

Meilun EdU Cell Proliferation Kit with Alexa Fluor 488 (suitable for FACS、FM)

EdU-488 细胞增殖检测试剂盒(适用于 FACS、FM)

产品编号: MA0424 规格: 50-500T

产品内容

产品组成	MA0424 50-500T
EdU(10mM)	200 μ l
488-Azide	55 μ l
Click-iT Reaction Buffer	30 ml
CuSO ₄	1.1 ml
Click-iT Additive	2 管 (Add 1.3ml/tube ddH ₂ O to dissolve)
Hoechst 33342(1000X)	50 μ l
说明书	1 份

产品简介

美仑EdU-488细胞增殖检测试剂盒(Meilun EdU Cell Proliferation Kit with Alexa Fluor 488), 是一种利用核苷渗入法对细胞增殖情况进行快速、简单、高灵敏检测的试剂盒。其原理为: 试剂盒中的EdU(5-ethynyl-2'-deoxyuridine)是一种胸苷(T)类似物, EdU可以在在细胞周期的S期中替代胸苷掺入到新合成的DNA中; 另一方面, EdU上的乙炔基能与叠氮化物(如荧光探针Alexa Fluor 488 Azide)通过Cu⁺的催化发生共价反应, 形成稳定的三唑环, 该反应非常迅速, 被称作点击反应(Click reaction) (图1)。通过点击反应, 新合成的DNA会被绿色荧光标记, 然后通过检测荧光信号实现细胞增殖的检测。

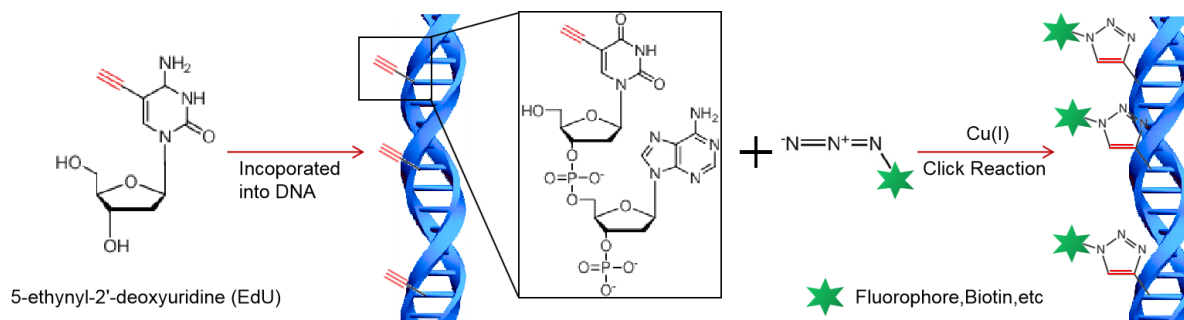


图1. EdU法中的点击反应原理图。掺入到细胞DNA中的EdU与荧光探针或生物素等标记的叠氮化物, 在铜离子的催化下发生共价反应, 形成稳定的三唑环, 使细胞DNA标记上荧光探针或生物素。

细胞增殖检测是评估细胞活性、遗传毒性及抗肿瘤药物效果等的基础实验手段。细胞增殖检测的方法按照原理通常可以分为五类：膜损伤检测、代谢活性检测、ATP水平测定、DNA合成检测和细胞荧光标记检测法。目前公认的最精确的检测细胞增殖的方法是直接检测细胞中DNA的合成，即核苷渗入法。以前常用的核苷渗入法是BrdU(胸腺嘧啶核苷酸类似物)法，但BrdU法的缺点是需要变性DNA后才能与抗体结合，导致了DNA双链结构的破坏，影响了其他染料的结合染色，导致染色弥散，准确性降低等问题。EdU法作为新型的核苷渗入法具有以下优点：

