

EdU-488 细胞增殖检测试剂盒(适用于 FACS、FM)

货号: R32174

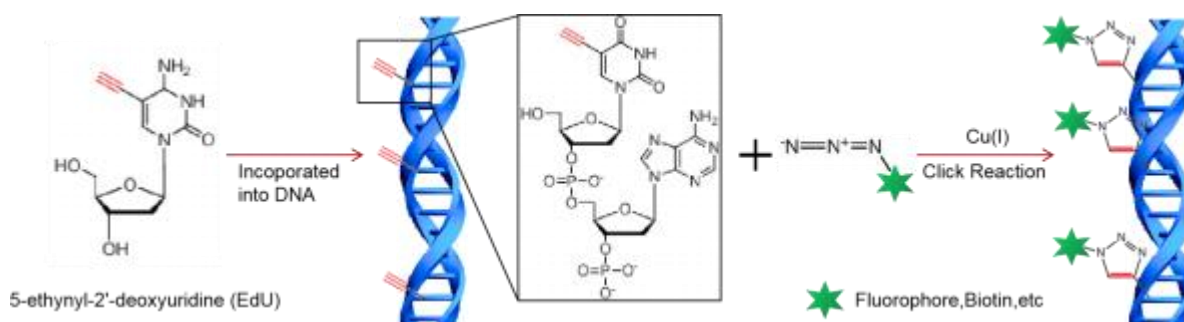
规格: 100T

产品内容:

产品组成	R32174
EdU(10mM)	200 μ l
488-Azide	55 μ l
Click-iT Reaction Buffer	30 ml
CuSO4	1.1 ml
Click-iT Additive	2 管(Add 1.3ml/tube ddH2O to dissolve)
蓝色细胞核染料(1000X)	50 μ l
说明书	1 份

产品简介:

EdU-488 细胞增殖检测试剂盒(EdU Cell Proliferation Kit with Alexa Fluor 488), 是一种利用核苷渗入法对细胞增殖情况进行快速、简单、高灵敏检测的试剂盒。其原理为: 试剂盒中的 EdU(5-ethynyl-2'-deoxyuridine)是一种胸苷(T)类似物, EdU 可以在在细胞周期的 S 期中替代胸苷掺入到新合成的 DNA 中; 另一方面, EdU 上的乙炔基能与叠氮化物(如荧光探针 Alexa Fluor 488 Azide)通过 Cu^+ 的催化发生共价反应, 形成稳定的三唑环, 该反应非常迅速, 被称作点击反应(Click reaction) (图 1)。通过点击反应, 新合成的 DNA 会被绿色荧光标记, 然后通过检测荧光信号实现细胞增殖的检测。





上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

图 1. EdU 法中的点击反应原理图。掺入到细胞 DNA 中的 EdU 与荧光探针或生物素等标记的叠氮化物，在铜离子的催化下发生共价反应，形成稳定的三唑环，使细胞 DNA 标记上荧光探针或生物素。

细胞增殖检测是评估细胞活性、遗传毒性及抗肿瘤药物效果等的基础实验手段。细胞增殖检测的方法按照原理通常可以分为五类：膜损伤检测、代谢活性检测、ATP 水平测定、DNA 合成检测和细胞荧光标记检测法。目前公认的最精确的检测细胞增殖的方法是直接检测细胞中 DNA 的合成，即核苷渗入法。以前常用的核苷渗入法是 BrdU(胸腺嘧啶核苷酸类似物)法，但 BrdU 法的缺点是需要变性 DNA 后才能与抗体结合，导致了 DNA 双链结构的破坏，影响了其他染料的结合染色，导致染色弥散，准确性降低等问题。

