

5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU)

1 产品基本信息

产品名称 (中文): 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU)

产品名称 (英文): EdU

产品编号: MX1536

产品规格: 2 mg, 10 mg, 50 mg

2 产品介绍

EdU, 即 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (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 的乙炔基与 FT™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。

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。

本制品需与 MX1543、MX1544、MX1545 等 EdU 成像试剂盒配合使用。

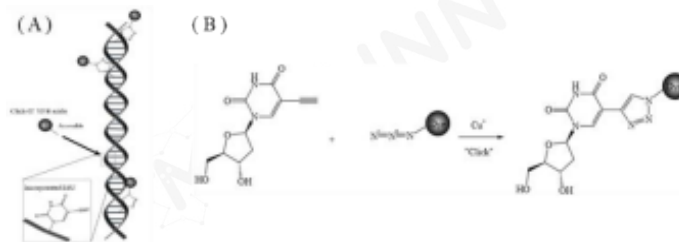


图 1 检测原理图

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。

适用范围:

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

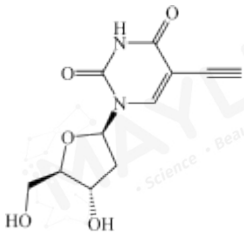
3 产品参数

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。

4 储存与运输

储存条件：-20 °C 避光保存

运输条件：冰袋运输

5 使用方法（仅供参考）

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 × 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

1. 细胞裂解

(1)将转入报告基因的细胞中的培养基移除，加入 PBS 轻轻洗涤（贴壁细胞可直接进行此操作，悬浮细胞要离心收集细胞）。充分裂解按如下方案加入 1×Lysis Buffer（用无菌水按 4：1 稀释 A 组分），然后将培养板 放在微型震荡器上室温震荡 15 min，充分裂解细胞得到裂解产物。

细胞培养板	96孔板	48孔板	24孔板	12孔板	6孔板
裂解液体积	30 μL	60 μL	120 μL	250 μL	500 μL

注：裂解产物可室温保存 6 h，-70 °C 可长期存放（裂解产物不能多次反复冻融）。

(2)将充分裂解后的裂解产物，10000~15000 rpm 离心 3~5 min，收上清。

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

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 EdU 注射液进一步稀释，不会影响 EdU 的稳定性。

表 2 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, et al. PNAS. 2008	Mice	腹腔注射	100 μ g	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 μ g/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 μ g	1 h	Eye
20163731	Schmidt EJ, et al. BMC Dev Biol. 2010	Mice	腹腔注射	200 μ g	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 μ g	4 h	Thymi
21145612	Sun H, et al. J Hepatol. 2011	Mice	腹腔注射	100 μ g	72 h	-

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。

(二) EdU 标记

1. 动物 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 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 EdU，降低背景。

2. 切片厚度：3~10 μ m 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 $^{\circ}$ 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画笔画的圈被破坏, 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、EdU 标记细胞

(一) EdU 储液准备

1 mg 的 EdU 加入 396.5 μ L DMSO 配置成 10 mM 的储液。分装保存于 -20 $^{\circ}$ 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 EdU 储液至合适浓度后加入细胞中, 混匀; 设置不加 EdU 处理的阴性对照组。

注: 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。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 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 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。

以下是使用本产品进行 EdU 标记后, 选择 MX1543、MX1544、MX1545 等 EdU 成像试剂盒进行染色的操作方法。

三、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 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 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 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 ×Click-iT EdU 反应缓冲液 (组分 B)	860 μ L
CuSO ₄ (组分 C)	40 μ L
FT™ 488/555/594/647A Azide (组分 A)	2 μ L
1 ×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 Hoechst 33342 (组分 F) 储液 1: 2000 至 1×Hoechst33342 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 100 μ L Hoechst 33342 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 μ L 1×Hoechst 33342 溶液，室温避光孵育 15~30 min。

(四) 去除 Hoechst 33342 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)
FT™488 Azide	495	519
FT™555 Azide	555	565
FT™647A Azide	650	670
Hoechst 33342, 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）

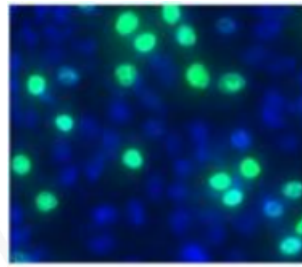


图 2 使用 EdU 对增殖的 HeLa 细胞进行细胞增殖分析用 EdU 孵育 HeLa 细胞 2 小时，然后固定、促渗并用 FT™ Dye 叠氮化物和本司 Hoechst 33342 染色。结果是根据 HeLa 细胞的光散射特征通过荧光显微镜拍照得出。

6 常见问题

Q1：什么样的信号才是真正的 EdU 阳性信号？

答：(1)FT™ Dye Azide 染色信号与核染色信号（Hoechst33342 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。

(3)对于流式细胞术检测，则是通过设置阴性对照样品（不做 EdU 处理但同时进行 FT™ Dye Azide 染色），高于阴性对照样品信号强度的为阳性信号。

Q2：问：整个细胞都有 EdU 信号，或背景信号很强是什么原因？怎么解决？

答：(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。

Q3：没有阳性信号是什么原因？怎么解决？

答：(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)EdU 处理时细胞已经长得过满而产生接触抑制等情况使得细胞没有发生增殖。

(3)实验时如果未使用完全培养基配制 EdU 培养基而是使用无血清培养基配制 EdU 培养基，可能会使细胞同步化在 G0/G1 期而导致没有阳性信号或阳性信号很少。

(4)染色过程干片等因素导致未染上信号。

(5)对于阴性结果，可设置阳性对照（常见肿瘤细胞株如 A549、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阳性信号，再根据具体信号比例进行 EdU 处理时间的调整。

7 注意事项

- 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
- 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。
- 试剂保存：粉末在-20℃避光保存，1 年有效；配置成溶液，-20℃避光保存，1 个月有效，-80℃避光保存，6 个月有效。
- 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。

- 请使用一次性手套，废液请妥善处理。
- 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。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。