



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
 订货热线: 400-1683301或800-8283301
 订货e-mail: order@beyotime.com
 技术咨询: info@beyotime.com
 网址: http://www.beyotime.com

细胞凋亡 – DNA Ladder 抽提试剂盒(离心柱式)

产品编号	产品名称	包装
C0008	细胞凋亡 – DNA Ladder抽提试剂盒(离心柱式)	50次

产品简介:

- 碧云天的细胞凋亡 – DNA Ladder抽提试剂盒(离心柱式)(Apoptosis, DNA Ladder Extraction Kit with Spin Column)是目前最先进的DNA Ladder抽提试剂盒之一。本试剂盒是针对细胞凋亡过程中产生的核小体间DNA链断裂而设计的。可以非常有效地抽提最小片段为180-200bp的DNA ladder，同时又可以抽提到最大50kb左右的基因组DNA。
- DNA ladder也称DNA fragmentation，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。
- 样品首先被蛋白酶K消化，随后加入适合DNA结合到纯化柱上的缓冲液，然后加入到纯化柱内。通过高速离心，使DNA在穿过纯化柱的瞬间，结合到纯化柱上，随后通过两次洗涤去除各种杂质，最后通过洗脱液把DNA洗脱下来。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。
- 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。
- 本试剂盒每次最多可以抽提20mg组织或200-350万个培养细胞。样品用量过多，反而会影响抽提效果。
- 试剂盒提供了RNase A，可以获得不含RNA的高纯度总DNA，排除了RNA对DNA ladder观察造成的干扰。
- 纯化柱对于DNA的最大容量约为30微克。通常每200万Hela细胞或500万淋巴细胞可以抽提得到15-25微克总DNA，每25mg肝、脑、肾组织可以抽提得到10-30微克总DNA，每25毫克心、肺组织可以抽提得到5-10微克总DNA，每10mg脾组织可以抽提得到5-30微克总DNA。样品的用量请勿超过纯化柱的容量，样品用量最好能保持在纯化柱容量的70%或以下。当然过少的样品也不利于检测到DNA ladder。
- 对于培养细胞的凋亡检测，通常6孔板一个孔的细胞就足够用于DNA ladder的抽提和检测。
- 本试剂盒可以抽提50个样品。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C0008-1	样品裂解液A	10ml
C0008-2	样品裂解液B	11ml
C0008-3	洗涤液I	21ml (第一次使用前加入7ml无水乙醇)
C0008-4	洗涤液II	16ml (第一次使用前加入24ml无水乙醇)
C0008-5	洗脱液	22ml
C0008-6	蛋白酶K	1.1ml
C0008-7	RNase A	220µl
C0008-8	DNA纯化柱及废液收集管	50套
—	说明书	1份

保存条件:

蛋白酶K -20°C保存，其余均室温保存。一年有效。蛋白酶K室温(15-25°C)存放一周，活力无明显下降。

注意事项:

- 温度较低时样品裂解液A或样品裂解液B中可能会有沉淀产生，属正常现象。使用前必须检查一遍。如有沉淀，55°C水浴孵育使沉淀溶解，混匀后使用。
- **第一次使用前洗涤液I需添加7ml无水乙醇，洗涤液II需添加24ml无水乙醇，混匀，并在瓶上做好标记。**
- 本试剂盒需使用55°C或70°C水浴，请提前作好准备。
- 除特别说明外，每次Vortex应控制在5-10秒左右。
- 本试剂盒所有操作均在室温进行，操作时无需冰浴。所有离心也均在室温进行。
- 废液收集管在一次抽提中需多次使用，切勿中途丢弃。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 从培养的动物细胞中抽提并检测DNA ladder

