上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

EMSA/Gel-Shift 试剂盒

产品编号	产品名称	包装
R32250-100T	EMSA/Gel-Shift 试剂盒	100T

产品简介：

EMSA/Gel-Shift 试剂盒(EMSA/Gel-Shift Kit)是用于 EMSA(也称 gel shift)研究的一个试剂盒。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。本试剂盒提供了进行 EMSA 实验的探针标记、蛋白和 DNA 结合以及 EMSA 上样等的主要试剂，使 EMSA 实验变得简单方便。

EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X)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。

每个 EMSA/Gel-Shift 试剂盒足够标记 10-20 次探针，足够进行 100 个蛋白和探针的结合反应。

产品组成：

产品编号	产品名称	包装
R32250-100T	T4 Polynucleotide Kinase	100U
	T4 Polynucleotide Kinase Buffer (10X)	100μl
	Nuclease-Free Water	1ml
	探针标记终止液	100μl
	5M 醋酸铵	600μl
	EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X)	200μl
	EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液(蓝色，10X)	200μl
	EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液(无色，10X)	200μl
	TE	1ml/管，共 2 管
—	说明书	1 份

保存条件：

-20° C 保存，一年有效。

注意事项：

需自备待标记的 EMSA 探针，需自备用于探针标记的同位素，需自备 EMSA 胶配制的相关试剂。

如需做 super-shift，需自备用于 super-shift 的抗体。

本实验涉及到同位素的操作，请严格按照同位素的相关管理条例进行操作。

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. 探针的标记：

1. 如下设置探针标记的反应体系：

待标记探针(1.75pmol/μl)	2μl
T4 Polynucleotide Kinase　Buffer (10X)	1μl
Nuclease-Free Water	5μl
[γ-32P]ATP (3,000Ci/mmol at 10mCi/ml)	1μl
T4 Polynucleotide Kinase (5-10u/μl)	1μl
总体积	10μl

按照上述反应体系依次加入各种试剂，加入同位素后，Vortex 混匀，再加入 T4 Polynucleotide Kinase，混匀。

2. 使用水浴或 PCR 仪，37° C 反应 10 分钟。

3. 加入 1 微升探针标记终止液，混匀，终止探针标记反应。

4. 再加入 89 微升 TE，混匀。此时可以取少量探针用于检测标记的效率。通常标记的效率在 30%以上，即总放射性的 30%以上标记到了探针上。为实验简便起见，通常不必测定探针的标记效率。

5. 标记好的探针最好立即使用，最长使用时间一般不宜超过 3 天。标记好的探针可以保存在-20° C。

2. 探针的纯化：

通常为实验简便起见，可以不必纯化标记好的探针。在有些时候，纯化后的探针会改善 EMSA 的电泳结果。如需纯化，可以按照如下步骤操作：

1. 对于 100 微升标记好的探针，加入 1/4 体积即 25 微升的 5M 醋酸铵，再加入 2 体积即 200 微升的无水乙醇，混匀。

2. 在-70° C 至-80° C 沉淀 1 小时，或在-20° C 沉淀过夜。

3. 在 4° C，12,000g-16,000g 离心 30 分钟。小心去除上清，切不可触及沉淀。

4. 在 4° C，12,000g-16,000g 离心 1 分钟。小心吸去残余液体。微晾干沉淀，但不宜过分干燥。

5. 加入 100 微升 TE，完全溶解沉淀。标记好的探针最好立即使用，最长使用时间一般不宜超过 3 天。标记好的探针可以保存在-20° C。

3. EMSA 胶的配制：

1. 准备好倒胶的模具。可以使用常规的灌制蛋白电泳胶的模具，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。

