

产品名称: EdU 细胞增殖检测试剂盒 (Fluorescein 647, 远红)

产品货号: RA20072

基本信息

中文名称	EdU 细胞增殖检测试剂盒 (Fluorescein 647, 远红)
英文名称	EdU Cell Proliferation Assay Kit (Fluorescein 647, Far-Red)
产品规格	20 T、100T、500 T
存储条件	-20℃, 避光保存
运输条件	冰袋运输
有效期	12 个月
激发/发射波长	650/670 nm

产品介绍

细胞增殖检测是评估细胞健康程度、遗传毒性及抗肿瘤药物效果的基础实验手段。检测细胞增殖最精确的方法是 BrdU 法, EdU 法检测试剂盒是 BrdU 法的革命性突破。EdU (5-乙炔基-2'-脱氧尿苷) 是一种嘧啶类似物, 在 DNA 合成期整合入 DNA 双链, 检测基于“点击”反应, 一种由铜催化的叠氮化合物和炔烃作用发生共价反应形成共价键。点击法的 EdU 标记增殖快速有效、易于使用, 只需多聚甲醛固定和 Triton X-100 促渗就可以使检测试剂进入细胞, 只需少量的叠氮化染料即可非常有效地标记出整合的 EdU; BrdU 方法需要 DNA 变性 (如酸变性、热变性或者用 DNase 消化) 暴露出 BrdU, 从而方便 BrdU 抗体结合。本试剂盒包含 EdU 法检测所需要的所有组分, 可以用于体外培养细胞的增殖检测。

应用范围

细胞增殖、分化、生长与发育、DNA 损伤修复、病毒复制等方面的研究。

产品特点

简单高效: 无需抗原抗体反应, 基于小分子化学反应的检测方法简单高效, 反应仅需要几分钟;

灵敏度高: 无需抗体, 检测染料仅 BrdU 抗体的 1/500, 很容易扩散, 即便是单个增殖细胞也能准确检测;

快速省时: 无需过夜, 省却了抗原抗体反应的复杂繁琐步骤, 完成整个检测周期仅需 5 小时。

产品名称: EdU 细胞增殖检测试剂盒 (Fluorescein 647, 远红)

产品货号: RA20072

产品组分

组分	2~20 T	10~100 T	50~500 T	开封后保存温度	稳定性
A. 10 mM EdU	40 μ L	200 μ L	1 mL	-20 $^{\circ}$ C	开封后不同组分按指定温度保存, 如后续保存 -20 $^{\circ}$ C 也可。
B. 647A Azide	10 μ L	50 μ L	250 μ L	-20 $^{\circ}$ C, 避光	
C. 10 $\times$ Click-iT EdU 反应缓冲液	200 μ L	1 mL	5 mL	2~8 $^{\circ}$ C	
D. CuSO ₄	100 μ L	500 μ L	2 $\times$ 1.25 mL	2~8 $^{\circ}$ C	
E. Click-iT EdU 缓冲液添加物	6 mg	30 mg	150 mg	2~8 $^{\circ}$ C	
F. Hoechst 33342	5 μ L	25 μ L	125 μ L	2~8 $^{\circ}$ C	

规格: 如果用于荧光显微镜检测, 所能使用次数为上述各个规格的最大使用次数 (针对 96 孔板培养的细胞), 如 20T 的试剂盒可检测 20 个孔的样品 (不同容器的具体用量可参考表 2); 如果用于流式检测, 所能使用次数为上述各个规格的最小使用次数, 如 20T 的试剂盒可检测 2 个样品。

自备材料

1. 耗材

96/24/12/6 孔培养板或培养皿

2. 试剂

- (1) 10 mM PBS, pH 7.2~7.6
- (2) 4% 多聚甲醛固定液 (in PBS)
- (3) 促渗试剂 (0.5% Triton X-100 in PBS)
- (4) 2 mg/mL 甘氨酸溶液 (in ddH₂O)
- (5) 3% BSA in PBS, pH 7.2~7.6
- (6) 1% BSA in PBS, pH 7.2~7.6
- (7) ddH₂O

实验步骤

1. 荧光显微镜检测方法

(1) 细胞培养

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) 药物处理

产品名称：EdU 细胞增殖检测试剂盒 (Fluorescein 647, 远红)

产品货号：RA20072

根据实验需要进行各种药物处理。

(3)EdU 标记

1)用细胞完全培养基按一定比例稀释 EdU 溶液 (组分 A) 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。预实验中, 建议设置 EdU 浓度梯度, 可参考表 3 和表 4。

2)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用 2 h 的孵育时间, 可参考表 3。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。

