

凝胶阻滞迁移 EMSA

EMSA 实验是在体外检测蛋白质和 DNA 互作的常规方法, 本 Protocol 源自陈忠周课题组毕业论文, 采用核酸染料对电泳结果快速检测, 实验前需要准备纯化好的蛋白质样品与 DNA 样品

1. 检查试剂是否足够, 及时配制相关试剂

- **TBS 缓冲液(5x)**: 55g 硼酸、108g Tris, 用 HCl 调 pH=8, 加水定容至 2L
- **50mM 双链 DNA 样品**: 使用 30bp 长度的一对引物, 溶解为 100mM 浓度, 水浴锅 95°C 加热 5 分钟变性后, 关闭水浴锅自然降温至室温; 或者使用特定浓度的 pUC19 线性化质粒
- **30% 凝胶液**: 凝胶液的成分为 Arc-Bis(75:1), 可以称取 5.93g Acr、0.079g Bis, 直接加入 20mL 无菌水, 体积会变大, 充分溶解后用 0.45 μ m 滤膜过滤
- **50% 甘油**: 用无菌水 1:1 稀释甘油(2mL 灭菌超纯水 + 2mL 甘油)
- **3x 核酸染色液**: 15 μ L 10000X GelRed Plus 浓缩液和 5mL 1M NaCl 加到 45ml ddH₂O 中, 室温保存, 使用后回收, 尝试能否重复使用
- **10xTris-based Binding Buffer**: 溶解后 1mL 分装, 维持室温使用
 - **1M Tris-HCl (pH=7.5)**: 称取 6.1g Tris 溶解于水中, 用 HCl 调 pH 到 7.5, 50mL 定容
 - **1M DTT**, -20°C 冰箱有 1M 的储液, 1mL 管分装

	储液	10x 浓度	10 mL 配制
Tris-HCl	1M Tris-HCl (pH=7.5)	100 mM	1 mL
EDTA	0.5M EDTA (pH=8.0)	10 mM	0.2 mL
KCl	粉末(M _w =74.55g/mol)	1 M	0.75 g
DTT	1M DTT 储液(1000x)	1 mM	0.01 mL
Glycerol	液体	50% vol/vol	5 mL
BSA	30mg/mL(3%,300x)	0.10mg/mL	0.03 mL
dH ₂ O			定容到 10 mL

- ## 2. 配制 5%TBE Native PAGE, 室温下凝固至少 2 小时。 ! EMSA 不区分浓缩胶和分离胶, 需要保留样品孔

5%TBE Native PAGE	8 mL 体系
dH ₂ O	4.64 mL
5xTBE	1.6 mL
30% Acr-bis(75:1)	1.33mL
50% 甘油	0.32 mL
10% AP 储液	56 uL
TEMED	5.6uL

3. 凝胶期间或前一天晚上准备 EMSA 样品, 按照如下表格配制 20 μ L 体系的样品, 短离后, 25 $^{\circ}$ C 孵育至少 1 小时

	正对照	负对照	实验组 1	实验组 2	实验组 3
10 \times Binding Buffer	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L
DNA(50mM)	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Protein(1mg/mL)	2 μ L	2 μ L	1 μ L	2 μ L	3 μ L
ddH ₂ O	15 μ L	15 μ L	16 μ L	15 μ L	14 μ L

4. 以 0.5 \times TBE 为电泳缓冲液, 在冰水浴中不上样 200V 预电泳 30 min
5. 在 EMSA 样品中混入 2 μ L 10 \times Loading Buffer 后进行电泳, 加入 Marker 和等量纯 DNA, 20 μ L 上样, 冰水浴中 200V 恒压电泳 30 分钟, 期间及时补充冰块
6. 电泳结束后拆下胶板, 加入核酸染料, 在小塑料盒中室温振荡染色约 10 min, 300nm 紫外光下扫胶, 使用过的核酸染料于 50 mL 管中回收(可重复使用)
7. 换一个盒子, 在 PAGE 胶中加入快染液进行染色, 查看蛋白所在位置

修订日期 2024-04-23

JW Wang L5