

# AipBest 凋亡 DNA Ladder 快速提取试剂盒(离心柱型)

## AipBest Apoptosis DNA Ladder Rapid Extraction Kit(Centrifugal Column)

### 使用说明书

◆目录号：AD201

目录编号	包装单位
AD201-01	20次
AD201-02	50次

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	20 次 (AD201-01)	50 次 (AD201-02)
裂解/结合液 CB	室温	6mL	15mL
漂洗液 WB	室温	6mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇	15mL
洗脱缓冲液 EB	室温	15mL	15mL
吸附柱 AC 和 收集管(2mL)	室温	20 套	50 套

◆适用范围：适用于快速提取凋亡 DNA Ladder。

◆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°C 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。

◆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。

◆产品特点：

1. 操作安全，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，快速简捷，单个样品操作一般可在 10 分钟内完成。

◆**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，如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 开始实验前将需要的水浴先预热到 70°C 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  $2 \times 10^6$  培养细胞 DNA 产量为 10-20 $\mu$ g，200 $\mu$ L 人全血典型产量为 3-6 $\mu$ g。
5. 一般电泳检测时典型上样量为 2-3 $\mu$ g 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，可以试试加大上样量。

◆**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  $2 \times 10^6$  个细胞(悬浮细胞或者组织培养细胞重悬在 200 $\mu$ L PBS 中)或者 200 $\mu$ L 全血(大约含有  $2 \times 10^6$  个细胞)加入 200 $\mu$ L 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 $\mu$ L 裂解/结合液 CB 前加 20 $\mu$ L RNase A(25mg/mL)溶液，振荡混匀，室温放置 5-10 分钟。

**注：**细胞或者全血处理起始量最大可达 300 $\mu$ L，如果起始量介于 200 $\mu$ L-300 $\mu$ L 之间，则需要按比例相应提高后面使用试剂量。

2. 室温(15°C-20°C)放置 10 分钟。
3. 加入 100 $\mu$ L 异丙醇，立刻涡旋振荡充分混匀，此时可能会出现絮状沉淀。  
**注：**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 AC 中，(吸附柱放入收集管中)13,000rpm 离心 30 秒，倒掉收集管中的废液。
5. 加入 600 $\mu$ L 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 600 $\mu$ L 漂洗液 WB，12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
7. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，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 AC，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。

**注：**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)。

◆问题与解决方法:

问题	评论与建议
没有 DNA Ladder 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- <b>建议：</b> 提高凋亡剂的浓度或者延长凋亡诱导时间。
未见到 NALadder 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- <b>建议：</b> 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- <b>建议：</b> 可以加大洗脱下来纯化 DNA 的电泳上样量。
DNA 弥散，未见 Ladder	*凋亡晚期，非特异的剪切 DNA 所致- <b>建议：</b> 在凋亡较早期时提取 DNA Ladder(或者做多个不同时期动态连续检测)。 *RNA 污染太多，影响了观测- <b>建议：</b> 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。
背景高，DNA Ladder 弱或者不明显	

