

AipBest 选择性凋亡 DNA Ladder 抽提试剂盒(溶液型)

AipBest Selective Apoptosis DNA Ladder Extraction Kit(Solution Type)

使用说明书

◆目录号：AD202

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	25 次 (AD202-01)	50 次 (AD202-02)
Extraction Buffer	4°C	5mL	10mL
10% SDS	室温	500μL	1mL
Enzyme A	-20°C	500μL	1mL
Enzyme B	-20°C	500μL	1mL
Precipitant	4°C	3.5mL	7mL

◆产品储存：按试剂盒各组分保存，保质期一年。

◆储存事项：为保持活性方便运输，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 (AD203)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 35mm 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 10~20mg 组织块放入小玻璃匀浆器,加 100~200 μ L 的 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。4500rpm 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 2~4mm);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°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, $1,100\sim 1,600\times g$ (约 3500~4500rpm)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 20 μ L 的 Enzyme A,混匀, 56°C 温育 1 小时。

7. 向上述混合液中加入 20 μ L 的 Enzyme B，混匀,37 $^{\circ}$ 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 130 μ L 的 Precipitant 后，颠倒混匀，再加入 1mL 的乙醇，混匀后—20 $^{\circ}$ C放置 1 小时以上(沉淀凋亡 DNA 片段)。
9. 至少 13,000rpm、4 $^{\circ}$ C 离心 15min，弃上清，加 1mL 的 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 的双蒸水或 TE Buffer 充分溶解沉淀，加 3 μ L 的 6x DNA 凝胶上样缓冲液震荡混匀。取全部 20 μ 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 溶解沉淀有可能会致浓度太稀，无法检出 DNA Ladder，因此可减少用量，反之，可增加)。

=====

