

化学发光法EMSA试剂盒

50 T WLA079a 100 T WLA079b



仅用于科学研究,不能用于诊断

产品信息

产品名称 化学发光法EMSA试剂盒

产品概述 凝胶迁移实验又称凝胶阻滞实验或电泳迁移率实验 (EMSA, electrophoretic mobility shift assay), 是一种用于蛋白与核酸相互作用的技术。最初是用于转录因子与启动子相互作用的验证性实验, 也可应用于蛋白-DNA、蛋白-RNA互作研究, 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。本试剂盒中结合缓冲液 (10X) 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。本试剂盒提供了进行EMSA实验除探针外的所有试剂, 使EMSA实验变得简单方便。

包装信息

试剂盒组分	WLA079a (10板/50T)	WLA079b (20板/100T)	保存条件
TE缓冲液	250μl	500μl	-20°C
5XTBE (胶配制用)	15ml	30ml	-20°C
结合缓冲液 (10X)	150μl	300μl	-20°C
上样缓冲液 (5X)	300μl	600μl	-20°C
封闭液	300ml	600ml	-20°C
HRP标记Streptavidin	25μl	50μl	-20°C
洗涤液 I	250ml	500ml	-20°C
洗涤液 II	250ml	500ml	-20°C
洗涤液 III	500ml	1000ml	-20°C
检测平衡液 (20X)	120ml	250ml	-20°C

注意事项

1. 需自备0.1%SDS、生物素标记的EMSA探针、非生物素标记的EMSA探针以及相对应的非生物素标记的突变探针, 此外还需自备0.5XTBE用于预电泳、电泳以及转膜。
2. 如需做super-shift, 需自备用于super-shift的抗体。
3. 本试剂盒包装以5孔为1板胶计算, 有20板胶量以及50板胶量规格。

操作流程

1. **探针退火。**用TE缓冲液稀释引物, 结合反应前等体积混合两条引物 (生物素标记、非生物素标记以及非生物标记的突变探针), 94°C退火引物, 并自然冷却至4°C, 待用。
2. **核蛋白提取。**请使用万类生物核蛋白和浆蛋白提取试剂盒 (WLA020a) 具体提取过程请参考说明书。
3. **制备凝胶、电泳。**
 - (1) 制备6%的非变性聚丙烯酰胺凝胶: (注意根据试剂情况按比例调整总体积)

试剂	体积
5XTBE	1ml
30% Acr-Bis	2ml
40% Glycerin	625μl
DDW	3.215ml
10% AP	150μl
TE	10μl
总计	7ml

- (2) 预电泳。以预冷为4°C的0.5XTBE为电泳缓冲液, 100V预电泳30-60min。

化学发光法EMSA试剂盒

50 T WLA079a 100 T WLA079b

仅用于科学研究,不能用于诊断



产品信息

4. 形成探针-蛋白复合物。

阴性对照反应

试剂	体积
DDW	17.5μl
结合缓冲液 (10X)	2μl
核蛋白提取物	0
生物素标记探针	0.5μl
总计	20μl

样品反应

试剂	体积
DDW	--
结合缓冲液 (10X)	2μl
核蛋白提取物	4-10μg
生物素标记探针	0.5μl
总计	20μl

探针冷竞争反应

试剂	体积
DDW	--
结合缓冲液 (10X)	2μl
核蛋白提取物	4-10μg
未标记的探针	0.5μl
生物素标记探针	0.5μl
总计	20μl

突变探针的冷竞争反应

试剂	体积
DDW	--
结合缓冲液 (10X)	2μl
核蛋白提取物	4-10μg
未标记的突变探针	0.5μl
生物素标记探针	0.5μl
总计	20μl

super-shift反应

试剂	体积
DDW	--
结合缓冲液 (10X)	2μl
核蛋白提取物	4-10μg
目的蛋白特异抗体	0.5μl
生物素标记探针	0.5μl
总计	20μl

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,并且室温放置10min,从而消除可能发生的探针与蛋白的特异性结合,或者让冷探针优先反应。之后加入标记好的探针,混匀,室温避光放置20-30min。

5. 电泳。加入5X上样缓冲液 5ul混匀,上样10-20ul,100V电泳至溴酚蓝于三分之二处。

6. 转膜。

- (1) 在预冷的0.5XTBE中浸泡凝胶,尼龙膜,滤纸和纤维垫。
- (2) 按以下顺序制作“三明治”:纤维垫,滤纸,凝胶,尼龙膜,滤纸,纤维垫。确保凝胶位于阴极,膜位于阳极。
- (3) 在预冷的0.5XTBE中进行转膜。转膜装置应置于冰上进行,300mA,40min。

7. 交联。转膜后,贴近胶的尼龙膜一面在紫外线下照射30min。

8. 封闭。交联后,加入15ml 封闭液 封闭30min。

9. 孵育。将HRP标记Streptavidin以1:5000稀释于12ml 封闭液中,摇床室温缓慢摇晃孵育20min。

10. 洗膜。

25ml 洗涤液 I 洗膜5min → 25ml 洗涤液 II 洗膜15min → 25ml 洗涤液 III 洗膜5min, 2次 → 25ml 0.1%SDS in 2X检测平衡液 洗膜5min, 2次 → 25ml 0.1%SDS in 1X检测平衡液 洗膜10min, 2次 → 25 ml 0.1%SDS in 0.5X检测平衡液 洗膜5min, 2次。

11. ECL发光检测信号。