



北京博凌科为生物科技有限公司

Beijing BLKW Biotechnology Co., Ltd.

Tel: 010-57158602/52872342/80773165 (Fax)

[Http://www.blkwbio.com/](http://www.blkwbio.com/)

E-mail: blkwbio@blkwbio.com

- ◆ 凋亡DNA Ladder快速提取试剂盒
- ◆ 目录号1416
- ◆ 使用手册
- ◆ 实验室使用，仅用于体外

凋亡 DNA Ladder 快速提取试剂盒

目录号: 1416

目录编号	包装单位
141601	20次
141602	50次

❖ 适用范围:

适用于快速提取凋亡DNA Ladder

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	20 次	50 次
裂解/结合液 CB	室温	6 ml	15 ml
漂洗液 WB	室温	6 ml	15 ml
		<i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>	
洗脱缓冲液 EB	室温	15ml	15 ml
吸附柱 AC	室温	20 个	50 个
收集管 (2ml)	室温	20 个	50 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项：

1. 裂解/结合液 CB 低温时可能出现析出和沉淀，可以在 37℃ 水浴几分钟帮助重新溶解，**恢复澄清透明后冷却到室温**即可使用。
2. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。



❖ **产品介绍：**

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/结合液中裂解后，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：**

1. 不需要使用有毒的苯酚等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 本公司独有的裂解/结合液配方有效裂解细胞，使用本试剂盒不需要加入昂贵的蛋白酶 K 处理，大大降低了使用成本和加快了处理速度。
3. 节省时间，简捷，单个样品操作一般可在 10 分钟内完成。





❖ **注意事项：**

1. **所有的离心步骤均在室温完成**，使用转速可以达到13,000rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 开始实验前将需要的水浴先预热到 70℃ 备用。
3. 裂解/结合液 CB 含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，**避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**
4. 一般 2×10^6 培养细胞 DNA 产量为 10-20 μg ，200 μl 人全血典型产量为 3-6 μg 。
5. 一般电泳检测时典型上样量为 2-3 μg 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：**（实验前请先阅读注意事项）


提示： 第一次使用前请先在漂洗液 WB 中加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！

1. 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）或者 200 μ l 全血（大约含有 2×10^6 个细胞）加入 200 μ l 裂解/结合液 CB，立刻涡旋振荡充分混匀。

可选做步骤： 如果 RNA 残留较多，影响凋亡 DNA ladder 的观察，可以在加入 200 μ l 裂解/结合液 CB 前加 20 μ l RNase A (25mg/ml) 溶液，振荡混匀，室温放置 5-10 分钟。

细胞或者全血处理起始量最大可达 300 μ l，如果起始量介于 200 μ l-300 μ l 之间，则需要按比例相应提高后面使用试剂量。

2. 室温（15 $^{\circ}$ C-20 $^{\circ}$ C）放置 10 分钟。
3. 加入 100 μ l 异丙醇，立刻涡旋振荡充分混匀，此时可能会出现絮状沉淀。
上述步骤中适当力度充分混匀非常重要，混匀不充分严重降低产量。如果样品粘稠不易混匀，则可以涡旋振荡 15 秒。
4. 将上一步混合物（包括可能有的沉淀）加入一个吸附柱 AC 中，（吸附柱放入收集管中）13,000rpm 离心 30 秒，倒掉收集管中的废液。
5. 加入 700 μ l 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
6. 加入 500 μ l 漂洗液 WB，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
7. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，13,000rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇影响洗脱效率和下游反应。

-
- 
8. 取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，在**吸附膜的中间部位**加 100 μ l 洗脱缓冲液 EB(洗脱缓冲液事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中预热)，室温放置 3-5 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。

洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要 DNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于 50 μ l，体积过小降低 DNA 洗脱效率，减少 DNA 产量。

9. DNA 可以直接使用或者存放在 -20 $^{\circ}$ C，但是不要超过 14 天。
10. 取大约 2-3 μ g 纯化的 DNA 电泳检测（注意 200 μ l 人全血典型产量只有 3-6 μ g）。



❖ **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 7, 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。