

彗星电泳试剂盒

产品编号	产品名称	包装
C2041S	彗星电泳试剂盒	20次
C2041M	彗星电泳试剂盒	100次

产品简介:

- 碧云天生产的彗星电泳试剂盒(Comet Assay Kit), 也称彗星检测试剂盒、彗星电泳检测试剂盒、彗星电泳DNA损伤检测试剂盒(DNA Damage Comet Assay Kit), 是一种简单、快速、高效的通过电泳检测单细胞DNA损伤的试剂盒。彗星电泳实验也被称为单细胞凝胶电泳检测(Single Cell Gel Electrophoresis Assay, SCGE), 是一种快速检测单细胞DNA损伤的实验方法, 因在电泳时观察到的DNA受损细胞形似彗星的图像, 故称彗星电泳或彗星试验[1]。
- 常见的DNA损伤有碱基修饰、DNA链内和链间交联、DNA单链断裂(Single strand-breaks, SSBs)以及DNA双链断裂(Double-strand breaks, DSBs)等, 其中DSBs被认为是最严重的DNA损伤。引起DNA产生DSBs的物理或化学因素有紫外线照射、电离辐射(X、 γ 射线等)、遗传毒性化学物质和化疗药物等。DSBs的无效修复或错误修复可以引发基因组紊乱, 最终导致肿瘤及其它相关疾病的发生[2]。
- 根据DNA损伤的原理, DNA的损伤检测可以分为三类: 基于损伤DNA理化性质的改变, 如彗星实验; 基于分子杂交, 如荧光原位杂交法(Fluorescence in situ hybridization, FISH); 基于DNA损伤后形成的产物检测DNA损伤, 如检测磷酸化的H2AX、暴露的3'-OH (TUNEL检测)和8-OHdG等。前两种方法是基于荧光标记直接观测DNA的损伤情况, 而基于DNA损伤后形成产物检测DNA损伤是通过标记物间接反映DNA的损伤程度。本彗星电泳试剂盒基于荧光标记直接检测DNA的损伤情况, 最初由Östling和Johansson在1984年发明, 此后由Singh等在1988年改进, 此后成为评估DNA损伤与修复、遗传毒性检测常用的标准实验技术[3-6]。
- 彗星电泳是一种检测真核细胞DNA损伤的常用方法, 其检测原理如下。低熔点琼脂糖凝胶具有在37°C下保持溶液状态的特点, 可保持细胞的原有状态, 不会造成额外的DNA损伤, 避免了正常熔点琼脂糖需要更高温度熔解而导致的细胞损伤。因此将细胞包埋在含有低熔点琼脂糖凝胶的载玻片上, 细胞经裂解后, 正常细胞细胞核中的大分子DNA由于其完整性, 在电场作用下迁移速率基本一致, DNA荧光染色仍然能保持细胞核的形态或有非常轻微的拖尾; 如果DNA发生单链或双链断裂, 在电场作用下, 不同分子量的DNA呈现不同的迁移速率, 大分子DNA迁移速率较低, 而小分子DNA片段迁移速率较快, 荧光染色后, 大分子DNA仍然呈现细胞核样的形态, 形似彗星的头部(Comet head), 小分子DNA呈现逸出细胞核的拖尾形态, 形似彗星的尾巴(Comet tail)。DNA损伤越严重, 小分子DNA片段就越多并且片段越小, 电泳时的迁移速率越快, 彗星状拖尾就越长。因此, 通过测定彗尾部分的光密度或长度就可定量测定单个细胞DNA损伤程度[6]。使用本试剂盒检测HeLa细胞中DNA损伤的效果参考图1。

