

Microbial DNA Pull-down Kit

货号：NR3113C

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. Microbial DNA Pull-down Kit 组分

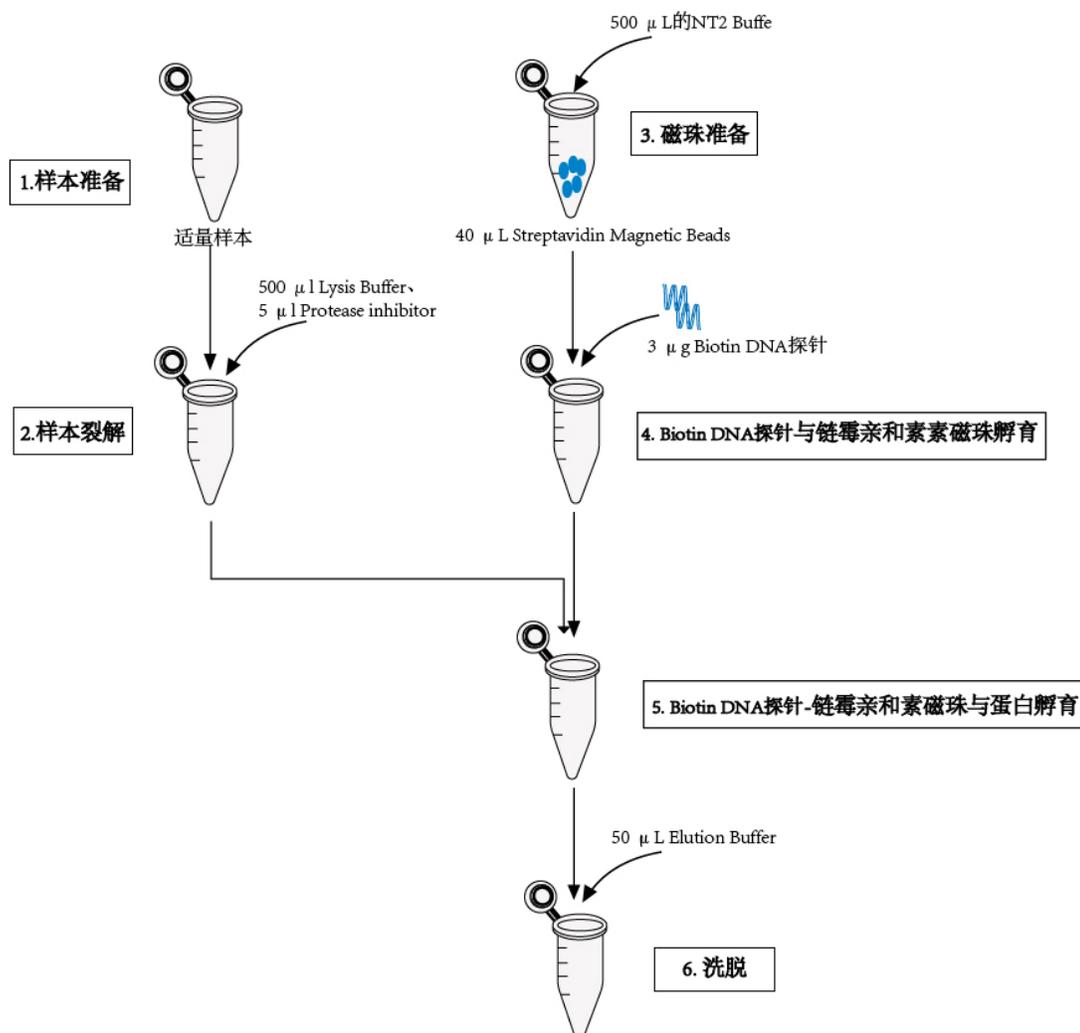
| 名称 | 12 Tests 规格 | 24 Tests 规格 | 储存条件 |
|-----------------------------|-------------|-------------|-----------------------|
| Streptavidin Magnetic Beads | 500 μ L | 1 mL | 4 $^{\circ}$ C, 1 年 |
| Lysis Buffer | 7 mL | 14 mL | 4 $^{\circ}$ C, 1 年 |
| NT2 Buffer | 16 mL | 32 mL | 4 $^{\circ}$ C, 1 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

将微生物样本悬液转移至样品管中离心，去除上清培养基，再用 PBS 清洗三次，清洗干净后，4 °C 5000 g 离心 5 min 收集沉淀，将微生物沉淀转移至 1.5ml 的 EP 管中，样本量不低于 50 μL 菌体沉淀。

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 总蛋白提取

(1) 样本加入 500 μL 预冷的 Lysis Buffer 和 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，建议冰上超声至溶液基本澄清。

(3) 于 4 °C 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中，- 80°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°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 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。

(3) 加入 200 μL 的 NT2 Buffer，上下颠倒重悬磁珠。

4.4 DNA Pull down

(1) 将 3 μg 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 μL **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 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2~4 h；放磁力架上静置 1 min 并弃上清。

(5) 加入 500 μL **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 μL 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 $^{\circ}\text{C}$ 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会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 4C 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。