

## 化学发光法RNA EMSA试剂盒

产品编号	产品名称	包装
GS606	化学发光法RNA EMSA试剂盒	100次

### 产品简介:

- 碧云天的化学发光法RNA EMSA试剂盒(Chemiluminescent RNA EMSA Kit), 简称化学发光法REMSA试剂盒或Chemiluminescent REMSA Kit, 是一种高效、灵敏的通过化学发光法检测生物素(Biotin)标记的RNA EMSA探针及其与蛋白质相互作用的试剂盒。
- RNA结合蛋白(RNA binding proteins, RBPs)调控RNA的加工、成熟、运输、稳定性、翻译和降解, 以促进细胞的生存和生长[1,2]。研究RNA和蛋白的相互作用对正常的细胞功能和调节至关重要, 而这种相互作用的检测通常需要使用放射性标记的RNA探针进行放射性EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)或2D蛋白质凝胶电泳(2D protein gel electrophoresis)。EMSA是一种灵敏的技术, 是基于DNA/RNA-蛋白复合物在聚丙烯酰胺凝胶电泳中有不同迁移率的原理, 可用于鉴定蛋白质与核酸的相互作用。该技术提供了研究DNA或RNA结合蛋白和鉴定核酸底物的有效方法[3]。在RNA EMSA实验中, 末端标记的RNA探针与特定蛋白结合, 形成RNA-蛋白复合物。经聚丙烯酰胺凝胶电泳, RNA-蛋白复合物的迁移速度比游离的RNA探针慢, 可以观察明显的位移条带, 即可判断RNA和蛋白的相互作用。传统的放射性EMSA技术程序繁琐, 耗时较长, 需要2-3天才能获得结果。本试剂盒为基于生物素标记探针的非放射性EMSA试剂盒(Biotin-EMSA), 采用了高灵敏度的化学发光技术, 利用高质量的Streptavidin-HRP Conjugate和BeyoECL Moon (一种极超敏的以luminol为基础的ECL类化学发光试剂)对生物素标记的RNA探针进行检测, 轻松实现了RNA EMSA, 实验时间大大缩短, 约7-8个小时即可完成。
- 为验证整个化学发光法RNA EMSA实验条件和体系, 本试剂盒提供了阳性对照系统, 包含阳性蛋白、生物素标记RNA阳性探针、未标记RNA阳性探针。本试剂盒中的阳性探针与阳性蛋白能很好的结合, 产生明显的位移带(Shift band)。使用本试剂盒对于阳性蛋白、HeLa细胞的细胞核蛋白和细胞浆蛋白的RNA EMSA效果参考图1。