(4)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。

(5)EdU 检测

注：本参考步骤每个样本使用 100 μ L 的工作液, 用户可以根据自己的样本情况调整用量。

1)配置 1 $\times$ Click-iT EdU 反应缓冲液 (组分 C) : 用 ddH₂O 将组分 C 稀释 10 倍。

2)配置 5 $\times$ Click-iT EdU 缓冲液添加物 (组分 E) : 加 300 μ L 的 ddH₂O 至 30 mg 的 E 组分管中 (终浓度 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 ddH₂O 溶解, 制备成 5 $\times$ 储液备用。

3)准备 1 $\times$ Click-iT EdU 缓冲液添加物: 用 ddH₂O 稀释 5 $\times$ Click-iT EdU 缓冲液添加物至 1 $\times$, 溶液应现配现用。

4)依据表 1 准备 Click-iT 工作液。

产品名称: EdU 细胞增殖检测试剂盒 (Fluorescein 647, 远红)

产品货号: RA20072

表 1 Click-iT 工作液

反应组分	以 10 个孔的样本数为例
1 × Click-iT EdU 反应缓冲液	855 μL
CuSO ₄ (组分 D)	40 μL
647A Azide (组分 B)	5 μL
1 × Click-iT EdU 缓冲液添加物	100 μL
总体积	1 mL

5) 去除促渗剂, 每孔 100 μL 的 3% BSA 洗涤液洗涤 2 次。

6) 每孔加入 100 μL Click-iT 工作液, 均匀覆盖细胞。

7) 室温避光孵育 30 min。

8) 除去 Click-iT 工作液, 以 100 μL 3% BSA 洗涤细胞 2 次后, 去除洗涤液, 加入 100 μL PBS 保持细胞湿润。如其他无特别要求, 即可进行拍照分析。

(6) DNA 复染 (可选)

1) 用 100 μL PBS 洗涤细胞 1 次, 去除洗涤液。

2) 用 PBS 将 Hoechst 33342 (组分 F) 稀释 2000 倍。

3) 每孔加 100 μL 1 × Hoechst 33342 溶液, 室温避光孵育 15-30 min。

4) 去除 Hoechst 33342 溶液, 用 100 μL PBS 洗涤细胞 2 次。

(7) 成像及分析

建议染色完成后立即进行荧光显微镜拍照观察; 如果条件限制, 请于 4 °C 条件下避光湿润保存 3 天之内完成拍照。

2. 流式细胞仪检测方法

(1) 细胞培养

每孔 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ 个细胞接种于 6 孔板中。

(2) 药物处理

根据实验需要进行各种药物处理。

(3) EdU 标记细胞

1) 用细胞完全培养基按一定比例稀释 EdU 溶液 (组分 A) 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 μM 的初始浓度进行摸索。预实验中, 建议设置 EdU 浓度梯度, 可参考表 3 和表 4。

2) 细胞培养箱中孵育 2 h。EdU 孵育细胞的时间可以直接用作测定细胞 DNA 合成的指标, 时间点选择以及孵育的时间取决于细胞生长速率。通过短暂的 EdU 孵育进行的脉冲式标记细胞可以用于研究细胞周期动力学。

产品名称: EdU 细胞增殖检测试剂盒 (Fluorescein 647, 远红)

产品货号: RA20072

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用 2 h 的孵育时间, 可参考表 3。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 μM ; 长时间孵育 (> 24 h) 宜采用低浓度, 如: 1~10 μM ; 也可参考表 4。

(4)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 1% BSA 洗涤细胞 2 次, 在细胞固定促渗之前进行。

1)孵育完成后, 收集细胞, 每管加入 1 mL PBS 清洗细胞, 1000 rpm 离心 5 min, 吸弃上清, 以除去未掺入 DNA 的 EdU 残留。

2)每管加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定液重悬细胞。

3)室温孵育 20 min, 1000 rpm 离心 5 min, 吸弃上清。

4)每管加入 1 mL 2 mg/mL 甘氨酸孵育 5 min, 中和残留的固定液, 1000 rpm 离心 5 min, 吸弃上清, 每管加入 1 mL PBS 清洗 1 次, 1000 rpm 离心 5 min, 吸弃上清。

5)每管加入 1 mL 0.5% Triton X-100 促渗液重悬细胞, 室温孵育 10 min。

(5)EdU 检测

注: 针对 6 孔板样本可参考每孔 1 mL 的工作液来进行, 用户可以根据自己的样本情况调整用量。

1)配置 1 $\times$ Click-iT EdU 反应缓冲液: 用 ddH₂O 将组分 C 稀释 10 倍。

2)配置 5 $\times$ Click-iT EdU 缓冲液添加物 (组分 E): 加 300 μL ddH₂O 至 30 mg 的组分 E 试管中 (终浓度 100 mg/mL), 混匀至全部溶解。使用后, 剩余储液存放在 -20 $^{\circ}\text{C}$, 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 ddH₂O 溶解为 5 $\times$ 储液备用。

