

## Comet Assay (SCGE; ang. *single cell gel electrophoresis*)

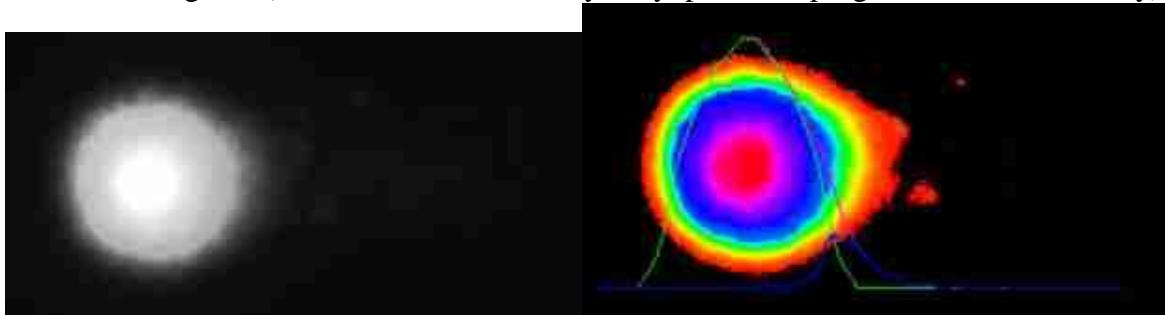
Dr Marcin Schmidt,  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
<http://www.up.poznan.pl/~mschmidt/>

Technika Comet Assay służy do analizy stopnia uszkodzeń DNA w komórce wywołanych czynnikami chemicznymi (np. mutageny, stres oksydacyjny) lub fizycznymi (np. promieniowanie jonizujące i UV) oraz umożliwia śledzenie kinetyki ich naprawy. Technika ta nie jest zalecana do wykrywania apoptozy. Zaobserwować można jedynie wczesne jej fazy, a późniejsze charakteryzują się tak dużymi uszkodzeniami DNA, że "ucieka" ono z żeli i nie jest obserwowane.

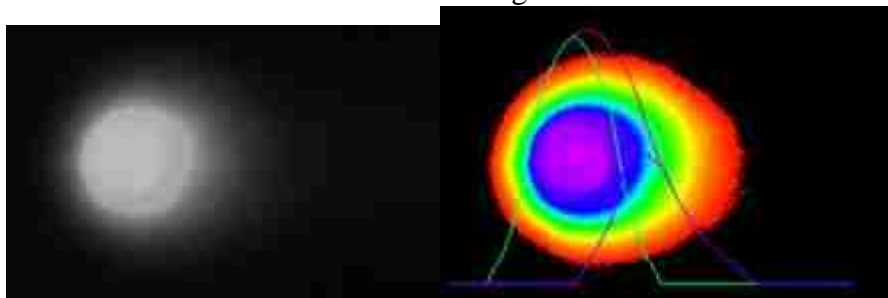
Comet Assay polega na elektroforetycznym rozdziale DNA jądrowego co umożliwia zaobserwowanie jego fragmentacji. Badane komórki unieruchamia się w agarozie na szkiełkach mikroskopowych, a następnie poddaje się je lizie w celu uwolnienia zawartości jądra. Wysoka siła jonowa buforu lizującego wspomaga dysocjację białek od DNA. Następnie przeprowadzana jest elektroforeza (w warunkach neutralnych w standardowym buforze TBE lub w warunkach alkalicznych). DNA wybarwia się fluorescencyjnie lub solami srebra, po czym analizuje uzyskany obraz pod mikroskopem. W przypadku występowania uszkodzeń zaobserwować można obraz przypominający komety. Głowę komety stanowi obszar jądra komórkowego, natomiast ogon fragmenty DNA, które wymigrowały podczas elektroforezy. Im większe uszkodzenia tym ogon jest dłuższy i zawiera więcej DNA.

