

EMSA

LightShift Chemiluminescent EMSA kit *Pierce 20148* www.piercenet.com

Biotin 3' End DNA labeling kit *Pierce 89818*

Membrán: pozitív töltésű Biobond-plusz nylon membrán *N5031 Sigma* (a nitocellulóz nem jó!!!)

Igepal CA-630 (Nonidet P40): *I3021 Sigma*

Szükséges oldatok:

5x TBE

- 450 mM Tris-HCl
- 450 mM Borát
- 10 mM EDTA pH: 8,3

5% polyacrilamide gel:

- 7,230 ml dH₂O
- 1 ml 5x TBE
- 1,660 ml 30% acrilamide
- 10 µl TEMED
- 100 µl AMPER (ahogy Western blotnál: 0.01g/100µl)

A gél lassan szilárdul, nagyon könnyen törik!

Először meg kell önteni a gélt, majd a kit komponenseit jégen felolvasztani, 0,5 x TBE puffert készíteni (1,5 L), a gélt 100 V-on előfuttatni 45' ig, közben: összemérni a binding-okat, és inkubálni

binding reaction (*Pierce EMSA kit*)

Nagyon sokféle protokoll létezik EMSA-ra. Ezt a közeget A549 sejtekre alkalmaztam, NFκB és AP1 transzkripciós faktorok vizsgálatához, ettől el lehet térni, az irodalmat át kell nézni!!!

Az alábbi anyagok egy reakcióra valók, de lehet csinálni egy MIXet és azt szétosztani

- 2 µl 10x Binding buffer
- 1 µl glicerol
- 1 µl MgCl₂
- 1 µl poly(dIdC)
- 1 µl EDTA (hígítani kell: 18µl dH₂O + 2 µl EDTA) / reaction (MIX)

- eppendorf csövekbe mérjük a következőket:

- ... μl steril dH_2O
 - 6 μl MIX
 - 2 μl jelölt oligo
 - 10 μg nuclear extract
-

$V_{\text{össz}} = 20 \mu\text{l}$, 26 °C (vízfürdő) 25'

Leállítás: 5 μl 5x loading buffer (mérjük a csövek felára, majd fugáljuk le: 30'', max speed)

- 20 μl mintát kell felvinni az előfuttatott géltre
 - 100 V ELFO (80-90 min), addig, míg a kisebbik indikátorfesték a gél alsó 1/3 ¼ ébe jut
 - *közben: 1l 0,5x TBE puffert készíteni és behűteni, szivacsokat beáztatni*
 - semi dry készülékben BLOT: **45'** jégen, 80 mA (Maniatisban utána lehet nézni a semy dry blot technika részleteire)
 - *közben: 45 °C ra melegíteni a blokkoló és mosó puffereket, majd a mosóból 1x-est csinálni*
 - szétszedés után megvárni, míg a puffer beszívódik a membrán-ba (fél perc), levágni a szélét
 - UV crosslinker (1200mJ) ez egy ciklust jelent
 - 50 ml-es Falcon csőbe tesszük a membránt, majd a hibridizáló kamrában forgatjuk
 - 5 ml BLOCKING SOL. 15', 6 rpm
 - 5 ml ST-HRP a BLOCKING-ban hígítva (1:300) 15', 6 rpm
 - 4x15 ml 1x WASH 4x5' 10 rpm
 - 10 ml EQUILIBR. 10' 10 rpm
 - 4 ml ECL 5' 5 rpm
- előhívás: 10', kazettába tenni