

胶迁移实验步骤

实验步骤

生物素标记探针

1 按如下顺序加入反应物，温和混匀，切勿涡漩

超纯水	25 μ l
5 \times TdT Reaction Buffer	10 μ l
探针(1 μ M)	5 μ l
Biotin-N4-CTP	5 μ l
TdT (2U/ μ l)	5 μ l

37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟

2 加入 2.5 μ l 0.2M EDTA 终止反应

3 加入 50 μ l 酚：氯仿，短暂涡漩，15000g 离心 2min，保留上层水相，-20 $^{\circ}$ C 保存。

4 结合反应前等体积混合两条标记引物，90 $^{\circ}$ C 退火引物，并自然冷却至 4 $^{\circ}$ C，待用。

抽提核蛋白

1.2-3 $\times 10^6$ 密度铺 60mm 细胞培养板，培养约 12h

2. 移去细胞培养基，PBS 洗细胞一次

3. 加入 1mL Buffer B 于培养板，将细胞刮下收集于 1.5mL 离心管

4. 1000g 离心 2min，吸去上清

5. 加入 160 μ l Buffer A，重悬沉淀，冰育 20min

6. 加入 40 μ l 含 2.5% NP-40 的 Buffer A，涡漩 10s，4 $^{\circ}$ C 15000g 离心 5min

7. 吸去上清，加入 40 μ l Buffer C，4 $^{\circ}$ C 涡漩 25min，4 $^{\circ}$ C 18000g 离心 5min

8. 吸取 2 μ l 上清采用 Bradford 法测蛋白质浓度，其余储存于 -80 $^{\circ}$ C

配置非变性聚丙烯酰胺凝胶(以 6% 浓度为例)

5 \times TBE	1mL
30% Ac-Bi	2mL
40% Glycerin	625 μ l
DDW	6.125mL
10% AP	150 μ l
10% TEMED	100 μ l

以预冷为 4 $^{\circ}$ C 的 0.5 \times TBE 为电泳缓冲液，100V 预电泳 30-60min

EMSA (参考 PIERCE 公司试剂盒)

特异性的证明

首次使用的探针序列需证明其是否与目的蛋白特异性结合，确定目的条带的位置。

按照“步骤”中的体系，做以下四组平行结合实验：

(在加入 ddw, 10 \times binding buffer, Poly(dI.dC)的基础上)

- 1) 生物素标记的探针
- 2) 蛋白质粗提物
- 3) 蛋白质粗提物 + 200 倍浓度的非标记的同种探针
- 4) 蛋白质粗提物 + 200 倍浓度的非标记的突变探针

室温反应 10min，然后加入生物素标记的探针

室温继续反应 20min, 做 EMSA 检测结果分析, 如果出现如下实验结果

- 1) 显示游离探针位置
- 2) 显示游离探针位置和迁移带位置
- 3) 只有游离带, 没有迁移带
- 4) 和 2)带型一致

则证明探针与目的蛋白为特异性结合。

步骤

1.按如下顺序加入反应物, 温和混匀 (20 μ l 体系)

ddw	——
10 \times binding buffer	2 μ l
Poly(dI.dC)	1 μ l
核蛋白粗提物	4—10 μ g (温和混匀)
生物素标记的探针	0.5 μ l

室温反应 20min, 加入 6 \times Loading Buffer (TAKARA) 4 μ l, 上样 10—20 μ l, 100V 电泳至溴酚蓝于三分之二处。

2.电转前将尼龙膜浸泡于 0.5 \times TBE 至少 10min

以预冷的 0.5 \times TBE 为电转缓冲液 100V 转胶于尼龙膜上, 45min

3.UV BOX 下, 以贴近膜一面面向紫外光源, 以 254nm 激发光交联 15min

4.加入 25mL Blocking Buffer, 以约 70rpm 在脱色摇床上封闭 30min

5.将 SA-HRP 以 1:30000-50000 稀释于 12mL Blocking Buffer, 脱色摇床 70rpm 作用 20min (洗膜过程全部在脱色摇床上进行, 约 100-140rpm)

