

产品说明书

YF[®] Dye dUTP Conjugates

产品货号: 25 nmole

产品规格:

货号	名称	外观颜色	分子量	Ex/Em (nm)
YD0045	YF [®] 488(6)-2-dUTP (YF [®] 488(6)-2 标记 dUTP)	橙色	1555.3	491/512
YD0046	YF [®] 555-dUTP (YF [®] 555 标记 dUTP)	红色	1652.6	550/561
YD0044	YF [®] 594-3-dUTP (YF [®] 594-3 标记 dUTP)	紫红色	1642.4	585/609
YD0043	YF [®] 640-dUTP (YF [®] 640 标记 dUTP)	蓝色	1867.8	641/658

储存条件

-20°C避光保存, 有效期见外包装。可以采用 pH7.4 的 10 mM Tris 溶解后, 分装保存, 避免反复冻融。

使用方法

DNA 标记

1. 试剂 (自备)

- (1) Taq DNA 聚合酶
- (2) 10× Taq reaction buffer
- (3) 25 mM MgCl₂
- (4) dATP, dTTP, dCTP, dGTP (单独溶液), 1 mM each
- (5) DNA 模板
- (6) 正向、反向引物, 10 μM each
- (7) PCR 清洁试剂盒

2. PCR 反应

- (1) 先按照表 1 反应体系配制 PCR 反应混合液
- (2) 再在每个反应管加 1 μL 1mM YF[®] dye dUTP 染料

注: 阴性对照管, 加 1 μL 1mM dTTP 代替 YF[®] dye dUTP

- (3) 按照表 2 程序运行 PCR 反应

注: a. 热变性时间依据不同的 Taq 酶进行调整;

b. 退火温度设置: T_m - 5°C;

c. 延伸时间根据扩增片段大小而定, 一般 200 - 300 bp 片段设为 1 min 即可。

(4) 可选步骤。用 PCR 清洁试剂盒去除未掺入的单核苷酸。

表 1 PCR 反应体系

组分	体积	终浓度
10× Taq reaction buffer	2 μL	1×
25 mM MgCl ₂	2 μL	5 mM
1 mM dATP	2 μL	100 μM
1 mM dCTP	2 μL	100 μM
1 mM dGTP	2 μL	100 μM
1 mM dTTP	1 μL	50 μM
10 μM 正向引物	1 μL	500 nM
10 μM 反向引物	1 μL	500 nM
模板	1 ng	50 pg/μL
Taq	1 U	0.05 U/μL
dH ₂ O	up to 19 μL	

表 2 PCR 反应条件

94°C 2 min	Hold
94°C 30 sec	30 个循环
50 - 60°C 30 sec	
72°C 1 min	
72°C 5 min	Hold

(5) 取 10% 的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳 (凝胶不加入 DNA 染料), 检测 PCR 反应的效率和特异性, 通过紫外凝



胶成像仪或激光凝胶扫描仪观察。其中远红外染料（波长 ≥ 650 nm），肉眼无法观察。

注：凝胶染色前先观察 YF[®] 染料的荧光，以免与下一步的凝胶染料发生荧光淬灭。

(6) 采用后染法，使用 DNA 凝胶染料对凝胶进行染色，观察总的 PCR 产物或阴性对照组的 PCR 扩增产物。

TUNEL 法检测细胞凋亡

注：我司提供了一系列 YF[®] Dye TUNEL Assay Kits，试剂盒组分包括：平衡缓冲液、反应缓冲液和 TdT 酶等。

1. 试剂（自备）

- (1) PBS, pH 7.4
- (2) 4%甲醛 in PBS
- (3) 70%乙醇（可选）
- (4) 0.2% Triton[™] X - 100 in PBS
- (5) 0.1% Triton[™] X - 100 in PBS/5 mg/mL bovine serum albumin (BSA)
- (6) 12.5 U/ μ L 末端脱氧核糖核苷酸转移酶 (TdT)
- (7) 5 \times TdT 反应缓冲液：1M 二甲基胍酸钾，125 mM Tris-HCl, 1.25 mg/mL BSA, pH 6.6
- (8) 25 mM CoCl₂ 溶液
- (9) 100 μ M dATP

2. 样品准备

- (1) 细胞或新鲜冷冻组织切片的准备
 - a. 准备一份不含 TdT 酶样品作为阴性对照。（可选步骤）
 - b. 用 PBS 清洗细胞或者组织切片两次。
 - c. 向上述细胞或组织切片中加入 4%甲醛，4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。
 - d. 用 70%乙醇重悬细胞，-20 $^{\circ}$ C 可储存两周。（可选步骤）
 - e. 用 PBS 清洗两次。
 - f. 促渗加入适量的 0.2% Triton X - 100 的 PBS 溶液，室温孵育 30 min。
 - g. 用 PBS 清洗两次。
- (2) 石蜡组织切片的准备
 - a. 准备一份不含 TdT 酶样品做阴性对照（可选）。
 - b. 根据标准步骤进行脱蜡或水化处理。
 - c. 用 PBS 清洗两次。

d. 用 20 μ g/mL 蛋白酶 K (in PBS) 促渗，处理组织，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。根据组织类型，蛋白酶 K 的孵育温度和时间可相应的变化。

e. 用 PBS 清洗两次。

3. 反应混合液准备

- (1) 用去离子水将 YF[®] dye dUTP 稀释成 10 μ M。
- (2) 每个样品准备 100 μ L TUNEL 平衡缓冲液，配比如下：
 - 20 μ L 5 \times TdT 反应缓冲液；
 - 20 μ L 25 mM CoCl₂；
 - 60 μ L dH₂O。
- (3) 每个样品准备 50 μ L TUNEL 反应混合液，如下表所示：

组分	体积	最终浓度
5 \times TdT reaction buffer	10 μ L	1 \times
25 mM CoCl ₂	10 μ L	5 mM
100 μ M dATP	2.5 μ L	5 μ M
10 μ M YF [®] dye dUTP	2.5 μ L	0.5 μ M
12.5 U/ μ L TdT	1 μ L	12.5 U/reaction
dH ₂ O	24 μ L	
总体积	50 μ L	

4. TUNEL 染色

- (1) 向样品中加入 100 μ L 平衡缓冲液，室温下孵育 5 min。
注：对于贴壁细胞或者组织切片，用石蜡盖玻片覆盖样品，使缓冲液均匀覆盖样品。
- (2) 去除平衡缓冲液，另外加入 50 μ L 反应缓冲液。
注：对于贴壁细胞或者组织切片，用盖玻片覆盖样品，使缓冲液均匀覆盖组织。
- (3) 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 min。组织切片需 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 2 h。
注：a. 对于细胞或组织切片，孵育需在潮湿环境下进行；
b. 对于悬浮细胞，孵育需在摇床上进行，或者在孵育的过程中，每隔 15 min，轻轻的摇晃一下反应液。
- (4) 用含有 0.1% Triton X - 100, 5 mg/mL BSA 的 PBS 溶液清洗样品三次，每次 5 min。
- (5) 如果需要，可进行样品复染。采用荧光显微镜或者流式细胞仪观察。TUNEL 标记的细胞的细胞核显示出明亮的荧光。不含 TdT 酶的对照组可观察到细胞未被标记上荧光。

