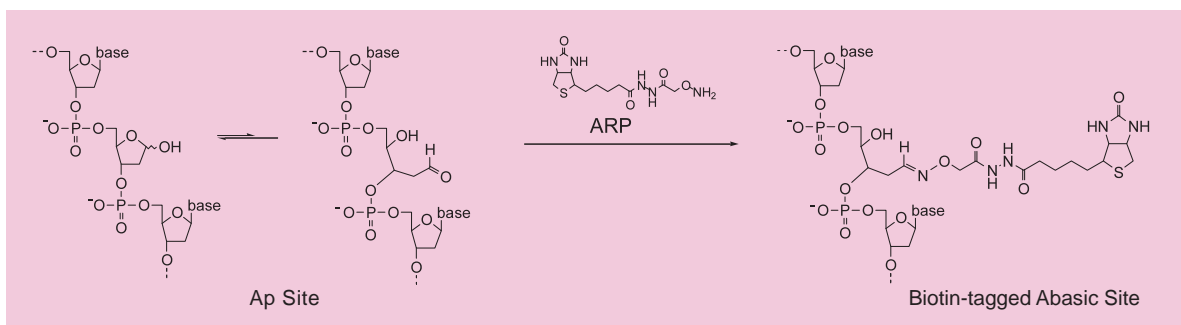


. 概述

DNA的氧化损伤是由于DNA与活性氧 (ROS) 尤其是羟自由基之间的相互作用造成的。由超氧阴离子和过氧化氢通过Fenton反应产生的羟自由基在DNA中产生多重修饰。羟自由基对脱氧核糖基团的氧化攻击将导致DNA释放自由碱基，产生链断裂、各种糖修饰以及单个无碱基位点 (AP位点)。事实上AP位点是由ROS产生的损伤的主要类型。醛反应性探针 (ARP; *N'*-氨基甲基羰基胍-D-生物素) 特异性地与AP位点的开环上的醛基反应。通过这个反应可以检测到导致醛基形成的DNA修饰。用过量ARP试剂反应后，DNA上的所有AP位点均用生物素做了标签。可以用亲和素-生物素法，用连接到亲和素上的过氧化物酶或碱性磷酸酶做比色法检测来对这些带有生物素标签的AP位点进行计数。DNA损伤定量试剂盒包含用于检测每 1×10^5 个碱基对中1-40个AP位点的所有必需溶液。

* 本试剂盒仅适用于基因组DNA中无碱基位点 (Abasic Sites)的检测。

. 在无碱基位点处制备ARP标签的机制



. 试剂盒内含

20 samples

| | |
|---------------------------------|-------------------------|
| ARP Solution | 250 μ l \times 1管 |
| ARP-DNA Standard Solution | 不同浓度各250 μ l |
| Filtration Tube | 20管 |
| Washing Buffer | 1包 |
| 96孔板 | 1块 |
| DNA Binding Solution | 10 ml \times 1瓶 |
| Substrate Solution | 10 ml \times 1瓶 |
| TE Buffer | 40 ml \times 1瓶 |
| HRP-Streptavidin | 25 μ l \times 1管 |

. 储存条件

- 请在0-5 $^{\circ}$ C下保存，切勿冻存。试剂盒在0-5 $^{\circ}$ C下可保存6个月。
- Washing Buffer Solution在室温保存。
- 纯化的ARP-DNA在0-5 $^{\circ}$ C可以保存1年。

. 所需的设备和材料

- 带有630-670 nm滤光片的酶标仪
- 培养箱
- 10 μ l和200 μ l的可调式移液器，多通道移液器
- 微量离心机

. 注意事项

- AP-DNA不稳定，从样品中分离出基因组DNA后请用ARP处理并用过滤管纯化。
- 纯化ARP-DNA后应立即加入200 μ l TE Buffer，如果旋转震荡后的DNA放在过滤管中超过30 min，DNA的回收率会下降。
- 在混合DNA Solution和DNA Binding Solution时，使用 γ 射线消毒的过滤管会造成DNA粘附在过滤管上，如果一定要使用过滤管，请不要使用射线消毒的过滤管。
- 如果想精确测定样品DNA的AP位点数量，建议重复多次测定。
- 如果样品DNA Solution少于10 μ l，请用等量的ARP Solution，在用过滤管纯化后要测定DNA的浓度。
- 在测定时如果没有630-670 nm的滤光片，可以从每孔中吸取50 μ l溶液到一个新的96孔板中，每孔加入50 μ l 1 M浓度的硫酸 (Sulfuric Acid)，在450 nm波长处检测。
- 剩余的溶液会带来误差，在每一步可以采用在纸巾上充分拍打96孔板的方式去除剩余的溶液。

