

说明书

DNA pull-down 试剂盒（动物）

产品信息

货号	产品名称	规格
FI8901-12T	DNA pull-down 试剂盒（动物）	12 次
FI8901-24T	DNA pull-down 试剂盒（动物）	24 次
FI8901-40T	DNA pull-down 试剂盒（动物）	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 试剂盒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, 请通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀瓶中磁珠。
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 (以下方案三选一操作)

1.1 动物细胞总蛋白提取

- (1) 实验组和对照组一共取 $2 \times 10^7 \sim 4 \times 10^7$ 个细胞, 用预冷的 PBS 清洗细胞 2~3 次, 每次 4°C 500 g 离心 5 min 收集细胞沉淀, 彻底去除培养基成分;
- (2) 加入 0.6~1 mL 预冷的②裂解缓冲液、6~10 μL ⑦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, 也可以置于冰上裂解 30 min, 间隔手动混匀;
- (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, 记为实验组和对照组, -80°C 保存或直接用于 DNA pull down 实验。

1.2 动物组织总蛋白提取

- (1) 采用预冷的 PBS 清洗新鲜组织 2~3 次, 彻底去除血液等成分, 如果样本为冷冻组织, 在取样时也需要进行清洗操作;
- (2) 实验组和对照组一共取 0.2~0.4 g 干净的组织, 置于研钵中, 用液氮充分研磨, 转移粉末至新的离心管中;
- (3) 加入 0.6~1 mL 预冷的②裂解缓冲液、6~10 μL ⑦蛋白酶抑制剂 (按 1%添加), 吹打混匀;
- (4) 冰上超声破碎至溶液基本澄清;
- (5) 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, 记为实验组和对照组, -80°C 保存或直接用于 DNA pull down 实验。

1.3 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，记为实验组和对照组，-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存或直接用于 DNA pull down 实验。

*** 注意：**

- i. 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 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，总量约 2~3 mg。
- ii. 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。
- iii. 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。

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；
- (9) 每组加入 50 μL ⑤洗脱缓冲液，涡旋震荡 20 s，放混匀仪上室温洗脱 10~15 min；
- (10) 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（即调取产物），可用于 Western-blot、SDS-PAGE 或质谱实验。

*** 注意：** i. 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. DNA pull-down 捕获的蛋白量

通常较少，因此 SDS-PAGE 建议用硝酸银染色而非考马斯亮蓝染色；硝酸银染色步骤参考如下：

- (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 4.5 g，72 μ L 甲醛，加水至 180 mL）；
- (7) 终止：5 min（Na₂EDTA 2.19 g，加水至 150 mL）。

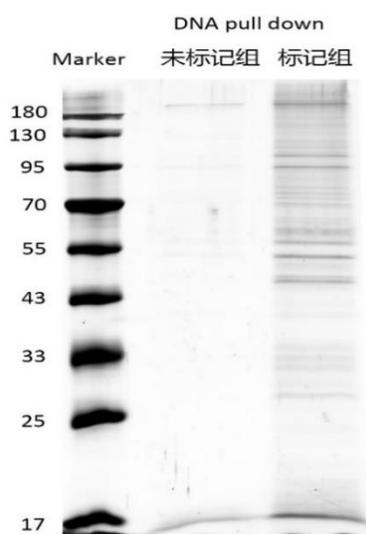
问题解决

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会导致非特异性结合增多
	DNA 量不够	提高 DNA 用量
多条非特异条带	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