

EdU-488 细胞增殖检测试剂盒

原理: EdU(5-ethynyl-2'-deoxyuridine), 中文名为 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷, 是一种胸腺嘧啶核苷类似物, 其炔基集团在天然化合物中很少见, 在细胞增殖时能够替代胸苷(胸腺嘧啶脱氧核苷, thymidine) 插入正在复制的 DNA 分子中, EdU 上的乙炔基能与荧光标记的小分子叠氮化物探针(如 Azide Alexa Fluor 488 等)通过一价铜离子催化发生共价反应, 形成稳定的三唑环, 该反应非常迅速, 被称作点击反应(Click reaction), 从而可以进行高效快速的检测细胞增殖, 特别是可以有效地检测处于 S 期的细胞百分数。

与传统的免疫荧光染色(BrdU)检测方法相比, EdU 只有 BrdU 抗体大小的 1/500, 在细胞内更容易扩散, 不需要严格的样品变性(酸解、热解、酶解)处理, 有效地避免了样品损伤, 有助于在组织、器官的整体水平上观测细胞增殖的真实情况, 具有更高的灵敏度和更快的检测速度。

产品货号: RCF-043 ;

规格: 200T

有效期: 12 个月

试剂盒组成

货号 Code	品名 Product name	储存条件 Storage condition
RCF043-1	PB 10mL	-20°C
RCF043-2	AC 1mL*2	-20°C
RCF043-3	CU 400μL	-20°C
RCF043-4	488 色原 50μL	-20°C
RCF043-5	100mg/mL EdU 母液 100μL	-20°C

备注: AC 容易氧化失效, 不使用时放入冰箱-20 度保存, 如发现变色, 需更换新鲜试剂。

实验流程

1. 样本处理

1.1 动物实验

1.1.1 动物 EdU 注射

对于小鼠, 可以按照 10-200mg/kg 的用量, 把 EdU 用 PBS 配制成一定浓度, 腹腔注射、特定组织或器官局部注射或者加入饮水中。具体用量跟所用动物的种类、体重和使用方式有关, 可以参考相关文献, 因此初次使用时建议对 EdU 的使用浓度进行一定的摸索, 或者直接使用 50mg/kg 的浓度进行测试。

注射方式: 依据客户实验而定, 如腹腔注射, 皮下注射, 肌肉注射, 尾静脉注射等, 其中以腹腔注射为多。

6 小时后或根据特定实验确定适当的时间后, 快速处死小鼠, 取出所需组织, 按照常规步骤制作冰冻切片或石蜡切片。EdU 标记的时候也可参考相关文献自行调整。

建议任何实验均可取小肠组织检测细胞增殖情况, 小肠上皮组织细胞增殖快, 成年小鼠 EdU 注射 6 小时后即可检测到阳性信息, 可用作阳性对照进行预实验。

1.1.2 切片处理

切片前处理: 组织器官最好进行清洗, 以去除血液、组织中残留的 EdU, 降低背景。

切片厚度: 3-10μm 为宜, 切片过厚可能会影响切片背景及染色效率。

切片后处理:

石蜡切片脱蜡: 二甲苯脱蜡 2 次, 15 分钟/次, 梯度乙醇 (100%, 95%, 85%, 75%) 各一次, 5 分钟/次, 去离子水洗脱 1 次。

冰冻切片处理: 室温放置 30 分钟后, 固定 10 分钟, PBS 清洗 3 次, 每次 5 分钟。

1.2 细胞实验

1.2.1 细胞 EdU 标记

- 1) 用细胞完全培养基和 EdU 母液按 8000: 1 的比例稀释, 制备适量 50 μ M 的 EdU 培养基;
- 2) 每孔加入适量 50 μ M 的 EdU 培养基孵育 2 小时, 弃培养基(最佳孵育时间一般为细胞周期的 1/10), EdU 培养基和 EdU 反应液孵育体积可参考下表;
- 3) PBS 清洗细胞 3 次, 每次 5 分钟

	96 孔板	48 孔板	24 孔板	12 孔板	6 孔板	5.5cm 小皿
EdU 培养基	100 μ L	200 μ L	300 μ L	500 μ L	1mL	2mL
EdU 反应液	100 μ L	200 μ L	300 μ L	500 μ L	1mL	2mL

