

For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures

Version 2.0

DNA损伤检测试剂盒 γ -H2AX免疫荧光法 (绿色)**DNA Damage Assay Kit by γ -H2AX**

Cat.No. MDD1216

Size : >100 tests

Technical literature is available at: www.mesgenbio.comE-mail MesGen Technical Services if you have questions on use of this system: tech@mesgenbio.com**产品简介**

MesGen Biotech的DNA损伤检测试剂盒(γ -H2AX免疫荧光法), 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兔多抗可以识别人、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、磷酸化 γ -H2AX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。并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。

使用本试剂盒染色后 γ -H2AX呈绿色荧光, 其最大激发波长为492nm, 最大发射波长为520nm; 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。

如果检测96孔板内的样品, 本试剂盒可以检测100-300个样品(抗体重复使用1-3次); 如果用于检测6孔板内的样品, 通常可以检测10-30个样品(抗体重复使用1-3次); 如果检测组织切片至少可以检测50个样品。

产品组成

| 名称 | 体积 |
|-------------------|---------------------|
| 固定液 (含通透剂) | 50 mL |
| 10X 洗涤液 | 50 mL (使用时用纯水稀释至1X) |
| 免疫荧光染色封闭液 | 50 mL |
| γ -H2AX兔多抗 | 5 mL |
| 羊抗兔二抗 (绿色荧光) | 5 mL |
| 细胞核染色液(DAPI) | 50 mL |
| 抗荧光淬灭封片液 | 5 mL |

实验步骤**1. 对于贴壁细胞**

- 吸除细胞培养液, 用无菌PBS洗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1 mL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1X 洗涤液洗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1 mL免疫染色封闭液。如背景较杂, 可适当延长封闭时间。
- 吸除免疫染色封闭液, 加入 γ -H2AX兔多抗, 室温孵育1小时或4 $^{\circ}$ C孵育过夜。 γ -H2AX兔多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1 mL或50 μ L γ -H2AX兔多抗。
- 小心吸出 γ -H2AX兔多抗到适当的容器内, -20 $^{\circ}$ C保存, 留做下次使用。注: γ -H2AX兔多抗通常至少可以重复使用3次。
- 1X 洗涤液洗3次, 每次5-10分钟。
- 加入羊抗兔二抗 (绿色荧光), 室温孵育1小时。二抗的用量充分盖住样品即可, 对于6孔板中的样品, 通常加入1 mL二抗。
- 小心吸出羊抗兔二抗 (绿色荧光) 到适当的容器内, 短期内可2-8 $^{\circ}$ C保存, 留做下次使用。注: 二抗通常至少可以重复使用3次。
- 1X 洗涤液洗2次, 每次5-10分钟。
- 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1 mL细胞核染色液(DAPI)。
- 吸除细胞核染色液, 用1X 洗涤液洗3次, 每次3-5分钟。
- 如果是6孔板等较大孔板, 可滴加适当量抗荧光淬灭封片液, 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染色为绿色荧光, 细胞核DAPI染色为蓝色荧光。

2.对于悬浮细胞

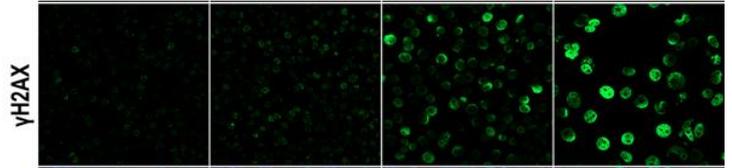
- 离心收集细胞，无菌PBS洗涤1次。吸尽PBS后把细胞适当弹散。
- 加入固定液，轻轻悬浮细胞，固定5-15分钟。
- 离心，去除固定液。
- 加入1X 洗涤液洗1次。
- 取少许1X 洗涤液重悬细胞，滴加到盖玻片或载玻片上，做成涂片。充分晾干后继续后续操作。
- 1X 洗涤液洗2次，每次5分钟。
- 转1.d。后续步骤同1.d起的步骤。或者也可以采用滴染的方法，具体参考如下的步骤。
- 使用免疫组化笔画圈并干燥。
- 滴加适量免疫染色封闭液，以充分覆盖样品并且不溢出圈为宜。湿盒内孵育10-20分钟。
- 吸除免疫染色封闭液，滴加适量 γ -H2AX兔多抗，以适当覆盖样品并且不溢出圈为宜，湿盒内室温孵育1小时或4°C孵育过夜。
- 吸除 γ -H2AX兔多抗，洗涤液洗3次，每次用洗涤液孵育5-10分钟。
- 滴加适量羊抗兔二抗（绿色荧光），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。
- 吸除二抗，洗涤液洗2-3次，每次用洗涤液孵育5-10分钟。
- 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。
- 吸除细胞核染色液(DAPI)，1X 洗涤液洗涤3次，每次用洗涤液孵育3-5分钟。
- 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染色为绿色荧光，细胞核DAPI染色为蓝色荧光。

3.对于组织切片：

- 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。
- 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。

注意事项

- 固定液对人体有害，操作时请特别小心，避免直接接触人体或吸入体内。
- 回收使用过的抗体如果出现浑浊、沉淀等异常现象，应停止后续重复使用。
- 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。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。



图示: Immunofluorescent staining of γ H2AX. DNA damage of HeLa cell from DOX (from left to light: Control、3 hours、24 hours、48 hours)

保存条件

γ -H2AX兔多抗、羊抗兔二抗、免疫荧光染色封闭液、细胞核染色液(DAPI) -20°C避光保存，其余试剂均4°C保存，半年有效。其中抗体须避免多次反复冻融，建议使用前作分装预处理。

产品仅供科学研究 禁止用于临床诊断、治疗

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