

Animal DNA Pull-down Kit

货号：NR3111C

目录

1. 产品介绍	1
2. 试剂盒操作流程图.....	2
3. 实验前准备	3
4. 试剂盒操作说明.....	3
5. 产品注意事项.....	5
6. 常见问题	5

1. 产品介绍

DNA pull-down 技术是研究 DNA 与蛋白质相互作用的核心方法，已成为当前研究热点。该技术利用特定目的 DNA 序列作为诱饵，捕获并鉴定与之结合的蛋白质。本试剂盒是以目的 DNA 片段合成生物素标记的特异性 DNA 为探针，该探针通过链霉亲和素（Streptavidin）与生物素（Biotin）之间高亲和力、高特异性的相互作用，牢固地结合在预先偶联了链霉亲和素的磁珠表面。将此 DNA 探针-磁珠复合物与含有目标蛋白的提取液共同孵育，使目的 DNA 与其特异性结合蛋白相互作用。孵育后，通过洗涤步骤去除未结合或非特异性结合的游离蛋白，保留磁珠-链霉亲和素-生物素化 DNA 探针-靶蛋白复合物。最后，将特异性结合的靶蛋白复合物洗脱，即可获得与目的 DNA 探针结合的蛋白质产物。洗脱得到的蛋白产物可进一步通过 Western blot 分析或质谱（MS）鉴定，以确定结合蛋白的种类和特性。

本产品可应用于动物细胞、组织等样品的 DNA 与蛋白结合的 DNA Pull down 实验，具体组分见表 1。

表 1. Animal DNA Pull-down Kit 组分

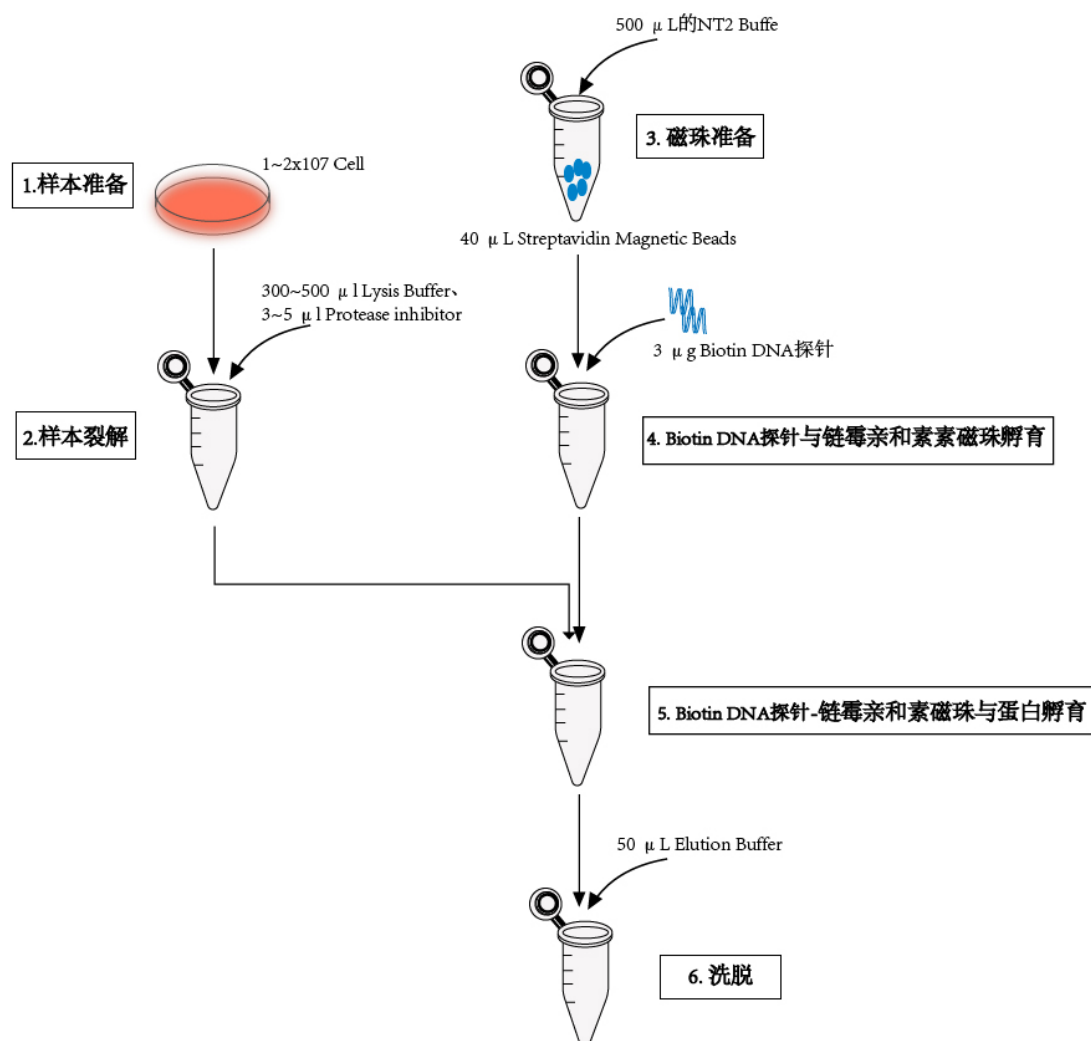
名称	12 Tests 规格	24 Tests 规格	储存条件
Streptavidin Magnetic Beads	500 μ L	1 mL	4℃, 1 年
Lysis Buffer	7 mL	14 mL	4℃, 1 年
NT2 Buffer	16 mL	32 mL	4℃, 1 年
Wash Buffer	32 mL	64 mL	4℃, 1 年
Elution Buffer	650 μ L	1.3 mL	-20℃, 1 年
Protease inhibitor	230 μ L	460 μ L	-20℃, 1 年