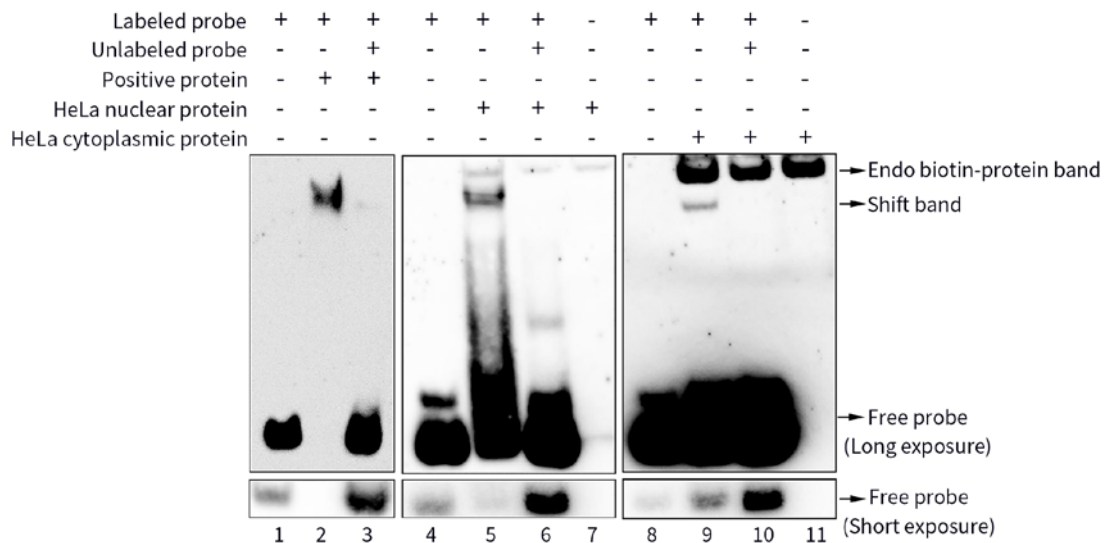


图1. 碧云天化学发光法RNA EMSA试剂盒(GS606)对阳性蛋白、HeLa细胞的细胞核蛋白和细胞浆蛋白的检测效果图。对于阳性蛋白及HeLa细胞的细胞核蛋白和细胞浆蛋白, 包含阴性对照反应(样品1、4、8)、蛋白样本-RNA探针的结合反应(样品2、5、9)和未标记探针冷竞争反应(样品3、6、10); 对于HeLa细胞的细胞核蛋白和细胞浆蛋白, 由于含有内源性Biotin标记的蛋白, 同时设置了蛋白本身的对照(样品7、11)。对于含有内源性Biotin标记蛋白引起的条带(Endo biotin-protein band), 可以使用碧云天的生物素检测封闭试剂盒(P0101)降低内源性背景, 但可能不会完全消除, 若实验中目的蛋白较纯或者样品量较大, 可缩短曝光时间以降低背景杂带。实际结果会因蛋白种类、纯度、电泳条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- 本试剂盒采用了非特异性结合比Avidin更低的Streptavidin, 使检测结果背景更低灵敏度更高。
- 本试剂盒可以用于100个蛋白和探针的结合反应和完整的10次阳性对照结合反应, 并足够检测至少10块有生物素标记RNA EMSA探针的膜。

## 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
GS606-1	REMSA Binding Buffer (10X)	120µl
GS606-2	REMSA/Gel-Shift上样缓冲液(无色, 10X)	200µl
GS606-3	REMSA/Gel-Shift上样缓冲液(蓝色, 10X)	200µl
GS606-4	BeyoECL Moon A液	55ml
GS606-5	BeyoECL Moon B液	55ml
GS606-6	Streptavidin-HRP Conjugate	100µl
GS606-7	封闭液	380ml
GS606-8	洗涤液(5X)	250ml
GS606-9	检测平衡液	250ml
GS606-10	生物素标记RNA阳性探针	30µl
GS606-11	未标记RNA阳性探针	10µl
GS606-12	阳性蛋白	20µl
—	说明书	1份

## 保存条件:

-20°C保存, 至少一年有效。BeyoECL Moon A液、BeyoECL Moon B液、封闭液、洗涤液(5X)和检测平衡液可以4°C保存, 至少一年有效。生物素标记RNA阳性探针和未标记RNA阳性探针最好能在-80°C保存。

## 注意事项:

- 操作过程要严格保证无RNase污染。请戴上口罩和手套操作, 尽量防止人体表面的RNase污染样品。操作时应避免对着样品或所使用的试剂盒或耗材呼气或说话, 以防RNase污染。对于操作环境中RNase的去除, 推荐使用碧云天生产的RNase and DNase Away (R0123)以去除实验桌、仪器设备表面或其它接触面上的RNase。
- 所用试剂和耗材都要求是RNase-free, 操作时应小心, 避免被污染。如果耗材可能有RNase污染, 可考虑用0.01%的DEPC水溶液浸泡过夜, 然后高温高压灭菌并烘干。
- 蛋白样品制备过程中样品的稀释等都需使用BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876)或DEPC水 (DNase、RNase free) (R0022)。
- 初次实验时可使用试剂盒提供的阳性蛋白、生物素标记RNA阳性探针及未标记RNA阳性探针进行系统测试, 确保实验体系正常。
- 需自备带正电荷尼龙膜, 以及凝胶电泳时所需的相关试剂。带正电荷尼龙膜(FFN10/FFN11/FFN13/FFN15)可以向碧云天订购。
- 如果需要使用更多的封闭液或洗涤液, 可另外单独订购封闭液(GS009B)或洗涤液(5X) (GS009W)。
- BeyoECL Moon A液和B液在吸取过程中必须要更换枪头, A液和B液相互污染后会导致A液或B液逐渐失效, 影响后续的使用效果。
- 各溶液使用后, 请盖紧瓶盖, 以防失效。特别是BeyoECL Moon B液, 含有氧化剂, 比较容易还被还原而失效。
- BeyoECL Moon A液和B液均对人体有害, 操作时请小心, 并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 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。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用说明:

### 1. 探针的制备:

本试剂盒只提供生物素标记RNA阳性探针和未标记RNA阳性探针, 不提供RNA探针生物素标记的相关试剂, 如有需要, 可以咨询碧云天RNA合成技术服务: [https://www.beyotime.com/support/RNA\\_synthesis.htm](https://www.beyotime.com/support/RNA_synthesis.htm)。

### 2. EMSA胶的配制:

用户可自备所需试剂, 按照本步骤配制EMSA胶, 也可直接购买BeyoGel™ EMSA PAGE预制胶(6%) (GS305/GS306)。

- 准备好倒胶的模具。可以使用常规的制备蛋白电泳胶的模具(E6011-6015/E6020-6025/E6030/E6032/E6035/E6038)。最好选择可以灌制较薄胶的模具, 以便于干胶等后续操作。为得到更好的结果, 可以选择可灌制较大EMSA胶的模具。制胶前必须把制胶模具冲洗干净, 需特别注意不能有SDS残留。
- 按照下表配制10ml 6%的聚丙烯酰胺凝胶。

Reagent	Volume	Cat. No. of Beyotime
TBE Buffer (5X)	1.0ml	ST718/ST723
Ultrapure water	6.6ml	ST876/R0021/R0022
29:1 Acrylamide/Bisacrylamide (30%, w/v)	2ml	ST003
80% Glycerol	312.5µl	ST1348/ST1353
10% Ammonium persulfate	75µl	ST005

TEMED	10 $\mu$ l	ST728
Total	10ml	-

**注:** 按照上述顺序依次加入各种试剂, 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。

### 3. EMSA结合反应:

- a. 按照下表设置EMSA结合反应。阴性对照组(Negative Control): 仅含标记探针; 探针冷竞争组(Cold Probe Competition Group): 含样品蛋白、标记探针、标记探针400倍量的未标记探针; 无探针样品组(Sample without Probe Group): 含样品蛋白, 用来排除样本蛋白是否存在自身的内源性Biotin。其中样品组(Sample Group)也可以是阳性对照相应的试剂。

Reagent	Negative Control	Sample Group	Cold Probe Competition Group	Sample without Probe Group
Ultrapure water	8 $\mu$ l	7 $\mu$ l	6 $\mu$ l	8 $\mu$ l
REMSA Binding Buffer (10X)	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Protein Extract	-	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Unlabeled RNA probe	-	-	1 $\mu$ l	-
Biotin-labeled RNA probe	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	-
Total	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

- b. 按照上表顺序依次加入各种试剂, 在加入生物素标记好的RNA探针(Biotin-labeled RNA probe)前先混匀。混匀之后先让未标记的RNA探针(Unlabeled RNA probe)冰上先反应10分钟, 以消除可能发生的探针和蛋白的非特异性结合。然后加入标记好的RNA探针, 混匀, 置于冰上反应10分钟。

