



北京百泰克生物技术有限公司

Bioteke Corporation

将显著增加凋亡 DNA 条带检测灵敏度。电泳距离不要过长，否则将使小的凋亡 DNA 条带弥散而降低分辨率。

## 选择性凋亡DNA Ladder抽提试剂盒

**产品描述:** 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 $5-10 \times 10^5$ 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 $1-2 \times 10^4$ 个凋亡细胞。多于 $2 \times 10^4$ 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)。

### 试剂盒组成、储存、稳定性

试剂盒组成	保存	25次(DP3501)	50次(DP3502)
Extraction buffer	4 °C	5 ml	10 ml
10% SDS	室温	500 $\mu$ l	1 ml
Enzyme A	-20 °C	500 $\mu$ l	1 ml
Enzyme B	-20 °C	10mg	20mg
Lysis buffer	室温	5ml	10ml
Precipitant	4 °C	3.5 ml	7 ml



北京百泰克生物技术有限公司  
BioTeke Corporation

地址: 北京海淀区留学人员创业园

电话: 010-62951781

传真: 010-62951781

网址: [www.bioteke.com](http://www.bioteke.com)

Email: [info@bioteke.com](mailto:info@bioteke.com)

## 注意：

Enzyme B提供的是冻干粉，使用前请按照标签浓度比例加入PCR水或者灭菌水加以稀释。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℃保存。

## 操作步骤：

1. 用PBS漂洗细胞两遍后微型离心机500 ×g 4℃ 5 min收集5-10×10<sup>5</sup>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100μl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200μl，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 20μl后，再加入Enzyme A 20μl，混匀，56℃温育1小时。
7. 向上述混合液中加入Enzyme B 20μl，混匀,37℃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 130μl后，颠倒混匀，再加入0.95 ml的乙醇，混匀后-20℃放置1小时以上（沉淀凋亡DNA片段）。
9. 至少13000rpm 4℃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17μl双蒸水或TE Buffer充分溶解沉淀，加3μl 6× DNA凝胶上样缓冲液震荡混匀。取全部20μl 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溶解沉淀有可能会浓度太稀，无法检出DNA Ladder，因此可减少用量，反之，可增加）。

## 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(DP2901)快速染色凋亡小体观察。

3. 推荐起始细胞量为5-10×10<sup>5</sup> 个，但投入的细胞量可在1× 10<sup>5</sup> ~ 5 × 10<sup>6</sup>之间变化。原则是总细胞中应含有至少约1-2 x 10<sup>4</sup>个凋亡细胞。多于2×10<sup>4</sup>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1-10×10<sup>5</sup> 个细胞，如果细胞凋亡发生率为10%，经过处理可得到约1-10×10<sup>4</sup>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 x10<sup>6</sup>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 100-200μl Lysis 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，