

## BeyoClick™ EU-647 RNA合成检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
R0311S	BeyoClick™ EU-647 RNA合成检测试剂盒	50-500次
R0311L	BeyoClick™ EU-647 RNA合成检测试剂盒	200-2000次

### 产品简介:

- 碧云天BeyoClick™ EU-647 RNA合成检测试剂盒(BeyoClick™ EU RNA Synthesis Kit with Alexa Fluor 647), 是一种基于RNA合成过程中尿嘧啶核苷(Uridine)类似物EU (5-ethynyl-uridine)的掺入, 并通过随后的点击反应(Click reaction)使EU被Alexa Fluor 647所标记, 从而实现简单、快速、高灵敏地检测新合成RNA的试剂盒。
- 本试剂盒可以检测到活细胞或组织样品中新合成的RNA, 而不检测DNA[1]。检测过程中不需要放射性同位素和抗体, 只需要简单的两步反应即可完成。
- 经本试剂盒处理后, 有RNA合成的细胞在荧光显微镜下呈现较强的远红外荧光, 通常该荧光探针被激发后, 肉眼不能观察到激发出来的长波长荧光, 但可以被具有相应激发和发射检测模块的荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪或荧光酶标仪等所检测到, 也可以用于高内涵筛选(High-content screening, HCS)。流式细胞仪或荧光酶标仪检测仪适用于细胞样品, 不适用于组织切片。
- EU (5-ethynyl-uridine), 中文名为5-炔基尿苷, 是一种新型尿嘧啶核苷(Uridine)类似物, EU可以在RNA合成过程中替代尿苷掺入到新合成的RNA中。另一方面, EU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、Azide Alexa Fluor 555、Azide Alexa Fluor 594、Azide Alexa Fluor 647等)通过一价铜离子的催化发生共价反应, 形成稳定的三唑环, 该反应非常迅速高效, 被称作点击反应(Click reaction), 其反应原理参见图1。通过点击反应, 新合成的RNA会被相应的荧光探针所标记, 从而可以使用适当的荧光检测设备检测到新合成RNA。

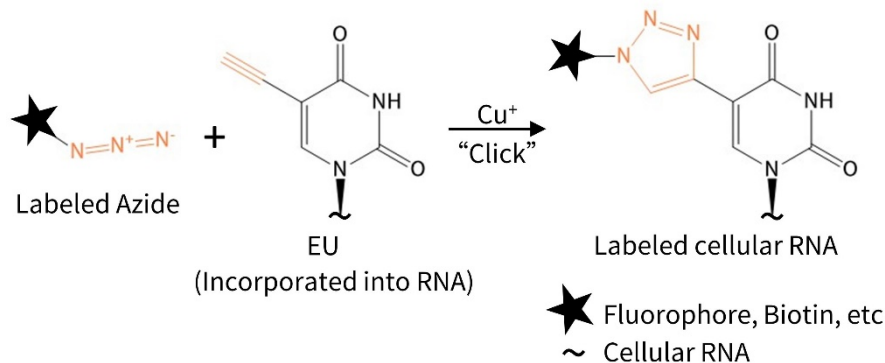


图1. 碧云天BeyoClick™系列RNA合成检测试剂盒中的点击反应(Click reaction)原理图。荧光探针等标记的叠氮化物(Labeled Azide)与掺入到细胞RNA中的EU, 在铜离子的催化发生共价反应, 形成稳定的三唑环, 最终使细胞RNA标记上荧光探针或其它探针。

- **本试剂盒反应简单、检测灵敏度高。**本试剂盒基于简单高效的点击反应, 无需特殊温度, 只需少量的小分子叠氮化物探针即可非常有效地标记掺入的EU, 并且可以检测到单个细胞的RNA合成情况。
- **本试剂盒使用便捷、兼容性好。**本试剂盒只需常用的多聚甲醛固定和Triton X-100穿透, 就可以使叠氮化物探针有效进入细胞并发生点击反应, 不会影响细胞形态, 不会产生多余的附加产物, 不会影响基于抗体的免疫荧光和免疫组化检测, 也不会影响DNA的荧光染色(如PI染色检测细胞周期、DAPI或Hoechst染料检测细胞核等)。
- **本试剂盒检测快速。**本试剂盒采用的BeyoClick™ EU法检测新合成的RNA仅需1.5-2小时。本试剂盒操作流程请参考图2。