EdU 法作为新型的核苷渗入法具有以下优点：

- ◆ 安全-----不使用^[3H]thymidine，无放射性污染。
- ◆ 简单-----基于小分子化学反应的检测方法，简单高效，仅需三步：EdU 孵育；细胞固定；荧光检测。无需 DNA 变性和孵育抗体。
- ◆ 快速-----无需过夜，省却抗原抗体反应。整个检测过程只需 2.5 小时，大大缩短实验周期。
- ◆ 准确-----标记率高且无需 DNA 变性(酸解、热解、酶解等)，可有效避免变性带来的样品损伤，确保细胞核边缘清晰完。
- ◆ 灵敏-----无需抗体，检测染料仅为 BrdU 抗体的 1/500，更容易扩散，即使单个增殖细胞也能准确检测。
- ◆ 兼容-----对样品几乎无损伤，允许与多种抗体或荧光蛋白同时标记，能够同时检测细胞其他性状特征。

本试剂盒适用于培养的细胞或组织样品，也适用于组织切片，可以检测到细胞或组织样本中的单个增殖细胞，也可以对细胞或组织样本总体的细胞增殖情况进行定量分析。本试剂盒包含 EdU 法检测所需要的所有组份，同时提供了蓝色细胞核染料，可以用来复染所有细胞核，也可用于细胞周期分析。



使用本试剂盒所做结果可以用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪或荧光酶标仪进行检测，也可以用于高内涵筛选(High-Content Screening, HCS)。

光谱特性：488-Azide：绿色荧光，Ex/Em=491/518 nm；蓝色细胞核染料：蓝色荧光，Ex/Em=346/460nm, bound to DNA。

操作步骤：

1. 需自备试剂

- (1) 10mM PBS, pH7.2-7.6 。
- (2) 固定液-----4%多聚甲醛 in PBS。
- (3) 洗涤液-----3% BSA in PBS, pH7.2-7.6。
- (4) 通透液-----0.3~0.5% Triton X-100 in PBS。
- (5) 去离子水或超纯水。

2. 检测体系的确定

(1) 以下操作步骤是以 6 孔板或常规切片检测体系为例的，如果使用其他容器，检测体系可以相应按比例调整，具体检测时 Click 反应液的使用量请参考表 1。

(2) 以下操作步骤是以贴壁细胞或组织切片为例的，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，比如在相关步骤中增加离心步骤等。细胞数在 10-100 万的悬浮细胞可以使用 500 μ l 的检测体系，可以根据细胞数的多少相应调整检测体系。

表 1. Click 反应液的使用量参考

细胞接种容器	384 孔板	96 孔板	48 孔板	24 孔板	12 孔板	6 孔板	5.5cm 皿
Click 反应液体积	20 μ l	50 μ l	70 μ l	100 μ l	200 μ l	500 μ l	1ml

3. EdU 标记与固定、通透

3.1 对于培养细胞

(1) 将适当数量的待测细胞接种于 6 孔板中，培养过夜至恢复正常状态后，进行所需要的药物处理或者其它刺激处理。



(2) 配制 2×EdU 工作液: 用完全培养基稀释 EdU(10mM)至合适的浓度, 配成 2X 的 EdU 工作液。例如, 推荐的 EdU 工作液(1X)的终浓度为 10μM, 那么需要用完全培养液 1:500 稀释 EdU(10mM)至浓度为 20μM, 即配成 2× EdU 工作液(20μM)。

【注】EdU 的使用浓度应根据所使用的的细胞类型做相应的优化, 推荐用户以 10μM 的 EdU 初始浓度进行摸索优化, 一般的贴壁肿瘤细胞使用 10μM 就可以。细胞培养基种类、细胞类型、细胞生长密度和增殖速度等多方面因素都有可能影响 EdU 的掺入效果, 因此建议用户在预实验中设置一系列的 EdU 浓度梯度, 以确定最佳浓度。如果之前使用过 BrdU 进行实验, 则可以参考 BrdU 的终浓度作为 EdU 的终浓度。

