彗星法 DNA 损伤分析试剂盒（3 孔载玻片）

货号: KTA3040　　规格：15 T/15 T×5　　批号：见产品标签

	适用样本：细胞
	荧光激发/发射：PI: Ex/Em=535 nm/617 nm
	保质期：4℃，避光保存 12 个月

01 背景与原理

彗星实验（Comet Assay），又称单细胞凝胶电泳实验（SCGE），是一种在单细胞水平上检测 DNA 损伤程度的方法。

当细胞 DNA 因化学或物理因素（如药物、辐射、重金属等）受损发生单链或双链断裂后，将细胞包埋于低熔点琼脂糖中并滴加在载玻片上。在裂解液的作用下，细胞膜、核膜及其他生物膜被破坏，细胞内的 RNA、蛋白质及其他成分进入凝胶并扩散到裂解液中，仅核 DNA 附着在剩余的核骨架上。在电场作用下，完整的大分子 DNA 会保留在原位，断裂的小分子 DNA 片段会向阳极迁移，形成头部（细胞核区域）和尾部（迁移的 DNA 片段）构成的彗星状图像，用 PI 染色后可在荧光显微镜下观察（若细胞未受损伤，核 DNA 呈现圆形的荧光团，无拖尾或仅有轻微拖尾现象）。根据电泳缓冲液的 pH 值，可分为中性彗星实验（pH ≈ 8.4）和碱性彗星实验（pH > 13）。中性彗星实验主要用于检测 DNA 双链断裂（DSBs），碱性彗星实验具有更高的灵敏度，可用于检测 DNA 单链断裂（SSBs）、双链断裂以及碱性不稳定位点（ALS）。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	15 T	15 T×5	
Comet Slides (3-Well)	5	5×5	4℃
Comet Lysis Buffer	75 mL×2	75 mL×2×5	4℃
20×Alkaline Electrophoresis Solution	100 mL	100 mL×5	4℃
Low Melting Agarose (LMA)	2 mL	2 mL×5	4℃
Propidium Iodide (PI)	1 mL	1 mL×5	4℃，避光保存
DMSO	15 mL	15 mL×5	4℃，避光保存

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	荧光显微镜	PI: Ex/Em=535 nm/617 nm
试剂	磷酸盐缓冲液（PBS，不含 Mg^{2+}和 Ca^{2+}，pH7.4）、去离子水、1×TAE 或 TBE 电泳液（如有需求）	/
其他	水浴锅、离心机、水平电泳槽、可调节式移液枪及枪头	/

04 注意事项

- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Comet Slides (3-Well)	即用型；使用前，37℃预热。	4℃保存。
Comet Lysis Buffer	即用型；使用前，4℃预冷。	Comet Lysis Buffer 在室温可能会浑浊，在 4℃会保持澄清，此为正常现象。4℃保存。
20×Alkaline Electrophoresis Solution	用去离子水将 20×Alkaline Electrophoresis Solution 稀释成 1×Alkaline Electrophoresis Solution，4℃预冷。	1×Alkaline Electrophoresis Solution 不建议反复使用，请根据实际用量配制。4℃保存。
Low Melting Agarose (LMA)	将 Low Melting Agarose (LMA)在 90-95℃水浴中加热 20 min 至 LMA 完全液化，转移到 37℃水浴中平衡 20 min，保持液体状态。	LMA 颜色为黄色，是经高温高压灭菌所致，不影响使用。4℃保存。
Propidium Iodide (PI)	即用型；使用前，平衡到室温。	4℃避光保存。
DMSO	即用型；使用前，平衡到室温（含血红素样品时可选用，按照 DMSO 与 Comet Lysis Buffer 的体积比为 1:9 配制裂解液）。	4℃避光保存。

05-2 样本制备

1. 在进行实验前，4℃预冷（至少 30 min）Comet Lysis Buffer 和 1×Alkaline Electrophoresis Solution（如有中性电泳需求，预冷 1×TAE 或 TBE 电泳液）。

2. 将 Low Melting Agarose (LMA)瓶在 90-95℃的水浴中加热 20 min 至 LMA 完全液化，转移到 37℃的水浴中平衡 20 min。

3. Comet Slide 提前放置在 37℃环境中预热 10 min。

4. 准备细胞样本，如下所示：

(1) 悬浮细胞：800 g 离心细胞 5 min，去掉上清液。用 PBS 清洗 1 次，离心去掉上清液。用 PBS 重悬细胞并计数，收集 1-5×10^5 个细胞重悬于 1 mL PBS 中。

