EdU-488 细胞增殖检测试剂盒

原理：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，其炔羟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 Azide Alexa Fluor 488 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(Click reaction)，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。

产品货号：RCF-043 ；

规格：200T

有效期：-20℃保存，12 个月有效

试剂盒组成

货号 Code	品名 Product name	储存条件 Storage condition
RCF043-1	PB 10mL	-20℃
RCF043-2	AC 1mL*2	-20℃
RCF043-3	CU 400μL	-20℃
RCF043-4	488 色原 50μL	-20℃
RCF043-5	100mg/mL EdU 母液 100μL	-20℃

备注：AC 容易氧化失效，不使用时放入冰箱-20 度保存，如发现变色，需更换新鲜试剂。

实验流程

1.样本处理

1.1 动物实验

1.1.1 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用水中。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，或者直接使用 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。

1.1.2 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：3-10μm 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。

1.2 细胞实验

1.2.1 细胞 EdU 标记

1）用细胞完全培养基和 EdU 母液按 8000：1 的比例稀释，制备适量 50μM 的 EdU 培养基；

2）每孔加入适量 50μM 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）,EdU 培养基和 EdU 反应液孵育体积可参考下表；

3）PBS 清洗细胞 3 次，每次 5 分钟

	96 孔板	48 孔板	24 孔板	12 孔板	6 孔板	5.5cm 小皿
EdU 培养基	100μL	200μL	300μL	500μL	1mL	2mL
EdU 反应液	100μL	200μL	300μL	500μL	1mL	2mL

1.2.2 细胞固定通透

1）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。；

2）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。

2.EdU 反应

按照 PB：CU：AC：488 色原=860：40：100：5 的比列配制 EdU 反应液（反应液现配现用）。

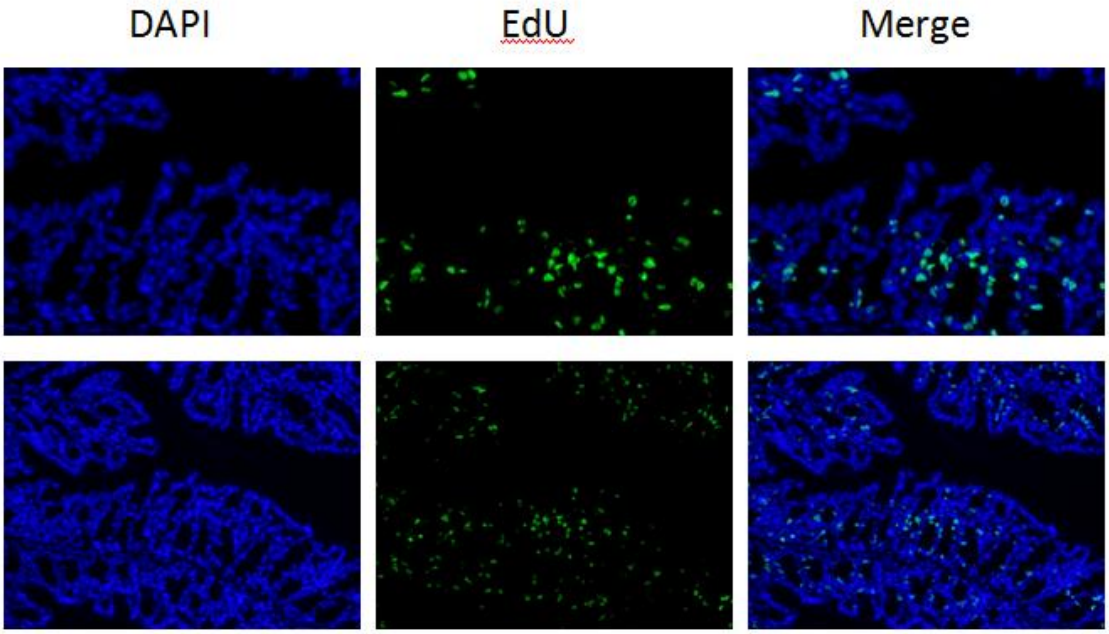
每个样本滴加 50-100μL 的 EdU 染色反应液（反应液均匀覆盖样本），室温避光孵育 15-60 分钟，弃染色反应液，PBS 冲洗 3 次，每次 5 分钟。

3.DAPI 染色

每个样本加入 50-100μL DAPI 染色液，染色 15 分钟，PBS 清洗 3 次，每次 5 分钟。

4.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。



以上是 50mg/kg 标记小鼠 6 小时的染色图像

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（50μg/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	100μL	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 50μM 的 EdU 培养基（50μM 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）。

文章引用试剂盒/方法：**Staining of EdU was performed using a EdU cell proliferation Assay kit (Huilanbio Biological Technology, Shanghai, China) based on the click chemistry technology according to the manufacture's instruction.**