

产品说明书

产品名称: EdU

产品货号: BN16032

产品规格: 2 mg、10 mg、50 mg

产品参数

分子量: 252.23

溶解性: 可溶于水, PBS 或生理盐水

CAS号: 61135-33-9

储存条件

-20°C 储存, 可保存一年

产品介绍

EdU, 即 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine) 是一种胸腺嘧啶核苷类似物, 能够在细胞增殖时期代替胸腺嘧啶 (T) 渗入正在复制的 DNA 分子中, 通过基于 EdU 与 YF[®]系列荧光标记染料的特异性反应快速检测细胞 DNA 复制活性, 可以快速准确检测细胞增殖能力。

本产品系列适用于小鼠, 大鼠及其他动物模型的各种组织器官(血管除外)的 EdU 细胞增殖检测。

与 BrdU 检测方法相比, EdU 检测方法用量小得多, 十分之一的用量即可获得与 BrdU 检测试剂盒相同甚至更好的检测结果, 而且小分子化学反应检测方法反应快, 效率高, 反应时间仅需几分钟, 不需要 DNA 变性、蛋白酶处理、抗原抗体过夜孵育, 能够更好地保护细胞形态, 更简单、更灵敏、更快速、更准确。

实验前须知

本制品需与 YF[®]488 Click-iT EdU Stain Kits (C6015)、

YF[®]555 Click-iT EdU Stain Kits (C6016)、YF[®]594 Click-iT EdU Stain Kits (C6017) 和 YF[®]647A Click-iT EdU Stain Kits (C6018) 染色试剂盒配合使用。

EdU 适用于各种动物活体注射, 稳定性较好, 对活体无明显副作用, 可将目标组织制备为石蜡或冰冻组织切片后检测; 本试剂也适用于体外培养的细胞增殖检测。

实验准备

- 1×PBS (pH 7.2~7.6)
- 渗透剂 (含 0.5% Triton X-100 的 PBS)
- 甘氨酸溶液 (2 mg/mL) (去离子水配制)
- 组织及切片处理相关试剂 (动物实验用)
- 细胞固定液 (含 4%多聚甲醛的 PBS) (细胞实验用)
- 96/24/12/6 孔培养板或培养皿 (细胞实验用)

注意: 请使用一次性手套, 废液请妥善处理。

动物实验方法 (以 1 cm×1 cm 切片为例)

实验前须知

表 1 EdU 注射液配置参考

EdU	0.1 mg	1 mg	2 mg	10 mg	50 mg	500 mg
PBS	100 μL	1 mL	2 mL	10 mL	50 mL	500 mL

EdU 建议初始给药量为 5mg/kg, 稀释浓度为 0.5~1 mg/mL。

注: 1)可采用 PBS 或生理盐水稀释;

2)注射时可将 EdU 注射液进一步稀释, 不会影响 EdU 的稳定性。

表 2 动物实验 EdU 标记时间及剂量参考

PubMed ID	Reference	Species	Method	Amount	Time	Tissue
18272492	Salic A, et al. PNAS. 2008	Mice	腹腔注射	100 µg	96 hr	Brain
19554638	Kaiser CL, et al. Laryngoscope. 2009	Chicken	皮下注射	50 mg/kg	72 hr	Cochlear
19494148	Guo F, et al. J Neurosci. 2009	Mice	腹腔注射	100 µg/g body weight	3 hr	Brain
19179611	Veres.TZ, et al. Am J Pathol. 2009	Mice	腹腔注射	50 mg/kg	3 hr/20 hr	-
20664699	Wiley LA, et al. Mol Vis. 2010	Mice	腹腔注射	100~200 µg	1 hr	Eye
20163731	Schmidt EJ, et al. BMC Dev Biol. 2010	Mice	腹腔注射	200 µg	30 min	embryo
20064490	Zeng C, et al. Brain Res. 2010	Mice	腹腔注射	50 mg/kg	4 hr~30 d	Brain
20038597	Janas ML, et al. J Exp Med. 2010	Mice	腹腔注射	100 µg	4 hr	Thymi
21145612	Sun H, et al. J Hepatol. 2011	Mice	腹腔注射	100 µg	72 hr	-

注：另可参考 BrdU 实验的注射时间，EdU 浓度按本说明书建议起始浓度或另行摸索。

1. EdU 标记

1.1 动物 EdU 注射（具体参数可参考表 2）：

- 1) 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、尾静脉注射等方式，其中以腹腔注射为多；
- 2) 标记时间：最佳标记时间依据具体实验目的而定，小肠等增殖快的组织宜采用短时间标记 (<12h)，大脑等增殖慢的组织器官可能需要长时间标记（如 7 天或更长时间）；
- 3) 标记浓度：最佳标记浓度依据具体标记时间而定，5 mg/kg 剂量适合大部分实验；
- 4) 取样部位：依据客户实验目的而定，一次标记可以对多种组织和器官切片，由于小肠上皮组织增殖较快，可以作为标记参考。

