



## EMSA(凝胶迁移) 实验报告

### 一、实验器材及试剂

#### 1、实验器材

名称	厂家	型号
低温研磨仪	上海净信	JXFSTPRP-CLN
台式高速冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司	2-16R
掌上离心机	杭州申花科技有限公司	SH-Mini7KS
涡旋混匀仪	杭州申花科技有限公司	SH-VM500S
金属浴	申花科技	SH-G100
磁力搅拌器	LICHEN	LC-MS-M2
翘板摇床	申花科技	SH-RS100E
垂直电泳仪	申花科技	SVE-2
蛋白转印槽	申花科技	SH-ZYZ10T
电泳仪电源	申花科技	SH-DDY10P
抗体孵育盒	Biosharp	BS-WB-01
镊子	Biosharp	BS-PTZ-UW
切胶铲	Biosharp	810103022
切胶托盘	/	/
气泡滚轮	Biosharp	3308 L-TRANS-2
电泳玻璃板干燥支架	Biosharp	BS-QT-003
化学发光成像系统	申花科技	SH-COMPACT523
移液器 0.1-2.5 $\mu$ L	Eppendorf	3123000217
移液器 0.5-10 $\mu$ L	Eppendorf	3123000020
移液器 2-20 $\mu$ L	Eppendorf	3123000098
移液器 10-100 $\mu$ L	Eppendorf	3123000047
移液器 20-200 $\mu$ L	Eppendorf	3123000055
移液器 100-1000 $\mu$ L	Eppendorf	3123000063
移液器 500-5000 $\mu$ L	Eppendorf	3123000071
酶标仪	ThermoFisher	Multiskan FC



## 2、主要实验试剂

试剂名称	厂家	货号
细胞核与细胞浆蛋白分离提取试剂盒	Beyotime	P0028
PMSF (100mM)	Beyotime	ST506
BCA 蛋白定量检测试剂盒	Beyotime	P0011
DNA Loading Buffer	Beyotime	R0216-10ml
5×TBE	Beyotime	ST718
40% Acr-Bis (37.5:1)	Beyotime	ST004
甘油	Beyotime	ST1348-50ml
促凝剂	Beyotime	T78381-25ML
TEMED	Beyotime	ST728
DEPC 水	Beyotime	R0022
尼龙膜	Beyotime	FFN15
BeyoECL Plus (超敏 ECL 化学发光试剂盒)	Beyotime	P0018S
BeyoECL Star (特超敏 ECL 化学发光试剂盒)	Beyotime	P0018AS
BeyoECL Moon (极超敏 ECL 化学发光试剂盒)	Beyotime	P0018FS

## 二. EMSA 实验步骤

### 1. 核蛋白提取 (核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒)

#### (1) 对于细胞:

1) 使用前将本产品室温解冻、复温后放置于冰上;

2) 根据使用体积配制工作液:

a. 细胞浆蛋白抽提工作液: 使用前在细胞浆蛋白抽提试剂 (G3741-1) 中加入 Cocktail (G2006-250UL), PMSF (G2008-1ML) 至终浓度为 1mM。临用前添加避免失效;

b. 细胞核蛋白抽提工作液: 使用前在细胞核蛋白抽提试剂 A (G3741-2) 加入 Cocktail (G2006-250UL), PMSF (G2008-1ML) 至终浓度为 1mM 以及 2% 体积的细胞核蛋白抽提试剂 B (G3741-3)。临用前添加避免失效;



