

凋亡 DNA Ladder 快速提取试剂盒 (Apoptosis DNA Ladder Kit)

目录号: ZP324

试剂盒内容:

试剂盒组成	ZP324-01 (50 次)	ZP324-02 (100 次)
10×红细胞裂解液	20ml	40ml
缓冲液 AE	15 ml	30 ml
缓冲液 B	15 ml	30 ml
缓冲液 C	30 ml	60ml
漂洗液 W2	15 ml	2×15 ml
洗脱缓冲液 TE	15 ml	30 ml
蛋白酶 K	0.5ml	1 ml
RNase A	0.3ml	0.6ml
吸附柱	50 个	100 个
收集管 (2 ml)	50 个	100 个
说明书	1 份	1 份

储存条件:

该试剂盒置于室温 (15-25°C) 干燥条件下可保存 12 个月;更长时间的保存可置于 2-8°C。

产品简介:

细胞发生凋亡时,染色质 DNA 在核小体之间发生断裂,最终形成 200bp 整数倍的 DNA 片段,这些 DNA 片段被提取后,经电泳及溴化乙锭染色后形成梯子状外观,谓之 DNA Ladder。血液和组织培养细胞在裂解后,释放出来的 DNA 片段在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜,再通过一系列快速的漂洗-离心的步骤,将盐、细胞代谢物、蛋白等杂质去除,最后低盐的洗脱缓冲液将 DNA Ladder 片段从硅基质膜上洗脱。

产品特点:

简单快速:一小时内即可获得 DNA Ladder。

广泛:适用于血液、多种动物细胞和动物组织等。

超纯:获得的 DNA 纯度高,可直接用于 PCR、酶切、杂交等分子生物学实验。

注意事项:请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 样品应避免反复冻融,否则会导致提取的 DNA 片段较小且提取量也下降。
2. 若缓冲液 A 或缓冲液 B 中有沉淀,可在 56°C 水浴中重新溶解,摇匀后使用。
3. 所有离心步骤均为使用台式离心机,室温下离心。
4. 一般 2×10^6 培养细胞 DNA 产量为 5-15 μ g, 200 μ l 人全血典型产量为 3-6 μ g。
5. 一般电泳检测时典型上样量为 2-3 μ g 纯化的 DNA,如果凋亡率低,有可能只见到基因组 DNA,而见不到 DNA ladder,可以试试加大上样量。

操作步骤：

1. 处理材料：

- a. 如提取材料为血液：可处理新鲜、冷冻或加入各种抗凝剂的血液，200 μ l-400 μ l 血液。在样品中加入 3 倍体积红细胞裂解液（例如，300 μ l 血液加入 900 μ l 红细胞裂解液），颠倒混匀，室温放置 5 分钟，期间再颠倒混匀几次。10000rpm(\sim 11,500 \times g)离心 1 分钟（若离心机最高转速不允许，可 3000rpm(\sim 3,400 \times g)离心 5min），吸去上清，留下白细胞沉淀，加 250 μ l 缓冲液 AE，振荡至彻底混匀。

注意：10 \times 红细胞裂解液稀释为 1 \times 的使用。

- b. 细胞样品：取 2×10^6 个细胞（悬浮细胞或者组织培养细胞重悬在 200 μ l PBS 中），然后 10,000 rpm(\sim 11,200 \times g)离心 1 分钟，倒尽上清，利用残留的几微升 PBS 液体，涡旋仪上振荡 5 秒分散细胞，以利于被裂解。加 250 μ l 缓冲液 AE，振荡至彻底悬浮；

- c. 组织样品：取 10-25mg 组织，加入到 250 缓冲液 AE，研磨棒研磨或匀浆器研磨至无大的团块即可。

2. 去除 RNA：加入 4 μ l RNase A，漩涡振荡 10 秒，室温放置 5 分钟。

3. 加入 10 μ l 蛋白酶 K 溶液，混匀。充分轻轻上下振荡混匀，56 $^{\circ}$ C 放置 15 分钟。

4. 加入 250 μ l 缓冲液 B，充分振荡混匀 2-5 秒。

注意：加入缓冲液 B 时可能会产生白色沉淀，属正常现象。

加入 250 μ l 无水乙醇，充分振荡混匀 15 秒，此时可能会出现絮状沉淀，简短离心以去除管盖内壁的水珠。

5. 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱中（吸附柱放入收集管中），12,000 rpm (\sim 13,400 \times g)离心 30 秒，倒掉废液，将吸附柱放回收集管中。

6. 向吸附柱中加入 500 μ l 缓冲液 C，12,000 rpm (\sim 13,400 \times g)离心 30 秒，倒掉废液，将吸附柱放入收集管中。

7. 向吸附柱中加入 600 μ l 漂洗液 W2（**使用前请先检查是否已加入无水乙醇**），12,000 rpm (\sim 13,400 \times g)离心 30 秒，倒掉废液，将吸附柱放入收集管中。重复此步骤一次。

8. 将吸附柱放回收集管中，12,000 rpm(\sim 13,400 \times g)离心 2 分钟，倒掉废液。将吸附柱置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR 等）实验。

9. 将吸附柱转入一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 80-200 μ l 洗脱缓冲液 TE，室温放置 2-5 分钟，12,000 rpm (\sim 13,400 \times g)离心 2 分钟，将溶液收集到离心管中。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于 80 μ l，体积过小影响回收效率。为增加基因组 DNA 的得率，可将离心得到的溶液再加入吸附柱中，室温放置 2 分钟，12,000 rpm (\sim 13,400 \times g)离心 2 分钟。DNA 产物应保存在 -20 $^{\circ}$ C，以防 DNA 降解。

问题与解决方法：

问题	评论与建议
没有 DNALadder 条带，只见到未凋亡细胞的基因组条带	*细胞未凋亡或者凋亡细胞率太低- 建议 ：提高凋亡剂的浓度或者延长凋亡诱导时间
未见到 DNALadder 条带，也未见到非凋亡细胞的基因组条带	*分离的 DNA 产量太低- 建议 ：加大起始细胞处理量，按比例扩大试剂使用量。确保做了步骤 9，以免乙醇残留降低洗脱效率。 *样品本身含有 DNA 量少（如人全血），电泳上样量太低，- 建议 ：可以加大洗脱下来纯化 DNA 的电泳上样量。
DNA 弥散，未见 Ladder	*凋亡晚期，非特异的剪切 DNA 所致- 建议 ：在凋亡较早时期时提取 DNA Ladder（或者做多个不同时期动态连续检测）。
背景高，DNA Ladder 弱或者不明显	*RNA 污染太多，影响了观测- 建议 ：将洗脱的纯化 DNA 加入 DNase free 的 RNase 至终浓度 2 μ g/ml，室温（15 $^{\circ}$ C-20 $^{\circ}$ C）放置 20 分钟降解污染的 RNA。此外，正常细胞含有更多的 RNA，凋亡细胞比例过低时易残留更多 RNA，因此 RNA 残留较多，往往提示凋亡细胞比例过低，可以根据实际情况调整诱导条件。