

产品说明书

26 版

基本信息

产品编号:	PS2445
产品名称:	化学发光法 EMSA 试剂盒

产品简介:

本产品是一种通过 Streptavidin-HRP 及后续的发光液试剂来实现化学发光检测 Biotin 标记的 EMSA 探针的检测试剂盒。同时本试剂盒提供了 EMSA 检测所需的结合缓冲液和上样缓冲液, 及一些关键的相关试剂, 可以实现非同位素的 EMSA 检测。

产品特点:

- 1: 操作便捷: 只需用生物素或地高辛等非放射性标记的探针, 无需特殊防护, 在常规分子生物学实验室即可操作, 大大降低了实验室的安全门槛和管理成本。
- 2: 高灵敏度: 该产品专门为化学发光检测系统优化, 优化的试剂盒配方能有效降低非特异性结合和背景噪声, 从而获得信噪比极高的结果, 条带清晰锐利。

组分:

组分	组分名称	包装规格 (100T)	储存
组分 A	5×EMSA 结合缓冲液	200 μ L	-20℃
组分 B	10×EMSA 上样缓冲液 (蓝色)	200 μ L	-20℃
组分 C	10×EMSA 上样缓冲液 (无色)	200 μ L	-20℃
组分 D	EMSA 平衡液	250mL	4℃
组分 E	EMSA 封闭液	380mL	-20℃
组分 F	5×EMSA 洗涤液	250mL	4℃
组分 G	EMSA 发光液 (A 液/ B 液)	55mL/55mL	4℃
组分 H	Streptavidin-HRP Conjugate	100 μ L	-20℃

操作步骤:

一: 实验准备	
1: 5' 或 3' 生物素末端标记的 DNA 探针。	
2: 尼龙膜。	
3: EMSA-PAGE 凝胶。	
4: 紫外交联仪。	
二: EMSA 凝胶制备	
1: 准备好倒胶的模具。可以使用常规的制备蛋白电泳胶的模具 (例如 BioRad 的常规用于蛋白电泳的制胶装置), 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。制胶前必须把制胶模具冲洗干净, 需特别注意不能有 SDS 残留。	
2: 配 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶 (1.0mm) 或者使用本公司 EMSAPAGE 胶制备试剂盒 (6%, 10 孔)。	
组分	体积
10×TBEbuffer	0.35mL



30%Acrylamide/Bis	1.4mL
80%Glycerol	218 μL
10%APS	105 μL
TEMED	7 μL (最后加入)
超纯水	4.9mL
总体积	7mL
可以适当根据配制胶数量等比放大。	

3: 按照上述顺序依次加入各种试剂, 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。准备好倒胶的模具, 使用 1.0mm 的电泳胶模具, 或其它适当的模具。

4: 待凝胶完全凝固后, 电泳槽内加入 0.5×TBE 电泳缓冲液, 小心拔出梳子, 用电泳缓冲液小心冲洗梳孔, 不得留有气泡。注意: 若缩短凝固时间, 可以放于 37℃-45℃烘箱。

三: EMSA 结合反应

1: 生物素标记 DNA 或未标记 DNA 准备: 探针和互补引物检测浓度, 适量稀释, 稀释之后按等体积进行混匀, 95℃, 退火 5min, 冷却至室温, 即为双链。用 Nanodrop 仪器测双链的浓度, 根据设计引物的长度 (设为 Xbp), 按照以下计算方程, 换算成 fmol/μL, 将探针稀释至 200fmol/μL。

$$C_{(fmol/\mu L)} = \frac{C_{(ng/\mu L)} \times 10^6}{660 \times X}$$

注意: 如果蛋白与双链 DNA 结合, 可以按照上述方法制备 DNA; 如果蛋白与单链 DNA 结合则只需要测单链 DNA 浓度, 稀释即可进行下一步。一般推荐加入总量为 200fmol (即 10 μL 体系 200fmol/μL 探针加入 1 μL), 由于标记 DNA 的加入量与蛋白-DNA 结合强度有关, 请按需调整。第一次实验建议做不同 DNA 探针梯度。

2: 结合蛋白准备: 结合蛋白用合适的稀释 buffer 稀释至适当浓度。

注意: 第一次实验建议做不同蛋白浓度梯度, 一般推荐纯化蛋白加入量为 2 μg (稀释至 1 μg/μL, 纯度>90%, 10 μL 体系加入 2 μL), 其他类型蛋白请按需调整。

3: 根据以下表格进行设计实验。

A: 阴性 (探针) 对照组	
组分	体积
5× EMSA 结合缓冲液	2 μL
结合蛋白	0 μL
生物素标记 DNA	1 μL
ddH2O	Up to 10 μL
B: 实验组	
5× EMSA 结合缓冲液	2 μL
结合蛋白	2 μL
生物素标记 DNA	1 μL
ddH2O	Up to 10 μL
C: 探针冷竞争组	





