

EdU-594 - выявление синтеза ДНК

Артикулы Servicebio: G1603

ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО / ПОДГОТОВКА И РАБОЧИЕ УСЛОВИЯ

Что подготовить

Подготовьте флуоресцентный микроскоп или цитометр с подходящими каналами, клеточную культуру и реагенты фиксации и пермеабилзации по инструкции. Запишите точный интервал контакта клеток с EdU. Проверьте совместимость других флуоресцентных меток с выбранной процедурой; одинаковое название метода не гарантирует одинаковой совместимости всех наборов.

ОСНОВНЫЕ УСЛОВИЯ ПО ИНСТРУКЦИИ SERVICEBIO

Для какой задачи

Флуоресцентное выявление включения EdU в новосинтезированную ДНК. Позволяет изучать пролиферацию на уровне отдельных клеток; предусмотрены протоколы для культур и тканей.

Ключевые условия для культуры

Для клеточной культуры: стартовая концентрация EdU - 10 мкМ; ориентир для быстрорастущих клеток - около 2 ч. Затем: фиксация 15 мин, промывки, пермеабилзация 15 мин при комнатной температуре и промывки по инструкции.

Реакция метки

Компонент С: 100 мг растворяют в 1 мл ультрачистой воды. На 1 мл клеточной смеси: 935 мкл буфера, 10 мкл А, 5 мкл iF594 (В), 50 мкл приготовленного С; смешивают последовательно. На лунку 96-луночного планшета - 100 мкл. Реакция: 30 мин при комнатной температуре в темноте, затем промывки. Для тканей рецептура другая.

Регистрация и ошибки

iF594: 593/614 нм; Hoechst 33342: 346/460 нм. Предусмотрите контроль без EdU. Недостаточные промывки повышают фон; коричневый компонент С непригоден.

Хранение

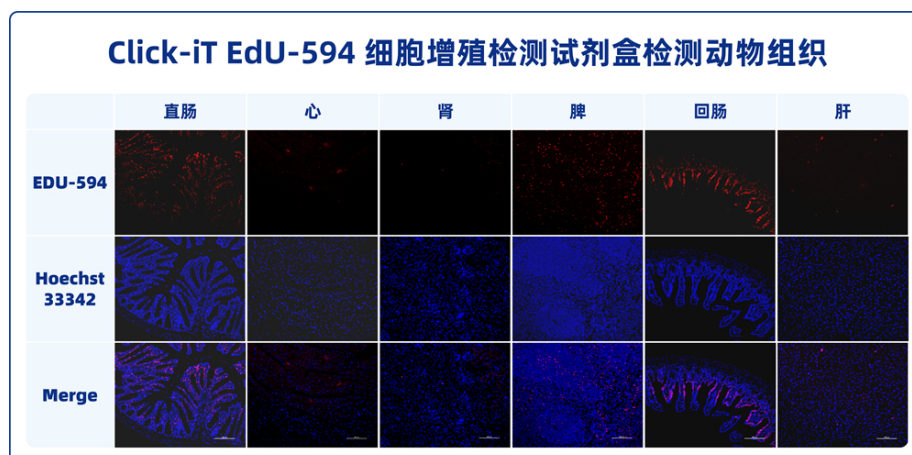
-20 °C в темноте, 12 месяцев; А и реакционный буфер допускают 4 °C.

Как спланировать постановку • рекомендации Молекулаб

Предлагаем включить контроль без EdU, прошедший остальные этапы обработки, и культуру с ожидаемым синтезом ДНК. Для сравнения групп оставьте одинаковыми длительность метки и правила анализа. Отдельно обозначьте, оцениваете ли вы долю положительных ядер или интенсивность их сигнала. Это разные показатели.

Результат и контроль качества

Пояснения к методу и практические рекомендации Молекулаб



Servicebio: EdU-594 в тканях. Красный - метка EdU, синий - ядра Hoechst 33342; нижний ряд - совмещение.

Что означает результат

EdU включается в ДНК во время её синтеза и затем выявляется химической реакцией с флуоресцентным зондом. Положительный сигнал отражает синтез ДНК в период метки, а не число завершённых делений. Более длительное мечение меняет долю клеток, успевших войти в S-фазу, поэтому результаты разных временных окон нельзя механически сопоставлять.

Какие контроли нужны

Контроль без EdU нужен для выбора порога положительного сигнала. При микроскопии можно определить долю EdU-положительных ядер среди всех корректно выделенных ядер. Алгоритм выделения объектов и порог следует сохранить для всей серии. Предлагаем отдельно проверять слипшиеся ядра и мусор, особенно при автоматическом подсчёте.

Если результат вызывает вопросы

Слабая метка в опытной группе	Сопоставьте с положительным контролем и состоянием культуры; снижение синтеза ДНК может быть реальным.
Положителен контроль без EdU	Проверьте фон, промывки и порог классификации.
Большой разброс по полям	Проверьте плотность и равномерность культуры, правила выбора полей.

Что сохранить в лабораторном журнале

Записывайте период метки, условия обработки и число проанализированных ядер. Например, 75 EdU-положительных ядер из 300 - 25% в данном временном окне; это учебный пример, а не ожидаемый результат для любой культуры.