



DNA pull-down Kit

Catalog#JKR23006A

Instruction Manual (For Two Groups)

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

目录

1. 实验原理	02
2. 实验路线	03
3. 试剂盒组分	04
4. 操作步骤	04
5. 常见问题	06



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, 标记后探针可以和偶联在磁珠上的链霉亲和素和素亲和结合, 再与总蛋白提取物进行孵育, 有互作的蛋白质可以和DNA探针特异性结合, 形成磁珠-DNA探针-蛋白复合物, 洗涤去除非特异性结合的蛋白质, 再经过洗脱得到目的DNA探针-蛋白质复合物, 最后通过Western Blot或质谱 (MS) 鉴定蛋白质类型。其原理图如1.1:

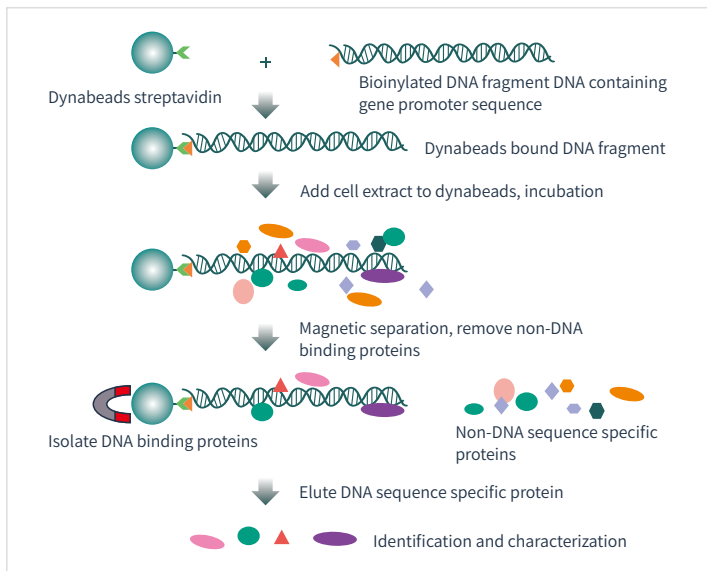
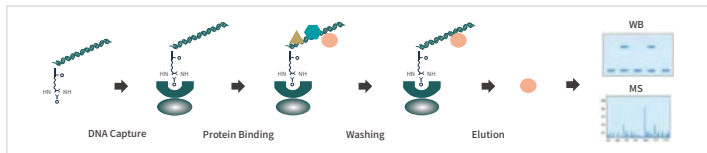


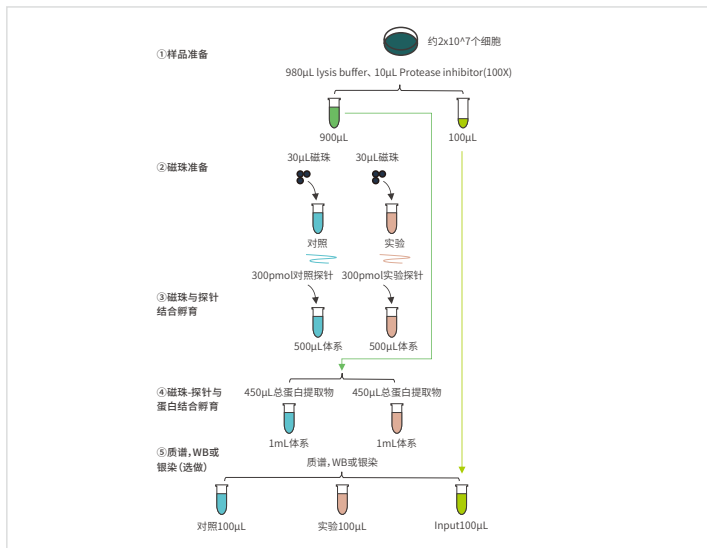
图1.1 DNA pull down 原理图

2.实验路线

2.1 实验流程图



2.2 对照设置流程图



3. 试剂盒组分

组分	容量 (6T)	保存条件
Lysis buffer	9mL	4°C
Protease inhibitor (100 X)	35μL	-20°C
Nucleic dilution buffer	30mL	4°C
Protein dilution buffer	45mL	4°C
Nucleic-Acid Compatible Streptavidin Magnetic Beads	200μL	4°C
Elution buffer	800μL	4°C避光

特别提示: 6T为6次单组 (1次实验组或1次对照组) 免疫沉淀实验, 后面的操作步骤中包含了实验组和对照组各1组, 需消耗2T试剂。

4. 操作步骤

4.1 总蛋白提取

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980μL Lysis buffer、10μL Protease inhibitor (100X), 冰上充分裂解30min, 每5min涡旋一次, 10s/次;
- ③ 用超声波细胞破碎仪超声5min, 功率20%, 超声3s, 间歇3s, 冰浴超声;
- ④ 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), 置于灭菌后预冷的研钵中, 用液氮研磨至粉状;

- ② 取 980 μ L Lysis buffer、10 μ L Protease inhibitor(100X)混匀作为裂解液,吸取 800 μ L裂解液加入研钵,在冰上继续研磨5-10min至样品成细腻的匀浆状,转移至新的EP管中,再向研钵中加入剩余的190 μ L裂解液收集残留的样品,同样转移至该EP管;
- ③ 装有样品匀浆的EP管在冰上充分裂解30min,每5min涡旋1次,10s/次;
- ④ 用超声波细胞破碎仪超声 8-10min,功率20%,超声3s,间歇3s,冰浴超声;
- ⑤ 离心:4 $^{\circ}$ C, 12000rpm, 10min,收集上清,再向上清中加入Lysis buffer补充体积至 1mL,混匀。

备注:蛋白提取整个过程都在冰上操作,减少高温造成的蛋白降解;超声过程中最好不要有气泡产生,减少蛋白降解。裂解后的总蛋白放在-20 $^{\circ}$ C保存。

4.2 磁珠准备及洗涤

- ① 将Nucleic-Acid Compatible Streptavidin Magnetic Beads从4 $^{\circ}$ 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 对照组和实验组各加入500 μ L Nucleic dilution buffer,重悬磁珠,置于磁力架上 1min,弃上清,该步骤重复3次。

4.3 磁珠结合DNA

- ① 实验管加入300pmol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 对照管和实验管各加入500 μ L Nucleic dilution buffer,重悬磁珠,置于磁力架上 1min,弃上清,该步骤重复3次。

4.4 DNA-磁珠结合蛋白

- ① 对照管和实验管各加入450 μ L提取的蛋白,用Protein dilution buffer补充体积至1mL,静音混合仪上4 $^{\circ}$ C孵育过夜(约16h),此处预留100 μ L裂解液作为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,该步骤重复5次。

4.5 洗脱复合物

- ① 对照管和实验管均加入100 μ L Elution buffer,混匀后沸水浴8-10min,置于磁力架上静置2min,取上清到新的EP管中,即为pull down产物,标记为对照组和实验组,2管各加入20 μ L 6X Loading buffer,沸水浴8-10min;
- ② 预留Input组的100 μ L裂解液,也加入20 μ L 6X Loading 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 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反复冻融。
- ② 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,可以增加细胞裂解液的量。

银染受实验本身的灵敏度制约,即便富集到了目标蛋白,也不一定在银染中显示出,银染主要还是起到质控作用,以评估整个实验操作过程是否异常,比如富集后总蛋白量的情况,不能决定最终质谱鉴定的结果,一般建议以质谱结果为准。



武汉金开瑞生物工程有限公司

WUHAN GENE CREATE 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