操作步骤



1 向样品DNA溶液中加入ARP溶液。在37 °C下培养1 h。



2 将ARP反应混合液转移到过滤管中，离心以纯化ARP标记的DNA。



3 将ARP-DNA标准溶液或ARP标记的样品DNA溶液加到各孔中。加入DNA结合溶液，并将培养板置于室温下过夜。



4 倒掉溶液并用洗涤缓冲液洗涤各孔。将板放在纸巾上轻拍几次以尽可能干净地去除缓冲液。



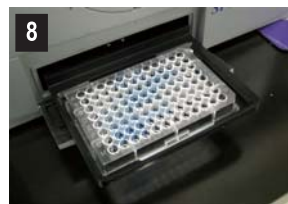
5 将HRP-链霉亲和素溶液加到每孔中并置于37 °C下培养1 h。



6 倒掉溶液并用洗涤缓冲液洗涤各孔。将板放在纸巾上轻拍几次以尽可能干净地去除缓冲液。



7 将Substrate Solution加入各孔中并置于37 °C下培养1 h。



8 测定630-670 nm处O.D.值。

ARP反应 (制备ARP标记的DNA)

1. 用TE Buffer溶解纯化后的DNA，测定吸光度 (260 nm)。按吸光度换算浓度 (DNA浓度:以50 μg/l为吸光度1)，用TE Buffer调节浓度至100 μg/ml。
2. 在0.5 ml管中混合10 μl纯化的基因组DNA溶液 (100 μg/ml) 和10 μl ARP溶液，在37 °C下培养1 h。
3. 用100 μl TE洗涤过滤管内侧。
4. 向ARP标记的DNA溶液中加入380 μl TE Buffer，并将此溶液加入过滤管中。^{a)}
5. 以2,500-5,000 × g离心过滤管15 min，倒掉滤出液。
6. 向过滤管内加入400 μl TE Buffer，用移液器将过滤膜上的DNA重悬。
7. 以2,500-5,000 × g离心过滤管15 min。^{b)}
8. 向过滤管中加入200 μl TE Buffer并用移液器将过滤器上的DNA重悬。
9. 将ARP标记的DNA溶液转移到1.5 ml管中，并向过滤管中再加入200 μl TE Buffer以完全将ARP标记的DNA从过滤器转移到1.5 ml管中。^{c)}
10. 将ARP标记的DNA溶液储存于0-5 °C。

- a) 可用乙醇沉淀代替过滤管来纯化ARP标记的DNA。乙醇沉淀后，将DNA沉淀物溶解到100 μl TE中，并测定DNA浓度。
- b) 如果离心后DNA溶液残留在过滤器上，再离心5 min，接着按步骤7操作。
- c) 使用过滤管的DNA回收率为90%，因此ARP标记的DNA的浓度大约为2.25 μg/ml。为更准确地测定样品DNA中无碱基位点的数目，我们建议测定准确的DNA浓度值。

DNA中无碱基位点数目的测定

第一天

1. 用310 μl TE稀释90 μl ARP标记的DNA溶液。
2. 每孔中加入60 μl ARP-DNA标准溶液。每个浓度的ARP-DNA标准溶液三个孔。
3. 每孔中加入60 μl稀释的ARP标记的DNA溶液。每个样品三个孔。
4. 向每孔中加入100 μl DNA结合溶液并混合。将培养板置于室温下过夜。