Analizę obrazu kometek prowadzi się subiektywnie poprzez zliczanie komórek z danego zakresu wielkości ogona komety. Bardziej precyzyjny pomiar wymaga zastosowania specjalistycznego oprogramowania do analizy obrazu. Poniżej przedstawione zostały zdjęcia z programu do analizy uszkodzeń DNA metodą Comet Assay. Przedstawiają one wygląd komety i jej histogram (linie histogramów oznaczają zawartość DNA w głowie komety, ogonie i w całej komecie). Do opisywania stopnia uszkodzeń stosuje się najczęściej %DNA w ogonie (lub "intensywność" ogona), a także współczynniki Tail Moment (=długość\_ogona\*%DNA\_w\_ogonie/100) lub Olive Moment (oba opisują wzrost uszkodzeń DNA do pewnego zakresu, po przekroczeniu którego zwiększenie uszkodzeń nie powoduje już wzrostu wartości tych współczynników).

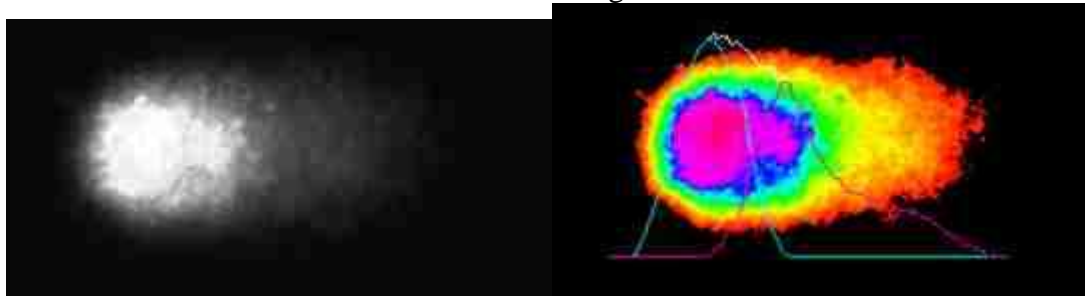
Obraz DNA z komórek kontrolnych (ludzkie komórki nabłonkowe):  
9% DNA w ognie (lewa strona widok rzeczywisty, prawa z oprogramowania do analizy)



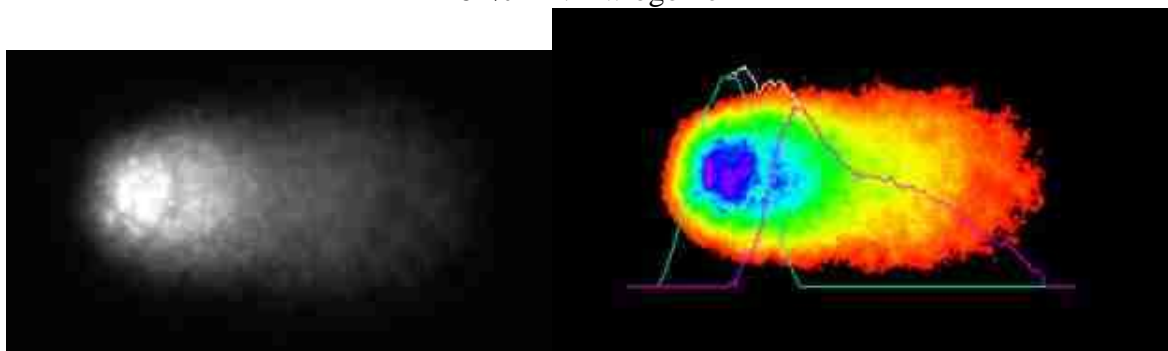
33% DNA w ognie



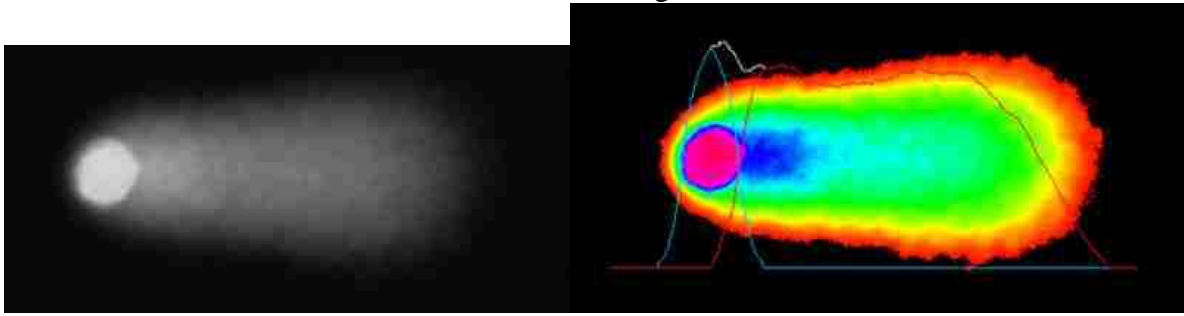
Obraz DNA z komórek poddanych działaniu promieniowania jonizującego w dawce 60 Gy:  
50% DNA w ognie



