DNA pull down 试剂盒说明书

产品货号：KT104-01

产品简介：DNA pull-down 是一种检测 DNA 和蛋白相互作用的方法，可用于检测转录因子与启动子等互作关系的主要实验手段之一。本产品适用于大部分的动物细胞和组织的 DNA pull-down 实验。本试剂盒包含 12 个 pull-down 反应。

试剂盒包装组分：

表 1 试剂盒包装组分信息

试剂	编号	数量
4℃保存试剂		
Cell lysis buffer	SCDPD-1	10mL
Binding buffer	SCDPD-2	65mL
Wash buffer	SCDPD-3	150mL
链霉亲和素磁珠	SCDPD-4	650uL
	-20℃保存试剂	
蛋白酶抑制剂	SCDPD-5	100uL
PMSF	SCDPD-6	120uL
5x SDS Loading buffer	SCDPD-7	150uL

需要的额外材料：

生物素标记的 DNA 探针和非生物素标记的 DNA 探针
针旋转仪
磁力架
Western blotting 试剂耗材
化学发光底物
电泳仪等
银染试剂

注意事项：

1 为了使蛋白质降解最小化，在细胞裂解物制备物中包括蛋白酶抑制剂
2 不要冷冻或干燥链霉抗生物素蛋白磁珠。冷冻或干燥将导致珠子聚集并失去结合活性。
3 操作过程中不要剧烈吹打磁珠，控制孵育时间和清洗条件
4 在 SDS-PAGE Loading buffer 缓冲液对于一次性应用是可接受的。沸腾会导致珠粒聚集和结合活性丧失。

实验过程摘要：

如图 1 所示，针对目标区域设计特异性 DNA 探针并经过脱硫生物素标记，脱硫生物素探针可以和偶联在磁珠上的链霉亲和素亲和结合。然后，细胞核提取物与磁珠-DNA 探针孵育，作用蛋白质分子可以和 DNA 探针特异性结合；经过洗涤可以将非特异性结合蛋白质去除；最后，经洗脱液洗脱，得到目的 DNA 探针-蛋白质复合物，再经过 Western Blot 或质谱（MS）鉴定蛋白质类型。

