

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	20 T	储存
Streptavidin beads	400 μ L	4 $^{\circ}$ C
SA binding buffer	8 mL	4 $^{\circ}$ C
Biotin pulldown buffer	36 mL	4 $^{\circ}$ C
Protease inhibitor	300 μ L	-20 $^{\circ}$ C
Binding enhancer PD	8 mL	4 $^{\circ}$ C
Biotin washing buffer	30 mL	4 $^{\circ}$ C
WB elution buffer	2 mL	4 $^{\circ}$ C
MS elution buffer	2 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<3 h；
- ◆ 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 2 mL 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 ~ 3 mm 探头，600~800 W 功率，冰浴条件下 5 s ON、5 s OFF 超声 15 ~ 30 min；
- 4 $^{\circ}$ C 条件 12000 g 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, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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， $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 500 ng~1000 ng/1000 bp；
- ◆ 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。 $4\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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

