

通用型 DNA 损伤彗星银染检测试剂盒产品说明书（中文版）

主要用途

通用型 DNA 损伤彗星银染检测试剂是一种旨在采用组织细胞碱性凝胶电泳，在电场环境下，损伤变性的 DNA 片段迁移形成特定的形态，即 DNA 移动尾巴，来进行体外评价和半定量分析 DNA 损伤程度的权威而经典的技术方法。该技术经过精心研制、成功实验证明的。其适用于新鲜动物细胞、组织、血液、骨髓等样品的 DNA 损伤研究，包括 DNA 链断裂、氧化性碱基损伤、DNA 剪切损伤、DNA 交联、DNA 修复等，应用于环境和药物毒理学、放射学、氧化应急反应等研究。产品严格无菌，即到即用，性能稳定，操作简便，重复一致。

技术背景

彗星检测技术（Comet assay），又称为单细胞凝胶电泳检测技术（single cell gel electrophoresis assay; SCGE）或微凝胶电泳检测技术（microgel electrophoresis assay），是基于变性切离的 DNA 片段，在电场的影响下，从细胞中移出的原理，而完整的超螺旋 DNA 仍然保持在细胞核内。通过凝胶电泳，呈现出分子迁移图形，形成彗星拖尾（comet tail）现象，即完整 DNA 的细胞染色体为“头”，而松散和断裂的 DNA 为“尾”，以此评价 DNA 损伤程度。这是分析单一细胞 DNA 链断裂的敏感方法之一。其技术方法的基本步骤是：第一，细胞固定包埋在凝胶里；第二，细胞裂解处理；第三，DNA 变性处理；第四，电泳迁移；第五，染色和图像分析。由此观察 DNA 迁移形态，进行体外检测，成为细胞 DNA 损伤研究的基本手段。其中电泳条件将决定检测的敏感程度。碱性电泳（alkaline electrophoresis）为常规电泳检测，可以检测单链 DNA 断裂、双链 DNA 断裂、大部分无嘌呤核酸位点（apurinic site）和无嘧啶核酸位点（apyrimidic site）、碱不稳定 DNA 结合物（alkali-labile DNA adduct）等 DNA 损伤。

产品内容

胶体液（Reagent A）	毫升
基质液（Reagent B）	毫升
清理液（Reagent C）	毫升
裂解液（Reagent D）	毫升
电泳液（Reagent E）	毫升（用户自备）
净化液（Reagent F）	毫升（用户自备）
固定液 A（Reagent G）	毫升
固定液 B（Reagent H）	毫升
染色液（Reagent I）	毫升
中和液（Reagent J）	毫升
显影液 A（Reagent K）	微升
显影液 B（Reagent L）	微升
终止液（Reagent M）	毫升
产品说明书	1 份

保存方式

保存在 4℃ 冰箱里；染色液（Reagent I）避免光照；有效保证 6 月

用户自备

无离子水：用于稀释电泳缓冲液

磨砂载玻片和盖玻片：用于放置样品进行微凝胶电泳的器材

电泳槽：用于微凝胶电泳的装置

恒温培养箱或恒温水槽：用于孵育反应

1.5 毫升离心管：用于样品操作的容器

90 mm 培养皿：用于样品处理、染色等的容器

光学显微镜：用于观察细胞彗星现象

实验步骤

一、琼脂载玻片准备

1. 准备 1 张完全磨砂载玻片，磨砂面朝上
2. 将**胶体液（Reagent A）**置于微波炉里加热溶化（注意：避免溢出）
3. 放进 45℃ 恒温水槽孵育 10 分钟
4. 移出 xx 微升**胶体液（Reagent A）**到载玻片中间
5. 盖上洁净的盖玻片
6. 轻压盖玻片 5 分钟，确保胶体液铺展
7. 放进 4℃ 冰箱里备用

二、样品准备

实验开始前，将**基质液（Reagent B）**置于微波炉里加热溶化，然后放进 45℃ 恒温水槽备用。然后进行下列操作。

1. 准备好新鲜培养细胞、组织样本、血液样品等（ 1×10^5 细胞）
2. 移入到 1.5 毫升离心管
3. 放进 4℃ 微型台式离心机离心 10 分钟，速度为 300g
4. 加入 xx 毫升**清理液（Reagent C）**，混匀
5. 移取 20 微升到新的 1.5 毫升离心管
6. 加入 xx 微升在 45℃ 恒温水槽里的**基质液（Reagent B）**
7. 用枪头上下抽吸混匀
8. 用大拇指推动移走上述制备的载玻片上的盖玻片
9. 即刻移取 75 微升细胞基质混合液到载玻片上
10. 用新的盖玻片盖上
11. 轻压盖玻片 5 分钟，确保细胞基质混合液铺展
12. 放进 4℃ 冰箱里冷却 10 分钟，直至胶体凝结，避免光照
13. 用大拇指推动移走盖玻片
14. 将载玻片放进 9cm 培养皿

