

DNA pull-down assay Kit

DPD 试剂盒说明书

KT104-01 系列：不带阳性对照体系

Cat. No. KT104-0101 (12 rxns)

Cat. No. KT104-0102 (24 rxns)

Cat. No. KT104-0103 (48 rxns)

KT104-02 系列：包含阳性对照体系

Cat. No. KT104-0201 (12 rxns)

Cat. No. KT104-0202 (24 rxns)

Cat. No. KT104-0203 (48 rxns)

按试剂标签提示分开储存

For research use only, not intended for diagnostic testing.

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。

试剂盒包装组分:

表 1 KT104-01 试剂盒包装组分信息

室温保存试剂				
编号	试剂	数量(12 rxns)	数量(24 rxns)	数量(48 rxns)
SCDPD-1	Cell lysis buffer	10mL	20mL	40mL
SCDPD-2	Binding buffer	65mL	130mL	260mL
SCDPD-3	Wash buffer	150mL	300mL	600mL
4°C 保存试剂				
SCDPD-4	SA-链霉亲和素磁珠	650uL	1.3mL	2.6mL
-20°C 保存试剂				
SCDPD-5	蛋白酶抑制剂	120uL	240uL	480uL
SCDPD-6	PMSF	150uL	230uL	280uL
SCDPD-7	5x SDS Loading buffer	150uL	300uL	600uL

表 1 KT104-02 阳性试剂盒包装组分信息

室温保存试剂				
编号	试剂	数量(12 rxns)	数量(24 rxns)	数量(48 rxns)
SCDPD-1	Cell lysis buffer	10mL	20mL	40mL
SCDPD-2	Binding buffer	65mL	130mL	260mL
SCDPD-3	Wash buffer	150mL	300mL	600mL
4°C 保存试剂				
SCDPD-4	SA-链霉亲和素磁珠	650uL	1.3mL	2.6mL
-20°C 保存试剂				
SCDPD-5	蛋白酶抑制剂	120uL	240uL	480uL
SCDPD-6	PMSF	150uL	230uL	280uL
SCDPD-7	5x SDS Loading buffer	150uL	300uL	600uL
阳性对照体系: (-20°C保存)				
SCDPD-8	阳性对照探针 TATA-biotin	2ug	4ug	8ug
SCDPD-9	阴性对照探针 TATA-unbiotin	2ug	4ug	8ug
SCDPD-10	抗体 TBP (兔)	10uL, 足够检	20uL, 足够检	40uL, 足够检

	抗, CST, 44059S)	测 4-5 个 WB	测 8-10 个 WB	测 18-20 个 WB
--	-----------------	------------	-------------	--------------

注：对照组与实验组消耗试剂量相同，一次实验含 Input 组、目的探针组、阴性对照组，要消耗 2 rxns 试剂量。

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)。

探针序列：GTCACGTCACCAACTTGTCTTCTATAAAAGTATAAAAGTATAAAAGGAGCCACATCTCCACGAGAA

实验前准备

细胞准备

A 动物组织处理：

细胞量：约 $1-2 \times 10^7$ 个

动物组织经过组织匀浆或液氮研磨后，去除大颗粒组织后用 PBS 重悬细胞，清洗 2-3 次，3000rpm 离心 3min，去除上清后 -80°C 保存或继续进行实验。

注：尽量将上清液彻底吸干再保存。

B 动悬浮细胞交联：

细胞量：约 $1-2 \times 10^7$ 个

悬浮细胞培养之后连同培养液收集到离心管中，3000rpm 离心收集细胞沉淀；细胞沉淀用 PBS 重悬再离心去上清，重复清洗细胞 3 次，去除上清后 -80°C 保存或继续进行实验。

