彗星实验试剂盒(碱性)

产品编号：CTCC-M001

包装规格：6T/12T/24T/48T

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。

本试剂盒具有以下特点：

(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。

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。

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。

试剂制备

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 管内凝胶充分熔化。样本处理前，将充分熔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)。

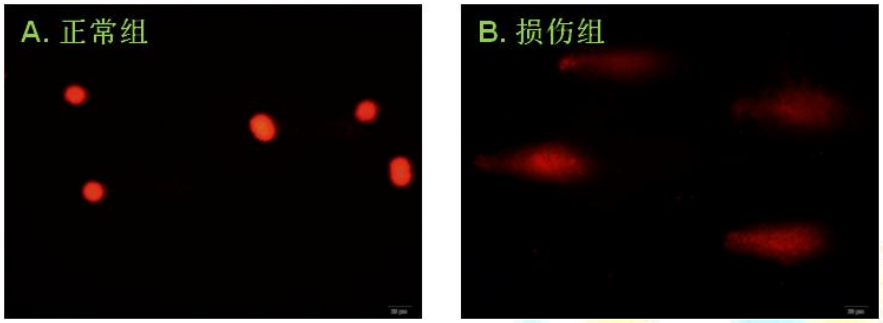
3. Lysis Solution 使用前需 4℃预冷至少 20min，若长期保存，室温即可，4℃长期放置会有沉淀析出。(选做)对于富含亚铁血红素的样本(如血细胞、组织样本等)，Lysis Solution 需额外添加 10%DMSO(如 45mL Lysis Solution+5mL DMSO)。
4. 解旋液配制：将 10×Alkaline Solution 用去离子水稀释后(如 5mL 10×Alkaline Solution +45mL 去离子水)，室温放置备用。
5. 电泳液配制：将 10×Alkaline Solution 用去离子水稀释后(如 50mL 10×Alkaline Solution +450mL 去离子水)，4℃冷藏备用(预冷时间应不小于 4h)。

操作说明（示意图见尾页）

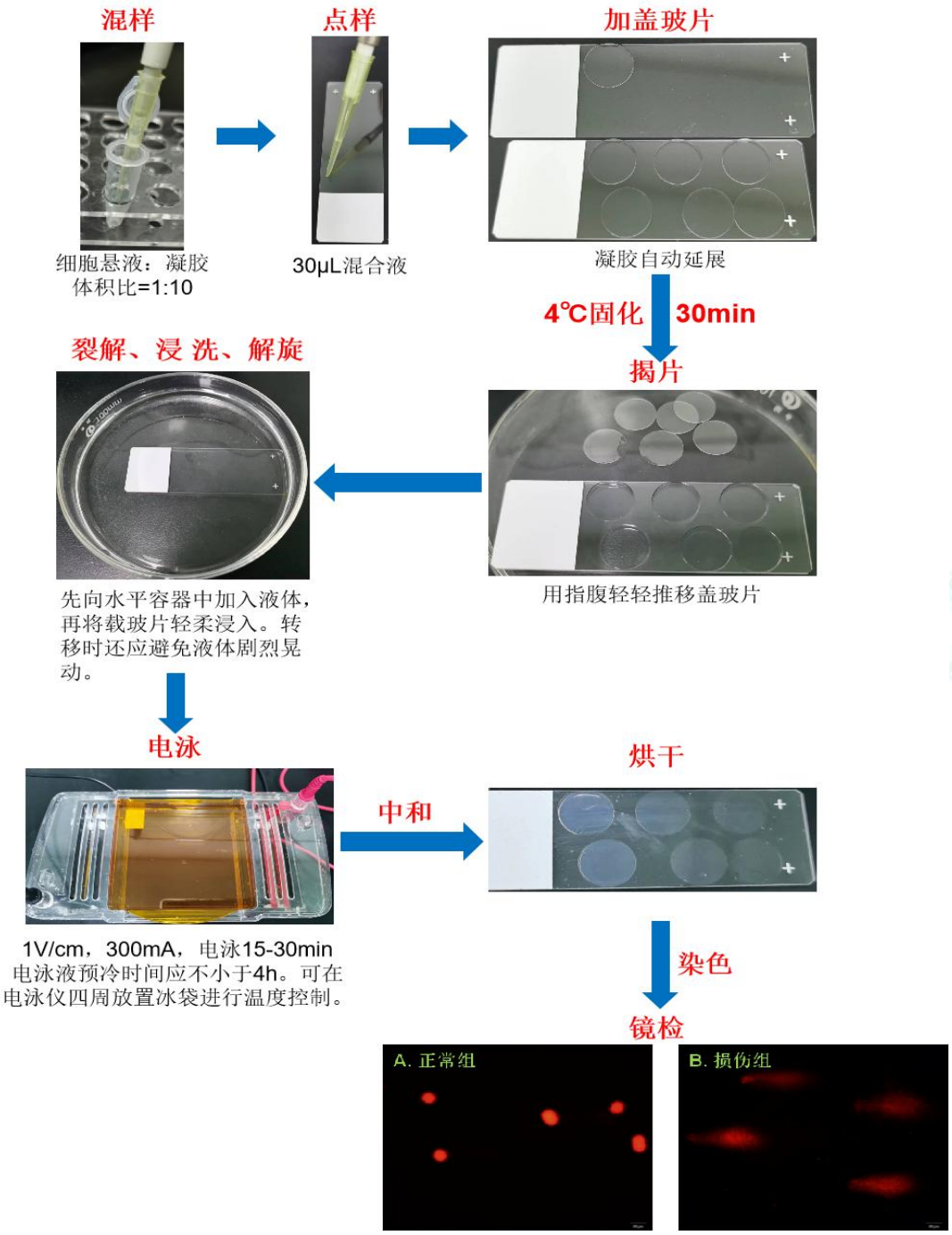
1. **样本处理**：用冷的 1×PBS 缓冲液(不含钙镁)重悬细胞，调整细胞密度为 3×10^5 个/mL。
2. **铺胶**：按照 1:10(v/v)将细胞悬液与熔化后的 Comet Agarose(37℃)在 EP 管（可直接放置于 37℃水浴）中充分混合(如 10μL 细胞悬液+100μL Comet Agarose)，迅速吸取 30μL 混合液(约 900 个细胞)滴加至载玻片表面，立即加盖盖玻片，凝胶自动延展，转移载玻片至干燥的容器中水平放置，4℃避光固化 30min。注意：每次点样均应使用新的移液器吸头，且待测样本较多时应逐个进行混样、点样，不可同时混样。
3. **裂解**：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℃预冷的 Lysis Solution 的容器中水平放置，4℃裂解 1h-2h(可自行摸索样本最佳裂解时间，最长至 4℃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，每次放 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℃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℃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 损伤按慧星尾部 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



操作示意图


混样
点样
加盖玻片
细胞悬液：凝胶体积比=1:10
30μL混合液
凝胶自动延展
4℃固化
30min
揭片
裂解、浸 洗、解旋
用指腹轻轻推移盖玻片
先向水平容器中加入液体，再将载玻片轻柔浸入。转移时还应避免液体剧烈晃动。
电泳
烘干
中和
1V/cm，300mA，电泳15-30min
电泳液预冷时间应不小于4h。可在电泳仪四周放置冰袋进行温度控制。
染色
镜检
A. 正常组
B. 损伤组