- a. 收集约 100 万个细胞，离心沉淀，弃上清。加入 200 微升 PBS，轻轻吹散或弹散细胞，使细胞重悬于 PBS 中。需自备 PBS。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。
 - b. 加入 4 微升 RNase A，Vortex 混匀。室温(15-25°C)放置 3-5 分钟。
 - c. 加入 20 微升蛋白酶 K，Vortex 混匀。
 - d. 加入 200 微升样品裂解液 B，Vortex 混匀。70°C 孵育 10 分钟。
加入样品裂解液 B 后必须立即 Vortex 混匀。不可把蛋白酶 K 直接和样品裂解液 B 混合。
 - e. 加入 200 微升无水乙醇，Vortex 混匀。
加入乙醇后必须充分混匀，否则会严重影响抽提效果。加入乙醇后可能产生白色沉淀，属正常现象，后续步骤中必须把白色沉淀和溶液全部转移到纯化柱内。
 - f. 把步骤 e 中的混合物加入到 DNA 纯化柱内。≥6000g (约≥8000rpm)离心 1 分钟。倒弃废液收集管内液体。
进行本步骤前需将纯化柱置于废液收集管上。倒弃废液后回收废液收集管。
注意：必须把沉淀全部转移到 DNA 纯化柱内，否则会严重影响抽提效果！
 - g. 加入 500 微升洗涤液 I，≥6000g (约≥8000rpm)离心 1 分钟。倒弃废液收集管内液体。
进行本步骤前需将纯化柱置于废液收集管上。倒弃废液后回收废液收集管。
 - h. 加入 600 微升洗涤液 II，≥18000g (约≥12000rpm)离心 1 分钟。倒弃废液收集管内液体。
进行本步骤前需把纯化柱置于废液收集管上。倒弃废液后回收废液收集管。
 - i. 再≥18000g (约≥12000rpm)离心 1 分钟，以去除残留的乙醇。
不可把步骤 h 的离心时间延长而省略本步骤。倒弃废液后再离心可以确保充分去除残留的乙醇。
 - j. 将 DNA 纯化柱置于一洁净的 1.5ml 离心管上，加入 50-100 微升洗脱液。室温放置 1-3 分钟。≥12000rpm 离心 1 分钟。所得液体即为纯化得到的总 DNA。
洗脱液需要直接加至纯化柱管内柱面中央，使液体被纯化柱吸收。如果有必要，可以使用去离子水或 TE 进行洗脱。使用较小体积的洗脱液可以使获得的总 DNA 的浓度较高，但洗脱下来的 DNA 量相对较少。
 - k. 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液配制并新鲜配制后使用。电泳时为获取最佳的电泳效果使 ladder 充分分开，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。
2. 从动物组织中抽提并检测 DNA ladder
- a. 取不超过 25mg 的组织(脾不超过 10mg)，剪切成尽可能小的碎片，加入 180 微升样品裂解液 A。
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，但固定过的组织请参考后续的其它步骤进行。
 - b. 加入 20 微升蛋白酶 K，Vortex 混匀，55°C 水浴孵育至完全裂解。
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 小时内完成。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 DNA 纯化柱堵住的凝胶状。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。
 - c. 加入 4 微升 RNase A，Vortex 混匀。室温(15-25°C)放置 3-5 分钟。
 - d. 最高速剧烈 Vortex 15 秒。加入 200 微升样品裂解液 B，Vortex 混匀。70°C 孵育 10 分钟。
加入样品裂解液 B 后需立即 Vortex 混匀。加入样品裂解液 B 后可能会产生白色沉淀，但大多数情况在 70°C 孵育后会溶解。即使 70°C 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 Vortex 样品，以尽量破坏凝胶状物。
 - e. 转步骤 1.e，后续步骤同“从培养的动物细胞中抽提总 DNA”1.e 起的步骤。