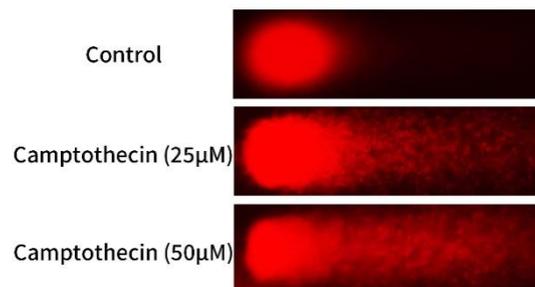


图1. 碧云天彗星电泳试剂盒(C2041)检测HeLa细胞中DNA损伤的效果图。正常培养条件下的HeLa细胞中(Control), 几乎没有彗星状拖尾, 说明DNA很完整; 在25 μ M或50 μ M Camptothecin (SC0141)诱导1小时后, 部分细胞核出现明显的彗尾, 说明DNA出现不同程度的损伤。实际染色效果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中效果仅供参考。

- 根据裂解液的差异, 彗星电泳可以分为中性彗星电泳和碱性彗星电泳。中性彗星电泳, 主要用于检测DNA双链的断裂; 碱性彗星电泳, 灵敏度更高, 可以检测更少量的单双链断裂、DNA的碱性不稳定位点及不完整切除修复引起的DNA链的断裂等。本试剂盒采用了常用的碱性彗星电泳法。
- 本试剂盒小包装可以检测20个样品, 中包装可以检测100个样品。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C2041S-1	Lysis Buffer	200ml
C2041S-2	DMSO	20ml

C2041S-3	Normal Melting Point Agarose	100mg
C2041S-4	Low Melting Point Agarose	70mg
C2041S-5	Propidium Iodide Solution	400µl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C2041M-1	Lysis Buffer	500ml×2
C2041M-2	DMSO	100ml
C2041M-3	Normal Melting Point Agarose	500mg
C2041M-4	Low Melting Point Agarose	350mg
C2041M-5	Propidium Iodide Solution	2ml
—	说明书	1份

保存条件：

4°C保存，一年有效。其中Propidium Iodide Solution须避光保存。DMSO、Normal Melting Point Agarose、Low Melting Point Agarose也可室温保存。

注意事项：

- Lysis Buffer必须完全溶解后再使用，如有沉淀，可37°C水浴充分溶解。
- 从细胞裂解步骤开始，所有的试剂均应提前在4°C预冷后用于细胞，并在裂解、解旋、电泳、中和过程中保持4°C低温状态及避光，防止诱发额外的DNA损伤。重点注意避免日光、日光灯等中的紫外线对DNA的损伤。
- 需使用不含钙、镁离子的PBS，推荐使用碧云天的PBS (C0221A)。
- DNA损伤的阳性对照可通过一定浓度的Camptothecin (SC0141)、Cisplatin (S1552)和Etoposide (SC0173)等进行诱导，具体可参考碧云天的DNA损伤检测试剂盒(γ-H2AX免疫荧光法) (C2035)，也可以使用100µM过氧化氢或25µM KMnO₄在4°C处理20分钟。
- 本试剂盒中Propidium Iodide Solution对人体有害，操作时请小心，并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 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. 用户自备仪器、耗材和试剂。

- 仪器、耗材：水平电泳仪、荧光显微镜、微波炉、恒温水浴箱、载玻片和盖玻片。推荐使用碧云天的专门用于彗星电泳分析的载玻片(Comet Assay Slide)(FSL061)或粘附载玻片(表面带正电荷) (FSL051)和精装盖玻片(18×18) (FCGF18)等。
- 试剂：PBS (C0221A)，中性缓冲液(0.4M Tris-HCl, pH7.5，可使用1M Tris-HCl, pH7.5 (Sterile, DNase free) (ST775)进行配制)，电泳缓冲液(1mM EDTA (pH8.0)，200mM NaOH，无须调整pH，最终pH约为13)。电泳缓冲液的配制如下表所示，推荐使用ST876 BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)进行配制。注：中性缓冲液及电泳缓冲液需新鲜配制后置于4°C预冷。

Reagent	Volume
NaOH	4g
0.5M EDTA (ST066)	1ml
Ultrapure Water	499ml
Total Volume	500ml

