

Version: AA 3.2 (2021.04.01修订)

SPARKeasy DNA Ladder Kit

凋亡DNA Ladder快速提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: AA1701

01/产品组分

序号	组分	50 次 AA1701
1	裂解/结合液 CB	15 mL
2	漂洗液 WB	15 mL 第一次使用前按说明加指定量无水乙醇
3	洗脱缓冲液 EB	15 mL
4	吸附柱 AC	50 个
5	收集管 (2 mL)	50 个

02/保存条件

所有组分均室温 (15-25℃) 保存。

03/产品概述

本试剂盒适用于快速提取凋亡 DNA Ladder, 可在 30 min 内完成单个或多个样本的提取工作。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 200 bp 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 片段在高离序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。

04/自备材料

无水乙醇、异丙醇、RNase A、PBS

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 所有离心操作步骤，均在室温（15-25℃）下进行。
- ◇ 开始实验前根据需要将水浴预热到 70℃ 备用。
- ◇ 裂解/结合液 CB 低温时可能出现析出和沉淀，可以在 37℃ 水浴帮助重新溶解，恢复澄清透明后冷却到室温即可使用。
- ◇ 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。
- ◇ 一般 2×10^6 培养细胞 DNA 产量为 10-20 μg ，200 μL 人全血典型产量为 3-6 μg 。
- ◇ 一般电泳检测时典型上样量为 2-3 μg 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。
- ◇ 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化等影响，各溶液使用后应及时盖紧瓶盖。
- ◇ 首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！

06/使用方案

1. 取 2×10^6 个细胞（悬浮细胞或者组织培养细胞重悬在 200 μL PBS 中）或者 200 μL 全血（大约含有 2×10^6 个细胞）加入 200 μL 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 μL 裂解/结合液 CB 前加 20 μL RNase A（25 mg/mL）溶液，振荡混匀，室温放置 5-10 min。
 - ▲ 细胞或者全血处理起始量最大可达 300 μL ，如果起始量介于 200 μL -300 μL 之间，则需要按比例相应提高后面使用试剂量。
2. 室温（15-25℃）放置 10 min。
3. 加入 100 μL 异丙醇，立刻涡旋振荡充分混匀，此时可能会出现絮状沉淀。
 - ▲ 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 s。
4. 将上一步混合物（包括可能有的沉淀）加入一个吸附柱 AC 中（吸附柱放入收集管中），12,500 rpm（14,500 $\times$ g）离心 30 s，弃废液。
5. 加入 600 μL 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000 rpm（13,400 $\times$ g）离心 30 s，弃废液，重复此步骤一遍。
6. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，12,500 rpm（14,500 $\times$ g）离心 2 min，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。
7. 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 50-100 μL 洗脱缓冲液 EB（事先在 65-70℃ 水浴中预热），室温放置 3-5 min，12,000 rpm（13,400 $\times$ g）离心 1 min。将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2 min，12,000 rpm（13,400 $\times$ g）离心 1 min。

▲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50 μ L，体积过小降低DNA洗脱效率，减少DNA产量。

8. DNA可以直接使用或者存放在-20℃，但是不要超过14天。

07/相关产品

AA1904-A RNase A (10 mg/mL)

AA1702 SPARKclassic 选择性凋亡DNA Ladder抽提试剂盒

AC1709 RNase Free and DNase Free纯水

AJ0101 Spark 2000 DNA Marker

AJ0102 Spark 5000 DNA Marker

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

