



Apoptotic DNA Ladder Extraction Kit

细胞凋亡-DNA Ladder 提取试剂盒

产品简介

凋亡DNA Ladder提取试剂盒是采用硅胶柱的纯化方式，专门为提取细胞凋亡过程中产生的核小体间断裂的DNA而设计的。即可以有效地提取到小至150-200bp 的片段，又可以抽提到最大50kb左右的基因组DNA。每次抽提可以处理20mg组织或200-300万个培养细胞。样品用量过多，反而会影响抽提效果。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。

试剂盒组成

产品编号	D3201	D3205	D3206	D3207
次数	5	50	100	200
纯化柱子	5	50	100	200
收集管	5	50	100	200
Buffer PTL	1.2ml	15ml	30ml	55ml
Buffer BL	1.2ml	15ml	30ml	55ml
Buffer WB	3ml	33ml	55ml	110ml
DNA Wash Buffer	2	13ml	26ml	26ml*2
Proteinase K	120μl	1.05ml	1.05ml*2	2.1ml*2
RNase A	30μl	220μl	450μl	900μl
说明书	1	1	1	1

储存和稳定性

室温保存，18个月内有效。Buffer BL可能有沉淀产生，37℃水浴溶解后即可。Proteinase K常温运输，-20℃保存。

实验前准备

请仔细阅读该手册并熟悉各个步骤，在开始之前准备好所有的试剂盒组分和必需的器材。

浓缩的DNA Wash Buffer需用无水乙醇按如下稀释：

- D3201 加8 ml；D3205加入52 ml；D3206与D3207每瓶加入104 ml 无水乙醇

需自备器材

无水乙醇 1.5ml离心管 水浴 离心机

操作步骤

1.材料处理：

A.动物组织：称取<30mg的组织，加入到1.5ml的离心管中，加入200μl Buffer PTL。将样品剪成一块块小块可以加速裂解效果。如果样品大于30mg，可按比例提高Buffer PTL的用量，如样品为60mg，则加入400μl Buffer PTL（以下的试剂也相应加量）。

B.细胞样品：收集约100万个细胞，离心沉淀，弃上清。加入200μl Buffer PTL重悬细胞。

2.加入20μl Proteinase K（20mg/ml），涡旋混匀。

A. 细胞样品：加入Proteinase K 混匀后，即可继续下一步。

B. 动物组织：于55℃水浴孵育至组织完全消化。水浴时每隔20-30min混匀一次。消化时间取决于样品使用量和组织类型：组织一般需要消化1-3小时，也可裂解过夜。

3.加入4μl RNase A颠倒混匀，在室温条件下孵育5分钟。

4.加入220μl Buffer BL，振荡15 秒，70℃放置10 分钟，溶液应变清亮。

注意：加Buffer BL 时可能会产生白色沉淀，一般70℃放置时会消失，不会影响后续实验。如溶液未变清亮，说明细胞裂解不彻底，可能导致提取DNA量少和提取出的DNA不纯。

5.室温下，10,000×g离心2min去除不溶解的杂质，小心将上清液转移到新的离心管中（细胞样品，无需此步操作）。

6.加220μl无水乙醇，充分振荡混匀15 秒，此时可能会出现絮状沉淀。

7.将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一GBC吸附柱中（**吸附柱放入收集管中**），12,000 rpm（~13,400×g）离心30 秒，倒掉废液，将GBC吸附柱放入收集管中。

8.向GBC吸附柱中加入500μl Buffer WB，12,000 rpm（~13,400×g）离心30 秒，倒掉废液，将GBC吸附柱放入收集管中。

9.向GBC吸附柱 中加入600μl DNA Wash Buffer（**使用前请先检查是否已加入无水乙醇**），12,000 rpm（~13,400×g）离心30 秒，倒掉废液，GBC吸附柱放入收集管中。

10.向GBC吸附柱 中加入600μl DNA Wash Buffer，12,000 rpm（~13,400×g）离心30秒，倒掉废液，将GBC吸附柱放入收集管中。

11.12,000 rpm（~13,400×g）离心2 分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