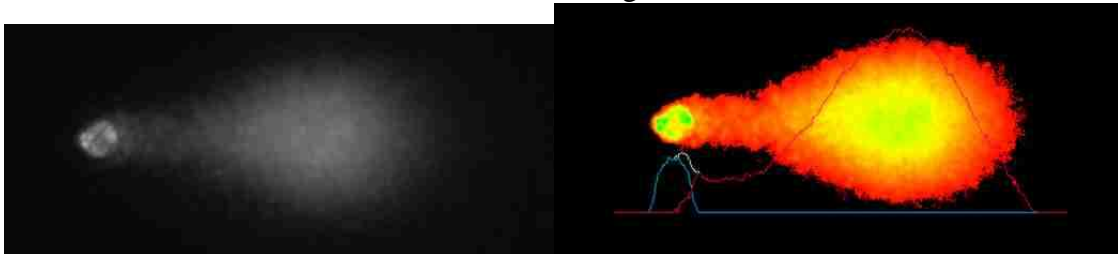
64% DNA w ognie



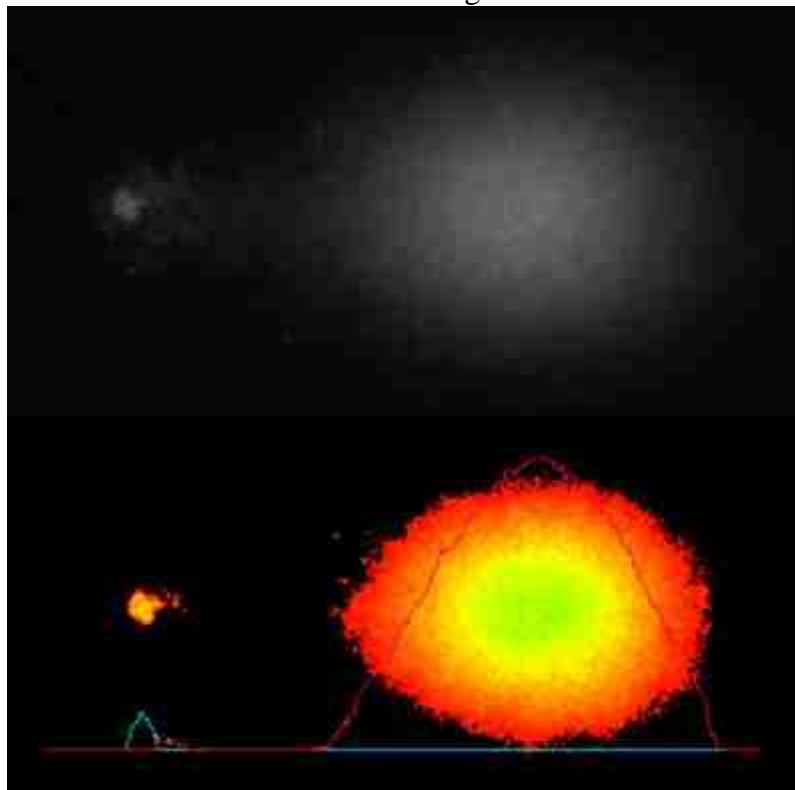
Obraz DNA z komórek poddanych działaniu promieniowania jonizującego w dawce 80 Gy:  
83% DNA w ognie



