

## Comet assay

timocita

Eppendorf-csövek ( $2 \times 10^6$  sejt/1 ml / cső)

### A munka menete

- Tárgylemezeket  $-20$  °C-ra tesszük (min. 20 percre)
- Egér túlaltatása éterrel
- Tímusz kivétele
  - Az előzőleg előkészített 10 ml médiumba
- Timocita szuszpenzió készítése
  - A cső tartalmát a Petri-csésze tetejébe borítjuk szitán át
  - A szitára ráöntjük a másik cső tartalmát és átnyomkodjuk a tímuszt
- Sejtszámolás
  - Neubauer/Buerker kamrában
- Sejtek hígítása
  - $2 \times 10^6$  sejt/lyuk
- A sejtek kezelése
  - közben:
    - elkészítjük a tárgylemezeket
      - maratott tárgylemezt kivesszük a hűtőből, a párát letöröljük,
      - felolvasztott, max 1,5 %-os agarózba merítjük
        - $+4$  °C-ra tesszük
    - 5 ml mincing solution készítése:
      - 3,5 ml steril deszt víz
      - 0,5 ml 10x HBSS W/O Ca,Mg
      - 0,5 ml 200 mM EDTA
      - 0,5 ml DMSO
- **A további műveleteket minimális fény mellett végezzük!**
- a kezelés elteltével
  - CFG
    - 5 perc

- 10 000 RPM
- leszívjuk a mediumot
- 200 µl mincing solution/cső
  - Felszuszpendáljuk benne a sejteket
- **a sejteket felvisszük a tárgylemezre**
  - összekeverni:
    - 10 µl sejtuszpenzió
    - 75 µl LMPA
  - ezt visszük fel
    - majd lefedjük fedőlemezzel (18×18)
    - minél hamarabb hidegre tesszük
  - hagyjuk megszilárdulni
  - közben:
    - **lizáló oldat** készítése (400 ml):
      - 1% Triton X-100           **4 ml**
      - 10 % DMSO               **40 ml**
      - DV                           **36 ml**
      - 400 ml-re kiegészítjük **lízis pufferrel**
- **Lízis**
  - a tárgylemezeket (a fedőlemez eltávolítása után) az előzőleg elkészített lízis pufferbe tesszük (lehetőleg vízszintesen)
    - 1 h
    - sötét
    - hideg
  - közben: **elfo puffer** készítése: kb. 1 l (800 ml elég)
    - 30 ml NaOH / 1000 ml
    - 5 ml EDTA / 1000 ml
    - kiegészítjük 1 l-re DV-vel
- **Elfo**
  - a kád feltöltése elfo pufferrel (kb 800 ml)
  - sötét
  - tárgylemezek behelyezése
    - fallal párhuzamosan

- azonos állásban
- elfo
  - 25 V
  - 300 mA
  - 0:25 h
- **Neutralizálás**
  - tárgylemezeket bele a neutralizáló puffert tartalmazó üvegvédőbe
    - 5-10 percig
- **Festés** Ethidium bromiddal
  - 5-10 perc
  - az oldat: 20-30 µl EtBr / 10 ml dv
    - ebből 100 µl/lemez
- A tárgylemezeket neutralizáló oldattal átöblítjük
- **Detektálás** fluoreszcens mikroszkópiával