



EdU细胞增殖检测试剂盒 (AF488)

货号: R46066

储存条件: -20℃, 避光

有效期: 12个月

产品简介:

细胞增殖检测广泛应用于细胞活性、遗传毒性及抗肿瘤药物效果的评价中, 直接检测细胞中的 DNA 合成被认为是最精确的检测细胞增殖的方法。EdU(5-ethynyl-2'-deoxyuridine), 中文名为 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷, 是一种新型胸苷(胸腺嘧啶脱氧核苷, thymidine)类似物, EdU 可以在 DNA 合成过程中替代胸苷掺入到新合成的 DNA 中。EdU 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, 被称作点击反应(Click reaction)。通过点击反应, 新合成的 DNA 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增殖的细胞。

产品组分

R46066	Component	50 T	100 T	200 T	Storage conditions	Quantity Per Test
R46066A	EdU(10 mM)	100 μ L	200 μ L	400 μ L	-20°C.Store in the dark.	2 μ L per 1.0-2.0x10 ⁶ cells
R46066B	AF488 azide	100 μ L	200 μ L	400 μ L	-20°C.Store in the dark.	2 μ L per 1.0-2.0x10 ⁶ cells
R46066C	Click Reaction Buffer	13 mL	26 mL	52 mL	-20°C.Store in the dark.	243 μ L per 1.0-2.0x10 ⁶ cells
R46066D	CuSO ₄	250 μ L	500 μ L	1000 μ L	-20°C.	5 μ L per 1.0-2.0x10 ⁶ cells
R46066E	Click Additive	248 mg	496 mg	992 mg	-20°C.Store in the dark.	250 μ L per 1.0-2.0x10 ⁶ cells
R46066F	DAPI Staining Solution (1000 $\times$)	25 μ L	50 μ L	100 μ L	-20°C.Store in the dark.	0.5 μ L per 1.0-2.0x10 ⁶ cells

注: 每个 Test 推荐的细胞数量为 1.0-2.0x10⁶ cells, 可根据实验样本情况调整 Click 反应液的用量

使用方法



1. 准备工作

(1) Click Additive Solution 的配制: 对于 50T 规格的试剂盒, 取 12.5 mL 预冷的去离子水加入到管中, 混匀至全部溶解, 即为 Click Additive Solution; 对于 100T 规格的试剂盒, 取 25mL 预冷的去离子水加入到管中, 混匀至全部溶解, 即为 Click Additive Solution; 对于 200T规格的试剂盒, 取 50 mL 预冷的去离子水加入到管中, 混匀至全部溶解, 即为 Click Additive Solution。配制后适量分装, 并于-20°C 保存。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, 说明该组分已失效, 请弃用。

(2) Click Reaction Buffer 首次溶解后, 根据每次样本数量适量分装, 并于-20°C 保存;

2. EdU 标记细胞

推荐 EdU 终浓度为 10 μ M(1 $\times$)。用细胞培养液 1:500 稀释 EdU(10mM)即可得到 2 $\times$ EdU工作液(20 μ M)。将 37°C预热的 2 $\times$ EdU 工作液(20 μ M)与等体积细胞悬液混合使 EdU 终浓度变为 1 $\times$ 。37°C培养箱培养 2 小时。细胞培养基, 细胞生长密度及细胞类型和其他实验条件都有可能影响细胞的标记效果, 因此 EdU 的标记浓度和标记时间应根据所用的细胞类型做相应的优化选择。

3. 固定与通透

- (1) 收集细胞, 300 $\times$ g 离心 5 min, 用含 2% FBS 的 PBS 溶液清洗细胞 2 次。
- (2) 用 4%多聚甲醛溶液固定细胞, 充分混匀后室温避光孵育 15 min。
- (3) 收集细胞, 300 $\times$ g 离心 5 min, 清洗细胞 2 次。
- (4) 加入含 0.1% Triton X-100 的 PBS 溶液重悬细胞, 混匀后室温孵育 15 min。
- (5) 300 $\times$ g 离心 5 min, 清洗细胞 2 次。

4. 荧光标记

- (1) 本说明书按照每 2 $\times$ 10

6细胞 500 μ L 的反应体系。可根据实验样本情况调整 Click 反应液的用量。

- (2) 300 $\times$ g 离心 5 min, 收集细胞, 每孔加入 500 μ L 的 Click 反应液, 混匀后室温避光孵育30 min。



(3) 反应结束后, 用含 2% FBS 的 PBS 清洗细胞 2 次。

(4) 用含 2% FBS 的 PBS 将 DAPI Staining Solution (1000×) 稀释成 1×, 每个样加 250 μL, 室温孵育 5 min。

(5) 最后再补加 250 μL 含 2% FBS 的 PBS 溶液混匀, 上机检测。

Component	Number of samples						
	1	2	4	5	10	25	50
Click Reaction Buffer	243 μL	486 μL	972 μL	1215 μL	2430 μL	6075 μL	12150 μL
CuSO ₄	5 μL	10 μL	20 μL	25 μL	50 μL	125 μL	250 μL
Azide 488	2 μL	4 μL	8 μL	10 μL	20 μL	50 μL	100 μL
Click Additive Solution	250 μL	500 μL	1000 μL	1250 μL	2500 μL	6250 μL	12500 μL
Total volume	500 μL	1000 μL	2000 μL	2500 μL	5000 μL	12500 μL	25000 μL

注意事项

1. 请严格按照上表中组分顺序和体积配制 Click 反应液, 否则会影响后续实验。
2. Click 反应液需在配制后 15 min 内使用。
3. 为避免荧光淬灭, 请尽快检测。