

AF594-EdU 通用款细胞增殖检测试剂盒

(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

-20℃避光保存, 有效期见外包装。

产品编号	产品名称	产品规格
YFXCA08	AF594-EdU 通用款细胞增殖检测试剂盒	10-100T/ 50-500T

产品组分

组分	10-100T	50-500T	开封后储存条件
10mM EdU	200μL	1mL	-20℃
AF594 Azide	50μL	250μL	-20℃, 避光
10× Click-iT EdU 反应缓冲液	1mL	5mL	2-8℃
CuSO ₄	500μL	2×1.25mL	2-8℃
Click-iT EdU 反应缓冲液添加物	30mg	150mg	-20℃
Hoechst 33342	25μL	125μL	2-8℃, 避光

一、产品说明

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。

本试剂盒可以应用于细胞增殖、分化、生长与发育、DNA 损伤修复、病毒复制等方面的研究。

二、自备材料

96/24/12/6 孔培养板或培养皿, 10mM PBS (pH7.2-7.6), 4%多聚甲醛固定液 (in PBS), 促渗试剂 (0.5% Triton X-100 in PBS), 2mg/mL 甘氨酸溶液 (in ddH₂O), 3% BSA in PBS (pH7.2-7.6), 1% BSA in PBS (pH7.2-7.6), ddH₂O。

三、操作步骤

1、荧光显微镜检测方法:

- 1) 细胞培养: 取对数生长期的细胞, 以每孔 4×10^3 - 1×10^5 细胞 (可根据细胞大小、生长速度、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: 根据实验要求进行各种药物处理。
- 3) EdU 标记
 - A. 用细胞完全培养基按照一定的比例稀释 EdU 溶液至合适浓度后, 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)。

B. 细胞培养箱中孵育 2h。

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 2h 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 (<2h) 宜采用高浓度 (如 10-50 μ M); 长时间孵育 (>24h) 宜采用低浓度 (如 1-10 μ M); 也可参考表 5。

4) 细胞固定及促渗

注: 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 的洗涤液洗涤细胞 2 次, 在细胞固定促渗之前进行。

A. 孵育结束后, 去除培养基, 以 1 \times PBS 洗涤细胞 2 次, 每次 5min, 以去除未渗入 DNA 的 EdU 残留, 贴壁不牢的细胞可降低洗涤强度。加入 50 μ L 4%多聚甲醛固定液, 室温孵育 20min 后, 去除固定液。

B. 每孔加入 50 μ L 2mg/mL 甘氨酸溶液, 室温孵育 5min, 中和残留的固定液。

C. 每孔加入 100 μ L 3% BSA 洗涤细胞 2 次。

D. 去除洗涤液, 加入 100 μ L Triton x-100, 室温孵育 10min。

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。

A. 用 ddH₂O 把 10 \times Click-iT EdU 反应缓冲液稀释成 1 \times Click-iT EdU 反应缓冲液。

B. 配置 5 \times Click-iT EdU 反应缓冲液添加物:向 30mg 的 Click-iT EdU 反应缓冲液添加物中加入 300 μ L ddH₂O (终浓度 100mg/mL), 混匀至全部溶解 (5 \times Click-iT EdU 反应缓冲液添加物适当分装后, -20 $^{\circ}$ C 保存。如果溶解后有白色物质析出, 请上下颠倒多次至全部溶解后使用。如果该溶液颜色变为棕色, 说明该组分有效成分已失效, 需弃用)。

注: 不同规格的 Click-iT EdU 反应缓冲液添加物, 按照此比例制备成 5 \times 储备液待用。

C. 用 dH₂O 将 5 \times Click-iT EdU 反应缓冲液添加物稀释至 1 \times 工作液, 现用现配。

D. 根据表 1 准备 Click-iT 工作液 (工作液需在配置后 15min 内使用)

表 1 Click-iT 工作液

反应组分	以 10 个孔的样本数量为例
1 \times Click-iT EdU 反应缓冲液	855 μ L
CuSO ₄	40 μ L
AF594 Azide	5 μ L
1 \times Click-iT EdU 反应缓冲液添加物	100 μ L
总体积	1mL

