

EdU 细胞增殖检测试剂盒

EdU Cell Proliferation Detection Kit

产品简介

EdU (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine) 是一种胸腺嘧啶核苷类似物，可以代替胸腺嘧啶(T)掺入到正在复制的 DNA 分子中，随后 EdU 与荧光染料发生快速的点击反应，新合成的 DNA 分子被荧光标记，通过检测荧光信号可快速检测细胞的增殖能力。EdU 法无需使用抗体、操作简单、灵敏度高，是一种在 BrdU 法基础上升级的新方法。本试剂盒可用于培养细胞及组织切片的检测。

货号规格

货号	产品名称	规格
100-121	EdU-488 细胞增殖检测试剂盒	100T
100-122	EdU-594 细胞增殖检测试剂盒	100T
100-123	EdU-555 细胞增殖检测试剂盒	100T
100-124	EdU-647 细胞增殖检测试剂盒	100T

产品组分

组分	浓度	试剂量
EdU 溶液(试剂 A)	1000X	100 μ L
反应缓冲液(试剂 B)	1X	50 mL
催化剂溶液(试剂 C)	50X	1000 μ L
荧光染料溶液(试剂 D)	500X	100 μ L
缓冲添加剂(试剂 E)	粉末	2 管
Hoechst 33342 (试剂 F)	500X	100 μ L

备注：荧光光谱数据(Ex/Em)： 488 Azide: 490/513 nm; 555 Azide: 550/561 nm;
594 Azide: 585/609 nm; 647A Azide: 648/664 nm.
Hoechst 33342: 346/460nm.

保存条件

本产品冰袋运输，4℃ 保存，一年内有效。注：Hoechst 33342 (试剂 F)，可分装后-20℃ 保存，短期内使用可保存于 4℃。荧光试剂注意避光使用。冰袋运输。

自备试剂

- 10 mM PBS (pH7.2-7.6)
- 细胞固定液 (含 4%多聚甲醛的 PBS)
- 透膜液 (0.2% Triton X-100 in PBS)
- 细胞培养板 (48/24/12/6 孔板)；流式细胞分析管(如 12×75 mm)。

注意事项

- EdU 使用浓度说明: 本试剂盒推荐使用 50 μ M 的浓度孵育 2 小时, 由于细胞类型、密度以及细胞增殖速度都会影响 DNA 复制过程中 EdU 的掺入, 因此建议首次实验时对 EdU 的最佳使用浓度进行优化, 以达到更好的实验效果; 同时, 可设不加 EdU 的阴性对照组, 以便进行染色背景分析。
- 组织切片染色过程中需防止干片, 干片会导致背景过强影响实验结果。
- 试剂平衡至室温并瞬时离心再使用。
- 为了您的安全与健康, 实验过程中请穿实验服并佩戴口罩和一次性手套。

使用说明（贴壁细胞）

细胞培养

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

EdU 标记

1. 设置 1 个不加 EdU 培养基的阴性对照组，以便进行流式检测数据的染料背景分析。
2. 用细胞培养基将 1000 X 的 EdU 溶液(试剂 A)稀释至 1X，制备适量 50 μ M EdU 培养基。

注意：1) EdU 浓度与孵育时间相关，短时间孵育 (<2h) 宜采用高浓度 (10~50 μ M)，长时间孵育 (>24h) 宜采用低浓度 (10 μ M)；

3. 将细胞培养基更换为 EdU 培养基，每孔加入 0.5mL，孵育 2 小时。

注意：1) 最佳孵育时间与细胞周期相关（表 1），大多数肿瘤细胞系均可采用 2 小时孵育时间；
2) EdU 培养基用量参考表 2；

表 1. EdU 孵育时间参考

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	5d	20-24h	22-25h	3h
孵育时间	5min	1d	2h	2h	20min

表 2. 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

备注：表 2 为贴壁细胞的使用量参考，悬浮细胞和组织切片的使用量适当调整。

EdU 检测

- a. EdU 标记完成后，吸去培养基，用 PBS 洗涤细胞 1 次。
- b. 每孔加入 0.5 mL 的固定液，室温固定 10 分钟。**注意：**如果用于流式测试，则用胰酶消化之后再进行固定。
- c. 去除固定液，用 PBS 洗涤细胞 2 次。
- d. 去除 PBS，每孔加 0.5 mL 透膜液 0.2% TritonX-100 室温孵育 10 分钟。
- e. 去除透膜液，用 PBS 洗涤细胞 2 次。
- f. 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。配制后适当分装，并于 -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。
- g. 参照表 3 按顺序进行 EdU 反应液的配制：
- h. 去除 PBS，每孔加入 500 μ L EdU 反应液，室温避光孵育 30 分钟。
- i. 去除 EdU 反应液，用 PBS 洗涤细胞 2-3 次。
- j. 染核，用 PBS 将 500X 的 Hoechst 33342(试剂 F)稀释成 1X 的染色工作液，每孔加入 0.5 mL 染色工作液，室温避光染色 5-10 分钟。
- k. 去除染色工作液，用 PBS 洗涤细胞 2 次。
- l. 荧光显微镜检测。如果条件限制，请避光 4°C 湿润保存，3 天之内检测。

表 3. 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 μL	928 μL	1392 μL	1856 μL	4640 μL
催化剂溶液(试剂 C)	10 μL	20 μL	30 μL	40 μL	100 μL
荧光染料溶液(试剂 D)	1 μL	2 μL	3 μL	4 μL	10 μL
缓冲添加剂溶液	25 μL	50 μL	75 μL	100 μL	250 μL
总体积	500 μL	1 mL	1.5 mL	2 mL	5 mL

注意：按顺序配制适量 EdU 反应液（现用现配，30 分钟内使用）

使用说明（组织切片）

动物体内 EdU 的标记及切片样品的处理

- 动物体内 EdU 的标记可参考相关文献。对于小鼠，可按照 10-200 mg/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水中，初次使用时建议对 EdU 的使用浓度进行一定的摸索。
- 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。
- 对于冰冻切片：
 - 可在组织周围用组化笔画圈，圈中滴加适量固定液，室温固定 15 分钟。
 - 去除固定液，用 PBS 洗涤 2-3 次，每次 3 分钟。
 - 去除 PBS，滴加适量透膜液室温孵育 10-15 分钟。
 - 去除透膜液，用 PBS 洗涤 2 次，每次 3 分钟。
- 对于石蜡切片：
 - 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。PBS 5 分钟。
 - 去除 PBS，滴加适量透膜液室温孵育 10-15 分钟。
 - 去除透膜液，用 PBS 洗涤 2 次，每次 3 分钟。

EdU 检测

- 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。
- 参照表 3 顺序进行 EdU 反应液的配制：
- 去除 PBS，每个圈中滴加适量 EdU 反应液，室温避光孵育 30 分钟。
- 去除 EdU 反应液，用 PBS 洗涤 3 次，每次 3-5 分钟。
- 染核，用 PBS 将 500X 的 Hoechst 33342(试剂 F)稀释成 1X 的染色工作液，每个圈中滴加适量染色工作液，室温避光染色 5-10 分钟。
- 去除染色液，用 PBS 洗涤细胞 2 次。
- 用甘油或防荧光猝灭剂封片。
- 荧光显微镜检测。如果条件限制，请避光于 4°C 湿润保存，3 天之内检测。