Waals™ DNA Pull-down Kit, DP01-20T

操作说明

- **描述：**Waals™ DNA Pull-down Kit，包含 Chromatin IP Lysis Buffer， Streptavidin Magnetic Beads, DNA-Protein Binding Buffer, 0.1 M DTT, Low Salt Wash Buffer, LiCl Wash Buffer。试剂盒各提供 20 次反应的试剂。
- **试剂盒储存：**Waals™ DNA Pull-down Kit，4℃储存（勿冷冻）。
- **介　绍**

Waals™ DNA Pull-down Kit 提供链霉亲和素磁珠及 DNA pull-down 相关试剂。客户需自备生物素标记的 DNA。生物素标记的 DNA 与样品蛋白孵育形成 DNA-蛋白复合物，通过磁珠分离可高效富集与目的 DNA 相互作用的蛋白。通过变性洗脱后可进行银染、质谱、免疫印迹等分析。

操作流程

- **细胞裂解**

1. 约 1 × 10^7 个细胞用于 DNA pull-down 实验。
2. 弃掉培养皿中的培养基，用预冷的 PBS 润洗细胞，弃掉上清液。
3. 加入 10 mL 预冷的 PBS，将细胞刮下并转移至新的 15 mL 离心管中。
4. 1000 × g，4℃，离心 5 分钟。
5. 弃掉上清液，加入 Chromatin IP Lysis Buffer（1 mL per 1 × 10^7 个细胞）【注】使用前加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂，混匀，冰上反应 10 分钟。

- **超声法处理细胞沉淀**

1. 超声处理细胞沉淀，破碎细胞核。将离心管至于冰水混合物中进行超声，超声探头置于液体中心。【注】可使用 3mm 的探头，设置最大超声功率的 30 - 40%（约 300W），每次超声时间 20 秒，休息 40 秒，共计 10-20 次（时间和次数可根据实际情况调整，但应避免样品过热）。另外，可用光学显微镜观察细胞核的破碎情况。
2. 8000 × g，4℃，离心 10 分钟。将上清液转移至新的离心管中，即获得 Lysates，可置于-80℃保存。

■ **DNA Pull-down**

1. 用 Waals™ DNA Pull-down Kit 提供的试剂按下表配制 **DNA Pull-down Mix**:

试剂名称	体积 (μL)	终浓度
DNA-Protein Binding Buffer	300	-
0.1 M DTT	5	1 μM
Biotin-labeled DNA	5 pmol	-
Lysates	100 – 150 (μg)	-
用 DNA-Protein Binding Buffer 补足至	500 μL	

2. 将 **DNA Pull-down Mix** 在 4℃旋转孵育 2-4 小时。

■ **磁珠准备**

1. 重悬磁珠，吸取 50μL 至无酶离心管中。
2. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
3. 用 100μL DNA-Protein Binding Buffer 重悬磁珠。
4. 重复步骤 2 和 3，2 次。
5. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
6. 将已孵育的 **DNA Pull-down Mix** 加入离心管中，温和重悬。
7. 4℃**旋转**反应 2-4 小时。
8. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
9. 加入 1mL Low Salt Wash Buffer 温和重悬磁珠，在 4℃旋转孵育 5 分钟。
10. 重复步骤 8 和 9，3 次【注】洗涤次数可根据实际情况增加或减少。
11. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
12. 加入 1mL LiCl Wash Buffer，温和重悬磁珠。
13. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠。【注】上清液可用于分析未结合的样品是否被洗净。

■ **蛋白分离**

1) 加入 20-50μL 1 × protein SDS-PAGE Loading Buffer 于离心管中，混匀，95℃加热 10 分钟。
2) 将离心管置于磁分离器上，收集上清至新的离心管，-20℃保存。
3) 免疫印迹、银染、质谱等检测。