

请在使用前仔细阅读说明书

## DNA损伤定量试剂盒-AP位点计数-

5 samples, 20 samples

### 目录

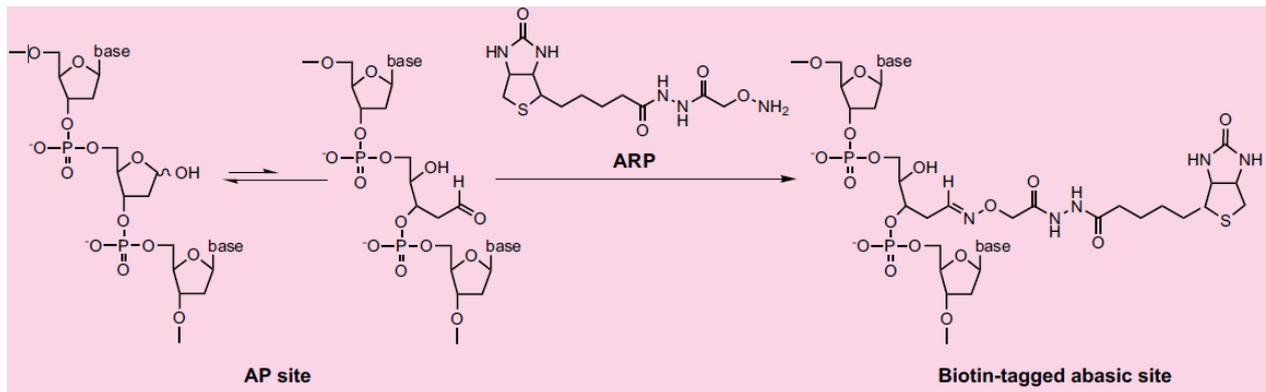
一、产品描述.....	1	五、注意事项.....	4
二、试剂盒内含.....	1	六、Q&A.....	4
三、所需设备.....	1	七、参考文献.....	4
四、操作步骤.....	1		

### 产品描述

DNA 的氧化损伤是由于 DNA 与活性氧 (ROS) 尤其是羟自由基之间的相互作用造成的。由超氧阴离子和过氧化氢通过 Fenton 反应产生的羟自由基在 DNA 中产生多重修饰。羟自由基对脱氧核糖基团的氧化攻击将导致 DNA 释放自由碱基, 产生链断裂、各种糖修饰以及单个无碱基位点 (AP 位点)。事实上, AP 位点是由 ROS 产生的损伤的主要类型。醛反应性探针 (ARP;  $\gamma$ -氨基甲基羰基胍-D-生物素) 特异性地与 AP 位点的开环上的醛基反应。通过这个反应可以检测到导致醛基形成的 DNA 修饰。用过量 ARP 试剂反应后, DNA 上的所有 AP 位点均用生物素做了标签。可以用亲和素-生物素法, 用连接到亲和素上的过氧化物酶或碱性磷酸酶做比色法检测来对这些带有生物素标签的 AP 位点进行计数。DNA 损伤定量试剂盒包含用于检测每  $1 \times 10^5$  个碱基对中 1-40 个 AP 位点的所有必需溶液。

本试剂盒仅适用于基因组 DNA 中无碱基位点 (abasic sites) 的检测。

在无碱基位点处制备 ARP 标签的机制:



### 试剂盒内容: 5 samples

ARP solution.....	100 $\mu$ l $\times$ 1管	DNA binding solution.....	10 ml $\times$ 1瓶
ARP-DNA standard solution.....	不同浓度各250 $\mu$ l	Substrate solution.....	10 ml $\times$ 1瓶
Filtration tube.....	5管	TE buffer.....	15 ml $\times$ 1瓶
Washing buffer.....	1包	HRP-streptavidin.....	25 $\mu$ l $\times$ 1管

### 20 samples

ARP solution.....	250 $\mu$ l $\times$ 1管	DNA binding solution.....	10 ml $\times$ 1瓶
ARP-DNA standard solution.....	不同浓度各250 $\mu$ l	Substrate solution.....	10 ml $\times$ 1瓶
Filtration tube.....	20管	TE buffer.....	40 ml $\times$ 1瓶
Washing buffer.....	1包	HRP-streptavidin.....	25 $\mu$ l $\times$ 1管

