

Code No. MK600

研究用

TaKaRa

ApopLadder Ex™

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 试剂盒原理	1
● 试剂盒特性	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 试剂盒以外必备试剂和仪器	1
● 实验操作	1
● 实验应用	2
● Q&A	2
● 关联产品	4

● 制品说明

发生细胞凋亡现象的特征之一，是染色体 DNA 以核小体为单位（185 bp）进行 DNA 片断化产生 DNA Ladder (ApopLadder)，这些被片断化了的 DNA 片段，可以使用电泳的方法进行检出。

ApopLadder Ex™能够从培养细胞中选择性地提取片断化 DNA。提取的片段化 DNA 可以通过电泳法进行高效检出，还可以和荧光色素组合使用，对片断化 DNA 进行定量。

本制品包含了细胞裂解、蛋白质和 RNA 的分解、DNA 片段的沉淀及凝胶电泳用的 6×Loading Buffer 的所有反应试剂。

● 试剂盒原理

把发生细胞凋亡的细胞用 Lysis Buffer 进行处理，游离片断化 DNA。通过离心分离，把片断化 DNA 从完整的染色体中分离出来。将含有片断化 DNA 的上清液用酶试剂进行处理，分解蛋白质及 RNA 等不纯物质，然后乙醇沉淀分离片断化 DNA。

● 试剂盒特性

- ◆ 操作简便：Ready to Use 型试剂。
- ◆ 高灵敏度：能够高灵敏度地检出凋亡细胞的片断化 DNA。
- ◆ 高特异性：抑制完整的染色体 DNA 的混入，选择性地提取片断化 DNA。
- ◆ 快速操作：整体操作约需 2.5 小时。
- ◆ 定量性：与荧光色素(例如 SYBR[®] Green I)组合可以对片断化 DNA 进行定量。
- ◆ 安全性：不使用苯酚氯仿等。

● 制品内容 (24 次量)

1. Lysis Buffer	1.2 ml × 4
2. 10% SDS Solution	0.48 ml
3. Enzyme A	0.48 ml
4. Enzyme B	0.48 ml
5. Precipitant	1.04 ml × 3
6. 6×Loading Buffer	0.48 ml

● 保 存：-20℃

● 试剂盒以外必备试剂和仪器

- | | |
|-----------------|-----------------|
| 1. 微量移液器 | 7. 低速离心机 |
| 2. 1.5 ml 微量离心管 | 8. TE buffer |
| 3. 37℃温育箱 | 9. PBS(-)buffer |
| 4. 56℃温育箱 | 10. 乙醇 |
| 5. 涡旋振荡器 | 11. 80%的乙醇 |
| 6. 高速离心机 | |

使用电泳、荧光图像分析以及荧光染料等方法可以用来测定 DNA 片段。

● 实验操作

1. 把 $10^6 \sim 10^7$ 的细胞*1 用 PBS(-) Buffer 清洗一次后，使其悬浮于少量的 PBS(-) Buffer 中，移入 1.5 ml Microtube 中后， $1,600 \times g$ 离心 5 分钟，除去上清。

2. 将 Microtube 底部的细胞沉淀用手指轻轻弹松后，加入 100 μ l 的 Lysis Buffer，用振荡器激烈混合 10 秒钟后，1,100 \times g 离心 5 分钟。
3. 把上清移入另一 1.5 ml Microtube 中。
4. 沉淀按操作 2.方法再重复一次。
5. 把上清液与操作 3.的上清液合于一起，作为粗提取液。
6. 向粗提取液中加入 10% SDS Solution 20 μ l 后，再加入 Enzyme A 20 μ l，56 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。
7. 再向上述反应液中加入 Enzyme B 20 μ l，37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。
8. 向上述反应液中加入 Precipitant 130 μ l 后，再加入 0.95 ml 的乙醇，- 20 $^{\circ}$ C 放置 1 小时以上。
9. 12,000 \times g 离心 15 分钟，弃上清，用 80%乙醇清洗沉淀。
10. 12,000 \times g 同样离心 15 分钟后除去乙醇，干燥沉淀。
11. 加入适量的 TE Buffer (10~50 μ l 左右) *2 后充分搅拌溶解，得到凋亡细胞的片断化 DNA (可用于多种检测)。

*1 最终得到凋亡细胞的片断化 DNA 的量，取决于全细胞中凋亡诱导的程度。

*2 凋亡发生率较低时，添加过量 TE Buffer 有可能会致无法检出片断化 DNA，因此推荐使用较少量的 TE Buffer。

● 实验应用

1. 凝胶电泳确定 DNA ladder
按照样品：6 \times Loading buffer=5:1 (总体积为 6~15 μ l) 的比例混合后，进行琼脂糖凝胶电泳。
2. 用 SYBR[®] Green I 进行荧光检测
将荧光色素 SYBR[®] Green I 用 TE Buffer 稀释 1000 倍，同时把 DNA 样品也用 TE Buffer 稀释成适当的浓度。稀释 DNA 样品每 50 μ l 添加 1000 倍稀释好的荧光色素 5 μ l，然后全量用荧光 Plate reader、荧光分光光度仪等荧光测定装置进行检出。