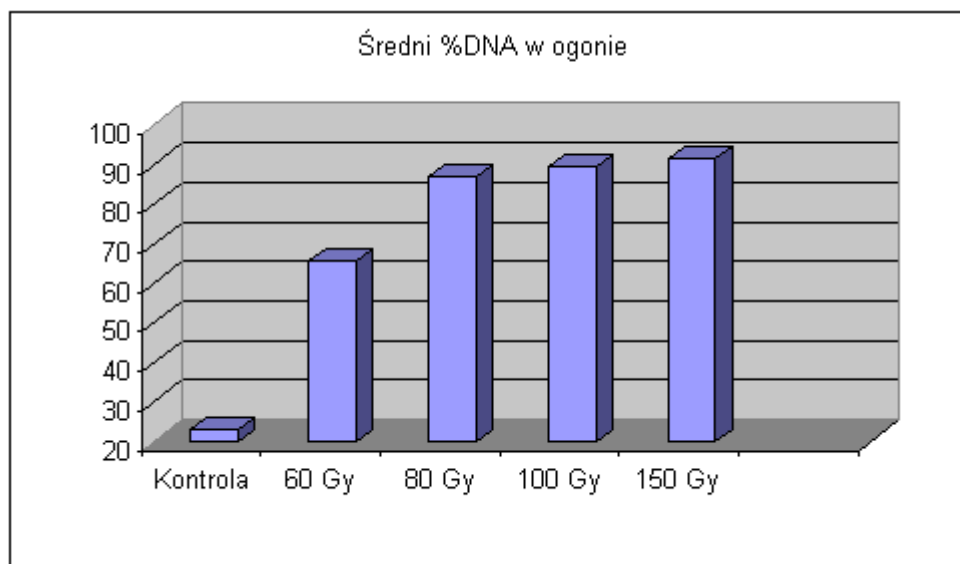
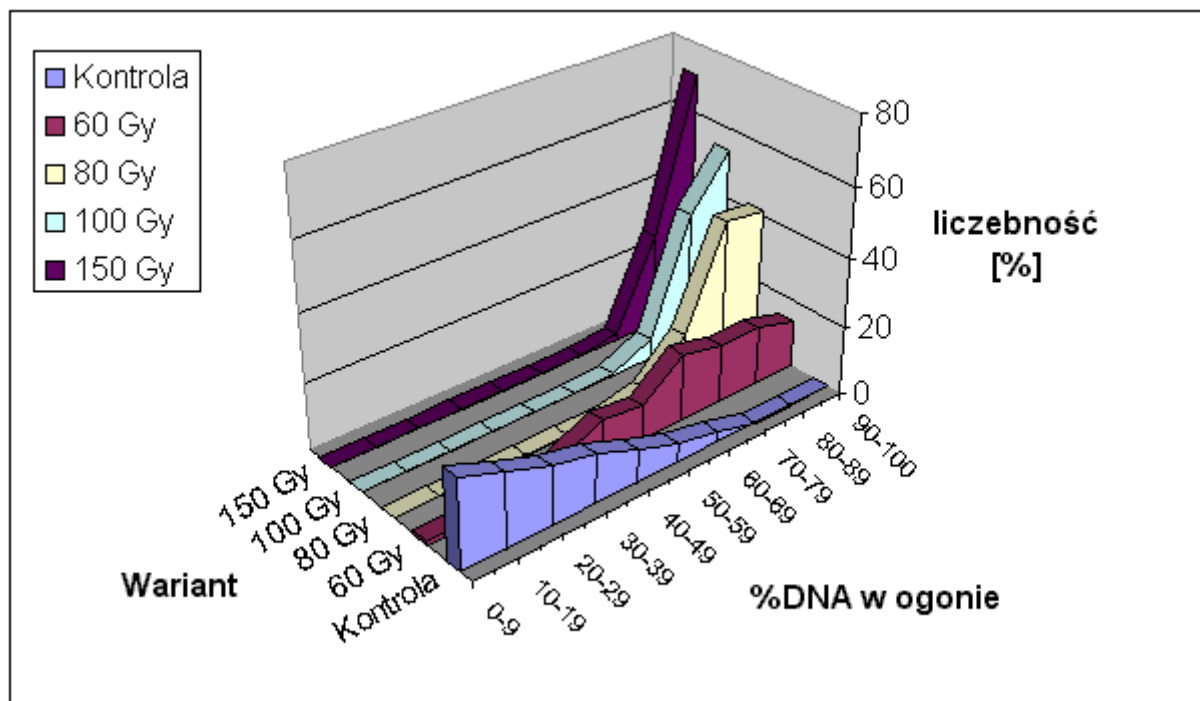
Obraz DNA z komórek poddanych działaniu promieniowania jonizującego w dawce 100 Gy:  
94% DNA w ognie