储存条件	运输条件
0-5°C	室温

### 所需设备

- 带有630-670 nm滤光片的酶标仪
- 培养箱

-10  $\mu$ l和200  $\mu$ l的可调式移液器，多通道移液器  
-微量离心机

## 操作步骤



1 向样品DNA溶液中加入ARP溶液。  
37°C下孵育1小时。



2 将ARP反应混合液转移到过滤管中，  
离心以纯化ARP-标记的DNA。



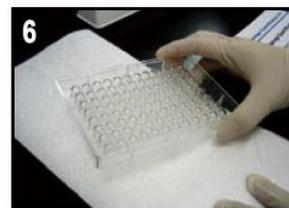
3 将ARP-DNA标准溶液或ARP标记的样品  
DNA溶液加到各孔中。加入DNA结  
合溶液，并将培养板置于室温下过夜。



4 倒掉溶液并用洗涤缓冲液洗涤各孔。  
将板放在纸巾上轻拍几次以尽可能  
干净地去缓冲液。



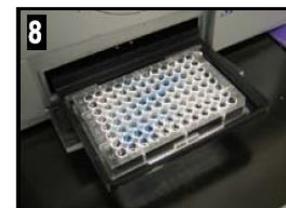
5 将HRP-链霉素和素溶液加到每孔中  
并置于37°C下孵育1小时。



6 倒掉溶液并用洗涤缓冲液洗涤各孔。  
将板放在纸巾上轻拍几次以尽可能  
干净地去缓冲液。



7 将底物溶液加入各孔中并置于37°C下  
孵育1小时。



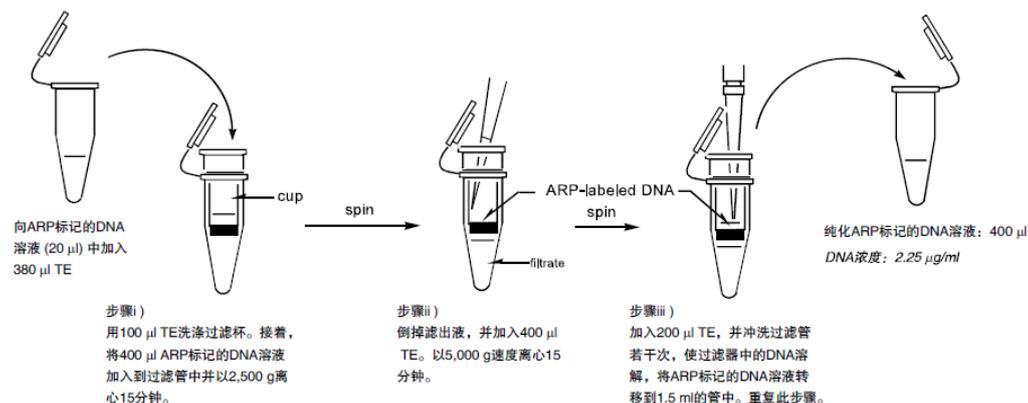
8 测定630-670 nm处的O.D.值。

## ARP反应 (制备ARP标记的DNA)

1. 用 TE buffer 溶解纯化后的 DNA，测定吸光度(260nm)。按吸光度换算浓度(DNA 浓度:以 50  $\mu$ g/l 为吸光度 1)、用 TE buffer 调节浓度至 100  $\mu$ g/ml。
  2. 在 0.5 ml 管中混合 10  $\mu$ l 纯化的基因组 DNA 溶液 (100  $\mu$ g/ml) 和 10  $\mu$ l ARP 溶液，37°C下孵育 1 小时。
  3. 用 100  $\mu$ l TE 洗涤过滤管内侧。
  4. 向 ARP 标记的 DNA 溶液中加入 380  $\mu$ l TE buffer，并将此溶液加入过滤管中。<sup>a)</sup>
  5. 以 2,500-5,000 g 离心过滤管 15 分钟，倒掉滤出液。
  6. 向过滤管内加入 400  $\mu$ l TE buffer，用移液器将过滤膜上的 DNA 重悬。
  7. 以 2,500-5,000 g 离心过滤管 15 分钟。<sup>b)</sup>
  8. 向过滤管中加入 200  $\mu$ l TE buffer 并用移液器将过滤器上的 DNA 重悬。
  9. 将 ARP 标记的 DNA 溶液转移到 1.5 ml 管中，并向过滤管中再加入 200  $\mu$ l TE buffer 以完全将 ARP 标记的 DNA 从过滤器转移到 1.5 ml 管中。<sup>c)</sup>
  10. 将 ARP 标记的 DNA 溶液储存于 0-5°C。
- a) 可用乙醇沉淀代替过滤管来纯化 ARP 标记的 DNA。乙醇沉淀后，将 DNA 沉淀物溶解到 100  $\mu$ l TE 中，并测定 DNA 浓度。  
b) 如果离心后 DNA 溶液残留在过滤器上，再离心 5 分钟，接着按步骤 7 操作。  
c) 使用过滤管的 DNA 回收率为 90%，因此 ARP 标记的 DNA 的浓度大约为 2.25  $\mu$ g/ml。为更准确地测定样品 DNA 中无碱基位点的数目，我们建议测定准确的 DNA 浓度值。

