

EdU-488 法细胞增殖成像检测试剂盒

货号：PMK0992

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-488 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)	100 μ L	500 μ L	-20℃
洗液 (5 \times)	12mL	60mL	-20℃
488 染料	20 μ L	100 μ L	-20℃，避光保存
反应缓冲液 (10 \times)	1mL	5mL	4℃
铜试剂	0.4mL	2mL	4℃
还原剂	100mg	5 \times 100mg	-20℃
DAPI (500 \times)	24 μ L	120 μ L	-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 \times)：向洗液 (5 \times) 中添加磷酸盐缓冲液 (PBS)，将 5 \times 母液稀释成 1 \times 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。

488 染料：即用型；使用前，平衡到室温；-20℃避光保存。

反应缓冲液 (10 \times)：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。

产品说明书

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. 在最合适的条件下孵育细胞 2 h (根据细胞扩增时间确定, 一般肿瘤细胞的孵育时间为 2 h);
5. 孵育后除去培养基, 并向每个孔中加入 0.1 mL 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 0.1 mL 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 0.1 mL 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 15min;
- (2) 除去固定液, 用适量洗液 (1×) 浸洗 5min, 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 15min;
- (4) 除去通透剂, 用适量洗液 (1×) 浸洗 5min, 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 3min; 然后依次在 95%、85%、75% 和 50% 乙醇中洗涤 3min; 最后在 PBS 中洗涤 5min。
- (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 100 μL 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。

产品说明书

组分	体积
去离子水	758 μ L
反应缓冲液 (10 \times)	100 μ L
铜试剂	40 μ L
488 染料	2 μ L
还原剂 (10 \times)	100 μ L
总体积	1mL

2. 向每个样品中加入 100 μ L 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 \times) 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 500 μ l 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 \times DAPI) 或抗体标记；

细胞核染色：(1) 每孔加 0.1mL 的 1 \times DAPI 溶液，室温避光孵育 10min。

(2) 吸除 1 \times DAPI 溶液，用 0.1 mL 洗液 (1 \times) 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 = 501/525nm)，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：

PMK0993 EdU-555 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：

