

# DNA pulldown 结果解读

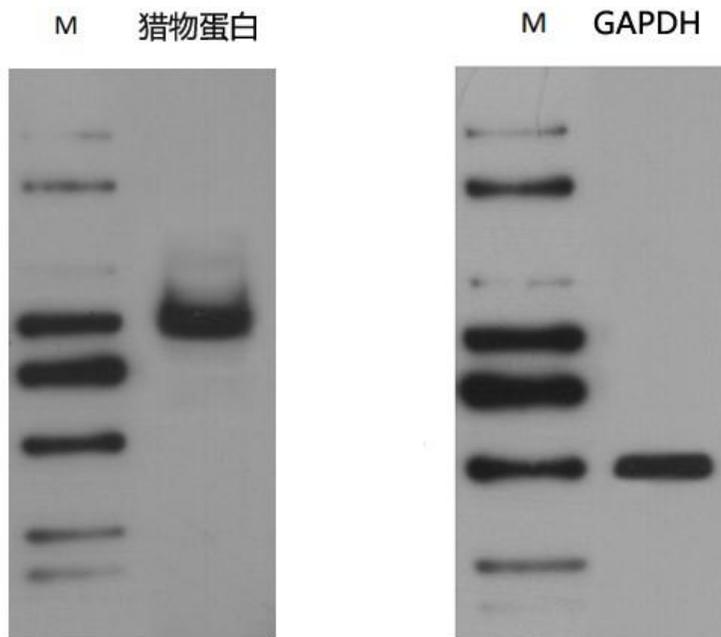
| 专注 | 品质 | 诚信 |

提供核酸和蛋白的整体研究方案

>>>

# 实验前的准备

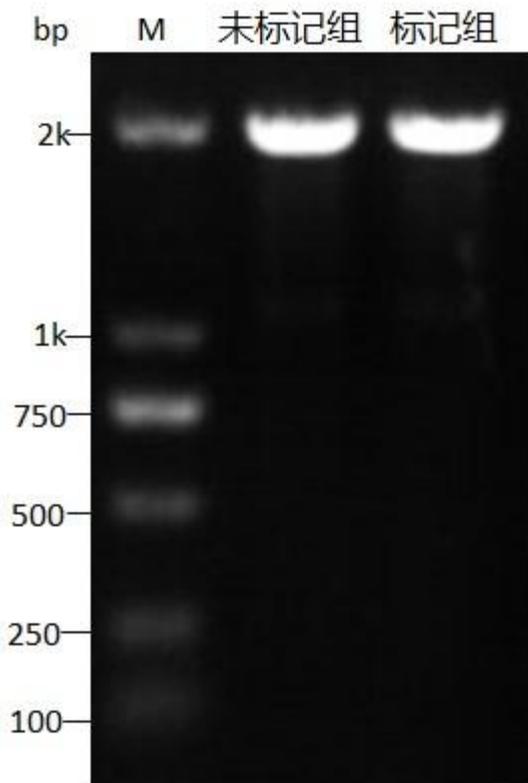
## DNA pulldown前WB



1、在正式实验前，建议先通过WB检测预期的猎物蛋白的本底表达量，如果表达水平太低，pull down后可能检测不到而误判成假阴性结果，建议样本中过表达后再尝试，同时也可以借此判断样本中蛋白是否已发生降解。