## ARP标记的基因组DNA的分离过程

### ARP标记的基因组DNA的分离过程



## DNA 中无碱基位点数目的测定

第一天

1. 用 310  $\mu\text{l}$  TE buffer 稀释 90  $\mu\text{l}$  ARP 标记的 DNA 溶液。
2. 每孔中加入 60  $\mu\text{l}$  ARP-DNA 标准溶液。每个浓度的 ARP-DNA 标准溶液三个孔。
3. 每孔中加入 60  $\mu\text{l}$  稀释的 ARP 标记的 DNA 溶液。每个样品三个孔。
4. 向每孔中加入 100  $\mu\text{l}$  DNA 结合溶液并用移液器混合几次。将培养板置于室温下过夜。

第二天

#### 5. 溶液的制备

洗涤缓冲液: 将洗涤缓冲液包的内容物溶解到 1 L 去离子水或蒸馏水中。室温储存此洗涤缓冲液。

HRP-链霉亲和素溶液: 用洗涤缓冲液稀释 HRP-链霉亲和素以制备 HRP-链霉亲和素工作液, 稀释到 4,000 倍(现配现用)。

6. 倒掉各孔中的 DNA 结合溶液并用 250  $\mu\text{l}$  洗涤缓冲液洗涤各孔 5 次。倒掉洗涤缓冲液后, 将培养板倒置并轻拍几次以完全去除该溶液。

7. 向每孔中加入 150  $\mu\text{l}$  稀释的 HRP-链霉亲和素工作液并置于 37°C 下孵育 1 小时。

8. 倒掉各孔中的溶液, 用 250  $\mu\text{l}$  洗涤缓冲液洗涤各孔 5 次。

9. 向每孔中加入 100  $\mu\text{l}$  底物溶液并置于 37°C 下孵育 1 小时。

10. 测定 630-670 nm 处的 O. D. 值, 并使用从 ARP-DNA 标准溶液孔得到的数据制作标准曲线。

11. 使用标准曲线确定基因组 DNA 中的无碱基位点的数目。

### DNA Solution Arrangement on the Plate

Standard ARP-DNA (60  $\mu\text{l}$ /well) or sample DNA (60  $\mu\text{l}$ /well) + DNA binding solution (100  $\mu\text{l}$ /well)

[ 5 samples ]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0 ARP DNA std.				blank						
C		2.5 ARP DNA std.										
D		5 ARP DNA std.				use these area for sample DNA						
E		10 ARP DNA std.										
F		20 ARP DNA std.										
G		40 ARP DNA std.										
H												

blank: 60  $\mu\text{l}$  TE Buffer + 100  $\mu\text{l}$  DNA binding solution/well

↓  
Washing (250  $\mu\text{l}$ /well)  
HRP-Streptavidin (150  $\mu\text{l}$ /well)  
Washing (250  $\mu\text{l}$ /well)  
Substrate (100  $\mu\text{l}$ /well)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D		Washing HRP-Streptavidin and Substrate										
E												
F												
G												
H												

[ 20 samples ]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		0 ARP DNA std.			sample 1	sample 5			sample 13			
B		2.5 ARP DNA std.				sample 6			sample 14			
C		5 ARP DNA std.				sample 7			sample 15			
D		10 ARP DNA std.				sample 2	sample 8			sample 16		
E		20 ARP DNA std.					sample 9			sample 17		
F		40 ARP DNA std.			sample 10			sample 18				
G		blank			sample 11			sample 19				
H		sample 4			sample 12			sample 20				

blank: 60  $\mu\text{l}$  TE Buffer + 100  $\mu\text{l}$  DNA binding solution/well  
Do not use column 1 and 12

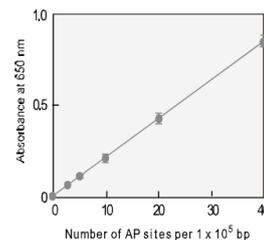
↓  
Washing (250  $\mu\text{l}$ /well)  
HRP-Streptavidin (150  $\mu\text{l}$ /well)  
Washing (250  $\mu\text{l}$ /well)  
Substrate (100  $\mu\text{l}$ /well)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D		Washing HRP-Streptavidin and Substrate										
E												
F												
G												
H												