E. 去除促渗剂, 每孔加入 100 μ L 的 3% BSA 洗涤液洗涤 2 次。

F. 每孔加入 100 μ L Click-iT 工作液, 均匀覆盖细胞, 室温避光孵育 30min。

G. 除去 Click-iT 工作液, 以 100 μ L 的 3% BSA 洗涤液洗涤 2 次后, 去除洗涤液, 加入 100 μ L 的 PBS 保持细胞湿润。如无其他特别要求, 即可进行拍照分析。

6) DNA 复染 (可选)

A. 用 100 μ L PBS 洗涤细胞 1 次, 去除洗涤液。

B. 用 PBS 将 Hoechst 33342 稀释 2000 倍。

C. 每孔加入 100 μ L 1 \times Hoechst 33342 工作液, 室温避光孵育 15-30min。

7) 成像分析

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 $^{\circ}$ C 条件下避光湿润保

存, 3 天内完成拍照分析。

2、流式细胞仪检测方法:

1) 细胞培养: 每孔 1×10^5 - 3×10^6 细胞接种于 6 孔板中。

2) 药物处理: 根据实验要求进行各种药物处理。

3) EdU 标记

A. 用细胞完全培养基按照一定的比例稀释 EdU 溶液至合适浓度后, 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 $10 \mu\text{M}$ 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)。

B. 细胞培养箱中孵育 2h。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。

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 2h 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 (<2h) 宜采用高浓度 (如 10 - $50 \mu\text{M}$) ; 长时间孵育 (>24h) 宜采用低浓度 (如 1 - $10 \mu\text{M}$) ; 也可参考表 5。

4) 细胞固定及促渗

注: 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 的洗涤液洗涤细胞 2 次, 在细胞固定促渗之前进行。

A. 孵育结束后, 收集细胞, 每管加入 1mL PBS 清洗细胞, 1000rpm 离心 5min, 吸弃上清液, 以除去未渗入 DNA 的 EdU 残留。

B. 每管加入 1mL 4%多聚甲醛固定液重悬细胞。

C. 室温孵育 20min, 1000rpm 离心 5min, 吸弃上清。

D. 每管加入 1mL 2mg/mL 的甘氨酸溶液孵育 5min, 中和残留的固定液, 1000rpm 离心 5min, 吸弃上清, 每管加入 1mL PBS 清洗 1 次, 1000rpm 离心 5min, 吸弃上清。

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

5) EdU 检测

注: 针对 6 孔板可参考 1mL 工作液进行, 用户可以根据自己的样本情况调整用量。

A. 用 ddH₂O 把 $10 \times$ Click-iT EdU 反应缓冲液稀释成 $1 \times$ Click-iT EdU 反应缓冲液。

B. 配置 $5 \times$ Click-iT EdU 反应缓冲液添加物: 向 30mg 的 Click-iT EdU 反应缓冲液添加物中加入 300 μL ddH₂O (终浓度 100mg/mL), 混匀至全部溶解 ($5 \times$ Click-iT EdU 反应缓冲液添加物适当分装后, -20°C 保存。如果溶解后有白色物质析出, 请上下颠倒多次至全部溶解后使用。如果该溶液颜色变为棕色, 说明该组分有效成分已失效, 需弃用)。

注: 不同规格的 Click-iT EdU 反应缓冲液添加物, 按照此比例制备成 $5 \times$ 储备液待用。

C. 用 dH₂O 将 $5 \times$ Click-iT EdU 反应缓冲液添加物稀释至 $1 \times$ 工作液, 现用现配。

D. 根据表 2 准备 Click-iT 工作液 (**工作液需在配置后 15min 内使用**)

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	20 μL
AF594 Azide	5 μL
$1 \times$ Click-iT EdU 反应缓冲液添加物	100 μL
总体积	1mL

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

F. 每管加入 1mL Click-iT 工作液, 混匀, 室温避光孵育 30min。

G. 1000rpm 离心 5min, 吸弃染色反应液, 每管加入 1% BSA 洗涤液洗涤 2 次, 1000rpm 离心 5min, 吸弃上清, 用 1mL 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), 流式细胞仪进行检测。

注: 如果进行其他标志物检测, 可参考步骤 4.

