

彗星检测试剂盒

货号: CSP167

包装规格: 12T/24T/48T

一、产品简介

当各种内外源DNA损伤因子诱发细胞DNA链断裂时，DNA的超螺旋结构受到破坏，采用化学方法使细胞膜、核膜破裂，细胞内的蛋白质、RNA以及其它成分均扩散到细胞裂解液中，而核DNA由于分子量太大只能留在原位。在碱处理和碱性电解质的作用下，DNA发生解螺旋，损伤的DNA断链及片段被释放出来，在电泳过程中会离开核DNA向阳极移动，形成彗星状的图像，而未损伤的DNA部分保持球形。DNA受损越严重，产生的断片越多并且片段越小，电泳时迁移的DNA量也就越大，荧光显微镜下可观察到尾部荧光强度增强。

产品优势:

- (1) 采用单层凝胶体系，操作简便；
- (2) 载玻片表面经过特殊处理，粘附力强，有效降低脱胶风险；
- (3) 搭配直径 12mm 盖玻片，增加单个载玻片的实验通量；
- (4) 凝胶经 70%酒精脱水烘干后染色，有效解决镜检时不易聚焦的问题。

二、试剂盒组成

组分	6T(试用装)	12T	24T	48T
Comet Agarose	4mL	8mL	15mL	15mL×2
Lysis Solution	25mL	50mL	100mL	100mL×2
Comet Slide	1	2	4	8
10×Alkaline Solution	60mL	125mL	250mL	250mL×2
Propidium Iodide(PI)	1mL	1mL×2	4mL	4mL×2

保存: PI染色液需 4℃避光保存，其余试剂室温保存即可，有效期6个月。

三、操作步骤

1. 自备试剂: 1×PBS 缓冲液(不含钙镁离子)、去离子水、无水乙醇、DMSO(可选)。
2. 拧松 Comet Agarose 瓶盖，90-100℃水浴至少水浴 5min，转移全部凝胶至 50mL 离心管中(凝胶体积<容器体积 1/3)，拧松盖子，微波炉加热至液体沸腾(加热时间很短暂，应仔细观察液面，不可过沸至液体溢出)。初次实验时应对凝胶进行分装，每支 5mLEP 管中最多加入 1mL 凝胶溶液，4℃保存。后续实验时，90-100℃水浴约 10min 即可使 EP 管内凝胶充分融化。样本处理前，将充分融化的凝胶溶液转移至 37℃水浴锅中放置备用(需至少平衡 20min 后方可使用)。
3. Lysis Solution 使用前需 4℃预冷至少 20min，若长期保存，室温即可，4℃长期放置会有沉淀析出。(选做)对于富含亚铁血红素的样本(如血细胞、组织样本等)，Lysis Solution 需额外添加 10%DMSO(如 45mL Lysis Solution+5mL DMSO)。
4. 解旋液配制: 将 10×Alkaline Solution 用去离子水稀释后(如 5mL 10×Alkaline Solution

+45mL 去离子水), 室温放置备用。

5. 电泳液配制: 将 10×Alkaline Solution 用去离子水稀释后(如 50mL 10×Alkaline Solution +450mL 去离子水), 4°C 冷藏备用(预冷时间应不小于 4h)。

四、操作说明(示意图见尾页)

1. **样本处理:** 用冷的 1×PBS 缓冲液(不含钙镁)重悬细胞, 调整细胞密度为 3×10^5 个/mL。
2. **铺胶:** 按照 1:10(v/v) 将细胞悬液与融化后的 Comet Agarose(37°C) 在 EP 管(可直接放置于 37°C 水浴) 中充分混合(如 10μL 细胞悬液+100μL Comet Agarose), 迅速吸取 30μL 混合液(约 900 个细胞)滴加至载玻片表面, 立即加盖盖玻片, 凝胶自动延展, 转移载玻片至干燥的容器中水平放置, 4°C 避光固化 30min。

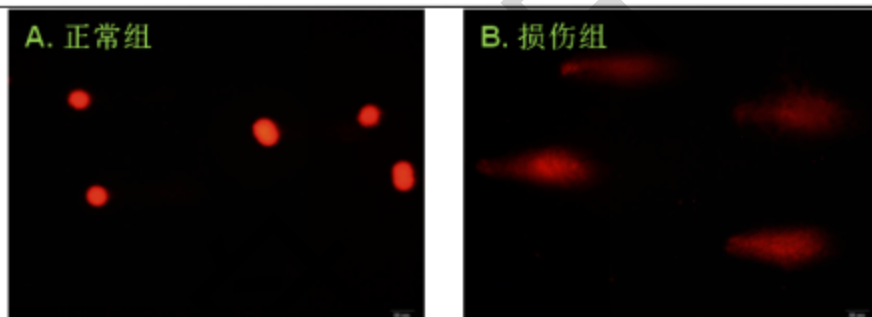
注意: 每次点样均应使用新的移液器吸头, 且待测样本较多时应逐个进行混样、点样, 不可同时混样。

3. **裂解:** 用指腹小心将盖玻片推开, 可见光滑平整的圆形单层凝胶。将载玻片轻柔浸入装有 4°C 预冷的 Lysis Solution 的容器中水平放置, 4°C 裂解 1h-2h(可自行摸索样本最佳裂解时间, 最长至 4°C 裂解过夜)。
4. **洗涤:** 取出载玻片, 并沥去多余液体。放入装有蒸馏水的水平容器中浸洗 2 次, 每次 5min。
5. **解旋:** 取出载玻片, 并沥去多余液体。水平容器中倒入适量新鲜配制的解旋液, 将载玻片轻柔浸没其中, 室温避光解旋 20min。
6. **电泳:** 水平电泳仪中倒入 4°C 充分预冷的电泳液(预冷时间不小于 4h), 书写区朝向负极, 将载玻片轻柔浸入电泳液中。按照 1V/cm 设定电压(如正负极水平间距 25cm, 即设置电压为 25V), 调节电泳液液面高度使电流接近 300mA, 电泳 15-30min。

注意: 电泳时间延长会导致电泳液温度持续升高, 可通过在电泳仪四周放置冰袋来控制电泳温度, 避免高温导致凝胶脱片。

7. **中和:** 取出载玻片, 并沥去多余液体。放入装有蒸馏水的水平容器中浸洗 2 次, 每次 5min。
8. **烘干:** 取出载玻片, 并沥去多余液体, 将载玻片轻柔浸没 70% 酒精溶液中, 室温放置 5min, 取出沥干, 37°C 烘干 15min 至凝胶完全干燥。
9. **染色:** 每个样本滴加 150μL 染色液, 室温避光染色 10min, 沥去染色液, 蒸馏水浸洗 2 次, 每次 10min。
10. **观察及分析:** 荧光显微镜下观察, 并进行图片采集。图片采集时应保持凝胶湿润。可使用彗星分析软件(如 CASP, <https://casplab.com/>), 得出彗星尾长(tail length of comet, TL)、彗星 DNA 比例(percent DNA in the tail, TD)、彗星尾距(tail moment, TM)等参数。DNA 损伤按彗星尾部 DNA 量占全部 DNA 量的比例可分为 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。

示例



五、注意事项

- ✓ 本产品仅限于科学研究使用。
- ✓ 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套和口罩操作。
- ✓ 载玻片与盖玻片均为特殊耗材，不可自行替换，不可擦拭，不可重复使用，否则脱胶风险显著增加。
- ✓ 为避免操作不当引起脱胶，勿将溶液直接倾倒在玻片上，需将载玻片轻柔浸没在溶液中。
- ✓ 除沥去液体时，应始终保持玻片水平放置。

操作示意图