- ◆ 安全-----不使用 $[3H]$ thymidine，无放射性污染。
- ◆ 简单-----基于小分子化学反应的检测方法，简单高效，仅需三步：EdU孵育；细胞固定；荧光检测。无需DNA变性和孵育抗体。
- ◆ 快速-----无需过夜，省却抗原抗体反应。整个检测过程只需 2.5 小时，大大缩短实验周期。
- ◆ 准确-----标记率高且无需DNA变性(酸解、热解、酶解等)，可有效避免变性带来的样品损伤，确保细胞核边缘清晰完。
- ◆ 灵敏-----无需抗体，检测染料仅为BrdU抗体的1/500，更容易扩散，即使单个增殖细胞也能准确检测。
- ◆ 兼容-----对样品几乎无损伤，允许与多种抗体或荧光蛋白同时标记，能够同时检测细胞其他性状特征。

本试剂盒适用于培养的细胞或组织样品，也适用于组织切片，可以检测到细胞或组织样本中的单个增殖细胞，也可以对细胞或组织样本总体的细胞增殖情况进行定量分析。本试剂盒包含EdU法检测所需要的所有组份，同时提供了蓝色细胞核染料Hoechst 33342，可以用来复染所有细胞核，也可用于细胞周期分析。

使用本试剂盒所做结果可以用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪或荧光酶标仪进行检测，也可以用于高内涵筛选(High-Content Screening, HCS)。

针对6孔板培养的细胞（每孔500 μ l的Click反应液），MA0424可以提供50个孔反应的量；MA0424-L可以提供200个孔反应的量。针对96孔板培养的细胞（每孔50 μ l的Click反应液），MA0424可以提供500个孔反应的量；MA0424-L可以提供2000个孔反应的量（不同容器细胞Click反应液的具体用量可参考表1）。针对每管细胞数量为10-100万的流式细胞仪检测（每管500 μ l的Click反应液），MA0424可以提供50管反应的量，MA0424-L可以提供200管反应的量。针对冰冻或石蜡切片的检测（每个样品100-200 μ l的Click反应液），MA0424可以提供125-250个样品反应的量，MA0424-L可以提供500-1000个样品反应的量。

光谱特性：488-Azide：绿色荧光，Ex/Em=491/518 nm；Hoechst 33342：蓝色荧光，Ex/Em=346/460nm, bound to DNA。

操作步骤

1. 需自备试剂

- (1) 10mM PBS, pH7.2-7.6 (美仑货号: MA0015)。
- (2) 固定液-----4%多聚甲醛in PBS (美仑货号: MA0192)。
- (3) 洗涤液-----3% BSA in PBS, pH7.2-7.6。
- (4) 通透液-----0.3~0.5% Triton X-100 in PBS。
- (5) 去离子水或超纯水。

2. 检测体系的确定

(1) 以下操作步骤是以**6孔板**或**常规切片**检测体系为例的, 如果使用其他容器, 检测体系可以相应按比例调整, 具体检测时Click反应液的使用量请参考表1。

(2) 以下操作步骤是以贴壁细胞或组织切片为例的, 如果检测的是悬浮细胞, 请按常规的悬浮细胞的操作方式进行, 比如在相关步骤中增加离心步骤等。细胞数在10-100万的悬浮细胞可以使用500 μ l的检测体系, 可以根据细胞数的多少相应调整检测体系。

表1. Click反应液的使用量参考

细胞接种容器	384孔板	96孔板	48孔板	24孔板	12孔板	6孔板	5.5cm皿
Click反应液体积	20 μ l	50 μ l	70 μ l	100 μ l	200 μ l	500 μ l	1ml

3. EdU标记与固定、通透

3.1 对于培养细胞

(1) 将适当数量的待测细胞接种于6孔板中, 培养过夜至恢复正常状态后, 进行所需要的药物处理或者其它刺激处理。

(2) 配制2XEdU工作液: 用完全培养基稀释EdU(10mM)至合适的浓度, 配成2X的EdU工作液。例如, 推荐的EdU工作液(1X)的终浓度为10 μ M, 那么需要用完全培养液1:500稀释EdU(10mM)至浓度为20 μ M, 即配成2XEdU工作液(20 μ M)。

【注】EdU的使用浓度应根据所使用的的细胞类型做相应的优化, 推荐用户以10 μ M的EdU初始浓度进行摸索优化, 一般的贴壁肿瘤细胞使用10 μ M就可以。细胞培养基种类、细胞类型、细胞生长密度和增殖速度等多方面因素都有可能影响EdU的掺入效果, 因此建议用户在预实验中设置一系列的EdU浓度梯度, 以