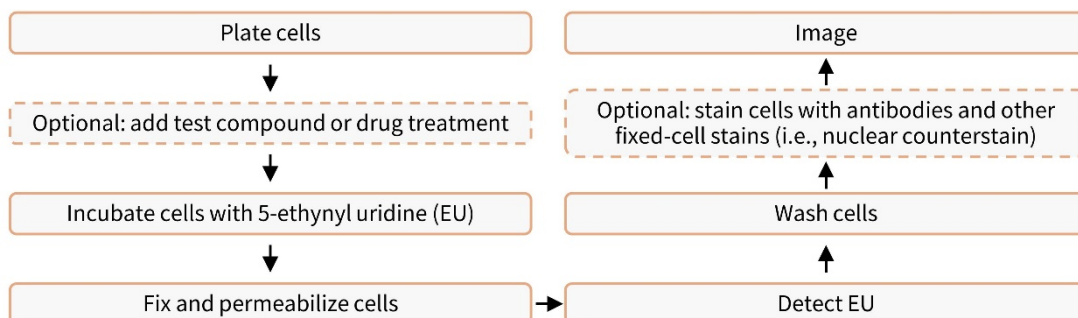


图2. 碧云天BeyoClick™系列RNA合成检测试剂盒实验操作流程。

- 本试剂盒同时提供了染色细胞核的Hoechst 33342，以方便染色观察所有的细胞核。HeLa细胞用本试剂盒检测新合成RNA的效果参见图3。

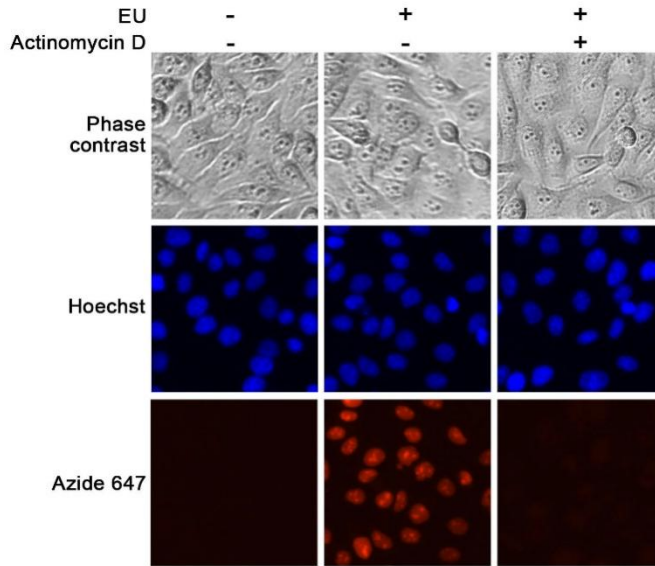


图3. 碧云天BeyoClick™ EU-647 RNA合成检测试剂盒(R0311)检测HeLa细胞新合成RNA的效果图。EU孵育2小时后检测，无EU组观察不到荧光(最左侧一列)；EU (1mM)组有较强的伪彩红色荧光(中间一列)；而用RNA合成抑制剂Actinomycin D (1μM)提前预处理0.5小时后，荧光显著减弱，说明RNA合成抑制后，EU的掺入被显著抑制(最右侧一列)。实际检测效果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中效果仅供参考。