第二天

5. 溶液的制备

洗涤缓冲液：

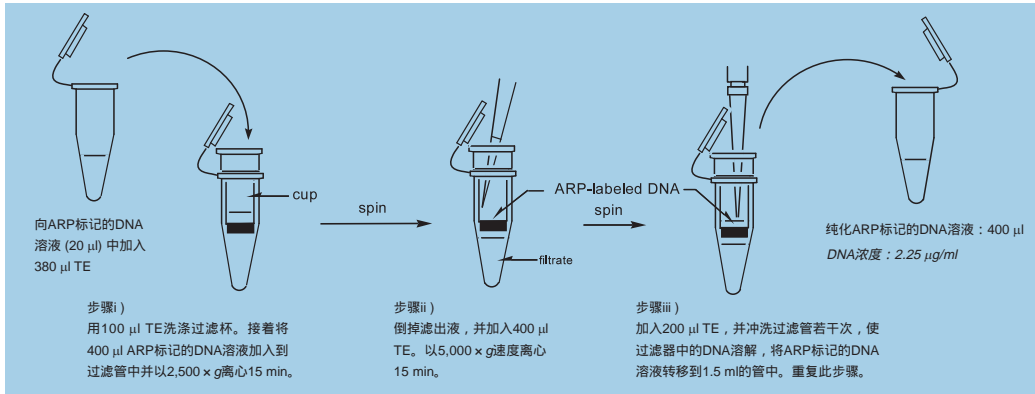
将洗涤缓冲液包的内容物溶解到1 L去离子水或蒸馏水中。室温储存此洗涤缓冲液。

HRP-链霉亲和素溶液：

用洗涤缓冲液稀释HRP-链霉亲和素以制备HRP-链霉亲和素工作液。稀释到4,000倍 (现配现用)。

6. 倒掉各孔中的DNA结合溶液并用250 μl 洗涤缓冲液洗涤各孔5次。倒掉洗涤缓冲液后，将培养板倒置并轻拍几次以完全去除该溶液。
7. 向每孔中加入150 μl稀释的HRP-链霉亲和素工作液并置于37 °C下培养1 h。
8. 倒掉各孔中的溶液，用250 μl 洗涤缓冲液洗涤各孔5次。
9. 向每孔中加入100 μl底物溶液并置于37 °C下培养1 h。
10. 测定630-670 nm处的O.D.值，并使用从ARP-DNA标准溶液孔得到的数据制作校准曲线。
11. 使用标准曲线确定基因组DNA中的无碱基位点的数目。

. ARP标记的基因组DNA的分离过程



96板孔上DNA溶液的排列

Standard ARP-DNA (60 µl/well) or sample DNA (60 µl/well) + DNA Binding Solution (100 µl/well)

[20 samples]

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|------------------|---|----------|----------|---|-----------|----------|---|-----------|-----------|----|
| A | | 0 ARP DNA std. | | | sample 1 | | sample 5 | | | sample 13 | | |
| B | | 2.5 ARP DNA std. | | | | | | sample 6 | | | sample 14 | |
| C | | 5 ARP DNA std. | | | sample 2 | | sample 7 | | | sample 15 | | |
| D | | 10 ARP DNA std. | | | | | | sample 8 | | | sample 16 | |
| E | | 20 ARP DNA std. | | | | | sample 9 | | | sample 17 | | |
| F | | 40 ARP DNA std. | | | | | sample 10 | | | sample 18 | | |
| G | | blank | | sample 3 | | | sample 11 | | | sample 19 | | |
| H | | | | sample 4 | | | sample 12 | | | sample 20 | | |

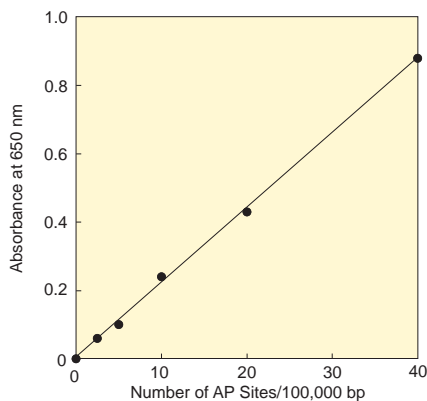
blank: 60 µl TE Buffer + 100 µl DNA Binding Solution/well
Do not use column 1 and 12

↓
Washing (250 µl/well)
HRP-Streptavidin (150 µl/well)
Washing (250 µl/well)
Substrate (100 µl/well)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Washing HRP-Streptavidin and Substrate

. 典型标准曲线



如何制备典型标准曲线

1. 计算每个ARP-DNA标准溶液的平均O.D.值。
 2. 用平均O.D.值 - 空白O.D.值。^{a)}
 3. 绘出标准溶液的AP位点数目对应的O.D.值。X轴为AP位点数目，Y轴为O.D.值。
 4. 使用此标准曲线确定样品中的AP位点数目。
- a) 空白O.D.值约为0.04-0.06，且40个ARP-DNA标准溶液的O.D.值约为0.8-1.0。O.D.值取决于HRP-链霉亲和素的活性。

. 参考文献

1. Bibo Wang, *et al.*, Contradictory Effects of Mitochondria and Non-Mitochondria-Targeted Antioxidants on Hepatocarcinogenesis by Altering DNA Repair in Mice, *Hepatology*, **2018**, 67(2), 623-635
2. Mengxia Li, *et al.*, APE1 deficiency promotes cellular senescence and premature aging features, *Nucleic Acids Research*, **2018**, 46(11), 5664-5677
3. Anne Bravard, *et al.*, The prion protein is critical for DNA repair and cell survival after genotoxic stress, *Nucleic Acids Research*, **2015**, 43(2), 904-916
4. Kuicheon Choi, *et al.*, Impaired Integrity of DNA After Recovery From Inflammation Causes Persistent Dysfunction of Colonic Smooth Muscle, *Gastroenterology*, **2011**, 141, 1293-1301
5. Shinichi Someya, *et al.*, Sirt3 Mediates Reduction of Oxidative Damage and Prevention of Age-Related Hearing Loss under Caloric Restriction, *Cell*, **2010**, 143, 802-812
6. Jeffrey W. Pippin, *et al.*, DNA damage is a novel response to sublytic complement C5b-9-induced injury in podocytes, *The Journal of Clinical Investigation*, **2003**, 111, 877-885