天净沙系列

CAT#:230329

常温运输及保存

天净沙

彗星 DNA 电泳检测试剂盒

Comet DNA Electrophoresis Detection Kit

使用手册 V0.51

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

彗星 DNA 电泳又称单细胞凝胶电泳，是一种在单细胞水平上检测 DNA 损伤的经典技术。因其在荧光显微镜下，受损细胞的 DNA 像彗星的尾巴一样拖出，而得名。该方法的原理是：细胞经裂解去除细胞膜、脂质、蛋白质等后，DNA 仍以“类核”形式附着在核骨架上。如果 DNA 有断裂，在电场作用下，断片会从类核中拖出，形成“彗星尾”。DNA 损伤越严重，尾长越长，尾部荧光强度也越大。为此本公司开发了彗星 DNA 电泳检测试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，用户不用单独准备各成份。
2. 经过精心优化，用户不需要单独摸索和优化各种条件。
3. 适用于各种细胞。
4. 可以检测各种 DNA 损伤，如如单链断裂、双链断裂、碱不稳定位点等。
5. 本产品足够 50 次彗星电泳。
6. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用大扁盒包装

成份	编号	规格	包装
琼脂糖凝胶 A	230329a	5 mL	5 mL 本色瓶
琼脂糖凝胶 B	230329b	5 mL	5 mL 本色瓶
彗星电泳专用裂解液	230329c	100 mL	100 mL 本色瓶
彗星电泳液	230329d	250 mL	250 mL 本色瓶
彗星电泳终止液	230329e	250 mL	250 mL 本色瓶
彗星 DNA 染色液	230329f	1 mL	1.5 mL 棕色管
使用手册	230329sc	1 份	无

运输及保存

常温运输和保存，彗星 DNA 染色液需要-20℃保存，有效期一年。

自备物品

样品、包被载玻片、PBS 缓冲液、荧光显微镜

使用方法

一、样品载玻片制备

1. 第一层胶（底胶）：取已预涂正常熔点琼脂糖的载玻片，用 75-80℃的琼脂糖凝胶 A 滴一滴约 50 μL 在磨砂区，迅速盖上盖玻片，4℃固化 5 分钟。此层用于固定第二层胶。
2. 第二层胶（细胞胶）：收集待测细胞，用 PBS 重悬，计数，调整浓度至约 1E5 个/mL。
3. 将细胞悬液与 37℃预热的琼脂糖凝胶 B 按 1:3（v/v）比例迅速混匀。

4. 取下第一层的盖玻片，立即将混合液滴加在第一层胶上，快速盖上新的盖玻片，避免产生气泡。

5. 4℃避光固化 10-15 分钟，使琼脂糖完全凝固。

二、细胞裂解

6. 水平推走盖玻片后将载玻片水平浸没于预冷的彗星电泳专用裂解液中。

7. 4℃避光裂解过夜。

三、DNA 解旋与电泳

8. 解旋：从裂解液中取出载玻片，用 PBS 轻轻漂洗一次。然后水平放入电泳槽，加入新鲜预冷的彗星电泳液覆盖载玻片。在室温避光解旋 20-30 分钟。此步骤使 DNA 解链，暴露出断裂位点。

9. 电泳：在相同缓冲液中进行电泳。条件通常为：低电压（~1 V/cm），高电流（~300 mA），4℃避光电泳 20-30 分钟。具体时间需根据实验室条件和损伤程度预实验优化。

10. 电压/电流计算："V/cm"指两个电极之间的电压除以槽内缓冲液的长度（cm）。关键：电泳必须在 4℃冰水浴中进行，以防止过度电泳和缓冲液发热。

四、终止与染色

11. 终止：电泳结束后，小心取出载玻片，水平置于终止液中 5 分钟。

12. 脱水/干燥（可选）：可依次将载玻片浸入 70%、95%、100%乙醇中各 5 分钟，然后室温干燥，便于长期保存。

13. 染色：若已脱水干燥，需用 PBS 或去离子水复水 5 分钟。

14. 每片载玻片滴加约 50-100 μL 稀释好的荧光染料，盖上盖玻片。

15. 避光染色 15-20 分钟，即可观察。

五、图像获取与分析

16. 观察：在荧光显微镜下（选择 SYBR Gold 的蓝光激发/绿光发射），使用合适放大倍数（如 200×或 400×）观察。

17. 拍照：随机选取至少 50-100 个细胞/组进行拍照。避免选择边缘、重叠或凋亡细胞（彗星尾极长，几乎无头）。

18. 分析：使用彗星分析软件（如 CASP，OpenComet 等）进行分析。常用参数有：尾矩：尾长×尾部 DNA 百分比，是最常用的综合指标。尾长：从彗星头中心到尾端的最长距离。尾部 DNA 百分比：尾部的荧光强度占总荧光强度的百分比。Olive 尾矩：考虑了尾部分布，更稳定。

	六、关键注意事项 19. 全程避光、轻柔操作：从裂解开始，尤其是染色后，需严格避光以防 DNA 额外损伤和荧光淬灭。操作琼脂糖包被细胞时动作要轻柔。 20. 对照设置：必须设立阴性对照（未处理细胞）和阳性对照（如用已知浓度的过氧化氢或辐射处理的细胞），以验证实验体系的有效性。 21. 平行重复：每个实验条件至少需要独立的 3 个生物学重复，每个重复分析 50-100 个细胞。 22. 无 DNA 酶操作：尽量使用无菌、无 DNA 酶污染的耗材和试剂。 23. 参数优化：裂解时间、电泳电压/时间对结果影响巨大，需根据细胞类型和损伤类型进行预实验优化。
关联产品	PCR 引物二聚体形成抑制剂