

EMSA试剂盒

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) Kit

注:本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4°C及-20°C,保质期12个月。

序号	试剂	货号及规格			储存
		IEP008 (12T)	IEP008M (24T)	IEP008L (96T)	
01	Buffer 1	2 mL	4 mL	16 mL	4°C
02	Buffer 2	0.4 mL	0.8 mL	3.2 mL	4°C
03	封闭液	30 mL	60 mL	240 mL	4°C
04	5×洗涤液	32 mL	64 mL	256 mL	4°C
05	检测平衡液	40 mL	80 mL	320 mL	4°C
06	ECL Plus Reagent A	2 mL	4 mL	16 mL	4°C
07	ECL Plus Reagent B	2 mL	4 mL	16 mL	4°C
08	PMSF	24 μL	48 μL	192 μL	-20°C
09	Protease inhibitor	24 μL	48 μL	192 μL	-20°C
10	DTT	24 μL	48 μL	192 μL	-20°C
11	10×结合反应液	24 μL	48 μL	192 μL	-20°C
12	Poly(al:dC)	12 μL	24 μL	96 μL	-20°C
13	10×Loading buffer	30 μL	60 μL	240 μL	-20°C

14	Streptavidin-HRP	6 μ L	12 μ L	48 μ L	-20 $^{\circ}$ C
----	------------------	-----------	------------	------------	------------------

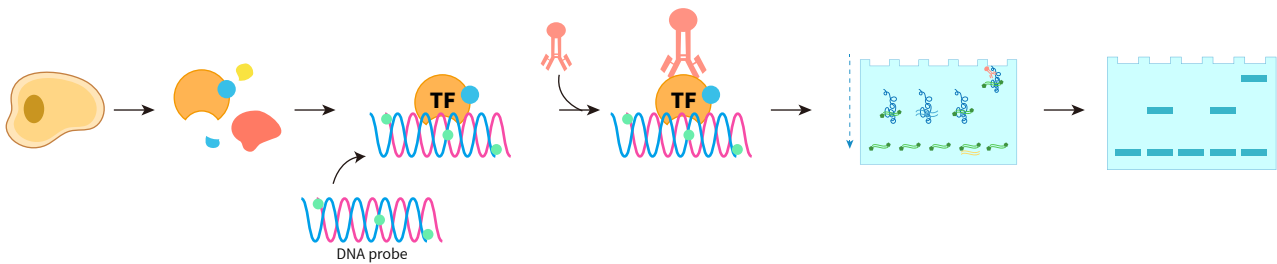
产品简介/Product Description

MeRIP (Methylated RNA Immunoprecipitation) RNA 甲基化指发生在 RNA 分子上不同位置的甲基化修饰现象, 常见的 RNA 转录后修饰方式有 6- 甲基腺嘌呤 (N6-methyladenosine, m6A)、5- 甲基胞嘧啶 (C5-methylcytidine, m5C) 和 7- 甲基鸟嘌呤 (N7-methylguanosine, m7G) 等。RNA 甲基化在调控基因表达、剪接、RNA 编辑、RNA 稳定性、控制 mRNA 寿命和降解、介导环状 RNA 翻译等方面可能扮演重要角色。利用甲基化 RNA 免疫共沉淀 (Methylated RNA Immunoprecipitation, MeRIP) 技术, 可以对 RNA 转录后甲基化修饰图谱进行全面研究。

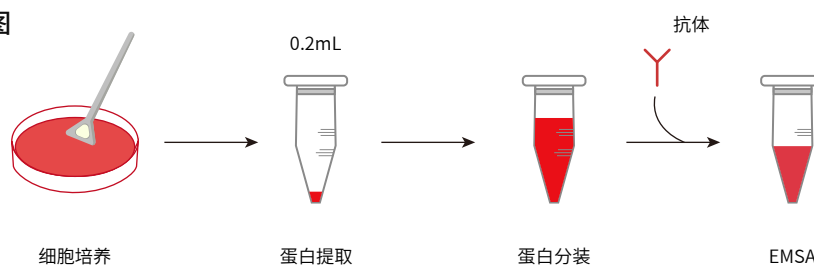
MeRIP 有助于研究 RNA 的化学修饰以及其分子机制, RNA 甲基化会在几个层面影响基因的表达: 1) 影响 mRNA 的稳定性; 2) 影响 mRNA 的剪切; 3) 影响 RNA 和蛋白质的结合; 4) 影响 miRNA 的生成等等, 因此 MeRIP 助力解决细胞分化, 生物发育、疾病发生发展、热休克反应等生物学问题。

