

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°C避光储存 1 年; 开封后按指定温度保存 可有效放置 1 年

产品编号	产品名称	试剂盒组成	10-100T
YFXCA08	AF594-Edu 通用款细胞增殖检测试剂盒	10mM Edu	200 μ L
		AF594 Azide	50 μ L
		10 \times Click-iT EdU 反应缓冲液	1mL
		CuSO ₄	500 μ L
		Click-iT EdU 缓冲液添加物	30mg
		Hoechst 33342	20 μ L

注: 规格次数针对 96 孔细胞培养板。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; 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。

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。EdU 法检测基于“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。

本试剂盒中, EdU 含有炔烃, AF594 Azide 染料含有叠氮化合物。点击法的 EdU 标记增殖快速有效, 易于使用。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; 而 EdU 法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。

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。

二、自备材料

10mM PBS, pH 7.2-7.6; 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, pH 7.2-7.6; 1% BSA in PBS, pH 7.2-7.6; ddH₂O; 96/24/12/6 孔培养板或培养皿。

三、荧光显微镜检测

1、细胞培养

取对数生长期细胞, 以每 4×10^3 - 1×10^5 细胞 (可根据细胞大小、生长速度以及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

根据实验需要进行各种药物处理。

3、EdU 标记

3.1 用细胞完全培养基按一定比例稀释 EdU 溶液 (组分 A) 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, 可参考附表 2 和附表 3。

3.2 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, 可参考附表 2。EdU 浓度与孵育时间相关, 短时间孵育 (24 h) 宜采用低浓度, 如: 1~10 μM ; 也可参考附表 3。

4、细胞固定及促渗

注: 对于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 洗涤液洗涤细胞 2 次, 在细胞固定 促渗之前进行。

4.1 孵育完成后, 去除培养基。以 1 \times PBS 清洗细胞两次, 每次 5min, 以除去未掺入 DNA 的 EdU 残留, 贴壁不牢的细胞可降低清洗强度。加入 50 μL 4% 多聚甲醛固定液, 室温孵育 20min 后, 去除固定液。

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

4.3 以每孔 100 μL 3% BSA 洗涤细胞 2 次。

4.4 去除洗涤液, 加入 100 μL 0.5% Triton X-100, 室温孵育 10 min。

5、Edu 检测

注: 本参考步骤每个样本使用 100 μL 的工作液, 用户可以根据自己的样本情况调整用量

5.1 配置 1 \times Click-iT EdU 反应缓冲液 (组分 C): 用 ddH₂O 将组分 C 稀释 10 倍。

5.2 配置 5 \times Click-iT EdU 缓冲液添加物 (组分 E): 加 300 μL 的 ddH₂O 至 30mg 的 E 组分管中 (终浓度 100 mg/mL), 混匀至全部溶解。使用后, 剩余储液存放在 -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。

注: 不同规格的组分 E 均按照此比例加 ddH₂O 溶解, 制备成 5 \times 储液备用。

5.3 准备 1 \times Click-iT EdU 缓冲液添加物: 用 ddH₂O 稀释 5 \times Click-iT EdU 缓冲液添加物至 1 \times , 溶液应现配现用。

5.4 依据表 1 准备 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 μL
CuSO ₄ (组分 D)	40 μL
AF594 Azide (组分 B)	5 μL
1 \times Click-iT EdU 缓冲液添加物	100 μL
总体积	1mL

5.5 去除促渗剂, 每孔 100 μL 的 3% BSA 洗涤液洗涤 2 次。

5.6 每孔加入 100 μL Click-iT 工作液, 均匀覆盖细胞。

5.7 室温避光孵育 30min。

5.8 除去 Click-iT 工作液, 以 100 μL 3% BSA 洗涤细胞 2 次后, 去除洗涤液, 加入 100 μL PBS 保持细胞湿润。如其他无特别要求, 即可进行拍照分析。

6、荧 DNA 复染 (可选)

6.1 用 100 μL PBS 洗涤细胞 1 次, 去除洗涤液。

6.2 用 PBS 将 Hoechst 33342 (组分 F) 稀释 2000 倍。

6.3 每孔加 100 μL 1 \times Hoechst 33342 溶液, 室温避光孵育 15-30 min。

6.4 去除 Hoechst 33342 溶液, 用 100 μL PBS 洗涤细胞 2 次。

7、成像及分析

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 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光湿润保存 3 天之内完成拍照。