6) DNA 复染 (可选)

A. 用 100 μ L PBS 洗涤细胞 1 次, 去除洗涤液。

B. 用 PBS 将 Hoechst 33342 稀释 2000 倍。

C. 每孔加入 100 μ L 1 \times Hoechst 33342 工作液, 室温避光孵育 15-30min。

D. 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)

A. 加入抗体工作液, 混匀。

B. 避光条件下, 以合适的温度及时间孵育抗体。

8) 流式细胞检测及分析

A. 建议染色完成后立即进行流式检测; 如果条件限制, 请于 4 $^{\circ}$ C 条件下避光湿润保存, 3 天内完成检测分析。

B. 检测的细胞数量建议尽量达到百万级, 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 5) G 中的清洗次数。

3、结果展示:

1) 左: 使用 EdU 对增殖的 HeLa 细胞进行细胞增殖分析。

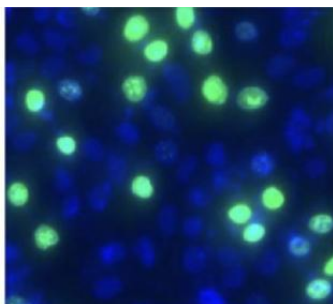
用 EdU 孵育 HeLa 细胞 2h, 然后固定, 促渗并用 AF 叠氮化物和 Hoechst 33342 染色。结果是根据 HeLa 细胞的光散射特征通过荧光显微镜拍照得出。

2) 中: 使用 EdU 对增殖的 HeLa 细胞进行细胞周期分析。

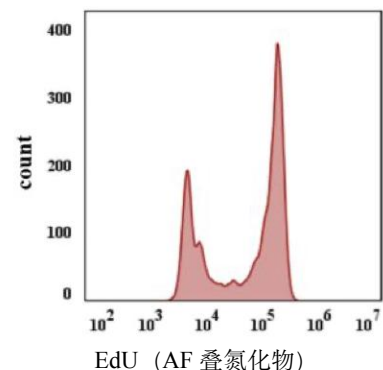
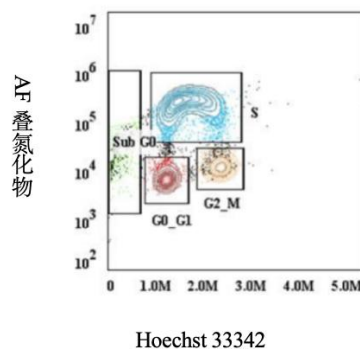
用 EdU 孵育 HeLa 细胞 2h, 然后固定, 促渗并用 AF 叠氮化物和 Hoechst 33342 染色。细胞周期的不同区段可通过 DNA 含量和 EdU 结合。结果是根据 HeLa 细胞的光散射特征通过流式细胞仪画门分析得出。

3) 右: 使用 EdU 对增殖的 HeLa 细胞进行细胞增殖分析。

用 EdU 孵育 HeLa 细胞 2h, 然后固定, 促渗并用 AF 叠氮化物染色。结果是根据 HeLa 细胞的光散射特征通过流式细胞仪画门分析得出。



EdU (AF 叠氮化物)



四、附录

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	5.5cm 小皿
EdU 培养基	100 μ L	150 μ L	200 μ L	500 μ L	1mL	2mL
染色反应液	100 μ L	150 μ L	200 μ L	500 μ L	1mL	2mL

