

EdU-647 细胞增殖检测试剂盒

EdU Cell Proliferation Kit with Alexa Fluor 647

本产品冰袋运输；-20℃避光保存，保质期 12 个月。

货号规格

| | |
|--------|------------|
| CX004 | 50~500 次 |
| CX004L | 200~2000 次 |

产品内容

| 组分名称 | CX004 | CX004L |
|-----------------------|--------|--------|
| EdU (10 mM) | 200 μL | 800 μL |
| 647 Azide | 55 μL | 220 μL |
| Click Reaction Buffer | 30 mL | 120 mL |
| CuSO ₄ | 1.5 mL | 6 mL |
| Click Additive | 2 管 | 1 瓶 |
| Hoechst 33342 (1000×) | 50 μL | 200 μL |

产品特点

- CL反应简单** —— 基于简单高效的点击反应，无需 DNA 变性；
- CL灵敏度高** —— 只需少量的小分子叠氮化物探针即可高效地标记出掺入的 EdU，并且可以检测到单个细胞的增殖情况；
- CL操作便捷** —— 只需常用的多聚甲醛固定和 Triton X-100 穿透，就可以使叠氮化物探针有效进入细胞并发生点击反应；
- CL兼容性好** —— 不影响细胞形态，也不会干扰后续的免疫荧光和免疫组化检测，以及 DNA 的荧光染色。

产品简介

本产品通过在 DNA 合成过程中掺入胸腺嘧啶脱氧核苷(thymidine)类似物 EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine)，并在随后的点击反应(Click reaction)中将 EdU 标记上荧光染料 Alexa Fluor 647，从而实现了对细胞增殖进行简单、快速、高灵敏的检测，其检测对象包括培养的细胞或组织样品，也可检测组织切片。经试剂盒处理后的增殖细胞会发出较强的远红外荧光，可被多种成像系统(如激光共聚焦显微镜等)或有相应激发和发射检测模块的流式细胞仪或荧光酶标仪所检测到，也可以进行高内涵筛选(High-Content Screening, HCS)。需注意的是，流式细胞仪或荧光酶标仪检测仪适用于细胞样品，不可用于组织切片。

本试剂盒包含 EdU 法检测所需的所有试剂组分，除检测细胞增殖外，还可用于细胞周期分析，为此，试剂盒中提供了蓝色细胞核染料 Hoechst 33342。

自备试剂

| 缓冲液 | 推荐配方 |
|-----|---------------------------|
| 固定液 | 4%的多聚甲醛 |
| 洗涤液 | 含 3% BSA 的 PBS |
| 通透液 | 含 0.3% Triton X-100 的 PBS |

操作步骤

◆ 细胞的 EdU 标记

如下步骤以 6 孔板检测体系为例，如使用其它型号培养板，检测体系可以按相应比例调整。

1. 在 6 孔板中(如有必要可以放入盖玻片)培养适量细胞。待细胞培养过夜且恢复到正常状态后，进行所需的药物处理或者其它刺激处理等；
2. 配制 2×EdU 工作液：推荐 EdU 终浓度为 10 μ M(1×)，用细胞培养液 1:500 稀释 EdU(10 mM)即可得到 2×EdU 工作液(20 μ M)；
 - 注：**◎ 对于 A549、HeLa 和 NIH/3T3 等贴壁细胞，推荐 EdU 的使用终浓度为 10 μ M(1×)。但细胞类型、培养液种类、细胞密度以及细胞增殖速度等多方面因素都会影响 EdU 掺入到细胞中的效率，故初次使用时建议进行预实验以确定 EdU 的最佳使用浓度；
 - ◎ 由于 EdU 工作液需与培养液等体积加入培养板中，故需要配制成 2×工作液。
3. 将 37 $^{\circ}$ C 预热的 2×EdU 工作液(20 μ M)，按与培养液相同体积加入 6 孔板中，使 6 孔板中的 EdU 终浓度变为 1×。例如设计终浓度为 10 μ M，原先 6 孔板中的培养基为 1 mL，则只需将 1 mL 2×的 EdU 工作液(20 μ M)加入到孔板中即可；
 - 注：**◎ 如果培养基体积过大，可以先吸除适量的培养液，再加入等体积的 2×EdU 工作液；或者可以减少工作液的体积并提高 EdU 的浓度，使最终培养液中的 EdU 浓度为 10 μ M，例如 2 mL 培养液中加入 220 μ L 0.1 mM EdU；
 - ◎ 不建议替换所有的培养液，以免对细胞的增殖造成影响。
4. 继续孵育细胞 2h。该孵育时间的长短取决于细胞生长速率，通常继续孵育时间以细胞周期 10% 左右为宜；
 - 注：**◎ 对于常见的哺乳动物细胞如 HeLa、3T3、HEK293 等，细胞周期约为 18~25 h，孵育时间以 2 h 左右为宜；
 - ◎ 人胚胎细胞的细胞周期约为 30 min，推荐孵育时间为 5 min；
 - ◎ 酵母细胞的细胞周期约 3 h，推荐孵育时间为 20 min；
 - ◎ 对于增殖的神经细胞，细胞周期约 5 天，推荐的孵育时间为 1 天；
 - ◎ 当孵育时间小于 45 min 时，建议提高 EdU 的浓度；如孵育时间大于 20 h，则建议适当降低 EdU 的浓度。
5. 细胞的 EdU 标记完成后，吸弃培养液，并加入 1 mL **固定液**，室温固定 15 min；
 - 注：**对于流式细胞仪检测，贴壁细胞胰酶消化后用培养液重悬后再固定。
6. 去除 **固定液**，每孔加入 1 mL **洗涤液** 洗涤细胞 3 次，每次 3~5 min；
7. 去除 **洗涤液**，每孔加入 1 mL **通透液**，室温孵育 10~15 min；
8. 去除 **通透液**，每孔用 1 mL **洗涤液** 洗涤细胞 1~2 次，每次 3~5 min；
9. 转至步骤 **EdU 检测**；

