



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
 订货热线: 400-1683301或800-8283301
 订货e-mail: order@beyotime.com
 技术咨询: info@beyotime.com
 网址: http://www.beyotime.com

化学发光法EMSA阳性对照试剂盒

产品编号	产品名称	包装
GS010S	化学发光法EMSA阳性对照试剂盒	60次

产品简介:

- 碧云天生产的化学发光法EMSA阳性对照试剂盒(Chemiluminescent EMSA Positive Control Kit), 是一种提供了阳性探针、阳性蛋白和阳性蛋白抗体等专用于化学发光法进行EMSA检测时作为阳性对照的试剂盒。本试剂盒可用于检测整个化学发光法EMSA实验条件和体系是否正常。
- EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)是研究蛋白和核酸相互作用的一种常用方法[1-2]。本试剂盒提供了生物素标记阳性探针、未标记阳性探针、阳性蛋白和阳性蛋白抗体, 可以很方便地测试阳性蛋白与阳性探针的结合反应、探针冷竞争反应和Super-shift反应, 获得比较理想的非同位素的EMSA检测的阳性对照检测结果。
- 本试剂盒需配套碧云天的化学发光法EMSA试剂盒(GS009)进行使用。
- 本试剂盒可以用于共60次反应, 包括阴性对照反应、阳性对照反应、未标记探针冷竞争反应和基于抗体的Super-shift反应各15次。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
GS010S-1	生物素标记阳性探针	60μl
GS010S-2	未标记阳性探针	15μl
GS010S-3	阳性蛋白	45μl
GS010S-4	阳性蛋白抗体	15μl
GS010S-5	EMSA/Gel-Shift结合缓冲液(5X, 阳性对照专用)	120μl
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存, 一年有效。

注意事项:

- 探针避免加热到40°C以上, 温度过高会导致双链DNA探针解聚成单链。而单链无法用于EMSA研究。
- 阳性蛋白和生物素标记阳性探针反应时需要使用经过优化的EMSA/Gel-Shift结合缓冲液(5X, 阳性对照专用), 不能使用其它EMSA试剂盒中的EMSA/Gel-Shift结合缓冲液(5X)。
- 需自备带正电荷尼龙膜, 以及凝胶电泳时所需的相关试剂。带正电荷尼龙膜(FFN10/FFN11/FFN13/FFN15)可以向碧云天订购。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. EMSA胶的配制:

- 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(例如碧云天或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。
- 按照如下配方配制20ml 4%的聚丙烯酰胺凝胶(注: 使用29:1等不同比例的Acr/Bis对结果影响不大)。

Reagent	Volume
TBE Buffer (10X)	1.0ml
重蒸水	16.2ml
39:1 Acrylamide/Bisacrylamide (40%, w/v)	2ml
80%甘油	625μl
10%过硫酸铵(Ammonium persulfate)	150μl
TEMED	10μl

- 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。

2. EMSA结合反应：

a. 如下设置EMSA结合反应：

阴性对照反应	
Nuclease-Free Water	7 μ l
EMSA/Gel-Shift结合缓冲液(5X, 阳性对照专用)	2 μ l
阳性蛋白	0 μ l
生物素标记阳性探针	1 μ l
总体积	10 μ l
阳性对照反应	
Nuclease-Free Water	6 μ l
EMSA/Gel-Shift结合缓冲液(5X, 阳性对照专用)	2 μ l
阳性蛋白	1 μ l
生物素标记阳性探针	1 μ l
总体积	10 μ l
探针冷竞争反应	
Nuclease-Free Water	5 μ l
EMSA/Gel-Shift结合缓冲液(5X, 阳性对照专用)	2 μ l
阳性蛋白	1 μ l
未标记阳性探针	1 μ l
生物素标记阳性探针	1 μ l
总体积	10 μ l
Super-shift反应	
Nuclease-Free Water	5 μ l
EMSA/Gel-Shift结合缓冲液(5X, 阳性对照专用)	2 μ l
阳性蛋白	1 μ l
阳性蛋白抗体	1 μ l
生物素标记阳性探针	1 μ l
总体积	10 μ l

b. 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°C)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°C)放置20分钟。

c. 加入1 μ l EMSA/Gel-Shift上样缓冲液(无色，10X)，混匀后立即上样。

注1：从本步骤起，需配套碧云天的化学发光法EMSA试剂盒(GS009)进行使用。

注2：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/Gel-Shift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，至可以观察到蓝颜色即可。

3. 电泳：

a. 用0.5X 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1X的EMSA上样缓冲液(蓝色)，以观察电压是否正常进行。

b. 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 μ l稀释好的1X的EMSA/Gel-Shift上样缓冲液(蓝色)，用于观察电泳进行的情况。

c. 按照10V/厘米的电压电泳。确保胶的温度不超过30°C，如果温度升高，需要适当降低电压。电泳至EMSA/Gel-Shift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。

