

DNA损伤检测试剂盒(γ -H2AX免疫荧光法)

产品编号	产品名称	包装
C2035S	DNA损伤检测试剂盒(γ -H2AX免疫荧光法)	>100次

产品简介:

- 碧云天生产的DNA损伤检测试剂盒(γ -H2AX免疫荧光法), 英文名为DNA Damage Assay Kit by γ -H2AX Immunofluorescence, 是通过免疫荧光染色检测DNA损伤标记物 γ -H2AX(即磷酸化的H2AX)的含量以确认DNA是否损伤的检测试剂盒。本试剂盒中的 γ -H2AX兔单抗可以识别人、小鼠或大鼠的 γ -H2AX, 因此本试剂盒可以通过荧光显微镜或高内涵筛选(High content screening, HCS)等检测人、小鼠或大鼠等细胞或组织中的DNA损伤。
- 本试剂盒提供了固定液、洗涤液、封闭液、一抗、荧光标记二抗、细胞核荧光染色液、封片液, 使用时不必再配制其它任何溶液。提供了细胞核荧光染色液, 可以把细胞核染成蓝色荧光, 这样可以清楚地判断细胞核内DNA是否损伤。使用本试剂盒检测BGC-823细胞核中DNA损伤的效果参考图1。

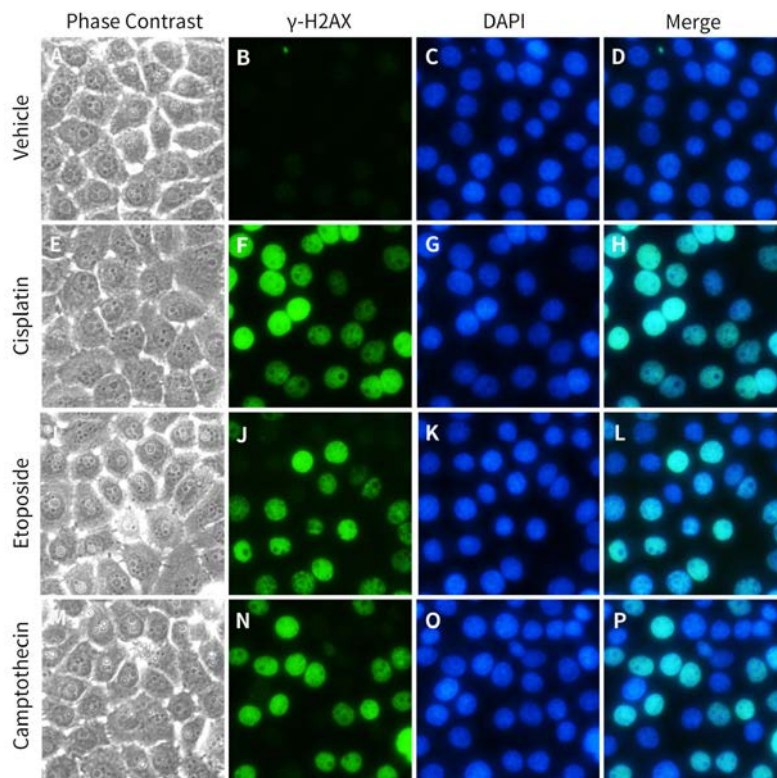


图1. 碧云天DNA损伤检测试剂盒(γ -H2AX免疫荧光法)检测BGC-823(人胃癌细胞)细胞核中DNA损伤的效果图。正常培养条件下的BGC-823中, γ -H2AX含量很低, 细胞核内几乎没有绿色荧光染色(图B); 在100 μ M Cisplatin (S1552)诱导6小时后, 几乎所有细胞核内DNA均出现损伤, γ -H2AX含量大大升高, 细胞核内绿色荧光显著增强(图F); 在50 μ M Camptothecin (SC0141)和100 μ M Etoposide (SC0173)分别诱导1.5小时和6小时后, 部分细胞核内DNA出现损伤, γ -H2AX含量明显升高, 细胞核内绿色荧光显著增强(图J、图N)。Cisplatin、Etoposide或Camptothecin可以向碧云天购买。实际染色效果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中效果仅供参考。