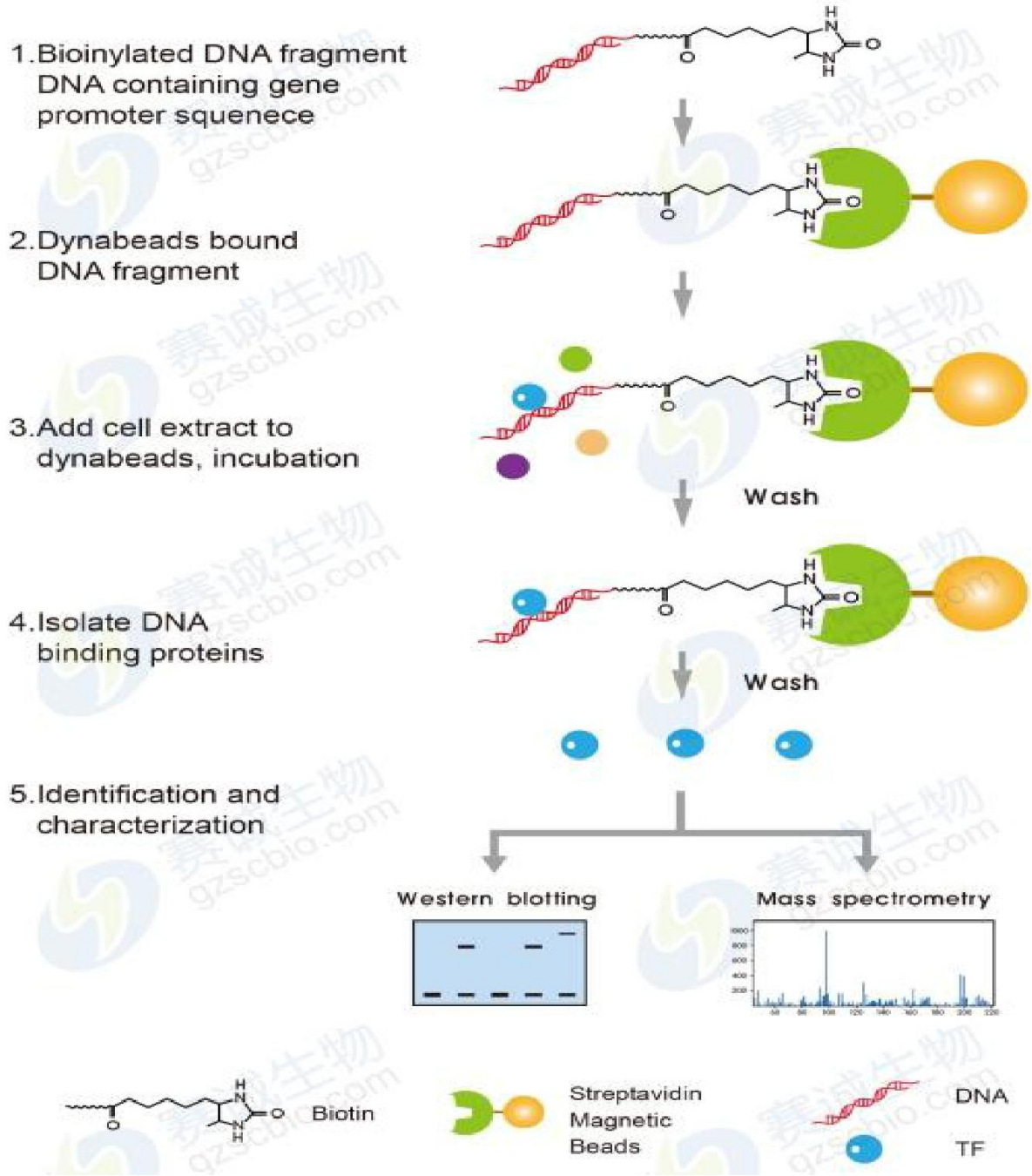

图 1　DNA pull-down 试剂盒实验过程示意图

实验步骤

A、裂解细胞

细胞量：约 1-2x10^7 个

1.用细胞刮将细胞刮下来或者用胰酶消化，收集至无核酸酶 EP 管。

2.1500rpm，4℃离心 5min，弃上清，收集细胞，用 PBS 溶液清洗细胞 2-3 次

3.加入 1mL Cell lysis buffer，使用前每 mL 裂解液加入 10uL 蛋白酶抑制剂和 12uL PMSF，吹打均匀后于 4℃冰箱翻转裂解 1-2h。

4.4℃，12000rpm 离心 15min。将上清转移到一个新的 1.5mL 的 EP 管中，标识清楚。裂解液继续 IP 实验或者储存在-80℃

B、磁珠与探针孵育

1.上下轻微颠倒重悬磁珠；

2.标记实验所需的无 RNA 酶 1.5ml EP 管，包括阳性对照生物素标记探针组和非标记探针组，目的基因生物素标记探针组和非标记探针组，空磁珠组（分组：Target-biotin，Target-unbiotin，beads）

3.吸取 50uL 重悬后的磁珠悬液于每个无核酸酶 1.5mL EP 管中，置于磁力架上待液体澄清，去上清；

4.每管加入 500uL Binding Buffer，涡旋振荡 10s 清洗磁珠，短暂离心后置于磁力架上，去上清；

5.重复清洗磁珠 2 次，去上清；

6.用 500uL 的 Binding Buffer 重悬磁珠，加入 500ng-2ug 探针（根据探针长度调整）于相应 EP 管中，beads 组不加探针；

7.封口膜封口后，置于 4℃冰箱翻转孵育 6-8 小时。

C、磁珠-探针与裂解液孵育

1.将 4℃冰箱的磁珠-探针混合物置于磁力架上待液体澄清，去上清，用 500uL Binding Buffer 清洗磁珠 1 次，然后依次加入 1 mL Binding buffer；

2.加入 100-300uL 细胞裂解液，上下颠倒轻微混匀，封口，置于 4℃冰箱翻转孵育过夜，剩余裂解液取 10-30uL（10%）作为 input 组于另一 EP 管中；

3.过夜孵育的混合物置于磁力架上待液体澄清，去上清，加入 1mL wash buffer，涡旋振荡 10S 清洗磁珠，短暂离心后置于磁力架上，去上清，重复清洗磁珠 5 次（共 6 次），去上清，磁珠产物进行下一步；

D、蛋白产物洗脱

1.于每组（包括 input 组和 beads 组）中分别加入 30-40uL wash buffer 和 10uL 5xLoading buffer 于 100℃ 煮 10min，短暂离心后置于磁力架上，取上清至新的 EP 管中，即为 DNA pull-down 产物。

2.获得的产物可直接用于银染检测或质谱检测或 WB 检测。