

本产品仅用于科研, 不可用于诊断

EdU-647细胞增殖检测试剂盒 (iFluor® 647 azide)

RG100-121-100 规格:100T

一、产品简介

EdU-647细胞增殖检测试剂盒, 是一种简单快速而灵敏的检测细胞增殖的试剂盒。EdU (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine) 是一种胸腺嘧啶核苷类似物, 能够在细胞增殖时期代替胸腺嘧啶 (T) 掺入正在复制的DNA分子中, EdU上的乙炔基能与荧光标记的小分子叠氮化物探针 (如iFluor® 647 azide) 通过一价铜离子的催化发生共价反应, 使EdU被iFluor® 647 azide所标记, 新合成的DNA会被相应的荧光探针标记, 从而可以通过适当的荧光检测设备检测到增殖的细胞。本试剂盒可用于培养细胞及组织切片的检测。

二、试剂盒组分

试剂	浓度	规格
EdU溶液 (试剂A)	1000X	105 μ l
反应缓冲液 (试剂B)	1X	50 ml
催化剂溶液 (试剂C)	50X	1050 μ l
荧光染料溶液 (试剂D)	500X	105 μ l
缓冲添加剂 (试剂E)	—	2管
Hoechst 33342 (试剂F)	500X	105 μ l

三、保存条件

4°C储存, 一年有效。荧光试剂须避光保存。

四、其他所需试剂

- 10 mM PBS, pH7.4
- 细胞固定液 (4%多聚甲醛溶液)
- 透膜液 (0.2%Triton X-100), PBS稀释
- 根据实验要求: 细胞爬片, 载玻片, 12孔细胞培养板或其它多孔板, 或流式细胞分析管 (如12 \times 75 mm)

五、检测方法

细胞培养 (贴壁细胞)

每孔 $0.5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 细胞接种于12孔板中, 细胞正常生长且密度不超过80%为宜。

EdU标记

- 配制2X的EdU工作液: 由于EdU工作液与培养基是等体积加入到孔板中, 所以需要配制2X的EdU工作液。用培养液以1:500的比例稀释EdU溶液 (试剂A) 即可得到2X的EdU工作液 (100 μ M)。将等体积的2X EdU工作液加至12孔板中, 使12孔板EdU的终浓度为1X (50 μ M)。更换所有的培养液可能会对细胞的增殖有影响, 因此不建议替换所有的培养液。

2. 继续培养2小时。注：不同种类细胞的EdU孵育时间不同，具体参考如下表：

表2. EdU孵育时间参考对照表

细胞系	人胚胎细胞	人神经细胞	人宫颈癌细胞	人胚肾细胞系	酵母细胞
细胞周期	30 min	5 d	20-24 h	22-25 h	3 h
孵育时间	5 min	1 d	2 h	2 h	20 min

表3. EdU培养基及染色反应液的使用量参考

	96孔板	48孔板	24孔板	12孔板	6孔板
EdU培养基	100 μ l	200 μ l	300 μ l	500 μ l	1 ml
染色反应液	100 μ l	200 μ l	300 μ l	500 μ l	1 ml

EdU检测

1. EdU标记完成后，去除培养基，用PBS洗涤细胞1次。
2. 每孔加入0.5 ml细胞固定液，室温固定10分钟。
3. 去除固定液，用PBS洗涤细胞2次。
4. 去除PBS，每孔加0.5 ml 0.2%TritonX-100透膜液，室温孵育10分钟。
5. 去除透膜液，用PBS洗涤细胞2次。
6. 配制缓冲添加剂溶液：用1.3 ml去离子水溶解一管缓冲添加剂（试剂E），混匀至全部溶解，即为缓冲添加剂溶液。配制后可以适当分装，并-20 $^{\circ}$ C保存。缓冲添加剂溶液在使用过程中如果出现变色成棕色，则弃用。
7. 参照表4顺序进行EdU反应液的配制：

