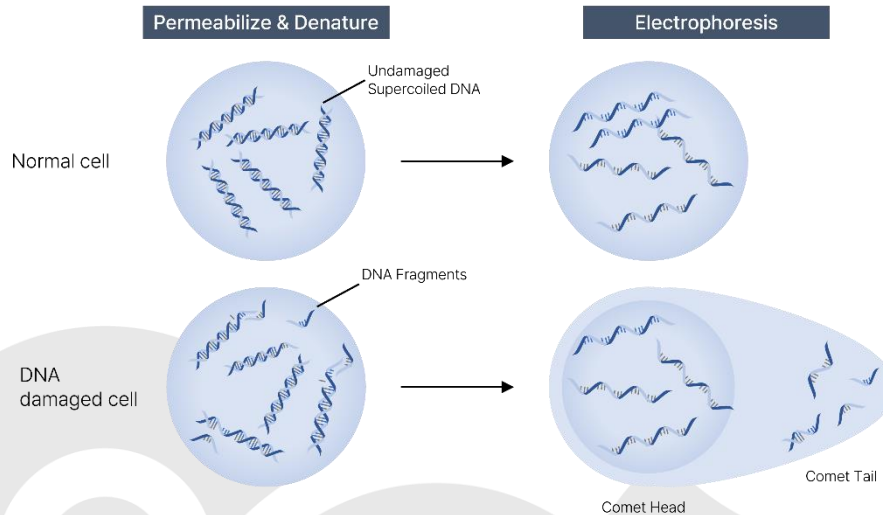


Comet Assay kit

(Fluorometric)

BO-COM-75, 75 Assays (3 assays/slide)

제품 원리



BIOMAX 사의 Comet Assay kit는 개별 세포의 DNA 손상 정도를 시각적으로 평가할 수 있도록 하는 제품입니다. 손상되지 않은 DNA는 핵양체(nucleoid) 내에 머무르지만, 변성되거나 절단된 DNA 단편은 전기장의 영향으로 핵양체 밖으로 이동하여 혜성 형태로 관찰됩니다. DNA 염색 후 혜성 꼬리의 길이와 형광 강도 분포를 분석하여 DNA 손상 정도를 평가할 수 있습니다. Neutral comet assay는 이중 가닥 절단(double-strand break)을 검출하는 데 사용되며, alkaline comet assay는 단일 가닥 및 이중 가닥 절단 모두를 검출할 수 있습니다.

제품의 구성 및 보관 조건

Components	Size	Storage
LM Agarose	15 ml	2-8 °C
Lysis solution	500 ml x 2 Bottles	Room Temperature
200 mM EDTA, pH 10	20 ml	
Comet slide	25 ea	
Secure Green solution, 10,000x	20 µl	2-8 °C

* 개봉하지 않은 제품은 빛을 차단한 상태에서 2-8 °C 보관 시 약 6 개월간 안정적입니다.

검사 필요 장비 및 소모품

- ▶ Fluorescence Microscope (FITC filter)
- ▶ Electrophoresis system
- ▶ Boiling & 37 °C water bath
- ▶ 2-8 °C refrigerator
- ▶ Vortexer / centrifuge
- ▶ 1 L cylinder
- ▶ Microtube
- ▶ 15 ml or 50 ml conical tube
- ▶ Pipette & Sterile tips
- ▶ 1X PBS (Ca^{2+} , Mg^{2+} free)
- ▶ 500 mM EDTA
- ▶ Distilled or deionized water
- ▶ 70 % Ethanol
- ▶ DMSO (optional; heme이 포함된 sample일 경우)
- ▶ [미제공] Alkaline unwinding solution, pH>13
- ▶ [미제공] Alkaline electrophoresis solution, pH>13
- ▶ [미제공] 1X TBE buffer

실험 전 준비 사항 및 보관 방법

Lysis solution

사용 전 최소 20 분 동안 2-8 °C에 보관 후 사용합니다.

Heme이 포함된 sample의 경우 DMSO를 첨가하여 준비합니다.

예) Lysis solution 40 ml + DMSO 4 ml

LMAgarose

뚜껑을 느슨하게 연 뒤, 병을 95-100 °C에서 agarose가 완전히 녹을 때까지 약 5 분간 가열합니다.

이후 사용 전까지 37 °C water bath에서 충분히 식힙니다.

Staining solution

Secure Green solution을 1:10,000의 비율로 희석합니다.

예) Secure Green solution 1 µl + D.W. 10 ml

*Staining solution은 Propidium iodide (final conc. 10-30 µM) 등의 다른 형광 염료로 대체할 수 있습니다.

