

DNA Pull-Down 试剂盒（动物）

DNA Pull-Down Kit

产品信息

货号	产品名称	规格
FI8901-12T	DNA Pull-Down Kit	12 次
FI8901-24T	DNA Pull-Down Kit	24 次
FI8901-40T	DNA Pull-Down Kit	40 次

产品描述

DNA pull-down 是检测目标 DNA 序列与蛋白质之间相互作用的主要方法之一。辉骏生物生产的 DNA Pull-Down Kit 利用链霉亲和素磁珠与生物素的强亲和力，高效调取生物素标记的目标 DNA 序列及其结合蛋白。

首先制备生物素标记的 DNA 探针，再与动物样本裂解液孵育，DNA 探针与样本中的蛋白质结合形成复合物；链霉亲和素磁珠特异性捕获生物素 DNA 探针，同时捕获该 DNA 探针的结合蛋白；之后可以采用 Western Blot 技术检测特定蛋白，也可以采用质谱（LC-MS/MS）技术鉴定未知蛋白。

试剂盒组分

编号	名称	12T 规格	24T 规格	40T 规格	储存条件
①	链霉亲和素磁珠	500 μ L	1 mL	1.7 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
②	裂解缓冲液	7 mL	14 mL	22 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
③	NT2 缓冲液	16 mL	32 mL	52 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
④	漂洗液	32 mL	64 mL	110 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
⑤	洗脱缓冲液	650 μ L	1.3 mL	2.2 mL	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑥	蛋白酶抑制剂	230 μ L	460 μ L	760 μ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑦	10 mL 离心管	1 个	1 个	1 个	——

***注意：**该试剂盒包含足够完成 12、24 或 40 个反应的试剂，每个反应使用 40 μ L 磁珠。由于每次 pull-down 实验至少需要设置一个实验组和一个阴性对照组，因此一次实验至少需要使用 2 个反应的试剂量。

额外所需材料

1. 自备材料：DNA 凝胶回收试剂盒、核蛋白提取试剂盒（可选）、PBS。
2. 所需仪器：磁力架（辉骏产品货号 FI7101）、混匀仪、低温离心机、超声波破碎仪。

使用说明

I 注意事项

1. 请勿干燥或剧烈涡旋磁珠，禁止长时间置于磁场，这些操作可能会引起磁珠聚团，降低结合活性。
2. 为保证磁珠均匀分布，请在使用前通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀磁珠。
3. 具体样品量和孵育时间依赖于每个特定体系，可能需要优化才能得到最大产量。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

II 实验前准备工作

DNA 探针制备：根据目标 DNA 序列设计并合成生物素标记的引物和未标记的引物，PCR 扩增分别得到生物素标记的 DNA 探针（实验组）和未标记的探针（对照组）；按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明书进行探针的回收纯化。

III 操作方法

1. 蛋白提取（以下方案二选一操作）

1.1 总蛋白提取

(1) 将两组样本（实验组+对照组）按照如下方法收集和处理：

样本类型	样本量	收集方法
动物细胞	2*10 ⁷ ~4*10 ⁷ 个	冷 PBS 漂洗 2~3 次，每次 4 °C 500 g 离心 5 min 收集沉淀，尽量吸干液体
动物组织	0.2~0.4 g	冷 PBS 漂洗 2~3 次，彻底去除血液等成分，用液氮在研钵中充分研磨，再转移粉末至预冷的新离心管中

- (2) 样本置于冰上，加入 0.6~1 mL 预冷的②裂解缓冲液、6~10 μL ⑥蛋白酶抑制剂（按 1%添加），吹打混匀；
- (3) 为了更充分裂解，最好冰上超声至溶液基本澄清；若无超声条件，可置于冰上裂解 30 min，期间每 10 min 涡旋混匀一次，每次 5 s；
- (4) 4°C 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中；取 30 μL 作为 input，剩余上清平分为两份用于 DNA pull-down 实验，记为实验组和对照组，置于冰上备用或-80°C 保存。

1.2 核蛋白提取

如果提取核蛋白，需要自备核蛋白提取试剂盒，并按照说明书操作。提取好的核蛋白取 30 μL 作为 input，剩余平分为两份用于 DNA pull-down 实验（记为实验组和对照组），置于冰上备用或-80°C 保存。

* 注意：

- i. 提取核蛋白所需的样本量约为总蛋白的两倍，但具体使用量还需要根据实际操作来摸索。
- ii. 当样本不能完全裂解时（溶液很浑浊），可以增加裂解缓冲液或改善超声条件继续裂解；超声条件因样本类型和超声设备而异，应提前摸索好。根据经验，样本总蛋白浓度通常不低于 5 μg/μL，总量约 2~3 mg。
- iii. 如果样本中目标蛋白丰度较低，或结合物间的结合较弱，可以增加初始样本量，同时等比例增加裂解缓冲液和酶抑制剂的用量，但总孵育体积最大不超过离心管体积的 2/3，体积过大可以更换大规格离心管。

