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（10×）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	有效期
TE缓冲液	250μl	500μl	-20°C	6个月
5×TBE（胶配制用）	15ml	30ml	-20°C	6个月
结合缓冲液（10×）	150μl	300μl	-20°C	6个月
上样缓冲液（5×）	300μl	600μl	-20°C	6个月
封闭液	300ml	600ml	-20°C	6个月
HRP标记Streptavidin	25μl	50μl	-20°C	6个月
洗涤液 I	250ml	500ml	-20°C	6个月
洗涤液 II	250ml	500ml	-20°C	6个月
洗涤液 III	500ml	1000ml	-20°C	6个月
检测平衡液（20× ）	120ml	250ml	-20°C	6个月

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0.5×TBE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10板胶量以及20板胶量规格。
4. 开封后请尽快使用 。

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
5×TBE	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0.5×TBE为电泳缓冲液，100V预电泳30-60min。

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（10×）	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（10×）	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（10×）	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（10×）	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（10×）	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	0.5ul
总计	20ul

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5×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0.5×TBE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0.5×TBE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 2×检测平衡液 洗膜5min，2次→25ml 0.1%SDS in 1×检测平衡液 洗膜10min，2次 →25 ml 0.1%SDS in 0.5×检测平衡液 洗膜5min，2次。

11. ECL发光检测信号。