天净沙系列

CAT#:241213

常温运输和保存

天净沙

EMSA 电泳试剂盒（蛋白质-DNA）

EMSA Electrophoresis Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是用于电泳分离蛋白质-核酸复合体的电泳试剂盒。凝胶迁移实验（Electrophoretic Mobility Shift Assay，EMSA）实验时，需要先将标记的 DNA 与蛋白质共孵育，随后进行 PAGE 电泳，电泳后将复合物转移至膜并进行检测。本产品就是用于电泳步骤的试剂盒，它具有以下特点:

1. 本产品即开即用，操作简单便捷。
2. 能最大限度地维持蛋白质-DNA 复合体的稳定性。
3. 足够 30 次 EMSA 迷你电泳实验。
4. 跟地高辛、生物素和其他标记的 DNA 探针兼容。
5. 后续可以用于碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶检测兼容。
6. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品第一部分，大纸盒包装，常温运输和保存。

成份	编号	规格	包装
丙烯酰胺，电泳级	CAS 79-06-1	60 g	250 mL 棕色瓶
甲叉双丙烯酰胺，电泳级	CAS 110-26-9	2 g	10 mL 棕色瓶
10×EMSA 电泳液	241213a	250 mL	250 mL 本色瓶
TEMED，电泳级	CAS 110-18-9	1.5 mL	2.0 mL 白色盖
过硫酸铵，电泳级	CAS 7727-54-0	1 g	2.0 mL 绿色盖
使用手册	241213sc	1 份	1 份

本产品第二部分，塑料袋包装，低温运输，-20℃保存。

成份	编号	规格	包装
2×蛋白质-DNA EMSA 上样液	241213b	1.5 mL	2.0 mL 棕盖管

运输及保存

大纸盒常温运输和保存，塑料袋低温运输、-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

去离子水

使用方法

1. PAGE 浓度的选择：根据 EMSA 所用 DNA 探针的长度选择 PAGE 凝胶的浓度。5%的 PAGE 的有效分辨范围为 80-500 bp、8%的 PAGE 的有效分辨范围为 60-400 bp、12%的 PAGE 的有效分辨范围为 40-200 bp。
2. 用自选方法标记 DNA 探针、制备细胞裂解液和进行 DNA 探针与目标蛋白的结合，获得含有靶蛋白质-DNA 复合体的结合液。一定要做阴性对照（就是用不含靶蛋白质与标记的 DNA 探针结合）。
3. 体积的选择：EMSA 实验一般使用长度为 8-10 cm 的迷你胶，可以结合梳子的厚度，计算所需 PAGE 胶的体积。
4. 配制 PAGE 胶（下面以配制 100 mL PAGE 胶为例计算用量，配制更大体

积的胶则需以此用量为基础按比例增加。一般一块 10×10 cm 的胶只需要 10 mL 左右的 PAGE 胶)：

A：新鲜配制 10%的 APS（过硫酸铵)：称量约 0.1 克硫酸铵干粉到一个 1.5 mL EP 管中，按每 0.1 克过硫酸铵干粉加 1 mL 自备去离子水的比例将水加到管中，摇晃到硫酸铵粉末全部溶解。配制好的 10%的 APS 溶液可以在 4℃存放一周，超过一周的不能再用。

B：新鲜配制 30%的丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺溶液（29:1)：将 2 g 甲叉双丙烯酰胺倒入到装有 60 g 丙烯酰胺的 250 mL 棕色塑料瓶中，天平上去皮，加入 146 mL 自备的去离子水，充分摇晃直到溶解（约需 10-20 分钟)。此溶液简称为 30% AB 溶液，此溶液 4℃保存，最好在一个月内用完。

C：配 PAGE 胶：在一个 250 mL 的三角瓶中，先按下表的用量加入去离子水、30% AB 溶液和 10×EMSA 电泳液。丙烯酰胺单体溶液具有神经毒性，一定要戴手套操作。

PAGE 胶浓度	各成分用量（单位：mL）			总体积 (mL)
	去离子水	30% AB 溶液	10×EMSA 电泳液	
5%	73.4	16.6	10.0	100
6%	70.0	20.0	10.0	100
7%	66.7	23.3	10.0	100
8%	63.3	26.7	10.0	100
9%	60.0	30.0	10.0	100
10%	56.7	33.3	10.0	100
11%	53.3	36.7	10.0	100
12%	50.0	40.0.	10.0	100

C：摇晃混匀。最好能抽真空 10-15 分钟以去除溶液中的氧气（氧气能抑制丙烯酰胺聚合反应)，无条件也可以不脱氧。

D：加入 500 μL 10% APS 和 100 μL TEMED，迅速摇匀后倒胶。

E: 在 PAGE 胶的液面距离达到顶部时停止灌胶，插入梳子。

F: 室温聚合 30-60 分钟（低温抑制聚合反应，故最好室温)。

G: 待 PAGE 胶凝固后拔出梳子，用 1×EMSA 电泳液冲洗加样孔。1×EMSA 电泳液可以用 9 倍的去离子水和 1 倍的 10×EMSA 电泳液混合均匀而得（下同)。

	H: 放 4℃冰箱预冷 30 分钟-12 小时。为了防止 PAGE 胶收缩，最好在胶的顶部加少量 1×EMSA 电泳液。使用预冷的 PAGE 胶有利于蛋白质-DNA 复合体在电泳时保持结合状态，因为此复合体为非共价结合，温度越高，这些微弱相互作用越不稳定。 5. 将预冷后的 PAGE 凝胶板固定在电泳装置上，往上槽和下槽中加入足够 1×EMSA 电泳液。 6. 取 10 μL 自备的蛋白质-DNA 结合样品，加入等体积 2×蛋白质-DNA EMSA 上样液，轻柔混合均匀后上样。 7. 连接电源线，打开电源开关。使用 8W 的功率，电泳 16-18 小时。由于温度变化过大会改变蛋白-DNA 复合体构型，所以电泳时最好能保持 4℃恒温。 8. 终止电泳，取出凝胶进行后续的转膜和显色处理。
关联试剂	EMSA 电泳试剂盒（蛋白质-RNA）