



动物组织凋亡 DNA Ladder 提取试剂盒

20T

概述:

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. 本试剂可提取 107~108 细胞, 凋亡率在 20% 以上则可得到 Ladder。

组成:

- | | | |
|---------|-------|-----------------------------|
| 1. 溶液 A | 25ml | 5N 异硫氰酸胍 |
| 2. 溶液 B | 80ml | 4N NaClO ₄ PH5.2 |
| 3. 溶液 C | 1.2ml | Resin 用时充分混匀 |
| 4. 溶液 D | 15ml | 洗液 I 用时加入 15ml 无水乙醇, 充分混匀 |
| 5. 溶液 E | 12ml | 洗液 II 用时加入 18ml 无水乙醇, 充分混匀 |
| 6. 溶液 F | 3ml | TE buffer |

自备试剂: 氯仿、异丙醇。

实验步骤:

步骤:

1. a) 称取 100~300mg 动物组织, 液氮研磨, 快速转入 1.5ml 离心管, 加入 1ml 溶液 A, 用移液器反复吸打, 使之充分裂解, 室温放置 5 分钟。
b) 取 100~300mg 动物组织, 用小剪刀尽量剪碎, 加入 1ml 溶液 A, 转入 1.5ml 离心管, 冰浴超声破碎, 室温放置 5 分钟。
c) 取 100~300mg 动物组织, 用小剪刀尽量剪碎, 转入匀浆器, 加入 1ml 溶液 A, 电动匀浆。室温放置 5 分钟。
2. ≥ 8000 rpm 离心 5 分钟。
3. 将上清移入 5ml 离心管中, 加入 2.5ml 溶液 B, 50 μ l 溶液 C, 充分混匀, 室温 10~20 分钟。
4. ≥ 8000 rpm 离心 1 分钟, 弃上清。
5. 加入 800ul 溶液 B, 混匀, ≥ 8000 rpm 离心 1 分钟, 弃上清。
6. 加入 1ml 溶液 D, 充分混匀, ≥ 8000 rpm 离心 30~60 秒, 弃上清。
7. 加入 1ml 溶液 E, 充分混匀, ≥ 8000 rpm, 离心 30~60 秒, 弃上清。
8. ≥ 12000 rpm, 离心 1 分钟, 吸干上清, 室温晾干约 5~10 分钟。
9. 加入 50~100ul 溶液 F, 混匀, 40~50℃ 水浴 1~5 分钟。
10. ≥ 12000 rpm 离心 30~60 秒, 取上清, 即为 DNA。
11. 取 20~40 μ l 进行 0.8% Agarose 电泳, 观察 DNA 是否出现 Ladder 形状, 是即为已发生凋亡, 否则即为未发生凋亡或不足以检测出来。

注意事项:

1. 组织若多, 可适当加大溶液 A 和溶液 C 的用量, 其它成份不变。
2. 混匀一定要温和, 否则 DNA 大分子将被打断而部分降解。
3. 本试剂盒可检测到三个月小鼠胸腺组织 DNA Ladder。