使用本产品的文献：

1. Wang N, Hou L, Zhu ZY, Zhang JY, Ju CX, Ge YL, Yue W. Effect of 2, 3-dioxo indoline on apoptosis and human telomerase reverse transcriptase mRNA in SH2SY5Y cells. Chinese Pharmacological Bulletin. 2007 May;23(5):680-4.
2. Qian YF, Yao WB, Wang H, Gao XD. The Mechanism of Kaixin San Inhibiting Apoptosis in Hydrogen Peroxide-induced PC12 Cells. Chin J Nat Med. 2007 Sep;5(5):379-384.
3. Qian YF, Wang H, Yao WB, Gao XD. Aqueous extract of the Chinese medicine, Danggui-Shaoyao-San, inhibits apoptosis in hydrogen peroxide-induced PC12 cells by preventing cytochrome c release and inactivating of caspase cascade. Cell Biol Int. 2008 Feb;32(2):304-11.
4. Bai Y, Li Q, Yang J, Zhou X, Yin X, Zhao D. p75(NTR) activation of NF-kappaB is involved in PrP106-126-induced apoptosis in mouse neuroblastoma cells. Neurosci Res. 2008 Sep;62(1):9-14.
5. Cai L, Wang H, Li Q, Qian Y, Yao W. Salidroside inhibits H2O2-induced apoptosis in PC12 cells by preventing cytochrome c release and inactivating of caspase cascade. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2008 Sep;40(9):796-802.
6. Wang H, Xu Y, Yan J, Zhao X, Sun X, Zhang Y, Guo J, Zhu C. Acteoside protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against beta-amyloid-induced cell injury. Brain Res. 2009 Aug 4;1283:139-47.
7. Li J, Xu Z, Tan M, Su W, Gong XG. 3-(4-(Benzo[d]thiazol-2-yl)-1-phenyl-1H-pyrazol-3-yl) phenyl acetate induced Hep G2 cell apoptosis through a ROS-mediated pathway. CHEM-BIOL INTERACT. 2010 Feb 12;183(3):341-8.
8. Chai J, Xiong Q, Zhang P, Zheng R, Peng J, Jiang S. Induction of Ca²⁺ signal mediated apoptosis and alteration of IP3R1 and SERCA1 expression levels by stress hormone in differentiating C2C12 myoblasts. GEN COMP ENDOCR. 2010 Apr 1;166(2):241-9.
9. Wang L, Xu T, Lei WW, Liu DM, Li YJ, Xuan RJ, Ma JJ. Cadmium-induced oxidative stress and apoptotic changes in the testis of freshwater crab, *Sinopotamon henanense*. PLoS One. 2011 Nov;6(11):e27853.
10. Zhu H, Xia L, Zhang Y, Wang H, Xu W, Hu H, Wang J, Xin J, Gang Y, Sha S, Xu B, Fan D, Nie Y, Wu K. Activating transcription factor 4 confers a multidrug resistance phenotype to gastric cancer cells through transactivation of SIRT1 expression. PLoS One. 2012 Feb;7(2):e31431.
11. Lu B, Xu Y, Xu L, Cong X, Yin L, Li H, Peng J. Mechanism investigation of dioscin against CCl₄-induced acute liver damage in mice. ENVIRON TOXICOL CHEM. 2012 Mar 30;34(2):127-135.