2. 试剂盒的准备。

- 1%正常熔点琼脂糖凝胶配制：根据琼脂糖凝胶的浓度和体积计算出所需琼脂糖的重量，称取适量正常熔点琼脂糖(Normal Melting Point Agarose)加入合适的容器(如50ml离心管(FTUB550))中，加入适量的PBS后加热溶解。例如100mg正常熔点琼脂糖中加入10ml PBS，适当晃动混匀琼脂糖粉末，微波炉加热煮沸琼脂糖溶液或置于90-100°C水浴中至完全溶解。随后置于45°C水浴中冷却后备用。未使用完的1%正常熔点琼脂糖凝胶可在4°C保存，下次重新溶解后使用。
注：如有必要可以在液面处作一标记，以便于部分水分挥发后可以用超纯水或去离子水补充至最初的体积。
- 0.7%低熔点琼脂糖凝胶配制：根据琼脂糖凝胶的浓度和体积计算出所需低熔点琼脂糖的重量，称取适量低熔点琼脂糖(Low Melting Point Agarose)加入合适的容器(如50ml离心管(FTUB550))中，加入适量的PBS后加热溶解。例如70mg低熔点琼脂糖中加入10ml PBS，适当晃动混匀低熔点琼脂糖粉末，70-80°C水浴5-10分钟，使琼脂糖溶液完全溶解。随后置于37°C水浴中冷却至少20分钟后备用。未使用完的0.7%低熔点琼脂糖凝胶可在4°C保存，下次重新溶解后使用。
注1：低熔点琼脂糖在37°C水浴中冷却至少20分钟非常重要，否则过高的温度会引起DNA的损伤。
注2：低熔点琼脂糖最好在70-80°C水浴中溶解，不要用微波炉。
注3：低熔点琼脂糖溶液可以在37°C保持溶液状态1-2小时。

3. 样品的准备。

- a. 贴壁细胞: 收集细胞上清(含悬浮的细胞), 贴壁细胞用胰酶消化, 收集细胞悬液后和收集的细胞上清混合, 离心去除上清。细胞用冰浴预冷的PBS洗涤一次, 离心收集细胞沉淀, 加入适量PBS重悬使细胞密度为 1×10^6 个/ml。
- b. 悬浮细胞: 收集细胞悬液后离心去上清, 细胞用冰浴预冷的PBS洗涤一次, 离心收集细胞沉淀, 加入适量的PBS重悬使细胞密度为 1×10^6 个/ml。
- c. 组织样品: 将组织参考文献方法例如使用胰酶、胶原酶等消化处理制作成细胞悬液, 然后参考悬浮细胞进行操作。

注1: 细胞最好是新鲜制备的。如果使用冻存的细胞, 需要先确定冻存是否会对细胞造成额外的DNA损伤。

注2: 每次实验, 需要设置未经处理的正常细胞作为空白对照(Control)。

4. 制片。

- a. 第一层凝胶的制备: 该层为1%正常熔点琼脂糖凝胶。将载玻片的磨砂面朝上, 45°C 预热, 将预热的 $30\mu\text{l}$ 1%正常熔点琼脂糖凝胶铺在彗星电泳载玻片的圆孔内或载玻片上, 盖上盖玻片, 4°C 放置10分钟使其凝固。轻轻移去盖玻片, 室温放置备用, 此时凝胶为薄薄的一层。

注1: 盖上盖玻片时须避免产生气泡。

注2: 移去盖玻片时先轻轻推移, 使盖玻片适当移位后, 再用尖头镊子慢慢掀开, 避免把胶弄破。去掉盖玻片后, 室温放置晾干过夜, 第一层凝胶的贴壁效果更好。 $18 \times 18\text{mm}$ 的盖玻片比 $24 \times 24\text{mm}$ 的更容易移去, 推荐使用 $18 \times 18\text{mm}$ 的盖玻片。

注3: 对于未测试过的载玻片, 建议先确定正常熔点琼脂糖凝胶在该载玻片上不脱落。也可使用适当的毛玻璃或磨砂载玻片, 凝胶不容易脱落, 也不影响后续荧光观察。

- b. 第二层凝胶的制备: 该层为含有细胞悬液的低熔点琼脂糖。将 $10\mu\text{l}$ 细胞(约 10^4 个)和 $75\mu\text{l}$ 37°C 水浴的0.7%低熔点琼脂糖混合均匀, 然后迅速吸取 $70\mu\text{l}$ 滴加到第一层凝胶上, 用移液器吸头轻轻的铺开铺匀, 覆盖整个第一层胶, 或盖上盖玻片, 4°C 放置10分钟使其凝固。