2. 磁珠准备

- (1) 将①链霉亲和素磁珠上下颠倒混匀，取实验组和对照组一共所需的 80 μL 磁珠到新的离心管中；
- (2) 加入 1 mL ③NT2 缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (3) 重复上步操作一次；
- (4) 加入 400 μL ③NT2 缓冲液，上下颠倒重悬磁珠；
- (5) 将磁珠平分为两份，每组各约 200 μL ，转移到新的离心管中，记为实验组和对照组。

3. 漂洗液准备

为了防止实验过程中的蛋白降解，需要向漂洗液中添加蛋白酶抑制剂。取出⑦10 mL 离心管，加入实验组和对照组总共所需的 5 mL ④漂洗液、25 μL ⑥蛋白酶抑制剂（按 0.5% 添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。如果有多组样本，按照实际使用量配置。

4. DNA pull-down

- (1) 取 3 μg 实验组和对照组 DNA 探针，分别加入对应的磁珠（步骤 2 制备）中，混匀仪上室温孵育 30 min；
- (2) 放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (3) 每组加入 500 μL 漂洗液（步骤 3 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (4) 重复上步操作一次；
- (5) 加入相应组别的样本裂解液（步骤 1 制备），放混匀仪上 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2~4 h；
- (6) 放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (7) 每组加入 500 μL 漂洗液（步骤 3 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (8) 重复上步操作两次，共漂洗三次，保留磁珠。

5. 蛋白洗脱

本说明书提供以下两种蛋白洗脱方案，操作者可以根据后期检测的需要选择合适的洗脱方法。

- (1) 非变性洗脱法：向磁珠中加入 50 μL ⑤洗脱缓冲液，涡旋震荡 20 s，混匀仪上室温洗脱 10~15 min；涡旋震荡 20 s，1000 g 离心 20 s；放磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中，-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。该洗脱产物保持原有的生物活性，适用于后期各种检测，例如质谱、SDS-PAGE 或 Western-blot 等。
- (2) SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法（变性洗脱法）：向磁珠中加入 50 μL 1 \times SDS-PAGE 上样缓冲液，95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min；磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中。该洗脱产物适用于 SDS-PAGE 或 Western Blot 检测；如果需要进行质谱检测，则切胶条后送检。

* 注意：

- i. 本试剂盒提供的洗脱缓冲液可以兼容质谱，辉骏生物也可以提供蛋白的质谱检测服务。
- ii. 如果选择非变性洗脱法，可以暂时保留洗脱后的磁珠，当非变性洗脱效率较低时，则采用 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法继续洗脱蛋白。
- iii. DNA pull-down 捕获的蛋白量通常较少，因此 SDS-PAGE 建议用硝酸银染色，染色步骤参考如下：

(为了便于称量，每步配置的溶液体积较大，实际操作时取适量溶液浸泡胶即可)

- (1) 固定: 30 min (乙醇: 乙酸: 水=4: 1: 5 体积比);
- (2) 敏化: 30 min (乙酸钠 10.2 g, 硫代硫酸钠 0.471 g, 乙醇 45 mL, 加水至 150 mL);
- (3) 水洗: 4 次, 每次 10 min;
- (4) 银染: 30 min (硝酸银 0.375 g, 加水至 150 mL);
- (5) 水洗: 2 次, 每次 40 s;
- (6) 显色: 显影至条带清楚 (碳酸钠 3.75 g, 60 μ L 甲醛, 加水至 150 mL);
- (7) 终止: 5 min (Na₂EDTA 2.19 g, 加水至 150 mL)。

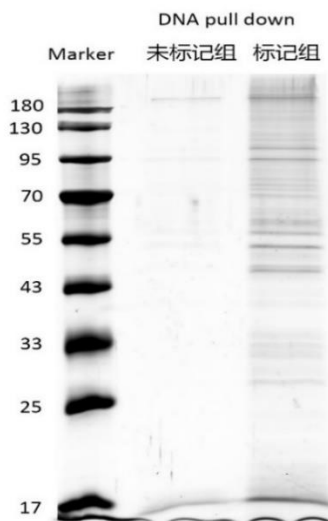
问题解决

问题	可能原因	解决方案
获得的复合产物少	样本或蛋白量不够	提高样本用量或更换核蛋白提取试剂盒
	孵育时间不够	延长孵育时间 (如孵育过夜), 但需要注意孵育时间过长也可能导致非特异性结合增多
	DNA 量不够	提高 DNA 用量
SDS-PAGE 检测有很多非特异结合条带	非特异性的蛋白结合在磁珠上	增加漂洗时间和次数

使用案例

实验目标: 筛选与目标 DNA 序列结合的蛋白质。

- (1) 未标记组: 未标记目标 DNA 探针的 pull-down 产物 (对照组);
- (2) 标记组: 生物素标记目标 DNA 探针的 pull-down 产物 (实验组)。



DNA pull-down 蛋白银染图