3)准备 1 $\times$ Click-iT EdU 缓冲液添加物: 以 ddH₂O 稀释 5 $\times$ Click-iT EdU 缓冲液添加物储液至 1 $\times$, 溶液应现配现用。

4)依据表 2 准备 Click-iT 工作液。

表 2 Click-iT 工作液

反应组分	单次反应所需加液体积
1 $\times$ Click-iT EdU 反应缓冲液	875 μL
CuSO ₄ (组分 D)	20 μL
647A Azide (组分 B)	5 μL
1 $\times$ Click-iT EdU 缓冲液添加物	100 μL
总体积	1 mL

产品名称: EdU 细胞增殖检测试剂盒 (Fluorescein 647, 远红)

产品货号: RA20072

5)1000 rpm 离 5 min, 吸弃上清, 去除促渗剂, 每管加入 1mL 的 1% BSA 洗涤液洗涤 2 次, 1000 rpm 离 5 min, 吸弃上清。

6)每管加入 1 mL Click-iT 工作液, 混匀。

7)室温避光孵育 30 min。

8)1000 rpm 离心 5 min, 吸弃染色反应液, 每管加入 1% BSA 洗涤细胞 2 次, 1000 rpm 离心 5min, 吸弃上清, 用 1 mL 1% BSA 再次重悬细胞 (重悬细胞的溶液体积可根据细胞的数量加以调整), 流式细胞仪检测。

注: 如需进行其他标志物检测可参考步骤 4。

(6)DNA 复染

1)用 100 μ L PBS 洗涤细胞 1 次, 去除洗涤液。

2)用 PBS 将 Hoechst 33342 (组分 F) 稀释 2000 倍。

3)每孔加 100 μ L 1 $\times$ Hoechst 33342 溶液, 室温避光孵育 15~30 min。

4)去除 Hoechst 33342 溶液, 用 100 μ L PBS 洗涤细胞 2 次。

(7)细胞内抗原标记 (可选)

1)加入抗体工作液, 混匀。

2)避光条件下, 以合适的温度及时间孵育抗体。

(8)流式检测及分析

1)建议染色完成后立即进行流式检测; 如果条件限制, 请避光 4 $^{\circ}$ C 湿润保存待测, 但不应超过 3 天。

2)检测的细胞数量建议尽量能达到百万级, 若细胞数量较少, 检测的细胞数量可调整为十万级起始进行实验。

对于细胞得率过少 (刚到万级) 的情况, 可能不利于做流式图, 对此可适当减少步骤 (五) 8 中的清洗次数。

表 3 EdU 培养基及染色反应液的参考使用量

试剂	96 孔板	48 孔板	24 孔板	12 孔板	6 孔板	5.5 cm 小皿
EdU 培养基	100 μ L	150 μ L	200 μ L	500 μ L	1 mL	2 mL
染色反应液	100 μ L	150 μ L	200 μ L	500 μ L	1 mL	2 mL

产品名称: EdU 细胞增殖检测试剂盒 (Fluorescein 647, 远红)

产品货号: RA20072

表 4 EdU 的参考孵育时间

细胞系	人胚胎细胞	酵母细胞	鼠成纤维细胞	人宫颈癌细胞	人胚肾细胞系	人神经细胞
细胞周期	~30 min	~3 h	~18 h	~21 h	~25 h	~5 d
孵育时间	5 min	20 min	2 h	2 h	2 h	1 d

注: 1. EdU 孵育时间取决于细胞周期, 一般为细胞周期的 1/10 至 1/5, 但大多数细胞系均可采用 2 h 孵育时间。

考虑到细胞培养基、温度、湿度、光线等其他因素的影响, 细胞周期会有所变化。

注意事项

1. 使用前请将产品瞬时离心至管底, 再进行后续实验。
2. EdU (10 mM) 首次使用时建议根据实验需要分装, -20°C 保存。
3. 本品不建议与 TUNEL 试剂盒同时检测。这是由于 EdU 的结构中有 -OH 存在, 会影响 TUNEL 的反应过程。
4. 由于铜离子会破坏肌动蛋白结构, 影响鬼笔环肽检测, 所以 Phalloidin (鬼笔环肽) 与本产品不兼容。
5. 开封后的组分保存条件请按照说明书上进行保存。
6. 荧光染料均存在淬灭问题, 实验操作时请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
7. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
8. 本产品仅限于科研, 不得用于临床诊断或治疗。