产 品 说 明 书

Sulfo-Cy3-E-dUTP（磺酸基-Cy3-乙基-dUTP）

产品规格：25 nmole

产品货号：SB-CD0048

应用范围：荧光标记染料

产品参数

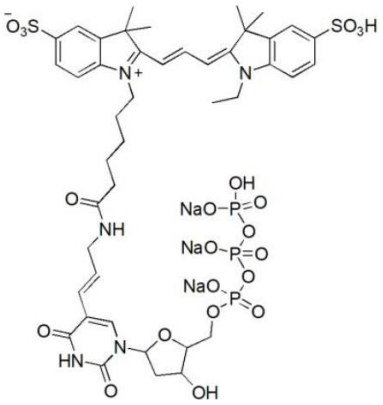
Ex/Em：548/565 nm

分子式：$C_{43}H_{53}N_5Na_3O_{21}P_3S_2$

分子量：1201.9

消光系数：162,000

分子结构图：



储存条件

-20℃避光保存，有效期见外包装，可以采用 pH 7.4 的 10 mM 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 $MgCl_2$

（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

（1）按照表 1 反应体系配制 PCR 反应混合液：

（2）每个反应管加 1 μL 1 mM Sulfo-Cy3-E-dUTP

注：阴性对照管，加 1 μL 1mM dTTP 代替 Sulfo-Cy3-E-dUTP。

（3）按照表 2 程序运行 PCR 反应

注：a 热变性时间依据不同的 Taq 酶进行调整

b 退火温度设置：Tm - 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。

（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/uL
Taq	1 U	0.05 U/μL
dH_2O	up to 19 μL	

表 **2. PCR** 反应条件

94℃ 2 min ①	Hold
94℃ 30 sec	30 个循环

50-60℃ 30 sec ②

72℃ 1 min ③

72℃ 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。

注：凝胶染色前先观察染料的荧光，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：我司提供了一系列染料的 Cy Dye TUNEL Assay Kits，其中试剂盒成分包括：平衡缓冲液、Cy dye TUNEL 反应缓冲和 TdT 酶。

1. 试剂（自备）

（1）PBS，pH 7.4

（2）4%多聚甲醛（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 二甲基胂酸钾，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

（1）细胞或新鲜冷冻组织切片的准备

a. 准备一份不含 TdT 酶的样品作为阴性对照。（可选步骤）

b. 用 PBS 清洗细胞或者组织切片两次。

c. 向上述细胞或组织切片中加入 4%多聚甲醛，4℃孵育 30 min。

d. 用 70%乙醇重悬细胞，-20℃可储存两周。（可选步骤）

e. 用 PBS 清洗两次。

f. 促渗加入适量的 0.2% Triton™ X-100 的 PBS 溶液，室温孵育 30 min。

g. 用 PBS 清洗两次。

（2）石蜡组织切片的准备

a. 准备一份不含 TdT 酶的样品做阴性对照。（可选步骤）

b. 根据标准步骤进行脱蜡或水化处理。

c. 用 PBS 清洗两次。

d. 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。

e. 用 PBS 清洗两次。

3. 反应混合液准备

（1）用去离子水将 Sulfo-Cy3-E-dUTP 稀释成 10 μM。

（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）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 Sulfo-Cy3-E-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

（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。

（3）37℃避光孵育 60 min。组织切片需 37℃避光孵育 2 h。

注：a. 对于细胞或组织切片，孵育需在潮湿环境下进行。

b. 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 PBS、0.1% Triton X-100 或 5 mg/mL BSA 清洗样品三次，每次 5 min。

（5）如需要，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。

注意事项

1. 该产品推荐贮存浓度为 10 mM，-20℃条件下至少可以保存一个月。

2. 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。

3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。