

产品说明书

产品货号: VYD0044

产品名称: YF594-dUTP (YF594 标记 dUTP)

产品规格: 25 nmole

储存条件: -20℃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

应用范围: FISH 探针，TUNEL 细胞凋亡检测

产品参数

外观颜色: 红色

Ex/Em: 593/614 nm

分子式: $C_{64}H_{95}N_9Na_3O_{27}P_3S_2$

分子量: 1648.5

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 $MgCl_2$
- (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: $T_m - 5^{\circ}C$;

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。

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) 0.2% Triton™ X - 100 in PBS
- (4) 0.1% Triton™ X - 100 in PBS (5 mg/mL bovine serum albumin (BSA))
- (5) 12.5 U/μL 末端脱氧核糖核苷酸转移酶 (TdT)
- (6) 5 × TdT 反应缓冲液：1 M 二甲基胍酸钾，125 mM Tris-HCl, 1.25 mg/mL BSA, pH 6.6
- (7) 25 mM CoCl₂ 溶液

(8) 100 μ M dATP

2. 样品准备

(1) 细胞或新鲜冷冻组织切片的准备

- 准备一份不含 TdT 酶的样品作为阴性对照。(可选步骤)
- 用 PBS 清洗细胞或者组织切片两次。
- 向上述细胞或组织切片中加入 4% 甲醛，室温孵育 30 min。
- 用 PBS 清洗两次。
- 促渗加入适量的 0.4% Triton X - 100 的 PBS 溶液，室温孵育 20 min。冰冻组织切片根据组织厚度，Triton X - 100 的孵育浓度，温度和时间可相应的变化。
- 用 PBS 清洗两次。

(2) 石蜡组织切片的准备

- 准备一份不含 TdT 酶的样品做阴性对照(可选)。
- 根据标准步骤进行脱蜡或水化处理。
- 用 PBS 清洗两次。
- 用 20 μ g/mL 蛋白酶 K (in PBS) 促渗，处理组织，37°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。
- 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 CoCl_2 ；

60 μ L dH_2O 。

(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_2O	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，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°C避光孵育 60 min。组织切片需 37°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。

c. 对于孵育时间，如需缩短孵育时间，可适当增加 YF dye dUTP 的浓度。

(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。