

说明书

DNA pull-down 试剂盒

货号

FI8705-12T

描述

DNA pull-down 试剂盒，包含足够完成 12 个反应的试剂，每个反应用 40 μ L 磁珠。由于每次 pull-down 需要设置实验组和对照组，因此本试剂盒可以完成 6 次 pull-down 实验。

试剂盒组分

编号	名称	体积 (12 Tests)	储存条件
①	链霉亲和素磁珠	500 μ L	4°C, 1 年
②	裂解缓冲液	7 mL	4°C, 1 年
③	NT2 缓冲液	16 mL	4°C, 1 年
④	漂洗液	32 mL	4°C, 1 年
⑤	洗脱缓冲液	650 μ L	-20°C, 1 年
⑥	蛋白酶抑制剂	230 μ L	-20°C, 1 年
⑦	10 mL 离心管	——	——

目录

I 产品简介	1
II 重要产品信息	2
III 额外所需的主要材料和仪器	2
IV 操作方法	2
V 问题解决	4
VI 使用案例	4

I 产品简介

DNA pull-down 试剂盒采用链霉亲和素磁珠来高效调取生物素标记的目标 DNA 序列及其结合蛋白。首先根据目标序列制备生物素标记的 DNA 探针，利用链霉亲和素磁珠捕获目标 DNA 探针，再与待测样本蛋白孵育，洗涤去除未结合的蛋白，即可得到目标 DNA 序列的结合蛋白。

II 重要产品信息

- 请勿干燥或冷冻磁珠，这些操作会导致磁珠聚集而降低结合能力。
- 由于煮沸会导致磁珠聚集并且失去结合能力，经煮沸的磁珠不应再次使用。

III 额外所需的主要材料和仪器

- **自备试剂：**DNA 凝胶回收试剂盒、核蛋白提取试剂盒（可选）。
- **所需仪器：**低温离心机、混匀仪、磁力架、超声仪（动物组织、植物和微生物样本裂解需要）。

IV 操作方法

*注意：

- 为保证磁珠均匀分布，通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀瓶中磁珠。
- 具体样品量和孵育时间依赖于每个特定体系，因而可能需要优化才能得到最大产量。

4.1 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。

4.2. 蛋白提取

以下方案二选一操作。

方案 1：总蛋白提取

(1) 按如下方法收集样本：

样本类型	样本量/组	收集方法
动物细胞	1×10 ⁷ ~ 2×10 ⁷ 个	冷 PBS 漂洗 2~3 次，彻底去除培养基成分，4 °C 500 g 离心 5 min 收集沉淀
动物组织	100~200 mg	冷 PBS 或生理盐水清洗干净，彻底去除血液等成分，液氮充分研磨
植物组织	200~300 mg	无菌双蒸水清洗干净，液氮充分研磨
微生物	50 μL 菌体沉淀	冷 PBS 漂洗 2~3 次，彻底去除培养基成分，4 °C 5000 g 离心 5 min 收集沉淀

(2) 样本加入 300~500 μL 预冷的②裂解缓冲液、3~5 μL ⑥蛋白酶抑制剂（按 1:100 添加），吹打混匀。

(3) a. 动物细胞：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。

b. 动物组织：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）。

c. 植物、微生物：冰上超声破碎至溶液基本澄清。

(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，剩余用于 DNA pull-down 实验，-80°C 保存。

***注意：**当样本不能完全裂解时（溶液很浑浊），可以适当增加裂解缓冲液的用量继续裂解。根据经验，提取的样本蛋白量约 2~3 mg。如果样本中目标蛋白丰度较低，或与 DNA 结合较弱，可以增加初始样本量：300 μ L 为裂解缓冲液的最小使用体积，当样本增加时，裂解液缓冲液和抑制剂可等比例增加，但总孵育体积最大不超过离心管体积的 2/3。超声条件因样本类型和超声设备而异，可提前摸索好合适的条件。

方案 2：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 μ L 作为 input，剩余用于 DNA pull-down 实验，-80 $^{\circ}$ C 备用。

***注意：**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。

4.3 磁珠准备

- (1) 每组实验取 40 μ L ①磁珠，加入 500 μ L ③NT2 缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (2) 再次加入 500 μ L ③NT2 缓冲液洗涤磁珠，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (3) 加入 200 μ L ③NT2 缓冲液，上下颠倒重悬磁珠。

4.4 漂洗液准备

取出 ⑦10 mL 离心管（空管），加入本次实验 2 组样本（实验组+对照组）所需的 5 mL ④漂洗液、25 μ L ⑥蛋白酶抑制剂（按 1:200 添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。

***注意：**如果有多组样本，按照实际使用量配置。

4.5 DNA pull-down

- (1) 将 3 μ g DNA 探针加入磁珠（4.3 制备）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 漂洗液（4.4 配置），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；重复该漂洗操作一次。
- (3) 加入样本裂解液（4.2 制备），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。
- (4) 加入 500 μ L 漂洗液（4.4 配置），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；重复该漂洗操作两次。
- (5) 加入 50 μ L ⑤洗脱缓冲液，涡旋震荡 20 s，放混匀仪上室温洗脱 10~15 min，涡旋震荡 20 s。
- (6) 1000 g 离心 20 s，放磁力架上静置 1 min，收集上清（即调取产物）；调取的蛋白产物可用于 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。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）。

V 问题解决

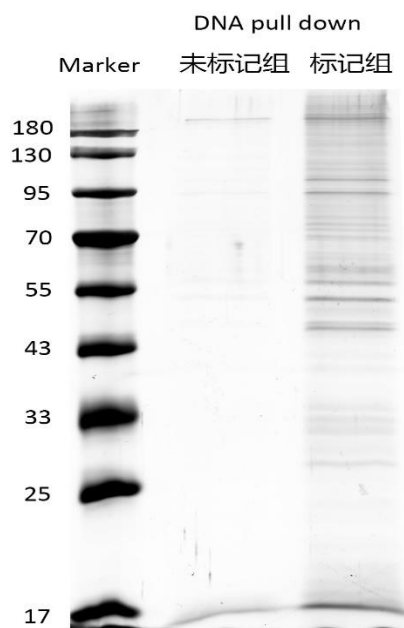
问题	可能原因	解决方案
获得的复合产物少	样本或蛋白量不够	提高样本用量或更换核蛋白提取试剂盒
	孵育时间不够	延长孵育时间（如孵育过夜），但需要注意孵育时间过长也可能导致非特异性结合增多
	DNA 量不够	提高 DNA 用量
多条非特异条带	非特异性的蛋白结合在磁珠上	增加漂洗时间和次数

VI 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