

DNA 损伤 (彗星电泳) 试剂盒

产品编号: D-0110 规格: 20T



外显子生物
EXON BIO

产品说明

细胞核中的 DNA 为负超螺旋结构, 而且很致密, 通常 DNA 双链以组蛋白为核心, 盘旋而形成核小体。当用去污剂破坏细胞膜和核膜, 用高浓度盐提取组蛋白, DNA 残留而形成类核。如果类核中的 DNA 有断裂, 断裂点将引起 DNA 致密的超螺旋结构松散, 在类核外形成一个 DNA 晕圈。将类核置于电场中电泳, DNA 断片可从类核部位向阳极迁移, 经荧光染色后, 在阳极方向可见形似彗星的特征性图像, 故称"彗星试验"。彗星尾部即为迁移出类核的 DNA 片段。此时彗星尾部有可能还与头部以单链或双链的形式相连。DNA 损伤越严重, 导致 DNA 超螺旋结构越松散, 产生的断裂点越多, DNA 片段越小, 从而在彗星尾部出现的 DNA 断片越多, 则慧尾的长度、面积和荧光强度越大。通过测量彗星尾部的长度、面积或荧光强度等指标, 可以对 DNA 的损伤程度进行定量分析。

本产品试剂及操作经过优化改良, 操作简便, 使用普通载玻片即可进行, 不需要使用磨砂玻片, 操作过程中不易掉片; 一次性制备大量样本, 做好的片子可长期保存, 解决了传统操作中易掉片, 不易保存等问题。

试剂盒组成

试剂	规格	数量	储存
细胞裂解液	100 ml	1	4°C
DMSO	10 ml	1	4°C
正常熔点琼脂糖 NMA	30 mg	1	4°C
低熔点琼脂糖 LMA	30 mg	1	4°C
中和液 (10×)	200 ml	1	4°C
PI 染液	500 ul	1	4°C

注意

1. 细胞裂解液、碱性电泳缓冲液, 应根据需求, 现配现用。
2. PI 染液应避光低温保存, 染色时也应暗处进行操作

需要自备的试剂、耗材与仪器

- ☛试剂: 碱性电泳缓冲液 (1mM EDTA, 300mM NaOH) (现配现用)、PBS、无水乙醇;
- ☛耗材: 1.5 ml 管、载玻片、22×22mm 及 24×24mm 盖玻片
- ☛仪器: 恒温干燥箱、微量移液器、水浴锅、水平电泳仪

实验前准备:

0.5%正常熔点琼脂糖溶液: 向装有正常熔点琼脂糖粉末的瓶中加 6 ml PBS, 微波炉加热溶解, 45°C 水浴

锅放置；

0.7%低熔点琼脂糖溶液：向装有低熔点琼脂糖粉末的瓶中加 4.3ml PBS, 沸水浴中加热直至完全溶解（或微波高火 30s, 取出摇匀，再次高火 10-30s, 直至溶解），37℃水浴锅放置。

1×中和液：根据实验需求，将 10×中和液与蒸馏水按 1: 9 比例稀释，放于 4℃冰箱预冷后使用。

实验步骤

- 1、新鲜收集的细胞用冰冷的 PBS 洗一次，离心收集，PBS 重悬使其密度为 1×10^6 个/mL；
- 2、**铺胶**：下述各浓度琼脂糖凝胶均用 PBS 配制，
 - 第 1 层凝胶的制备：取干净的载玻片，滴加 100ul 45 预热的 0.5%正常熔点琼脂糖，加 22 × 22mm 盖玻片，4 放置 3 min, 待胶凝固后，推去盖玻片，于 60 烘箱烤 30min, 直至胶完全干透，此时片子可室温干燥条件下密封保存一周。
 - 第 2 层凝胶的制备：取已铺好第一层胶的玻璃片，将 10 μL 细胞（约 10^4 个）和 75 μL 37 预热的 0.7%低熔点琼脂糖混合均匀。迅速将含细胞的琼脂糖滴到第 1 层琼脂糖上，立即盖上另一干净盖玻片（22 × 22mm），置 4 2 min 使第 2 层 LMA 凝固。
 - 第 3 层凝胶的制备：第 2 层凝固后，在室温下小心移去盖玻片，滴加预热 37 的 75 μL 的 0.7%低熔点琼脂糖，如上盖上盖玻片（22 × 22mm），4 下凝固 2 min。
- 3、**细胞裂解** 移去盖玻片，将玻片置于平皿中，倒入预冷的细胞裂解液（使用前每 9mL 加入 1mL 的 DMSO），4℃裂解 1~2h，取出载玻片用 PBS 漂洗。
- 4、**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。
- 5、**单细胞电泳** 在电压 25V 下，电泳 20-30 min。
- 6、**中和** 电泳后将载玻片置于平皿内。加入中和缓冲液，将载玻片没入，4℃中和三次，每次 10min，弃去 Tris-HCl 缓冲液。
- 7、**脱水干燥** 将片子浸入无水乙醇中 15min，重复两次，然后取出晾干，直至胶完全干透变薄，4℃下避光保存。
- 8、取出片子，滴加 20 ul PI 染液，盖上盖玻片，室温染色 10 min，显微镜下观察拍照。
- 9、随机选择 100 个细胞，通过软件（如 CASP）测量彗星头部直径和尾长，根据尾长和头部直径比值，估计 DNA 的损伤程度。

广州市外显子生物技术有限公司

广州市海珠区敦和路 189 号 2 号楼 404-405

技术支持：QQ 2251645850 订购：QQ 1050304988

咨询：E-mail: focobio@126.com; exonlab@qq.com; Tel: 86-020-89895006