◆ 动物体内的 EdU 标记

EdU 可以通过注射或进食等适当方式进行动物的体内标记。如下以小鼠为例，其它动物体内的 EdU 标记请参考相关文献。

1. 参照每千克体重 10~200 mg EdU 用量，使用 PBS 将 EdU 配制合适浓度，并通过腹腔注射、特定组织或器官局部注射、加入饮用水中等方式注入小鼠体内；
 - 注：**◎ 此步骤中 EdU 用量较大，需额外购买(货号：CX000)；
 - ◎ 具体用量跟实验动物的种类、体重和 EdU 注入方式有关，可以参考相关文献，建议初次使用时可对 EdU 的用量进行一定的摸索，或者直接按照每千克体重 50 mg 的用量进行测试。如果之前使用过 BrdU 进行实验，则可以按 BrdU 的用量操作。
2. 4h 后或根据特定实验确定的适当时间后，快速处死小鼠，取出所需的组织，按照常规步骤制作

冰冻切片或石蜡切片。EdU 标记的时长也可以参考相关文献自行调整；

3. 对于冰冻切片：
 - (1) 加入适量 **固定液**，室温固定 15 min；
 - (2) 去除 **固定液**，用适量 **洗涤液** 洗涤 3 次，每次 3~5 min；
 - (3) 去除 **洗涤液**，用适量 **通透液**，室温孵育 10~15 min；
 - (4) 去除 **通透液**，用适量 **洗涤液** 洗涤 1~2 次，每次 3~5 min；
 - (5) 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；
 - (6) 转至步骤 **EdU 检测**；
4. 对于石蜡切片：
 - (1) 脱蜡：将石蜡切片置于二甲苯中浸泡 10 min；换用新鲜二甲苯再浸泡 10 min；更换 50%的二甲苯再浸泡 5 min；无水乙醇中浸泡 5 min；更换新的无水乙醇再浸泡 5 min；更换 95%乙醇浸泡 5 min；更换 85%乙醇浸泡 5 min；更换 75%乙醇浸泡 5 min；更换 50%乙醇浸泡 5 min；更换 30%乙醇浸泡 5 min；更换 PBS 浸泡 5 min；
 - (2) 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，必须反复洗涤干净，否则残留的酶会严重干扰后续标记反应。
 - (3) 转至步骤 **EdU 检测**。

◆ EdU 检测

如下步骤以 6 孔板中细胞样品为例，对于其它孔板或切片样品，仅需要按比例调整每步溶液的用量，其余步骤相同。

- 注：**
- ◎ 6 孔板每孔的反应体系为 500 μL 反应混合物，对于 12、24、48、96 和 384 孔板，每孔的反应体系则可分别调整为 200 μL、100 μL、70 μL、50 μL 和 20 μL 反应混合物；
 - ◎ 对于较小的培养板孔，单位培养面积的液体用量已经进行过适当增加，可以有效避免液体蒸发可能带来的负面影响；
 - ◎ 对于切片样本，可以根据其大小，每个切片使用 100~200 μL 反应混合物。

