



kFluor647-EdU法细胞增殖检测试剂盒（成像）

货号: R41180-100T

储存条件: -20℃, 12个月

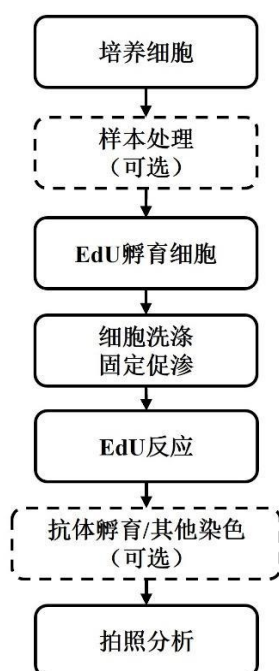
产品简介:

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。直接测定 DNA 的合成是检测细胞增殖最精确的方法之一，传统使用 BrdU 方法测定 DNA 的合成。BrdU 方法测定 DNA 合成需要 DNA 变性（如酸变性、热变性或者用 DNase 消化）去暴露 BrdU，从而方便 BrdU 抗体结合。

EdU（5-ethynyl-2'-deoxyuridine, 5-溴-2-脱氧尿嘧啶）则是一种嘧啶类似物，可以在 DNA 合成期整合入 DNA 双链。EdU 检测法是基于一种由铜催化的叠氮化合物和炔烃的原子共价反应，即“点击反应”。EdU 标记增殖快速有效，易于使用，只需少量的叠氮化染料即可非常有效地标记出整合的 EdU，是 BrdU 方法的革命性突破。

EdU 法细胞增殖检测试剂盒中，EdU 试剂含有炔烃，同时 kFluor647 染料试剂含有叠氮化合物。从而达到便捷、高效、灵敏检测到增殖细胞的效果。

EdU 成像检测工作流程





产品组成:

组分	R41180-100T	储存条件
组份 A: 10 mM EdU	0.2 mL	-20℃
组份 B: kFluor647-azide	20 μ L	-20℃, 避光
组份 C: CuSO ₄	0.5 mL	2-8℃
组分 D: Click-iT EdU 缓冲液添加物	30 mg	2-8℃
组份 E: 10× Click-iT EdU 反应缓冲液	1 mL	2-8℃
组份 F: Hoechst33342	10 μ L	2-8℃

注 1: 针对 96 孔板培养的细胞, R41180-100T 可以提供至少 100 个孔反应的量。不同器皿培养的细胞所对应的具体反应体系用量可参考表 1。

注 2: kFluor647-azide: Ex/Em=650/668 nm; Hoechst 33342: Ex/Em=350/461 nm, bound to DNA。

表 1 EdU 培养基及染色反应液的使用量参考

	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

试剂盒以外自备仪器和试剂

4% (w/v) 多聚甲醛固定液

1.5 mL Microtube

PBS

0.25% (w/v) 胰酶溶液

0.5% (v/v) TritonX-100 in PBS

3% (w/v) BSA in PBS, pH7.4

去离子水、荧光显微镜

注意事项



1.组分 B: kFlour647-azide , 应-20℃ 避光保存。按说明书指定方法稳定保存可有效放置一年。

2.如果用于动物实验需要更多 EdU。

3.此试剂盒适用荧光光谱为: kFluor647-azide: Ex/Em= 650/668 nm; Hoechst 33342: Ex/Em=350/461 nm, bound to DNA。

4. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

操作步骤

1. 用 EdU 标记细胞

1.1以每孔 4×10^3 - 1×10^4 细胞接种于 96 孔板中, 进行药物处理或者其他刺激处理。

1.2准备一份 EdU 工作液(组份 A): 以完全培养基稀释 10 mM 的储液至合适的工作浓度用培养基配置 Edu 工作液, 具体浓度可参考表2

1.3加入 EdU 工作液和细胞进行孵育, 将 EdU 整合入细胞内(根据细胞生长特性, 可适当改变温度, 降低细胞生长速率, 有利于 EdU 整合入细胞)。阴性对照组不用EdU 处理。