### 如何制备典型标准曲线

1. 计算每个 ARP-DNA 标准溶液的平均 O. D. 值。
  2. 用平均 O. D. 值 - 空白 O. D. 值。<sup>a)</sup>
  3. 绘出标准溶液的 AP 位点数目对应的 O. D. 值。  
X 轴为 AP 位点数目, Y 轴为 O. D. 值。
  4. 使用此标准曲线确定样品中的 AP 位点数目。
- a) 空白 O. D. 值约为 0.04-0.06, 且 40 个 ARP-DNA 标准溶液的 O. D. 值约为 0.8-1.0。O. D. 值取决于 HRP-链霉亲和素的活性。

典型标准曲线



## 注意事项

- 1、 请将试剂盒在0-5°C保存，不要冷冻。Washing buffer Solution在室温保存。
- 2、 AP-DNA不稳定，从样品中分离出基因组DNA后请用ARP处理并用过滤管纯化。纯化的ARP-DNA在0-5°C可以保存1年。
- 3、 纯化ARP-DNA后应立即加入200 µl TE buffer，如果旋转震荡后的DNA放在过滤管中超过30分钟，DNA的回收率会下降。
- 4、 在混合DNA Solution和DNA Binding Solution时，使用γ射线消毒的过滤管会造成DNA粘附在过滤管上，如果一定要使用过滤管，请不要使用γ射线消毒的过滤管。
- 5、 如果想精确测定样品DNA的AP位点数量，建议重复多次测定。
- 6、 如果样品DNA Solution少于10 µl，请用等量的ARP Solution，在用过滤管纯化后要测定DNA的浓度。
- 7、 在测定时如果没有630-670 nm的滤光片，可以从每孔中吸取50 µl溶液到一个新的96孔板中，每孔加入50 µl 1 M浓度的硫酸（sulfuric acid），在450 nm波长处检测。
- 8、 剩余的溶液会带来误差，在每一步可以采用在纸巾上充分拍打96孔板的方式去除剩余的溶液。

## Q&A

· 可否使用单链 DNA 或 RNA?

不可以将此试剂盒用于确定单链 DNA 或 RNA 的无碱基位点的数目。由于微量培养板上的结合效率，单链 DNA 的 O.D. 读数约为双链 DNA 的两倍。

· 如何储存基因组 DNA?

如果 DNA 不能在分离后立即用 ARP 标记，则制备 DNA 片状沉淀物并存放于-20°C或-80°C。ARP 标记后，样品可于 4°C下在 TE 缓冲液中存放几个月。

· 如何制备 DNA?

您可以使用常用的方法或购买 DNA 分离试剂盒。在 DNA 分离过程中，每  $1 \times 10^5$  个碱基对会产生 2-4 个无碱基位点。因此，使用相同分离方法制备每个 DNA 样品。

· 如果平均每  $1 \times 10^5$  个碱基对有不 40 个无碱基位点，如何确定无碱基位点的数目?

将 ARP 标记的样品 DNA 用 0 ARP-DNA standard solution 稀释，具体稀释方法请咨询客户服务，400-823-9388，[info@dojindo.cn](mailto:info@dojindo.cn)。

· 如果样品 DNA 浓度低于 100 µg/ml，应该怎么办?

可以使用过滤管浓缩您的样品 DNA 或用乙醇沉淀把 DNA 制成片状沉淀物并将其溶解制备成 100 µg /ml 的溶液。

· 如果样品 DNA 少于 1 µg 该怎么办?

加入相同体积的ARP溶液并依照操作手册操作。ARP标记的DNA的回收率可能低于通常的反应，因此测定该ARP标记的DNA溶液。0.5 µg DNA和0.25 µg DNA的平均回收率分别为70%和50%。

## 参考文献

1. I.T.Lindahl, *et al.*, *Biochemistry*, **11**, 3610(1972).
2. K.Kubo, *et al.*, *Biochemistry*, **31**, 3703(1992).
3. H.Ide, *et al.*, *Biochemistry*, **32**, 8276(1993).
4. A.Asaeda, *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, **17**, 503(1998).
5. J.Nakamura, *et al.*, *Cancer Res.*, **58**, 222(1998).
6. P.Mon *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **277**, 28663(2002).
7. J.A.Gralnick, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **278**, 20708(2003).
8. J.W.Pippin, *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **111**, 877(2003).
9. M.Satoh, *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **305**, 1183(2003).

如果您需要更多的信息或者有任何问题可以通过以下方式联系我们：

上海

上海市零陵路 899 号飞洲国际广场 27 楼 J 座

邮编：200030

电话：800-988-0083

网址：<http://www.dojindo.cn>

北京

北京市朝阳区德外马甸裕民路 12 号元辰鑫大厦 E1-210 室

邮编：100029

电话：010-8225-1765

E-mail：[info@dojindo.cn](mailto:info@dojindo.cn)

修订日期：2014-7-24