4. 转膜：

a. 取一和EMSA胶大小相近或略大的尼龙膜，剪角做好标记，用0.5X TBE浸泡至少10分钟。尼龙膜自始至终仅能使用镊子夹取，并且仅可夹取不可能接触样品的边角处。

b. 取两片和尼龙膜大小相近或略大的滤纸，用0.5X TBE浸湿。

c. 把浸泡过的尼龙膜放置在一片浸湿的滤纸上，注意避免尼龙膜和滤纸间产生气泡。

d. 非常小心地取出EMSA胶放置到尼龙膜上，注意确保胶和膜之间没有气泡。

e. 再把另外一片浸湿的滤纸放置到EMSA胶上，注意确保滤纸和胶之间没有气泡。

f. 采用Western时所使用的湿法电转膜装置或其它类似的电转膜装置，以0.5X TBE为转膜液，把EMSA胶上的探针、蛋白以及探针和蛋白的复合物等转移到尼龙膜上。对于大小约为10×8×0.1cm的EMSA胶，用碧云天或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。

g. 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，不可使膜干掉。

5. 交联：

- 用紫外交联仪(UV-light cross-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(例如碧云天的手提紫外检测仪(EUV002))，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。
- 交联完毕后，可以直接进入下一步检测；也可以用保鲜膜包裹后在室温干燥处存放3-5天，然后再进入下一步检测。
- 如果检测结果发现交联效果不佳，甚至连free probe的条带都非常微弱，可以考虑在膜干燥后参考步骤A的条件再交联一次，以进一步改善交联效果。

6. 化学发光法检测生物素标记的探针：

- 37-50°C水浴溶解封闭液和洗涤液。
注意：封闭液和洗涤液必须完全溶解后方可使用，封闭液和洗涤液可以在室温至50°C之间使用，但必须确保这两种溶液中均无沉淀产生，在冬天需特别注意。
- 取一合适的容器加入15ml封闭液，再放入交联过的含有样品的尼龙膜。在侧摆摇床或水平摇床上缓慢摇动15分钟。
- 取7.5μl Streptavidin-HRP Conjugate加入到15ml封闭液中(1:2000稀释)，混匀备用。
- 去除用于尼龙膜封闭的封闭液，加入上一步中配制的15ml含有Streptavidin-HRP Conjugate的封闭液。在侧摆摇床或水平摇床上缓慢摇动15分钟。
- 取25ml洗涤液(5X)，加入100ml重蒸水或Milli-Q级纯水，混匀配制成125ml洗涤液。
- 将尼龙膜转移至另一装有15-20ml洗涤液的容器内，漂洗1分钟。
- 去除洗涤液，加入15-20ml洗涤液，在侧摆摇床或水平摇床上缓慢上洗涤5分钟。
- 重复步骤G 三次(共洗涤四次)，每次洗涤时间都约为5分钟。
- 将尼龙膜转移至另一装有20-25ml检测平衡液的容器内，在侧摆摇床或水平摇床上缓慢摇动5分钟。
- 取5ml BeyoECL Moon A液和5ml BeyoECL Moon B液混匀，配制成BeyoECL Moon工作液。注：BeyoECL Moon工作液必须现配现用。说明：从本步骤起操作方法和注意事项同Western实验的荧光检测。
- 取出尼龙膜，用吸水纸吸去过多液体。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。
- 在尼龙膜的表面小心加上步骤J配制好的共10ml BeyoECL Moon工作液，使工作液完全覆盖尼龙膜。室温放置2-3分钟。取出尼龙膜，用吸水纸吸去过多液体。将膜放在两片保鲜膜中间，随后进行压片检测或化学发光成像仪检测。
- 压片检测：将膜固定于片夹内。暗室内压片1分钟，立即显影定影，根据结果再调整压片时间。或直接分别压片30秒、1、3、5分钟，然后一起显影定影观察结果。
- 化学发光成像仪检测：将膜放置到化学发光成像仪内，参考仪器说明书进行检测，如使用BeyoImager™ 600化学发光成像系统(EI600)，自动或手动曝光。使用本试剂盒得到的阳性蛋白-探针的结合反应、探针冷竞争反应和Super-shift反应结果参见图1。

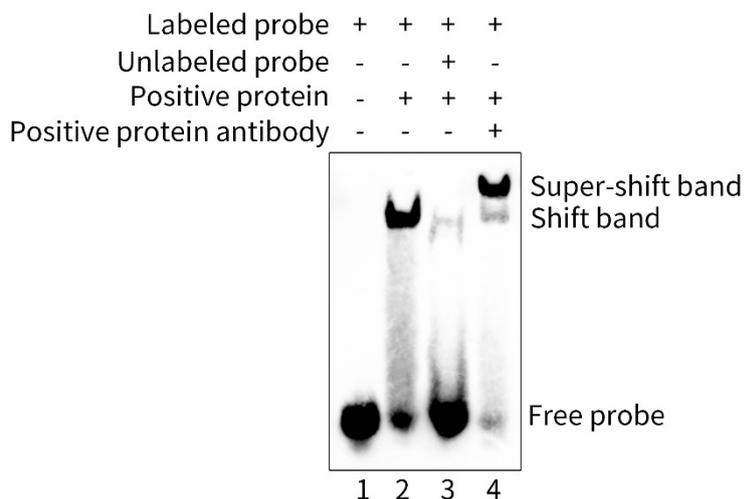


图1. 碧云天化学发光法EMSA阳性对照试剂盒检测结果。1为阴性对照反应；2为阳性蛋白-探针的结合反应；3为未标记探针冷竞争反应；4为阳性蛋白抗体的Super-shift反应。实际结果会因蛋白种类、电泳条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

参考文献：

- Revzin A. Biotechniques. 1989. 7(4):346-55.
- Laniel MA, Béliveau A, Guérin SL. Methods Mol Biol. 2001.148:13-30.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
GS002	EMSA/Gel-Shift试剂盒	100次

GS005	EMSA/Gel-Shift结合缓冲液(5X)	100次
GS006	EMSA/Gel-Shift上样缓冲液(无色, 10X)	200次
GS007	EMSA/Gel-Shift上样缓冲液(蓝色, 10X)	200次
GS008	EMSA探针生物素标记试剂盒	20次
GS009	化学发光法EMSA试剂盒	100次
GS010S	化学发光法EMSA阳性对照试剂盒	60次

Version 2024.02.26