

细胞凋亡 DNA Ladder 抽提试剂盒（离心柱式）

货号: KTA1101

规格: 50 T/100 T

批号: 见产品标签

	适用样本: 动物组织、细胞
	保质期: 按各组分标签提示分开存储, 保质期 12 个月

01 背景与原理

细胞在发生凋亡时, 核酸内切酶激活, 这些内切酶会切断核小体间的基因组 DNA。细胞凋亡时抽提 DNA 进行电泳检测, 可以发现 180-200 bp 或其整倍数的 DNA Ladder。DNA Ladder 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。

细胞凋亡 DNA Ladder 抽提试剂盒（离心柱式）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, 可以非常有效地抽提最小片段为 180-200 bp 的 DNA Ladder, 同时又可以抽提到 50 kb 以上的基因组 DNA。

02 包装清单

试剂盒组分		规格		储存条件
		50 T	100 T	
Apoptotic DNA Ladder Extraction Kit with Spin Column (Part 1 of 2)	Lysis Buffer A	12 mL	24 mL	RT
	Lysis Buffer B	12 mL	24 mL	RT
	Wash Buffer A	21 mL	42 mL	RT
	Wash Buffer B	8 mL	16 mL	RT
	Elution Buffer	10 mL	20 mL	RT
	Spin Column	50	50×2	RT
	Collection Tube	50	50×2	RT
Apoptotic DNA Ladder Extraction Kit with Spin Column (Part 2 of 2)	RNase A	110 µL	220 µL	-20°C
	Proteinase K	550 µL	1.1 mL	-20°C

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	凝胶电泳仪、水浴锅、离心机和涡旋振荡器	/
耗材	细胞培养孔板	/
试剂	磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.4），无水乙醇	配液、清洗
其他	可调节式移液枪及枪头	/

04 注意事项

- 温度较低时 Lysis Buffer A 和 Lysis Buffer B 中可能会有沉淀产生，属正常现象。如有沉淀，56℃水浴孵育溶解沉淀，混匀后使用。
- 本试剂盒所有操作均在室温进行，所有离心也均在室温进行。
- Collection Tube 在一次抽提中需多次使用，切勿中途丢弃。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Lysis Buffer A	即用型	室温保存
Lysis Buffer B	即用型	室温保存
Wash Buffer A	第一次使用前 50 T 添加 9 mL 无水乙醇，100 T 添加 18 mL 无水乙醇，混匀并做好标记	室温保存
Wash Buffer B	第一次使用前 50 T 添加 32 mL 无水乙醇，100 T 添加 64 mL 无水乙醇，混匀并做好标记	室温保存
Elution Buffer	即用型	室温保存
RNase A	即用型	-20℃保存
Proteinase K	即用型	-20℃保存

05-2 实验步骤

注意：需使用 56℃或 70℃水浴，请提前作好准备。

1. 细胞样本

(1) 收集约 1×10⁶ 个细胞，加入 200 μL PBS，轻柔混匀，使细胞重悬于 PBS 中。

注意：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。

(2) 加入 2 μL RNase A，轻柔涡旋混匀,室温放置 3-5 min。

(3) 加入 10 μ L Proteinase K, 轻柔涡旋混匀。

(4) 加入 200 μ L Lysis Buffer B, 轻柔涡旋混匀, 70℃孵育 10 min。

注意: 加入 **Lysis Buffer B** 后必须立即涡旋混匀。不可把 **Proteinase K** 直接和 **Lysis Buffer B** 混合。

(5) 加入 200 μ L 无水乙醇, 轻柔涡旋混匀。

注意: 加入乙醇后可能产生白色沉淀, 属正常现象。

(6) 把步骤 5 中的混合物 (包括可能产生的沉淀) 加入到 Spin Column。12000 rpm 离心 1 min, 倒弃 Collection Tube 内液体。

注意: 进行本步骤前需将 **Spin Column** 置于 **Collection Tube** 上。倒弃废液后回收 **Collection Tube**。必须把沉淀全部转移到 **Spin Column** 内, 否则会严重影响抽提效果。

(7) 加入 0.5 mL Wash Buffer A (使用前先检查是否已加入无水乙醇), 12000 rpm 离心 1 min, 倒弃 Collection Tube 内液体。

