

5-TAMRA-dUTP

产品货号

YD0051

产品规格

100 nmol

储存条件

-20℃ 避光保存，避免反复冻融，有效期见外包装

应用范围

FISH 探针、TUNEL 检测

产品参数

Ex/Em = 546/579 nm

浓度：1 mM 液体

产品介绍

5-TAMRA-dUTP 可通过 Klenow 片段、逆转录酶 (AMV)、Taq DNA 聚合酶、末端转移酶 (3' -末端标记) 和 DNA 聚合酶 I 酶促等反应掺入 DNA 中。主要应用于 cDNA 合成、PCR 扩增、切口平移、随机引物标记或引物延伸过程中对 DNA 进行酶促非放射性标记,同时可作为探针直接用于荧光检测的原位杂交。

注意事项

- 使用前请将产品恢复至室温并瞬时离心至管底，再进行后续实验。
- 荧光染料均存在淬灭问题，实验操作时请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

操作步骤

一. DNA标记检测

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 1 mM 5-FAM-X-dUTP 染料

注：阴性对照管，加1 μL 1 mM dTTP 代替5-FAM-X-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：Tm-5℃;

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℃ 2 min	Hold
94℃ 30 sec	30个循环
50 - 60℃ 30 sec	
72℃ 1 min	
72℃ 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：凝胶染色前先观察染料的荧光特性，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。

二. 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/μL末端脱氧核糖核苷酸转移酶 (TdT)
- (7) 5×TdT反应缓冲液：1M二甲胺盐酸钾，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

- 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，4°C孵育30 min。
- 用70%乙醇重悬细胞，-20°C可储存两周。（可选步骤）
- 用PBS清洗两次。
- 促渗加入适量的0.2% Triton X - 100的PBS溶液，室温孵育30 min。
- 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5-FAM-X-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 5-FAM-X-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°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。

(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。