(3) 37℃ 预热 2XEdU 工作液, 等体积加入 6 孔板中, 使 6 孔板中的 EdU 终浓度变为 1X。例如如果终浓度为 10μM, 6 孔板中每孔原来有培养基 1ml, 则将 1ml 2XEdU 工作液(20μM)加入到每孔中。如果培养基原有体积过大, 可以先吸除适量的培养基, 再加入与剩下培养基等体积的 2XEdU 工作液; 或者可以增加 EdU 的浓度并减少工作液的体积, 例如 2ml 培养液中加入 220μl 10XEdU 工作液(100μM)。

【注】更换所有的培养液可能会对细胞的增殖有影响, 因此不建议更换所有的培养液。

(4) 继续孵育细胞适当时间。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。

【注】孵育时间小于 45min 时, 建议提高 EdU 的浓度; 孵育时间大于 20h 时, 建议适当降低 EdU 的浓度。

(5) EdU 标记完成后, 去除培养基。

【注】若最后做流式检测, 样本为贴壁细胞, 则用胰酶将细胞消化下来, 收集细胞, 之后每一步去除液体的步骤都需要 500-1000×g 离心 3-5min,

(6) 加入 1ml 固定液, 室温固定 15-30min。

(7) 去除固定液, 以每孔 1ml 的洗涤液洗涤细胞 3 次, 每次 3-5min。

(8) 去除洗涤液, 加入 1ml 通透液, 室温孵育 10-15min。



(9) 去除通透液, 以每孔 1ml 的洗涤液洗涤细胞 1-2 次, 每次 3-5min。

(10) 转步骤 4。

3.2 对于组织切片样本

可以通过注射或进食等方式进行动物体内的 EdU 标记。以下是以小鼠为例的, 其它动物体内 EdU 标记条件请参考相关文献。

(1) 用 PBS 配制成一定浓度的 EdU, 对于小鼠, 可按照 10-200mg/kg 的用量进行腹腔注射、特定组织或器官局部注射或者加入饮用水。

【注】 EdU 具体用量与动物的种类、体重和使用方式有关, 可以参考相关文献, 因此建议用户在预实验中设置一系列的 EdU 浓度梯度, 以确定最佳浓度。推荐用户以 50mg/kg 的 EdU 初始浓度进行摸索优化。如果之前使用过 BrdU 进行实验, 则可以参考 BrdU 的终浓度作为 EdU 的终浓度。或者直接使用 50mg/kg 的浓度进行测试。

(2) EdU 标记 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, 取出所需组织, 按照常规步骤制作冰冻切片或石蜡切片。EdU 标记的时间也根据相关参考文献自行调整。

(3) 对于冰冻切片:

- 加入适量固定液, 室温固定 15min。
- 去除固定液, 用适量洗涤液洗涤 3 次, 每次 3-5min。
- 去除洗涤液, 加入适量通透液, 室温孵育 10-15min。
- 去除通透液, 用适量洗涤液洗涤 1-2 次, 每次 3-5min。
- 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进行抗原修复处理。

f. 转步骤 4。

(4) 对于石蜡切片:

a. 脱蜡: 二甲苯中脱蜡 5-10min。换用新鲜的二甲苯, 再脱蜡 5-10min。无水乙醇 5min, 换新的无水乙醇 3min。95%乙醇 3min。85%乙醇 3min。75%乙醇 3min。50%乙醇 3min。PBS 5min。



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进行抗原修复处理。

【注】如果使用蛋白酶 K 或胰酶进行抗原修复, 修复后须反复洗涤干净, 避免残留的酶干扰后续标记反应。

c. 转步骤 4。

4. EdU 检测

【注】本参考步骤每个样品的反应体系为 500 μ l 的 Click 反应液。用户可根据自己的样本情况适当调整。对于切片, 可以根据切片大小, 每个切片使用 100-200 μ l 的 Click 反应液, 其余步骤相同。

(1) 配制 Click-iT Additive Solution。配制后请按照每次用量适当分装, 并-20 $^{\circ}$ C 保存, 溶液一旦呈现棕色, 则说明有效成分降解不能再用。

