

EdU-594 细胞增殖检测试剂盒（适用于 FACS、FM）

产品编号：MA0426 规格：50-500T

产品内容

产品组成	MA0426-1 50-500T
EdU (10mM)	200μL
594-Azide	55μL
Click-iT Reaction Buffer	30mL
CuSO ₄	1.1mL
Click-iT Additive	2 管 (Add 1.3mL/tube ddH ₂ O to dissolve)
Hoechst 33342 (1000×)	50μL
说明书	1 份

产品简介

EdU-594 细胞增殖检测试剂盒 (EdU Cell Proliferation Kit with Alexa Fluor 594)，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 594 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。

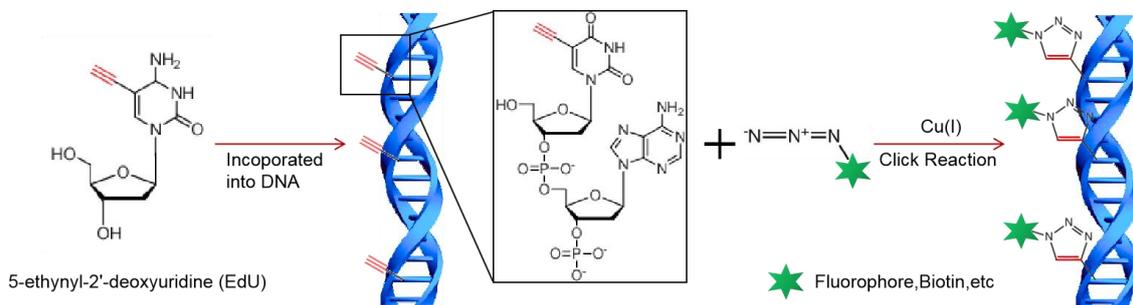


图 1. EdU 法中的点击反应原理图。掺入到细胞 DNA 中的 EdU 与荧光探针或生物素等标记的叠氮化物，

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整。
- ◆ 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），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 50 μ L 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 500 μ L 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 100-200 μ L 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：594-Azide：红色荧光， $E_x/E_m=594/618\text{nm}$ ；Hoechst 33342：蓝色荧光， $E_x/E_m=346/460\text{nm}$ ，bound to DNA。

使用方法

（一）自备试剂

- （1）10mM PBS，pH 7.2-7.6（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，pH 7.2-7.6。
- （4）通透液-----0.3~0.5% Triton X-100 in PBS。
- （5）去离子水或超纯水。



（二）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，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，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，如 1000×g 室温离心 5min。细胞数在 10-100 万的悬浮细胞可以使用 500μL 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	20μL	50μL	70μL	100μL	200μL	500μL	1mL

（三）EdU 标记与固定、通透

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

【注】EdU 的使用浓度应根据所使用的细胞类型做相应的优化，推荐用户以 10μM 的 EdU 初始浓度进行摸索优化，一般的贴壁肿瘤细胞使用 10μM 就可以。细胞培养种类、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 3.细胞实验 EdU 孵育浓度及时间参考。

（3）37℃ 预热 2×EdU 工作液，等体积加入 6 孔板中，使 6 孔板中的 EdU 终浓度变为 1×。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 2×EdU 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 2×EdU 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 10×EdU 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。

【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。您也可以参考附表 1.常见细胞系 EdU 孵育时间参考。

（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（四）EdU 检测。

■ 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。以下以小鼠为例，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 2 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进行抗原修复处理。

f. 转步骤（四）EdU 检测。

(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（四）。

（四）EdU 检测

【注】本参考步骤每个样品的反应体系为 500 μ L 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 100-200 μ L 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 ₄	20μL	40μL	100μL	200μL	1mL
594-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。594-Azide 的最大激发波长是 594nm，最大发射波长是 618nm。如果需要检测细胞增殖的比例，可以参照步骤（五）对细胞核进行复染。

（五）细胞核染色

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

(2) 吸除步骤四（5）洗涤液，每孔加 1mL 的 1×Hoechst 33342 溶液，室温避光孵育 10min。

(3) 吸除 1×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，自生产之日起 12 个月有效。594-Azide 和 Hoechst 33342（1000×）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. 如需在传统流式细胞仪上进行总 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. 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 2. 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	-



附表 3. 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 μ M	1 h
18521918	Cappella P, <i>et al.</i> Cytometry A. 2008	HL-60, A2780, U2OS	1~10 μ M	30 min
18996411	Chehrehasa F, <i>et al.</i> J Neurosci Methods. 2009	Neurospheres	1~20 μ M	24 h
19179371	Limsirichaikul S, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res. 2009	Human primary fibroblasts	10 μ M	0.5, 1, 2, 4 h
19253396	Warren M, <i>et al.</i> Dev Dyn. 2009	Chick embryos	10 μ M~2mM	4 h
19647746	Yu Y, <i>et al.</i> J Immunol Methods. 2009	Spleen cells	50 μ M	24 h
19544417	Momcilović O, <i>et al.</i> Stem Cells. 2009	Human ES cells	10 μ M	30 min
20080700	Cinquin O, <i>et al.</i> PNAS. 2010	emb-30	1 μ M	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

