



DNA pull-down Kit for Plant

Catalog#JKR23006P

Instruction Manual (For Two Groups)

Sufficient reagents for 6T assays per kit.
Store at -20&4°C

目录

1. 实验原理	02
2. 实验路线	03
3. 试剂盒组分	04
4. 操作步骤	04
5. 常见问题	06



1. 实验原理

DNA pull down 技术是体外研究DNA与蛋白质互作的有力工具。该技术针对目标区域设计特异性DNA探针并经过脱硫生物素标记，标记后探针可以和偶联在磁珠上的链霉亲和素和素亲和结合，再与总蛋白提取物进行孵育，有互作的蛋白质可以和DNA探针特异性结合，形成磁珠-DNA探针-蛋白复合物，洗涤去除非特异性结合的蛋白质，再经过洗脱得到目的DNA探针-蛋白质复合物，最后通过Western Blot或质谱 (MS) 鉴定蛋白质类型。其原理图如1.1:

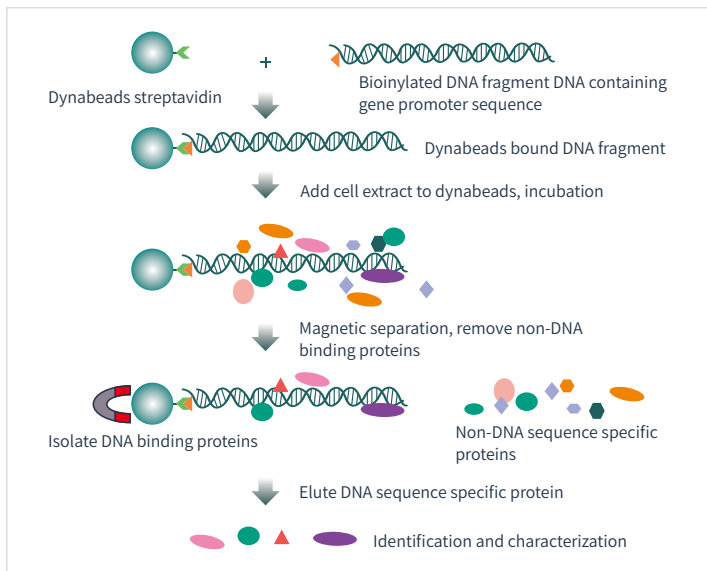
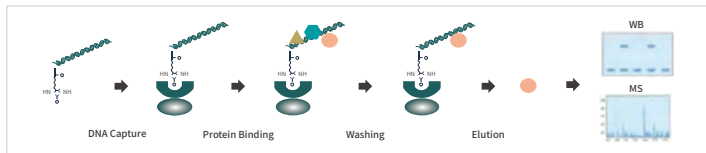


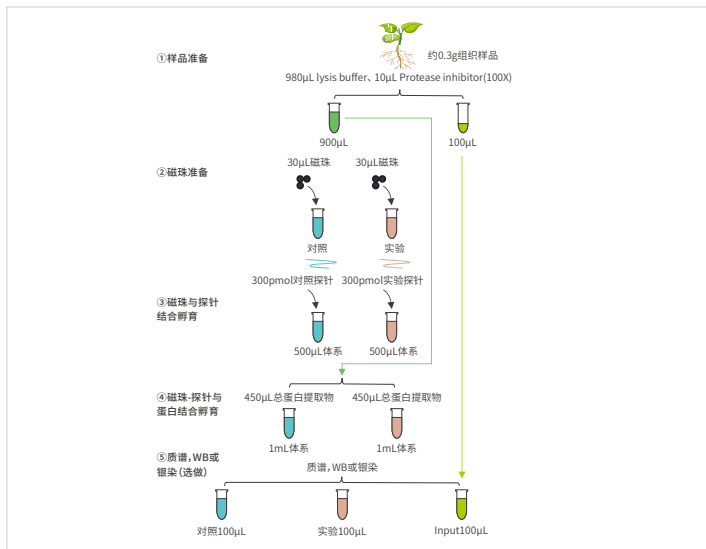
图1.1 DNA pull down 原理图

2. 实验路线

2.1 实验流程图



2.2 对照设置流程图



3. 试剂盒组分

组分	容量(6T)	保存条件
Plant Lysis buffer	9mL	4°C
Plant Protease inhibitor(100X)	35μL	-20°C
Nucleic dilution buffer	30mL	4°C
Protein dilution buffer	45mL	4°C
Nucleic-Acid Compatible Streptavidin Magnetic Beads	200μL	4°C
Elution buffer	800μL	4°C避光

