



**ELK Biotechnology**

For research use only.

## 彗星法 DNA 损伤检测试剂盒

### Reagent Kit for Single Cell Gel

### Electrophoresis Assay

货号	规格	储藏
CA001	50 rxn	4C°

### 产品介绍

DNA 在自由基 (如·OH) 的攻击下容易发生损伤, 即脱氧戊糖遭到破坏, 磷酸二脂键的断裂, 碱基的破坏或脱落, 便可进一步产生单链断裂或双链断裂。将细胞固定于低熔点琼脂糖中, 取少量细胞涂在载玻片上, 用碱高盐溶液破坏细胞膜, 再用碱溶液使 DNA 分子解旋。将载玻片置于电泳液中, 在电场的作用下, DNA 分子向阳极移动。如果 DNA 损伤严重, 碎片多, 则电泳速度快。未受损伤的 DNA 大分子则由于细胞膜的阻隔, 滞留在原处。用 PI 染色或银染, 可观察到 DNA 受损的细胞形同彗星现象, 作定性分析。也可用相关的软件作定量分析。

### 试剂组成

组分	50 rxn	保存温度
Lysis Buffer	250 ml	RT
DMSO	25 ml	RT
4mM Tris-Hcl	100 ml	RT
低熔点琼脂糖 LMA	10 ml	4°C
正常熔点琼脂糖NMA	50 mg	RT
Propidium Iodide(PI)	1 ml	4°C
两孔载玻片	25片	RT



## ELK Biotechnology

For research use only.

### 所需仪器及自备试剂

1. 低速离心机
2. 水平电泳仪
3. 荧光显微镜
4. 恒温水浴箱
5. 盖玻片
6. 微量移液器及1.5mL Microtube
7. PBS
8. 碱性电泳缓冲液

### 注意事项

实验试剂有毒，操作时要戴手套。

### 实验前准备

1. Lysis Solution  
使用前每10mL Lysis Buffer中加入1mL DMSO，混匀后4°C或冰上放置。Lysis Solution现配现用，于细胞裂解前20min配置好。
2. Comet LMAgarose  
试剂盒配备的LMAgarose为即用型。实验前，将LMAgarose置于90°C-100°C水中5min或直至融解，再放置于37°C~42°C水浴锅中至少20min等待试剂冷却。
3. 0.5%正常熔点琼脂糖  
PBS配制0.5%正常熔点琼脂糖，现配现用。
4. 0.4mM Tris-Hcl缓冲液  
每90mL dH<sub>2</sub>O中加入10mL 4mM Tris-Hcl。

### 操作步骤

1. 细胞用预冷的 PBS 洗一次，离心收集，用 PBS 重悬使其密度为  $1 \times 10^6$  个/mL；
2. 第1层凝胶的制备：将载玻片37°C~42°C预热，将100μL的0.5%正常熔点琼脂糖（NMA）铺于载玻片上，盖上干净的盖玻片，再置4°C下10min使 NMA 凝固。
3. 第2层凝胶的制备：将 10μL 细胞（约  $10^4$  个）和 75μL的低熔点琼脂糖 LMA混合均匀。然后，轻轻揭去盖玻片，迅速将含细胞的 LMA 滴到第 1 层琼脂糖上，立即盖上另一干净盖玻片，置 4°C10min 使第2 层 LMA 凝固。



**ELK Biotechnology**  
For research use only.

4. 第3层凝胶的制备：第2层 LMA 凝固后，在室温下小心移去盖玻片，滴加预热的 75 $\mu$ L 低熔点琼脂糖 LMA，盖上盖玻片 4 $^{\circ}$ C 下凝固（第三层覆盖第二层周围 0.5mm，增加凝胶化作用时间至 30min，高湿度环境）。
5. 细胞裂解：移去盖玻片，将玻片置于平皿中，倒入预冷的 Lysis Buffer（使用前每 9mL 加入 1mL 的 DMSO），4 $^{\circ}$ C 裂解 1~2h，取出载玻片用 PBS 漂洗。
6. DNA 碱解旋：将载玻片置于水平电泳槽。倒入新配制的碱性电泳缓冲液，约覆过载玻片胶面 0.25cm 左右，室温放置 20~60min，以便使 DNA 在碱性条件下解螺旋和产生碱易变性区段，使 DNA 断链在电场中易于迁移。



## **ELK Biotechnology**

**For research use only.**

7. 单细胞电泳：电压 25V，电泳 20~30min，电压、电流可用改变缓冲液面高低来调节。
8. 中和与染色：电泳后将载玻片置于平皿内。加入0.4mM Tris-HCl缓冲液，将载玻片没入，4°C中和三次，每次5min，弃去Tris-HCl 缓冲液，每载玻片加 10 $\mu$ L 的PI染液，盖上盖玻片，避光染色 10min。
9. 观察、拍照和分析：荧光显微镜 515~560nm 波长的激发光。PI 染色的 DNA 图象呈红色，可清楚地观察到核 DNA 和迁移的 DNA（即慧星尾）。每个样本随机选择100个细胞，测定核 DNA 直径和DNA迁移的长度，并用相应的软件分析。

DNA 损伤按慧星尾部 DNA 量占全部 DNA 量的比例分为 5 级：

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。