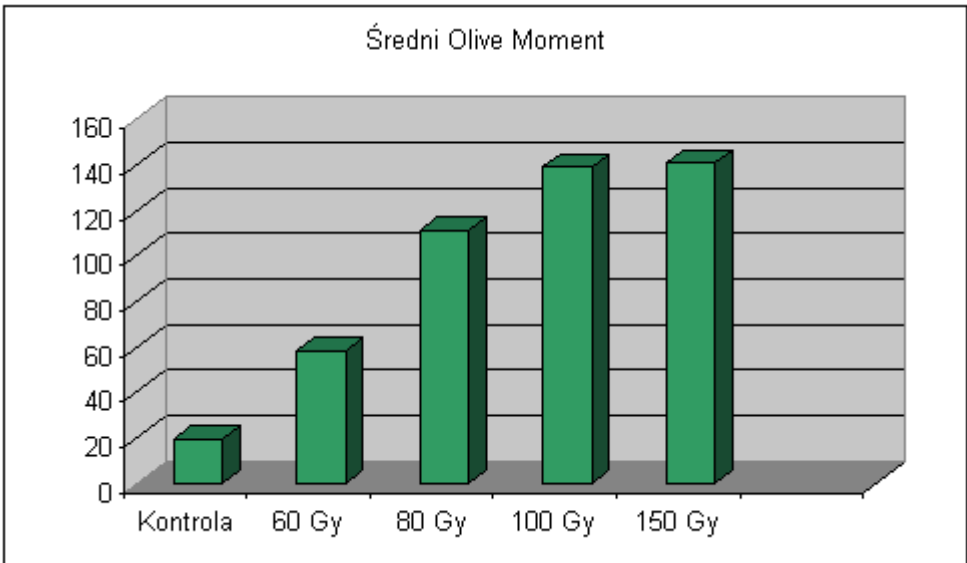
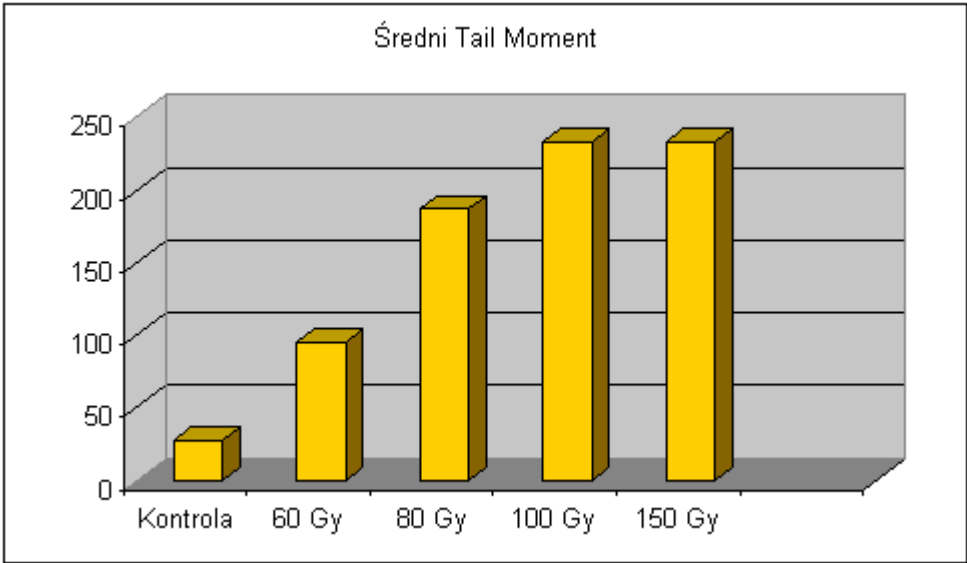


Obraz DNA z komórek poddanych działaniu promieniowania jonizującego w dawce 150 Gy:  
98% DNA w ognie



Komórki z naświetlanej populacji nie wykazują jednakowych uszkodzeń, dla danej dawki czynnika uszkadzającego (tu promieniowanie jonizujące wyrażone w Gy) obserwujemy zakres uszkodzeń.





