

EdU-555 细胞增殖检测试剂盒

EdU Cell Proliferation Kit with Alexa Fluor 555

本产品冰袋运输；-20℃避光保存，保质期12个月。

货号规格

CX003	50~500 次
CX003L	200~2000 次

产品内容

组分名称	CX003	CX003L
EdU (10 mM)	200 μL	800 μL
555 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 555，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在荧光显微镜下发出非常明亮的红色荧光，可用于荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪及荧光酶标仪等的检测，也可进行高内涵筛选(High-Content Screening, HCS)。需注意的是，流式细胞仪或荧光酶标仪检测仅适用于细胞样品，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 CX003，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 CX003L，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
555 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，即可在荧光显微镜下观察，或使用流式细胞仪、多功能酶标仪等进行荧光检测。**555 Azide** 的最大激发波长是 555 nm，最大发射波长是 565 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。**555 Azide** 的最大激发波长是 555 nm，最大发射波长是 565 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 **555 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：21J20