注 1: EdU 的标记浓度应根据所用的细胞类型做相应的优化选择。预实验中, 我们推荐客户以 50 μ M 的 EdU 初始浓度设置一系列的 EdU 浓度梯度, 以确定最佳的合适您的细胞的实验浓度。

注 2: 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; EdU 孵育细胞的时间可以直接用做测定细胞 DNA 合成的指标, 时间点选择以及孵育时间的长度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。(EdU 孵育浓度及时间的选择可参考附录 表 2. 细胞实验 EdU 孵育浓度及时间参考)

表 2. 细胞实验 EdU 孵育浓度及时间参考

Cell line	Concentration	Time	Reference
-----------	---------------	------	-----------



NIH3T3, Hela	10 nM-10 μ M	1 h	Salic A, et al. PNAS. 2008
HL-60, A2780, U2OS	1-10 μ M	30 min	Cappella P, et al. Cytometry A. 2008
Neurospheres	1-20 μ M	24 h	Chehrehasa F, et al. J Neurosci Methods. 2009
Primary fibroblasts	10 μ M	1, 2, 4 h	Limsirichaikul S, et al. Nucleic Acids Res. 2009
Chick embryos	10 μ M-2 mM	4 h	Warren M, et al. Dev Dyn. 2009
Spleen cells	50 μ M	24 h	Yu Y, et al. J Immunol Methods. 2009
Human ES cells	10 μ M	30 min	Momcilović O, et al. Stem Cells. 2009
emb-30	1 μ M	12 h	Cinquin O, et al. PNAS. 2010
VSMC	50 μ M	2 h	Han W, et al. Life Sci. 2009
ESC	50 μ M	2 h	Huang C, et al. J Genet Genomics. 2010
fission yeast strains	10 μ M	3 h	Hua H, et al. Nucleic Acids Res. 2011
EJ cells	50 μ M	4 h	Lv L, et al. Mol Cell Biochem. 2011
GC cells	50 μ M	2 h	Yang S, et al. Biol Reprod. 2011
U2OS, HT29	30 μ M	90 min	Zhang YW, et al. Nucleic Acids Res. 2011
HIT-T15	50 μ M	4 h	Guo T, et al. PloS One. 2011
MCF-10A	25 μ M	2 h	Zeng T, et al. PloS One. 2011
C3H10T1/2	10 μ M	24 h	Ding D, et al. Int Orthop. 2011
EPC	50 μ M	4 h	Zeng W, et al. Biomaterials. 2011
SGC7901	25 μ M	24 h	Xue Z, et al. J Cell Biochem. 2011
MSC	50 μ M	2 h	Peng F, et al. Lasers Med Sci. 2011
HCC	50 μ M	2 h	Li D, et al. J Biol Chem. 2011

2. 细胞固定与促渗

2.1 孵育完成后，去除培养基，加入 50 μ L 4% 中性多聚甲醛至各个孔的玻璃片上，室温孵育 15-30 min 后，去除固定液。

2.2 以每孔 0.1 mL 3% BSA 在 PBS 的洗涤液洗涤细胞 2 次。

2.3 去除洗涤液，加入 0.1 mL 含 0.5% Triton X-100 的 PBS 到每个孔中，室温孵育 20 min。

注意：本参考步骤是针对以 4% 中性多聚甲醛固定且以 0.5% Triton X-100 促渗操作样本而优化的操作方法。本参考所介绍的步骤同样可用于其他类似操作的样本，如以甲醇固定以皂苷固定的样本等。



3. EdU 检测

3.1 准备 1× Click-iT EdU 反应缓冲液（组份 E）：转移 10×组份 E 试剂以去离子水稀释 10 倍。

3.2 制备 5×的 Click-iT EdU 缓冲液添加物储液（组份 D）：加 0.3 mL 去离子水至含 30 mg 的 D 组份试管中，混匀至全部溶解。使用后，剩余储液存放在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ，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。