请注意，本试剂盒不包含所有必需试剂/耗材，请参照清单另行准备：

① PBS 缓冲液；② DNA 探针；③ 超声仪（用于裂解样本）；④ 低温离心机；⑤ 混匀仪；⑥ 磁力架

* 注意：Biotin-DNA 探针可通过公司定制或自行制备。

2. 试剂盒操作流程图



3. 实验前准备

* 注意：以下样本收集量均为 1 组的建议用量，设计多组实验，样本量请按照实际使用量配置。如设计实验组和对照组，则需收集建议量的 2 倍，以此类推。

3.1 样本收集

3.1.1 贴壁细胞样本

吸净培养容器中的培养基，并加入 PBS 后用细胞铲将细胞刮入离心管中（或加入适量 PBS 清洗 1 次细胞后用胰酶消化细胞，加入血清终止反应后收集于离心管中），离心去掉上清，再加入 PBS 清洗细胞 2 次，离心后去除上清收集沉淀样本，每组细胞总量 $1\sim 2\times 10^7$ 个。

3.1.2 悬浮细胞样本

将细胞悬液转移至样品管中，离心弃掉上清。去除上清后用 PBS 清洗细胞 2-3 次，直至把所有的培养基去除干净，每组细胞总量 $1\sim 2\times 10^7$ 个。

3.1.3 动物组织样本

组织离体 15 分钟内，立即将其用消毒过的刀具切成小块，用 PBS 或生理盐水洗净血液、体液等影响实验结果的残留成分，于液氮中进行充分研磨，每组样本量为 100~200 mg。

3.2 DNA 探针制备

(1) 实验组 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，PCR 扩增得到生物素标记的 DNA 探针即为实验组探针，按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明书进行探针的回收纯化。

(2) 对照组 DNA 探针制备：根据目标 DNA 序列设计并合成/PCR 扩增得到目的 DNA 片段，该片段未标记生物素即为对照组 DNA 探针，按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明书进行探针的回收纯化。

4. 试剂盒操作说明

* 注意：以下操作均为 1 组用量，设计多组样本，试剂用量请按照实际使用量配置。如设计实验组和对照组，则为操作说明用量的 2 倍，以此类推。

4.1 蛋白提取

4.1.1 细胞样本

- (1) 样本加入 300~500 μL 预冷的 Lysis Buffer 和 3~5 μL Protease inhibitor (按 1:100 添加), 吹打混匀。
- (2) 置于冰上裂解 30 min (间隔手动混匀), 为了更充分裂解, 也可以冰上超声至溶液基本澄清。
- (3) 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 g 离心 15 min, 收集上清至新的离心管中, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。收集得到的样本可取 30 μL 作为 input, 剩余用于 DNA Pull down 实验。

