

DNA Pulldown Kit

DNA Pulldown 试剂盒

目录号

DLI101

产品简介

DNA pulldown 技术利用生物素标记的 DNA 作为诱饵分子，富集 DNA 结合蛋白（转录因子、共调节因子、DNA 修复酶等）的实验技术。DNA pulldown 技术是使生物素标记的 DNA 探针与细胞全蛋白提取液孵育，形成 DNA 蛋白质复合物。该复合物可被链霉亲和素标记的磁珠结合并分离纯化。洗脱获取到的复合物，可以用于 western blot 实验或蛋白质质谱实验。

产品组成

组分	规格 (20T)	规格 (48T)	储存
Streptavidin beads	400 μ L	960 μ L	4 $^{\circ}$ C
SA binding buffer	8 mL	19.2 mL	4 $^{\circ}$ C
Biotin pulldown buffer	36 mL	86.4 mL	4 $^{\circ}$ C
Protease inhibitor	300 μ L	720 μ L	-20 $^{\circ}$ C
Binding enhancer PD	8 mL	19.2 mL	4 $^{\circ}$ C
Biotin washing buffer	30 mL	72 mL	4 $^{\circ}$ C
WB elution buffer	2 mL	4.8 mL	4 $^{\circ}$ C
MS elution buffer	2 mL	4.8 mL	4 $^{\circ}$ C

产品应用

- ◆ 特定基因的转录因子筛选研究；
- ◆ 转录因子靶向结合特定基因的验证研究；
- ◆ 转录因子结合区域研究；
- ◆ DNA 修饰（m5C 等）结合修饰酶、去修饰酶及读取酶研究。

产品特点

- ◆ 探针材料：使用 DNA 探针开展实验，准备周期短且特殊物种不受没有抗体的限制；
- ◆ 流程简便：DNA 探针总量大可以富集具备结合功能的蛋白；
- ◆ 样本适用广：适用于动物、植物、真菌等细胞生物；
- ◆ 时间周期短：整个实验流程 < 3h；
- ◆ 适配 WB 及 MS 检测：洗样品适配 western blot 鉴定。

使用方法

1. 探针-磁珠结合 (时间 30 min)

- 取 20 μ L Streptavidin beads 至 2mL 离心管中，加入 200 μ L SA binding buffer 轻弹混匀后，磁力架上收集磁珠；
- 磁珠中加入 200 μ L SA binding buffer 及生物素标记的目标基因 DNA 探针（标示为 pulldown）轻弹混匀，室温摇动结合 30 min 后，静置待用。

2. 蛋白质提取 (时间 30 min)

- 新鲜细胞：1 \times PBS 洗涤两次，最后一次吸干残余 PBS；冻存细胞：1000 rpm 离心 5 min 后，去除干净 PBS；组织样品：取 0.1 ~ 0.2 g 组织，使用液氮在研钵中研磨成单细胞状态；
- 细胞沉淀中依次加入 1 mL Biotin pulldown buffer 及 15 μ L Protease inhibitor 后，使用 2~3mm 探头，600~800W 功率，冰浴条件下 5s ON、5s OFF 超声 15~30min；
- 4 $^{\circ}$ C 条件 12000g 离心 10 min 后，转移上清至新离心管中；

- d. 磁力架上转移 200 μL 上清至新离心管中（标示为 Input, -20°C 暂存），转移 800 μL 上清至 pulldown 离心管中（第 1 部分完成）

3. Pulldown (时间 1.5 h)

- a. Pulldown 管继续加入 400 μL Binding enhancer PD 及 800 μL Biotin pulldown buffer 后，在垂直混匀器上，室温摇动孵育 60 min，磁力架上收集磁珠去除上清；
- b. 磁珠中加入 500 μL Biotin washing buffer，室温摇动洗涤 5 min，磁力架上收集磁珠去除上清液，重复本步 2 次（共洗涤 3 次）

4. 洗脱 (时间 10 min/ 60 min)

- a. 选择 1：Western blot 或蛋白染色：pulldown 样品加入 100 μL WB elution buffer，吹打混匀后 65°C 洗脱 10 min，在磁力架上收集上清即为洗脱蛋白溶液；
- b. 选择 2：质谱检测：pulldown 样品加入 100 μL MS elution buffer， 95°C 摇动孵育洗脱 10 min，在磁力架上收集上清即为洗脱蛋白溶液；

注意事项

- ◆ 每个 DNA pulldown 实验使用 2×10^7 细胞；
- ◆ 探针使用量根据探针长度按照 500ng~1000ng/1000bp；
- ◆ 阴性对照可以是杂文序列的探针、LacZ 探针或无探针；
- ◆ Pulldown 或 NC 组对应的磁珠-探针，在第 1 部分制备完成；
- ◆ 磁珠也可以作为阴性对照组；
- ◆ 每次洗涤需要充分去除洗涤液；
- ◆ MS elution buffer 不含去污剂可以用于质谱分析；
- ◆ 洗脱样品需要加入蛋白质上样缓冲液并经变性后，开展银染或 Western blot 检测。

保存条件

保存条件见产品组成，保质期 12 个月。4~8 $^{\circ}\text{C}$ 运输。

技术支持

本公司产品使用过程中如有任何疑问与建议，欢迎随时与我们联系：

product@tsingke.com.cn

说明书版本号

1.1.1.I401.2507