[For Alkaline comet assay]

아래 표에 따라 용액을 제조하고, 완전히 녹인 후 사용합니다.

Alkaline Unwinding Solution, pH>13 (200 mM NaOH, 1 mM EDTA)

Component	Volume
NaOH	0.4 g
200 mM EDTA, pH 10	250 µl
D.W.	49.75 ml

용액을 제조하는 동안 따뜻해질 수 있으므로 상온에서 충분히 식힌 후 사용합니다.

Alkaline Electrophoresis solution, pH>13 (200 mM NaOH, 1 mM EDTA)

Component	Volume
NaOH	8 g
500 mM EDTA	2 ml
D.W.	Up to 1 L

사용하기 직전 신선하게 만드는 것이 권장됩니다. 2-8 °C에서 식힌 후 사용합니다.

[For Neutral comet assay]

1X TBE buffer

Component	Volume
Tris base	10.8 g
Boric acid	5.5 g
EDTA	0.93 g
D.W.	Up to 1 L

2-8 °C에서 식힌 후 사용합니다.

주의 사항

- ▶ LMAgarose를 37 °C로 식히지 않을 경우 세포에 손상을 가할 수 있습니다.
반드시 충분히 식힌 후 사용하여 주시기 바랍니다.
- ▶ LMAgarose를 녹일 때 전자레인지 사용은 권장하지 않습니다.
95-99 °C boiling water bath 혹은 끓는 물에서 녹이는 것을 권장합니다.
- ▶ LMAgarose가 녹을 수 있으므로 굳힌 이후에는 열을 가하지 않도록 주의합니다.
- ▶ Lysis solution은 장기간 냉장 보관할 경우 침전물이 발생할 수 있습니다. 사용 이후에는 실온에 보관하시기 바랍니다.
- ▶ 제조한 Alkaline unwinding solution 및 Alkaline electrophoresis solution의 pH>13인지 확인하시기 바랍니다. pH<13일 경우, 정확한 DNA의 손상 정도 및 이동 패턴을 관찰하기 어려울 수 있습니다.
- ▶ 실험을 진행하는 동안 반드시 개인 보호구 (장갑, 실험복 등)를 착용하시기 바랍니다.
특히 Alkaline Unwinding solution 및 Alkaline electrophoresis solution은 반드시 장갑을 착용한 후 제조 및 사용해야 합니다.
- ▶ 전기 영동 시 사용하는 기기, 실험실 환경 및 실험 목적에 따라 실험 조건이 달라질 수 있으므로, 예비 실험을 권장합니다. 0.6-1.2 V/cm, 300 mA, 30-60 min 등의 다양한 조건을 고려하여 예비 실험을 수행한 뒤, 실험 조건을 확립하여 본 실험을 진행하시기 바랍니다.
- ▶ 실험 과정 중 Comet slide 위에 용액을 붓지 않도록 주의합니다.

Sample preparation

Suspension Cells

세포를 수집하여 원심분리한 뒤, 차가운 1X PBS에 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 의 세포 현탁액을 준비합니다.

Adherent Cells

원심분리한 뒤, 차가운 1X PBS로 한 번 세척합니다. 이후, 차가운 1X PBS에 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 의 세포 현탁액을 준비합니다. 만약 세포 손상이 심하다면 Trypsin 처리 시간을 줄이거나 scraper를 사용하는 등의 방법으로 세포 손상을 최소화합니다.

Tissue preparation

조직 조각을 20 mM EDTA가 포함된 차가운 1X PBS 1-2 ml에 넣습니다. 작은 해부용 가위를 사용하여 조직을 아주 작은 조각으로 잘게 자른 후 5 분간 그대로 둡니다. 잔여물이 옮겨지지 않도록 주의하며, 세포 현탁액을 회수합니다. 세포 수를 세고 원심분리하여 펠렛을 만든 후, 차가운 1X PBS에 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 의 밀도로 재현탁합니다.

Controls

음성 대조군은 세포 내 내인성 손상 수준 및 시료 전처리 중 발생할 수 있는 추가 손상을 확인하기 위해 항상 포함해야 합니다. 양성 대조군이 필요한 경우, $1 \times 10^5/\text{ml}$ 의 세포 현탁액에 $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ 또는 $25 \mu\text{M KMnO}_4$ 를 4°C 에서 20-30 분간 처리하여 준비합니다.

