

EdU 细胞增殖检测使用说明

RN:RI1078.2

产品简介

EdU (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 Apollo® 荧光染料的特异性反应快速检测细胞 DNA 复制活性。

与 BrdU 检测方法相比, EdU 检测方法更快速、更灵敏、更准确。EdU 与 T 非常相似, 而 EdU 染料 (Apollo® 荧光染料) 只有 BrdU 抗体的 1/500, 在细胞内很容易扩散, 无需 DNA 变性 (酸解、热解、酶解等), 可有效避免样品损伤, 而且无需抗原抗体反应。本产品系列可搭配 Cell-Light™ Apollo Stain Kit 使用, 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)以及体外培养的细胞增殖检测。

试剂	C00052	C00053	C00054
EdU(试剂 A)	2 mg	10 mg	50 mg

运输保存

室温运输, -20°C 储存, 可稳定储存一年。

使用前须知

本制品需与 Cell-Light™ Apollo567 Stain Kit(100T) (Code No. C10371-1) 或 Cell-Light™ Apollo643 Stain Kit(100T) (Code No. C10371-2) 或 Cell-Light™ Apollo488 Stain Kit(100T) (Code No. C10371-3) 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

- 1X 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) (去离子水配置)
- 组织及切片处理相关试剂 (动物实验用)
- 细胞固定液(即含 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。

实验参考

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

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。

表 2 Apollo®染色反应液的配置参考（**现用现配**）

配制顺序	Apollo®染色反应液	500µL*	1 mL	5 mL	10 mL
1	去离子水	469 µL	938 µL	4.69 mL	9.38 mL
2	Apollo®反应缓冲液（试剂B）	25 µL	50 µL	250 µL	500 µL
3	Apollo®催化剂溶液（试剂C）	5 µL	10 µL	50 µL	100 µL
4	Apollo®荧光染料溶液（试剂D）	1.5 µL	3 µL	15 µL	30 µL
5	Apollo®缓冲添加剂（试剂E）	5 mg	9 mg	44 mg	88 mg

注：1）*表示通常配制的 Apollo®反应液的体积；

2）按顺序配制适量 1X Apollo®染色反应液，以免破坏正常的反应体系（**现用现配**，30 分钟用完）；

3）试剂 E 为白色粉末，较易氧化，使用后请旋紧管盖，如试剂出现棕黄色，则需更换；

粉末较难准确称量，称量误差范围可稍微放宽，但不应超过±20%。

表 3 配套染料的相关波长信息

产品编号	荧光染料	Excitation	Emission	Similar to
C00031*	Apollo® 567	550 nm	565 nm	Cy3
C00041	Apollo® 643	653 nm	667 nm	Cy5
C00051	Apollo® 488	490 nm	520nm	FAM
C00033*	Hoechst 33342	350 nm	461 nm	DAPI

注：1）*荧光显微镜宜采用 Hoechst 33342 及 Apollo® 567 进行 DNA 复制活性检测；

2）激光共聚焦显微镜采用 Apollo® 567 或 Apollo® 643 均可。

动物实验方法（以1cm x 1cm切片为例）

实验前须知

EdU 的分子量为 252.23，易溶于水，PBS，生理盐水。

EdU 建议初始给药量为 5mg/kg，稀释浓度为 0.5~1mg/mL。

表 4 EdU 注射液配置参考

EdU	0.1mg	1mg	2mg	10mg	50mg	500mg
PBS	100 μ L	1mL	2mL	10mL	50mL	500mL

注：1) 可采用 PBS 或生理盐水稀释；2) 可根据具体 EdU 用量与注射体积进行溶解。

EdU 标记

1.1 动物 EdU 注射（具体参数可参考表 1）：

- 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 小时)，大脑等增殖慢的组织及器官可能需采用长时间标记（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，5mg/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 小时后即可检测到阳性信息，可用作实验阳性对照进行预实验。）

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 μ m 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 分钟/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 分钟后，4 $^{\circ}$ C 丙酮固定 10 分钟，PBS 清洗 3 次，每次 5 分钟。
- 2.4 2 mg/mL 甘氨酸 清洗 10 分钟；
- 2.5 （加强）加入 100 μ L 渗透剂（0.5% Triton X-100 的 PBS）脱色摇床孵育 10 分钟，PBS 清洗。

以下是使用本制品进行 EdU 标记后, 选择 Cell-Light™ Apollo567 Stain Kit(100T) (Code No. C10371-1) 或 Cell-Light™ Apollo643 Stain Kit(100T)(Code No. C10371-2)或 Cell-Light™ Apollo488 Stain Kit(100T)(Code No. C10371-3) 进行染色的操作方法。

Apollo 染色

3.1 加入 100 μ L 的 1X Apollo®染色反应液 (表 2), 避光、室温孵育 30 分钟后, 弃染色反应液;

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。

3.2 加入渗透剂(0.5% TritonX-100 的 PBS)清洗 2~3 次, 每次 10 分钟, 弃渗透剂;

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

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。

注: 染料兼容性需参照表 3。

DNA 染色

4.1 用去离子水按 100: 1 的比例稀释试剂 F, 制备适量 1X Hoechst 33342 染色反应液, 避光保存;

4.2 加入 100 μ L 1X Hoechst 33342 染色反应液, 避光, 室温孵育 30 分钟后, 弃染色反应液;

