

Click-iT EdU-488 细胞增殖检测试剂盒(适用于 FACS/FM)

Click-iT EdU-488 Cell Proliferation Assay Kit(for FACS/FM)

使用说明书**◆货号及规格:**

目录编号	包装规格
C221-01	100T

◆产品组成:

组分编号	试剂盒组分	储存	C221-01(100T)
C221-1	EdU 储存液(10mM)	-20℃	100uL
C221-2	催化试剂(试剂 A)	4℃	120uL
C221-3	荧光染料 iF488(试剂 B)	-20℃	50uL
C221-4	催化添加剂(试剂 C)	-20℃	2*100mg
C221-5	反应缓冲液	4℃	20mL
C221-6	Hoechst 33342 染色液	-20℃	30uL

◆储存条件: 2-8℃运输, -20℃避光保存, 保质期 12 个月; 催化试剂(试剂 A)和反应缓冲液可 4℃保存。

◆产品概述:

细胞增殖能力的检测是评估细胞活性、基因毒性和抗肿瘤药物效果等的基本方法。目前检测细胞增殖的方法有很多。其中, 公认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。由于该方法有放射性污染且很难实现单细胞检测, 随后逐渐被基于抗体检测的 BrdU(Bromo-Deoxyuridine)法所替代。BrdU 法的缺点是需要变性 DNA 后才能与抗体结合, 导致 DNA 双链结构被破坏, 影响其他染料的结合, 染色弥散, 准确性降低等问题。不论是最初使用的放射性标记核苷掺入法, 还是后续改进的基于抗体检测的 BrdU 法, 都有着一定的自身局限性。

EdU(5-Ethynyl-2'-Deoxyuridine, 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷)是一种含有一个乙炔基团的胸腺嘧啶脱氧核苷类似物, 当将其注射到动物体内或者对体外培养的细胞进行孵育, 这些小分子能够迅速扩散到各个器官组织, 并渗入到细胞中, 可以在细胞增殖时期代替胸苷(T)掺入到新合成的 DNA 中。EdU 分子中的乙炔基团能与荧光标记的叠

氮化合物探针(如 AlexaFluor 488、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 647 等)在铜离子催化下发生点击反应(Click reaction)形成稳定的三唑环,因此可以使新合成的 DNA 被相应的荧光探针所标记。与另外两种方法相比,没有放射性污染,无需使用抗体、操作便捷、检测灵敏度高。

本试剂盒可用于检测体外培养的细胞或动物组织中细胞增殖情况。试剂盒中荧光探针为绿色荧光,最大激发波长为 491nm,最大发射波长为 516nm,处于增殖的细胞被标记后,细胞核会显示出明亮的绿色荧光,通过配套常规细胞核染料共同标记细胞核(本试剂盒提供 Hoechst 33342 细胞核染料),可用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜等仪器直接观察细胞增殖情况;也可以使用流式细胞仪检测体外培养细胞群荧光强度,根据荧光强度,来判断细胞周期中 S 期的 DNA 复制活性。

◆使用方法:

一、前期准备:

1. 将细胞按一定密度均匀种植于细胞培养板中(种植密度,由细胞大小、生长快慢等因素决定),待细胞贴壁或恢复正常状态后,进行相应的药物刺激等处理(如检测悬浮细胞,请按悬浮细胞常规操作方式进行,和贴壁细胞相比,相关步骤需添加离心步骤)。
2. 催化添加剂(试剂 C)低速离心,加入 1mL 超纯水溶解,并分装后于-20°C存放备用。

二、体外细胞 EdU 标记、固定及通透:

1. 2×EdU 工作液配制:每 1mL 培养基中加入 2μL EdU 存储液(10mM),即为 20μM 的 2×EdU 工作液,并放入培养箱中预热(对于 A549、HeLa 和 NIH/3T3 等贴壁细胞,推荐 EdU 的使用终浓度为 10μM。但细胞类型、培养液种类、细胞密度、细胞增殖速度等多方面的因素会影响 EdU 掺入到细胞中的量,因此初次使用时建议对 EdU 的使用浓度进行一定的摸索)。
2. 以半换液的模式,将培养板中原细胞培养基吸除一半,并补加等体积预热的 2×EdU 工作液,孵育一定的时间(孵育的时间一般取决于对应的细胞生长周期,通常占细胞周期 10%左右的时间。对于大多贴壁且生长较快的细胞,建议孵育 2h 左右。具体情况,需要随细胞特性、处理后实际情况等进行调整。如需孵育较长时间可适当降低 EdU 工作浓度;较短时间则可适当提 EdU 浓度)。
3. 将 EdU 标记孵育后的细胞样品,用 PBS 缓冲液清洗 1-2 次后,加入固定液,覆盖细胞即可,室温固定 15min(如需用流式检测,贴壁细胞此步之前先消化重悬后再固定,后续按悬浮细胞的处理方式即可);用 PBS 缓冲液洗涤 2-3 次,每次 3-5min。
4. 去除 PBS 缓冲液,加入通透液,覆盖细胞或组织即可,室温孵育 15min。

