天净沙系列

CAT#:230329-2

常温运输，4℃保存

天净沙

细菌彗星 DNA 碱性电泳试剂盒

Bacterial Comet DNA Alkaline Electrophoresis Detection Kit

使用手册 V1.0

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 电泳又称单细菌凝胶电泳，是一种在单细菌水平上检测 DNA 损伤的经典技术。因其在荧光显微镜下，受损细菌的 DNA 像彗星的尾巴一样拖出，而得名。彗星 DNA 电泳对研究 DNA 损伤和损伤修复有重要的意义，为此本公司开发了专门用于细菌的彗星 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，也不需要单独摸索和优化各种条件。
2. 专门根据细菌优化，适用于革兰氏阴性和阳性细菌。
3. 使用高灵敏度的核酸染料，能检测相对真核细胞来说非常小的细菌 DNA。
4. 可用于检测 DNA 单链和双链断裂和碱不稳定位点（Alkali-Labile Sites，ALS）等，也可用于检测 DNA 单链断裂。
5. 本产品足够 50 次细菌彗星 DNA 电泳（含对照）和染色。
6. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品第一部分用大扁盒包装，常温运输，4℃保存，有效期 1 年。

成份	编号	规格	包装
琼脂糖	CAS 9012-36-6	1 g	5 mL 本色瓶
包埋细菌裂解液 A 成份 1	230329-2b1	50 mL	60 mL 本色瓶
包埋细菌裂解液 A 成份 2	220714	1 mL	1.5 mL 本色管
包埋细菌裂解液 A 成份 3	CAS 12650-88-3	50 mg	1.5 mL 蓝盖管
包埋细菌裂解液 B 成份 1	230329-2c1	50 mL	60 mL 本色瓶
包埋细菌裂解液 B 成份 2	230329-2c2	1 mL	1.5 mL 红盖管
10×彗星 DNA 碱性电泳液	230329-2d	250 mL	250 mL 本色瓶
10×中和液，pH 7.0	230329-2e	50 mL	60 mL 本色瓶
使用手册	230329-2sc	1 份	无

本产品第二部分用 logo 热封袋包装，低温运输，-20℃保存，有效期 1 年。

成份	编号	规格	包装
包埋液	230329-2a	1 mL×5	1.5 mL 绿盖管
彗星 DNA 染色液	230329-2f	15 μL	0.5 mL 棕色管
使用手册	230329-2sc	1 份	无

运输及保存

常温运输，4℃保存，其中包埋液、彗星 DNA 染色液需要-20℃保存，有效期一年。

自备物品

样品、蒸馏一端是磨砂的载玻片、PBS 缓冲液、荧光显微镜

使用方法

注意：由于紫外线可以照成 DNA 损伤，故本实验最好在暗处操作。由于使用低熔点胶，最好所有溶液均预冷，并且不能剧烈摇晃，避免包埋的琼脂糖从载玻片上脱落。

一、 制备胶封载玻片

1. 在 300 mL 干净的烧杯中加入 100 mL 自备蒸馏水，加入 1 g 本试剂盒提供的琼脂糖干粉，低功率微波炉加热到开始沸腾，用玻璃棒搅拌 1 分钟，再低功率微波炉加热到开始沸腾，搅拌直到琼脂糖彻底溶解。
2. 让其放到 60℃金属浴或水浴，使其温度保持在 60℃。
3. 用干净镊子夹住一块干净载玻片的磨砂端，将其浸入到琼脂糖溶液中，直到琼脂糖液淹没一半的磨砂区域后取出，搽去载玻片背面琼脂糖，放平底托盘上。
4. 逐块进行上述操作，100 mL 琼脂糖溶液足够胶封 75-100 块载玻片。
5. 处理完后，将所有的胶封载玻片 65℃干燥 15 分钟后即可使用，也可以常温干燥放置半年以上。

二、第一轮包埋

6. 预热离心管：如果需要做 N 个反应，则将 N 个 0.5 mL 离心管放 37℃金属浴待用。
7. 预冷托盘：将平底不锈钢或玻璃托盘放冰上或 4℃冰柜预冷，用水平仪确保其水平。
8. 37℃预热细菌包埋裂解液 A 和 B 成份 1 放待用。
9. 在冰上预冷碱性彗星电泳液待用。。
10. 准备包埋胶：根据所做样本数 N 和每 10 个样本需要 1 管包埋胶的比例，将 1 管或多管本试剂盒提供的包埋胶放 90-100℃水浴加热，直到管内包埋胶彻底融化，一般需要 5 分钟。
11. 将瓶子轻柔颠倒混匀 10 次（避免出现气泡），然后分别加 100 μL 包埋胶到预热的 0.5 mL 离心管中，放回 37℃金属浴待用。

三、制备玻载包埋细菌

12. 培养细菌到对数增长期，用待测试剂对其进行损伤处理。不能使用平台期或长时间静置的细菌，因为这些阶段的细菌会积累损伤。最好设置一个阳性对照(用双氧水处理)，一个阴性对照（水处理），和一个死细菌对照（用乙醇处理）。每个处理最好做 2-3 个重复。假设所有反应数为 N。
13. 将处理后的细菌浓度调到（3E4 细菌/mL）。取小量进行死细菌活细菌检测，测定其比例。
14. 将 5 μL 待测细菌加入到一管装有 100 μL 包埋胶的离心管中，迅速将样本和包埋胶混匀，然后将混合液加到胶封载片上，迅速盖上盖玻片后。一块载玻片可以点两次相同的样品，故再将另外一个样本加到载玻片的其他位置，盖上盖玻片后，平放到预冷托盘内。
15. 逐样处理， 待最后一张载玻片在预冷托盘上放满 5 分钟，小心取下盖玻片，将所有