**注1:** 混匀的时候不能大幅度振荡, 轻轻混匀即可, 全部操作都需在冰上进行。

**注2:** 试剂的加入顺序可能会影响RNA-蛋白复合体的特异性, 请始终按照上表中列出的顺序添加结合反应组分。

**注3:** 对于进行supershift测试的情况, 添加相应的目的蛋白的抗体, 相应减少超纯水的添加量即可。

- c. 选做: 不同蛋白样品的实验结果可能存在差异, 通过添加其它成分如2M KCl、50% Glycerol、1M MgCl<sub>2</sub>、500mM DTT (ST040/ST041/ST043)和tRNA/Yeast RNA (R0040)等, 可以实现对测试系统的优化。KCl、MgCl<sub>2</sub>和DTT浓度增加可以增强结合反应, 但过多的DTT会增加背景。添加Glycerol能够稳定蛋白质折叠, 但过多的Glycerol会导致沿泳道边缘出现垂直条纹。tRNA/Yeast RNA是非特异性竞争性RNA, 能够排除非特异性结合。测试每种试剂的效果需要分别建立反应, 所涉及到的试剂可以向碧云天单独购买。
- d. 加入1 $\mu$ l REMSA/Gel-Shift上样缓冲液(无色, 10X), 混匀后立即上样。

**注:** 有时候溴酚蓝会影响蛋白和RNA的结合, 建议尽量使用REMSA/Gel-Shift上样缓冲液(无色, 10X)。如果对于使用REMSA/Gel-Shift上样缓冲液(无色, 10X)在上样时感觉到无法上样, 可以在REMSA/Gel-Shift上样缓冲液(无色, 10X)里面添加极少量的REMSA/Gel-Shift上样缓冲液(蓝色, 10X), 至可以观察到蓝颜色即可。

### 4. 电泳:

- a. 用0.5X TBE (ST718/ ST723)作为电泳液。按照10V/厘米的电压预电泳10分钟。**注:** 预电泳的时候如果有空余的上样孔, 可以加入少量稀释好的1X的REMSA/Gel-Shift上样缓冲液(蓝色), 以观察电压是否正常进行。
- b. 把混合了上样缓冲液的样品加入到上样孔内。在多余的某个上样孔内加入10 $\mu$ l稀释好的1X的REMSA/Gel-Shift上样缓冲液(蓝色), 用于观察电泳进行的情况。
- c. 按照10V/厘米的电压电泳, 电泳至REMSA/Gel-Shift上样缓冲液(蓝色)的蓝色染料溴酚蓝至胶的下缘1/4处, 停止电泳。**注:** 如果温度升高, 则会影响条带清晰度, 为确保胶的温度不超过30 $^{\circ}$ C, 电泳的过程需在冰浴中进行。

### 5. 转膜:

- a. 取一片和EMSA胶大小相近或略大的尼龙膜, 剪角做好标记, 用0.5X TBE浸泡至少10分钟。尼龙膜自始至终仅能使用镊子夹取, 并且仅可夹取不可能接触样品的边角处。
- b. 取两片和尼龙膜大小相近或略大的滤纸, 用0.5X TBE浸湿。
- c. 把浸泡过的尼龙膜放置在一片浸湿的滤纸上, 注意避免尼龙膜和滤纸间产生气泡。
- d. 非常小心地取出EMSA胶放置到尼龙膜上, 注意确保胶和膜之间没有气泡。
- e. 再把另外一片浸湿的滤纸放置到EMSA胶上, 注意确保滤纸和胶之间没有气泡。
- f. 采用Western时所使用的湿法电转膜装置或其它类似的电转膜装置, 以0.5X TBE为转膜液, 把EMSA胶上的探针、蛋白以及探针和蛋白的复合物等转移到尼龙膜上。对于大小约为10 $\times$ 8 $\times$ 0.1cm的EMSA胶, 用常用的Western转膜装置(E6150/E6155/E6159), 电转时可以设置为360mA (约100V)转膜30-60分钟。如果胶较厚, 则需适当延长转膜时间。转膜时需保持转膜液的温度较低, 通常可以把电转槽置于4 $^{\circ}$ C冷库或置于冰浴或冰水浴中进行电转, 这样可以确保低温。具体的电转膜方法请参考电转膜装置的使用说明。
- g. 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。

### 6. 交联:

- a. 用紫外交联仪(UV-light cross-linker)选择254nm紫外波长, 120mJ/cm<sup>2</sup>, 交联45-60秒。如果没有紫外交联仪可以使用普通的手提式紫外灯(例如碧云天的手提紫外检测仪(EUV002)), 距离膜5-10厘米左右照射3-10分钟。也可以使用超净工作台