注1: 铺胶时须避免有气泡产生。如样品较多, 可以在放置在 37°C 水浴中的 1.5ml 离心管中分装好低熔点琼脂糖, 再加入细胞混匀, 混好后及时铺胶, 防止胶凝固。

注2: 一般情况, 只需用移液器吸头轻轻的铺开铺匀, 无须盖上盖玻片。盖上盖玻片, 后续移去时可能会使第二层凝胶脱落。

- c. 第三层凝胶的制备(选做): 第二层凝胶凝固后, 滴加 $75\mu\text{l}$ 37°C 预热的0.7%低熔点琼脂糖。盖上一片新盖玻片, 4°C 放置30分钟使其凝固。铺胶时须避免有气泡产生。

注: 双层凝胶法制片, 既能使凝胶有较好的附着, 又能使细胞尽可能多的处于同一平面, 染色效果更好; 三层胶一定程度上解决了脱落漂浮的问题, 但可能会影响观察的效果。

5. 细胞裂解。

- a. 裂解液的配制: 按照Lysis Buffer与DMSO的比例为9:1配制裂解液, 例如取 9ml Lysis Buffer加入 1ml DMSO, 混匀即得 10ml 裂解液。配制完毕后, 置于 4°C 预冷备用。**注:** 裂解液须现用现配。裂解液在室温可能会出现浑浊, 充分混匀后或混匀后置于 4°C 会变澄清。

注: 如果细胞或组织样品中含有红细胞或血红蛋白(hemoglobin), DMSO可避免其中的亚铁血红素(heme)中的铁催化产生的活性氧而导致的DNA损伤。如果样品中不含血红蛋白或亚铁血红素, 裂解液中也可以不加入DMSO。

- b. 如果有盖玻片, 参考步骤4a轻轻移去盖玻片, 将载玻片置于 10cm 培养皿中, 倒入约 10ml 预冷的裂解液, 淹没凝胶和载玻片。 4°C 裂解1-2小时或过夜, 取出载玻片用PBS漂洗3分钟。

6. DNA解旋。

将载玻片置于水平电泳槽中, 倒入电泳缓冲液, 至少高于载玻片胶面 0.25cm 左右, 室温放置20-60分钟。该步骤使DNA双链在碱性条件下解螺旋, 并使断裂的小片段DNA在电场中易于迁移。

7. 电泳。

电泳可在任何水平电泳槽中进行, 电泳电压一般为低电压 25V ($\sim 0.75\text{-}1\text{V}/\text{cm}$), 电泳时间通常在20-30分钟的短时间内进行。

注1: 电泳时宜低温最好是冰浴, 并避光。推荐在冷库或 4°C 冰箱中避光电泳。不同电泳槽的电泳时间需要适当调整, 保持电场强度约 $0.75\text{-}1\text{V}/\text{cm}$ 即可。

注2: 电压过高或电泳时间过长, 非受损细胞的DNA也可能会出现彗星形态的假阳性结果; 反之, 电压过低或时间过短, 小片段DNA电泳不充分, 受损细胞无彗星拖尾而造成假阴性结果。

8. 中和与染色。

电泳后将载玻片置于平皿内, 加入中性缓冲液, 将载玻片没入即可, 4°C 中和1-3次, 每次5-10分钟, 弃去中性缓冲液, 在载玻片上滴加约 $20\mu\text{l}$ Propidium Iodide Solution, 避光染色10-20分钟。然后超纯水(Ultrapure Water)洗涤3次, 盖上盖玻片, 随后即可在荧光显微镜下观察。

注1: 凝胶在细胞裂解、DNA解旋、电泳和中和之后与载玻片的结合可能不如之前紧密, 因此在电泳和中和后要轻取轻放, 宜水平轻轻取出, 以免凝胶脱落。

注2: 如果使用透明载玻片, 一般中和1次, 5分钟即可, 中和次数越多, 凝胶越容易脱落。中性缓冲液浸没载玻片即可, 太多会使凝胶脱落。

注3: 也可以使用EB、DAPI、SYBR Gold、SYBR Green、NA-Red、Gel-Red、NA-Green、Gel-Green等荧光染料或银染的方式进行染色, 并用相应的检测方法进行检测。