실험 과정

For Alkaline comet assay

- ① 사용 전 최소 20 분간 Lysis solution을 2-8 °C에 보관하여 차가운 상태로 준비합니다.
- ② LMAgarose의 뚜껑을 느슨하게 연 뒤, 끓는 물에 넣어 완전히 녹여줍니다. 그 다음 37 °C water bath에 최소 20 분간 넣어 충분히 식혀줍니다.
- ③ 세포 현탁액과 LMAgarose를 1:10의 비율로 섞은 뒤, Comet slide의 well 당 50 µl씩 분주합니다.
예) 세포 현탁액 50 µl + LMAgarose 500 µl
**필요한 경우, pipette tip 측면을 이용해 agarose가 well 영역을 완전히 덮도록 합니다.*
- ④ 빛을 차단한 뒤 Comet slide를 2-8 °C에서 10 분간 굳힙니다.
**단, 습도가 높은 환경일 경우에는 시간을 약 30 분까지 굳혀 부착성이 증가되도록 합니다.*
- ⑤ Comet slide를 Lysis solution에 담가 빛을 차단한 뒤 2-8 °C에서 30-60 분간 배양합니다.
**민감도를 높이기 위해 O/N도 가능합니다. 실험 목적 및 환경에 맞추어 배양 시간을 조절합니다.*
- ⑥ Comet slide를 꺼낸 후, 가볍게 두드려 여분의 용액을 제거합니다.
- ⑦ Alkaline unwinding solution에 slide를 담그고, 빛을 차단한 뒤 상온에서 20 분 또는 2-8 °C에서 1 시간 동안 배양합니다.
- ⑧ 차가운 Alkaline Electrophoresis buffer를 전기영동 탱크에 채우고, Comet slide를 올립니다.
- ⑨ 0.6-1.2 V/cm, 300 mA 조건에서 30 분 동안 전기영동을 진행합니다.
- ⑩ Comet slide를 꺼내 가볍게 두드려 묻은 용액을 제거한 다음, D.W.에 5 분간 담급니다.
- ⑪ Comet slide를 70% Ethanol에 5 분간 담급니다.
- ⑫ Comet slide를 꺼내 가볍게 두드려 묻은 용액을 제거하고, 37 °C에서 10-15 분간 Comet slide를 건조합니다.
- ⑬ 건조된 Agarose에 staining solution 100 µl를 올리고, 빛을 차단한 뒤 실온에서 30 분간 염색합니다.
- ⑭ Comet slide를 가볍게 두드려 여분의 염색 용액을 제거하고, D.W.로 행굽니다. 그 다음, 37 °C에서 완전히 건조합니다.
- ⑮ 형광 현미경(FITC filter)으로 즉시 관찰합니다.

For Neutral comet assay

- ① 사용 전 최소 20 분간 Lysis solution을 2-8 °C에 보관하여 차가운 상태로 준비합니다.
- ② LMAgarose의 뚜껑을 느슨하게 연 뒤, 끓는 물에 넣어 완전히 녹여줍니다. 그 다음, 37 °C water bath에 최소 20 분간 넣어 충분히 식혀줍니다.
- ③ 세포 현탁액과 LMAgarose를 1:10의 비율로 섞은 뒤, Comet slide의 well 당 50 µL씩 분주합니다.
예) 세포 현탁액 50 µl + LMAgarose 500 µl
**필요한 경우, pipette tip 측면을 이용해 well 영역을 완전히 덮도록 합니다.*
- ④ 빛을 차단한 뒤 Comet slide를 2-8 °C에서 10 분간 굳힙니다.
**단, 습도가 높은 환경일 경우에는 시간을 약 30 분까지 굳혀 부착성이 증가되도록 합니다.*
- ⑤ Comet slide를 Lysis solution에 담가 빛을 차단한 뒤 2-8 °C에서 30-60 분간 배양합니다.
**민감도를 높이기 위해 O/N도 가능합니다. 실험 목적 및 환경에 맞추어 시간을 조정합니다.*
- ⑥ Comet slide를 꺼낸 뒤, 가볍게 두드려 남은 용액을 제거합니다.
- ⑦ Comet slide를 차가운 1X TBE buffer에 15 분간 담가 세척합니다.
- ⑧ 전기영동 탱크에 차가운 1X TBE buffer를 채우고, Comet slide를 올립니다.
- ⑨ 0.6-1.2 V/cm, 300 mA 조건에서 40 분 동안 전기영동을 진행합니다.
- ⑩ Comet slide를 꺼내 가볍게 두드려 여분의 TBE buffer를 제거한 다음, D.W.에 5 분간 담급니다.
- ⑪ Comet slide를 70% Ethanol에 5 분간 담급니다.
- ⑫ Comet slide를 꺼내 가볍게 두드려 묻은 용액을 제거하고, 37 °C에서 10-15 분간 Comet slide를 건조합니다.
- ⑬ 건조된 Agarose에 staining solution 100 µl를 올리고, 빛을 차단한 뒤 실온에서 30 분간 염색합니다.
- ⑭ Comet slide를 가볍게 두드려 여분의 염색 용액을 제거하고, D.W.로 행굽니다. 그 다음, 37 °C에서 완전히 건조합니다.
- ⑮ 형광 현미경(FITC filter)으로 즉시 관찰합니다.

