



彗星电泳实验报告

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
水平电泳仪	申花	SH-DDY20P
激光共聚焦	徕卡	stellaris 5
微波炉	美的	/
恒温水浴锅	恩谊	/
载玻片	世泰	80302-2104
盖玻片	世泰	85850-0001
1.5mL 离心管	科兔生物	KTL-15-P
细胞孔板	科兔生物	KTB-6

2、主要实验试剂

试剂名称	厂家	货号
DMEM 培养基	Gibco	C1885500BT
胰酶消化液	Biosharp	BL512A
1M Tris-HCl	Biosharp	BL537A
电泳缓冲液	科兔生物	MG-DY-09
PBS 缓冲液	科兔生物	RG-CE-10

二、实验步骤

1.试剂准备

a.1%正常熔点琼脂糖凝胶配制：根据琼脂糖凝胶的浓度和体积计算出所需琼脂糖的重量，称取适量正常熔点琼脂糖(Normal Melting Point Agarose)加入到 200ml 锥形瓶中，加入适量的 PBS 后加热溶解。例如 100mg 正常熔点琼脂糖中加入 10ml PBS，适当晃动混匀琼脂糖粉末，微波炉加热煮沸琼脂糖溶液或置于 90-100°C水浴中至完全溶解。随后置于 45°C水浴中冷却后备用。未使用完的 1%正常熔点琼脂糖凝胶可在 4°C保存，下次重新熔解后使用。

b.0.7%低熔点琼脂糖凝胶配制：根据琼脂糖凝胶的浓度和体积计算出所需低熔点琼脂糖



的重量，称取适量低熔点琼脂糖(Low Melting Point Agarose)加入到 200ml 锥形瓶中，加入适量的 PBS 后加热溶解。例如 70mg 低熔点琼脂糖中加入 10ml PBS，适当晃动混匀低熔点琼脂糖粉末，70-80°C水浴 5-10 分钟，使琼脂糖溶液完全溶解。随后置于 37°C水浴中冷却至少 20 分钟后备用。未使用完的 0.7%低熔点琼脂糖凝胶可在 4°C保存，下次重新溶解后使用。

c.中性缓冲液配置：使用 1M Tris-HCl 和纯水配置 0.4M Tris-HCl，备用。

2.样品的准备

收集细胞上清(含悬浮的细胞)，贴壁细胞用胰酶消化，收集细胞悬液后和收集的细胞上清混合，离心去除上清。细胞用冰浴预冷的 PBS 洗涤一次，离心收集细胞沉淀，加入适量 PBS 重悬使细胞密度为 1×10^6 个/ml。

3.制片

a.第一层凝胶的制备：该层为 1%正常熔点琼脂糖凝胶。将载玻片的磨砂面朝上，45°C 预热，将预热的 30 μ l 1%正常熔点琼脂糖凝胶铺在彗星电泳载玻片的圆孔内或载玻片上，盖上盖玻片，4°C放置 10 分钟使其凝固。轻轻移去盖玻片，室温放置备用，此时凝胶为薄薄的一层。

b.第二层凝胶的制备：该层为含有细胞悬液的低熔点琼脂糖。将 10 μ l 细胞(约 10^4 个)和 75 μ l 37°C水浴的 0.7%低熔点琼脂糖混合均匀，然后迅速吸取 70 μ l 滴加到第一层凝胶上，用移液器吸头轻轻的铺开铺匀，覆盖整个第一层胶，或盖上盖玻片，4°C放置 10 分钟使其凝固。

4.细胞裂解

a.裂解液的配制：按照 Lysis Buffer 与 DMSO 的比例为 9:1 配制裂解液，例如取 9ml Lysis Buffer 加入 1ml DMSO，混匀即得 10ml 裂解液。配制完毕后，置于 4°C预冷备用。

b.将载玻片置于 10cm 培养皿中，倒入约 10ml 预冷的裂解液，淹没凝胶和载玻片。4°C裂解过夜，取出载玻片用 PBS 漂洗 3 分钟。

5.DNA 解旋

将载玻片置于水平电泳槽中，倒入电泳缓冲液，至少高于载玻片胶面 0.25cm 左右，室温放置 20-60 分钟。该步骤使 DNA 双链在碱性条件下解螺旋，并使断裂的小片段 DNA 在电场中易于迁移。

6.电泳

电泳可在任何水平电泳槽中进行，电泳电压一般为低电压 25V (~0.75-1V/cm)，电泳时间通常在 20-30 分钟的短时间内进行。

注 1：电泳时宜低温最好是冰浴，并避光。推荐在冷库或 4°C冰箱中避光电泳。不同电泳槽的电泳时间需要适当调整，保持电场强度约 0.75-1V/cm 即可。

7.中和与染色

电泳后将载玻片置于平皿内，加入中性缓冲液，将载玻片没入即可，4°C中和 1-3 次，每次 5-10 分钟，弃去中性缓冲液，在载玻片上滴加约 20 μ l Propidium Iodide Solution，避光



染色 10-20 分钟。然后超纯水(Ultrapure Water)洗涤 3 次，盖上盖玻片，随后即可在荧光显微镜下观察。

8.观察、拍照和实验结果分析。

在激光共聚焦下观察和拍照。

仅供科研用途，不可用于临床诊断！