



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

细胞凋亡—DNA Ladder 抽提试剂盒(离心柱式)

产品编号	产品名称	包装
R33009-50T	细胞凋亡—DNA Ladder 抽提试剂盒(离心柱式)	50T

产品简介:

源叶的细胞凋亡—DNA Ladder 抽提试剂盒(离心柱式)(Apoptosis, DNA Ladder Extraction Kit with Spin Column)是目前最先进的 DNA Ladder 抽提试剂盒之一。本试剂盒是针对细胞凋亡过程中产生的核小体间 DNA 链断裂而设计的。可以非常有效地抽提最小片段为 180-200bp 的 DNA ladder, 同时又可以抽提到最大 50kb 左右的基因组 DNA。

DNA ladder 也称 DNA fragmentation, 是细胞凋亡的一个重要指标。通常观察到 DNA ladder, 就可以判定细胞发生了凋亡。

样品首先被蛋白酶 K 消化, 随后加入适合 DNA 结合到纯化柱上的缓冲液, 然后加入到纯化柱内。通过高速离心, 使 DNA 在穿过纯化柱的瞬间, 结合到纯化柱上, 随后通过两次洗涤去除各种杂质, 最后通过洗脱液把 DNA 洗脱下来。整个过程无需酚氯仿抽提, 无需酒精沉淀, 样品裂解后仅需约 15 分钟即可完成。

通过 DNA 纯化柱方式抽提 DNA ladder 比用传统的酚氯仿抽提酒精沉淀方法更加便捷, 小片段 DNA 不容易损失。

本试剂盒每次最多可以抽提 20mg 组织或 200-350 万个培养细胞。样品用量过多, 反而会影响抽提效果。

试剂盒提供了 RNase A, 可以获得不含 RNA 的高纯度总 DNA, 排除了 RNA 对 DNA ladder 观察造成的干扰。

纯化柱对于 DNA 的最大容量约为 30 微克。通常每 200 万 HeLa 细胞或 500 万淋巴细胞可以抽提得到 15-25 微克总 DNA, 每 25mg 肝、脑、肾组织可以抽提得到 10-30 微克总 DNA, 每 25 毫克心、肺组织可以抽提得到 5-10 微克总 DNA, 每 10mg 脾组织可以抽提得到 5-30 微克总 DNA。样品的用量请勿超过纯



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

化柱的容量, 样品用量最好能保持在纯化柱容量的 70%或以下。当然过少的样品也不利于检测到 DNA ladder。

对于培养细胞的凋亡检测, 通常 6 孔板一个孔的细胞就足够用于 DNA ladder 的抽提和检测。

本试剂盒可以抽提 50 个样品。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
R33009-50T	样品裂解液 A	10ml
	样品裂解液 B	11ml
	洗涤液 I	21ml (第一次使用前加入 7ml 无水乙醇)
	洗涤液 II	16ml (第一次使用前加入 24ml 无水乙醇)
	洗脱液	22ml
	蛋白酶 K	1.1ml
	RNase A	220μl
	DNA 纯化柱及废液收集管	50 套
——	说明书	一份

保存条件:

-20℃ 保存, 一年有效。

注意事项:

