

FT™ Dye dUTP Conjugates

1 产品介绍

Sulfo-Cy3-E-dUTP 由我司自主合成，为 FISH 探针的制备以及细胞凋亡检测试剂盒提供荧光染料。

产品特点：

- 稳定性强：产品性能稳定，标记效果好；
- 批间差小：批间差控制的好。
- 选择灵活方便：提供多种颜色 FT™ dUTP 染料，选择灵活方便。

适用范围：

FISH 探针、TUNEL 检测

2 产品信息

产品货号	产品名称	外观颜色	分子量	产品规格	Ex/Em (nm)
MS1154	FT™488(6)-2-dUTP (FT™488(6)-2 标记 dUTP)	橙色	1555.3	25 nmole	491/512
MS1155	FT™555-dUTP (FT™555标记 dUTP)	红色	1652.6	25 nmole	550/561
MS1153	FT™640-dUTP (FT™640标记 dUTP)	蓝色	1867.8	25 nmole	641/658

3 储存与运输

储存条件：-20 °C 避光保存

运输条件：冰袋运输

4 使用方法（仅供参考）

一、储液制备

采用 pH7.4 的 10 mM Tris 溶解后，分装保存，避免反复冻融。

二、DNA 标记

（一）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

（二）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 FT™ dye dUTP 染料。

注：阴性对照管，加 1 μL 1mM dTTP 代替 FT™ dye dUTP。

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：Tm -5℃。

(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。

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 反应体系同系列产品

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

温度	时间	循环
94℃	2 min	Hold
94℃	30 sec	30个循环
50~60℃	30 sec	
72℃	1 min	
72℃	5 min	Hold

(1)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 FT™染料的荧光，以免与下一步的凝胶染料发生荧光淬灭。

(2)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。

三、TUNEL 法检测细胞凋亡

详情见 Tunel 法细胞凋亡说明书。

注：我司提供了一系列 FT™ 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：1 M 二甲基胍酸钾，125 mM Tris-HCl，1.25 mg/mL BSA，pH 6.6

(8)25 mM CoCl₂ 溶液

(9)100 μM dATP

2. 样品准备

(1)细胞或新鲜冷冻组织切片的准备

1)准备一份不含 TdT 酶的样品作为阴性对照。(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℃孵育 30 min。

4)用 70%乙醇重悬细胞，-20℃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)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℃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 FT™ dye dUTP 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 d H₂O。

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 FT™ dye dUTP	2.5 μL	0.5 μM
12.5 U/μL TdT	1 μL	12.5 U/reaction
dH 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℃避光孵育 60 min。组织切片需 37℃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。

5 注意事项

- 荧光染料均存在淬灭问题，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。