

# 产品说明书

## 产品名称: YF Dye dUTP Conjugates

货号	名称	分子量	Ex/Em (nm)
BN10045-5nmole	6-YF488-P <sub>4</sub> -dUTP	~1360	490/515
BN10045-25nmole			
BN10046-5nmole	YF555-dUTP	~1550	555/565
BN10046-25nmole			
BN10044-5nmole	YF594-P <sub>4</sub> -dUTP	~1547	593/614
BN10044-25nmole			
BN10043-5nmole	YF640R-P <sub>4</sub> -dUTP	~1650	642/662
BN10043-25nmole			

## 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 MgCl<sub>2</sub>
- (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<sub>m</sub> - 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 <sub>2</sub>	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 <sub>2</sub> 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/ $\mu\text{L}$  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  $\text{CoCl}_2$  溶液
- (9) 100  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$ 。

- 3.2 每个样品准备 100  $\mu\text{L}$  TUNEL 平衡缓冲液：

20  $\mu\text{L}$  5×TdT 反应缓冲液

20  $\mu\text{L}$  25 mM  $\text{CoCl}_2$

60  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$

- 3.3 每个样品准备 50  $\mu\text{L}$  TUNEL 反应混合液，如下表所示：

组分	体积	最终浓度
5×TdT reaction buffer	10 $\mu\text{L}$	1×
25 mM $\text{CoCl}_2$	10 $\mu\text{L}$	5 mM
100 $\mu\text{M}$ dATP	2.5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{M}$
10 $\mu\text{M}$ YF dye dUTP	2.5 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{M}$
12.5 U/ $\mu\text{L}$ TdT	1 $\mu\text{L}$	12.5 U/reaction
$\text{dH}_2\text{O}$	24 $\mu\text{L}$	
总体积	50 $\mu\text{L}$	

#### 4、TUNEL 染色

- 4.1 向样品中加入 100  $\mu\text{L}$  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  $\mu$ 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。