

## EdU 染色试剂盒（红，AF555）

货号：HKI0022

### 【产品信息】

产品名称	产品货号	规格	有效期
EdU 染色试剂盒（红，AF555）	HKI0022	100T	一年

### 【产品简介】

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 AzideAlexaFluor488 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(Clickreaction)，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。

### 【储存与运输】

冰袋运输，-20° C 储存，可稳定储存一年

### 【试剂组成】

货号	品名	规格
HKI0022-1	反应缓冲液 PB	5ml
HKI0022-2	催化剂 AC	1ml
HKI0022-3	催化剂 CU	200ul
HKI0022-4	红色色原	25ul
HKI0022-5	EdU 储存液(400mM)	50ul

## 【使用方法】

### 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 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。

### 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：3-10  $\mu\text{m}$  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。

### 细胞实验

细胞 EdU 标记

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  $\mu\text{M}$  的 EdU 培养基；  
 每孔加入适量 50  $\mu\text{M}$  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），PBS 清洗细胞 3 次，每次 5 分钟，EdU 培养基和 EdU 反应液孵育体积可参考下表：

	96 孔板	48 孔板	24 孔板	12 孔板	6 孔板	5.5cm 小皿
EdU 培养基	100 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	1mL	2mL
EdU 反应液	100 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	1mL	2mL

细胞固定通透

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；

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。

### EdU 反应

按照 PB: CU: AC: 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  $\mu\text{L}$  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。

### DAPI 染色

每片组织加入 50-100  $\mu\text{L}$  DAPI 染色液，染色 15 分钟，PBS 洗脱三次，每次 5 分钟。

### 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℃ 保存。

### 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，如使用自备 EdU 粉末，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  $\mu$ 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 $\mu$ 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，待使用时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  $\mu$  M 的 EdU 培养基 (50  $\mu$  M 为推荐浓度。由于细胞类型、培养基种类、细胞密度和增殖速度等多种因素会显著影响 EdU 在细胞中的掺入量。因此，在首次使用 EdU 时，建议对其使用浓度进行一些探索和调整。如果您之前已经使用 BrdU 进行过实验，可以将 BrdU 的终浓度作为 EdU 的参考浓度)。

### 【注意事项】

1. 对于体外培养细胞，具体 EdU 使用浓度、孵育时间随样品以及研究目的的不同，可进行适当调整。
2. 部分组织细胞增殖速度缓慢，为了排除造模效果不佳等因素，建议选增殖快的组织样品作为参照样本（如肠道组织）。
3. 如果背景颜色过深，可能是实验中洗涤不充分、组织样品固定时间过长、固定液残余导致。
4. 催化剂 AC 颜色发生轻微变化，点击反应催化体系依旧能够正常进行，如呈现棕色，表明该组分已失效，请弃用。
5. 操作时请穿实验服，佩戴一次性手套。