(8) 加入 0.6 mL Wash Buffer B (使用前先检查是否已加入无水乙醇), 12000 rpm 离心 1 min, 倒弃 Collection Tube 内液体。

(9) 12000 rpm 离心 2 min, 去除残留的乙醇。

(10) 将 Spin Column 置于一新的 1.5 mL 离心管上, 开盖室温干燥 3-5 min, 加入 50-100 μ L Elution Buffer。室温放置 1-3 min。12000 rpm 离心 1-2 min。所得液体即为纯化得到的总 DNA。

注意: 为提高 DNA 提取量, 可以将 **Elution Buffer** 预热至 56℃再洗脱, 也可将第一次洗脱所得溶液重新加入 **Spin Column** 进行洗脱。

(11) 取部分抽提得到的 DNA, 1%琼脂糖凝胶电泳分析。

注意: 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。电泳时为获取最佳电泳效果使 **Ladder** 充分分开, 电泳速度可适当慢一些, 电泳时间适当延长, 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. 动物组织样本

注意: 与培养细胞相比, 动物组织样本凋亡细胞出现的部位不定、规律性差, 取样部位及取样量的不同, 均会显著影响最终 **DNA Ladder** 的提取效果, 建议有丰富经验的用户使用本试剂盒提取组织凋亡 **DNA Ladder**。

(1) 称取不超过 25 mg 的组织 (脾脏不超过 10 mg), 剪切成尽可能小的碎片, 加入 190 μ L Lysis Buffer A。

注意: 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。

(2) 加入 10 μ L Proteinase K, 轻柔涡旋混匀, 56℃孵育直至完全裂解。

注意: 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 h 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, 但不应该呈可把 **Spin Column** 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。也可将组织样本经液氮研磨成面粉状, 缩短裂解时间。

(3) 加入 2 μ L RNase A, 轻柔涡旋混匀, 室温放置 3-5 min。

(4) 涡旋混匀 15 s, 加入 200 μ L Lysis Buffer B, 涡旋混匀, 70℃孵育 10 min。

注意: 加入 **Lysis Buffer B** 后需立即涡旋混匀。加入 **Lysis Buffer B** 后可能会产生白色沉淀, 但大多数情况在 70℃孵育后会溶解。即使 70℃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, 此时需剧烈晃动或涡旋样品, 以尽量破坏凝胶状物。

(5) 后续步骤同 05-2 中 1-(5)到 1-(11)细胞样本的步骤。

06 结果示例

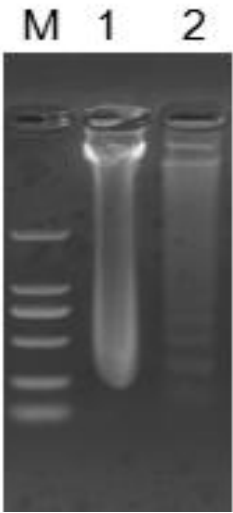


Figure 1. Jurkat 细胞用 DMSO（1）或凋亡诱导剂 A+B（1:1000）（2）处理 30 h 后用细胞凋亡 DNA Ladder 抽提试剂盒（离心柱式）抽提 DNA Ladder 并进行 DNA 电泳分析，可以看到凋亡诱导后 DNA Ladder 明显增加。

07 FAQ

1．该产品可以使用冻存样本吗？

对于 DNA Ladder 检测来说，新鲜或冻存的细胞/组织均可。

2．哪个凋亡时期可用这款试剂盒呢？

DNA Ladder 出现在细胞凋亡晚期，观察细胞形态已发生皱缩出芽，染色质完全凝聚，细胞核已固缩断裂的凋亡晚期形态，建议该种形态的凋亡细胞比例在 30%以上时进行 DNA Ladder 检测或先进行 TUNEL 检测。

08 相关产品

货号	试剂盒名称
KTP3007	ExKine™ Pro动物细胞/组织总蛋白提取试剂盒（柱式法）
KTA2010	一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）
KTA2011	一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（红色荧光）
KTA0002	Annexin V-AbFluor™ 488/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒
KTA4001	线粒体膜电位分析试剂盒（JC-1 法）

细胞凋亡DNA Ladder抽提试剂盒（离心柱式）

(Abbkine 货号：KTA1101)

