

产品说明书

产品名称: YF Dye dUTP Conjugates

| 货号 | 名称 | 分子量 | Ex/Em (nm) |
|----------------|------------------------------|-------|------------|
| YD0045-5nmole | 6-YF488-P ₄ -dUTP | ~1360 | 490/515 |
| YD0045-25nmole | | | |
| YD0046-5nmole | YF555-dUTP | ~1550 | 555/565 |
| YD0046-25nmole | | | |
| YD0044-5nmole | YF594-P ₄ -dUTP | ~1547 | 593/614 |
| YD0044-25nmole | | | |
| YD0043-5nmole | YF640R-P ₄ -dUTP | ~1650 | 642/662 |
| YD0043-25nmole | | | |

储存条件

-20°C 避光保存, 可以储存 6 个月, 可以采用 pH7.4 的 10mM 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

2.1 按照表 1 反应体系配制 PCR 反应混合液:

2.2 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

2.3 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

2) 退火温度设置: T_m - 5°C

3) 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

2.4 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 ① | Hold |
| 94°C, 30 sec | 30 个循环 |
| 50-60°C, 30 sec ② | |
| 72°C, 1 min ③ | |
| 72°C, 5 min | Hold |

2.5 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（注意：远红外染料（波长 $\geq 650\text{nm}$ ），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。

2.6 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：US Everbright 提供了一系列染料的 YF Dye TUNEL Assay Kits，其中试剂盒成分包括：平衡缓冲液、YF dye TUNEL 反应缓冲和 TdT 酶。

1、试剂（自备）

- (1) PBS, pH7.4
- (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 二甲基胍酸钾, 125 mM Tris-HCl, 1.25 mg/mL BSA, pH 6.6
- (8) 25 mM CoCl_2 溶液
- (9) 100 μM dATP

2、样品准备

2.1 细胞或新鲜冷冻组织切片的准备

- 1、准备一份不含 TdT 酶样品作为阴性对照。（可选步骤）

- 2、用 PBS 清洗细胞或者组织切片两次。

- 3、向上述细胞或组织切片中加入 4%甲醛，4°C 孵育 30 min。

- 4、用 70%乙醇重悬细胞，-20°C 可储存两周。（可选步骤）

- 5、用 PBS 清洗两次。

- 6、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。

2.2 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。（可选步骤）

- 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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。

- 5、用 PBS 清洗两次。

3、反应混合液准备

- 3.1 用去离子水将 YF dye dUTP 稀释成 10 μM 。

- 3.2 每个样品准备 100 μL TUNEL 平衡缓冲液：

- 20 μL 5×TdT 反应缓冲液
- 20 μL 25 mM CoCl_2
- 60 μL dH_2O

- 3.3 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 YF dye dUTP | 2.5 μL | 0.5 μM |
| 12.5 U/ μL TdT | 1 μL | 12.5 U/reaction |
| dH_2O | 24 μL | |
| 总体积 | 50 μL | |

4、TUNEL 染色

- 4.1 向样品中加入 100 μL 平衡缓冲液，室温下孵育 5 min。

注意：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。





4.2 去除平衡缓冲液，另外加入 50 μ L 反应缓冲液

注意：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。

4.3 37°C 避光孵育 60 min。组织切片需 37°C 避光孵育 2 h。

注意：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。

4.4 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。

4.5 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。