2、如果没有WB条件或需求，亦可以通过考染判断蛋白提取质量。

## 探针扩增

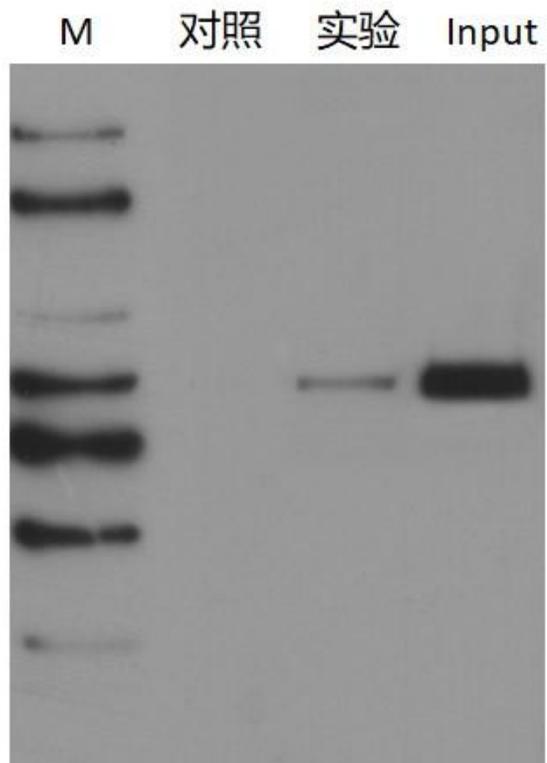


1、扩增好的DNA探针通过凝胶电泳，判断扩增是否完全；

2、注意：未标记的DNA探针作为对照组，生物素标记的DNA作为实验组。

## Pull down后WB

### DNA pulldown 后WB



1、pull down后通过WB检测猎物蛋白，若实验组能检测到猎物蛋白目的条带，而对照组没有，说明该蛋白能与诱饵DNA特异性结合；若都没有检测到，说明该蛋白不能与诱饵DNA结合。

# 银染和质谱鉴定



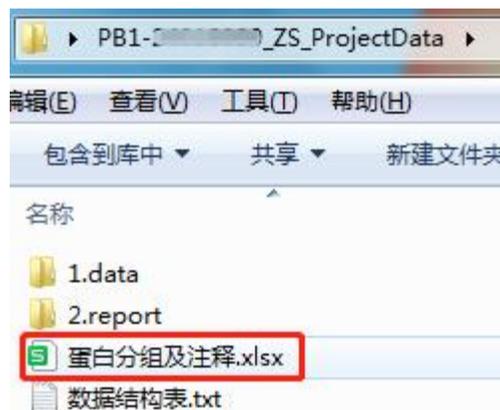
1、银染通常作为质谱送样上机前的质控，检测pull down后蛋白液的质量，或在知道预期蛋白大小的前提下切胶送质谱，减少杂蛋白的干扰；

2、在质谱结果中挑选候选蛋白时，建议选择IP组中iBAQ较高，且与研究方向相关的蛋白，如鉴定到的蛋白太多需要缩小选择范围，可以考虑优先选择实验组特有蛋白；

3、质谱在上机前会将蛋白酶解成肽段，而高丰度的肽段很可能会掩盖掉低丰度肽段的信号峰，因此质谱无法保证一定能鉴定到某一个或某一类蛋白；

4、由于磁珠也可以富集到一些可以与之结合的蛋白，而且蛋白丰度都比较低，肽段信号被掩盖的情况有时候反而没有实验组那么多，因此可能最终鉴定出来对照组的特异性蛋白比IP组还要多，这也是很正常的情况。