特别提示: 6T为6次单组(1次实验组或1次对照组)免疫沉淀实验,后面的操作步骤中包含了实验组和对照组各1组,需消耗2T试剂。

4. 操作步骤

4.1 总蛋白提取

- ① 取洗净后的植物组织(约0.3g),剪碎后置于灭菌后预冷的研钵中,用液氮研磨至粉状;
- ② 取 980μL Plant Lysis buffer、10 μL Plant Protease inhibitor(100X)混匀作为裂解液,吸取800μL裂解液加入研钵,在冰上继续研磨5-10min至样品成细腻的匀浆状,转移至新的EP管中,再向研钵中加入剩余的190μL裂解液收集残留的样品,同样转移至该EP管;
- ③ 装有样品匀浆的EP管在冰上充分裂解30min,每5min涡旋1次,10s/次;
- ④ 用超声波细胞破碎仪超声12-15min,功率为20%,工作3s,间歇3s,冰浴超声;

- ⑤ 用台式高速冷冻离心机4°C, 12000rpm, 离心10min, 收集上清, 再向上清中加入 Plant Lysis buffer 补充体积至1mL, 混匀。

备注: 蛋白提取整个过程都在冰上操作, 减少高温造成的蛋白降解; 超声过程中最好不要有气泡产生, 减少蛋白降解。裂解后的总蛋白放在-20°C保存。

4.2 磁珠准备及洗涤

- ① 将Nucleic-Acid Compatible Streptavidin Magnetic Beads从4°C冰箱取出, 上下颠倒多次混匀磁珠储存液, 分别取30μL到2个1.5mL Ep管中, 记为对照组和实验组, 置于磁力架上静置1min以分离磁珠, 弃上清;
- ② 对照组和实验组各加入500μL Nucleic dilution buffer, 重悬磁珠, 置于磁力架上1min, 弃上清, 该步骤重复3次。

4.3 磁珠结合DNA

- ① 实验管加入100-300pmol生物素标记的DNA探针, 对照管加等量不带生物素标记的DNA或者不加, 用Nucleic dilution buffer补充体积至500μL, 静音混合仪上室温孵育2h;
- ② 对照管和实验管从静音混合仪中取出, 置于磁力架上静置1min, 弃上清;
- ③ 对照管和实验管各加入500μL Nucleic dilution buffer, 重悬磁珠, 置于磁力架上1min, 弃上清, 该步骤重复3次。

4.4 DNA-磁珠结合蛋白

- ① 对照管和实验管各加入450μL提取的蛋白, 用Protein dilution buffer补充体积至1mL, 静音混合仪上4°C孵育过夜(约16h), 此处预留100μL裂解液作为Input组;
- ② 对照管和实验管从静音混合仪中取出, 置于磁力架上静置1min, 弃上清;
- ③ 加入1mL Protein dilution buffer, 重悬磁珠, 置于磁力架上静置1min, 弃上清, 该步骤重复5次。

4.5 洗脱复合物

- ① 对照管和实验管均加入100 μ L Elution buffer, 混匀后沸水浴8-10min, 置于磁力架上静置2min, 取上清到新的EP管中, 即为pull down产物, 标记为对照组和实验组, 2管各加入20 μ L 6X Loading buffer, 沸水浴8-10min;
- ② 预留Input组的100 μ L裂解液, 也加入20 μ L 6X Loading buffer, 沸水浴8-10min;
- ③ 对照组、实验组和Input均 -20 $^{\circ}$ C保存备用。后续做银染、质谱鉴定或WB检测。

5. 常见问题

Q: 通过pull-down后银染验证发现, 没有想要的目的条带?

- ① 样品被蛋白酶降解, 对应的策略是需要添加蛋白酶抑制剂, 所有操作保持4 $^{\circ}$ C以下冰上操作并防止反复冻融。
- ② 加入生物素标记DNA量不足, 可以增加生物素标记DNA量。
- ③ 裂解液盐碱度太高, 需用低盐碱度的裂解液。
- ④ 加入细胞裂解液不够, 可以增加细胞裂解液的量。

银染受实验本身的灵敏度制约, 即便富集到了目标蛋白, 也不一定在银染中显示出, 银染主要还是起到质控作用, 以评估整个实验操作过程是否异常, 比如富集后总蛋白量的情况, 不能决定最终质谱鉴定的结果, 一般建议以质谱结果为准。



武汉金开瑞生物工程有限公司

WUHAN GENE CREATE BIOLOGICAL ENGINEERING CO., LTD.

地址：湖北省武汉市江夏区神墩五路北武汉生之源股份生物科创产业园

电话：027-87960366

邮箱：marketing@genecreate.com

网址：www.genecreate.cn

