

## E2Select Ubiquitin Conjugation Kit

### 说明书 (UBK-982)

#### 1. 试剂盒组成: (10T)

名称	体积
10 × Reaction Buffer	200 μL
10 × E1 Enzyme (His-tag)	200 μL
5 × Ubiquitin (冻干粉中加 400μL 水)	400 μL
10 × Mg <sup>2+</sup> -ATP	200 μL
10 × E3 Ligase Itch (Positive control)	20 μL
20 × S5a substrate (Positive control)	20 μL
<b>10 × E2 Enzyme Set</b>	
20 × UBE2R1/UbcH3/Cdc34 (2R1)	15 μL
20 × UBE2N/UBE2V2 Complex (2N/2V2)	15 μL
20 × UBE2D1/UbcH5a (D1)	15 μL
20 × UBE2D2/UbcH5b (D2)	15 μL
20 × UBE2D3/UbcH5c (D3)	15 μL
20 × UBE2L3/UbcH7 (2L3)	15 μL
20 × UBE2K/E2-25K (2K)	15 μL
20 × UBE2C/UbcH10 (2C)	15 μL
20 × UBE2E1/UbcH6 (E1)	15 μL
20 × UBE2H/UbcH2 (2H)	15 μL
20 × UBE2L6/UbcH8 (2L6)	15 μL

\* -80°C保存, 避免反复冻融

#### 2. 反应体系配制 (20 μL)

名称	体积
10 × Reaction Buffer	2 μL
10 × E1 Enzyme	2 μL
5 × Ubiquitin	4 μL
10 × Mg <sup>2+</sup> -ATP	2 μL
20 × E2 Enzyme	1 μL
E3 Ubiquitin Ligase*	0.2-2 μM
Substrate (可选)*	1-5 μM
H <sub>2</sub> O	Up to 20 μL

\*使用者自己准备, E3 Ubiquitin Ligase 可重组表达或从细胞裂解液中纯化, Substrate (可选) not required for analyzing E3 Auto-Ubiquitination.

### 3. Positive control 反应体系配制 (20 $\mu\text{L}$ )

10 $\times$ Reaction Buffer	2 $\mu\text{L}$
10 $\times$ E1 Enzyme	2 $\mu\text{L}$
5 $\times$ Ubiquitin	4 $\mu\text{L}$
10 $\times$ $\text{Mg}^{2+}$ -ATP	2 $\mu\text{L}$
20 $\times$ E2 Enzyme	1 $\mu\text{L}$
10 $\times$ E3 Ligase Itch (Positive control)	2 $\mu\text{L}$
20 $\times$ S5a substrate (Positive control)	1 $\mu\text{L}$
$\text{H}_2\text{O}$	6 $\mu\text{L}$

### 4. 反应条件

37 $^{\circ}\text{C}$  抚育 (30min-2h, 如果效果不明显可增加反应时间 12h), 建议使用 PCR 仪或金属浴

### 5. 结果检测

(1) 取样品 20  $\mu\text{L}$  加入 5  $\mu\text{L}$  的 5X SDS-PAGE Buffer (加入 1  $\mu\text{L}$  新鲜配制的 1M DTT), 加热样品 95 $^{\circ}\text{C}$  5 min, 随后使用还原性 (含 DTT) 上样缓冲液进行 SDS-PAGE 电泳分析;

(2) 选择 E3 Ubiquitin Ligase、泛素、Substrate 抗体进行 Western-blot 分析。