1.2.2 细胞固定通透

- 1) 每孔加入细胞固定液(含 4% 的多聚甲醛的 PBS) 室温孵育 15 分钟, 弃固定液, PBS 清洗 3 次, 每次 5 分钟。;
- 2) 每孔加入渗透剂(0.5% TritonX-100 的 PBS) 脱色摇床孵育 15 分钟; PBS 清洗 3 次, 每次 5 分钟。

2. EdU 反应

按照 PB: CU: AC: 488 色原=860: 40: 100: 5 的比列配制 EdU 反应液(反应液现配现用)。

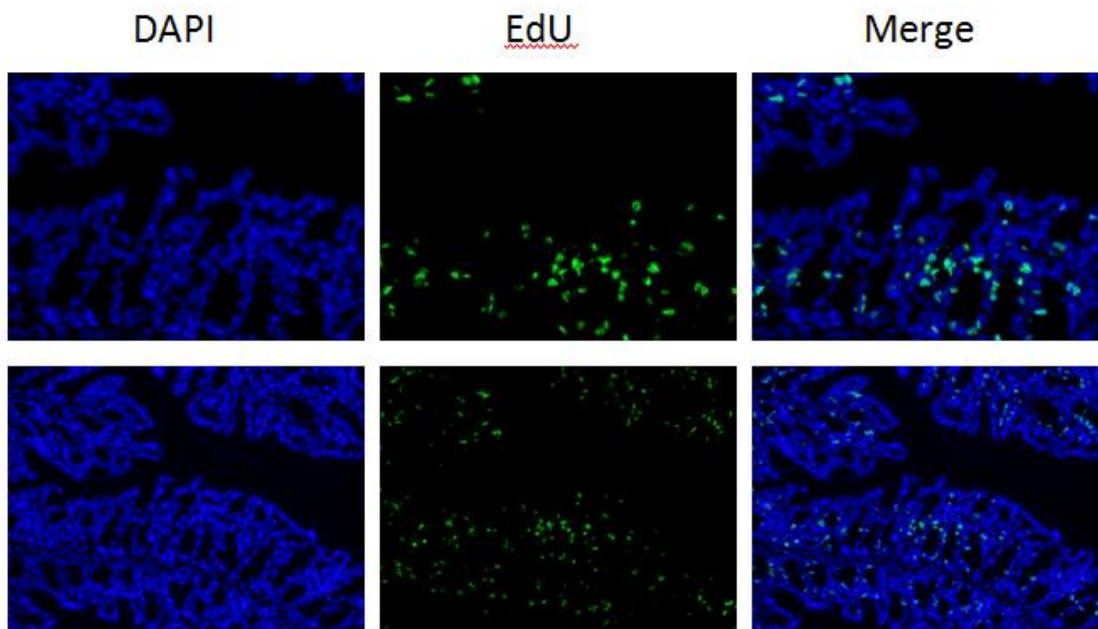
每个样本滴加 50-100 μ L 的 EdU 染色反应液(反应液均匀覆盖样本), 室温避光孵育 15-60 分钟, 弃染色反应液, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 分钟。

3. DAPI 染色

每个样本加入 50-100 μ L DAPI 染色液, 染色 15 分钟, PBS 清洗 3 次, 每次 5 分钟。

4. 图像拍照

染色完成后建议立刻观察, 使用荧光显微镜、共聚焦显微镜或者全片扫描仪进行采集图像, 染色完玻片避光 4 $^{\circ}$ C 保存。



以上是 50mg/kg 标记小鼠 6 小时的染色图像

实验前须知

EdU 的分子量为 252.23，易溶于水，PBS，生理盐水。

对于动物实验，建议将 EdU 粉末溶解于 DMSO 配制成 100mg/ml 的母液。

EdU 建议初始给药量为 50mg/kg (50 μ g/g)，稀释浓度为 0.5~1mg/mL。小鼠体重 20g，需要注射 1mg，以 1mg/mL 计算，需要注射 1mL。

Edu	0.1mg	1mg	2mg	10mg
PBS	100 μ L	1mL	2mL	10mL

对于细胞实验，EdU 母液质量浓度为 100mg/mL，转化为物质的量浓度为 400mM，建议将 EdU 母液稀释成 50mM 储存液，推荐的 EdU 工作浓度为 10 μ M。

文章引用试剂盒/方法: Staining of EdU was performed using a EdU cell proliferation Assay kit (Recordbio Biological Technology, Shanghai, China) based on the click chemistry technology according to the manufacture's instruction.