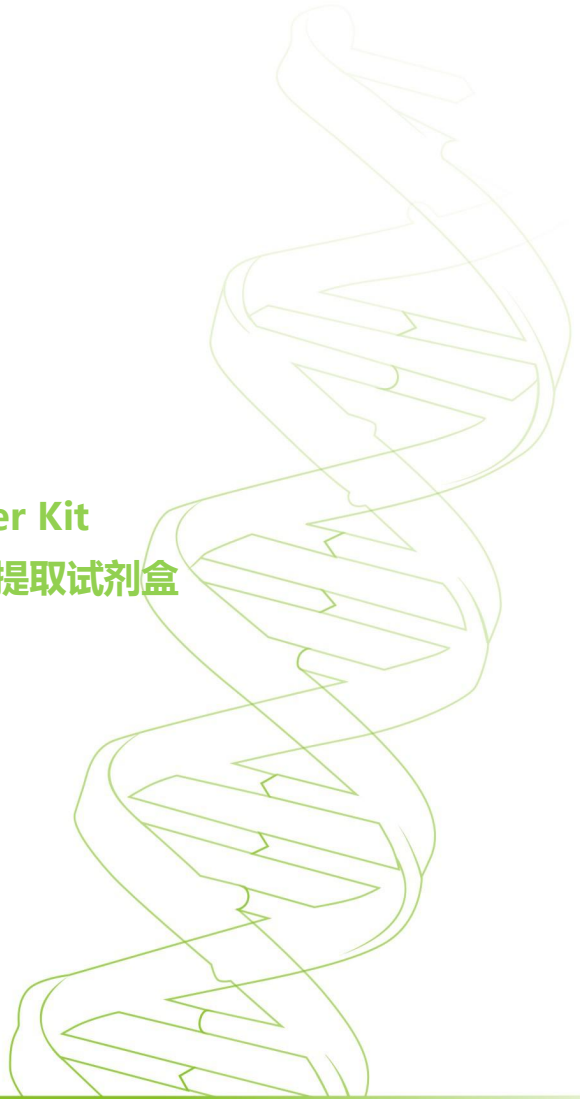


Imagene[®]

Apoptosis DNA Ladder Kit 凋亡 DNA Ladder 快速提取试剂盒



CODONX
RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

凋亡 DNA Ladder 快速提取试剂盒

目录号 DE122

使用说明书

网站: www.codonx.com

咨询电话: 010-56315162

技术支持 QQ: 3090544158

- 1/适用范围
- 2/试剂盒组成、储存、稳定性
- 3/储存事项
- 4/产品介绍
- 5/产品特点
- 6/注意事项
- 7/操作步骤
- 8/问题与解决方法

1/适用范围:

适用于快速提取凋亡DNA Ladder。

2/试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次(DE122-01)
裂解/结合液 CB	室温	15 ml
漂洗液 WB	室温	15 ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
洗脱缓冲液 EB	室温	15 ml
吸附柱 DA	室温	50 个
收集管 CT (2ml)	室温	50 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

3/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。

4/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 片段在高离子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。

5/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。

6/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。
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，可以加大上样量。

7/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 μl PBS 中）或者 200 μl 全血（大约含有 2×10^6 个细胞）加入 200 μl 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 μl 裂解/结合液 CB 前加 20 μl 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 μl ，如果起始量介于 200 μl -300 μl 之间，则需要按比例相应提高后面使用试剂量。

2. 室温（15℃-20℃）放置 10 分钟。
3. 加入 100 μl 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（包括可能的沉淀）加入一个吸附柱 DA 中，（吸附柱放入收集

管 CT 中) 13,000rpm 离心 30 秒, 倒掉收集管 CT 中的废液。

5. 加入 600µl 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 600µl 漂洗液 WB, 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
7. 将吸附柱 DA 放回空收集管 CT 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 DA, 放入一个干净的离心管中, 在**吸附膜的中间部位**加 100µl 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 65-70°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 50µl, 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°C, 但是不要超过 14 天。
10. 取大约 2-3µg 纯化的 DNA 电泳检测 (注意 200µl 人全血典型产量只有 3-6µg)。

8/问题与解决方法:

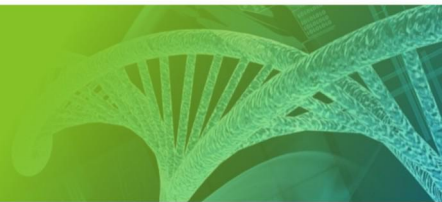
问题	评论与建议
没有 DNALadder 条带, 只见到未凋亡细胞的基因组条带	*细胞未凋亡或者凋亡细胞率太低- 建议 : 提高凋亡剂的浓度或者延长凋亡诱导时间
未见到 DNALadder 条带, 也未见到非凋亡细胞的基因组条带	*分离的 DNA 产量太低- 建议 : 加大起始细胞处理量, 按比例扩大试剂使用量。确保做了步骤 7, 以免乙醇残留降低洗脱效率。 *样品本身含有 DNA 量少 (如人全血), 电泳上样量太低, - 建议 : 可以加大洗脱下来纯化 DNA 的电泳上样量。
DNA 弥散,	*凋亡晚期, 非特异的剪切 DNA 所致- 建议 : 在凋亡较早期

未见 Ladder

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 2μg/ml, 室温(15°C-20°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。



CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd

Yizhuang Biomedical Park
Building 6, No.88 6th Kechuang St.Economic-Technological Development Area,Beijing,China
Tel: 010-56315162 www.codonx.com