## Przepis na wykonanie analizy

### Bufor lizujący (A):

2,5 M NaCl (146,1g/l)  
100mM EDTA (37,2g/l)  
10 mM Trizma-base/Tris (1,2g/l)

Składniki wsypać do 800 ml wody destylowanej i mieszając dodawać NaOH około 7 g/l. Po rozpuszczeniu wszystkich składników ustalić pH na 10,0 (stosując NaOH lub HCl), uzupełnić objętość do 900 ml wodą destylowaną, ponownie sprawdzić pH (ewentualnie skorygować małymi ilościami stężonych NaOH lub HCl). Przechowywać w temp. pokojowej.

### Bufor lizujący (B):

Przygotować 100 ml 10% roztworu wodnego Triton X-100 (90ml wody destylowanej uzupełnić do 100ml Tritonem X-100). Przechowywać w temp. pokojowej.

**Pełny bufor lizujący** (90 ml A + 10 ml B) przygotować bezpośrednio przed użyciem, schłodzić 30 min. w lodówce! Uzupełnienie buforu lizującego o DMSO (dimetylo sulfo tlenek, 10%) chroni przed wtórnymi uszkodzeniami przez wolne rodniki uwalniane z komórek podczas lizy (całość procedury należy wykonywać przy słabym rozproszonym świetle w celu minimalizacji możliwości wystąpienia fotouszkodzeń).

### Bufor elektroforetyczny (alkaliczny):

300 mM NaOH (12g/l)  
1 mM EDTA (0,371g/l)  
Ustalić pH > 13 (ważne !)

### Bufor neutralizujący:

0,4 M Trizma-base/Tris pH 7,5 (48,5g/l)

### Roztwory barwiące (fluorochromy):

Bromek etydyny 2µg/ml (przygotować stężony 10x roztwór - 20µg/ml, przed użyciem rozcieńczać wodą) – wysokie tło,

SYBR Green – roztwór wodny w buforze 1:10 (10µl barwnika 1:100 + 90 µl 10 mM Tris pH7,5). Przygotować wcześniej roztwór barwnika 1:100 w DMSO (1µl stężonego barwnika + 99 µl DMSO). Odczyn roztworu bardzo ważny, szybko blednie, stabilny przez kilka godzin.

SYBR Gold – roztwór wodny w buforze 1:10 (10µl barwnika 1:100 + 90 µl 10 mM Tris pH7,5). Przygotować wcześniej roztwór barwnika 1:100 w DMSO (1µl stężonego barwnika + 99 µl DMSO). Odczyn roztworu bardzo ważny, stabilny przez kilka godzin.

Można zastosować DAPI, lub każdy inny barwnik wiążący DNA (w tym pojedynczoniciowy) w zależności od wyposażenia mikroskopu w odpowiednie filtry emisyjne.

### Agaroza:

1% agaroza NMP (o normalnej temperaturze topnienia, przygotowana na wodzie).  
0,5% agaroza LMP (o niskiej temperaturze topnienia, przygotowana na PBS)

### Przygotowanie szkiełek podstawowych:

Szkiełka podstawowe dokładnie odtłuścić (acetonem lub chloroformem) poprzez zanurzenie

Na wrzącej łaźni wodnej przygotować zlewkę z 1% NMP agarozą, suche szkiełko zanurzyć w agarozie, a po wyciągnięciu bibułą zetrzeć agarozę z dolnej powierzchni szkiełka i pozostawić do wyschnięcia (zaznaczyć, na której stronie szkiełka znajduje się agaroz, warstwa może być niewidoczna po wyschnięciu).