确定最佳浓度。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。您也可以参考附表1.细胞实验EdU孵育浓度及时间参考。

(3) 37℃预热2XEdU工作液，等体积加入6孔板中，使6孔板中的EdU终浓度变为1X。例如如果终浓度为10μM，6孔板中每孔原来有培养基1ml，则将1ml 2XEdU工作液(20μM)加入到每孔中。如果培养基原有体积过大，可以先吸除适量的培养基，再加入与剩下培养基等体积的2XEdU工作液；或者可以增加EdU的浓度并减少工作液的体积，例如2ml培养液中加入220μl 10XEdU工作液(100μM)。

【注】更换所有的培养液可能会对细胞的增殖有影响，因此不建议更换所有的培养液。

(4) 继续孵育细胞适当时间。该孵育时间的长短取决于细胞生长速率，通常宜继续孵育细胞周期10%左右的时间。您也可以参考附表2.常见细胞系EdU孵育时间参考。

【注】孵育时间小于45min时，建议提高EdU的浓度；孵育时间大于20h时，建议适当降低EdU的浓度。

(5) EdU标记完成后，去除培养基。

【注】若最后做流式检测，样本为贴壁细胞，则用胰酶将细胞消化下来，收集细胞，之后每一步去除液体的步骤都需要500-1000×g离心3-5min，

(6) 加入1ml 固定液，室温固定15-30min。

(7) 去除固定液，以每孔1ml的洗涤液洗涤细胞3次，每次3-5min。

(8) 去除洗涤液，加入1ml通透液，室温孵育10-15min。

(9) 去除通透液，以每孔1ml的洗涤液洗涤细胞1-2次，每次3-5min。

(10) 转步骤4。

3.2 对于组织切片样本

可以通过注射或进食等方式进行动物体内的EdU标记。以下是以小鼠为例的，其它动物体内EdU标记条件请参考相关文献，也可以参考附表3进行条件优化。

(1) 用PBS配制成一定浓度的EdU，对于小鼠，可按照10-200mg/kg的用量进行腹腔注射、特定组织或器官局部注射或者加入饮用水。

【注】EdU具体用量与动物的种类、体重和使用方式有关，可以参考相关文献，因此建议用户在预实验中设置一系列的EdU浓度梯度，以确定最佳浓度。推荐用户以50mg/kg的EdU初始浓度进行摸索优化。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。或者直接使用50mg/kg的浓度进行测试。也可以参考附表2。

(2) EdU标记4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标记的时间也根据相关参考文献自行调整。

(3) 对于冰冻切片：

a. 加入适量固定液，室温固定15min。

b. 去除固定液，用适量洗涤液洗涤3次，每次3-5min。

c. 去除洗涤液，加入适量通透液，室温孵育10-15min。

d. 去除通透液，用适量洗涤液洗涤1-2次，每次3-5min。

e. 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（美仑货号：MB9895）进行抗原修复处理。

f. 转步骤4。

(4) 对于石蜡切片：

a. 脱蜡：二甲苯中脱蜡5-10min。换用新鲜的二甲苯，再脱蜡5-10min。无水乙醇5min，换新的无水乙醇3min。95%乙醇3min。85%乙醇3min。75%乙醇3min。50%乙醇3min。PBS 5min。

b. 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，可以使用适当的抗原修复液（美仑货号：MA0184、MA0188）进行抗原修复处理。

【注】如果使用蛋白酶K或胰酶进行抗原修复，修复后须反复洗涤干净，避免残留的酶干扰后续标记反应。

c. 转步骤4。

4. EdU检测

【注】本参考步骤每个样品的反应体系为500μl的Click反应液。用户可根据自己的样本情况参考表1适当调整。对于切片，可以根据切片大小，每个切片使用100-200μl的Click反应液，其余步骤相同。

(1) 配制Click-iT Additive Solution：对于MA0424，用1.3ml去离子水/管溶解Click-iT Additive；对于MA0424-L，用10.4ml去离子水/瓶溶解Click-iT Additive。混匀至全部溶解，即为Click-iT Additive Solution。配制后请按照每次用量适当分装，并-20℃保存，溶液一旦呈现棕色，则说明有效成分降解不能再用。