- 本试剂盒小包装R0311S如果用于培养的细胞(6孔板)的检测，可以检测50个样品，每个样品的反应体系为500μl的Click反应液；如果用于96孔板检测，可以检测500个样品，每个样品的检测体系为50μl的Click反应液；如果用于12孔、24孔、48孔或384孔板样品的检测，分别可以检测125、250、350和1250个样品，每个样品推荐的Click反应液用量为200μl、100μl、70μl和20μl；如果用于流式细胞仪检测，可以检测50个样品，每个细胞样品的细胞数量宜为10-100万，每个样品的反应体系为500μl的Click反应液；如果用于冰冻或石蜡切片的检测，可以检测125-250个样品，每个样品的反应体系为100-200μl的Click反应液。大包装R0311L可检测样品的数量为小包装R0311S的4倍。

**包装清单：**

产品编号	产品名称	包装
R0311S-1	EU (100mM)	1.1ml
R0311S-2	Azide 647	55μl
R0311S-3	Click Reaction Buffer	30ml
R0311S-4	CuSO <sub>4</sub>	1.1ml
R0311S-5	Click Additive	2管
R0311S-6	Hoechst 33342 (1000X)	50μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
R0311L-1	EU (100mM)	4.4ml
R0311L-2	Azide 647	220μl
R0311L-3	Click Reaction Buffer	120ml
R0311L-4	CuSO <sub>4</sub>	4.4ml
R0311L-5	Click Additive	1瓶
R0311L-6	Hoechst 33342 (1000X)	200μl
—	说明书	1份

**保存条件：**

-20°C保存，一年有效。Azide 647和Hoechst 33342须避光保存。

**注意事项：**

- Click Additive配制成溶液后请注意适当分装冻存。如果溶解后有白色物质析出，请上下颠倒多次，待全部溶解后使用。如果该

溶液颜色变成棕色，说明该组分的有效成分已失效，请弃用。

- 如果用于动物实验需要更多EU，可以从碧云天订购5-Ethynyl Uridine (EU) ( $\geq 98\%$ , BioReagent) (ST2055)。
- 由于本产品需要铜离子催化进行点击反应，请注意如下的兼容性问题及解决方案。本产品完全兼容有机类染料如Alexa Fluor®系列普通染料及Fluorescein (FITC)、Allophycocyanin (APC)及APCE-tandems染料；对于Qdot®纳米晶体探针、Horseradish peroxidase (HRP)、R-phycoerythrin (R-PE)和R-PE-tandems染料如Alexa Fluor® 680-R-PE等，需要在点击反应完成后进行反应和检测；本产品会影响GFP、RFP、mCherry等荧光蛋白的荧光，对于荧光类蛋白如Green Fluorescent Protein (GFP)、TC-FlAsH™和TC-ReAsH™类试剂，需要在点击反应前进行反应和检测。由于Phalloidin (鬼笔环肽)不兼容点击反应，推荐使用Tubulin-Tracker Red (C1050)进行细胞微管的检测。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，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。

## 使用说明：

### 1. 需要用户自己准备的耗材和试剂

- PBS (pH7.2-7.6) (C0221A)。
- 固定液(推荐使用免疫染色固定液(P0098)或4%多聚甲醛固定液(P0099))。
- 洗涤液(推荐使用免疫染色封闭液(P0102)，QuickBlock™免疫染色封闭液(P0260)，或含3% BSA的PBS)。
- 通透液(推荐使用免疫染色强力通透液(P0097)，免疫染色洗涤液(P0106)，或含0.3% Triton X-100的PBS)。
- 去离子水或超纯水。
- 根据实验要求：18×18mm盖玻片(FCGF18)，6孔板或其它多孔板，或流式细胞分析仪用管子(如12×75mm)。

### 2. 检测体系的准备

- 如下以6孔板或常规切片检测体系为例，如果使用12孔板、96孔板或384孔板等孔板，检测体系可以相应按比例缩小。
- 如果检测的是悬浮细胞，请按常规的悬浮细胞的操作方式进行。例如和贴壁细胞相比，相关步骤需要增加离心步骤等，如1000×g室温离心5分钟。

