

彗星法DNA损伤检测试剂盒

产品货号：26126

产品规格：20T/100T

产品简介：

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。

自备材料：

低速离心机、水平电泳仪、荧光显微镜、37℃和45℃恒温水浴箱、载玻片、盖玻片、平皿、微量移液器、1.5ml Microube、0.4mmol/L Tris-HCl (pH7.5) 缓冲液、PBS。

产品组成：

试剂名称	20T	100T	保存条件
Lysis Buffer	100ml	500ml	2-8℃
DMSO	8ml	40ml	2-8℃
正常熔点琼脂糖	30mg	150mg	2-8℃
低熔点琼脂糖	30mg	150mg	2-8℃
PI	400 μl	2ml	2-8℃，避光

使用方法：

1. 细胞用冰冷的PBS洗一次，离心收集，用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：
 - a. 第1层凝胶的制备：将载玻片的磨砂面向上，45℃预热，将预热45℃的100 μL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℃下10min使NMA凝固。
 - b. 第2层凝胶的制备：将10 μL细胞（约 10^4 个）和75 μL的0.7%低熔点琼脂糖LMA（在37℃下水浴加热至少20min使之完全溶化）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℃10min使第2层LMA凝固。
 - c. 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37℃的75 μL的0.7%低熔点琼脂糖LMA，如上盖上盖玻片4℃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）。
3. 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℃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（用户自备1mmol/L EDTA，300mmol/L NaOH），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，电泳20~30min，电压、电流可用改变缓冲液面高低来调节。
6. 中和与染色 电泳后将载玻片置于平皿内。加入0.4mmol/L Tris-HCl (pH7.5) 缓冲液，将载玻片没入，4℃中和三次，每次10min，弃去Tris-HCl缓冲液，每载玻片加20 μL的PI染液或EB染液，盖上盖玻片，避光染色10min。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

7. 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，EB染色的DNA图象呈桔红色，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，可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。

注意事项：

1. PI和EB有毒，操作时要戴手套。

有效期：12个月有效。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>