



北京艾德莱生物科技有限公司

Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

- ◆ 选择性凋亡**DNA Ladder**抽提试剂盒
  - ◆ 目录号 **DN17**
  - ◆ 使用手册
  - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	25 次	50 次
<b>Extraction buffer</b>	<b>4 °C</b>	<b>5 ml</b>	<b>10 ml</b>
<b>10% SDS</b>	<b>室温</b>	<b>500µl</b>	<b>1 ml</b>
<b>Enzyme A</b>	<b>-20 °C</b>	<b>500µl</b>	<b>1 ml</b>
<b>Enzyme B</b>	<b>-20 °C</b>	<b>500µl</b>	<b>1 ml</b>
<b>Precipitant</b>	<b>4 °C</b>	<b>3.5 ml</b>	<b>7 ml</b>

**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 500µl 灭菌水（25 次）或者 1ml 灭菌水（50 次）溶解后 -20 °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 °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，因此显著的提高检测灵敏度，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 $2 \times 10^4$ 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(DN1801)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 $2 \times 10^4$  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  $\mu$ 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。电泳距离不要太长, 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 $500 \times g$   $4^{\circ}\text{C}$  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 $\mu\text{l}$ 的Extraction buffer，用振荡器激烈混合10秒钟后， $1,100 \sim 1,600 \text{ xg}$  (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 $\mu\text{l}$ ，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 $\mu\text{l}$ 后，再加入Enzyme A 20 $\mu\text{l}$ ，混匀， $56^{\circ}\text{C}$ 温育1小时。
  7. 向上述混合液中加入Enzyme B 20 $\mu\text{l}$ ，混匀， $37^{\circ}\text{C}$ 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 $\mu\text{l}$ 后，颠倒混匀，再加入1 ml的乙醇，混匀后 $-20^{\circ}\text{C}$ 放置1小时以上（沉淀凋亡DNA片段）。
  9. 至少13000rpm  $4^{\circ}\text{C}$ 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 $\mu\text{l}$ 双蒸水或TE Buffer充分溶解沉淀，加3 $\mu\text{l}$  6 x DNA凝胶上样缓冲液震荡混匀。取全部20 $\mu\text{l}$  上样或者适量上样进行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溶解沉淀有可能会由于浓度太稀，无法检出DNA Ladder，因此可减少用量，反之，可增加）。