（注：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速度快，成年小鼠 EdU 注射 6 h 后即可检测到阳性信息，可用作实验阳性对照进行预实验。）

2. 切片处理

- 2.1 切片前处理：组织器官最好进行清洗，以去除血液、组织或器官中残留的 EdU，降低背景；
- 2.2 切片厚度：3~10 µm 为宜，切片过厚可能影响切片背景；

2.3 切片后处理：

- 1) 石蜡切片脱蜡：二甲苯洗脱 3 次，10 min/次，乙醇梯度 (100%，95%，85%，75%) 洗脱各 1 次，去离子水洗脱 1 次；
- 2) 冰冻切片处理：室温放置 30 min 后，4℃ 丙酮固定 10 min，PBS 清洗 3 次，每次 5 min。
- 2.4 2 mg/mL 甘氨酸清洗 10 min；
- 2.5（加强）加入 100 µL 渗透剂 (0.5% Triton X-100 的 PBS) 脱色摇床孵育 10 min，PBS 清洗。

以下是使用本产品进行 EdU 标记后，选择 YF[®]488 Click-iT EdU Imaging Kits (C6015)、YF[®]555 Click-iT EdU Imaging Kits (C6016)、YF[®]594 Click-iT EdU Imaging Kits (C6017) 和 YF[®]647A Click-iT EdU Imaging Kits (C6018) 进行染色的操作方法

3. EdU 检测

注意：本参考步骤每个切片使用 100 µL 的 Click-iT 反应混合物。用户可以根据自己的样本情况调整等比例减少所用的溶液体积。

3.1 准备 1× Click-iT EdU 反应缓冲液 (组分 C): 10× 组分 C 试剂以去离子水稀释 10 倍即可。

3.2 制备一份 5× 的 Click-iT EdU 反应添加物储液 (组分 E): 加 0.3 mL 去离子水至 30 mg 的 E 组分试管中 (100 mg/mL), 混匀至全部溶解。使用后, 剩余储液存放在 ≤-20°C, 可保存一年, 溶液一旦呈现棕色, 则说明有效成分降解不能再用 (注意: 不同规格的组分 E 均按照此比例加去离子水溶解为 5× 储液备用)。

3.3 准备 1× Click-iT EdU 缓冲液添加物: 以去离子水稀释 5× 储液至 1×, 溶液应新鲜配置, 当天用完。

3.4 依据表 3 准备 Click-iT 反应混合物。表 3 要求添加的组分对于反应来说非常重要, 否则反应无法有效进行。

表 3 Click-iT 反应混合物

反应组分	以 10 个孔的样本数为例
1× Click-iT EdU 反应缓冲液 (组分 B)	860 μL
CuSO ₄ (组分 C)	40 μL
YF [®] 488/555/594/647A Azide (组分 A)	2 μL
1× 反应缓冲液添加物 (步骤 3.3 所准备)	100 μL
总体积	1 mL

3.5 去除促渗剂, 以每孔 0.1 mL 的 3% BSA in PBS 的洗涤液洗涤 2 次, 去除洗涤液。

3.6 加入 0.1 mL Click-iT 反应混合物 (表 3) 至每个切片, 使反应液均匀覆盖样本。

3.7 室温避光孵育 30 min。

3.8 除去反应混合物, 每孔以 0.1 mL 3% BSA in PBS 洗涤两次, 去除洗涤液。

注: 染色反应液的用量要依据切片大小而定, 大多数器官切片均较小, 只需将染色反应液滴在待观察区域即可。

3.9 (加强) 加入甲醇清洗 1~2 次, 每次 5 min, 弃甲醇。PBS 清洗一次, 5 min。

注: 由于某些细胞类型对染料的吸附性较高, 需采用加强方式洗脱以降低染料背景。

其他染色(自备)

(可选) 客户可以根据实验需要进行细胞表面或细胞内抗原的抗体染色。

4. DNA 复染

4.1 以 0.1 mL PBS 洗涤每孔一次, 去掉洗涤液。

4.2 以 PBS 稀释 Hoechst 33342 (组分 F) 储液 1:2000 至 1× Hoechst 33342 溶液, 终浓度为 5 μg/mL。

4.3 每个切片加 0.1 mL 1× Hoechst 33342 溶液, 室温避光孵育 15-30 min。除去 Hoechst 33342 溶液。

4.4 0.1 mL PBS 洗涤每个切片 2 次, 去除洗涤液。

5. 成像及分析

表 4 荧光发射光谱

Fluorophore	Excitation(nm)	Emission(nm)
YF [®] 488 Azide	495	519
YF [®] 555 Azide	555	565
YF [®] 594 Azide	594	617
YF [®] 647A Azide	650	670
Hoechst 33342, bound to DNA	350	461

建议染色完成后, 立即进行观察; 如果条件限制, 请避光 4°C 湿润保存样品, 但不要超过 3 天。