个蛋白和探针的结合反应。

规格及成分

成份	编号	100 次包装
T4 Polynucleotide Kinase	131039A	100 U
T4 Polynucleotide Kinase Buffer(10×)	131039B	100 μL
Nuclease-Free Water	131039C	1 mL
探针标记终止液	131039D	100 μL
5M 醋酸铵	131039E	600 μL
EMSA 结合缓冲液(5×)	131039F	200 μL
EMSA 上样液(蓝色, 10×)	131039G	200 μL

	EMSA 上样液(无色, 10×)	131039H	200 μL
	TE 溶液	131039I	2 mL
	使用手册	1 份	

运输及保存

低温运输, -20℃保存, 有效期一年。

自备试剂

待标记的 EMSA 探针、用于探针标记的同位素、EMSA 胶配制的相关试剂等

使用方法

一、探针的标记:

1. 探针标记的反应体系如下:

成 份	用 量
待标记探针(1.75pmol/μL)	2 μL
T4 Polynucleotide Kinase Buffer(10×)	1 μL
Nuclease-Free Water	5 μL
[γ-32P]ATP(3,000Ci/mmol at 10mCi/mL)	1 μL
T4 Polynucleotide Kinase(5-10u/μL)	1 μL
总体积	10 μL

按照上述反应体系依次加入各种试剂, 加入同位素后, Vortex 混匀, 再加入 T4 Polynucleotide Kinase, 混匀。

2. 37℃反应 10 分钟。

3. 加入 1 微升探针标记终止液, 混匀, 终止探针标记反应。

4. 再加入 89 微升 TE, 混匀。此时可以取少量探针用于检测标记的效率。通常标记的效率在 30%以上, 即总放射性的 30%以上标记到了探针上。为实验简便起见, 通常不必测定探针的标记效率。

5. 标记好的探针最好立即使用, 最长使用时间一般不宜超过 3 天。标记好的探针可以保存在-20℃。

二、探针的纯化:

通常为实验简便起见, 可以不必纯化标记好的探针。在有些时候, 纯化后的探针会改善 EMSA 的电泳结果。如需纯化, 可以按照如下步骤操作:

1. 对于 100 微升标记好的探针, 加入 1/4 体积 (即 25 微升) 的 5M 醋酸铵, 再加入 2 倍体积 (即 200 微升) 的无水乙醇, 混匀。

2. 在-70℃至-80℃沉淀 1 小时, 或在-20℃沉淀过夜。

3. 在 4℃, 12,000g-16,000g 离心 30 分钟。小心去除上清, 切不可触及沉淀。

4. 在 4℃, 12,000g-16,000g 离心 1 分钟。小心吸去残余液体。微晾干沉淀, 但不宜过分干燥。

5. 加入 100 微升 TE, 完全溶解沉淀。标记好的探针最好立即使用, 最长使用时间

一般不宜超过 3 天。标记好的探针可以保存在-20℃。

三、EMSA 胶的配制

- 准备好倒胶的模具。可以使用常规的灌制蛋白电泳胶的模具，或其它适当的模具。
最好选择可以灌制较薄胶的模具，以便于干胶等后续操作。为得到更好的结果，可以选择可灌制较大 EMSA 胶的模具。
- 按照如下配方配制 20 毫升 4%的聚丙烯酰胺凝胶(注意:使用 29:1 等不同比例的 Acr/Bis 对结果影响不大)。

成份	用量
TBE buffer(10×)	1 mL
重蒸水	16.2 mL
39:1 acrylamide/bisacrylamide(40%,w/v)	2 mL
80% 甘油	625 μL
10% 过硫酸铵(ammonium persulfate)	150 μL
TEMED	10 μL

- 按照上述次序加入各个溶液,加入 TEMED 前先混匀,加入 TEMED 后立即混匀,并马上加入到制胶的模具中。避免产生气泡,并加上梳齿。如果发现非常容易形成气泡,可以把一块制胶的玻璃板进行硅烷化处理。

四、EMSA 结合反应:

- 按照下表加入 EMSA 结合反应各成分:

成份	阴性对照	样品	探针冷竞争反应	突变探针的冷竞争反应	Super-shift 反应
Nuclease-Free Water	7 μL	5 μL	4 μL	4 μL	4 μL
EMSA 结合缓冲液(5×)	2 μL	2 μL	2 μL	2 μL	2 μL
细胞核蛋白或纯化的转录因子	0	2 μL	2 μL	2 μL	2 μL
未标记的探针	--	--	1 μL	--	--
未标记的突变探针	--	--	--	1 μL	--
目的蛋白特异抗体	--	--	--	--	1 μL
标记好的探针	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
总体积	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL

- 按照上述顺序依次加入各种试剂,在加入标记好的探针前先混匀,并且室温(20-25℃)放置 10 分钟,从而消除可能发生的探针和蛋白的非特异性结合,或让冷探针优先反应。然后加入标记好的探针,混匀,室温(20-25℃)放置 20 分钟。

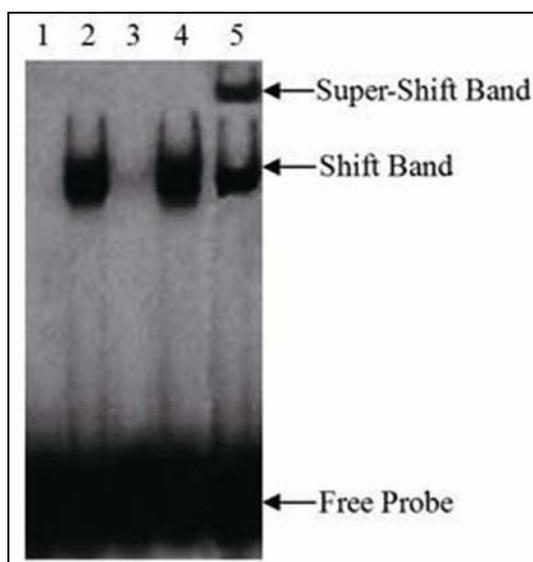
- 加入 1 微升 EMSA 上样缓冲液(无色, 10×), 混匀后立即上样。

注意: 有些时候溴酚蓝会影响蛋白和 DNA 的结合, 建议尽量使用无色的 EMSA 上样缓冲液。如果对于使用无色上样缓冲液在上样时感觉到无法上样, 可以在无色上样缓冲液里面添加极少量的蓝色的上样缓冲液, 至能观察到蓝颜色即可。

五、电泳分析

- 用 0.5×TBE 作为电泳液。按照 10V/厘米的电压预电泳 10 分钟。预电泳的时候如果有空余的上样孔, 可以加入少量稀释好的 1×的 EMSA 上样缓冲液(蓝色), 以观察电压是否正常进行。
- 把混合了上样缓冲液的样品加入到上样孔内。在多余的某个上样孔内加入 10 微升稀释好的 1×的 EMSA 上样缓冲液(蓝色), 用于观察电泳进行的情况。
- 按照 10V/厘米的电压电泳。确保胶的温度不超过 30℃, 如果温度升高, 需要适当降低电压。电泳至 EMSA 上样缓冲液中的蓝色染料溴酚蓝至胶的下缘 1/4 处, 停止电泳。
- 剪一片大小和 EMSA 胶大小相近或略大的比较厚实的滤纸。小心取下夹有 EMSA 胶的胶板, 用吸水纸或普通草纸大致擦干胶板边缘的电压液。小心打开两块胶板中的上面一块(注: 通常选择先移走硅烷化的那块玻璃板), 把滤纸从 EMSA 胶的一侧逐渐覆盖住整个 EMSA 胶, 轻轻把滤纸和胶压紧。滤纸被胶微微浸湿后(大约不足 1 分钟), 轻轻揭起滤纸, 这时 EMSA 胶会被滤纸一起揭起来。把滤纸侧向下, 放平, 在 EMSA 胶的上面覆盖一层保鲜膜, 确保保鲜膜和胶之间没有气泡。
- 在干胶仪器上干燥 EMSA 胶。然后用 X 光片压片检测, 或用其它适当仪器设备检测。

六、结果分析



上图为典型的 EMSA 分析图，各上样孔介绍如下：

1. 为阴性对照反应(标记探针)；
 2. 为常规反应(含激活的目的转录因子的核蛋白+标记探针)；
 3. 为探针冷竞争反应(含激活的目的转录因子的核蛋白+标记探针+标记探针 100 倍量的标记探针)；
 4. 为突变探针的冷竞争反应(含激活的目的转录因子的核蛋白+标记探针+标记探针 100 倍量的未标记突变探针)；
 5. 为 Super-shift 反应(含激活的目的转录因子的核蛋白+标记探针+目的转录因子的特异抗体)。
-