|  |
| --- |
| **代理商公司简介****竞争超迁移EMSA服务案例** |



竞争超迁移EMSA服务案例

1. **实验目的**

利用待检测转录因子对应的DNA探针和抗体，对1例细胞核蛋白提取物进行竞争超迁移EMSA检测。

1. **实验目的**

根据特异性的探针序列合成生物素标记的探针和非生物素标记的探针，进行相应的结合反应后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，经过电转将胶上的蛋白-DNA结合物及未结合的DNA转移到尼龙膜或其他固相支持物上，经干烤或者紫外线照射固定，用酶反应显色，从而检测DNA与蛋白有无结合条带。

1. **操作步骤**

1.核蛋白提取：参考Thermo Scientific 试剂盒NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents。

1.1 采用预冷的PBS冲洗样品；

1.2 转移至1.5 ml离心管中，500×g，离心3 min；

1.3 小心弃去上清，备用；

1.4 加入预冷的CER I（含Protease Inhibitor）100 μl；

1.5 剧烈votex 15 s，冰浴10 min；

1.6 加入预冷的CER II 5.5 μl；

1.7 剧烈votex 5 s，冰浴1 min；

1.8 剧烈votex 5 s，16000×g，离心10 min；

1.9 立即吸取上清至一预冷的离心管中，即为抽提得到的组织浆蛋白；

1.10 加入预冷的NER （含Protease Inhibitor）40 μl；

1.11 剧烈votex 15 s，置于冰上，每10 min剧烈votex 15 s，共40 min；

1.12 16000×g，离心10 min；

1.13 立即吸取上清至一预冷的离心管中，即为抽提得到的组织核蛋白。

2. 合成生物素标记和非标记的探针：

01158-3-F：5’-cgctccgtGCCGCCATTTTGggcggctggt-3’

01158-3-R：5’-ACCAGCCGCCCAAAATGGCGGCACGGAGCG-3’

3. 6%非变性聚丙烯酰胺凝胶的配制：在15 ml试管中，按顺序放入ddH2O 7.15 ml ，30%聚丙烯酰胺溶液2 ml，5×TBE 1 ml，甘油175 μl，10% APS 75 μl，TEMED 8 μl；

4. 4℃，100 V电压预电泳约60 min；

5. 根据Thermo Scientific公司EMSA试剂盒（货号：20148）要求配制结合反应液，室温放置15 min；

6. 加入生物素标记的探针，室温放置35 min；

7. 加入5 ul Loading Buffer到每一个结合反应中，混匀，上样；

8. 4℃，100 V电压电泳，至溴芬兰电泳至2/3凝胶长度时停止电泳；

9. 转膜：将合适大小的尼龙膜浸泡在0.5×TBE中15 min，按照夹心法依次将海绵、滤纸、凝胶、尼龙膜、滤纸、海绵按顺序放好，筛孔板固定，仔细去除夹心内所有气泡，凝胶面向阴极插入电泳槽中，倒入0.5×TBE，300 mA恒流电转移30 min；

10. 紫外线交联；

11. 化学发光法检测生物素标记的DNA：参照PIERCE公司LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit说明操作；

12. 50℃水浴温和地将封闭缓冲液（blocking buffer）和4×漂洗缓冲液（Wash Buffer）预热，直至颗粒物全部溶解；

13. 将膜放入洁净的塑料平皿中，加入20 ml 封闭缓冲液，放在摇床上温和摇动15 min；

14. 吸取66.7 μl辣根抗生物素蛋白链菌素过氧化物酶底物到20 ml封闭缓冲液，混匀备用；

15. 将封闭缓冲液倒去，加入步骤10所配溶液，放在摇床上温和摇动15min；

16. 取40 ml 4×漂洗缓冲溶液到120 ml ddH2O中，得到1×漂洗缓冲溶液；将膜转移到一个新的塑料平皿，加入20 ml 1×漂洗缓冲溶液漂洗5min，共漂洗4次；

17. 将膜转移至另一新的塑料平皿，加入30 ml底物平衡缓冲液，平衡5min；

18. 配置底物工作液（Substrate Working Solution）：将6 ml Luminol/Enhancer Solution加入到6 ml Stable Peroxide Solution中，混匀，避光保存备用；

19. 将膜从底物平衡缓冲液中拿出，正面朝上放到新的洁净平皿中，将底物工作液倒入膜的表面，避光放置5 min；

20. 将膜从底物工作液中取出，用塑封膜封好，避免气泡和皱褶；

21. 机器曝光并记录结果。

1. **实验结果**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 特异性抗体 | - | - | - | + |
| 非标记探针 | - | - | + | - |
| 结合蛋白 | - | + | + | + |
| 标记探针 | + | + | + | + |

****

1. **结果分析**

综上，该探针与核蛋白结合后检测到了结合条带；加入非标记的探针结合条带消失，显示出竞争；加入特异性的抗体后，结合条带迁移变慢，显示出超迁移。