EdU-555 法细胞增殖成像检测试剂盒

货号：PMK0993

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：100T/500T

适用样本：贴壁细胞、悬浮细胞、活体动物

产品简介

细胞增殖的检测对于评估细胞健康，确定遗传毒性或评估抗癌药物至关重要。目前直接测量 DNA 合成是最准确的方法，在复制过程中将核苷类似物（例如[3H]胸苷或 5-溴-2'-脱氧尿苷）加入到细胞中，然后通过放射自显影或使用 BrdU 抗体来进行检测。EdU-555 法细胞增殖成像分析试剂盒是一种替代 BrdU 的新型检测方法。EdU（5-乙炔基-2′-脱氧尿苷）是胸腺嘧啶核苷的核苷类似物，可以在 DNA 合成过程中替代胸苷掺入到新合成的 DNA 中。与 BrdU 方法相比 EdU-Click 检测不是基于抗体，因此不需要通过 DNA 变性（变性通常使用氯化氢、加热或脱氧核糖核酸酶消化）来检测加入的核苷。检测基于 Click 反应，叠氮化物和炔烃之间由铜催化的共价反应，整个反应 30min 内可完成。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	100T	500T	
EdU（10mM）	100μL	500μL	-20℃
洗液（5×）	12mL	60mL	-20℃
555 染料	20μL	100μL	-20℃，避光保存
反应缓冲液（10×）	1mL	5mL	4℃
铜试剂	0.4mL	2mL	4℃
还原剂	100mg	5×100mg	-20℃
DAPI（500×）	24μL	120μL	-20℃，避光保存

自备耗材

低温离心机
可调节式移液枪及枪头
去离子水
固定液（含 3.7%甲醛的 PBS）
通透剂（含 0.5%Triton X-100 的 PBS）

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。
EdU（10 mM）：即用型；使用前，平衡到室温；-20℃保存。
洗液（1×）：向洗液（5×）中添加磷酸盐缓冲液（PBS），将 5×母液稀释成 1×工作液（终浓度为 3% BSA），并混匀。使用后分装并保存在-20℃，该溶液可稳定保存 6 个月。
555 染料：即用型；使用前，平衡到室温；-20℃避光保存。
反应缓冲液（10×）：即用型，使用前，平衡到室温；-20℃保存。
铜试剂：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

还原剂（10×）的配制：向 还原剂 中添加去离子水配制终浓度为 100mg/mL 的 还原剂（10×）并混合直至化合物完全溶解。使用后分装-20℃保存，该溶液可稳定保存 6 个月。若溶液变成棕色，说明组分已经降解，不建议继续使用。

DAPI（1×）：临用前配制，用 PBS 按 1：500 的比例配成 1×DAPI 工作液；分装，-20℃避光保存。

实验步骤

A. EdU 标记培养细胞

本实验以 96 孔板培养的贴壁细胞为例。悬浮细胞可在孵育 EdU 后进行涂片处理（将适量细胞滴加到载玻片上，酒精灯烘烤至干燥），涂片后从固定开始与贴壁细胞采用相同的染色步骤。

1. 孔板内放入适配盖玻片，接种适量细胞，使其生长至所需密度后处理细胞；
2. 用 10mM EdU 溶液在培养基中制备 2×EdU 工作溶液（20μM）。推荐的 EdU 终浓度为 10μM，用细胞培养液 1:500 稀释 10mM EdU 即可得到 2×EdU 工作溶液（20μM）；
3. 将预热（37℃）的 2×EdU 溶液等体积添加到含有试验细胞的培养基中，使 96 孔板中的 EdU 终浓度变为 1×；

注意：建议不要更换所有培养基，因为这会影响细胞增殖速率；建议 EdU 起始浓度是 10μM。

4. 在最适合的条件下孵育细胞 2h（根据细胞扩增时间确定，一般肿瘤细胞的孵育时间为 2h）；
5. 孵育后除去培养基，并向每个孔中加入 0.1mL 固定液（含 3.7%甲醛的 PBS），室温下孵育 15 min；
6. 除去固定液，用 0.1 mL 洗液（1×)浸洗孔中细胞 5 min，重复 3 次；
7. 除去洗涤液，向每个孔中加入 0.1mL 通透剂（含 0.5%Triton X-100 的 PBS），室温下孵育 15 min；
8. 除去通透剂，用 0.1mL 洗液（1×)浸洗孔中细胞 5 min，重复 2 次；
9. 转步骤 C。