15. 加入 xx 毫升预冷的**裂解液 (Reagent D)**
16. 放进 4℃冰箱里孵育 60 分钟
17. 倒去裂解液

三、凝胶电泳

1. 移出 xx 毫升**电泳液 (Reagent E)** 到 250 毫升三角烧瓶里
2. 加入 225 毫升无离子水，充分混匀后，标记为 **GENMED 电泳工作液**
3. 加入 xx 毫升**电泳工作液**到上述 9cm 培养皿
4. 室温下孵育 30 分钟
5. 倒去电泳工作液
6. 将载玻片置于（具有温度控制的）水平电泳槽里
7. 加入适量的**电泳工作液**到电泳槽里，恰好在载玻片之上
8. 插上电源，设定电压 25 伏
9. 在 4℃环境下，电泳 30 分钟
10. 断开电源，取出载玻片
11. 放进无离子水里浸润 2 次，每次 1 秒
12. 放进 9cm 培养皿
13. 加入 xx 毫升**净化液 (Reagent F)**
14. 在 4℃冰箱里孵育 5 分钟
15. 倒去净化液
16. 空气中晾干

四、染色分析

1. 小心加入 xx 毫升**固定液 A (Reagent G)** 到上述 9cm 培养皿里
2. 小心加入 xx 毫升**固定液 B (Reagent H)**，混匀
3. 置于平式震荡仪上，在室温下孵育 30 分钟，速度为 50RPM
4. 小心倒去固定液
5. 小心加入 8 毫升用户自备的无离子水
6. 小心加入 xx 毫升**染色液 (Reagent I)**
7. 置于平式震荡仪上，在室温下孵育 30 分钟，速度为 50RPM，避免光照
8. 小心倒去**染色液 (Reagent I)**
9. 小心加入 10 毫升用户自备的无离子水
10. 置于平式震荡仪上，在室温下孵育 1 分钟，速度为 50RPM
11. 小心倒去无离子水
12. 准备 1 个 15 毫升锥形离心管
13. 加入 8 毫升用户自备的无离子水
14. 加入 xx 毫升**中和液 (Reagent J)**
15. 加入 xx 微升**显影液 A (Reagent K)**
16. 加入 xx 微升**显影液 B (Reagent L)**，混匀
17. 小心倒入 9cm 培养皿里
18. 置于平式震荡仪上，在室温下孵育 6 分钟，速度为 50RPM（注意：可见金黄色条带；避免过度染色）
19. 小心倒去显影液

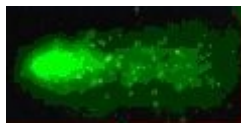
20. 小心加入 8 毫升用户自备的无离子水
 21. 小心加入 xx 毫升**终止液 (Reagent M)**，混匀
 22. 置于平式震荡仪上，在室温下孵育 30 分钟，速度为 50RPM（注意：可以保存在终止液里）
 23. 盖上新的盖玻片
 1. 即刻在光学显微镜下观察并拍照记录：
 2. 分析参数：
 - 1) 形态指标，即拖尾率目测量（comet%）。根据荧光图像是否彗星一样头尾分明将其分为彗星样细胞和非彗星样细胞，计数一定量细胞中彗星样细胞所占的比例，即彗星样细胞发生率（comet %），估计 DNA 的损伤程度。通过镜下观察，计数 50 至 100 个细胞，直接得到，方便实用。
 - 2) 距离指标，即直接在显微镜下或在照片上测出彗星的一些长度数值。
 - (1) 尾长（Tail Length; μm ）：沿电泳方向尾部最远端与头部中心间的距离（迁移距离）——距离越长，DNA 损伤越严重
 - (2) 总彗星长度（comet length; μm ）：从头至尾，电泳方向上的最大长度——长度越大，DNA 损伤越严重
 - (3) 尾长与头部直径比值：沿电泳方向尾部最远端与头部中心间的距离与头部直径之比——比值越大，DNA 损伤越严重
 - 3) 强度指标，即 DNA 含量
 - (1) 头部和尾部荧光百分比：尾部总荧光强度与头部总荧光强度的比值——百分比越高，DNA 损伤越严重
 - (2) 尾部和总彗星荧光百分比（Tail DNA %）：检测 500 个细胞
 - 4) 矩类指标，构建距离、强度的平均关系数值
 - (1) 尾矩（tail moment; TM），又称为 Olive tail moment (OTM)：尾部 DNA 占总 DNA 的百分比与头、尾部中心间距的乘积，单位为 $\mu\text{m}\%$ 或 $\mu\text{m tail fraction}$
 - (2) 彗星矩（comet moment; CM）：以头部中心点为零点，沿电泳方向将彗星按一定的间隔分成若干个区域（80 个），分别测定每个区域的荧光强度乘以该区域中心距零点的距离除以彗星总荧光强度
7. 构建 DNA 损伤程度和药物处理剂量（dose）或时间（time）曲线

注意事项

1. 本产品为 20 次操作
2. 操作时，须戴手套
3. 整个操作，建议在暗光下进行
4. 建议使用新鲜培养的动物细胞、组织、血液等；细胞量为 10^5 细胞/毫升
5. 可以使用 100 微摩尔过氧化氢或 25 微摩尔高锰酸钾冰上孵育 10 分钟预处理样品作为阳性对照
6. **电泳液 (Reagent E)**：10 倍浓度为 3 摩尔 NaOH，10 毫摩尔 EDTA，pH 13.5
7. **净化液 (Reagent F)**：70%ETHANOL
8. 操作时小心轻柔，避免胶体脱位
9. 电泳温度过高，会造成胶体脱位

10. 电泳时，电压 25 伏为佳，建议控制电泳液量达到要求

11. 细胞 DNA 损伤彗星图像如下（400 倍）



12. 本公司提供系列 DNA 损伤检测分析试剂产品

质量标准

1. 本产品经鉴定性能稳定
2. 本产品经鉴定重复性好