

# EU 新生 RNA 检测（成像检测）使用说明

RN: R11081.1

## 产品简介

EU 是一种尿嘧啶核苷类似物，能够在 RNA 转录时期代替尿嘧啶(U)渗入正在合成的 RNA 分子，通过基于 EU 与 Apollo® 荧光染料或叠氮生物素的特异性反应进行 RNA 荧光检测。本试剂盒将直接测定细胞内新生 RNA 的变化，适用于 RNA 合成、病毒复制等方面的研究。Cell-Light™ 检测方法基于 EU 与 Apollo® 荧光染料的完美结合准确检测新合成的 RNA，只需三步即可分析数据：EU 孵育、细胞固定化、染料检测，简单，快速，准确。

本产品系列适用于荧光显微镜，共聚焦显微镜，高内涵筛选仪的 EU RNA 转录活性检测。

## 试剂盒内容

试剂	浓度	C10316-1	C10316-2	C10316-3	
试剂A	EU溶剂	1000X	20 μL	20 μL	20 μL
试剂B	Apollo®反应缓冲液	20X	500 μL	500 μL	500 μL
试剂C	Apollo®催化剂溶液	100X	100 μL	100 μL	100 μL
试剂D	Apollo®567荧光染料溶液	300X	30 μL	-	-
	Apollo®643荧光染料溶液	300X	-	30 μL	-
	Apollo®488荧光染料溶液	300X	-	-	30 μL
试剂E	Apollo®缓冲添加剂	粉末	100 mg	100 mg	100 mg
试剂F	Hoechst 33342	100X	150 μL	150 μL	150 μL

## 运输保存

室温运输，4°C 储存，荧光试剂请避光保存，可稳定储存半年。

### 使用前须知

贴壁细胞宜采用荧光检测方式，适用于荧光显微镜、共聚焦显微镜、高内涵筛选仪检测，亦可进行爬片检测。

### 实验准备

- 盖玻片
- 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）
- 细胞固定液（即含 4% 多聚甲醛的 PBS）

注：甲醛可代替多聚甲醛，但有可能对组织产生较大破坏；

- 96/24/12/6 孔培养板或培养皿

注意：请使用一次性手套，废液请妥善处理。

## 实验参考

表 1 EU 培养基及染色反应液的使用量参考

	96 孔板*	48 孔板	24 孔板	12 孔板	6 孔板	5.5 cm 小皿
EU 培养基	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L	300 $\mu$ L	500 $\mu$ L	1 mL	2 mL
染色反应液	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L	300 $\mu$ L	500 $\mu$ L	1 mL	2 mL

注：1) \*表示贴壁细胞通常采用的培养容器，EU 培养基与染色反应液用量以覆盖细胞为宜；2) 悬浮细胞 EU 用量依据培养体积而定。

表 2 Apollo<sup>®</sup>染色反应液的配置参考（现用现配）

配制顺序	Apollo <sup>®</sup> 染色反应液	500 $\mu$ L*	1 mL	5 mL	10 mL
1	去离子水	469 $\mu$ L	938 $\mu$ L	4.69 mL	9.38 mL
2	Apollo <sup>®</sup> 反应缓冲液 (试剂B)	25 $\mu$ L	50 $\mu$ L	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L
3	Apollo <sup>®</sup> 催化剂溶液 (试剂C)	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L
4	Apollo <sup>®</sup> 荧光染料溶液 (试剂D)	1.5 $\mu$ L	3 $\mu$ L	15 $\mu$ L	30 $\mu$ L
5	Apollo <sup>®</sup> 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<sup>®</sup>反应液的体积；

2) 按顺序配制适量 1X Apollo<sup>®</sup>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 $\pm 20\%$ 。

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 <sup>®</sup> 567	550 nm	565 nm	Cy3
C00041	Apollo <sup>®</sup> 643	653 nm	667 nm	Cy5
C00051	Apollo <sup>®</sup> 488	490 nm	520nm	FAM
C00033*	Hoechst 33342	350 nm	461 nm	DAPI