# 质谱鉴定



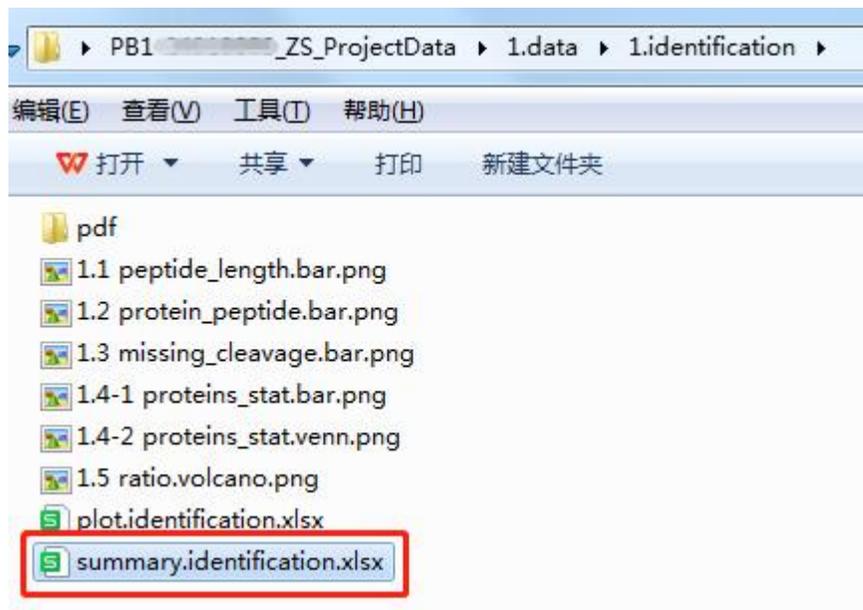
	A	B	C	D	E	F	
	Accession	Protein ID	Gene	Fasta description	Mw (kDa)	Length	Protein
3	P07814	SYEP_HUMAN	EPRS1	Bifunctional glutamate	170.591	1512	
4	P41252	SYIC_HUMAN	IARS1	Isoleucine--tRNA ligase	144.498	1262	
5	O95793	STAU1_HUMAN	STAU1	Double-stranded RNA-binding	63.182	577	Q9NUL3
6	P04843	RPN1_HUMAN	RPN1	Dolichyl-diphosphoolig	68.569	607	
7	Q12906	ILF3_HUMAN	ILF3	Interleukin enhancer-binding	95.338	894	Q96SI9
8	Q86VP6	CAND1_HUMAN	CAND1	Cullin-associated NEDD8	136.376	1230	
9	Q99623	PHB2_HUMAN	PHB2	Prohibitin-2 OS=Homo	33.296	299	
10	O75367	H2AY_HUMAN	MACROH2A1	Core histone macroH2A1	39.184	369	Q9POM6
11	P08238	HS90B_HUMAN	HSP90AA1	Heat shock protein 90 class	83.264	724	P07900
12	P11388	TOP2A_HUMAN	TOP2A	DNA topoisomerase 2- $\alpha$	174.385	1531	Q02880
13	P54652	HSP72_HUMAN	HSPA2	Heat shock-related 70 kDa	70.021	639	P11142
14	P55060	XPO2_HUMAN	CSE1L	Exportin-2 OS=Homo sapiens	110.417	971	

Unique.DZ   Unique.SY   common

1、如图所示，我司质谱鉴定会将“对照组特有蛋白”、“实验组特有蛋白”、“共有蛋白”从data中挑出并单独制成表“蛋白分组及注释.xlsx”，包含蛋白功能注释、iBAQ等重点信息；

2、例图中“Unique.DZ”即对照组特有蛋白列表，“Unique.SY”即实验组特有蛋白列表，“common”即共有蛋白列表，实际sheet名称可能会根据项目不同有所变动。

# 质谱鉴定



表头信息如“Accession”等具体含义，总表中均有解释，文件路径如图所示，也可以百度一下，由于版面限制就不赘述了。

表单	条目	描述
help		各表单的表头解释
stat		本次项目的统计信息
	Sample	样品名
	Identified pr	鉴定到的蛋白数目
	Quantified p	定量到的蛋白数目
	Identified pe	鉴定到的肽段数目
	Quantified p	定量到的肽段数目
	Unique pept	“唯一匹配”的肽段数目
	Comparison	比较组编号
	Comparison	比较组名称
	Gx:Gy	分子组、分母组编号
	SampleX	分子组包含的样品
	SampleY	分母组包含的样品
	FC threshol	判定下调差异蛋白的比值边界
	FC threshol	判定上调差异蛋白的比值边界
	Log2 FC thr	下调边界对数转换后的值
	Log2 FC thr	上调边界对数转换后的值
	P value thre	比较组采用的T检验方式
	T test	比较组采用的T检验方式
	Down count	下调差异蛋白数目
	Up count	上调差异蛋白数目
	Total diff	所有差异蛋白数目
	No diff	非差异的蛋白数目
	NA	无法进行差异计算的蛋白数目
	Total	定量到的蛋白数目，等同于“Quantified proteins”
protein		蛋白结果
	Accession	蛋白条目的Uniprot数据库登记号
	Protein ID	蛋白条目的Uniprot数据库编号
	Gene	蛋白条目的基因名
	Fasta descr	蛋白序列数据库Fasta文件中对蛋白条目的描述信息

< > >| help stat protein peptide +



# 感谢聆听

提供核酸和蛋白的整体研究方案

