

Product Manual

产品说明书

产品信息

货号	名称	规格
PR01067	通用型 BFTM 488 Click-iT EdU 细胞增殖检测试剂盒 (AF, 绿色)	20 T
PR01067		100 T
PR01067		500 T
PR01068	通用型 BFTM 555 Click-iT EdU 细胞增殖检测试剂盒 (YF, 橙红色)	20 T
PR01068		100 T
PR01068		500 T
PR01069	通用型 BFTM 594 Click-iT EdU 细胞增殖检测试剂盒 (AF, 红色)	20 T
PR01069		100 T
PR01069		500 T
PR01071	通用型 BFTM 647A Click-iT EdU 细胞增殖检测试剂盒 (AF, 远红外)	20 T
PR01071		100 T
PR01071		500 T

产品介绍

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，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。点击法的 EdU 标记增殖快速有效、易于使用，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；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。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。

应用范围

细胞增殖、分化、生长与发育、DNA 损伤修复、病毒复制等方面的研究

储运条件

-20℃ 避光保存，有效期见外包装；开封后，保存温度详见说明书。冰袋运输。

产品特点

- 简单高效：无需抗原抗体反应，基于小分子化学反应的检测方法简单高效，反应仅需要几分钟；
- 灵敏度高：无需抗体，检测染料仅 BrdU 抗体的 1/500，很容易扩散，即便是单个增殖细胞也能准确检测；
- 快速省时：无需过夜，省却了抗原抗体反应的复杂繁琐步骤，完成整个检测周期仅需 5 小时。

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. 可设置未进行 EdU 处理的细胞经 YF® Dye Azide 染色作为阴性对照样品，用于确定合适的检测条件，此设置对干流式细胞术检测尤为重要，可以明确阴性信号的强度以划分阴性信号跟阳性信号的界限。

5. 本产品仅限于科研，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

自备材料

1. 耗材

96/24/12/6 孔培养板或培养皿

2. 试剂

- (1) 10 mM PBS, pH 7.2~7.6
- (2) 4% 多聚甲醛固定液 (in PBS)
- (3) 促渗试剂 (0.5% Triton X-100 in PBS)
- (4) 2 mg/mL 甘氨酸溶液 (in ddH₂O)
- (5) 3% BSA in PBS, pH 7.2~7.6
- (6) 1% BSA in PBS, pH 7.2~7.6
- (7) ddH₂O

操作步骤

1. 荧光显微镜检测方法

(1) 细胞培养

取对数生长期细胞，以每孔 $4 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ 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

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，可参考表 3 和表 4。

2) 细胞培养箱中孵育 2 h。

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 2 h 的孵育时间，可参考表 3。EdU 浓度与孵育时间相关，短时间孵育 (< 2 h) 宜采用高浓度，如：10~50 μ M；长时间孵育 (> 24 h) 宜采用低浓度，如：1~10 μ M；也可参考表 5。

(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。

1) 孵育完成后，去除培养基。以 $1 \times$ PBS 清洗细胞两次，每次 5 min，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 μ L 4% 多聚甲醛固定液，室温孵育 20 min 后，去除固定液。

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

3) 以每孔 100 μ L 3% BSA 洗涤细胞 2 次。

4) 去除洗涤液，加入 100 μ L 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 μ L 的工作液，用户可以根据自己的样本情况调整用量。

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。

2) 配置 $5 \times$ Click-iT EdU 缓冲液添加物 (组分 E)：加 300 μ L 的 ddH₂O 至 30 mg 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 $^{\circ}$ 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。

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。

4) 依据表 1 准备 Click-iT 工作液。

表 1 Click-iT 工作液

反应组分	以 10 个孔的样本数为例
1 × Click-iT EdU 反应缓冲液	855 μL
CuSO4 (组分 D)	40 μL
YF® 488/555/594/647A Azide (组分 B)	5 μL
1 × Click-iT EdU 缓冲液添加物	100 μL
总体积	1 mL

- 5) 去除促渗剂，每孔 100 μL 的 3% BSA 洗涤液洗涤 2 次。
- 6) 每孔加入 100 μL Click-iT 工作液，均匀覆盖细胞。
- 7) 室温避光孵育 30 min。
- 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) DNA 复染 (可选)

- 1) 用 100 μL PBS 洗涤细胞 1 次，去除洗涤液。
- 2) 用 PBS 将 Hoechst 33342 活细胞 DNA 染料 (蓝色) (组分 F) 稀释 2000 倍。
- 3) 每孔加 100 μL 1 × Hoechst 33342 活细胞 DNA 染料 (蓝色) 溶液，室温避光孵育 15-30 min。
- 4) 去除 Hoechst 33342 活细胞 DNA 染料 (蓝色) 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 °C 条件下避光湿润保存 3 天之内完成拍照。