### 3. 培养细胞的EU标记及固定、洗涤和通透

- 在6孔板中(如有必要可以加入盖玻片)培养适当数量的细胞。细胞培养过夜并且恢复到正常状态后，进行所需的药物处理或者其它刺激处理等。
- 配制2X的EU工作液：由于EU工作液是与培养液等体积加入到孔板中，所以需要配制成2X的工作液。推荐的EU终浓度为1mM (1X)，用细胞培养液50:1稀释EU (100mM)即可得到2X的EU工作液(2mM)，例如取100μl EU (100mM)加入4.9ml中，即得5ml 2X的EU工作液(2mM)。  
注：对于A549、HeLa和NIH/3T3等贴壁细胞，推荐EU的使用终浓度为1mM。但细胞类型、培养液种类、细胞密度、细胞增殖速度等多方面的因素会影响EU掺入到细胞中的量，因此初次使用时建议对EU的使用浓度进行一定的摸索。如果之前使用过BrU进行实验，则可以参考BrU的终浓度作为EU的终浓度。
- 将37°C预热的2X的EU工作液(2mM)，等体积加入6孔板中，使6孔板中的EU终浓度变为1X。例如设计终浓度为1mM，原先6孔板中的培养液为1ml，则将1ml 2X的EU工作液(2mM)加入到孔板中。如果培养液体积过大，可以先吸除适量的培养液，再加入等体积的2X的EU工作液；或者可以减少EU工作液的体积并增加EU的浓度，使最终培养液中的EU浓度为1mM，例如2ml培养液中加入220μl 10mM EU。如果加药处理的，建议保持原来的药物浓度，直接添加适量EU在原培养孔中。
- 继续孵育细胞2小时。该孵育时间的长短取决于细胞生长速率，通常宜继续孵育细胞周期10%左右的时间。对于常见的哺乳动物细胞如HeLa、3T3、HEK293等，细胞周期大约在18-25小时，孵育时间宜在2小时左右。人胚胎细胞的细胞周期约30分钟，推荐的孵育时间为5分钟；酵母细胞的细胞周期约3小时，推荐的孵育时间为20分钟，增殖的神经细胞其细胞周期约5天，推荐的孵育时间为1天。孵育时间小于45分钟时，建议提高EU的浓度；孵育时间大于20小时时，建议适当降低EU的浓度。
- EU标记细胞完成后，去除培养液，并加入1ml固定液，室温固定15分钟。注：对于流式细胞仪检测，贴壁细胞胰酶消化后用培养液重悬后再固定。
- 去除固定液，每孔用1ml洗涤液洗涤细胞3次，每次3-5分钟。
- 去除洗涤液，每孔用1ml通透液，室温孵育10-15分钟。
- 去除通透液，每孔用1ml洗涤液洗涤细胞1-2次，每次3-5分钟。
- 转步骤5。

### 4. 动物体内EU的标记及切片样品的处理

EU可以通过注射或进食等适当方式进行动物的体内标记。如下以小鼠为例，其它动物体内EU的标记请参考相关文献。

- 对于小鼠，可以按照100-400mg/kg的用量，把EU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。具体用量与所用动物的种类、体重以及使用方式有关，可以参考相关文献，因此初次使用时建议对EU的使用浓度进行一定的摸索，或者直接使用200mg/kg的浓度进行测试。如果之前使用过BrU进行实验，则可以参考BrU的终浓度作为EU的终浓度。EU可以单独购买碧云天的ST2055。
- 4小时后或根据特定实验确定的适当时间后，快速处死小鼠，取出所需的组织，按照常规步骤制作冰冻切片或石蜡切片。EU标记的时间也可以参考相关文献自行调整。
- 对于冰冻切片：
  - 加入适量固定液，室温固定15分钟。
  - 去除固定液，用适量洗涤液洗涤3次，每次3-5分钟。

