

货号	名称	规格	存储
F1711-12T	DNA Pull-Down 试剂盒 (植物)	12T	-20℃
F1711-24T	DNA Pull-Down 试剂盒 (植物)	24T	-20℃
F1711-40T	DNA Pull-Down 试剂盒 (植物)	40T	-20℃

### 产品简介

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 PullDown 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，再与植物样本裂解液孵育，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。

### 试剂盒成分

编号	名称	12T 规格	24T 规格	40T 规格	储存条件
①	链霉亲和素磁珠	500 $\mu$ L	1 mL	1.7 mL	4℃, 1 年
②	裂解缓冲液	7 mL	14 mL	22 mL	4℃, 1 年
③	NT2 缓冲液	16 mL	32 mL	52 mL	4℃, 1 年
④	漂洗液	32 mL	64 mL	110 mL	4℃, 1 年
⑤	洗脱缓冲液	650 $\mu$ L	1.3 mL	2.2 mL	-20℃, 1 年
⑥	蛋白酶抑制剂	230 $\mu$ L	460 $\mu$ L	760 $\mu$ L	-20℃, 1 年
⑦	10mL 离心管	1 个	1 个	1 个	——

**\*注意：**该试剂盒包含足够完成 12、24 或 40 个反应的试剂，每个反应使用 40  $\mu$ L 磁珠。由于每次 pull-down 实验至少需要设置一个实验组和一个阴性对照组，因此一次实验至少需要使用 2 个反应的试剂量。

### 额外所需材料

1. 自备材料：DNA 凝胶回收试剂盒、核蛋白提取试剂盒（可选）、PBS。
2. 所需仪器：磁力架、混匀仪、低温离心机、超声波破碎仪。

### 使用说明

#### I 注意事项

1. 请勿干燥或剧烈涡旋磁珠，禁止长时间置于磁场，这些操作可能会引起磁珠聚团，降低结合活性。
2. 为保证磁珠均匀分布，请在使用前通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀磁珠。
3. 具体样品量和孵育时间依赖于每个特定体系，可能需要优化才能得到最大产量。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### II 实验前准备工作

##### RNA 探针制备

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。

#### III 操作方法

1. 蛋白提取（以下方案二选一操作）
  - 1.1 总蛋白提取

- (1) 实验组和对照组一共取 0.4~0.6 g 植物组织，用无菌双蒸水清洗干净，置于研钵中，用液氮充分研磨，再转移粉末至预冷的新离心管中；
- (2) 将样本置于冰上，每组加入 1mL 预冷的②裂解缓冲液、10 μL ⑥蛋白酶抑制剂（按 1%添加），吹打混匀；
- (3) 冰上超声破碎至溶液基本澄清；
- (4) 4℃ 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℃ 保存。

## 1.2 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℃ 保存。

**\* 注意：**i. 提取核蛋白所需的样本量约为总蛋白的两倍，但具体用量还需要根据实际操作来摸索。

ii. 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 μg/μL，总量约 2~3 mg。

ii. 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①链霉亲和素磁珠上下颠倒混匀，取实验组和对照组一共所需的 80 μL 磁珠到新的离心管中；
- (2) 加入 1 mL ③NT2 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 ③NT2 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，转移到新的离心管中，记为实验组和对照组。

## 3. 漂洗液准备

为了防止实验过程中的蛋白降解，需要向漂洗液中添加蛋白酶抑制剂。取出⑦10 mL 离心管，加入实验组和对照组总共所需的 5 mL ④漂洗液、25 μL ⑥蛋白酶抑制剂（按 0.5%添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。如果有多组样本，请按照实际用量配置。

## 4. DNA pull-down

- (1) 取 3 μg 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 μL 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 °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 μL 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

本说明书提供以下两种蛋白洗脱方案，操作者可以根据后期检测的需要选择合适的洗脱方法。

(1) 非变性洗脱法：向磁珠中加入 50 μL ⑤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℃ 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。

(2) SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法（变性洗脱法）：向磁珠中加入 50 μL 1×SDS-PAGE 上样缓冲液，95 °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：**i. 本试剂盒提供的洗脱缓冲液可以兼容质谱。

ii. 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。

iii. 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，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  $\mu$ L 甲醛，加水至 150 mL）；
- (7) 终止：5 min（Na<sub>2</sub> EDTA 2.19 g，加水至 150 mL）。

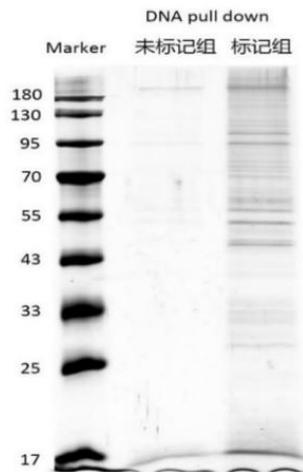
#### 问题解决

问题	可能原因	解决方案
获得的复合产物少	样本量不够	提高样本用量
	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会导致非特异性结合增多
	DNA 探针量不够	提高 DNA 探针用量
SDS-PAGE 检测有很多非特异结合的条带	非特异性的蛋白结合在磁珠上	增加漂洗时间和次数

#### 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