天净沙系列

CAT#:211245

低温运输及避光保存

天净沙

EMSA 检测试剂盒（生物素-ECL 检测法）

Skygen EMSA Detection Kit

使用手册 V0.8

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 EMSA 检测试剂盒（生物素-ECL 检测法），EMSA 是一种灵敏的技术，是基于 DNA/RNA-蛋白复合物在聚丙烯酰胺凝胶电泳中有不同迁移率的原理，可用于鉴定蛋白质与核酸的相互作用。本试剂盒为 Streptavidin-HRP 及后续的 ECL 试剂来实现化学发光检测 Biotin 标记的 EMSA 探针的检测试剂盒。产品具有以下特点：

1．高效、高灵敏度；

2．本产品使用了非特异性结合更低的 strepatavidin，使检测结果背景更低。

3．本产品可以用于 30 个蛋白和探针的结合反应，并足够检测至少 3 块有生物素标记 EMSA 探针的膜。

4．本产品仅供科研使用。

规格及成分

本产品使用大扁盒包装

成分	编号	规格	包装
封闭液	211245a	114 mL	120 mL 本色瓶
洗涤液（5×）	211245b	75 mL	120 mL 本色瓶
检测平衡液	211245c	75 mL	120 mL 本色瓶
结合缓冲液（5×）	211245d	60 μL	1.0 mL 本色瓶
上样缓冲液 1（无色，10×）	211245e	60 μL	1.0 mL 本色瓶
上样缓冲液 2（蓝色，10×）	211245f	60 μL	1.0 mL 本色瓶
ECL A 液	211245g	16.5 mL	30 mL 本色瓶
ECL B 液	211245h	16.5 mL	30 mL 本色瓶
链霉亲和素-HRP 结合物	211245i	30 μL	1.0 mL 本色瓶
使用手册	211245sc	1 份	1 份

运输及保存

干冰运输，-20℃保存，有效期一年。

自备物品

带正电荷尼龙膜等。

使用流程

一、EMSA 胶的配制：

1. 准备好倒胶的模具。建议：为得到更好的结果，可以选择可灌制较大 EMSA 胶的模具。最好是灌制较薄胶的模具，以便于干胶等后续操作。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. 按照如下配方配制 20 mL 4%的聚丙烯酰胺凝胶（使用 29:1 等不同比例的 Acr/Bis 对结果影响不大）。

成分	用量
10× TBE 缓冲液	1.0 mL
重蒸水	16.2 mL
丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺混合 39:1 (40%, w/v)	2.0 mL
10%过硫酸铵溶液	150 μL
80%甘油	625 μL
TEMED	10 μL

3. 按照上述顺序依次加入各种试剂，注意加入 TEMED 前先混匀，试剂加完后，马上加入到制胶的模具中。避免产生气泡，并加上梳齿。若发现发现易形成气泡，可以把一块制胶的玻璃板进行硅烷化处理。

二、EMSA 结合反应：

4. 按照下表设置 EMSA 结合反应。

成分	冷竞争组	突变探针冷竞争组	样品组	阴性对照组	Super-shift 反应
无核酸酶水	4 μL	4 μL	5 μL	7 μL	4 μL
结合缓冲液 (5×)	2 μL	2 μL	2 μL	2 μL	2 μL
细胞核蛋白或纯化的转录因子	2 μL	2 μL	2 μL	-	2 μL
目的蛋白特异抗体	-	-	-	-	1 μL
未标记探针	1 μL	1 μL	-	-	-
标记好的探针	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL

5. 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）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，室温放置 20 分钟。
6. 加入 1 μL 上样缓冲液 1（无色，10×），混匀后立即上样。注意：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。若想要便于观察上样，则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，至可以观察到蓝色即可。

三、电泳：

7. 电泳液为 0.5× TBE 溶液。按照 10 V/厘米的电压预电泳 10 分钟。为观察电压是否正常进行，可以在空余的上样孔中加入少量稀释好的 1×的上样缓冲液 2

（蓝色）。

8. 在上样孔中加入混合了上样缓冲液的样品。为观察电泳进行的情况，在多余的上样孔内加入 10 μL 稀释好的 1×的上样缓冲液 2（蓝色）。

9. 按照 10 V/厘米的电压电泳。确保胶的温度不超过 30℃，如果温度升高，需要适当降低电压。电泳至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。

四、转膜：

10. 取一和 EMSA 胶大小相近或略大的尼龙膜，剪角做好标记，用 0.5× TBE 溶液浸泡至少 10 分钟。注意尼龙膜自始至终仅能使用镊子夹取不接触样品的边角处。

11. 接下来取两片和尼龙膜大小相近或略大的滤纸，用 0.5× TBE 溶液浸湿。之后把浸泡过的尼龙膜放置在其中一片浸湿的滤纸上，注意避免尼龙膜和滤纸间产生气泡。

12. 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。

13. 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。

14. 以 0.5× TBE 溶液为转膜液，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，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 × 0.1 cm 的 EMSA 胶，用 BioRad 的常用的 Western 转膜装置。

15. 电转时可以设置为 380 mA（约 100 V）转膜 30-60 分钟。如果胶较厚，则适当延长转膜时间。转膜时需保持转膜液的温度较低，为确保低温，可以把电转槽置于 4℃冷库或置于冰浴或冰水浴中进行电转。具体的电转膜方法请参考电转膜装置的使用说明。

16. 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。

五、交联：

17. 用紫外交联仪选择 254 nm 紫外波长，120 mJ/cm2，交联 45-60 秒。也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。

18. 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。
19. 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 17 的条件再交联一次，以进一步改善交联效果。

六、化学发光法检测生物素标记的探针：

20. 使用 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。
21. 取一合适的容器加入 15 mL 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。
22. 取 7.5 μL 链霉亲和素-HRP 结合物加入到 15 mL 封闭液中(1:2000 稀释)，混匀备用。
23. 去除用于尼龙膜封闭的封闭液，加入上一步中配制的 15 mL 含有链霉亲和素-HRP 结合物的封闭液。在侧摆摇床或水平摇床上缓慢摇动 15 分钟。
24. 取 25 mL 洗涤液（5×），加入 100 mL 重蒸水或超纯水，混匀配制成 125 mL 洗涤液。
25. 将尼龙膜转移至另一装有 15-20 mL 洗涤液的容器内，漂洗 1 分钟。
26. 去除洗涤液，加入 15-20 mL 洗涤液，在侧摆摇床或水平摇床缓慢上洗涤 5 分钟。
27. 重复步骤 26 三次（共洗涤四次），每次洗涤时间都约为 5 分钟。
28. 将尼龙膜转移至另一装有 20-25 mL 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。
29. 取 5 mL ECL A 液和 5 mL ECL B 液混匀，配制成 ECL 工作液。注意：ECL 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。
30. 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。
31. 在尼龙膜的表面小心加上步骤 29 配制好的共 10 mL ECL 工作液，使工作液完全覆盖尼龙膜。室温放置 2-3 分钟。
32. 取出尼龙膜，用吸水纸吸去过多液体。将尼龙膜放在两片保鲜膜或其它适当的透光薄膜中间，并固定于压片暗盒（也称片夹）内。

	33. 用 X 光片压片 1-5 分钟。可以先压片 1 分钟，立即显影定影，然后根据结果再调整压片时间；也可以直接分别压片 30 秒、1、3、5 分钟或更长时间，然后一起显影定影观察结果。
关联产品	MNase Southern 预杂交液

20260629sxl