5. 去除通透液后使用 PBS 缓冲液洗涤 1-2 次，每次 3-5min，然后转至步骤四。

三、动物 EdU 注射造模以及组织切片处理：

1. 根据实验要求，以腹腔注射、肌肉注射、皮下注射、尾静脉注射等方式对动物进行一次或多次 EdU 注射造模，一般实验 EdU 用量和动物体重的比值为 5mg/kg，具体注射量根据研究内容和动物情况而定。
2. 小肠等上皮组织细胞增殖速度快，大脑等组织细胞增殖速度慢，生长较快的组织部位通常标记时间小于 12 小时，而生长较慢的组织标记时间可能需几天；最佳标记时间根据具体实验而定，由于小肠上皮组织增殖较快，建议取该类组织作为标记参考。
3. 将造模动物按照规定处死后，取出所需的组织，按照常规步骤制作冰冻切片或石蜡切片。
 - a) 对于冰冻切片：放置恢复到室温，加入适量固定液，室温固定 15min。去除固定液，用适量 PBS 缓冲液洗涤 3 次，每次 3-5min；去除 PBS 缓冲液，用适量通透液覆盖组织室温孵育 10-15min；去除通透液，用 PBS 缓冲液洗涤 1-2 次，每次 3-5min，然后转至步骤四；
 - b) 对于石蜡切片：切片脱蜡复水，PBS 洗涤 5min。去除 PBS 缓冲液，加入通透液，覆盖细胞或组织即可，室温孵育 15min；去除通透液后使用 PBS 缓冲液洗涤 1-2 次，每次 3-5min，然后转至步骤四。

四、EdU 检测：

1. 在细胞或组织固定和穿孔期间，配制点击反应液(对于不同样本配制体系参考以下表中方案。
 - a) 对于体外培养细胞：本参考步骤是对应 10 个 96 孔板样品的体积用量(每孔 100 μ L)，可根据使用需求，等比例增加或减少配制量，请按下表顺序依次添加组分，边加边混匀(现配现用)。

组分名称	体积
反应缓冲液	935 μ L
催化试剂(试剂 A)	10 μ L
荧光染料 iF488(试剂 B)	5 μ L
催化添加剂(试剂 C)	50 μ L
总体积	1000μL

- b) 对于组织细胞切片：参考下体系进行点击反应液体系的配制，可根据切样本数，等比例增加或减小配制量，每个切片样本约用 100-200 μ L 的点击反应液覆盖。

组分名称	体积
反应缓冲液	928uL
催化试剂(试剂 A)	10uL
荧光染料 iF488(试剂 B)	12uL
催化添加剂(试剂 C)	50uL
总体积	1000uL

2. 去除上一步的 PBS 缓冲液，加入点击反应液，轻摇保证反应液全部覆盖细胞或组织，室温避光孵育 30min。
3. 去除点击反应液，PBS 缓冲液洗涤 2-3 次，每次 3-5min(如无其他特别要求，即可用流式细胞仪检测其荧光强度或用其他仪器检测荧光效果)。

五、细胞核染色：

1. 去除上一步 PBS 缓冲液，将 Hoechst 33342 染色液与 PBS 缓冲液以 1 比 500-1000 比例稀释后，加入覆盖细胞，孵育 5min。
2. 去除 Hoechst 33342 染色液，PBS 缓冲液洗涤 2-3 次，每次 3-5min。

六、成像以及检测分析：

直接将体外培养的细胞或者组织切片样品置于荧光显微镜或共聚焦显微镜等仪器检测，分析处于增殖的细胞占比；或者收集体外培养的细胞，用流式细胞仪检测荧光强度(建议使用未经 EdU 标记的细胞样品作为流式细胞仪检测的阴性对照，并选择合适的电压)，根据荧光强度，来判断细胞周期中 S 期的 DNA 复制活性。本试剂盒荧光染料 iF488(试剂 B)对应的光谱特性为 Ex/Em: 491nm/516nm(绿色)；Hoechst 33342 染色液对应的光谱特性为 Ex/Em: 346nm/460nm(蓝色)。

◆注意事项：

1. 对于常见的哺乳动物细胞如 HeLa、3T3、HEK293 等，细胞周期大约在 18-25 小时，孵育时间宜在 2 小时左右。人胚胎细胞的细胞周期约 30 分钟，推荐的孵育时间为 5 分钟；酵母细胞的细胞周期约 3 小时，推荐的孵育时间为 20 分钟，增殖的神经细胞其细胞周期约 5 天，推荐的孵育时间为 1 天。孵育时间小于 45 分钟时，建议提高 EdU 的浓度；孵育时间大于 20 小时时，建议适当降低 EdU 的浓度。
2. 对于体外培养细胞，具体 EdU 使用浓度、孵育时间随样品以及研究目的的不同，可进行适当调整。
3. 部分组织细胞增殖速度缓慢，为了排除造模效果不佳等因素，建议选增殖快的组织样品作为参照样本(如肠道组织)。
4. 背景颜色过深可能是实验中洗涤不充分、组织样品固定时间过长、固定液残余导致。

5. EdU 催化添加试剂(试剂 C)易氧化，尽量避免长时间暴露于空气中，配制成水溶液后，建议分装保存；经测试，如 EdU 催化添加试剂颜色发生轻微变化，点击反应催化体系依旧能够正常进行，如呈现棕色，表明该组分已失效，请弃用。
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
7. 本产品仅限于专业人员科学研究使用，不得用于临床诊断和药品等用途。

=====

