

EMSA Kit

凝胶阻滞迁移试剂盒

目录号

DLI102

产品简介

凝胶阻滞或电泳迁移率实验 (Electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 是一种体外研究 DNA 结合蛋白质 (包括转录因子、共调节因子) 和 DNA 相互作用的技术。EMSA 基于 DNA-蛋白质复合体在聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 中迁移率的不同, 当 DNA 结合蛋白质与 DNA 结合后, 其在 PAGE 中的迁移率将小于未结合蛋白 DNA, 从而根据显影结果判定两者间是否结合。

产品组成

组分	20 T	96T	储存
PAGE Buffer A	20 mL	100 mL	4℃
PAGE Buffer B	20 mL	100 mL	4℃
Coagulant A	2 mL	10 mL	4℃
Coagulant B	140 μL	900 μL	4℃
EMSA lysis buffer	20 mL	100 mL	4℃
Protease inhibitor	200 μL	1 mL	-20℃
Stabilizing agent	10 mL	50 mL	4℃
Binding buffer	150 μL	750 μL	4℃
Loading buffer	300 μL	1.5 mL	4℃

产品应用

- ◆ 鉴定蛋白-DNA 结合位点, 确定某一转录因子能否结合具体 DNA 序列;
- ◆ 分析结合特异性: 通过变异 DNA 序列或竞争实验, 评定结合区域的特异残基;
- ◆ 转录因子活性对比研究。

产品特点

- ◆ 转录因子 (包括转录因子、共调节因子) 靶基因研究;
- ◆ 转录因子在靶基因启动子区域结合位点验证研究;
- ◆ 组间转录因子活性对比研究。

使用方法

- 配制 PAGE 凝胶 (时间 30 min)**
 - 在离心管中, 加入 1 mL PAGE Buffer A、1 mL PAGE Buffer B 及 4 mL ddH₂O 并充分混匀;
 - 继续加入 50 μL Coagulant A 及 7 μL Coagulant B 充分混匀后, 快速转移至制胶板中, 插入制胶梳子后, 室温静置凝胶 30 min;
- 提取核蛋白 (时间 30 min)**
 - 收集 1×10⁷ 细胞, 加入 1 mL 1×PBS 吹打混匀并 1000 rpm 离心 5 min 后, 充分去除上清;
 - 细胞沉淀中加入 1 mL EMSA lysis buffer、5 μL Protease inhibitor 吹打混匀;
 - 室温静置裂解 10 min, 期间隔 2 min 轻弹混匀;
 - 4℃, 3000 g 离心 10 min 后, 去除上清;
 - 细胞沉淀中加入 250 ~ 500 μL Stabilizing agent 充分重悬后冰浴保存待用;
- 结合反应 (时间 30 min)**



- a. 按照下表配制各组结合体系，轻轻混匀后，室温（20~37 ℃范围）静置孵育 30 min；

组别	Binding Buffer	蛋白提取物	探针	野生探针	突变探针	抗体	ddH ₂ O
单位	μL	μg	fmol	pmol	pmol	μg	μL
阴性对照	1.5	-	500	-	-	-	补足到 15
实验组	1.5	1~10	500	-	-	-	补足到 15
野生型竞争反应	1.5	1~10	500	50	-	-	补足到 15
突变型竞争反应	1.5	1~10	500	-	50	-	补足到 15
超迁移组	1.5	1~10	500	-	-	0.2~0.5	补足到 15

4. 电泳（时间 60 min）

- a. 每组加入 3 μL Loading buffer 混匀样品后，按组别顺序，依次上样至 PAGE 凝胶孔中；
- b. 在 0.5× TBE 电泳液中，120 V 恒压电泳 45~60 min。

5. 荧光拍照（时间 5 min）

- a. 将凝胶置于紫外凝胶成像或荧光凝胶成像系统中；
- b. 设置不同的曝光时间，观察目标条带位置并拍照。

注意事项

- ◆ 凝胶配制加入 Coagulant A 及 Coagulant B 后，需要立即充分混匀，以保证凝胶浓度均匀；
- ◆ 本产品要求 EMSA 探针需要荧光素标记；
- ◆ Stabilizing agent 裂解液，采用 BCA 法检测蛋白质浓度；
- ◆ 避免多次反复冻融对蛋白质活性的影响，蛋白质提取物可以分管后 -80 ℃冻存；

- ◆ 野生竞争探针为相同核苷酸序列探针；
- ◆ 突变竞争探针为不同核苷酸序列探针；
- ◆ 超迁移组（super-shift）组抗体为 IP 级别的 DNA 结合蛋白抗体；
- ◆ 当蛋白提取物为纯化的 DNA 结合蛋白，可不作超迁移组；
- ◆ 染料溴酚蓝电泳至凝胶的下缘 1/4 处时停止电泳；
- ◆ 电泳缓冲液温度不超过 30 ℃；
- ◆ 根据探针浓度曝光时间可以设置为 100 ms、200 ms、400 ms、800 ms 或 1000 ms。

保存条件

各组分保存条件见产品组成，保质期 12 个月。4~8℃ 运输。

技术支持

本公司产品使用过程中如有任何疑问与建议，欢迎随时与我们联系：
product@tsingke.com.cn。

说明书版本号

1.1.1.1102.2505