(2) 请参考下表配制 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 Click 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。

组分	以 6 孔板为例的样品数				
	1	2	5	10	50
Click-iT Reaction Buffer	430 μ l	860 μ l	2.15ml	4.3ml	21.5ml
CuSO ₄	20 μ l	40 μ l	100 μ l	200 μ l	1ml
488-Azide	1 μ l	2 μ l	5 μ l	10 μ l	50 μ l
Click-iT Additive Solution	50 μ l	100 μ l	250 μ l	500 μ l	2.5ml
总体积	500 μ l	1ml	2.5ml	5ml	25ml

(3) 去除上一步骤中的洗涤液。每孔加入 500 μ l Click 反应液, 轻轻摇晃培养板以确保 Click 反应液可以均匀覆盖样品。

(4) 室温避光孵育 30min。

(5) 吸除 Click 反应液, 以每孔 1ml 的洗涤液洗涤细胞 3 次, 每次 3-5min。

(6) 此时增殖细胞被标记了明亮的绿色荧光。如无其它特殊要求, 即可在荧光显微镜下观察, 或者使用流式细胞仪(用 500 μ l 洗涤液重悬细胞后上机)、多功能酶标仪、高内涵筛选仪器(一般高内涵筛选需要细胞核复染)进行荧光检



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyyssw@sina.com

测分析。488-Azide 的最大激发波长是 491nm, 最大发射波长是 518nm。如果需要检测细胞增殖的比例, 可以参照步骤 5 对细胞核进行复染。

5. 细胞核染色

(1) 1X 蓝色细胞核染料溶液的配制: 用 PBS 按 1:1000 比例稀释蓝色细胞核染料(1000X)。

(2) 吸除步骤 5(5)洗涤液, 每孔加 1ml 的 1X 蓝色细胞核染料溶液, 室温避光孵育 10min。

(3) 吸除 1X 蓝色细胞核染料溶液, 以每孔 1ml 的洗涤液洗涤细胞 3 次, 每次 3-5min。

(4) 随后即可进行荧光检测。蓝色细胞核染料为蓝色荧光, 最大激发波长为 346nm, 最大发射波长为 460nm。

保存条件:

-20℃ 保存, 一年有效。488-Azide 和蓝色细胞核染料(1000X)须避光保存。

注意事项:

1. 羟基脲(Hydroxyurea)为 DNA 合成抑制剂, 经过 10mM 羟基脲提前 30min 处理的细胞, 绿色荧光阳性的细胞几乎完全消失, 因此常被用作 EdU 实验的阴性对照。

2. 配制好的 Click-iT Additive Solution 请根据每次用量适当分装后-20℃ 保存, 避免反复冻融。Click-iT Additive Solution 融化后有白色物质析出为正常现象, 请上下颠倒几次, 待全部溶解后使用。溶液一旦呈现棕色, 则说明有效成分降解, 不能再使用。

3. 皂苷促渗液可以用于全血及含红细胞的细胞悬液, 以及其他含多种细胞类型的混合细胞悬液的通透。这种促渗液可以在裂解红细胞的同时, 维持白细胞的光散射特性。

4. 本试剂盒做动物实验时可能需要更多的 EdU, 请根据实验需求用合适稀释液稀释后使用。

5. 由于本产品涉及到铜离子催化进行点击反应, 请注意以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



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

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 GFP、TC-FlAsH™和 TC-ReAsH™类试剂, 需要在点击反应前进行反应和检测。Phalloidin (鬼笔环肽)不兼容点击反应, 在检测细胞微管时请选用其它探针。

6. 如需在传统流式仪上进行总 DNA 含量的检测, 可采取低流速检测。DNA 含量检测所用荧光检测信号应与 DNA 含量成线性关系。EdU 标记信号呈现对数放大可以很好的被检测到。

7. 为了您的安全和健康, 操作时请穿着实验服并佩戴一次性手套。