注：尽量将上清液彻底吸干再保存。

C 贴壁细胞交联：

细胞量：约 $1-2 \times 10^7$ 个

贴壁细胞培养好后，用胰酶消化或者细胞刮刮下转移到离心管中，3000rpm 离心收集细胞沉淀；细胞沉淀用 PBS 重悬再离心去上清，重复清洗细胞 3 次，去除上清后 -80°C 保存或继续进行实验。

注：尽量将上清液彻底吸干再保存。

探针制备

目的探针为目的基因片段生物素标记的 DNA，阴性对照为相同基因片段非标记的 DNA，一般为基因启动子区 2000bp 左右片段。

（赛诚生物提供探针制备服务，如有需要欢迎咨询）

需要的额外材料：

生物素标记 DNA 探针和非标记的 DNA 探针

针旋转仪

磁力架 （赛诚有售，如有需要欢迎咨询）

Western blotting 试剂耗材

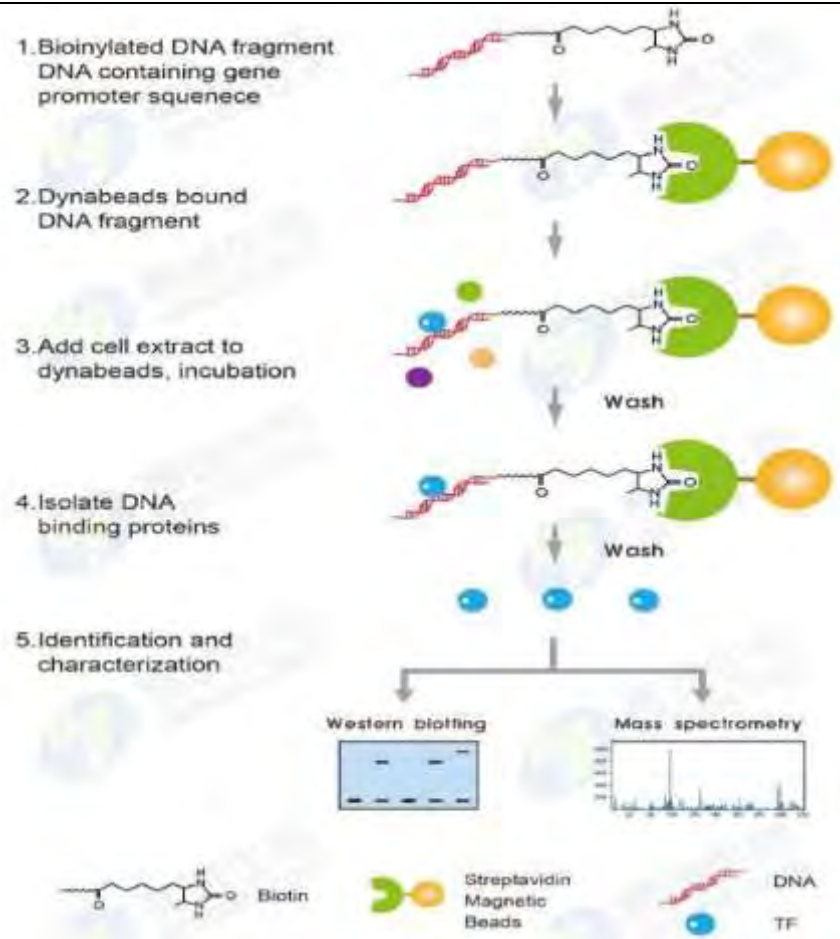
化学发光底物

电泳仪等

银染试剂

实验过程摘要：

如图所示，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。



DNA pull-down 实验步骤

A、裂解细胞

细胞量：约 $1-2 \times 10^7$ 个

1. 细胞沉淀加入 1mL Cell lysis buffer (SCDPD-1)，使用前每 mL 裂解液加入 10uL 蛋白酶抑制剂 (SCDPD-5) 和 12uL PMSF (SCDPD-6)，吹打均匀后于 4℃ 冰箱翻转裂解 1-2h。