2. 按照如下配方配制 20 毫升 4%的聚丙烯酰胺凝胶(注意：使用 29:1 等不同比例的 Acr/Bis 对结果影响不大)。

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

3. 按照上述次序加入各个溶液，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。

4. EMSA 结合反应：

1. 如下设置 EMSA 结合反应(预期的结果参见图 1)：

阴性对照反应：

Nuclease-Free Water	7μl
EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X)	2μl
细胞核蛋白或纯化的转录因子	0μl
标记好的探针	1μl
总体积	10μl

探针冷竞争反应：

Nuclease-Free Water	4μl
EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X)	2μl
细胞核蛋白或纯化的转录因子	2μl
未标记的探针	1μl
标记好的探针	1μl
总体积	10μl

Super-shift 反应：

Nuclease-Free Water	4μl
EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X)	2μl
细胞核蛋白或纯化的转录因子	2μl
目的蛋白特异抗体	1μl
标记好的探针	1μl
总体积	10μl

样品反应：

Nuclease-Free Water	5μl
EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X)	2μl
细胞核蛋白或纯化的转录因子	2μl
标记好的探针	1μl
总体积	10μl

突变探针的冷竞争反应：

Nuclease-Free Water	4μl
EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X)	2μl
细胞核蛋白或纯化的转录因子	2μl
未标记的突变探针	1μl
标记好的探针	1μl
总体积	10μl

2. 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。

3. 加入 1 微升 EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液(无色，10X)，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 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，至能观察到蓝颜色即可。

5. 电泳分析：

1. 用 0.5XTBE 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。

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

3. 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. 剪一片大小和 EMSA 胶大小相近或略大的比较厚实的滤纸。小心取下夹有 EMSA 胶的胶板，用吸水纸或普通草纸大致擦干胶板边缘的电压液。小心打开两块胶板中的上面一块(注：通常选择先移走硅烷化的那块玻璃板)，把滤纸从 EMSA 胶的一侧逐渐覆盖住整个 EMSA 胶，轻轻把滤纸和胶压紧。滤纸被胶微微浸湿后(大约不足 1 分钟)，轻轻揭起滤纸，这时 EMSA 胶会被滤纸一起揭起来。把滤纸侧向下，放平，在 EMSA 胶的上面覆盖一层保鲜膜，确保保鲜膜和胶之间没有气泡。

5. 在干胶仪器上干燥 EMSA 胶。然后用 X 光片压片检测，或用其它适当仪器设备检测。EMSA 的典型分析结果可以参见下面的图 1。

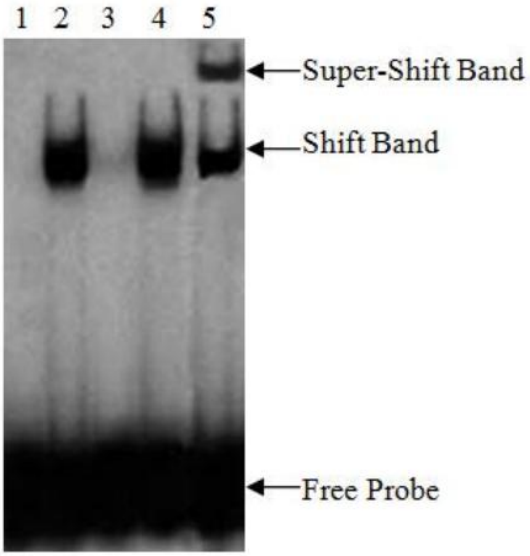

图 1. 一个典型的 EMSA/Gel-Shift 分析图

1.阴性对照反应(标记探针)；**2.常规反应**(含激活的目的转录因子的核蛋白+标记探针)；**3.探针冷竞争反应**(含激活的目的转录因子的核蛋白+标记探针+标记探针 100 倍量的未标记探针)；**4.突变探针的冷竞争反应**(含激活的目的转录因子的核蛋白+标记探针+标记探针 100 倍量的未标记突变探针)；**5. Super-shift 反应**(含激活的目的转录因子的核蛋白+标记探针+目的转录因子的特异抗体)。