12. Gao Q, Qi L, Wu T, Wang J. An important role of interleukin-10 in counteracting excessive immune response in HT-29 cells exposed to *Clostridium butyricum*. *BMC Microbiol* . 2012 Jun 8;12(1):100.
13. Wang J, Wang Q, Li J, Shen Q, Wang F, Wang L. Cadmium induces hydrogen peroxide production and initiates hydrogen peroxide-dependent apoptosis in the gill of freshwater crab, *Sinopotamon henanense*. *COMP BIOCHEM PHYS C* . 2012 Nov;156(3-4):195-201.
14. Zhang WJ, Zhang WG, Zhang PY, Cao XM, He AL, Chen YX, Gu LF. The expression and functional characterization associated with cell apoptosis and proteomic analysis of the novel gene MLLA-34 in U937 cells. *Oncol Rep* . 2013 Feb;29(2):491-506.
15. Wang B, Yu T, Dong X, Zhang Z, Song L, Xu Y, Zhang XH. Edwardsiella tarda invasion of fish cell lines and the activation of divergent cell death pathways. *Vet Microbiol* . 2013 May 3;163(3-4):282-9.
16. Ji MM, Liu AQ, Gan LP, Xing R, Wang H, Sima YH, Xu SQ. Functional analysis of 30K proteins during silk gland degeneration by a caspase-dependent pathway in *Bombyx*. *Insect Mol Biol* . 2013 Jun;22(3):273-83.
17. Liao Y, Shen W, Kong G, Lv H, Tao W, Bo P. Apigenin induces the apoptosis and regulates MAPK signaling pathways in mouse macrophage ANA-1 cells. *PLoS One*. 2014 Mar 19;9(3):e92007.
18. Li LJ, Xu NW, Gao RL, Lin XJ, Qiu HY, Liu WH, Jin YJ, Zhao ML. Effects of Danshen Injection () on inhibiting proliferation and inducing apoptosis through down-regulation of mutant JAK2 gene and its protein phosphorylation in human erythroid leukemic cells. *Chin J Integr Med* . 2014 May;20(5):381-6.
19. Wang T, Zhou J, Gan X, Wang H, Ding X, Chen L, Wang Y, DU J, Shen J, Yu L. *Toxoplasma gondii* induce apoptosis of neural stem cells via endoplasmic reticulum stress pathway. *Parasitology* . 2014 Jun;141(7):988-95.
20. Xie W, Chen C, Jiang Z, Wang J, Melzig MF, Zhang X. *Apocynum venetum* Attenuates Acetaminophen-Induced Liver Injury in Mice. *AM J CHINESE MED* . 2015;43(3):457-76.
21. Zhang X, Luo W, Zhao W, Lu J, Chen X. Isocryptotanshinone Induced Apoptosis and Activated MAPK Signaling in Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *J Breast Cancer*. 2015 Jun;18(2):112-8.
22. Yang J, Zong X, Wu G, Lin S, Feng Y, Hu J. Taurine increases testicular function in aged rats by inhibiting oxidative stress and apoptosis. *Amino Acids* . 2015 Aug;47(8):1549-58.
23. Chen W, Zheng X, Li S, Zhang W, Wen X, Yue L, Wang J. One-pot synthesis of FePt/CNTs nanocomposites for efficient cellular imaging and cancer therapy. *Journal of Nanoparticle Research*. 2015 Nov;17(11):1-10.
24. Wang H, Wang Y, Wu C, Tao H, Chen X, Yin W, Sima Y, Wang Y, Xu S. Changes in 30K protein synthesis during delayed degeneration of the silk gland by a caspase-dependent pathway in a *Bombyx* (silkworm) mutant. *J Comp Physiol B*. 2016 Aug;186(6):689-700.
25. Huang J, Peng K, Wang L, Wen B, Zhou L, Luo T, Su M, Li J, Luo Z. Ginsenoside Rh2 inhibits proliferation and induces apoptosis in human leukemia cells via TNF- α signaling pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2016 Aug;48(8):750-5.
26. Zhang C, Li XN, Xiang LR, Qin L, Lin J, Li JL. Atrazine triggers hepatic oxidative stress and apoptosis in quails (*Coturnix C. coturnix*) via blocking Nrf2-mediated defense response. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2017 Mar;137:49-56.
27. Zhang C, Li XN, Xiang LR, Qin L, Lin J, Li JL. Atrazine triggers hepatic oxidative stress and apoptosis in quails (*Coturnix C. coturnix*) via blocking Nrf2-mediated defense response. *ECOTOX ENVIRON SAFE* . 2017 Mar;137:49-56.
28. Xiao R, Xiang AL, Pang HB, Liu KQ. Hyperoside protects against hypoxia/reoxygenation induced injury in cardiomyocytes by suppressing the Bnip3 expression. *Gene* . 2017 Sep 20;629:86-91.
29. Li S, Zhao H, Wang Y, Shao Y, Liu J, Xing M. Arsenic-induced cardiotoxicity correlates with mitochondrial damage and trace elements imbalance in broiler chickens. *J POULT SCI* . 2019 Feb 1;98(2):734-744.
30. Pengfei Yuan, Liangliang Lei, Shuaijun Dong, Dechun Liu. Circular RNA hsa_circ_0068033 Acts as a Diagnostic Biomarker and Suppresses the Progression of Breast Cancer Through Sponging miR-6590NCOTARGETS. *THER*. 2020 Mar 4;13:1921-1929.;doi:10.2147/OTT.S223542.
31. Weiwei Li, Jiancheng Yang, Qiufeng Lyu, Gaofeng Wu, Shumei Lin, Qunhui Yang, Jianmin Hu. Taurine attenuates isoproterenol-induced H9c2 cardiomyocytes hypertrophy by improving antioxidative ability and inhibiting calpain-1-mediated apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 2020 Jun;469(1-2):119-132.;doi:10.1007/s11010-020-03733-7.
32. Xiuge Gao, Xiangchun Ruan, Hui Ji, Lin Peng, Yawei Qiu, Dan Yang, Xinhao Song, Chunlei Ji, Dawei Guo, Shanxiang Jiang. Maduramicin triggers methuosis-like cell death in primary chicken myocardial cells. *Toxicol Lett*. 2020 Oct 15;333:105-114.;doi:10.1016/j.toxlet.2020.07.025.

Version 2021.09.01