- 3) 细胞溶胀及裂解：根据细胞沉淀量添加细胞浆蛋白抽提工作液，于 4°C 重悬细胞，裂解 10min。裂解过程中涡旋 2-3 次，裂解液使用体积根据细胞沉淀体积确定，推荐 10 $\mu$ l 细胞沉淀加入 100 $\mu$ l 裂解液。例如 10<sup>6</sup> 总量的 HeLa 沉淀量约为 10 $\mu$ l，即加入细胞浆蛋白抽提工作液 100 $\mu$ l 进行裂解；
  - 4) 4°C，2000g，5min 条件下离心收集上清，吸尽上清，减少浆蛋白在核蛋白提取中的污染；
  - 5) 对步骤 1.4 的上清在 12000g，4°C，5min 条件下离心再次收集上清即为浆蛋白；
  - 6) 细胞核提取：向步骤 1.4 收集的沉淀中加入 50-100 $\mu$ l 细胞核蛋白抽提工作液。涡旋重悬，于 4°C 抽提 20min，期间每 3-4min 涡旋 10-15s；
  - 7) 12000g，4°C，10min 离心收集上清即为核蛋白。
- (2) 对于新鲜组织：
- 1) 使用前将本产品室温解冻、复温后放置于冰上；
  - 2) 根据使用体积配制工作液：
    - a. 细胞浆蛋白抽提工作液：使用前在细胞浆蛋白抽提试剂加入 Cocktail，PMSF 至终浓度为 1mM。临用前添加避免失效；
    - b. 细胞核蛋白抽提工作液：使用前在细胞核蛋白抽提试剂 A 加入 Cocktail，PMSF 至终浓度为 1mM 以及 2% 体积的细胞核蛋白抽提试剂 B。临用前添加避免失效；
  - 3) 把组织尽可能切成细小的碎片，使用预冷 PBS 清洗 1-2 次。每 50mg 组织加入 1 mL 细胞浆蛋白抽提工作液，使用预冷玻璃匀浆器或低温组织研磨仪充分匀浆。玻璃匀浆器研磨 30-60 次，研磨仪设置参数 60hz，30s，2 次。研磨次数及研磨仪参数可根据组织类型进行调整；
  - 4) 于 4°C，2000g 离心 5 分钟，收集上清，吸尽上清，减少浆蛋白在核蛋白提取中的污染；对上述步骤的上清在 12000g，4°C，5min 条件下离心再次收集上清即为浆蛋白；
  - 5) 细胞核提取：向步骤 2.4 收集的沉淀加入 50-100 $\mu$ l 细胞核蛋白抽提工作液，涡旋重悬，于 4°C 裂解提取 20min，每 3-4min 涡旋 10-15s；
  - 6) 12000g，4°C，10min 离心收集上清即为核蛋白。
2. 制胶（1.5mm 玻璃板）

试剂	浓度 6%
H <sub>2</sub> O (ml)	7.50



10*TBE (μl)	500
40%丙烯酰胺 (ml)	1.50
50%甘油 (μl)	500
改良型促凝剂 (μl)	50
TEMED (μl)	10
总体积 (ml)	10

待胶完全凝固后 120v 预电泳 1h, 缓冲液用预冷的 0.5×TBE。

3. 蛋白与探针反应(注: 蛋白调整至浓度 1 μg/μl ,上样体积 2 μl)

试剂名称	阴性对照 μl	样品组 μl	冷竞争 μl	突变竞争 μl	超迁移 μl
10×binding buffer	2	2	2	2	2
1μg/μl poly (dl.dc)	1	1	1	1	1
50% glycerol	1	1	1	1	1
1%NP-40	1	1	1	1	1
100mM MgCl <sub>2</sub>	1	1	1	1	1
200mM EDTA	1	1	1	1	1
Protein	0	2	2	2	2
标记探针	2	2	2	2	2
未标记探针	0	0	2	0	0
突变探针	0	0	0	2	0
特异性抗体	0	0	0	0	2
DEPC 水				补足至 20μl	

混合后室温放置 25-30 分钟。

4. 上样: 预电泳完后马上更换预冷的电泳缓冲液, 加 4μl 的 6×上样缓冲液到样品混合液中, 马上上样电泳, 150v , 60min。
5. 电转移: 将带正电的尼龙膜放入 0.5×TBE 中平衡 10 分钟, 待电泳完成后将加有样品的整块胶取下电转, 转膜缓冲液为预冷的 0.5×TBE, 300mA 转印 30 分钟。
6. 交联: 转膜完成后将膜取出, 于紫外灯下 20cm 处作用 20 分钟。
7. 封闭: 将交联完成的尼龙膜取出放入洗净的孵育盒, 用封闭液封闭 20 分钟。期间放于摇床上轻柔摇晃。



8. 抗体反应：倒掉封闭液。用封闭液将抗体稀释 300 倍后，室温孵育 30 分钟。期间放于摇床上轻柔摇晃。
9. 洗脱：用 1×的洗脱液清洗 4 次,每次 10 分钟。摇床速度为快速。
10. ECL 发光检测：将 ECL A 和 B 液按照 1:1 比例混合好后备用；将洗脱完的 PVDF 膜取出放在吸水纸上，稍微吸干膜上面的液体，将膜放在化学发光成像仪托盘上，加入混合好的 ECL 发光液，让液体完全覆盖膜，待反应 1min 之后，用吸水纸，吸干上面多余的液体，将托盘放入化学发光成像仪中，按照预设程序开始成像，成像完成之后，保存原始图为 TIFF 格式。

仅供科研用途，不可用于临床诊断！