3.3 准备 1×Click-iT EdU 缓冲液添加物（见表 3）：以去离子水稀释 5×储液至 1×, 溶液应新鲜配制，当天用完。

3.4 根据表 3，15 min 内制备 Click-iT 反应混合物。

表 3 Click-iT 反应混合物

反应组份	Click-iT 反应混合物
1× Click-iT 反应缓冲液（组份 E 在步骤 3.1 所准备）	860 μL
CuSO ₄ (组份 C)	40 μL
kFluor647-azide (组份 B)	1.6 μL
1× Click-iT EdU 缓冲液添加物(组份 D 在步骤 3.3 所准备)	100 μL
总体积	1 mL

注：对于 96 孔板，可参考每个反应需要 100 μL 的反应混合物来进行。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。

3.5 去除促渗液，每孔用 100 μL 含 3% BSA 的 PBS 洗涤液洗涤 2 次后，去除洗涤液。

3.6 每孔加入 100 μL Click-iT 反应混合物，摇晃培养板以确保反应混合物均匀覆盖细胞。

3.7 室温避光孵育 30 min。

3.8 除去反应混合物，每孔用 100 μL 含 3% BSA 的 PBS 洗涤 2 次后，去除洗涤液。

4. DNA 复染（可选步骤）

4.1 每孔用 100 μ L PBS 洗涤 1 次后，去掉洗涤液。

4.2 1 $\times$ Hoechst33342 溶液制备：用 PBS 1:2000 稀释 Hoechst33342（组份 F），终浓度为 5 μ g/mL。

4.3 每孔加 100 μ L 1 $\times$ Hoechst33342 溶液，室温避光孵育 15-30 min 后。除去 Hoechst33342 溶液。

4.4 每孔用 100 μ L PBS 洗涤 2 次后，去除洗涤液

5. 成像及分析

EdU 标记产生的荧光信号一般使用对数刻度的横坐标。EdU 检测 kFluor647，使用 647 nm 激发器（650/668 nm）检测。

表4 荧光发射光谱

Fluorophore	Excitation (nm)	Emission (nm)
kFluor647	650	668
Hoechst 33342, bound to DNA	350	461

实验范例

Edu（50 μ M）孵育人宫颈癌 HeLa 细胞 2 h 后，使用 kFluor647-EdU 法细胞增殖检测试剂盒检测 HeLa 细胞增殖情况，经荧光显微镜检测结果见图 1。

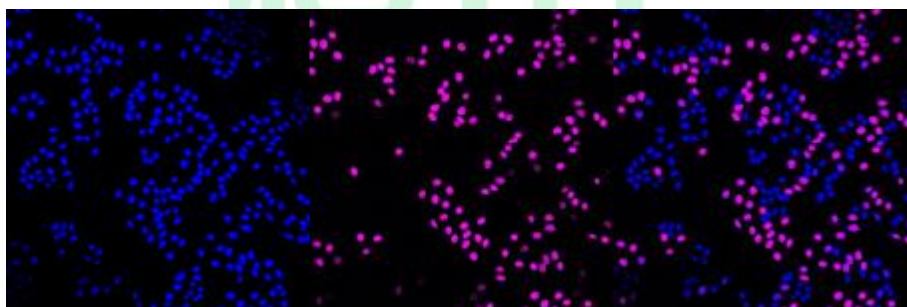


图 1. HeLa 细胞用本试剂盒染色后荧光显微镜检测细胞增殖的效果图。HeLa 细胞经 Edu（50 μ M）孵育 2 h 后，用本试剂盒染色，然后用荧光显微镜进行细胞的增殖检测。图中蓝色荧光为细胞核，紫色荧光为 Edu 标记的增殖细胞，合图可观察整体细胞的增殖情况。