



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

- ◆ 选择性凋亡DNA Ladder抽提试剂盒
- ◆ 目录号 1417
- ◆ 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 (141701)	50 次 (141702)
Extraction buffer	4 °C	5 ml	10 ml
10% SDS	室温	500 μ l	1 ml
Enzyme A	-20 °C	500 μ l	1 ml
Enzyme B	-20 °C	500 μ l	1 ml
Precipitant	4 °C	3.5 ml	7 ml

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 °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(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 2×10^4 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 ×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 μl的Extraction buffer，用振荡器激烈混合10秒钟后，1,100~1,600 ×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 μl，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 μl后，再加入Enzyme A 20 μl，混匀，56°C温育1小时。
7. 向上述混合液中加入Enzyme B 20 μl，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 μl后，颠倒混匀，再加入1 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 μl双蒸水或TE Buffer充分溶解沉淀，加3 μl 6 × DNA凝胶上样缓冲液震荡混匀。取全部20 μl 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）。