4.1.2 组织样本

- (1) 组织样本置于研钵中加入液氮充分研磨成粉末状, 转移至新的离心管中。
- (2) 样本加入 300~500 μL 预冷的 Lysis Buffer 和 3~5 μL Protease inhibitor (按 1:100 添加), 吹打混匀。
- (3) 最好冰上超声破碎至溶液基本澄清, 也可以置于冰上裂解 30 min (间隔手动混匀)。
- (4) 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 g 离心 15 min, 收集上清至新的离心管中, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。收集得到的样本可取 30 μL 作为 input, 剩余用于 DNA Pull down 实验。

4.1.3 核蛋白提取

如果提取核蛋白, 则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, 剩余用于 DNA pull-down 实验, -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

*注意:

- (1) 提取核蛋白所需的样本量约为方案 1 的两倍, 但具体使用量还需要根据实际操作来摸索。
- (2) 当样本裂解后依旧浑浊, 说明样本不能完全裂解时, 可以适当增加裂解缓冲液的用量继续裂解, 或者改善超声条件。提取到的样本蛋白浓度通常不低于 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 总量约 2~3 mg。
- (3) 如果样本中目标蛋白丰度较低, 或结合物间的结合较弱, 也可以增加初始样本量, 同时裂解液缓冲液和抑制剂可等比例增加。

4.2 漂洗液准备

取出 10 mL 离心管, 加入 2.5 mL Wash Buffer、12.5 μL Protease inhibitor (蛋白酶抑制剂与漂洗液按 1:200 添加), 混合均匀, 冰上保存, 现配现用。

4.3 磁珠准备

- (1) 每组实验取 40 μL 的 Streptavidin Magnetic Beads 于离心管中, 加入 500 μL 的 NT2 Buffer, 颠倒混匀 30 次, 放磁力架上静置 1 min 使磁珠全部吸附于磁力架, 弃上清。

(2) 再次加入 500 μ L 的 NT2 Buffer, 颠倒混匀 30 次, 放磁力架上静置 1 min 使磁珠全部吸附于磁力架, 弃上清。

(3) 加入 200 μ L 的 NT2 Buffer, 上下颠倒重悬磁珠。

4.4 DNA Pull down

(1) 将 3 μ g DNA 探针加入**步骤 4.3 制备的磁珠**中, 混匀仪上室温孵育 30 min, 放磁力架上静置 1 min 并弃上清。

(2) 加入 500 μ L **步骤 4.2 制备的漂洗液**, 颠倒混匀 30 次, 放磁力架上静置 1 min 并弃上清;

(3) 重复步骤 (2) 漂洗操作一次。

(4) 加入**步骤 4.1 制备的样本裂解液**, 放混匀仪上 4 $^{\circ}$ C 孵育 2~4 h; 放磁力架上静置 1 min 并弃上清。

(5) 加入 500 μ L **步骤 4.2 制备的漂洗液**, 颠倒混匀 30 次, 放磁力架上静置 1 min 并弃上清;

(6) 重复步骤 (5) 漂洗操作两次, 共漂洗三次。

4.5 洗脱

(1) 加入 50 μ L Elution Buffer, 涡旋震荡 20 s, 放混匀仪上室温洗脱 10~15 min, 涡旋震荡 20 s。

(2) 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 $^{\circ}$ C 保存, 或直接用于 Western-blot、SDS-PAGE 或质谱实验。

* 注意: 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。

5. 产品注意事项

- 在进行实验设计时, 建议加入对照组, 方便后续实验结果分析。
- 请勿使磁珠干燥、冷冻或剧烈涡旋, 会导致磁珠聚集而降低结合能力。
- 为了您的健康, 请穿戴实验服并佩戴一次性手套进行实验操作。

6. 常见问题

Q: 获得的复合产物少的原因有哪些? 怎么解决呢?

- (1) 样本或蛋白量较少, 可通过提高样本用量或更换和蛋白提取试剂盒进行蛋白提取;
- (2) 孵育时间较短, 可延长孵育时间, 但需要注意孵育时间过长也可能导致非特异性结合增多;
- (3) DNA 探针量较少, 可提高 DNA 探针用量

Q: 非特异结合蛋白较多，怎么解决呢？

要想减少非特异性的蛋白结合在磁珠上，可通过增加漂洗时间和次数来减少非特异结合。

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℃ 以下冰上操作并防止反复冻融。
- (2) 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，比如评估拉下的复合体含量情况，不能决定质谱鉴定的结果，建议以质谱结果为准。