

Product Manual

产品说明书

产品信息

产品货号	产品名称	规格
PR01473	BF™ 488(6)-2-dUTP (AF, 绿色)	25nmole
PR01474	BF™ 555-dUTP (YF, 橙红色)	25nmole
PR01475	BF™ 594-3-dUTP (AF, 红色)	25nmole
PR01477	BF™ 640-dUTP (YF, 远红外)	25nmole

产品介绍

BF™ Dye dUTP Conjugates 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。

应用范围

FISH 探针、TUNEL 检测

储运条件

-20 ℃ 避光保存，有效期见外包装；冰袋运输。

产品特点

- 稳定性强：产品性能稳定，标记效果好；
- 批间差小：产品为公司自研，批间差控制的好；
- 选择灵活：提供多种颜色，选择灵活方便。

注意事项

- 1.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。
- 2.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、储液制备
采用 pH 7.4 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 1μL 1mM BFTMdye dUTP 染料。
- 注：阴性对照管，加 1 μL 1mM dTTP 代替 BFTM dUTP 染料。
- 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。
- 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

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

- (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 BRTM 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

注：我司提供了一系列 BFTM Dye TUNEL Assay 试剂盒，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% TritonTM X-100 in PBS
- (5) 0.1% TritonTM 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 二甲基肼酸钾, 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 °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) 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 BF™ 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 dH2O。
- 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 CoCl2	10 μL	5 mM
100 μM dATP	2.5 μL	5 μM
10 μM BF™ dye dUTP	2.5 μL	0.5 μM
12.5 U/μL TdT	1 μL	12.5 U/reaction
dH2O	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。