注：一个试剂盒仅含有一种 Apollo 染料。

## 荧光显微镜检测方法（以96孔板，A549贴壁细胞为例）

### 细胞培养

取对数生长期细胞，以每孔  $4 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$  细胞接种于 96 孔板中，培养至正常生长阶段。

### 药物处理

（可选）客户可以根据实验需要进行各种药物处理。

### EU 标记

- 1.1 用细胞培养基按 1000: 1 的比例稀释 EU 溶液（试剂 A），制备适量 500 $\mu$ M EU 培养基；

注：1）配置好的培养基的保存时间取决于培养基的性质，建议现配现用。

- 1.2 每孔加入 100 $\mu$ L 500 $\mu$ M EU 培养基孵育 2 小时，弃培养基；

注：1）EU 孵育时间与实验目的密切相关；

2）EU 培养基用量以没过细胞为宜，但需要保证 EU 孵育时间内的营养物质持续供给（表 1）。

- 1.3 PBS 清洗细胞 1~2 次，每次 5 分钟。

注：清洗目的是将未渗入 RNA 的 EU 洗脱，清洗方式依据不同的细胞类型而定，贴壁不牢的细胞请降低清洗强度。

### 细胞固定化

- 2.1 每孔加入 50 $\mu$ L 细胞固定液（即含 4%多聚甲醛的 PBS）室温孵育 30 分钟，弃固定液；

注：1）低浓度的多聚甲醛有利于细胞结构的保持，当需要抗体染色时，需采用 Triton X-100 透化细胞以利于抗体进入细胞内。

2）可采用其他方式进行细胞固定。

- 2.2 每孔加入 50 $\mu$ L 2 mg/mL 甘氨酸，脱色摇床孵育 5 分钟后，弃甘氨酸溶液；

注：目的是中和多聚甲醛，保证染色反应体系，当采用其他方式进行细胞固定时可酌情省略此步骤；

- 2.3 每孔加入 100  $\mu$ L PBS，脱色摇床清洗 5 分钟，弃 PBS；

- 2.4 每孔加入 100 $\mu$ L 渗透剂（0.5% TritonX-100 的 PBS）脱色摇床孵育 10 分钟；PBS 清洗 1 次，10 分钟。

注：当实验需要进行其他抗体染色时，或由于某些细胞类型对染料的吸附性较高，可能需要增强细胞膜通透性。

### Apollo 染色

- 3.1 每孔加入 100  $\mu$ L 的 1X Apollo®染色反应液（表 1），避光、室温、脱色摇床孵育 30 分钟后，弃染色反应液；

注：1）染色液用量与细胞量相关，以覆盖细胞为宜（表 1）；2）孵育时间可以进行适当调整，调整范围为 10-30 分钟。

- 3.2 加入 100  $\mu$ L 渗透剂（0.5% TritonX-100 的 PBS）脱色摇床清洗 2~3 次，每次 10 分钟，弃渗透剂；

- 3.3 （可选）每孔每次加入 100  $\mu$ L 甲醇清洗 1~2 次，每次 5 分钟；PBS 清洗 1 次，每次 5 分钟。

注：一般情况下可省略这一步，只有某些细胞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）可以根据实验需要进行细胞表面或细胞内抗原的染色，提前计划好染色方案和检测通道，必要时进行相关的染料兼容性测试。

### 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 Hoechst33342 反应液，避光保存；

- 4.2 每孔加入 100  $\mu$ L 1X Hoechst 33342 反应液，避光、室温、脱色摇床孵育 30 分钟后，弃染色反应液；

- 4.3 每孔每次加入 100  $\mu$ L PBS 清洗 1~3 次。

### 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 $^{\circ}$ C 湿润保存待测，但不应超过 3 天。若为细胞爬片或涂片，可使用抗荧光淬灭封片剂封片后 4 $^{\circ}$ C 保存及进行检测。

## 相关产品

产品编号	产品名称	规格
C00064	EU 20mg	20mg
C00065	EU 50mg	50mg
C10371-1	Cell-Light™ Apollo 567 Stain Kit (100T)	100T
C10371-2	Cell-Light™ Apollo 643 Stain Kit (100T)	100T
C10371-3	Cell-Light™ Apollo 488 Stain Kit (100T)	100T