9. 观察、拍照和实验结果分析。

- a. 观察和拍照: 在荧光显微镜下观察, Propidium Iodide为红色荧光, $\text{Ex}/\text{Em}=535/617\text{nm}$ 。

- b. 结果分析: 碱性彗星电泳测定DNA损伤常见的**性状指标**有彗星细胞率, **距离指标**有彗星总长、尾长、彗星头部半径、彗星尾部半径等, **强度指标**有头部DNA百分含量、尾部DNA百分含量、头部面积、尾部面积等, **矩类指标**包括尾矩等。尾长(Length of

Tail), 即未损伤的大分子DNA和损伤的小分子DNA迁移的长度差(图2中的Tail), 在低损伤剂量范围内与DNA损伤呈线性关系; 尾部DNA百分比(Percentage of DNA in the Tail, Tail DNA %), 是尾部占总细胞DNA的百分比; 尾矩(Tail Moment), 即尾长与尾部DNA百分含量之乘积, 在高损伤剂量下与损伤程度呈线性关系, 是结合了尾部DNA的量与相对于细胞核的迁移距离。最重要的两个指标是尾部DNA百分含量和尾矩, 具体计算方式如下:

Tail DNA (%) = 100 × Tail DNA Intensity / Cell DNA Intensity

Tail Moment有两种计算方式:

(a) Olive Tail Moment=Tail DNA (%) × Tail Moment Length*

(b) Extent Tail Moment=Tail DNA (%) × Length of Tail

*Tail Moment Length is measured from the center of the head to the center of the tail (参见图2)。

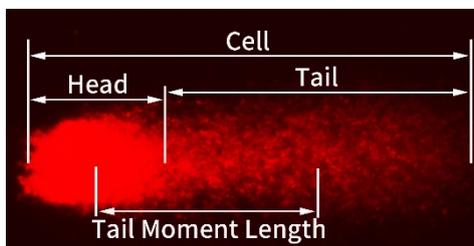


图2. 彗星电泳中细胞DNA损伤的尾矩。

- c. DNA损伤判定: 每个样品随机选择50-100个细胞, 测定相应指标。DNA损伤按尾部DNA百分比的比例分为5级, 可使用:
- 0级: <5% 无损伤;
 - 1级: 5~20% 轻度损伤;
 - 2级: 20~40% 中度损伤;
 - 3级: 40~95% 高度损伤;
 - 4级: >95% 重度损伤。

参考文献:

1. Malyapa RS, Bi C, Ahern EW, Roti Roti JL. Radiat Res. 1998. 149(4):396-400.
2. Parshad R, Sanford KK. Crit Rev Oncol Hematol. 2001. 37(2):87-96.
3. Gabriela Figueroa-González, Carlos Pérez-Plasencia. Oncol Lett. 2017. Jun; 13(6): 3982-3988.
4. Marc D. Roy. Biotechniques. 2018. VOL. 42, NO. 4.
5. D.V.Firsanov, L.V.Solovjeva, V.M.Mikhailov, M.P.Svetlova. Genome Stability. 2016. pp. 635-649.
6. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. Exp Cell Res. 1988. 175(1):184-91.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
C0007	细胞凋亡-DNA Ladder抽提试剂盒	50次
C1091	TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(显色法)	20次
C1098	TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(显色法)	50次
C1089	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(红色荧光)	20次
C1090	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(红色荧光)	50次
C1086	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)	20次
C1088	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)	50次
C2035S	DNA损伤检测试剂盒(γ -H2AX免疫荧光法)	>100次
C2041S	彗星电泳试剂盒	20次
C2041M	彗星电泳试剂盒	100次
FSL061-5pcs	彗星电泳载玻片(2孔)	5片/盒
FSL061-25pcs	彗星电泳载玻片(2孔)	5片/盒, 5盒/箱

Version 2023.10.30