- (c) 去除洗涤液，用适量通透液，室温孵育10-15分钟。
- (d) 去除通透液，用适量洗涤液洗涤1-2次，每次3-5分钟。
- (e) 抗原修复(选做)：如果同时需要进行目的蛋白的免疫荧光染色，并有必要进行抗原修复，可以使用适当的抗原修复液，例如P0090 冰冻切片快速抗原修复液(5X)，或者自行配制的适当的抗原修复液进行抗原修复处理。
- (f) 转步骤5。

d. 对于石蜡切片：

- (a) 脱蜡：二甲苯中脱蜡5-10分钟。换用新鲜的二甲苯，再脱蜡5-10分钟。无水乙醇5分钟，换新的无水乙醇3分钟。95%乙醇3分钟。85%乙醇3分钟。75%乙醇3分钟。50%乙醇3分钟。PBS 5分钟。
- (b) 抗原修复(选做)：如果同时需要进行目的蛋白的免疫组化染色，可以使用适当的抗原修复液，例如P0081 柠檬酸钠抗原修复液(50X)、P0083 改进型柠檬酸钠抗原修复液(50X)、P0085 EDTA抗原修复液(50X)、P0086 柠檬酸钠-EDTA抗原修复液(40X)、P0088 通用型强力抗原修复液(10X)、P0092 漂片抗原修复液(10X)，或者自行配制适当的抗原修复液进行抗原修复处理。

**特别注意：**如果使用蛋白酶K或胰酶进行抗原修复，必须反复洗涤干净，否则残留的酶会严重干扰后续标记反应。

(c) 转步骤5。

## 5. EU检测

**注：**本步骤6孔板中每孔的反应体系为500 $\mu$ l的反应混合物。对于12、24、48、96和384孔板，每孔的体系的分别为200 $\mu$ l、100 $\mu$ l、70 $\mu$ l、50 $\mu$ l和20 $\mu$ l的反应混合物。对于较小的孔，单位培养面积的液体用量已经适当增加，以有效避免液体蒸发可能带来的负面影响。对于切片，可以根据切片大小，每个切片使用100-200 $\mu$ l的反应混合物。如下以6孔板中的细胞样品为例说明具体的操作方法，对于其它孔板或切片，仅每步溶液的用量按比例调整即可，其余方法相同。

- a. 配制Click Additive Solution：对于R0311S，用1.3ml去离子水溶解试剂盒中提供的一管Click Additive，混匀至全部溶解，即为Click Additive Solution；对于R0311L，加入10.4ml去离子水溶解试剂盒中提供的一瓶Click Additive，混匀至全部溶解，即为Click Additive Solution。配制后可以适当分装，并-20 $^{\circ}$ C保存。
- b. 参考下表配制Click反应液。**注：**请严格按照下表中组分顺序和体积配制Click反应液，否则点击反应可能无法有效进行；Click反应液须在配制后15分钟内使用。

Components	Wells of 6 well plates						
	1	2	4	5	10	25	50
Click Reaction Buffer	430 $\mu$ l	860 $\mu$ l	1.72ml	2.15ml	4.3ml	10.75ml	21.5ml
CuSO <sub>4</sub>	20 $\mu$ l	40 $\mu$ l	80 $\mu$ l	100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	500 $\mu$ l	1ml
Azide 647	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l	4 $\mu$ l	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	25 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Click Additive	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	250 $\mu$ l	500 $\mu$ l	1.25ml	2.5ml
<b>Total volume</b>	<b>500<math>\mu</math>l</b>	<b>1ml</b>	<b>2ml</b>	<b>2.5ml</b>	<b>5ml</b>	<b>12.5ml</b>	<b>25ml</b>

- c. 去除上一步骤中的洗涤液。
- d. 每孔加入0.5ml Click反应液，轻轻摇晃培养板以确保反应混合物可以均匀覆盖样品。
- e. 室温避光孵育30分钟。
- f. 吸除Click反应液，用洗涤液洗涤3次，每次3-5分钟。
- g. 如果需要对细胞核进行染色，可以参照步骤6进行。如无其它的特殊需要，即可在荧光显微镜下观察，或者使用流式细胞仪、多功能酶标仪进行荧光检测，或者用高内涵筛选仪器(一般高内涵筛选需要使用染料对细胞核进行染色)进行检测。Azide 647的最大激发波长是650nm，最大发射波长是670nm。

