

Product Manual

产品说明书

产品货号

PR01072

产品介绍

5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU) 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 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU) 的乙炔基与 YF 系列荧光染料标记的叠氮化物 (Azide) 通过一价铜离子催化下发生特异性反应, 形成稳定的三唑环, 该反应为点击化学反应 (Click Reaction)。该反应可快速检测细胞 DNA 复制活性, 准确检测细胞增殖能力。检测原理见图 1。

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。

5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (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, 也适用于体外培养的细胞增殖检测。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) 的细胞增殖检测。

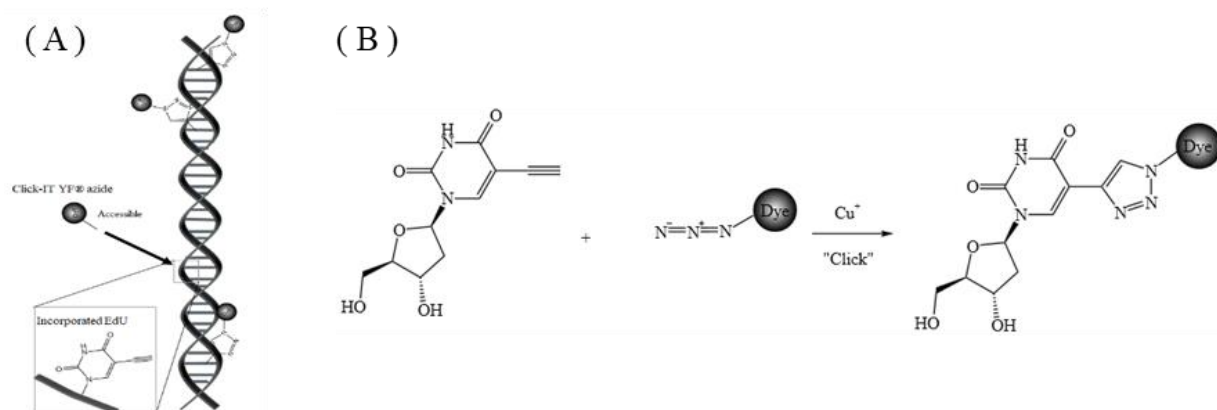


图 1 检测原理图

应用范围

适用于各种动物活体注射、适用于体外培养的细胞增殖检测

储运条件

-20 °C 避光保存, 有效期见外包装; 冰袋运输。

产品特点

快速高效: 点击化学反应, 仅需几分钟可检测细胞 DNA 复制活性, 准确检测细胞增殖能力;

简便、精准: 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;

适用性广: 适用范围广, 适用于细胞和各种动物活体注射;

使用方便: 可搭配我司其它试剂使用, 方便灵活。

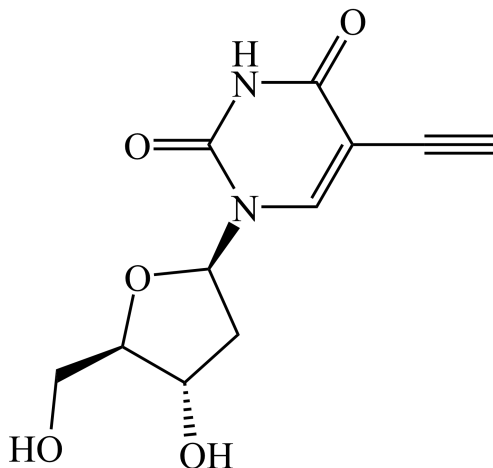
产品参数

CAS 号: 61135-33-9

分子量: 252.2

溶解性: 可溶于 DMSO、PBS 或生理盐水

分子结构图:



注: 配置储液时, 建议用 DMSO 溶解; 该产品在 DMSO 中溶解性非常好。

注意事项

- 1.使用前请将产品瞬时离心至管底, 再进行后续实验。
- 2.该产品对皮肤有不可逆损伤的可能性, 请注意防护, 避免吸入性风险。
- 3.试剂保存: 粉末在 -20°C 避光保存, 1 年有效; 配置成溶液, -20°C 避光保存, 1 个月有效, -80°C 避光保存, 6 个月有效。
- 4.请使用一次性手套, 废液请妥善处理。
- 5.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。
- 6.为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

自备材料

1.耗材

(1) 离心管 (2) 免疫组化笔

2.试剂

(1) 无水 DMSO (2) $1 \times$ PBS (pH 7.2~7.6) (3) 固定剂 (丙酮) (4) 通透液 (0.5% Triton X-100 in PBS) (5) 甲醇 (6) EdU 检测试剂 (7) 中性树脂

3.仪器

荧光显微镜 或 流式细胞仪

操作步骤

一、动物 EdU 注射造模及组织切片染色

(一) 实验前须知

表 1 EdU 注射液配置参考

5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (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 5 mg/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 5-乙炔基-2’ -脱氧尿苷 (EdU) 注射液进一步稀释, 不会影响 5-乙炔基-2’ -脱氧尿苷 (EdU) 的稳定性。