- 本试剂盒中提供的封闭液为碧云天的QuickBlock™免疫染色封闭液, 仅10分钟左右即可完成封闭。
- 使用本试剂盒染色后 γ -H2AX呈绿色荧光, 其最大激发波长为495nm, 最大发射波长为519nm; 细胞核呈蓝色荧光, 其最大激发波长为364nm, 最大发射波长为454nm。
- 根据DNA损伤的原理, DNA的损伤检测试剂盒可以分为三类: 基于损伤DNA理化性质的改变检测DNA损伤, 如彗星实验; 基于分子杂交检测DNA损伤, 如荧光原位杂交法(FISH); 以及基于DNA损伤后形成的产物检测DNA损伤, 如磷酸化的H2AX、暴露的3'-OH (TUNEL)和8-OHdG等。前两种方法是基于荧光标记直接观测DNA的损伤情况, 而基于DNA损伤后形成的产物检测DNA损伤是通过标记物的检测间接反映DNA的损伤程度[1-3]。本试剂盒是通过DNA损伤后形成的磷酸化的H2AX Ser139产物(即 γ -H2AX

或 γ H2AX)间接评估DNA的损伤, 也被称为DNA双链断裂染色检测试剂盒(DNA Double Strand Break (DSB) Staining Kit)、细胞双链DNA断裂检测试剂盒(Cellular DNA Double Strand Break Assay Kit)、或H2AX磷酸化检测试剂盒(H2AX Phosphorylation Assay Kit)。

- 常见的DNA损伤有碱基修饰、DNA链内和链间交联、DNA单链断裂(DNA single strand-breaks, SSBs)以及DNA双链断裂(DNA double-strand breaks, DSBs)等, 其中DNA双链断裂被认为是最严重的DNA损伤。引起DNA产生双链断裂的物理或化学因素有紫外线照射、电离辐射(X、 γ 射线等)、遗传毒性化学物质和化疗药物等。DSBs的无效修复或错误修复可以引发基因组紊乱, 最终导致肿瘤及其它相关疾病的发生[4]。
- H2AX, 全称为H2A histone family member X, 也可简称为H2A.X, 是染色体组蛋白H2A的变体之一。在细胞DNA双链发生断裂时, 磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)相关激酶(Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases, PIKKs)家族成员中的ATM (Ataxia-telangiectasia mutated protein)、ATR (ATM and RAD3-related)等使H2AX上的第139位丝氨酸发生磷酸化修饰, 形成磷酸化的H2AX, 即 γ -H2AX。H2AX磷酸化产生的 γ -H2AX含量水平可以清楚地反映出DNA的损伤程度及修复情况, 而被广泛应用于DNA损伤和细胞凋亡研究中, 成为一种重要的DNA损伤标记物。 γ -H2AX常用于DNA损伤的细胞或动物模型的检测, 也广泛应用于化合物的遗传毒性检测以及临床中肿瘤的早期筛查与治疗效果的评价[5-6]。
- 本系列产品包括 γ -H2AX兔单抗和小鼠单抗两类抗体, 同时提供绿色和红色两种荧光二抗, 以满足不同的染色需求, 具体见相关产品。
- 如果检测96孔板内的样品, 本试剂盒可以检测100-500个样品(抗体重复使用0-4次); 如果用于检测6孔板内的样品, 通常可以检测25-50个样品(抗体重复使用4-9次); 如果检测组织切片至少可以检测50个样品。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C2035S-1	固定液	50ml
C2035S-2	洗涤液	500ml
C2035S-3	免疫荧光染色封闭液	50ml
C2035S-4	γ -H2AX兔单抗	5ml
C2035S-5	抗兔488	5ml
C2035S-6	细胞核染色液(DAPI)	50ml
C2035S-7	抗荧光淬灭封片液	10ml
—	说明书	1份

保存条件:

固定液、细胞核染色液(DAPI) -20°C保存, 其余试剂均4°C保存, 半年有效。其中抗兔488和细胞核染色液(DAPI)须避光保存。

注意事项:

- 固定液对人体有害, 操作时请特别小心, 并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 免疫荧光染色时, 请注意回收使用过的 γ -H2AX兔单抗和抗兔488。回收后通常至少可以重复使用5次, 如果出现浑浊、沉淀等异常现象, 应停止使用。
- 每次使用洗涤液洗涤时须尽量吸尽残余液体, 同时要保持样品表面有些湿润, 不能干掉, 最后一次洗涤完时吸尽洗涤液。
- 需使用可以观察绿色荧光和蓝色荧光的荧光显微镜或高内涵分析仪。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 对于贴壁细胞:

- 吸除培养液, 用PBS洗涤1次。
- 加入固定液, 固定5-15分钟。固定液的用量充分盖住样品即可, 对于6孔板中的样品, 通常每孔加入1ml固定液。对于96孔板中的样品, 通常每孔加入100 μ l固定液, 其它多孔板的用量可以适当参考执行, 后续以6孔板为例进行描述。
- 吸除固定液, 用洗涤液洗涤3次, 每次3-5分钟。每次洗涤时须尽量吸尽残余液体, 同时要保持样品表面有些湿润, 不能干掉, 最后一次洗涤完时吸尽洗涤液。
- 加入免疫染色封闭液, 室温封闭10-20分钟。免疫染色封闭液的用量充分盖住样品即可, 对于6孔板中的样品, 通常加入1ml免疫染色封闭液。
- 吸除免疫染色封闭液, 加入 γ -H2AX兔单抗, 室温孵育1小时或4°C孵育过夜。 γ -H2AX兔单抗的用量充分盖住样品即可, 对于6孔板或96孔板中的样品, 通常分别加入1ml或50 μ l γ -H2AX兔单抗。
- 小心吸出 γ -H2AX兔单抗到适当的容器内, 4°C保存, 留做下次使用。注: γ -H2AX兔单抗通常至少可以重复使用5次。
- 洗涤液洗涤3次, 每次5-10分钟。每次洗涤时须尽量吸尽残余液体, 同时要保持样品表面有些湿润, 不能干掉, 最后一次洗涤完时吸尽洗涤液。
- 加入抗兔488, 室温孵育1小时。抗兔488的用量充分盖住样品即可, 对于6孔板中的样品, 通常加入1ml抗兔488。
- 小心吸出抗兔488到适当的容器内, 4°C保存, 留做下次使用。注: 抗兔488通常至少可以重复使用5次。