技术路线/Technology mapping

1. 原理流程图



2. 实验操作流程图



使用流程/Procedure

1. 样品准备及蛋白提取

(1) 细胞样本

- ①收集 1×10^7 , 加入 1 mL PBS 洗涤细胞, 1000 r/min 室温离心 5 min 收集细胞;
- ②加入 1 mL 预冷的 Buffer 1, 10 μ L PMSF, 10 μ L Protease inhibitor 和 10 μ L DTT, 重悬细胞后, 剧烈涡旋 10 s 充分混匀, 冰浴 10 min;
- ③4 $^{\circ}$ C, 1500g 离心 5 min, 弃上清;

- ④加入 200 μL 预冷 Buffer 2, 2 μL PMSF, 2 μL Protease inhibitor 和 2 μL DTT, 涡旋充分重悬沉淀, 冰浴 20 min, 每隔 2 min 高速剧烈涡旋 15~30 s 充分混匀;
- ⑤4°C, 12,000g~16,000g 离心 10 min, 弃沉淀, 上清为核提取物;
- ⑥考马斯亮蓝或 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度;
- ⑦分装 40 μL 左右一管 (5~25 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$ 反应体系), 液氮速冻后, -80°C暂时保存。

(2) 动物组织

- ①把 0.1 g 组织切成非常细小的碎片, 在冰浴条件充分匀浆, 用 100 μm 过滤收集细胞悬液, 可加少量 1 \times PBS 冲洗;
- ②4°C, 1,500 g 离心 5 min, 去上清, 收集细胞沉淀;
- ③加入预冷的 1 mL Buffer 1, 10 μL PMSF, 10 μL Protease inhibitor cocktail 和 10 μL DTT, 重悬细胞后, 剧烈涡旋 10 s 充分混匀, 冰浴 10 min;
- ④4°C, 1500 g 离心 5 min, 弃上清;
- ⑤加入 200 μL 预冷 Buffer 2, 2 μL PMSF, 2 μL Protease inhibitor cocktail, 2 μL DTT, 涡旋充分重悬沉淀, 冰浴 20 min, 每隔 2 min 高速剧烈涡旋 15~30 s 充分混匀;
- ⑥4°C, 12,000g~16,000g 离心 10 min, 弃沉淀, 上清为核提取物;
- ⑦考马斯亮蓝或 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度;
- ⑧分装 40 μL 左右一管 (5~25 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$ 反应体系), 液氮速冻后, -80°C暂时保存。

(3) 植物组织和部分不易匀浆的动物组织

- ①取组织样品 0.2 g, 液氮充分研磨;
- ②加入 200 μL 预冷 Buffer 2, 2 μL PMSF, 2 μL Protease inhibitor 和 2 μL DTT, 4°C摇晃浸提 20 min, 4°C, 12,000g~16,000g 离心 10 min, 弃沉淀, 上清为提取液;
- ③考马斯亮蓝或 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度;
- ④分装 40 μL 左右一管 (5~25 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$ 反应体系), 液氮速冻后, -80°C暂时保存。

(4) 原核 / 真核表达蛋白

- ①诱导蛋白质表达并鉴定表达形式, 要求表达的蛋白为上清表达;
- ②纯化诱导表达的蛋白;
- ③考马斯亮蓝或 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度;
- ④分装 40 μL 左右一管 (25ng~75ng/20 μL 反应体系), 液氮速冻后, -80°C暂时保存。

注意: 每个 EMSA 实验使用 1×10^7 细胞。

2. EMSA 凝胶配制

- ①5% 聚丙烯酰胺凝胶配制:

试剂	体积
TBE buffer (5 \times)	0.7 mL
ddH ₂ O	4.5 mL
39:1 acrylamide/bisacrylamide (40%,w/v)	0.875 mL
20%甘油	0.872 mL
10%过硫酸铵	52 μL
TEMED	3.5 μL

②照上述次序加入各个溶液，加入 TEMED 前先混匀，加入 TEMED 后立即混匀，并马上加入到制胶的模具中。避免产生气泡，并加上梳齿。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。

组分	终含量	阴性对照	WT冷竞争对照	Mutate冷竞争对照	实验组	Super shift	阳性对照 (选)
10×结合反应液	1×	2μL	2μL	2μL	2μL	2μL	2μL
细胞核提取物	5~25μg	——	1~5μL	1~5μL	1~5μL	1~5μL	1~5μL
Poly(dI:dC) (1μg/μL)	1μg	1μL	1μL	1μL	1μL	1μL	1μL
生物素标记的探针	20fmol	1μL	1μL	1μL	1μL	1μL	1μL
竞争性探针(野生)	1~4pmol	——	50~200×	——	——	——	——
竞争性探针(突变)	1~4pmol	——	——	50~200×	——	——	——
Antibody	0.5~1μg	——	——	——	——	0.5~1μL	——
ddH ₂ O to (μL)	——	20μL	20μL	20μL	20μL	20μL	20μL