表 2 动物实验 5-乙炔基-2’ -脱氧尿苷 (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 h	Brain
19554638	Kaiser CL, et al.Laryngoscope. 2009	Chicken	皮下注射	50 mg/kg	72 h	Cochlear
19494148	Guo F, et al. J Neurosci. 2009	Mice	腹腔注射	100 µg/g body weight	3 h	Brain
19179611	Veres.TZ, et al. Am J Pathol. 2009	Mice	腹腔注射	50 mg/kg	3 h/20 h	-
20664699	Wiley LA, et al. Mol Vis. 2010	Mice	腹腔注射	100~200 µg	1 h	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 h~30 d	Brain
20038597	Janas ML, et al. J Exp Med. 2010	Mice	腹腔注射	100 µg	4 h	Thymi
21145612	Sun H, et al. J Hepatol. 2011	Mice	腹腔注射	100 µg	72 h	-

注: 另可参考 BrdU 实验的注射时间, 5-乙炔基-2’ -脱氧尿苷 (EdU) 浓度按本说明书建议起始浓度或另行摸索。

(二) 5-乙炔基-2’ -脱氧尿苷 (EdU) 标记

1.动物 5-乙炔基-2’ -脱氧尿苷 (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 (< 12 h), 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 5-乙炔基-2’ -脱氧尿苷 (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。

(三) 切片处理

- 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 5-乙炔基-2’ -脱氧尿苷 (EdU) , 降低背景。
- 2.切片厚度: 3~10 µm 为宜, 切片过厚可能影响切片背景。
- 3.切片后处理:
 - (1) 石蜡切片处理: 二甲苯脱蜡 2 次, 每次 10 min, 乙醇梯度 (100%, 95%, 85%, 75%) 水合各 1 次, 每次 5 min, 去离子水清洗 1 次, 每次 3 min。
 - (2) 冰冻切片处理: 放置恢复到室温, 加入适量丙酮, 4 °C 固定 10 min。去除固定液, 用 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。

注: 建议根据实验选择合适的固定剂, 若使用甲醛类固定剂进行固定, 固定完成需先加入 2 mg/mL 甘氨酸清洗 10 min, 中和残留的固定液, 再进行 PBS 清洗。

4.将切片稍甩干, 用组化笔在组织周围画圈 (防止液体流走), 稍干后在圈内加入适量通透液 (0.5% Triton X-100 in PBS), 覆盖样本即可, 室温孵育 15 min, 去除通透液后用 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。

注: 若在后续实验操作中发现组化笔画的圈被破坏, 需及时补画。在组织固定和通透期间, 配制 Click-iT 反应混合物 (配制体系参考以下表 3 中方案) 。

二、5-乙炔基-2’ -脱氧尿苷 (EdU) 标记细胞

(一) 5-乙炔基-2’ -脱氧尿苷 (EdU) 储液准备

1 mg 的 5-乙炔基-2’ -脱氧尿苷 (EdU) 加入 396.5 µL DMSO 配置成 10 mM 的储液。分装保存于 -20 °C。

(二) 细胞标记

- 1.取对数生长期细胞，以每孔 $4 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ 细胞（可根据细胞大小、生长速度以及实验处理的具体要求调整细胞数量和密度）接种于 96 孔板中，培养至正常生长阶段。
- 2.根据实验需要进行各种药物处理。
- 3.用细胞完全培养基按一定比例稀释 10 mM 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷（EdU） 储液至合适浓度后加入细胞中，混匀；设置不加 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷（EdU） 处理的阴性对照组。

注：5-乙炔基-2'-脱氧尿苷（EdU） 的标记浓度需根据细胞类型加以调整，建议以 10 μ M 的初始浓度进行摸索。

- 4.细胞培养箱中孵育 2 h。

注：最佳孵育时间与细胞周期有关，大多数肿瘤细胞系均可采 2 h 的孵育时间。5-乙炔基-2'-脱氧尿苷（EdU） 浓度与孵育时间相关，短时间孵育（< 2 h）宜采用高浓度，如：10~50 μ M；长时间孵育（> 24 h）宜采用低浓度，如：1~10 μ M。

(三) 细胞固定及促渗

注：对于需要做细胞表面抗原标记的实验，可以考虑在完成 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷（EdU） 孵育后，以含 3% BSA 洗涤液洗涤细胞 2 次，在细胞固定促渗之前进行。

- 1.孵育完成后，去除培养基。以 $1 \times$ PBS 清洗细胞两次，每次 5 min，以除去未掺入 DNA 的 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷（EdU） 残留，贴壁不牢的细胞可降低清洗强度。加入 50 μ L 4 % 多聚甲醛固定液，室温孵育 20 min 后，去除固定液。
- 2.每孔加入 50 μ L 2 mg/mL 甘氨酸溶液，室温孵育 5 min，中和残留的固定液。
- 3.以每孔 100 μ L 3 % BSA 洗涤细胞 2 次。
- 4.去除洗涤液，加入 100 μ L 0.5 % Triton X-100，室温孵育 10 min。