载玻片平放在干净平底容器中。

四、包埋细菌裂解液

16. 新鲜配制包埋细菌裂解液 A：根据 1 张载玻片需要 1 mL 本溶液的比例，计算所需包埋细菌裂解液 A 的体积。以 10 mL 为例：在 10 mL 瓶中或离心管中，加入 10 mL 37℃预热的包埋细菌裂解液 A 成份 1 溶液，在加入 200 μL 包埋细菌裂解液 A 成份 2 溶液和 10 mg 包埋细菌裂解液 A 成份 3 干粉，轻柔颠倒混匀。滴加 500 μL 到每张载玻片上，37℃保温 30 分钟。第 15 分钟时，再补加 500 μL 到每张载玻片上。等待期间，按下步准备包埋细菌裂解液 B。
17. 新鲜配制包埋细菌裂解液 B：根据 1 张载玻片需要 1 mL 本溶液的比例，计算所需包埋细菌裂解液 B 的体积。以 10 mL 为例：在 10 mL 瓶中或离心管中，加入 10 mL 37℃预热的包埋细菌裂解液 B 成份 1 溶液，在加入 200 μL 包埋细菌裂解液 B 成份 2 溶液，轻柔颠倒混匀。滴加 500 μL 到每张载玻片上，37℃保温 2 小时。第 60 分钟时，再补加 500 μL 到每张载玻片上。
18. 吸走平底容器中的包埋细菌裂解液 B，加入相当于包埋细菌裂解液 10 倍体积的蒸馏水常温浸泡 3 分钟，不要摇晃以免包埋细菌脱落。小小吸走蒸馏水。

五、彗星 DNA 电泳

19. 将载玻片放入彗星 DNA 电泳仪。
20. 如果需要检测 DNA 单链断裂，双链断裂和碱不稳定位点，用 pH 试纸检测电泳液，确保其 pH 大于 13，然后直接加入预冷的彗星 DNA 碱性电泳液刚好淹没住载玻片，静置 20 分钟。如果只想检测 DNA 单链断裂，则用自备盐酸将彗星 DNA 碱性电泳液的 pH 调到 12.1，其余操作不变。
21. 按 0.75V/cm 电极距离的电压和 290 - 310 mA 电流 4℃电泳 10-40 分钟。可以通过增加或减少电泳液的量来调整 mA 数，使其达到 290 - 310 mA。一旦最佳使用体积确定，最好不要轻易变动，否则将影响彗星 DNA 尾部的长短。如果不满载，需要放入空的载玻片以维持电流平衡。

四、电泳后染色及分析

22. 工作液配置
    1) 1×中和液：用蒸馏水将 10×中和液新鲜稀释 10 倍，得到 1×中和液；
    2) 1×彗星 DNA 染色液：用 PBS 将彗星 DNA 染色液稀释 100 倍，即取 2 μL 彗星 DNA 染色液加入到 198 μL PBS 中，得到 1×彗星 DNA 染色液。
23. 电泳后将可以立即染色观察：载玻片转移到新的平底容器中，按 1 块载玻片 10 mL1×中和液的比例加入 1×中和液浸泡 5 分钟，换蒸馏水浸泡 5 分钟，吸取水后，在

	每片载玻片滴加约 30 μL 1×彗星 DNA 染色液，避光室温孵育 20 min。倒掉染料，用蒸馏水轻轻涮洗，盖上盖玻片，进入下步观察。 24. 电泳后将也可以长期保存今后染色观察：载玻片转移到新的平底容器中，加入自备 PBS 浸泡 5 分钟，换水浸泡 5 分钟，浸入无水乙醇 20 分钟，空气中放干后 50℃30 分钟后即可长期干燥放置。染色时先将载玻片放入水中 30 分钟，然后滴加约 25 μL 1×彗星 DNA 染色液，避光室温孵育 20 min。倒掉染料，用蒸馏水轻轻涮洗，盖上盖玻片，进入下步观察。 25. 观察：在荧光显微镜下（本试剂盒提供的染料需要选择 470 - 490 nm 激发波长和 520 - 550 nm 发射波长），使用合适放大倍数（如 100×或 400×）观察。 26. 拍照：随机选取至少 50 - 100 个细菌进行拍照。 27. 分析：使用彗星分析软件（如 CASP，OpenComet 等）进行分析。最常用参数是尾矩，即尾长×尾部 DNA 百分比。尾部 DNA 百分比是尾部的荧光强度占总荧光强度的百分比，也可单独据此分级打分：小于 5%的 DNA 在彗星尾部，无 DNA 损伤；5-20%的 DNA 在彗星尾部，低度 DNA 损伤；20-40%的 DNA 在彗星尾部，中度 DNA 损伤； 40-95%的 DNA 在彗星尾部，重度 DNA 损伤；95%以上的 DNA 在彗星尾部，完全 DNA 损伤。阴性对照应该无 DNA 损伤。
关联产品	细菌彗星 DNA 中性电泳试剂盒