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	约 30min	约 3h	约 18h	约 21h	约 25h	约 5d
孵育时间	5min	20min	2h	2h	2h	1d

表 5 文献中 EdU 的孵育浓度及时间

PubMed ID	Reference	Cell Line	Concentration	Time
18272492	Salic A, <i>et al.</i> PNAS.2008	NIH3T3, HeLa	10 nM~10 μ M	1 h
18521918	Cappella P, <i>et al.</i> Cytometry A.2008	HL-60, A2780, U2OS	1~10 μ M	0.5 h
18996411	Chehehasa F, <i>et al.</i> Neurosci Methods.2009	Neurospheres	1~20 μ M	24 h
19179371	Limsirichaikul S, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res.2009	Primary fibroblasts	10 μ M	1, 2, 4 h
19253396	Warren M, <i>et al.</i> Dev Dyn.2009	Chick embryos	10 μ M~2 mM	4 h
19647746	Yu Y, <i>et al.</i> J Immunol Methods.2009	Spleen cells	50 μ M	24 h
19544417	Momcilovic O, <i>et al.</i> Stem Cells.2009	Human ES cells	10 μ M	0.5 h
20080700	Cinquin O, <i>et al.</i> PNAS.2010	emb-30	1 μ M	12 h
20025889	Han W, <i>et al.</i> Life Sci.2009	VSMC	50 μ M	2 h
20659708	Huang C, <i>et al.</i> J Genet Genomics.2010	ESC	50 μ M	2 h

21310713	Hua H, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res.2011	Fission yeaststrains	10 μ M	3 h
20824490	Lv L, <i>et al.</i> Mol Cell Biochem.2011	EJ cells	50 μ M	4 h
21248284	Yang S, <i>et al.</i> Biol Reprod.2011	GC cells	50 μ M	2 h
21227924	Zhang YW, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res.2011	U2OS, HT29	30 μ M	1.5 h
21829621	Guo T, <i>et al.</i> PloS One. 2011	HIT-T15	50 μ M	4 h
21980430	Zeng T, <i>et al.</i> PloS One. 2011	MCF-10A	25 μ M	2 h
22012572	Ding D, <i>et al.</i> Int Orthop.2011	C3H10T1/2	10 μ M	24 h
22000787	Zeng W, <i>et al.</i> Biomaterials.2011	EPC	50 μ M	4 h
21913215	Xue Z, <i>et al.</i> J Cell Biochem.2011	SGC7901	25 μ M	24 h
22016038	Peng F, <i>et al.</i> Lasera Med Sci.2011	MSC	50 μ M	2 h
21878637	Li D, <i>et al.</i> J Biol Chem.2011	HCC	50 μ M	2 h

五、注意事项

- 1、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。
- 2、荧光光谱数据：AF488 Azide: 495/519 nm；AF594 Azide: 590/617 nm。
- 3、使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
- 4、EdU (10 mM) 首次使用时建议根据实验需要分装，-20 $^{\circ}$ C 保存。
- 5、可设置未进行 EdU 处理的细胞经 AF Dye Azide 染色作为阴性对照样品，用于确定合适的检测条件，此设置对于流式细胞术检测尤为重要，可以明确阴性信号的强度以划分阴性信号跟阳性信号的界限。
- 6、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。
- 7、本产品属于铜离子催化的点击反应，可能会造成部分荧光蛋白或荧光染料淬灭，建议在点击反应完成后进行反应和检测，目前已确定受影响的染料有 PE 及 PE tandems 染料。
- 8、铜离子会影响 GFP、RFP、mCherry 等荧光蛋白的荧光，因此本产品不适用于带 GFP、RFP、mCherry 等荧光的细胞检测。
- 9、由于铜离子会破坏肌动蛋白结构，影响鬼笔环肽检测，所以鬼笔环肽与本产品不兼容。