- j. 洗涤液洗涤2次, 每次5-10分钟。每次洗涤时须尽量吸尽残余液体, 同时要保持样品表面有些湿润, 不能干掉, 最后一次洗涤完时吸尽洗涤液。
 - k. 加入细胞核染色液(DAPI), 室温染色5分钟左右。细胞核染色液的用量充分盖住样品即可, 对于6孔板中的样品, 通常加入1ml 细胞核染色液(DAPI)。
 - l. 吸除细胞核染色液, 用洗涤液洗涤3次, 每次3-5分钟。每次洗涤时须尽量吸尽残余液体, 同时要保持样品表面有些湿润, 不能干掉, 最后一次洗涤完时吸尽洗涤液。
 - m. 如果是6孔板等较大的孔板, 可以滴加适当量的抗荧光淬灭封片液, 盖玻片封片后荧光显微镜下观察。如果是96孔板, 通常可以在保留洗涤液的情况下直接进行观察和拍照, 或使用高内涵分析仪进行拍照分析。 γ -H2AX的染色为绿色荧光, 细胞核的DAPI染色为蓝色荧光。
- 2. 对于悬浮细胞:**
- a. 离心收集细胞, PBS洗涤1次。吸尽PBS后把细胞适当弹散。
 - b. 加入固定液, 轻轻悬浮细胞, 固定5-15分钟。
 - c. 离心, 去除固定液。
 - d. 加入洗涤液洗涤1次。
 - e. 取少许洗涤液重悬细胞, 滴加到盖玻片或载玻片上, 做成涂片。充分晾干后继续后续操作。
 - f. 洗涤液洗涤2次, 每次5分钟。每次洗涤时须尽量吸尽残余液体, 同时要保持样品表面有些湿润, 不能干掉, 最后一次洗涤完时吸尽洗涤液。
 - g. 转1.d. 后续步骤同1.d起的步骤。或者也可以采用滴染的方法, 具体参考如下的步骤。
 - h. 使用免疫组化笔画圈并干燥。
 - i. 滴加适量免疫染色封闭液, 以充分覆盖样品并且不溢出圈为宜。湿盒内孵育10-20分钟。
 - j. 吸除免疫染色封闭液, 滴加适量 γ -H2AX兔单抗, 以适当覆盖样品并且不溢出圈为宜, 湿盒内室温孵育1小时或4°C孵育过夜。
 - k. 吸除 γ -H2AX兔单抗, 洗涤液洗涤3次, 每次用洗涤液孵育5-10分钟。更换洗涤液过程中保持样品湿润, 避免干燥。最后一次洗涤完时吸尽洗涤液。
 - l. 滴加适量抗兔488, 以适当覆盖样品并且不溢出圈为宜, 湿盒内室温孵育1小时。
 - m. 吸除抗兔488, 洗涤液洗涤2-3次, 每次用洗涤液孵育5-10分钟。更换洗涤液过程中保持样品湿润, 避免干燥。最后一次洗涤完时吸尽洗涤液。
 - n. 滴加适量细胞核染色液(DAPI), 适当覆盖样品并不溢出圈即可, 室温孵育5分钟左右。
 - o. 吸除细胞核染色液(DAPI), 洗涤液洗涤3次, 每次用洗涤液孵育3-5分钟。更换洗涤液过程中保持样品湿润, 避免干燥。最后一次洗涤完时吸尽洗涤液。
 - p. 滴加适量的抗荧光淬灭封片液, 盖玻片封片后荧光显微镜下观察。 γ -H2AX的染色为绿色荧光, 细胞核的DAPI染色为蓝色荧光。
- 3. 对于组织切片:**
- a. 对于石蜡切片先进行常规的脱蜡和水化处理, 对于冷冻切片可以直接进行后续步骤。
 - b. 转1.b. 后续步骤同1.b起的步骤。或者也可以采用滴染的方法, 具体可以转2.h起的步骤。

参考文献:

1. Gabriela Figueroa-González, Carlos Pérez-Plasencia. *Oncol Lett.* 2017. Jun; 13(6): 3982-3988.
2. Marc D. Roy. *Biotechniques.* 2018. VOL. 42, NO. 4.
3. D.V.Firsanov, L.V.Solovjeva, V.M.Mikhailov, M.P.Svetlova. *Genome Stability.* 2016. pp. 635-649.
4. Parshad R, Sanford KK. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2001. 37(2):87-96.
5. Lee, Y., Wang, Q., Shuryak, I. et al. *Radiat Oncol.* 2019. 14, 150.
6. Mah, LJ., El-Osta, A. & Karagiannis, T. *Leukemia,* 2010. 24:679-686.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
C0007	细胞凋亡-DNA Ladder抽提试剂盒	50次
C1086	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)	20次
C1088	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)	50次
C1089	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(红色荧光)	20次
C1090	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(红色荧光)	50次
C1091	TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(显色法)	20次
C1098	TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(显色法)	50次
C2035S	DNA损伤检测试剂盒(γ -H2AX免疫荧光法)	>100次
C2036S	DNA损伤检测试剂盒(γ -H2AX免疫荧光法, 兔单抗, 红色)	>100次
C2037S	DNA损伤检测试剂盒(γ -H2AX免疫荧光法, 鼠单抗, 绿色)	>100次
C2038S	DNA损伤检测试剂盒(γ -H2AX免疫荧光法, 鼠单抗, 红色)	>100次
C2041S	彗星电泳试剂盒	20次

C2041M	彗星电泳试剂盒	100次
--------	---------	------

Version 2023.11.08