

DNA pull-down 试剂盒说明书

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 20 个 pull-down 反应。

试剂盒包装组分:

表 1 试剂盒包装组分信息

4℃保存试剂		
试剂	编号	数量
Cell lysis buffer	SCDPD-1	10mL
Binding buffer	SCDPD-2	80mL
Wash buffer	SCDPD-3	130 mL
链霉亲和素磁珠	SCDPD-4	1 mL
-20℃保存试剂		
蛋白酶抑制剂	SCDPD-5	200uL
2x Loading buffer(无溴酚蓝)	SCDPD-6	150uL
阳性对照体系: (-20℃保存)		
阳性对照探针 TATA-biotin	SCDPD-7	5ug
阴性对照探针 TATA-unbiotin	SCDPD-8	5ug
抗体 TBP (兔抗, CST, 44059S)	SCDPD-9	5uL, 足够检测 4-5 个 Western blots

阳性对照体系说明:

阳性对照探针序列为包含 TATAAAAG 的串联序列，能特异性富集 TATA-box 结合蛋白 TBP (TATA-box binding protein)。

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。

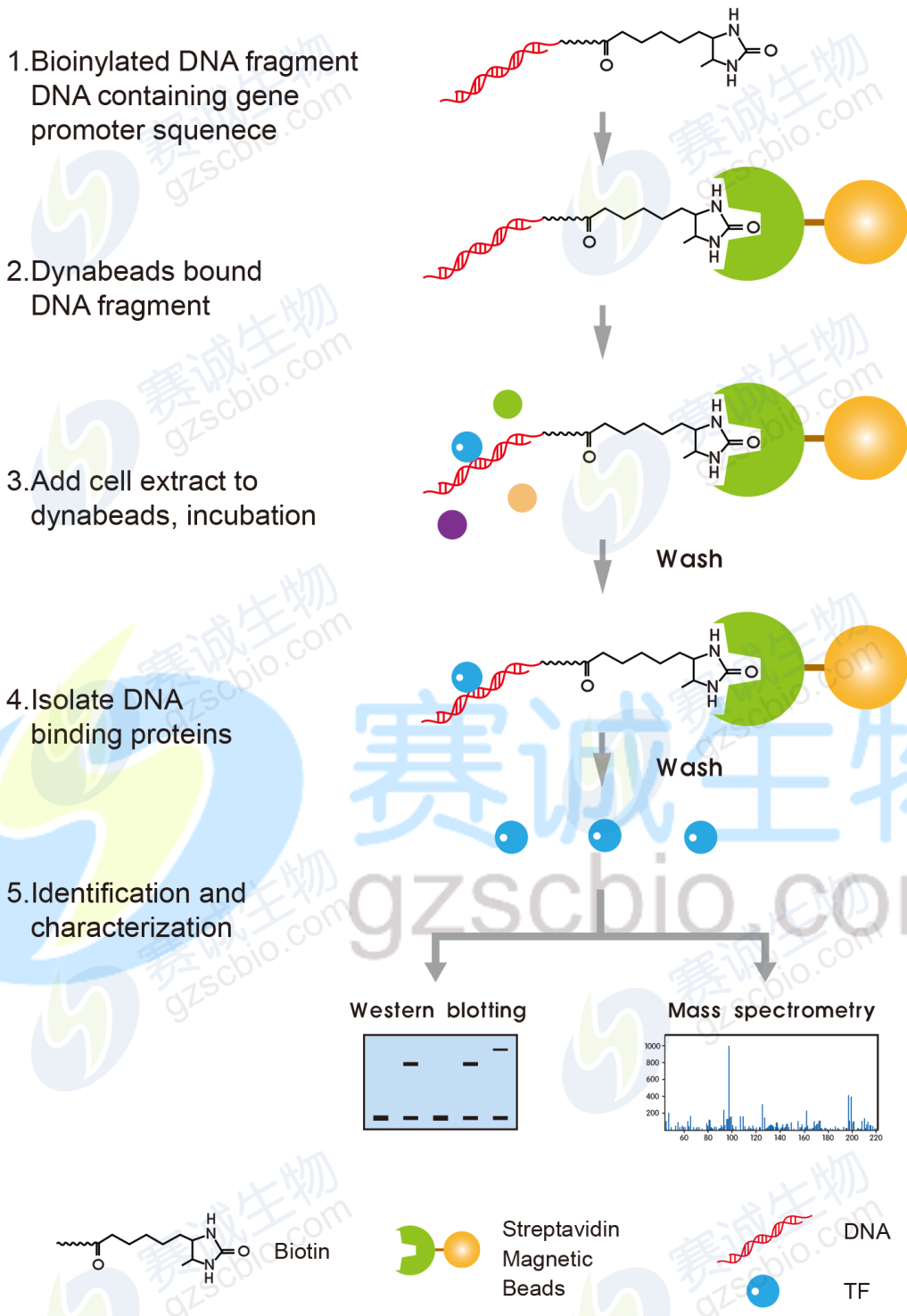


图 1 DNA pull-down 试剂盒实验过程示意图

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。

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
旋转仪

可替代的洗脱液: SDS PAGE 上样缓冲液

TBS-T

Western blotting 试剂

Nitrocellulose 或 PVDF 膜

抗兔二抗

化学发光底物

电泳仪等

银染试剂

实验步骤

A、裂解细胞

细胞量: 约 4×10^7 个

- 1 用细胞刮将细胞刮下来, 收集至无 RNA 酶 EP 管。
- 2 1500rpm, 4°C 离心 5min, 弃上清, 收集细胞, 用 PBS 溶液清洗细胞 1-2 次