4.3 PBS 清洗 1~3 次, 洗脱 Hoechst 33342 反应液。

图像获取及分析

建议染色完成后, 立即进行观测; 如果条件限制, 请避光 4℃ 湿润保存待测, 但不要超过 3 天。

注: 1) 适用于具有相应平台检测通道的仪器进行检测。2) 如对结果有疑问可发至 support@ribobio.com, 共同分析解决。

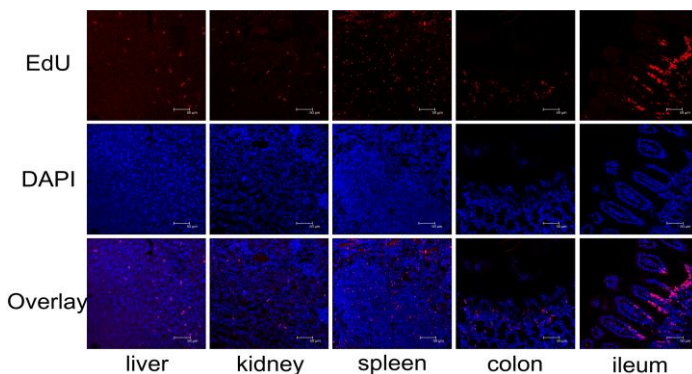


图 1 小鼠腹腔注射 EdU 4 小时后检测多种组织器官的细胞增殖实例

实验前须知

EdU 的分子量为 252.23, 建议使用时用 DMSO 配制成 50mM 储存液, 并参考 C10310 (EdU In Vitro Imagine Kit) 或 C10338 (EdU In Vitro Flow Cytometry Kit) 试剂盒说明书进行实验。

表 5 50mM EdU 储存液的配置参考

EdU	2mg	10mg	50mg
DMSO	158.6 μ L	793 μ L	3.965 mL

也可选择其他套装产品 Cell-Light™ EdU Apollo567 In Vitro Kit(100T) (Code No. C10310-1)、Cell-Light™ EdU Apollo643 In Vitro Kit(100T) (Code No. C10310-2)、Cell-Light™ EdU Apollo488 In Vitro Kit(100T) (Code No. C10310-3), 或 Cell-Light™ EdU Apollo567 In Vitro Flow Cytometry Kit(20T) (Code No. C10338-1)、Cell-Light™ EdU Apollo643 In Vitro Flow Cytometry Kit(20T) (Code No. C10338-2)、Cell-Light™ EdU Apollo488 In Vitro Flow Cytometry Kit(20T) (Code No. C10338-3) 进行相应检测, 实验操作步骤请参考相应说明书。

相关产品

产品编号	产品名称	规格
C10310-1	Cell-Light™ EdU Apollo567 In Vitro Kit(100T)	100T
C10310-2	Cell-Light™ EdU Apollo643 In Vitro Kit(100T)	100T
C10310-3	Cell-Light™ EdU Apollo488 In Vitro Kit(100T)	100T
C10338-1	Cell-Light™ EdU Apollo567 In Vitro Flow Cytometry Kit(20T)	20T
C10338-2	Cell-Light™ EdU Apollo643 In Vitro Flow Cytometry Kit(20T)	20T
C10338-3	Cell-Light™ EdU Apollo488 In Vitro Flow Cytometry Kit(20T)	20T
C00052	EdU 2mg	2mg
C00053	EdU 10mg	10mg
C00054	EdU 50mg	50mg
C10316-1	Cell-Light™ EU Apollo567 In Vitro Kit(100T)	100T
C10316-2	Cell-Light™ EU Apollo643 In Vitro Kit(100T)	100T
C10316-3	Cell-Light™ EU Apollo488 In Vitro Kit(100T)	100T
C00064	EU 20mg	20mg
C00065	EU 50mg	50mg

1, 什么样的信号才是真正的 EdU 阳性信号?

- 1) 信号与核信号 (Hoechst 33342 或 DAPI 等核染信号) 完全重合, 或者与核重合的信号明显强于胞浆上的信号 (染料附着等)。
- 2) 一般部分细胞上的信号呈现上述特征, 而不是全部细胞。

2, 整个细胞都有 EdU 信号, 或背景信号很强。

- 1) 染色后洗涤不充分, 可尝试加强洗涤解决。
- 2) 染色过程中干片, 导致染料粘附严重。
- 3) 多聚甲醛固定时间过长而未使用甘氨酸中和。
- 4) 没有阳性信号而曝光过度导致背景严重。

3, 没有阳性信号。

- 1) EdU 处理时间太短导致没有阳性信号。体外细胞实验一般 EdU 处理时间宜为细胞周期长度的 1/5-1/10, 阳性率约为 20%-30%, 体内实验需根据目的组织细胞的增殖速度进行调整, 若细胞增殖速度慢, 需要采用长时间的 EdU 处理时间。
- 2) 染色过程干片等因素导致未染上信号。
- 3) 对于阴性结果, 可设置阳性对照 (常见肿瘤细胞株如 HeLa EdU 处理 2 小时或 EdU 处理 6 小时以上的小鼠小肠上皮组织) 以确认染色过程无误, 对于目的样品, 可先使用较长的 EdU 处理时间以尽量先检测出信号, 再根据具体信号比例进行 EdU 处理时间的调整。