(2) 贴壁细胞：用细胞刮轻轻地从培养皿中取出细胞（或用胰蛋白酶消化，注意不要过度消化），将细胞悬液转移到离心管中，800 g 离心细胞 5 min，去掉上清液。用 PBS 清洗 1 次，离心去掉上清液。用 PBS 重悬细胞并计数，收集 1-5×10^5 个细胞重悬于 1 mL PBS 中。

5. 将细胞样品与 37℃ LMA 以 1:10 的体积比混合，立即取 50 μL 混合液加入到水平放置的 37℃ Comet Slide 的圆形样本孔中（将枪头抵住圆孔边缘，匀速推液同时由外向内缓慢转圈移动，使混合液均匀铺展）。

6. 保持 Comet Slide 水平，4℃避光凝固 LMA 15 min。

7. 将 Comet Slide 转移到干净容器中，沿容器壁缓慢加入预冷的 Comet Lysis Buffer（液面高于载玻片），4℃避光裂解 30-60 min。

注意：

(1) 正式实验前，需做预实验，确定最佳铺胶的细胞数量和裂解时间。

(2) 处理多个样品时，可将细胞样品与 LMA 的混合液保持在 37℃水浴锅中以避免凝胶化。

(3) 为避免紫外线对细胞样品造成损害，请在低/暗光条件下进行测定。

(4) 对于难以通过常规裂解充分释放 DNA 的特殊样本，可在裂解后用 DTT（二硫苏糖醇）、LIS（3,5-二碘水杨酸锂）等试剂 4℃继续处理。

05-3 实验步骤

电泳实验：根据您的实验目的选择合适的电泳缓冲液。

1. 中性电泳：

(1) 吸出 Comet Lysis Buffer，沿容器壁缓慢加入预冷的 1×TAE 或 TBE 电泳液（液面高于载玻片），4℃避光浸泡 15 min。

(2) 小心地将 Comet Slide 转移到水平电泳槽的凝胶平台上，加入适量预冷的 1×TAE 或 TBE 电泳液到电泳槽，直到完全覆盖住 Comet Slide（液面不得高于载玻片 0.5 cm）。

(3) 按照 1 V/cm 设置电压（例如，电泳槽正负两极的电极丝之间相距 25 cm，则施加 25 V 电压），电泳 30-45 min（电压、电流可通过改变电泳液面高低来加以调节）。

(4) 小心地将 Comet Slide 从电泳槽水平转移到干净容器中，加入 50 μL/孔 PI 染料，室温避光染色 10 min。

(5) 沿容器壁缓慢加入去离子水（液面高于载玻片），清洗多余的 PI 染料，吸出去离子水。

(6) 小心取出 Comet Slide，使用荧光显微镜观察并拍照。

2. 碱性电泳：

(1) 吸出 Comet Lysis Buffer，沿容器壁缓慢加入预冷的 1×Alkaline Electrophoresis Solution（液面高于载玻片），4℃避光解旋 30 min。

(2) 小心地将 Comet Slide 转移到水平电泳槽的凝胶平台上，加入适量预冷的 1×Alkaline Electrophoresis Solution 到电泳槽，直到完全覆盖住 Comet Slide（液面不得高于载玻片 0.5 cm）。

(3) 按照 1 V/cm 设置电压（例如，电泳槽正负两极的电极丝之间相距 25 cm，则施加 25 V 电压），电泳 15-30 min（电压、电流可通过改变电泳液面高低来加以调节）。

(4) 小心地将 Comet Slide 从电泳槽水平转移到干净容器中，沿容器壁缓慢加入去离子水（液面高于载玻片），浸洗 5 min，重复 2 次。

(5) 吸出去离子水，加入 50 μL/孔 PI 染料，室温避光染色 10 min。

(6) 沿容器壁缓慢加入去离子水（液面高于载玻片），清洗多余的 PI 染料，吸出去离子水。

(7) 小心取出 Comet Slide，使用荧光显微镜观察并拍照。

注意：如无法及时拍照，将 Comet Slide 置于 4℃湿盒中，可短暂保存 4 h。

06 结果计算

1. 定性分析：DNA 损伤程度按彗星尾部 DNA 百分含量分为 5 级：

级别	尾部 DNA 百分含量	损伤程度
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

2. 通过图像分析软件，如 OpenComet、CASPlab 和 Comet Assay IV（Perceptive Instruments）等，可对彗星图像进行定性、定量或半定量评估。常用指标包括尾长（彗星头部边缘至尾部最远端的距离）、尾部 DNA 百分含量（迁移至尾部的 DNA 荧光强度占整个彗星总荧光强度的百分比）、尾矩（尾长与尾部 DNA 百分含量的乘积）、Olive 尾矩（彗星头部中心至尾部中心距离与尾部 DNA 百分含量的乘积）、彗星率（彗星细胞数量去掉 0 级细胞后占总细胞数量的百分比）、总评分（各损伤等级细胞占比与其对应级别号的乘积之和）等。每个样品至少应分析 50 个细胞。