(2) 请参考下表配制Click反应液。

【注】请严格按照下表中组分顺序和体积配制Click反应液，否则Click反应可能无法有效进行。Click反应液须在配制后15分钟内使用。

组分	以 6 孔板为例的样品数				
	1	2	5	10	50
Click-iT Reaction Buffer	430µl	860µl	2.15ml	4.3ml	21.5ml
CuSO ₄	20µl	40µl	100µl	200µl	1ml
488-Azide	1µl	2µl	5µl	10µl	50µl
Click-iT Additive Solution	50µl	100µl	250µl	500µl	2.5ml
总体积	500µl	1ml	2.5ml	5ml	25ml

(3) 去除上一步骤中的洗涤液。每孔加入500µl Click反应液，轻轻摇晃培养板以确保Click反应液可以均匀覆盖样品。

(4) 室温避光孵育30min。

(5) 吸除Click反应液，以每孔1ml的洗涤液洗涤细胞3次，每次3-5min。

(6) 此时增殖细胞被标记了明亮的绿色荧光。如无其它特殊要求，即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。488-Azide的最大激发波长是491nm，最大发射波长是518nm。如果需要检测细胞增殖的比例，可以参照步骤5对细胞核进行复染。

5. 细胞核染色

(1) 1X Hoechst 33342溶液的配制：用PBS按1:1000比例稀释Hoechst 33342(1000X)。

(2) 吸除步骤5(5)洗涤液，每孔加1ml的1X Hoechst 33342溶液，室温避光孵育10min。

(3) 吸除1X Hoechst 33342溶液，以每孔1ml的洗涤液洗涤细胞3次，每次3-5min。

(4) 随后即可进行荧光检测。Hoechst 33342为蓝色荧光，最大激发波长为346nm，最大发射波长为460nm。

保存条件

-20℃保存，一年有效。488-Azide和Hoechst 33342(1000X)须避光保存。

注意事项

1. 羟基脲(Hydroxyurea) (美仑货号: MB1307) 为 DNA 合成抑制剂, 经过 10mM 羟基脲提前 30min 处理的细胞, 绿色荧光阳性的细胞几乎完全消失, 因此常被用作 EdU 实验的阴性对照。
2. 配制好的 Click-iT Additive Solution 请根据每次用量适当分装后-20℃保存, 避免反复冻融。Click-iT Additive Solution 融化后有白色物质析出为正常现象, 请上下颠倒几次, 待全部溶解后使用。溶液一旦呈现棕色, 则说明有效成分降解, 不能再使用。
3. 皂苷促渗液可以用于全血及含红细胞的细胞悬液, 以及其他含多种细胞类型的混合细胞悬液的通透。这种促渗液可以在裂解红细胞的同时, 维持白细胞的光散射特性。
4. 本试剂盒做动物实验时可能需要更多的 EdU (美仑货号: MB3074), 请根据实验需求用合适稀释液稀释后使用。
5. 由于本产品涉及到铜离子催化进行点击反应, 请注意以下的兼容性问题及解决方案。本产品完全兼容有机类染料如 Alexa Fluor®系列普通染料及 fluorescein (FITC)、Allophycocyanin (APC)及 APCE-tandems 染料; 对于 Qdot®纳米晶体探针、Horseradish peroxidase (HRP)、R-phycoerythrin (R-PE)和 R-PE-tandems 染料如 Alexa Fluor® 680-R-PE 等, 需要在点击反应完成后进行反应和检测; 本产品会影响 GFP、RFP、mCherry 等荧光蛋白的荧光, 对于荧光类蛋白如 GFP、TC-FIAsH™和 TC-ReAsH™类试剂, 需要在点击反应前进行反应和检测。Phalloidin (鬼笔环肽)不兼容点击反应, 在检测细胞微管时请选用其它探针。
6. 如需在传统流式仪上进行总 DNA 含量的检测, 可采取低流速检测。DNA 含量检测所用荧光检测信号应与 DNA 含量成线性关系。EdU 标记信号呈现对数放大可以很好的被检测到。
7. 为了您的安全和健康, 操作时请穿着实验服并佩戴一次性手套。