表4. EdU反应液的配制参考

组分	12孔板样品数				
	1	2	3	4	10
反应缓冲液 (试剂B)	464 μ L	928 μ L	1392 μ L	1856 μ L	4640 μ L
催化剂溶液 (试剂C)	10 μ L	20 μ L	30 μ L	40 μ L	100 μ L
荧光染料溶液 (试剂D)	1 μ L	2 μ L	3 μ L	4 μ L	10 μ L
缓冲添加剂溶液	25 μ L	50 μ L	75 μ L	100 μ L	250 μ L
总体积	500 μ L	1 mL	1.5 mL	2 mL	5 mL

注：按顺序配制适量EdU反应液，现用现配，30分钟内使用

8. 去除PBS，每孔加入500 μ l的EdU反应液，室温避光孵育30分钟。
9. 去除反应液，用PBS洗涤细胞2-3次。
10. 染核，用PBS以1：500比例稀释Hoechst 33342（试剂F）配成染色工作液，每孔加入500 μ l染色工作液，室温避光染色5-10分钟。
11. 去除染色液，用PBS洗涤细胞2次。
12. 荧光显微镜检测。Azide 647的最大激发波长是648 nm，最大发射波长是664 nm。Hoechst 33342的最大激发波长为346 nm，最大发射波长为460 nm。Hoechst 33342和双链DNA结合后，最大激发波长为350 nm，最大

发射波长为461 nm。

组织切片：动物体内EdU的标记及切片样品的处理

- a. 动物体内EdU的标记可参考相关文献，对于小鼠，可以按照10-200mg/kg的用量，把EdU用PBS配制成一定浓度，腹腔注射、特定组织或器官局部注射或者加入饮用水中，初次使用时建议对EdU的使用浓度进行一定的摸索。
- b. 标记4小时后或根据特定实验确定的适当时间后，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标记的时间也可以参考相关文献自行调整。
- c. 对于冰冻切片：
 - 1) 可在组织周围用组化笔画圈，每个圈中滴加适量固定液，室温固定15分钟。
 - 2) 去除固定液，用PBS洗涤2-3次，每次3分钟。
 - 3) 去除PBS，滴加适量透膜液室温孵育10-15分钟。
 - 4) 去除透膜液，用PBS洗涤2次，每次3分钟。
- d. 对于石蜡切片：
 - 1) 脱蜡:二甲苯脱蜡5-10分钟，换用新的二甲苯脱蜡5-10分钟。无水乙醇2分钟，换新的无水乙醇2分钟。90%乙醇2分钟。80%乙醇2分钟。70%乙醇2分钟。PBS5分钟。
 - 2) 去除PBS，滴加适量透膜液室温孵育10-15分钟。
 - 3) 去除透膜液，用PBS洗涤2次，每次3分钟。

EdU检测

- a. 配制缓冲添加剂溶液：用1.3 ml去离子水溶解一管缓冲添加剂（试剂E），混匀至全部溶解，即为缓冲添加剂溶液。配制后可以适当分装，并-20°C保存。缓冲添加剂溶液在使用过程中如果出现变色成棕色，则弃用。
- b. 参照表4顺序进行EdU反应液的配制。
- c. 去除PBS，每个圈中滴加适量EdU反应液，室温避光孵育30分钟。
- d. 去除反应液，用PBS洗涤3次，每次3-5分钟。
- e. 染核，用PBS以1：500比例稀释Hoechst 33342（试剂F）配成染色工作液，每个圈中滴加适量染色工作液，室温避光染色5-10分钟。
- f. 去除染色液，用PBS洗涤2次。
- g. 用甘油或防荧光淬灭剂封片。
- h. 荧光显微镜检测。

六、注意事项

1. EdU使用浓度说明：本试剂盒推荐使用50 μM 浓度孵育2小时，由于细胞类型、细胞密度以及细胞增殖速度都会影响细胞DNA复制过程中EdU的掺入，因此建议首次实验时对EdU的使用浓度进行一定的摸索，以达到更好的实验效果；同时，可设不加EdU的阴性对照组，以便进行染料背景分析。
2. 组织切片染色过程中需防止干片，导致背景过强影响实验结果。
3. 试剂使用前恢复至室温，并瞬时离心。
4. 实验过程请注意个人防护，请穿实验服及佩戴口罩。
5. 本产品仅用于科学研究，不用于临床诊断。