## 6. 细胞核染色

为了检测细胞增殖的比例，可以考虑使用Hoechst 33342进行细胞核染色。一般高内涵筛选仪器也需要对细胞核进行染色。

- a. 1X Hoechst 33342溶液的配制：按1:1000比例用PBS稀释Hoechst 33342 (1000X)，例如取1 $\mu$ l Hoechst 33342 (1000X)加入1ml PBS中，混匀，即得1ml 1X Hoechst 33342溶液。
- b. 接步骤5g，吸除洗涤液后，每孔加1X Hoechst 33342溶液1ml，室温避光孵育10分钟。
- c. 吸除1X Hoechst 33342溶液。
- d. 用洗涤液洗涤3次，每次3-5分钟。
- e. 随后即可进行荧光检测。Hoechst 33342为蓝色荧光，最大激发波长为346nm，最大发射波长为460nm。

## 7. 流式细胞仪检测

对于经步骤5或6获得的细胞悬液样品进行流式检测。如果使用传统的流体动力学聚焦的流式细胞仪来测量总RNA含量，请在检测过程中使用低流速，实验中的每个样品应使用相同的收集速率和细胞浓度。EU标记产生的荧光信号一般使用对数刻度的横坐标。Azide 647的最大激发波长是650nm，最大发射波长是670nm。

**注1：**建议使用未经EU标记的细胞样品作为流式细胞仪检测的阴性对照，并选择合适的电压。

**注2：**由于流式细胞仪检测比较灵敏，可根据细胞类型和实际染色情况对Azide 647的使用量进行适当调整。

## 参考文献：

1. Jao CY, Salic A. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008. 105(41):15779-84.

## 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0071S/L	BeyoClick™ EdU-488细胞增殖检测试剂盒	50-500/200-2000次
C0075S/L	BeyoClick™ EdU-555细胞增殖检测试剂盒	50-500/200-2000次
C0078S/L	BeyoClick™ EdU-594细胞增殖检测试剂盒	50-500/200-2000次
C0081S/L	BeyoClick™ EdU-647细胞增殖检测试剂盒	50-500/200-2000次
C0085S/L	BeyoClick™ EdU细胞增殖检测试剂盒(DAB法)	50-500/200-2000次
C0088S/L	BeyoClick™ EdU细胞增殖检测试剂盒(TMB法)	50-500/200-2000次
R0301S/L	BeyoClick™ EU-488 RNA合成检测试剂盒	50-500/200-2000次
R0305S/L	BeyoClick™ EU-555 RNA合成检测试剂盒	50-500/200-2000次
R0309S/L	BeyoClick™ EU-594 RNA合成检测试剂盒	50-500/200-2000次
R0311S/L	BeyoClick™ EU-647 RNA合成检测试剂盒	50-500/200-2000次
P1202S/L	BeyoClick™ HPG-488蛋白合成检测试剂盒	50-500/200-2000次
P1206S/L	BeyoClick™ HPG-555蛋白合成检测试剂盒	50-500/200-2000次
P1209S/L	BeyoClick™ HPG-594蛋白合成检测试剂盒	50-500/200-2000次
P1213S/L	BeyoClick™ HPG-647蛋白合成检测试剂盒	50-500/200-2000次
P1217S/L	BeyoClick™ HPG蛋白合成检测试剂盒(DAB法)	50-500/200-2000次
P1221S/L	BeyoClick™ HPG蛋白合成检测试剂盒(TMB法)	50-500/200-2000次
P1215S/L	BeyoClick™ HPG蛋白合成检测试剂盒(WB法)	50/200次
ST067-50mg/250mg/1g	EdU	50mg/250mg/1g
ST2055-50mg/250mg/1g	5-Ethynyl Uridine (EU) (≥98%, BioReagent)	50mg/250mg/1g
ST2057-5mg/25mg/100mg	L-Homopropargylglycine (HPG) (≥98%, BioReagent)	5mg/25mg/100mg

Version. 2023.06.07