결과 분석

-누적 관찰 및 촬영 시 광산화에 의해 형광이 증가할 수 있습니다.

[Alkaline comet assay]

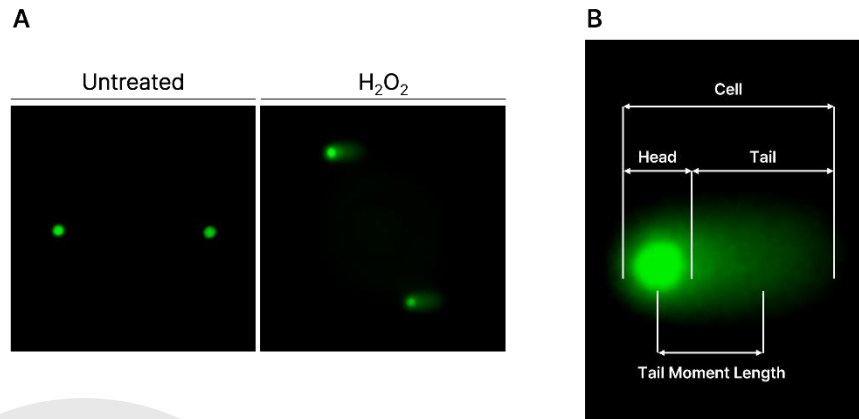


Figure 1. H₂O₂-induced HeLa cells. HeLa cells were untreated (A, left) or treated (A, right and B) with 100 μM of H₂O₂ for 30 minutes before alkaline comet assay (Electrophoresis, 25-30 V, 300 mA for 30 minutes).

- Tail DNA%는 cell 전체의 형광 intensity와 tail 부분의 intensity 값을 사용해 다음 식을 이용하여 구합니다.

$$\text{Tail DNA\%} = \frac{\text{Tail DNA Intensity}}{\text{Cell DNA Intensity}} \times 100$$

- Tail Moment Length는 Head의 중간 지점부터 Tail의 중간 지점까지의 거리를 의미합니다.

- Tail Moment는 아래 방법 중 하나를 선택하여 측정할 수 있습니다.

$$\text{Olive Tail Moment} = \text{Tail DNA\%} \times \text{Tail Moment Length}$$

Appendix

-실험 목적에 따라 사용자가 원하는 염색 시약으로 대체하여 사용할 수 있습니다.

[예시]

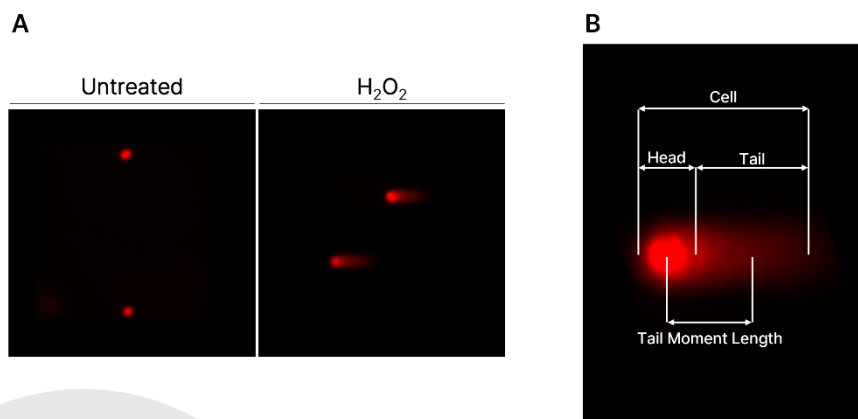


Figure 2. H_2O_2 -induced HeLa cells stained with $10\ \mu\text{M}$ of propidium iodide. HeLa cells were untreated (A, left) or treated (A, right and B) with $100\ \mu\text{M}$ of H_2O_2 for 30 minutes before alkaline comet assay (Electrophoresis, 25-30 V, 300 mA for 30 minutes).

Related products

-

* 안전한 사용을 위해 유해물질 정보는 MSDS를 참조하십시오.



Homepage : www.biomax.com

Shopping mall : www.biomaxmall.com

E-mail : info@scgbiomax.com

Tel : 02-3296-3158 / Fax : 02-973-2858

(주) 바이오맥스 : 경기 구리시 갈매순환로166번길 46, 금강펜테리움 IX타워 CORE-C, 7층

Note