5× EMSA 结合缓冲液	2 μL
结合蛋白	2 μL
未标记 DNA ^a	1 μL
生物素标记 DNA	1 μL
ddH ₂ O	Up to 10 μL
a. 未标记 DNA 推荐加入总量为生物素标记 DNA 的 5 倍-200 倍, 请按需调整。	
D: 突变探针冷竞争组	
5× EMSA 结合缓冲液	2 μL
结合蛋白	2 μL
未标记突变 DNA 或生物素标记突变 DNA ^b	1 μL
生物素标记 DNA	1 μL
ddH ₂ O	Up to 10 μL
b. 未标记突变 DNA 或生物素标记突变 DNA 推荐加入总量为生物素标记 DNA 的 200 倍以上, 请按需调整。	
E: Super-shift 组	
5× EMSA 结合缓冲液	2 μL
结合蛋白	2 μL
结合蛋白特异性抗体	1 μL
生物素标记 DNA	1 μL
ddH ₂ O	Up to 10 μL
4: 按照上述顺序依次加入各种试剂, 先加入竞争性探针优先反应 10min 之后, 再加入标记好的探针, 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, 或者让冷探针优先反应。然后加入标记好的探针, 混匀, 室温 (20-25℃) 放置 20 分钟。	
5: 取 9 μL 的反应液加入 1 μL 10×EMSA 上样缓冲液(无色), 混匀后立即上样。	
注意: 反应体系不能涡旋或剧烈混匀。 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上样缓冲液。特殊情况如果对于使用无色上样缓冲液在上样时感觉到无法上样, 可使用 10×EMSA 上样缓冲液 (蓝色)。 可以多制备一个样品加入 1 μL 的 10×EMSA 上样缓冲液 (蓝色) 作为跑胶的指示位置。	
四: 电泳	
1: 用 0.5×TBE 作为电泳液。先预冷按照 120V 预电泳 10min 后, 在电泳完毕后, 冲洗加样孔。每孔点 10 μL 的样品, 之后进行电泳。预电泳的时候如果有空余的上样孔, 可以加入 10×EMSA 上样缓冲液 (蓝色) 制备好的样品, 以观察电压是否正常运行, 也可作为跑胶的指示位置。	
2: 将电泳槽置于冰上或者 4℃ 环境中, 恒压 90V 进行电泳, 直至缓冲液指示带距离凝胶底部 2-3cm 为止 (约 1h)。	
五: 转膜与交联	
1: 裁剪和 EMSA 胶大小相近或略大的带正电荷的尼龙膜及两片海绵, 用 0.5×TBE 浸泡 5-10min。	
2: 取两片干净的海绵浸泡在 0.5×TBE 中 2-5min, 之后将浸泡后的海绵放置在半干转膜仪上, 在把浸泡过的尼龙膜放置在海绵上, 小心地取出 EMSA 胶并放置到尼龙膜上, 再把另外一片浸湿的海绵放置到 DNA-EMSA 胶上, 全程避免气泡产生。如果采用湿法电转膜装置, 夹心方法同上。	
3: 采用半干电转膜装置, 以 0.5×TBE 为转膜液, 4℃, 100mA 转膜 20min; 采用湿法电转膜装置, 如用 BioRad 的常用的 Western 转膜装置, 电转时可以设置为 380mA (约 100V) 转膜 30-60 分钟。如果胶较厚, 则需适当延长转膜时间。转膜时需保持转膜液	



的温度较低，通常可以把电转槽置于 4°C 冷库或置于冰浴或冰水浴中进行电转，这样可以确保低温。具体的电转膜方法请参考电转膜装置的使用说明。

4: 转膜完毕后，小心取出尼龙膜，样品面向上，放置在一干燥的滤纸上，轻轻吸掉下表面明显的液体。立即进入下一步的交联步骤，不可使膜完全干掉。

5: 用紫外交联仪 (UV-lightcross-linker) 选择 254nm 紫外波长，120mJ/cm²，交联 45-60 秒。如果没有紫外交联仪可以使用普通的手提式紫外灯 (距离膜 5-10 厘米) 左右照射 3-10 分钟。也可以使用超净工作台内的紫外灯，距离膜 5-10 厘米左右照射 3-15 分钟。最佳的交联时间可以使用标准品自行摸索。

六: 显色

1: 37-50°C 水浴温浴封闭液和洗涤液。

2: 交联过的尼龙膜加入 15mL 封闭液 (可重复使用 4-5 次)，摇床缓慢摇动 30min，(回收可重复利用 4-5 次)。

3: 取 5-7.5 μL Streptavidin-HRP 按照 1:2000-3000 加入到 15mL 封闭液中，摇床缓慢摇动 30min 后，回收可重复利用 4-5 次。

4: 用 10mL 的洗涤液进行洗涤，摇床缓慢摇动漂洗 5min，去除洗涤液 (此步骤重复三次)。

5: 再用平衡液进行平衡，摇床缓慢摇动 5min。

6: 取出尼龙膜，用吸水纸吸去过多平衡液。立即将膜的样品面向上，放置到处于水平桌面上的洁净容器内或保鲜膜上。

7: 在尼龙膜的表面小心滴加 EMSA 发光液 (EMSA 发光液等体积 A/B 液混合即可)，使工作液完全覆盖尼龙膜，室温静置 2-3min。

8: 放置在化学发光图像分析系统中扫描成像。

注意事项:

一: 储存注意事项

1: EMSA 试剂盒蓝冰运输，各个组分按照上表储存条件分别储存。如果长期不用，整个试剂盒可 -20°C 保存，可保存更长时间。

2: 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

二: 操作注意事项

1: 需自备带正电荷尼龙膜，以及凝胶电泳时所需的相关试剂。

2: 如果需要使用更多的封闭液或洗涤液，可另外单独订购。

3: 请仔细阅读完整说明书后，再开始实验操作。

4: 如组分不够用，可单独在本公司购买。

5: 为了您的安全和健康，实验时请穿实验服并戴一次性手套操作。

储存: 低温运输，按组分分开储存，有效期 12 个月。