### **Przygotowanie preparatów:**

1. We wrzącej łaźni wodnej upłynnij 0,5% LMP agarozę, po czym przenieś po 150  $\mu$ l do probówek typu eppendorf i umieść w łaźni na 42°C pozostawiając do ustalenia temperatury.
2. Zbierz komórki z hodowli, policz w hemocytometryrze Neubauera (komórki na kontrolę pozytywną inkubuj z 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lub 25 $\mu$ M KMnO<sub>4</sub> przez 20 min. w 4°C), odpowiednią ilość przenieś do probówki typu eppendorf, osadź przez wirowanie 300g, 5 min. temp. pokojowa.
3. Zbierz supernatant, osad rozbij i zawieś w 1 ml PBS, ponownie zwiruj (warunki jak powyżej), odrzuć supernatant, osad rozbij i zawieś w PBS do stężenia ~10000 komórek/10  $\mu$ l (10<sup>6</sup>komórek/ml).
4. Około 20  $\mu$ l zawiesiny komórek połącz z 150  $\mu$ l 0,5% LMP agarozy (42°C) wymieszaj i nanieś na szkiełko podstawowe pokryte NMP agarozą po 30  $\mu$ l.
5. Komórki zawieszona w LMP agarozie przykryj szkiełkiem nakrywkowym, lekko dociśnij i odstaw do lodówki (lub umieść na wyziębionym wkładzie chłodniczym) na 10 min.
6. Delikatnie zsuń (nie unosić) szkiełko nakrywkowe (można nanieść trzecią warstwę agarozy - LMP).
7. Szkiełko umieść w świeżym, zimnym buforze lizującym (A+B) i inkubuj co najmniej 1h w 4°C (lub przez noc).
8. Delikatnie zbierz bufor lizujący (odsysanie) a następnie zalej zimną wodą destylowaną, delikatnie zamieszaj i unieś szkiełko podstawowe, aby odmyć bufor lizujący.
9. Zbierz roztwór i zalej kolejną porcją wody destylowanej, po czym inkubuj przez 5 min. (płukanie wykonaj trzykrotnie).
10. Zalej szkiełko świeżym, zimnym buforem elektroforetycznym (pH >13), delikatnie zamieszaj i inkubuj 15 min. w 4°C. Zbierz roztwór.
11. Powtórz czynność z punktu 10 (całkowity czas inkubacji w buforze elektroforetycznym powinien trwać minimum 30 min.).
12. Delikatnie przenieś szkiełko do aparatu elektroforetycznego wypełnionego świeżym, zimnym buforem elektroforetycznym.
13. Elektroforezę prowadź przy napięciu ~0,75V/cm (odległość pomiędzy elektrodami aparatu elektroforetycznego, ustalając natężenie do 300mA regulując poziomem buforu) przez 30 min. w temperaturze 4°C.
14. Szkiełko przenieś do naczynia i przemyj trzykrotnie zimną wodą destylowaną.
15. Zalej zimnym buforem neutralizującym i inkubuj 10 minut.
16. Przemyj trzykrotnie wodą destylowaną.
17. Zanurz szkiełko w roztworze 70% etanolu na 5 minut.
18. Wysusz w temperaturze pokojowej lub cieplarni (37°C).

**Uwagi.** Do zakończenia elektroforezy wszystkie operacje prowadzić przy przyciemnionym świetle (intensywne światło powoduje uszkodzenia DNA). Czas lizy, inkubacji w buforze elektroforetycznym, elektroforezy oraz warunki elektroforezy muszą być stałe i dokładnie zachowywane dla powtarzalności wyników.

**Barwienie.** Nanieś ok. 10  $\mu$ l roztworu barwiącego na preparat, przykryj szkiełkiem nakrywkowym, po czym analizuj obraz pod mikroskopem fluorescencyjnym.

#### **Barwienie solami srebra:**

1. Szkiełka suche podstawowe z preparatami inkubować w roztworze utrwalającym 10 min. sporadycznie mieszając.
2. Przemyc kilkakrotnie wodą destylowaną
3. Wysusz szkiełka w cieplarni co najmniej 1 godz. w 37°C.
4. Przygotuj roztwór barwiący B (rozpuść 25g węglanu sodu w 500 ml wody destylowanej)
5. Przygotuj roztwór barwiący C (rozpuść w 500 ml wody destylowanej w podanej kolejności: 100 mg azotanu amonu, 100 mg azotanu srebra, 500mg kwasu wolframokrzemowego po czym dodaj 0,25 ml 37% formaldehydu).
6. Tuż przed użyciem połącz 68ml roztworu barwiącego C z 32ml roztworu barwiącego B, zalej wysuszone szkiełka (w przypadku wytrącenia się czarnego osadu soli srebra zlej roztwór i nanieś świeżą porcję).
7. Barwienie prowadź przez 10-20 min, aż do uzyskania brązowego lub szarego koloru.
8. Przemyc dwukrotnie wodą destylowaną i zablokuj reakcję w 1% kwasie octowym.
9. Osusz szkiełka i obserwuj pod mikroskopem świetlnym.