注：1mL 的细胞裂解液足够一次实验的 input，目的组（或阳性对照组），阴性对照组，即两个反应的量。

2. 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 (SCDPD-4)；

注：不要冷冻或干燥磁珠，冷冻或干燥将导致珠子聚集并失去结合活性。

2. 标记实验所需的无 RNA 酶 1.5ml EP 管，包括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（分组：input，TATA-biotin，TATA-unbiotin）

注：input 组不加探针和磁珠。

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 (SCDPD-2)，涡旋振荡 10s 清洗磁珠，短暂离心后置于磁力架上，待液体澄清，去上清；

5. 重复清洗磁珠 2 次，去上清；

6. 用 500uL 的 Binding Buffer (SCDPD-2) 重悬磁珠，加入 500ng-2ug 探针于相应 EP 管中，beads 组不加探针；

注：探针用量建议根据探针长度确定，一般 1000bp 探针用量为 1ug 左右，其他长度按比例适当增减。阳性对照体系探针建议使用 200ng-300ng 每个反应。

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 (SCDPD-2) 清洗磁珠 1 次，然后依次加入 1 mL Binding buffer (SCDPD-2)；

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 (SCDPD-3)，涡旋振荡 10S 清洗磁珠，短暂离心后置于磁力架上，待液体澄清，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

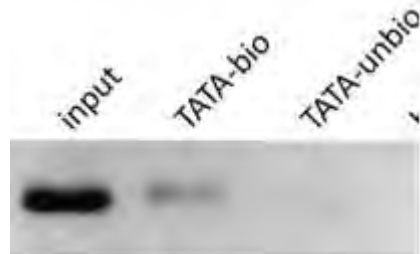
1. 于每组（包括 input 组和 beads 组）中分别加入 30-40uL wash buffer (SCDPD-3) 和 10uL 5xLoading buffer (SCDPD-7) 于 100℃煮 10min，短暂离心后置于磁力架上，取上清至新的 EP 管中，即为 DNA pull-down 产物。

2. 获得的产物可直接用于银染检测或质谱检测或 WB 检测。一般各取 10uL 进行上样跑胶银染。

结果示例：

阳性体系 WB 检测：

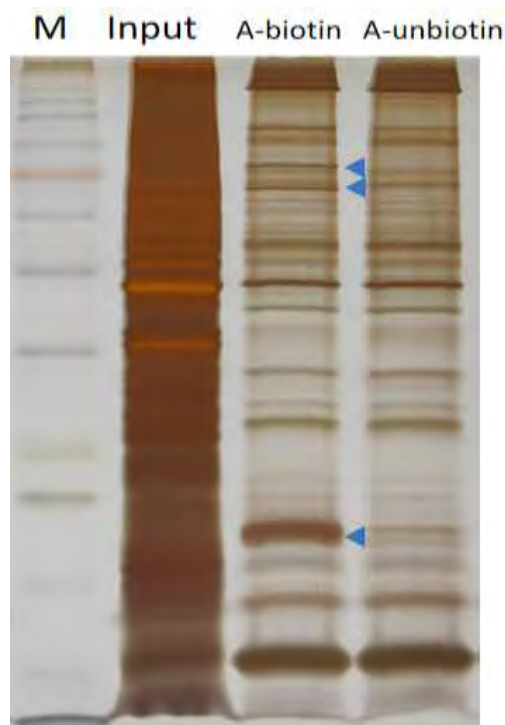
WB 检测 TATA-box 与 TBP 蛋白是否结合，用带生物素标记的 TATA-box 能富集 TBP；用非生物素标记的 TATA-box 不会富集 TBP。



抗体：TBP

DPD 结果示例：蛋白产物银染结果

通过 DNA pull-down 实验捕获与 gene-A 启动子结合的蛋白质。



银染可以看到明显的蛋白条带，并且目的探针组相对于阴性对照探针组有差异条带，后续可以进行质谱分析 RNA 结合的蛋白，或者进行 WB 检测靶蛋白的结合。