2.流式细胞仪检测方法

(1) 细胞培养

每孔 1 × 10⁵~3 × 10⁶ 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

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 μM 的初始浓度进行摸索。预实验中，建议设置 EdU 浓度梯度，可参考表 3 和表 4。

2)细胞培养箱中孵育 2 h。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 2 h 的孵育时间，可参考表 3。EdU 浓度与孵育时间相关，短时间孵育 (< 2 h) 宜采用高浓度，如：10~50 μM；长时间孵育 (> 24 h) 宜采用低浓度，如：1~10 μM；也可参考表 4。

(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。

- 1) 孵育完成后，收集细胞，每管加入 1 mL 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。
- 2) 每管加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定液重悬细胞。
- 3) 室温孵育 20 min，1000 rpm 离心 5 min，吸弃上清。
- 4) 每管加入 1 mL 2 mg/mL 甘氨酸孵育 5 min，中和残留的固定液，1000 rpm 离心 5 min，吸弃上清，每管加入 1 mL PBS 清洗 1 次，1000 rpm 离心 5 min，吸弃上清。
- 5) 每管加入 1 mL 0.5% Triton X-100 促渗液重悬细胞，室温孵育 10 min。

(5) EdU 检测

注：针对 6 孔板样本可参考每孔 1 mL 的工作液来进行，用户可以根据自己的样本情况调整用量。

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

2) 配置 5 × Click-iT EdU 缓冲液添加物 (组分 E) : 加 300 μL 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 × 储液备用。

3) 准备 1 × Click-iT EdU 缓冲液添加物: 以 ddH₂O 稀释 5 × Click-iT EdU 缓冲液添加物储液至 1 ×, 溶液应现配现用。

4) 依据表 2 准备 Click-iT 工作液。

表 2 Click-iT 工作液

反应组分	单次反应所需加液体积
1 × Click-iT EdU 反应缓冲液	875 μL
CuSO ₄ (组分 D)	20 μL
YF® 488 / 555 / 594 / 647A Azide (组分 B)	5 μL
1 × Click-iT EdU 缓冲液添加物	100 μL
总体积	1 mL

5) 1000 rpm 离 5 min, 吸弃上清, 去除促渗剂, 每管加入 1mL 的 1% BSA 洗涤液洗涤 2 次, 1000 rpm 离 5 min, 吸弃上清。

6) 每管加入 1 mL Click-iT 工作液, 混匀。

7) 室温避光孵育 30 min。

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) DNA 复染

1) 用 100 μL PBS 洗涤细胞 1 次, 去除洗涤液。

2) 用 PBS 将 Hoechst 33342 活细胞 DNA 染料 (蓝色) (组分 F) 稀释 2000 倍。

3) 每孔加 100 μL 1 × Hoechst 33342 活细胞 DNA 染料 (蓝色) 溶液, 室温避光孵育 15~30 min。

4) 去除 Hoechst 33342 活细胞 DNA 染料 (蓝色) 溶液, 用 100 μL PBS 洗涤细胞 2 次。

(7) 细胞内抗原标记 (可选)

1) 加入抗体工作液, 混匀。

2) 避光条件下, 以合适的温度及时间孵育抗体。

(8) 流式检测及分析

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 °C 湿润保存待测, 但不应超过 3 天。

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 (五) 8 中的清洗次数。

3.结果展示

(1) 图 1 使用 EdU 对增殖的 HeLa 细胞进行细胞增殖分析

用 EdU 孵育 HeLa 细胞 2 小时, 然后固定、促渗并用 YF® Dye 叠氮化物和 Hoechst 33342 活细胞 DNA 染料 (蓝色) 染色。结果是根据 HeLa 细胞的光散射特征通过荧光显微镜拍照得出。

(2) 图 2 使用 EdU 对增殖的 HeLa 细胞进行细胞周期分析

用 EdU 孵育 HeLa 细胞 2 小时, 然后固定、促渗并用 YF® Dye 叠氮化物和 Hoechst 33342 活细胞 DNA 染料 (蓝色) 染色。细胞周期的不同区段可通过 DNA 含量和 EDU 结合。结果是根据 HeLa 细胞的光散射特征通过流式细胞仪画门分析得出的。

(3) 图 3 使用 EdU 对增殖的 HeLa 细胞进行细胞增殖分析

用 EdU 孵育 HeLa 细胞 2 小时, 然后固定、促渗并用 YF® Dye 叠氮化物染色。结果是根据 HeLa 细胞的光散射特征通过流式细胞仪画门分析得出的。