温度较低时样品裂解液 A 或样品裂解液 B 中可能会有沉淀产生, 属正常现象。使用前必须检查一遍。如有沉淀, 55℃ 水浴孵育使沉淀溶解, 混匀后使用。

第一次使用前洗涤液 I 需添加 7ml 无水乙醇, 洗涤液 II 需添加 24ml 无水乙醇, 混匀, 并在瓶上做好标记。

本试剂盒需使用 55℃ 或 70℃ 水浴, 请提前作好准备。

除特别说明外, 每次 Vortex 应控制在 5-10 秒左右。

本试剂盒所有操作均在室温进行, 操作时无需冰浴。所有离心也均在室温进行。

废液收集管在一次抽提中需多次使用, 切勿中途丢弃。

本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。



为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 从培养的动物细胞中抽提并检测 DNA ladder

a. 收集约 100 万个细胞，离心沉淀，弃上清。加入 200 微升 PBS，轻轻吹散或弹散细胞，使细胞重悬于 PBS 中。

需自备 PBS。如果使用冻存的细胞沉淀，先把细胞沉淀解冻，并轻轻弹散，然后再加入 PBS 重悬细胞。

b. 加入 4 微升 RNase A，Vortex 混匀。室温(15-25°C)放置 3-5 分钟。

c. 加入 20 微升蛋白酶 K，Vortex 混匀。

d. 加入 200 微升样品裂解液 B，Vortex 混匀。70°C 孵育 10 分钟。

加入样品裂解液 B 后必须立即 Vortex 混匀。不可把蛋白酶 K 直接和样品裂解液 B 混合。

e. 加入 200 微升无水乙醇，Vortex 混匀。

加入乙醇后必须充分混匀，否则会严重影响抽提效果。加入乙醇后可能产生白色沉淀，属正常现象，后续步骤中必须把白色沉淀和溶液全部转移到纯化柱内。

f. 把步骤 e 中的混合物加入到 DNA 纯化柱内。 $\geq 6000g$ (约 $\geq 8000rpm$)离心 1 分钟。倒弃废液收集管内液体。

进行本步骤前需将纯化柱置于废液收集管上。倒弃废液后回收废液收集管。

注意：必须把沉淀全部转移到 DNA 纯化柱内，否则会严重影响抽提效果！

g. 加入 500 微升洗涤液 I， $\geq 6000g$ (约 $\geq 8000rpm$)离心 1 分钟。倒弃废液收集管内液体。

进行本步骤前需将纯化柱置于废液收集管上。倒弃废液后回收废液收集管。

h. 加入 600 微升洗涤液 II， $\geq 18000g$ (约 $\geq 12000rpm$)离心 1 分钟。倒弃废液收集管内液体。



进行本步骤前需把纯化柱置于废液收集管上。倒弃废液后回收废液收集管。

i. 再 $\geq 18000g$ (约 $\geq 12000rpm$)离心 1 分钟, 以去除残留的乙醇。

不可把步骤 h 的离心时间延长而省略本步骤。倒弃废液后再离心可以确保充分去除残留的乙醇。

j. 将 DNA 纯化柱置于一洁净的 1.5ml 离心管上, 加入 50-100 微升洗脱液。室温放置 1-3 分钟。 $\geq 12000rpm$ 离心 1 分钟。所得液体即为纯化得到的总 DNA。

洗脱液需要直接加至纯化柱管内柱面中央, 使液体被纯化柱吸收。如果有必要, 可以使用去离子水或 TE 进行洗脱。使用较小体积的洗脱液可以使获得的总 DNA 的浓度较高, 但洗脱下来的 DNA 量相对较少。

k. 取部分抽提得到的 DNA, 1%琼脂糖凝胶电泳分析。如果细胞发生凋亡, 即可观察到典型的 DNA ladder。电泳时一定要注意换用新鲜配制的电泳液, DNA 凝胶也要用新鲜配制的电泳液配制并新鲜配制后使用。电泳时为获取最佳电泳效果使 ladder 充分分开, 电泳速度宜适当慢一些, 凝胶宜适当长一些, 而加样孔宜更加扁平一些。选取适当较薄的梳齿, 往往会获得更好的 ladder 电泳效果。

2. 从动物组织中抽提并检测 DNA ladder

a. 取不超过 25mg 的组织(脾不超过 10mg), 剪切成尽可能小的碎片, 加入 180 微升样品裂解液 A。

请勿使用过多的样品, 过多的样品会导致抽提效果下降。较小的组织碎片会使裂解速度加快, 裂解效果提高。新鲜或冻存的组织均可, 但固定过的组织请参考后续的其它步骤进行。

b. 加入 20 微升蛋白酶 K, Vortex 混匀, 55°C 水浴孵育至完全裂解。

在孵育期间可以偶尔取出样品 Vortex 以加快裂解速度。裂解的时间因组织不同而有所不同, 通常可在 1-3 小时内完成。为方便起见, 可以直接裂解过夜, 裂解过夜对抽提效果无任何负面影响。组织完全裂解后可以呈粘稠状, 但



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

不应该呈可把 DNA 纯化柱堵住的凝胶状。如果消化过夜仍呈凝胶状，说明样品用量过多，作为补救措施，可以把整个反应体系放大一倍。

c. 加入 4 微升 RNase A，Vortex 混匀。室温(15-25°C)放置 3-5 分钟。

d. 最高速剧烈 Vortex 15 秒。加入 200 微升样品裂解液 B，Vortex 混匀。
70°C 孵育 10 分钟。

加入样品裂解液 B 后需立即 Vortex 混匀。加入样品裂解液 B 后可能会产生白色沉淀，但大多数情况在 70°C 孵育后会溶解。即使 70°C 孵育后仍有白色沉淀也不会干扰后续实验。有些组织例如肺、脾，在加入样品裂解液 B 后可能会形成凝胶状物，此时需剧烈晃动或 Vortex 样品，以尽量破坏凝胶状物。

e. 转步骤 1.e，后续步骤同“从培养的动物细胞中抽提总 DNA”1.e 起的步骤。