三、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷（EdU） 检测

注：本参考步骤每个切片使用 100 μ L 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。

- (一) 准备 $1 \times$ Click-iT 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷（EdU） 反应缓冲液（组分 C）： $10 \times$ 组分 C 试剂以去离子水稀释 10 倍即可。
- (二) 制备一份 $5 \times$ 的 Click-iT 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷（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 $^{\circ}$ 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：不同规格的组分 E 均按照此比例加去离子水溶解为 $5 \times$ 储液备用。

- (三) 准备 $1 \times$ Click-iT 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷（EdU） 缓冲液添加物：以去离子水稀释 $5 \times$ 储液至 $1 \times$ ，溶液应新鲜配制，当天用完。
- (四) 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 个样本数为例
$1 \times$ Click-iT 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷（EdU） 反应缓冲液（组分 B）	860 μ L
CuSO ₄ （组分 C）	40 μ L
YF® 488/555/594/647A Azide（组分 A）	2 μ L
$1 \times$ 反应缓冲液添加物（步骤 3.3 所准备）	100 μ L
总体积	1 mL

- (五) 切片样本：去除步骤一/（三）/4 的 PBS，加入 100 μ L Click-iT 反应混合物（表 3）至每个切片，使反应混合物均匀覆盖切片样本。

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。

- (六) 细胞样本：去除促渗剂，每孔 100 μ L 的 3% BSA 洗涤液洗涤 2 次。每孔加入 100 μ L Click-iT 工作液，均匀覆盖细胞。
- (七) 室温避光孵育 30 min。
- (八) 切片样本：去除反应混合物，用 3% BSA in PBS，清洗 3 次。
- (九) 细胞样本：除去 Click-iT 工作液，以 100 μ L 3% BSA 洗涤细胞 2 次后，去除洗涤液，加入 100 μ L PBS 保持细胞湿润。
- (十) 切片样本：（加强）加入适量甲醇清洗 2 次，覆盖样本即可，每次 5 min。去除甲醇，加入适量 PBS 清洗 3 次，每次 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。

四、DNA 复染

- (一) 以 PBS 稀释 活细胞 DNA 染料（蓝色）（组分 F）储液 1: 2000 至 $1 \times$ 活细胞 DNA 染料（蓝色）溶液，终浓度为 5 μ g/mL。

(二) 切片样本: 去除步骤三, (八) 的 PBS, 加入 100μL 活细胞 DNA 染料 (蓝色) 溶液至每个切片, 覆盖样本即可, 室温避光孵育 20 min (建议根据实际染色情况对染色液浓度及染色时间上下摸索)。

(三) 细胞样本: 每孔加 100 μL 1 × 活细胞 DNA 染料 (蓝色) 溶液, 室温避光孵育 15~30 min。

(四) 去除 活细胞 DNA 染料 (蓝色) 溶液, 加入适量 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。

五、封片 (组织切片)

(一) 石蜡切片: 去除 PBS, 将石蜡切片依次放入 75% 乙醇 2 min -85% 乙醇 2 min-95% 乙醇 2 min-无水乙醇 5 min -无水乙醇 5 min, 进行脱水, 放入二甲苯中 5 min, 进行透明, 最后将切片从二甲苯取出, 向样本上加入中性树胶进行封片。

(二) 冰冻切片: 去除 PBS, 向样本上加入中性树胶进行封片。

六、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
活细胞 DNA 染料 (蓝色), bound to DNA	350	461

注: 建议封片完成后立即进行荧光显微镜拍照观察; 如果条件限制, 可将切片避光置于阴凉干燥处暂存, 尽快观察拍照。

七、染色效果图 (图 2)

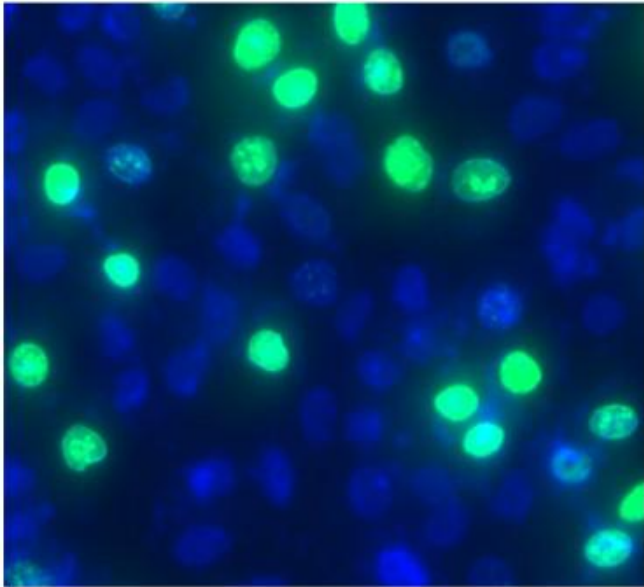


图 2 使用 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU) 对增殖的 HeLa 细胞进行细胞增殖分析用 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU) 孵育 HeLa 细胞 2 小时, 然后固定、促渗并用 YF® Dye 叠氮化物和本司活细胞 DNA 染料 (蓝色) 染色。结果是根据 HeLa 细胞的光散射特征通过荧光显微镜拍照得出。