1. 配制 Click Additive Solution：对于 CX004，用 1.5 mL 去离子水溶解一管 Click Additive，混匀至全部溶解，即为 Click Additive Solution；对于 CX004L，加入 12 mL 去离子水溶解试剂盒所提供的一瓶 Click Additive，混匀至全部溶解，即为 Click Additive Solution。配制完成后可以分装保存于-20℃。
2. 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，否则点击反应可能无法有效进行；
 - ◎ Click 反应液须在配制后 15 min 内使用。

| 组分 | 6 孔板样品数 | | | | | | |
|-------------------------|---------|--------|---------|---------|--------|----------|---------|
| | 1 | 2 | 4 | 5 | 10 | 25 | 50 |
| Click Reaction Buffer | 430 μL | 860 μL | 1.72 mL | 2.15 mL | 4.3 mL | 10.75 mL | 21.5 mL |
| CuSO ₄ | 20 μL | 40 μL | 80 μL | 100 μL | 200 μL | 500 μL | 1 mL |
| 647 Azide | 1 μL | 2 μL | 4 μL | 5 μL | 10 μL | 25 μL | 50 μL |
| Click Additive Solution | 50 μL | 100 μL | 200 μL | 250 μL | 500 μL | 1.25 mL | 2.5 mL |
| 总体积 | 500 μL | 1 mL | 2 mL | 2.5 mL | 5 mL | 12.5 mL | 25 mL |

3. 去除上一步骤中的洗涤液；
4. 每孔加入 0.5 mL **Click 反应液**，轻轻摇晃细胞培养板以确保反应混合物将样品均匀覆盖；

5. 室温避光孵育 30 min，也可酌情适当延长孵育时间；
6. 吸除 **Click 反应液**，用 **洗涤液** 洗涤 3 次，每次 3~5 min；
7. 如果需要对细胞核进行染色，可以参照步骤 **细胞核染色** 进行。如无其它的特殊需求，即可在能检测远红外荧光的荧光显微镜下观察，或使用有相应激发和发射检测模块的流式细胞仪、多功能酶标仪等进行荧光检测。647 Azide 的最大激发波长是 650 nm，最大发射波长是 670 nm；

◆ 细胞核染色

为了检测细胞增殖比例，可以使用 Hoechst 33342 进行细胞核染色。此外，高内涵筛选仪器一般也需要对细胞核进行染色。

1. 1×Hoechst 33342 溶液的配制：按 1:1000 比例用 1×PBS(货号：PS110) 稀释 Hoechst 33342(1000×)；
2. 接 **EdU 检测** 步骤 6，吸除 **洗涤液** 后，每孔加 1×Hoechst 33342 溶液 1 mL，室温避光孵育 10 min；
3. 吸除 1×Hoechst 33342 溶液，用 **洗涤液** 洗涤 3 次，每次 3~5 min；
4. 进行荧光检测。Hoechst 33342 为蓝色荧光，最大激发波长为 346 nm，最大发射波长为 460 nm；

◆ 流式细胞仪检测

对于经步骤 **EdU 检测** 或 **细胞核染色** 获得的细胞悬液样品进行流式检测。如果使用传统的流体动力学聚焦的流式细胞仪来测量总 DNA 含量，请在检测过程中使用低流速，实验中的每个样品应使用相同的收集速率和细胞浓度。EdU 标记产生的荧光信号一般使用对数刻度的横坐标。647 Azide 的最大激发波长是 650 nm，最大发射波长是 670 nm。

- 注：**
- ◎ 建议使用未经 **EdU** 标记的细胞样品作为流式细胞仪检测的阴性对照，并选择合适的电压；
 - ◎ 由于流式细胞仪检测比较灵敏，可根据细胞类型和实际染色情况对 **647 Azide** 的使用量进行适当调整。

注意事项

1. Click Additive 配制成溶液后请注意适当分装。如溶解后有白色物质析出，请上下颠倒数次，待其全部溶解后使用。如果该溶液颜色变成棕色，则说明已失效，请弃用；
2. 本产品完全兼容多种有机染料，如 Alexa Fluor® 系列普通染料、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，需在点击反应完成后进行反应和检测；
3. 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 Green Fluorescent Protein(GFP)、TC-FIAsH™ 和 TC-ReAsH™ 类试剂，需在点击反应前进行反应和检测。由于 Phalloidin (鬼笔环肽) 不兼容点击反应，推荐使用 Tubulin-Tracker Red 进行细胞微管的检测；
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
5. 本产品仅限科研使用。

版本号：21E31