四、流式细胞仪检测

1、细胞培养

每孔 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ 个细胞接种于 6 孔板中。

2、药物处理

根据实验需要进行各种药物处理。

3、Edu 标记细胞

3.1 用细胞完全培养基按一定比例稀释 Edu 溶液（组分 A）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，可参考附 2 和附表 3。

3.2 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，可参考附表 2。Edu 浓度与孵育时间相关，短时间孵育（24 h）宜采用低浓度，如： $1 \sim 10 \mu\text{M}$ ；也可参考附表 3。

4、细胞固定及促渗

注：对于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 洗涤细胞 2 次，在细胞固定促渗之前进行。

4.1 孵育完成后，收集细胞，每管加入 1mL PBS 清洗细胞，1000 rpm 离心 5 min，吸弃上清，以除去未掺入 DNA 的 Edu 残留。

4.2 每管加入 1mL 4% 多聚甲醛固定液重悬细胞。

4.3 室温孵育 20min，1000 rpm 离心 5min，弃上清。

4.4 每管加入 1mL 2mg/mL 甘氨酸孵育 5min，中和残留的固定液，1000 rpm 离心 5min，吸弃上清，每管加入 1mL PBS 清洗 1 次，1000 rpm 离心 5min，弃上清。

4.5 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 孔板样本可参考每孔 1mL 的工作液来进行，可根据自己的样本情况调整用量。

5.1 配置 $1 \times$ Click-iT Edu 反应缓冲液：用 ddH₂O 将组分 C 稀释 10 倍。

5.2 配置 $5 \times$ Click-iT Edu 缓冲液添加物（组分 E）：加 $300 \mu\text{L}$ ddH₂O 至 30 mg 的组分 E 试管中（终浓度 100 mg/mL ），混匀至全部溶解。使用后，剩余储液存放在 -20°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。

注：不同规格的组分 E 均按照此比例加 ddH₂O 溶解为 $5 \times$ 储液备用。

5.3 准备 $1 \times$ Click-iT Edu 缓冲液添加物：以 ddH₂O 稀释 $5 \times$ Click-iT Edu 缓冲液添加物储液至 $1 \times$ ，溶液应现配现用。

5.4 依据表 2 准备 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	875 μL
CuSO ₄ （组分 D）	20 μL
AF594 Azide（组分 B）	5 μL
$1 \times$ Click-iT Edu 缓冲液添加物	100 μL
总体积	1mL

5.5 1000rpm 离心 5min, 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, 弃上清。

5.6 每管加入 1mL Click-iT 工作液, 混匀。

5.7 室温避光孵育 30 min。

5.8 1000 rpm 离心 5 min, 吸弃染色反应液, 每管加入 1% BSA 洗涤细胞 2 次, 1000 rpm 离心 5min, 吸弃上清, 用 1 mL 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), 流式细胞仪检测。

注: 如需进行其他标志物检测可参考步骤 4。

6、细胞内抗原标记 (可选)

6.1 加入抗体工作液, 混匀。

6.2 避光条件下, 以合适的温度及时间孵育抗体。

7、流式检测及分析

7.1 建议染色完成后立即进行流式检测; 如果条件限制, 请避光 4℃湿润保存待测, 但不应超过 3 天。

7.2 检测的细胞数量建议尽量能达到百万级, 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 (8) 中的清洗次数。

五、注意事项

- 1、使用前请将产品瞬时离心至管底, 再进行后续实验。
- 2、荧光染料均存在淬灭问题, 实验操作时请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
- 3、Click-iT EdU 缓冲液添加物溶液最好现配现用, 以保证最佳结果。
- 4、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

附录
附表 1. EdU 培养基及染色反应液的参考使用量

	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

附表 2. 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	-30 min	-3 h	-18 h	-21 h	-25 h	-5 d
孵育时间	5 min	20 min	2 h	2 h	2 h	1 d

注: (1) EdU 孵育时间取决于细胞周期, 一般为细胞周期的 1/10 至 1/5, 但大多数细胞系均可采用 2 h 孵育时间;
 (2) 考虑到细胞培养基、温度、湿度、光线等其他因素的影响, 细胞周期会有所变化。

附表 3. 文献中 EdU 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