附表 1. 细胞实验 EdU 孵育浓度及时间参考

PubMed ID	Reference	Cell line	Concentration	Time
18272492	Salic A, <i>et al.</i> PNAS. 2008	NIH3T3, HeLa	10 nM~10 μM	1 h
18521918	Cappella P, <i>et al.</i> Cytometry A. 2008	HL-60, A2780, U2OS	1~10 μM	30 min
18996411	Chehrehasa F, <i>et al.</i> J Neurosci Methods. 2009	Neurospheres	1~20 μM	24 h
19179371	Limsirichaikul S, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res. 2009	Human primary fibroblasts	10 μM	0.5, 1, 2, 4 h
19253396	Warren M, <i>et al.</i> Dev Dyn. 2009	Chick embryos	10 μM~2 mM	4 h
19647746	Yu Y, <i>et al.</i> J Immunol Methods. 2009	Spleen cells	50 μM	24 h
19544417	Momcilović O, <i>et al.</i> Stem Cells. 2009	Human ES cells	10 μM	30 min
20080700	Cinquin O, <i>et al.</i> PNAS. 2010	emb-30	1 μM	12 h

20025889	Han W, <i>et al.</i> Life Sci. 2009	VSMC	50 μ M	2 h
20659708	Huang C, <i>et al.</i> J Genet Genomics. 2010	ESC	50 μ M	2 h
21310713	Hua H, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res. 2011	fission yeast strains	10 μ M	3 h
20824490	Lv L, <i>et al.</i> Mol Cell Biochem. 2011	EJ cells	50 μ M	4h
21248284	Yang S, <i>et al.</i> Biol Reprod. 2011	GC cells	50 μ M	2 h
21227924	Zhang YW, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res. 2011	U2OS, HT29	30 μ M	90 min
21829621	Guo T, <i>et al.</i> PloS One. 2011	HIT-T15	50 μ M	4h
21980430	Zeng T, <i>et al.</i> PloS One. 2011	MCF-10A	25 μ M	2h
22012572	Ding D, <i>et al.</i> Int Orthop. 2011	C3H10T1/2	10 μ M	24h
22000787	Zeng W, <i>et al.</i> Biomaterials. 2011	EPC	50 μ M	4h
21913215	Xue Z, <i>et al.</i> J Cell Biochem. 2011	SGC7901	25 μ M	24h
22016038	Peng F, <i>et al.</i> Lasers Med Sci. 2011	MSC	50 μ M	2h
21878637	Li D, <i>et al.</i> J Biol Chem. 2011	HCC	50 μ M	2h

附表 2. 常见细胞系 EdU 孵育时间参考

细胞系	人胚胎细胞	酵母细胞	小鼠胚胎成纤维细胞 NIH/3T3	人宫颈癌细胞 Hela	人肾细胞系 HEK293	人神经细胞
细胞周期	~30min	~3h	~18h	~21h	~25h	~5d
孵育时间	5min	20min	2h	2h	2h	1d

附表 3. 动物实验 EdU 标记时间及剂量参考

PubMed ID	Reference	Species	Method	Amount	Time	Tissue
18272492	Salic A, <i>et al.</i> PNAS. 2008	Mice	腹腔注射	100 μ g	96h	脑
19554638	Kaiser CL, <i>et al.</i> Laryngoscope. 2009	Chicken	皮下注射	50mg/kg	72h	耳蜗
19494148	Guo F, <i>et al.</i> J Neurosci. 2009	Mice	腹腔注射	100mg/kg	3h	脑
19179611	Veres.TZ, <i>et al.</i> Am J Pathol. 2009	Mice	腹腔注射	50mg/kg	3h/20h	-
20664699	Wiley LA, <i>et al.</i> Mol Vis. 2010	Mice	腹腔注射	100~200 μ g	1h	眼
20163731	Schmidt EJ, <i>et al.</i> BMC Dev Biol. 2010	Mice	腹腔注射	200 μ g	30min	胚胎
20064490	Zeng C, <i>et al.</i> Brain Res. 2010	Mice	腹腔注射	50mg/kg	4h~30d	脑
20038597	Janas ML, <i>et al.</i> J Exp Med. 2010	Mice	腹腔注射	100 μ g	4h	胸腺
21145612	Sun H, <i>et al.</i> J Hepatol. 2011	Mice	腹腔注射	100 μ g	72h	-