B. EdU 标记活体动物

本实验以 6 周龄小鼠为例，其它动物体内 EdU 的标记请参考相关文献。

1. 对于小鼠，可以按照 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用水中。具体用量跟所用动物的种类、体重和使用方式有关，可以参考相关文献，因此初次使用时建议对 EdU 的使用浓度进行一定的摸索，或者直接使用 50mg/kg 的浓度进行测试。如果之前使用过 BrdU 进行实验，则可以参考 BrdU 的终浓度作为 EdU 的终浓度。EdU 需单独购买；
2. 24 小时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 标记的时间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（含 3.7%甲醛的 PBS），室温下孵育 15 min；
(2) 除去固定液，用适量洗液（1×)浸洗 5 min，重复 3 次；
(3) 除去洗涤液，加入适量通透剂（含 0.5%Triton X-100 的 PBS），室温孵育 15 min；
(4) 除去通透剂，用适量洗液（1×)浸洗 5 min，重复 2 次；
(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，或者自行配制的适当的抗原修复液进行抗原修复处理；
(6) 转步骤 C。

4. 对于石蜡切片：

(1) 脱蜡：二甲苯中脱蜡 5-10min，换用新鲜的二甲苯，再脱蜡 5-10min。组织复性：在无水乙醇中洗涤 5 min，换新的无水乙醇洗涤 3 min；然后依次在 95%、85%、75%和 50%乙醇中洗涤 3 min；最后在 PBS 中洗涤 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，并有必要进行抗原修复，可以使用适当的抗原修复液，或者自行配制的适当的抗原修复液进行抗原修复处理；

注意：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) 转步骤 C。

C. EdU 检测

注意：在该步骤中，每孔使用 100μL 反应混合物。对于其它孔板或切片，反应混合物体积可根据实际情况进行调节，但必须按比例加入反应组分。

1. 根据下表制备 Click-iT 反应混合物；

注意：要按表中列出的顺序添加成分，否则反应将无法得到最佳效果。配置好的 Click-iT 反应混合物必须在 15min 内使用。

组分	体积
去离子水	758μL
反应缓冲液（10×）	100μL
铜试剂	40μL
555 染料	2μL
还原剂（10×）	100μL
总体积	1mL

2. 向每个样品中加入 100μL Click-iT 反应混合物，室温下避光孵育 30min；
3. 除去反应混合物，用 0.1 mL 洗液（1×）浸洗 5min，重复 3 次，除去洗涤液；

重要提示：在孵育过程中一定要避光。如不需要其它染色，孵育并洗涤后请直接进行成像和分析。可在荧光显微镜下观察，或者使用流式细胞仪（用 500μl 洗涤液重悬细胞后上机）、多功能酶标仪、高内涵筛选仪器(一般高内涵筛选需要细胞核复染)进行荧光检测分析。如果需要检测细胞增殖的比例，可以参照步骤 4.对细胞核进行复染。

4. 可选步骤：进行核染色（1×DAPI）或抗体标记；

细胞核染色：（1）每孔加 0.1mL 的 1×DAPI 溶液，室温避光孵育 10min。
（2）吸除 1×DAPI 溶液，用 0.1 mL 洗液（1×）浸洗 5min，重复 3 次。

5. 用荧光显微镜或其他荧光设备分析样品中标记的 DNA（Ex/Em=546/565nm），用 Ex/Em=360/460nm 检测细胞核。

注意事项

1. 为避免交叉污染，在加入不同样本和不同试剂时都需更换吸头。
2. 实验开始前确保所有的组分及设备处于合适的温度。
3. 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

相关产品：

PMK0992 EdU-488 法细胞增殖成像检测试剂盒

更多产品详情了解，请关注公众号：