**For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures**

USER GUIDE **MesGen Biotechnology**

**Version 2.0**

|  |
| --- |
| **彗星电泳法检测细胞损伤试剂盒**  |

**Comet Assay for DNA Damage Detection Kit**

**Cat.No. MG10221**

**Technical literature is available at:** [**www.mesgenbio.com**](http://www.mesgenbio.com)**. E-mail MesGen Technical Services if you have questions on use of this system:** **tech@mesgenbio.com**

**产品原理**

彗星分析又称单细胞凝胶电泳分析，为检测细胞内DNA损伤提供简便有效的方法。其检测原理是基于变性的原理，待测细胞被裂解处理以使DNA解旋和变性，之后细胞核进行电泳，使得细胞在彗星玻片上平铺的低熔点琼脂糖上移动。损伤的DNA片段会在电场作用下从细胞核中迁出，而未损伤DNA则迁移缓慢且只能保持在细胞核中，之后使用与DNA相互作用的荧光染料进行染色使结果可视。最终形成的DNA彗星尾形状和迁移模式，包括碱性彗星尾长度，尾部DNA百分比以及尾矩的计算等数据可使用图像分析软件进行，最终用于评估细胞中DNA的损伤。

**试剂盒组成**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **产品组成** | **20 tests** |  **50 tests** | **100 tests** |
| **细胞裂解液 CL** | 100ml |  250ml | 500ml |
| **DMSO** | 8ml |  20ml | 40ml |
| **常规熔点琼脂糖 NMA** | 30mg |  75mg | 150mg |
| **低熔点琼脂糖 LMA** | 40mg |  100mg | 200mg |
| **溴化乙锭溶液** | 400ul |  1ml | 2ml |

**操作方法**

1：将细胞用胰酶消化处理，再用预冷PBS洗一次（如为悬浮细胞，可直接离心收集），离心收集，再用PBS重悬细胞，使细胞密度约1×106个/ml；

2：取100ul预热的0.5％常规熔点琼脂糖溶液铺于载玻片上，盖上载玻片，4℃凝固5～10min后，移去盖玻片；

3：将10-20ul细胞悬液与已经融化的0.8％低熔点琼脂糖溶液（可以在42℃水浴中预先处理至少20min以上，融化后备用）在42℃

****

**Do not eat Store at +2 to +8° C & in the dark.**

水浴中以体积比1∶7混匀，将混合液滴在上步铺胶后的载玻片上，盖上盖玻片，4℃凝固5～10min；

4：小心移去盖玻片，在上述两层胶上小心铺设120ul已经融化的0.8％低熔点琼脂糖溶液（可以在42℃水浴中预先处理至少20min以上，使之融化），盖上载玻片，4℃凝固30min；

5：小心移去盖玻片，将载玻片置于干净皿具中，倒入预冷的细胞裂解液（使用前，每9ml细胞裂解液添加1ml DMSO），4℃裂解1-2h，取出后用PBS清洗2-3次；

6：将载玻片放入水平电泳槽，加入自备碱性电泳液（成份1mM EDTA，300mM NaOH），没过载玻片上胶面的高度约3cm，室温放置60min；电压25V，电泳时间30-40min（根据时间自行优化）；

7：将载玻片置于干净皿具中，加入0.4mM Tris-HCl（pH7.5）缓冲液（须自备），4℃中和10min，重复该步骤3次；

8：弃去缓冲液，在载玻片胶面位置加入20-30ul溴化乙锭溶液，染色10min；

9：用相应的荧光显微镜观察、拍照、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

**储存条件**

2-8℃, 溴化乙锭溶液须避光。

**注意事项**

1. 溴化乙锭溶液有致癌性，注意安全操作。
2. ****实验条件可根据特定情况进行妥善优化。

**仅供科学研究，不得用于临床治疗**

**For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures.**