天净沙系列

CAT#:241212

低温运输，-20℃保存

天净沙

蛋白质-DNA Pull-Down 试剂盒（生物素-SA 磁珠法）

PDotein-DNA Pull-Down Kit (Biotin-SA Magnetic Bead Method)

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是基于生物素-SA 磁珠法开发的蛋白质-DNA Pull-Down 试剂盒。它具有以下特点：

1. 即开即用，操作便捷。
2. 本产品提供试剂足够进行 30 次蛋白质-DNA Pull-Down 实验。
3. 磁珠经过优化能更高效的结合 DNA 及其结合蛋白。
4. 兼容性强，收集的产物可以进行后续多种实验。
5. 收集到的 DNA 保持原有的生物活性。
6. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用大扁盒包装

成分	编号	规格	包装
PD Pull-Down 专用裂解液	241212a	20 mL	20 mL 本色瓶
PD Pull-Down 专用磁珠	241212b	1.5 mL	1.5 mL 绿盖管
NT2 缓冲液	6-2245	45 mL	50 mL 本色瓶
PD Pull-Down 专用 DNA 折叠缓冲液	241212c	2 mL	5 mL 本色瓶
PD Pull-Down 专用洗涤液	241212d	100 mL	100 mL 本色瓶
PD Pull-Down 专用蛋白酶抑制剂	241212e	600 μL	1.5 mL 本色管
PD Pull-Down 专用 DNase 抑制剂	241212f	200 μL	0.5 mL 红盖管
PD Pull-Down 专用洗脱液	241212g	2 mL	5 mL 本色瓶
使用手册	241212sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备物品

PBS、DNase-free 水、生物素标记的 DNA 探针、生物素 DNA 标记混合物、磁力架、混匀仪、低温离心机、超声波破碎仪、离心管。

使用方法

一：探针的制备

1. 用自选方法获得带生物素标记的 DNA 探针，如较短可直接合成，如较长可以合成带生物素的引物进行扩增获得。
2. 取 2 μL DNA 检测浓度，取 1~2 μL DNA 进行 2%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量和长度；符合要求的 DNA 置于-20℃保存或直接用于后续实验

二：动物细胞样本裂解

3. 实验组和对照组一共取 2E7~4E7 个细胞，用预冷的 PBS（DNase-free）清洗细胞 2~3 次，每次 4℃ 500×g 离心 5 min 收集沉淀，去除培养基成分。

4. 将样本置于冰上，加入 0.6 mL 预冷的 PD Pull-Down 专用裂解液、6 μL PD Pull-Down 专用蛋白酶抑制剂和 3 μL PD Pull-Down 专用 DNase 抑制剂，吹打混匀。
5. 为了更充分裂解，最好冰上超声至溶液基本澄清，如果无超声条件，也可以置于冰上裂解 30 min，间隔手动混匀。
6. 4℃ 12000×g 离心 15 min，收集上清至新的无 DNase 离心管中。
7. 取 30 μL 作为 input，剩余上清平分为两份用于 DNA pull-down 实验，置于冰上备用或-80℃保存。

三：动物组织样本裂解

8. 采用预冷的 PBS（DNase-free）清洗新鲜组织 2~3 次，彻底去除血液等成分；如果样本为冷冻组织，在取样时也需要进行清洗操作。
9. 实验组和对照组共取 0.2~0.4 g 干净组织，用液氮在研钵中充分研磨，转移粉末至预冷的、新的无 DNase 离心管中。
10. 同 7-9 步。注：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。如果样本中目标蛋白或 DNA 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。

四：磁珠准备

11. 将 PD Pull-Down 专用磁珠上下颠倒混匀，取实验组和对照组一共所需的 80 μL 磁珠到新的无 DNase 离心管中。
12. 加入 1 mL NT2 缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
13. 重复上步操作一次。
14. 加入 400 μL NT2 缓冲液，上下颠倒重悬磁珠，然后将磁珠平分为两组，每组各约 200 μL，转移到新的无 DNase 离心管中，记为实验组和对照组。

五：漂洗液准备

15. 为了防止实验过程中的蛋白和 DNA 降解，需要向漂洗液中添加蛋白酶抑制剂和 DNase 抑制剂。在 10 mL 离心管中加入实验组和对照组总共所需的 5 mL PD Pull-Down 专用洗涤液、25 μL PD Pull-Down 专用蛋白酶抑制剂和 2.5 μL PD Pull-Down 专用 DNase 抑制剂，混合均匀，冰上保存，现配现用。如果有多组样本，请按照实际使用量配置。

六：DNA pull-down

16. 取实验组和对照组 DNA 探针各 3 μg，95℃变性 3 min，冰浴 1 min，短暂

	离心甩下管壁液体，向管中加入 50 μL PD Pull-Down 专用 DNA 折叠缓冲液，室温放置 30 min。 17. 将 DNA 探针分别加入对应步骤四制备的磁珠中，混匀仪上室温孵育 30 min。 18. 放磁力架上静置 1 min 并弃上清。 19. 每组加入 500 μL 步骤五准备的漂洗液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。 20. 重复上步操作一次。 21. 加入相应组别的样本裂解液，混匀仪上 4℃孵育 2~4 h。 22. 放磁力架上静置 1 min 并弃上清。 23. 每组加入 500 μL 漂洗液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 弃上清。 24. 重复上步漂洗操作两次，共漂洗三次，保留磁珠。 **七：蛋白洗脱** 25. 向磁珠中加入 50 μL PD Pull-Down 专用洗脱液，涡旋震荡 20 s，混匀仪上室温洗脱 10~15 min；涡旋震荡 20 s，1000×g 离心 20 s；放磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管，-80℃保存。该洗脱产物适用于后期各种检测，例如质谱、SDS-PAGE 或 Western-blot 等。
关联产品	蛋白质-RNA Pull-Down 试剂盒（生物素-SA 磁珠法）