- 5 加入 1mL Cell lysis buffer, 使用前每 mL 裂解液加入 10uL 蛋白酶抑制剂, 吹打均匀后于 4°C 冰箱翻转裂解 1-2h。
- 6 4°C, 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°C

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: TATA-biotin, TATA-unbiotin, Target-biotin, Target-unbiotin, beads)
- 3 吸取 50uL 重悬后的磁珠悬液于每个无 RNA 酶 1.5mL EP 管中, 去上清;
- 4 每管加入 500uL Binding Buffer, 轻微上下颠倒混匀清洗磁珠,;
- 5 3000rpm 离心 1 min, 去上清, 重复清洗磁珠 2 次, 去上清;
- 6 用 500uL 的 Binding Buffer 重悬磁珠, 加入 1-2ug 探针于相应 EP 管中;
- 7 封口膜封口后, 置于 4°C 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 3000rpm 离心 2min，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（beads 组不加裂解液），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 3000rpm 离心 2min，去上清，加入 1mL wash buffer，上下颠倒轻微混匀，清洗磁珠，3000rpm 离心 1min，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 30-50uL 2xLoading buffer 于 100℃煮 10min，3000rpm 离心 1min，取上清至新的 EP 管中，即为 RNA 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。

阳性体系 WB 检测：

WB 检测 TATA-box 与 TBP 蛋白是否结合，用带生物素标记的 TATA-box 能富集 TBP；用非生物素标记的 TATA-box 不会富集 HuR RBP（图 2）。

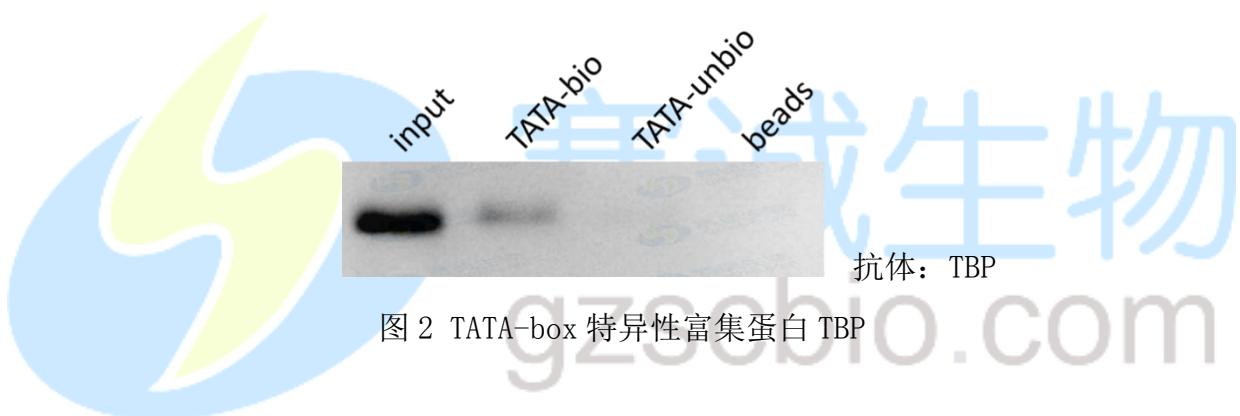


图 2 TATA-box 特异性富集蛋白 TBP