

5-FAM-X-dUTP

产品介绍

5-FAM-X-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。

应用范围

FISH 探针、TUNEL 检测

产品货号

YD0047

产品规格

100 nmole

储运条件

-20°C干燥避光保存,有效期见外包装;冰袋运输。

产品参数

Ex/Em = 495/520nm

注意事项

- 使用前请将产品瞬时离心至管底,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。
- 本产品仅限于科研,不得用于临床诊断或治疗,不得用于食品或药品,不得存放于普通住宅内。
- 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

DNA标记检测

1. 试剂 (自备)

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

2. PCR反应

- 先按照表 1 反应体系配制 PCR 反应混合液。
- 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。

- 按照表 2 程序运行 PCR 反应

注：1) 热变性时间依据不同的 Taq 酶进行调整。

- 退火温度设置: T_m - 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。

- 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
ddH ₂ O	up to 19 μL	

表 2 PCR 反应条件

温度	时间	循环
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。

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)

- PBS, pH 7.4
- 4%甲醛 in PBS
- 70%乙醇 (可选)
- 0.2% Triton™ X-100 in PBS
- 0.1% Triton™ X-100 in PBS/5 mg/mL bovine serum albumin (BSA)
- 12.5 U/μL 末端脱氧核糖核苷酸转移酶(TdT)
- 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
- 25 mM CoCl₂ 溶液
- 100 μM dATP

2. 样品准备

- 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。

7) 用 PBS 清洗两次。

(2) 石蜡组织切片的准备

1) 准备一份不含 TdT 酶的样品做阴性对照（可选）。

2) 根据标准步骤进行脱蜡或水化处理。

3) 用 PBS 清洗两次。

4) 用 20 µg/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。

(3) 反应混合液准备

1) 用去离子水将 5-TAMRA UTP 稀释成 10 µM。

2) 每个样品准备 100 µL TUNEL 平衡缓冲液, 配比如下:

20 µL 5×TdT 反应缓冲液; 20 µL 25 mM CoCl₂; 60 µL ddH₂O。

3) 每个样品准备 50 µL TUNEL 反应混合液, 如下表所示:

组分	体积	最终浓度
5×TdT reaction buffer	10 µL	1×
25 mM CoCl ₂	10 µL	5 mM
100 µM dATP	2.5 µL	5 µM
10 µM 5-FAM-X-dUTP	2.5 µL	0.5 µM
12.5 U/µL TdT	1 µL	12.5 U/reaction
ddH ₂ O	24 µL	
总体积	50 µL	

3. TUNEL染色

(1) 向样品中加入 100 µL 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 µL 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: 1) 对于细胞或组织切片, 孵育需在潮湿环境下进行。

2) 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。

相关联产品

产品货号	产品名称
YD0045	YF®488(6)-2-dUTP (YF®488(6)-2 标记 dUTP)
YD0046	YF®555-dUTP (YF®555 标记 dUTP)
YD0044	YF® 594-3-dUTP (YF®594-3 标记 dUTP)
YD0043	YF®640-dUTP (YF®640 标记 dUTP)
CD0048	Sulfo-Cy3-E-dUTP (磺酸基-Cy3-乙基-dUTP)
YD0047	5-FAM-X-dUTP
YD0051	5-TAMRA-dUTP
BD0050	Biotin-dUTP (生物素-dUTP)