②按照实验分组需要依次加入各种试剂，加入未标记的探针或抗体后混匀，并在 PCR 仪上 37°C 反应 20min，让冷探针和抗体优先反应；

③然后加入标记好的探针，混匀，在 PCR 仪上 37°C 反应 20min。（注意：期间可进行预电泳以平衡胶。）

注意：

1. 如需做 super-shift，需自备用于 super-shift 的抗体；
2. 若蛋白为原核表达产物，经纯化后每个反应体系终含量约为 25 ng~75 ng；
3. 生物素标记的探针需先稀释到 20fmol 再进行孵育，竞争性探针（野生）和竞争性探针（突变）的使用量是生物素标记探针的 50~200 倍。

4. 电泳分析

①加入 2.2 μL 10×Loading buffer，混匀后立即上样；

②用 0.5×TBE 作为电泳液。按照 10V/厘米（100V）的电压预电泳 10 min；（注意：预电泳不上样）；

③预电泳结束后按顺序将混合了 Loading buffer 的样品加入到上样孔内，按照 10V/厘米（100V）的电压电泳，4°C 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。

注意：

1. 溴酚蓝会影响蛋白和核酸的结合，建议尽量使用无色的上样缓冲液；
2. 在多余的某个上样孔内加入 10 μL 稀释好的 1× 的 EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液（蓝色），用于观察电泳进行的情况。

5. 电转印

①取和 DNA-EMSA 胶大小相近或略大的尼龙膜及两片滤纸，用 0.5×TBE 浸泡至少 5-10min；

②把浸泡过的尼龙膜放置在一片浸湿的滤纸上；

③小心地取出 EMSA 胶并放置到尼龙膜上；

④再把另外一片浸湿的滤纸放置到 EMSA 胶上；

⑤采用湿法电转膜装置，以 0.5×TBE 为转膜液，4°C，390mA（约 100V）转膜 60min；

⑥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。

注意：

1. 对于大小约为 $10 \times 8 \times 0.1$ cm 的 EMSA 胶，390 mA(约 100 V) 转膜 30-60min。如果胶较厚，则需适当延长转膜时间；
2. 结合膜的表面一定不能干燥；
3. 采用半干转膜仪时，建议 390mA、30min。

6. 紫外铰链

- ①用紫外交联仪 (UV-light cross-linker) 选择 254nm 紫外波长，120mJ/cm²，交联 2-10 min；
- ②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 4°C 存放 3-5 天，然后再进入下一步检测。

7. 化学发光反应

- ①37-50°C 水浴溶解封闭液和洗涤液；
- ②交联过的尼龙膜加入 15mL 封闭液（可重复使用 4-5 次），缓慢摇动 15 min；
- ③取 5 μ L Streptavidin-HRP 加入到 15mL 封闭液中，混匀备用；
- ④回收步骤②用于尼龙膜封闭的封闭液，加入步骤③15mL 含有 Streptavidin-HRP 的封闭液（可重复使用 4-5 次），缓慢摇动 30 min；
- ⑤回收含有 Streptavidin-HRP 的封闭液，加入 20 mL 1 \times 洗涤液（5 \times 洗涤液稀释到 1 \times 洗涤液并加入 1mL /L Tween-20）到容器内，缓慢摇动漂洗 5 min，去除洗涤液；
- ⑥重复上一步⑤三次；
- ⑦将尼龙膜转移至另一装有 20 mL 检测平衡液的容器内，缓慢摇动 5 min；
- ⑧取出尼龙膜，用吸水纸吸去过多检测平衡液。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；
- ⑨在尼龙膜的表面小心加上 ECL Plus Reagent 工作液（等体积 ECL Plus Reagent A 和 BeyoECL Plus Reagent B 混匀，体积为 0.02 mL/cm²），使工作液完全覆盖尼龙膜，室温静置 2-3 min；
- ⑩将尼龙膜放在两片保鲜膜或其它适当的透光薄膜中间，并固定于压片暗盒内，用 X 光片压片 n 分钟，显影定影，也可直接置于化学发光图像分析系统中扫描成像。

注意：

1. 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；封闭液和含 Streptavidin-HRP 的封闭液均可重复使用 4-5 次；
2. 荧光检测 ECL Plus Reagent 工作液必须现配现用；
3. 用 X 光片压片可以先压片 1 分钟，立即显影定影，然后根据结果再调整压片时间。

注意事项/Notes

1. 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，不得存放于普通住宅内；
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

