

## Meilun EdU Cell Proliferation Kit with Alexa Fluor 555 (suitable for FACS、FM)

### EdU-555 细胞增殖检测试剂盒(适用于 FACS、FM)

产品编号: MA0425 规格: 50-500T

#### 产品内容

产品组成	MA0425
EdU(10mM)	200 $\mu$ l
555-Azide	55 $\mu$ l
Click-iT Reaction Buffer	30 ml
CuSO <sub>4</sub>	1.1 ml
Click-iT Additive	2 管 (Add 1.3ml/tube ddH <sub>2</sub> O to dissolve)
Hoechst 33342(1000X)	50 $\mu$ l
说明书	1 份

#### 产品简介

美仑EdU-555细胞增殖检测试剂盒(Meilun EdU Cell Proliferation Kit with Alexa Fluor 555), 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 555 Azide)通过Cu<sup>+</sup>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会被红色荧光标记, 然后通过检测荧光信号实现细胞增殖的检测。

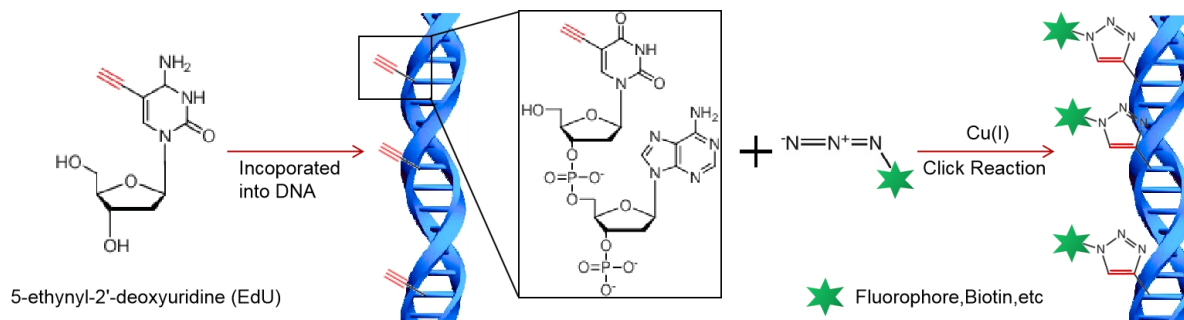


图1. EdU法中的点击反应原理图。掺入到细胞DNA中的EdU与荧光探针或生物素等标记的叠氮化物, 在铜离子的催化下发生共价反应, 形成稳定的三唑环, 使细胞DNA标记上荧光探针或生物素。

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500µl的Click反应液），本试剂盒可以提供50个孔反应的量；针对96孔板培养的细胞（每孔50µl的Click反应液），本试剂盒可以提供500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500µl的Click反应液），本试剂盒可以提供50管反应的量；针对冰冻或石蜡切片的检测（每个样品100-200µl的Click反应液），本试剂盒可以提供125-250个样品反应的量。

光谱特性：555-Azide：红色荧光，Ex/Em=555/567 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 $\mu$ 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 $\mu$ l	50 $\mu$ l	70 $\mu$ l	100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	500 $\mu$ 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 $\mu$ M, 那么需要用完全培养液1:500稀释EdU(10mM)至浓度为20 $\mu$ M, 即配成2XEdU工作液(20 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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：用1.3ml去离子水/管溶解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 <sub>4</sub>	20µl	40µl	100µl	200µl	1ml
555-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红色荧光。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。555-Azide的最大激发波长是555nm，最大发射波长是567nm。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。555-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, 红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 μM	2 h
20659708	Huang C, <i>et al.</i> J Genet Genomics. 2010	ESC	50 μM	2 h
21310713	Hua H, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res. 2011	fission yeast strains	10 μM	3 h
20824490	Lv L, <i>et al.</i> Mol Cell Biochem. 2011	EJ cells	50 μM	4h
21248284	Yang S, <i>et al.</i> Biol Reprod. 2011	GC cells	50 μM	2 h
21227924	Zhang YW, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res. 2011	U2OS, HT29	30 μM	90 min
21829621	Guo T, <i>et al.</i> PloS One. 2011	HIT-T15	50 μM	4h
21980430	Zeng T, <i>et al.</i> PloS One. 2011	MCF-10A	25 μM	2h
22012572	Ding D, <i>et al.</i> Int Orthop. 2011	C3H10T1/2	10 μM	24h
22000787	Zeng W, <i>et al.</i> Biomaterials. 2011	EPC	50 μM	4h
21913215	Xue Z, <i>et al.</i> J Cell Biochem. 2011	SGC7901	25 μM	24h
22016038	Peng F, <i>et al.</i> Lasers Med Sci. 2011	MSC	50 μM	2h
21878637	Li D, <i>et al.</i> J Biol Chem. 2011	HCC	50 μM	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	100μg	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	100~200μg	1h	眼
20163731	Schmidt EJ, <i>et al.</i> BMC Dev Biol. 2010	Mice	腹腔注射	200μg	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	100μg	4h	胸腺
21145612	Sun H, <i>et al.</i> J Hepatol. 2011	Mice	腹腔注射	100μg	72h	-