



选择性凋亡 DNA Ladder 抽提试剂盒

(离心柱型)

目录号: ZP325

试剂盒内容:

试剂盒组成	ZP325-01 (50 次)	ZP325-02 (100 次)
Extraction buffer	10 ml	20ml
10% SDS	1 ml	2ml
Enzyme A	1 ml	2 ml
Enzyme B	1 ml	2ml
Precipitant	7 ml	14ml
说明书	1 份	1 份

注意事项:

为保持活性方便运输, Enzyme B 客户收到时为冻干粉, 收到后加 500 μ l 灭菌水(25 次) 或者 1ml 灭菌水(50 次) 溶解后 - 20 $^{\circ}$ C 保存。Enzyme A 和 Enzyme B 为酶溶液, 应该避免反复冻融降低活性, 如果要分多次使用, 最好按照每次使用量分装后 - 20 $^{\circ}$ C 保存。

产品介绍:

凋亡(apoptosis)或程序性死亡的细胞一个形态学的显著特点是染色体DNA以核小体为单位(185 bp) 规律断裂形成长度约为 $n \times 185\text{bp}$ ($n=1,2,3,4\dots$) 的DNA片段, 经琼脂糖凝胶电泳显示为阶梯状凋亡DNA Ladder, 是凋亡细胞最直观的特征。本试剂盒选择性从组织和细胞中分离提取凋亡DNA ladder, 通过选择性分离基因组DNA与凋亡DNA ladder, 最大限度的减少了基因组DNA对凋亡DNA ladder的观察干扰, 因此显著的提高了检测敏感度, 反应可在微量离心管进行, 2.5小时完成, 快速方便; 无需有机抽提, 检测灵敏度极高, 可从约2000个凋亡细胞中检测到DNA ladder。推荐起始细胞量为 $5 \sim 10 \times 10^5$ 个, 但投入的细胞量可在 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 之间变化。原则是总细胞中应含有至少约 $1 \sim 2 \times 10^4$ 个凋亡细胞。多于 2×10^4 个凋亡细胞通常可获得十分清晰的凋亡DNA ladder。本试剂盒也可用于从组织中提取凋亡DNA ladder。但与培养细胞相比, 整体动物组织凋亡细胞出现的时间、部位、程度等规律性差往往造成难以准确取材, 可能显著影响实验结果。但只要组织确实发生凋亡, 有经验的用户也可以使用本试剂盒从组织提取凋亡DNA ladder (参见说明4)。

产品说明:

1. 溴化乙锭染色过度将降低DNA条带检测灵敏度, 可用水冲洗凝胶10~30分钟。如冲洗过头可再用溴化乙锭复染。可用更灵敏的DNA染色剂SYBR Green。也可进行丙烯酰胺DNA凝胶电泳和DNA银染。
2. 对细胞进行干预处理后, 凋亡可能仅在某一时间点或某一干预强度下最为明显。需要进行预试验确定最佳干预时间或强度。此时也可用凋亡小体/hoeschst染色试剂盒(ZP326)快速染色凋亡小体观察。
3. 推荐起始细胞量为 $5 \sim 10 \times 10^5$ 个, 但投入的细胞量可在 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 之间变化。原则是总细胞中应含有至少约 $1 \sim 2 \times 10^4$ 个凋亡细胞。多于 2×10^4 个凋亡细胞通常可获得十分清晰的凋亡DNA ladder。六孔板的一个孔相当于一个35 mm培养皿长满后可得到 $1 \sim 10 \times 10^5$ 个细胞, 如果细胞凋亡发生率为10%, 经过处理可得到约 $1 \sim 10 \times 10^4$ 个凋亡细胞, 应该足以获得清晰的凋亡DNA ladder。反之如果不能从 $>3 \times 10^6$ 个细胞获得清晰的凋亡DNA ladder, 表明其中凋亡细胞少于1%。此时增加细胞用量也难已奏效。
4. 从组织块提取凋亡DNA ladder。取10~20 mg组织块放入小玻璃匀浆器, 加100~200 μ l Extraction buffer, 上下手动匀浆15~20次。取出匀浆液, 冰上5~10 min。振荡10秒。4500 rpm 10分钟收集上清液并转移到新1.5ml离心管, 执行提取步骤3。另外一种方法是将30~50mg组织剪碎后在PBS里面匀浆, 制成细胞悬液, 离心收集细胞后接步骤2继续执行提取。
5. 采用高质量琼脂糖, 使用宽度较小和厚度较窄的样品梳子, 制作较薄的琼脂糖凝胶(厚度约2~4 mm); 用较低的电压进行慢速电泳, 将显著增加凋亡DNA条带检测灵敏度。电泳距离不要过长, 否则将使小的凋亡DNA条带弥散而降低分辨率。

操作步骤:

1. 用PBS漂洗细胞两遍后微型离心机500 \times g 4°C 5 min收集 $5 \sim 10 \times 10^5$ 个细胞(最好同时做一个未凋亡细胞的对照)。小心用移液枪吸弃上清, 除尽管壁附着液体。
2. 将离心管底部的细胞沉淀用手指轻轻弹松打散后, 加入100 μ l的Extraction buffer, 用振荡器激烈混合10秒钟后, 1,100~1,600 \times g(约3500~4500 rpm)离心5分钟。
3. 勿触动管底沉淀, 将上清液转移到新的1.5ml离心管。
4. 沉淀按操作2.方法再重复一次。
5. 把上清液与操作3.的上清液合并于一起共约200 μ l, 作为粗提取液(含有凋亡DNA片段, 未凋亡染色体DNA已经通过沉淀去除)。
6. 向粗提取液中加入10% SDS 溶液 20 μ l后, 再加入Enzyme A 20 μ l, 混匀, 56°C温育1小时。
7. 向上述混合液中加入Enzyme B 20 μ l, 混匀, 37°C温育1小时, 或者直到变得透亮(可过夜)。
8. 向上述混合液中加入Precipitant 130 μ l后, 颠倒混匀, 再加入0.95 ml的乙醇, 混匀后-20°C放置1小时以上(沉淀凋亡DNA片段)。
9. 至少13000rpm 4°C离心15min, 弃上清, 加1ml 70%乙醇漂洗一遍后离心, 倒去乙醇, 并且尽量吸除管壁附着液体。敞开管口, 室温晾干沉淀。
10. 用17 μ l双蒸水或TE Buffer充分溶解沉淀, 加3 μ l 6 \times DNA凝胶上样缓冲液震荡混匀。取全部20 μ l 上样进行1% agarose gels电泳。溴化乙锭染色, 紫外观察照相(凋亡发生率较低时, 添加过量TE Buffer溶解沉淀有可能导致浓度太稀, 无法检出DNA Ladder, 因此可减少用量, 反之, 可增加)。