

Chemiluminescent EMSA Kit

化学发光法 EMSA 试剂盒

产品编号	产品名称	规格
BL554A	化学发光法EMSA试剂盒	50T

产品简介:

本产品是一种通过 Streptavidin-HRP 及 ECL 检测试剂来实现化学发光检测 Biotin 标记的 EMSA 探针的检测试剂盒。同时本试剂盒也提供 EMSA 检测所需的结合缓冲液和上样缓冲液, 及一些关键的相关试剂, 可以实现非同位素的 EMSA 检测。

本试剂盒采用了高质量的 Streptavidin-HRP Conjugate, HRP 和 Streptavidin 共价交联的比例大于 3, 这样比采用 Streptavidin 和 Biotin-HRP conjugate 两种试剂进行检测更方便, 并且灵敏度更高。

本试剂盒采用了非特异性结合比 avidin 更低的 streptavidin, 使检测结果背景更低灵敏度更高。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。

本试剂盒可以用于 50 个蛋白和探针的结合反应。

产品组成:

组分	名称	规格	保存
BL554A-1	EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X)	100ul	-20°C
BL554A-2	EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液(无色, 10X)	100ul	-20°C
BL554A-3	EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液(蓝色, 10X)	100ul	-20°C
BL554A-4	ECL Reagent A	28ml	4°C
BL554A-5	ECL Reagent B	28ml	4°C
BL554A-6	Streptavidin-HRP Conjugate	50ul	-20°C
BL554A-7	封闭液	190ml	4°C
BL554A-8	洗涤液(5X)	125ml	4°C
BL554A-9	检测平衡液	125ml	4°C

使用方法:

一、探针的标记

自行准备实验所需的生物素标记 EMSA 探针。

二、EMSA 胶的配制

- 准备好倒胶的模具。可以使用常规的制备蛋白电泳胶的模具(例如 BioRad 的常规用于蛋白电泳的制胶装置), 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 胶模具。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。
- 按照如下配方配制 20ml 4% 的聚丙烯酰胺凝胶: (注: 使用 29:1 等不同比例的 Acr/Bis 对结果影响不大)。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



TBE buffer(10X)	1.0ml
重蒸水	16.2ml
39:1acrylamide/bisacrylamide(40%,w/v)	2ml
80%甘油	625 μ l
10%过硫酸铵(ammonium persulfate)	150 μ l
TEMED	10 μ l

(c) 按照上述顺序依次加入各种试剂，加入 TEMED 前先混匀，加入后立即混匀，并马上加入到制胶的模具中。避免产生气泡，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

三、EMSA 结合反应

(a) 如下设置 EMSA 结合反应

阴性对照反应	
Nuclease-Free Water	7 μ l
EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X)	2 μ l
细胞核蛋白或纯化的转录因子	0 μ l
标记好的探针	1 μ l
总体积	10 μ l
探针冷竞争反应	
Nuclease-Free Water	4 μ l
EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X)	2 μ l
细胞核蛋白或纯化的转录因子	2 μ l
未标记的探针	1 μ l
标记好的探针	1 μ l
总体积	10 μ l
Super-shift 反应	
Nuclease-Free Water	4 μ l
EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X)	2 μ l
细胞核蛋白或纯化的转录因子	2 μ l
目的蛋白特异抗体	1 μ l
标记好的探针	1 μ l
总体积	10 μ l
样品反应	
Nuclease-Free Water	5 μ l
EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X)	2 μ l
细胞核蛋白或纯化的转录因子	2 μ l
标记好的探针	1 μ l

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
 注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



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

(b) 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。

(c) 加入 1 μ l EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液(无色，10X)，混匀后立即上样。注意：有时溴酚蓝会影响蛋白和 DNA 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，至可观察到蓝色即可。

四、电泳

(a) 用 0.5X TBE 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。

(b) 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 μ l 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。

(c) 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。

五、转膜

(a) 取一和 EMSA 胶大小相近或略大的尼龙膜，剪角做好标记，用 0.5X TBE 浸泡至少 10 分钟。尼龙膜自始至终仅能使用镊子夹取，并且仅可夹取不可能接触样品的边角处。

(b) 取两片和尼龙膜大小相近或略大的滤纸，用 0.5X TBE 浸湿。

(c) 把浸泡过的尼龙膜放置在一片浸湿的滤纸上，注意避免尼龙膜和滤纸间产生气泡。

(d) 非常小心地取出 EMSA 胶放置到尼龙膜上，注意确保胶和膜之间没有气泡。

(e) 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。

(f) 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，以 0.5X TBE 为转膜液，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 10x8x0.1cm 的 EMSA 胶，用 BioRad 的常用的 Western 转膜装置，电转时可以设置为 380mA(约 100V)转膜 30-60 分钟。如果胶较厚，则需适当延长转膜时间。转膜时需保持转膜液的温度较低，通常可以把电转槽置于 4°C 冷库或置于冰浴或冰水浴中进行电转，这样可以确保低温。具体的电转膜方法请参考电转膜装置的使用说明。

(g) 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。

六、DNA 交联

(a) 用紫外交联仪(UV-light cross-linker)选择 254nm 紫外波长，120mJ/cm²，交联 45-60 秒。如果没有紫外交联仪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。

(b) 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。

注：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 (a)

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。



的条件再交联一次，以进一步改善交联效果。

七、化学发光法检测生物素标记的探针

(a) 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。

(b) 取一合适的容器加入 15ml 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。

(c) 取 7.5μl Streptavidin-HRP Conjugate 加入到 15ml 封闭液中(1:2000 稀释)，混匀备用。

(d) 去除用于尼龙膜封闭的封闭液，加入上一步中配制的 15ml 含有 Streptavidin-HRP Conjugate 的封闭液。在侧摆摇床或水平摇床上缓慢摇动 15 分钟。

(e) 取 25ml 洗涤液(5X)，加入 100ml 重蒸水或 Milli-Q 级纯水，混匀配制成 125ml 洗涤液。

(f) 将尼龙膜转移至另一装有 15-20ml 洗涤液的容器内，漂洗 1 分钟。

(g) 去除洗涤液，加入 15-20ml 洗涤液，在侧摆摇床或水平摇床缓慢上洗涤 5 分钟。

(h) 重复步骤 G 三次(共洗涤四次，每次洗涤 5 分钟)。

(i) 将尼龙膜转移至另一装有 20-25ml 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。

(j) 取 5ml ECL Reagent A 和 5ml ECL Reagent B 混匀，配制 ECL Reagent 工作液。注意：ECL Reagent 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。

(k) 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。

(l) 在尼龙膜的表面小心加上步骤 j 配制好的共 10ml ECL Reagent 工作液，使工作液完全覆盖尼龙膜。室温放置 2-3 分钟。

(m) 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。

(n) 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。

注意事项：

- 1、需自备带正电荷尼龙膜，以及凝胶电泳时所需的相关试剂。
- 2、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。
- 3、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期：

-20°C保存一年。