内的紫外灯，距离膜5-10厘米左右照射3-15分钟。最佳的交联时间可以使用标准品自行摸索。

- b. 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室温干燥处存放3-5天，然后再进入下一步检测。
- c. 如果检测结果发现交联效果不佳，甚至连Free probe的条带都非常微弱，可以考虑在膜干燥后参考步骤6a的条件再交联一次，以进一步改善交联效果。

#### 7. 化学发光法检测生物素标记的探针：

- a. 37-50°C水浴溶解封闭液和洗涤液。

**注：**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，在冬天须特别注意。

- b. 取一合适的容器加入15ml封闭液，再放入交联过的含有样品的尼龙膜。在侧摆摇床或水平摇床上缓慢摇动15分钟。
- c. 取6 $\mu$ l Streptavidin-HRP Conjugate加入到6ml封闭液中(1:1000稀释)，混匀备用。
- d. 去除用于尼龙膜封闭的封闭液，加入上一步中配制的6ml含有Streptavidin-HRP Conjugate的封闭液。在侧摆摇床或水平摇床上缓慢摇动20分钟。
- e. 取25ml洗涤液(5X)，加入100ml ddH<sub>2</sub>O或Milli-Q级纯水，混匀配制成125ml洗涤液。
- f. 将尼龙膜转移至另一装有15-20ml洗涤液的容器内，漂洗1分钟。
- g. 去除洗涤液，加入15-20ml洗涤液，在侧摆摇床或水平摇床上缓慢洗涤5分钟。
- h. 重复步骤7g三次(共洗涤四次)，每次洗涤时间都约为5分钟。
- i. 将尼龙膜转移至另一装有20-25ml检测平衡液的容器内，在侧摆摇床或水平摇床上缓慢摇动5分钟。
- j. 取5ml BeyoECL Moon A液和5ml BeyoECL Moon B液混匀，配制成10ml BeyoECL Moon工作液。

**注1：**BeyoECL Moon工作液必须现配现用。

**注2：**从本步骤起操作方法和注意事项同Western实验的荧光检测。

- k. 取出尼龙膜，用吸水纸吸去过多液体。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。
- l. 在尼龙膜的表面小心加上步骤7j配制好的10ml BeyoECL Moon工作液，使工作液完全覆盖尼龙膜。室温放置2-3分钟。取出尼龙膜，用吸水纸吸去过多液体。将膜放在两片保鲜膜中间，随后进行压片检测或化学发光成像仪检测。
- m. 压片检测：将膜固定于片夹内。暗室内压片1分钟，立即显影定影，根据结果再调整压片时间。或直接分别压片0.5、1、3、5分钟，然后一起显影定影观察结果。
- n. 化学发光成像仪检测：将膜放置到化学发光成像仪内，参考仪器说明书进行检测，如使用BeyoImager™ 600化学发光成像系统(EI600)，自动或手动曝光。使用本试剂盒对于阳性蛋白、HeLa细胞的细胞核蛋白和细胞浆蛋白的RNA EMSA效果参考图1。

#### 参考文献：

1. Gerstberger S, Hafner M, Tuschl T. Nat Rev Genet. 2014. 15(12):829-45.
2. Marondedze C, Thomas L, Serrano NL, Lilley KS, Gehring C. Sci Rep. 2016. 6:29766.
3. Hogan DJ, Riordan DP, Gerber AP, Herschlag D, Brown PO. PLoS Biol. 2008. 6(10):e255.

#### 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
GS002	EMSA/Gel-Shift试剂盒	100次
GS008	EMSA探针生物素标记试剂盒	20次
GS009	化学发光法EMSA试剂盒	100次
GS305S	BeyoGel™ EMSA PAGE预制胶(6%, 10孔)	10块
GS306S	BeyoGel™ EMSA PAGE预制胶(6%, 15孔)	10块
GS606	化学发光法RNA EMSA试剂盒	100次
D3308	化学发光法生物素标记核酸检测试剂盒	1000cm <sup>2</sup>

Version 2023.04.28