6.Buffer II 25ml, 5min

7.wash buffer 25ml 15min

8.Buffer III 25ml 5min \times 2 次

9.0.1%SDS in 2 \times SSC, 5min \times 2 次

10.0.1%SDS in 1 \times SSC, 10min \times 2 次

11.0.1%SDS in 0.5 \times SSC, 5min \times 2 次

12.将膜于滤纸稍适吸干, 加入到以 1:20 稀释的发光反应液(宁波奥唯), 作用 1-5 min, 将尼龙膜封于保鲜膜中 (避免褶皱和气泡的产生), 暗室曝光 1-5min, 检测信号。

重要试剂

Boitin-N4-CTP	(invitrogen	# 15918-18)
TdT	(NEB	# M0252L)
Poly(dI.dC)	(sigma	# P4929)
Hybond-N+ 尼龙膜	(Amersham	# RPN303B)
发光底物	(宁波 唯奥)	

缓冲液、溶液

Buffer A (store at 4 $^{\circ}$ C)

Hepes (pH7.9) 10mM

KCl	10mM
EDTA	0.1mM
DTT(fresh added)	1mM
PMSF(fresh added)	0.5mM

Buffer B (store at 4°C)
5mM EDTA in PBS (pH7.4)

Buffer C (store at 4°C)

Hepes (pH7.9)	20mM
NaCl	0.4M
EDTA	1mM
DTT(fresh added)	1mM
PMSF(fresh added)	1Mm

Buffer I (store at RT)

Tris (pH7.5)	0.1M
NaCl	1M
MgCl ₂	2mM

Buffer II (pH7.5) (store at RT)

马来酸	100mM
NaCl	150mM

Buffer III (store at RT)

Tris(pH9.5)	100mM
NaCl	100mM
MgCl ₂	50mM

Blocking Buffer (store at 4°C)
0.3%Tween-20, 0.3%Triton X-100, 5%BSA in Buffer I

Wash Buffer
0.3%Tween-20 in Buffer II

20×SSC (1L pH7.0)

NaCl	175.3g
柠檬酸钠	88.2g

10×Binding Buffer (store at -20°C)

Tris (pH7.5)	0.1M
KCl	0.5M
DTT	10Mm

Poly(dI.dC) (store at -20°C)

1mg/ml in TE (pH7.5)

SA-HRP(储存液 store at -20°C 工作液 store at 4°C)

1mg/ml in 50%PBS (pH7.2) 50%Glycerin

5×TBE (5L)

EDTA	18.612g
硼酸	139.1175g
Tris	272.565g

5×TdT Reaction Buffer (store at -20°C) (pH7.2)

Sodium cacodylate	0.5M
CoCl ₂	10mM
TCEP	1mM

Biotin-N4-CTP (store at -20°C)

Biotin-N4-CTP	50mM
Tris (pH7.5)	10mM
EDTA	1mM

使用本实验室 protocol 效果图

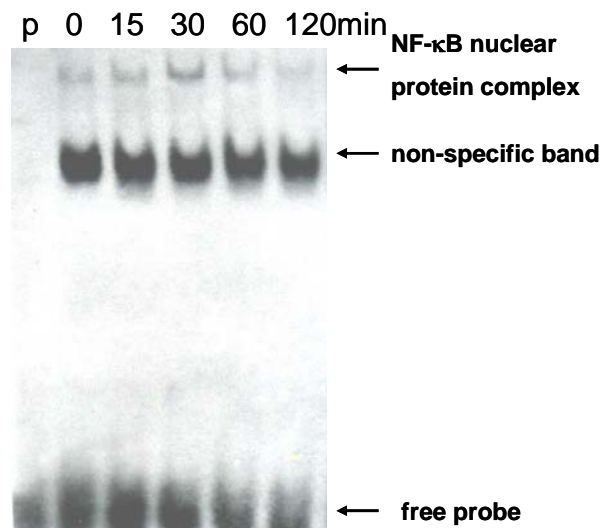


图 1. 用 10ng/ml 的 mLT-β刺激 MEF 细胞，分别刺激 0、15、30、60、120min，检测 NF-κB 的量。(p: probe only. 只加入标记探针未加入核蛋白抽提物)

By 洪丽欣