



Genecreate DNA pull-down Kit

Sufficient reagents for 6 assays per kit.
Store at -20&4°C

1. 实验原理

DNA pull down 技术是体外研究DNA与蛋白质互作的有力工具。该技术针对目标区域设计特异性DNA探针并经过脱硫生物素标记,脱硫生物素探针可以和偶联在磁珠上的链霉亲和素亲和结合(Wang, Yu et al. 2004)。然后,细胞提取物与磁珠-DNA探针孵育,作用蛋白质分子可以和DNA探针特异性结合;经过洗涤可以将非特异性结合蛋白质去除;最后,经洗脱液洗脱,得到目的DNA探针-蛋白质复合物,再经过Western Blot或质谱(MS)鉴定蛋白质类型。其原理图如1.1:

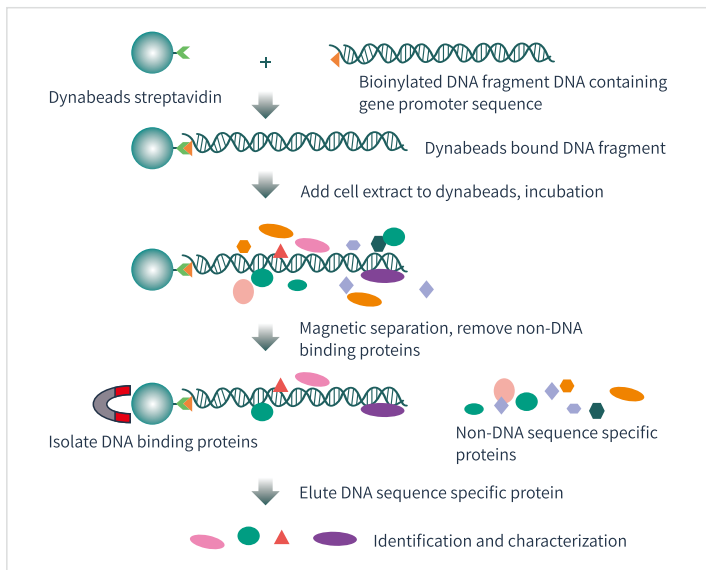
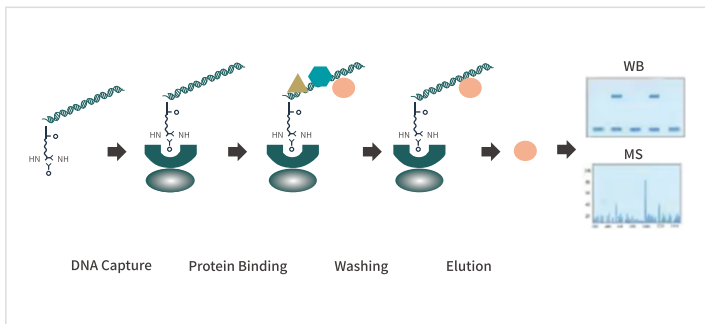


图1.1 DNA pull down 原理图

2.实验路线



3.试剂盒组分

组分	容量 (6T)	保存条件
Lysis buffer	7.5mL	4°C
PMSF	75μL	-20°C
Protease inhibitor (100 X)	75μL	-20°C
Nucleic dilution buffer	24mL	4°C
Protein dilution buffer	36mL	4°C
Nucleic-Acid Compatible Streptavidin Magnetic Beads	200μL	4°C
Elution buffer	700μL	4°C避光

4. 操作步骤

4.1 蛋白提取

4.1.1 细胞样本

- 1) 洗涤: 预冷的 1mL PBS 洗涤样品 (约 2×10^7 个细胞) 2 次, 最后一次尽量吸干 PBS;
- 2) 裂解: 根据细胞量加入 1mL Lysis buffer、10 μ L Protease inhibitor (100 X), 10 μ L PMSF, 冰上充分裂解 20~30min, 每 5min 涡旋一次, 10s/次;
- 3) 离心: 4°C, 12000rpm, 10min, 收集上清。

4.1.2 组织样本

- 1) 研磨: 取新鲜组织或低温组织 (约 0.3g), 置于研钵中, 用液氮进行研磨, 转移组织粉末至新的 EP 管中;
- 2) 裂解: 加入 1 mL Lysis buffer、10 μ L Protease inhibitor (100 X), 10 μ L PMSF, 充分裂解 20~30 min, 每 5min 涡旋一次, 10s/次;
- 3) 离心: 4°C, 12000 rpm, 10min, 收集上清。

4.2 磁珠准备及洗涤

- 1) 将 Nucleic-Acid Compatible Streptavidin Magnetic Beads 从 4°C 冰箱取出, 上下颠倒多次混匀磁珠储存液, 分别取 30 μ L 到 2 个 1.5mL Ep 管中, 记为对照组和实验组, 置于磁力架上静置 1min 以分离磁珠, 弃上清;
- 2) 加入 500 μ L Nucleic dilution buffer, 重悬磁珠, 置于磁力架上 1min, 弃上清;
- 3) 重复步骤 2) 2 次。

4.3 磁珠结合 DNA

- 1) 实验管加入适量生物素标记的 DNA 探针, 对照管加等量不带生物素标记的 DNA 或者不加, 用 Nucleic dilution buffer 补充体积至 500 μ L, 静音混合仪上室温孵育 2h;

- 2) 对照管和实验管从静音混合仪中取出, 置于磁力架上静置1min, 弃上清,
- 3) 加入500 μ L Nucleic dilution buffer, 重悬磁珠, 置于磁力架上1min, 弃上清;
- 4) 重复2次步骤3)。

4.4 DNA结合蛋白

- 1) 对照管和实验管加入300ug-2000ug提取的蛋白, 用Protein dilution buffer补充体积至500 μ L, 静音混合仪上4 $^{\circ}$ C孵育过夜(约16h) 此处需留100 μ L裂解液作为银染的Input组;
- 2) 对照管和实验管从静音混合仪中取出, 置于磁力架上静置1min, 弃上清;
- 3) 加入1mL Protein dilution buffer, 重悬磁珠, 置于磁力架上静置1min, 弃上清;
- 4) 重复4次步骤3)。

4.5 洗脱复合物

- 1) 2管均加入100 μ L Elution buffer, 沸水浴8-10min, 12000rpm离心5min, 取上清, 上清即为pull down产物。加入20 μ L 6xLoading buffer, 沸水浴8-10min, 记为对照组和实验组;
- 2) 取100 μ L 4.1步骤中所提取蛋白, 记为Input; 加入20 μ L 6xLoading buffer, 沸水浴8-10min。
- 3) 对照组、实验组和Input均 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。后续做银染、质谱鉴定或WB检测。

5. 常见问题

Q: 通过pull-down后银染验证发现, 没有想要的目的条带?

- 1) 有可能是样品被蛋白酶降解, 对应的策略是需要添加蛋白酶抑制剂, 所有操作保持4 $^{\circ}$ C以下冰上操作并防止冻融;
- 2) 有可能是加入生物素标记DNA量不足, 可以增加生物素标记DNA量;
- 3) 裂解液盐碱度太高, 需用低盐碱度的裂解液;
- 4) 加入细胞裂解液不够, 可以增加细胞裂解量。



武汉金开瑞生物工程有限公司

WUHAN GENECREATE BIOLOGICAL ENGINEERING CO., LTD.

地址：武汉市东湖新技术开发区高新大道666号生物城创新园B4栋二楼

电话：027-87960366

邮箱：marketing@genecreate.com

网址：www.genecreate.cn