● Q&A

- Q1 ApopLadder Ex 适用于哪些材料？
- A1 适用于大部分培养细胞，也适用于其特性类似于培养细胞的细胞，比如使用 BD Vacutainer CPT (Becton Dickinson)从全血或者脾中提取的淋巴细胞。但本试剂盒不适用于组织。
- Q2 可以从冻结细胞中提取片断化 DNA 吗？
- A2 不建议使用冻存细胞，我们推荐从新鲜的培养细胞中进行提取。但从本公司的实验结果看，进行 3 次冻融处理的培养细胞中也能提取检出片断化 DNA，但收量明显减少。
- Q3 提取的片断化 DNA 的保存方法和稳定性怎样？
- A3 请将片断化 DNA 分装后在-20 $^{\circ}$ C以下保存，尽量避免反复冻融。本公司的实验结果表明：-20 $^{\circ}$ C至少 1 个月稳定；4 $^{\circ}$ C保存时，至少 7 天稳定。
- Q4 以何种细胞作对照以验证提取成功？
- A4 细胞凋亡产生的 DNA 片断化受以下因素影响：靶细胞、诱导剂及其浓度和诱导的时间等。根据本公司的经验，推荐使用 1 mM 星型胞菌素 (Sigma-Aldrich, code.S4400) 处理的 HL60 细胞作为验证提取成功的对照。
- <使用 HL60 细胞实验例>
- 在 90 mm 培养皿中，加入 10 ml 培养基，接种 10⁶ 个 HL60 细胞，然后加入星型胞菌素，使其终浓度为 3 μ M。在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下培养 5 小时*，全量离心回收细胞。

用 PBS(-) Buffer 清洗一次后, 使其悬浮于少量的 PBS(-) Buffer 中, 将 5×10^6 个细胞移入 1.5 ml Microtube 中, $1,600 \times g$ 室温离心 5 分钟。得到的片断化 DNA 最终用 20 μ l TE Buffer 溶解。取其中 5 μ l 用 3% Agarose Gel 电泳检测。

*: 细胞的不同培养状态下星型胞菌素的作用效果也不同。图 1 中的 ladder 是对星型胞菌素处理 3~5 小时得到的结果。

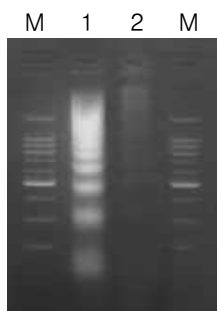


图 1

M. 100 bp DNA Ladder (200 ng)

1. 星型胞菌素处理

2. 星型胞菌素未处理

Q5 电泳结果中 DNA 片段模糊, 得不到清晰的 Ladder, 原因是什么?

A5 可以考虑以下原因:

- ① 细胞凋亡进行过度, 有非特异性的 DNA 片段。(推荐提早取样时间。)
- ② 操作中混入 DNase。应防止 DNase 混入 (如实验戴手套等)。

Q6 电泳结果无 DNA 片段检出, 为什么?

A6 可以考虑以下原因:

- ① 没有发生细胞凋亡。
- ② DNA 量太少, 无法检出。

可尝试以下方法解决:

- ① 增加凋亡诱导剂的浓度, 或延长诱导时间。
- ② 可使用 *In situ* Apoptosis Detection Kit (Code No. MK500) 等方法确认细胞凋亡是否发生。
- ③ 增加处理样品的细胞数。
- ④ 在步骤 11 中, 经乙醇沉淀后再溶解 DNA, 以缩小体积。

Q7 10% SDS Solution 低温下产生沉淀, 怎么办?

A7 在 40°C 左右加热, 即可溶解。溶解后的溶液可以正常使用, 不影响实验结果。

Q8 片断化 DNA 定量时, SYBR[®] Green I 以外的荧光色素可否使用?

A8 Pico Green (Thermo Fisher Scientific) 也可使用。

Q9 片断化 DNA 检测时, 使用哪种琼脂糖凝胶, 适合的浓度是多少?

A9 推荐使用 3% 的 PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (Code No. 5810A)。

Q10 $6 \times$ Loading Buffer 呈黄褐色, 有无问题?

A10 没关系。因为是使用了不妨碍 DNA 条带照像的黄色色素的原因。

Q11 贴壁细胞用什么方法剥离细胞较好?

A11 用细胞刮勺剥离较好。与使用 Trypsin 剥离细胞方法相比, 前者剥离的细胞的片断化 DNA Ladder 较为清晰。

● 关联产品

500 bp DNA Ladder (Code No. 3411A/B)

100 bp DNA Ladder (Code No. 3407A/B)

In situ Apoptosis Detection Kit (Code No. MK500)

SYBR is a registered trademark of Life Technologies Corporation.

ApopLadder Ex and PrimeGel are trademarks of TAKARA BIO INC.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经TAKARA BIO INC.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 TAKARA BIO INC.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takara.com.cn>