12.将GBC吸附柱转入一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加50-200 μl洗脱缓冲液TE或灭菌去离子水，室温放置2-5 分钟，12,000 rpm（~13,400×g）离心2 分钟，将溶液收集到离心管中。

13.电泳检测：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。

电泳时一定要用新鲜配制的电泳液，琼脂糖胶也要用新鲜电泳液现配现用。电泳时为获取最佳的效果，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。

可能出现的问题与对策

问 题	原 因	建 议
纯化柱阻塞	裂解不完全	延长加入 Buffer PTL 和蛋白酶后的裂解放置时间。加入正确体积的 Buffer BL 和于 70℃放置一段指定的时间。
	样本太多	如果使用大于 30mg 的组织，增加蛋白酶, PTL 与 BL 的用量，
	样本太粘滞	增加 TL 与 BL 的用量
低 DNA 量	柱子阻塞	见上述.
	洗脱液不足	重复洗脱或增加洗脱体积（见前面的注意事项），加入 DNA 洗脱液并将柱子置于 70℃放置 5min 有助于提高产量。
	洗涤不恰当	DNA 洗涤缓冲液在使用前用无水乙醇按指示稀释。
低 A ₂₆₀ /A ₂₈₀ 比率	由于与 Buffer BL 混和不完全导致细胞裂解不足	重复操作确保这次将样本与 Buffer BL 彻底混和均匀.
	由于放置时间不够导致细胞裂解或蛋白降解不完全	延长放置时间，确保没有可见的组织碎块剩余.
	样本富含蛋白质	使用柱子之后，先用 300μl 的 1: 1 的 Buffer BL 和乙醇混和液洗涤，然后用 DNA 洗涤缓冲液洗涤。
没有洗脱出 DNA	与 Buffer BL 混和不恰当导致细胞裂解不足	到吸附柱之前用 Buffer BL 混和完全.
	用 Buffer TL 时导致细胞或蛋白质裂解不足	组织样本必须剪成或切成碎块。使用 Buffer PTL 时增加于 65℃的放置时间，确保组织被完全裂解.
	Buffer BL 中没有加入无水乙醇	样品过柱前，必须加入无水乙醇调整结合条件
	浓缩洗涤液没有加入乙醇	使用前用指定体积的乙醇稀释 DNA 洗涤缓冲液。
洗涤时柱中有带颜色的遗留物	由于与 Buffer BL 混和不恰当导致不完全裂解	Buffer BL 是粘稠的，故样本必须与之剧烈混和完全.
	Buffer BL 中没有加入无水乙醇	样品过柱前，必须加入无水乙醇调整结合条件

可能用到的产品

货号	品名	规格
P3105	Plasmid Maix Kit	10T
P2105	Endo-free Plasmid Mini kit	50T
P6105	Yeast Plasmid Kit	50T
C4105	MiniElute DNA-Pure Kit	50T
P3415	2XPCR Master Mix	1ml
D1105	Blood DNA Kit	50T
D4105	Plant DNA Kit	50T
D7105	Hpure Fugal DNA Kit	50T
D3105	Baterial DNA Kit	50T
D8105	Soil DNA Kit	50T
R1106	TRNsol(TRIzol)	100ml
R4105	Total RNA Kit II	50T
R5105	Plant RNA Kit	50T
G4210	DH5a 感受态	5*0.2ml
G0668	DEPC-water	100ml
G3420	6X loading buffer	2ml
G3422	DAB 染色液	100ml
G0577	苏木素伊红染色液	50ml*2
G3424	RIPA 裂解液	100ml
P0018	ECL 发光液	100ml
G3418	TMB Solution For Blotting	100ml
G4308	TMB solution For Elisa	100ml
G3005	30%丙烯酰胺 (29:1)	500ml
G3403	40%丙烯酰胺 (37.5:1)	500ml
G0528	4%多聚甲醛	500ml
G3422	BCA 蛋白浓度测定试剂盒	500T
G3155	Bradford 蛋白浓度测定试剂盒	1000T
G4256	10X 丽春红染色液	10ml

广州捷信斯生物科技有限公司

地址：广州市国际生物岛螺旋四路一号研发B区403

电话：020-82160415 Email: genebase@vip.163.com WEB:www.gbcbio.cn