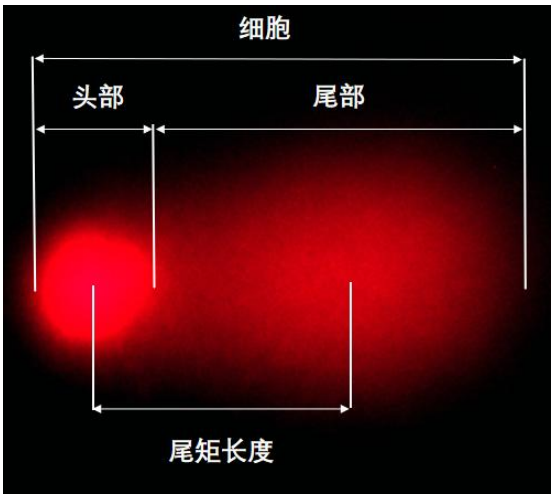


图 1. 彗星结果分析示意图。

07 结果示例

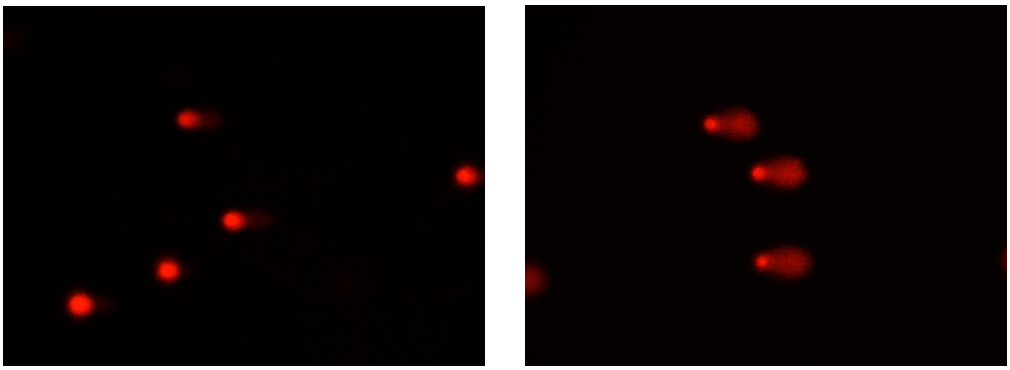


图 2. Hela 细胞未经处理（左）或处理（右，UV 照射 15 min）进行碱性彗星实验（21 V，电泳 15 min），染色后检测的效果图。数据仅供参考。

08 FAQ

1. 组织样本如何处理?

将组织参考文献方法例如使用胰酶、胶原酶、EDTA 等消化处理制备成单细胞悬液，再按照悬浮细胞进行处理。

2. 染色效果不好如何优化?

可以延长裂解时间，甚至可过夜孵育（此处可作为本实验的一个长时间暂停点，不会影响实验结果）。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTA0002	Annexin V-AbFluor™ 488/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒
KTA1101	细胞凋亡 DNA Ladder 抽提试剂盒（离心柱式）
KTA2010	一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）
KTA2011	一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（红色荧光）

彗星法DNA损伤分析试剂盒（3孔载玻片）

（Abbkine 货号：KTA3040）

一 样本处理



4℃预冷裂解液、1×碱性电泳液（1×TAE或TBE电泳液）至少30min



琼脂糖在90-95℃的水浴中液化



37℃水浴20 min



玻片提前于37℃环境中预热10 min





收集后PBS清洗1次，800 g离心5 min；1 mL PBS重悬1-5×10⁵个细胞

细胞样品与琼脂糖1:10的比例混合



取50 μL混合液于玻片上均匀铺展，4℃避光凝固15 min



4℃避光裂解30-60 min（in 1×裂解液）

二 电泳实验

①



4℃避光浸泡15 min（in 1×TAE或TBE电泳液）



中性电泳30-45 min（1 V/cm）

②



4℃避光解旋30 min（in 1×碱性电泳液）



碱性电泳15-30 min（1 V/cm）



去离子水浸洗玻片5 min，重复2次



加入50 μL/孔配制好的1×PI染料，室温避光染色10 min



去离子水去除多余染料



荧光显微镜观察

电泳液选择：
①.TBE优选用于细胞凋亡的分析；
②.碱性电泳可检测单链和双链DNA断裂，大多数碱不稳定位点

1×碱性电泳液配制：
用去离子水将20×碱性电泳液稀释20倍，4℃预冷。

V1.2