

DNA pull-down试剂盒(动物)

DNA pull-down Kit for Mammal

注:本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4°C及-20°C,保质期12个月。

序号	试剂	货号及规格			储存
		IRD001 (6T)	IRD001M (12T)	IRD001L (40T)	
01	链霉亲和素磁珠	0.25mL	0.5mL	1mL	4°C
02	裂解缓冲液	3.5 mL	7mL	14mL	4°C
03	NT2缓冲液	8mL	16mL	32mL	4°C
04	漂洗液	16mL	32mL	64mL	4°C
05	洗脱缓冲液	0.33mL	0.65mL	1.3mL	-20°C
06	蛋白酶抑制剂	0.12mL	0.23mL	0.46mL	-20°C

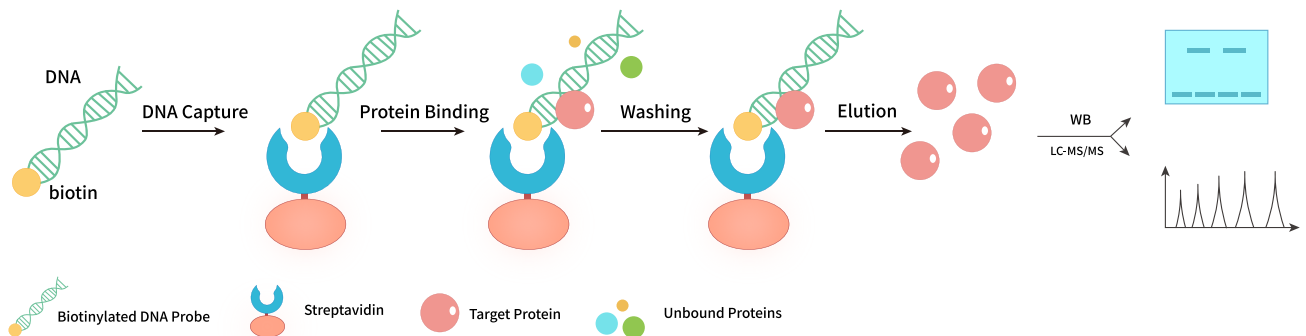
产品简介/Product Description

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。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。

技术路线/Technology mapping

1. 原理流程图



使用流程/Procedure

1. 蛋白提取

(1) 总蛋白提取

- ①组织: 0.2 ~ 0.4g 动物组织采用预冷的 PBS (RNase-free) 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;
细胞: 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 (RNase-free) 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样本置于冰上, 加入 0.6~1 mL 预冷的裂解缓冲液、6~10 μL 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; 如果无超声条件, 可置于冰上裂解 30min, 期间每 10min 涡旋混匀一次, 每次 5 s;
- ④4°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。

(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:

1. 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. 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, 应提前摸索好合适的条件。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。
3. 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 磁珠到新的无 RNase 离心管中;
- ②加入 1 mL NT2 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 NT2 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 , 转移到新的无 RNase 离心管中, 记为实验组和对照组。

3. 漂洗液准备

取 10 mL 离心管，加入实验组和对照组总共所需的 5mL 漂洗液、25 μ L 蛋白酶抑制剂（按 0.5% 添加）和 2.5 μ L RNase 抑制剂（按 0.05% 添加），混合均匀，冰上保存。

4. DNA pull-down

- ①取 3 μ g 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 μ L 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 $^{\circ}$ 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 μ L 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（选做）

如果需要对 pull down 产物进行蛋白检测，可以在以下方案中选择合适的洗脱方法：

- ①非变性洗脱法：向磁珠中加入 50 μ L 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 20s，1000g 离心 20s；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。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。
- ②SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法（变性洗脱法）：向磁珠中加入 50 μ L 1 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液，95 $^{\circ}$ 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：

1. 本试剂盒提供的洗脱缓冲液可以兼容质谱。
2. 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。
3. RNA 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（Na₂ EDTA 2.19 g，加水至 150 mL）。

注意事项/Notes

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内；
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

