

For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures

Version 2.0

# EdU-Alexa Fluor 488细胞增殖检测试剂盒(适用于FACS、FM)

EdU Cell Proliferation Kit with Alexa Fluor 488 (For FACS &amp; FM)



Do not eat

Store at -20° C &amp; in the dark.



Cat.No. MF7856

Size : 500 tests  2000 tests Technical literature is available at: [www.mesgenbio.com](http://www.mesgenbio.com).E-mail MesGen Technical Services if you have questions on use of this system: [tech@mesgenbio.com](mailto:tech@mesgenbio.com)

## 产品简介

EdU-Alexa Fluor 488细胞增殖检测试剂盒(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。其原理是试剂盒中的EdU(5-ethynyl-2'-deoxyuridine)是一种胸苷(T)类似物, EdU可以在细胞周期S期中替代胸苷渗入到新合成的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<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)。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。

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。

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DAPI, 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, 也可用于高内涵筛选(High-Content Screening, HCS)。

## 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。

## 包装说明

针对6孔板培养的细胞(每孔500µl的Click反应液), 小包装可以提供50个孔反应的量; 大包装可以提供200个孔反应的量。针对96孔板培养的细胞(每孔50µl的Click反应液), 小包装可以提供500个孔反应的量; 大包装可以提供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500µl的Click反应液), 小包装可以提供50管反应的量, 大包装可以提供200管反应的量。针对冰冻或石蜡切片的检测(每个样品100-200µl的Click反应液), 小包装可以提供125-250个样品反应的量, 大包装可以提供500-1000个样品反应的量。

耗材类型	Click反应液体积	耗材类型	Click反应液体积
384孔板	20 µl	12孔板	200 µl
96孔板	50 µl	6孔板	500 µl
48孔板	70 µl	3.5cm皿	600 µl
24孔板	100 µl	6cm皿	1000 µl

表1. Click反应液的使用量参考

## 光谱特性

488-Azide: 绿色荧光, Ex/Em=491/518 nm;

DAPI: 蓝色荧光, Ex/Em=358/461 nm, bound to DNA.

## 操作步骤

### 1. 自备试剂

- (1) PBS, pH7.2-7.6 (MesGen MG3150).
- (2) 固定液-----4%多聚甲醛固定液 (MesGen MGX2099).
- (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

- ※ 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。
- ※ 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。

### 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基1:500稀释EdU(10mM)至浓度为20 $\mu$ M, 即配成2XEdU工作液(20 $\mu$ M)。

**备注:** 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即可。细胞培养基种类、细胞类型、细胞生长密度和增殖速度等多种因素都可能影响EdU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。

- (3) 37 $^{\circ}$ C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10 $\mu$ M, 6孔板中每孔原有培养基1ml, 则将1ml 2XEdU工作液(20 $\mu$ M)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220 $\mu$ l

10XEdU工作液(100 $\mu$ M)。

**备注:** 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。

**备注:** 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, 加入1ml固定液, 室温固定15-30min。
- (6) 去除固定液, 以每孔1ml洗涤液洗涤细胞3次, 每次3-5min。
- (7) 去除洗涤液, 加入1ml通透液, 室温孵育10-15min。
- (8) 去除通透液, 以每孔1ml洗涤液洗涤细胞1-2次, 每次3-5min。
- (9) 转步骤4。

#### 3.2 对于组织切片样本

可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进行条件优化。

- (1) 用PBS配制成一定浓度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。

**备注:** 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。

- (2) EdU标记4小时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进行抗原修复处理。

**备注:** 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

本参考步骤每个样品的反应体系为500 $\mu$ 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 $\mu$ l的Click反应液, 其余步骤相同。

- (1) 配制Click Additive Solution: 用1.0ml去离子水/管溶解Click Additive, 混匀至全部溶解, 即为Click Additive Solution。配制后请按照每次用量适当分装, 并-20 $^{\circ}$ C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。

备注: 严格按照下表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	6孔板的单一样品为例
Click Reaction Buffer	430 $\mu$ l
CuSO <sub>4</sub> Solution	20 $\mu$ l
488-Azide	1 $\mu$ l
Click-iT Additive Solution	50 $\mu$ l
Total volume	500 $\mu$ l

- (3) 去除上一步骤中的洗涤液。每孔加入500 $\mu$ l 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、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 DAPI溶液的配制: 用PBS按1:1000比例稀释DAPI(1000X)。
- (2) 吸除步骤4(5)洗涤液, 每孔加1ml的1X DAPI溶液, 室温避光

孵育10min。

- (3) 吸除DAPI溶液, 以每孔1ml洗涤液洗涤细胞3次, 每次3-5min。
- (4) 随后即可进行荧光检测。DAPI为蓝色荧光, 最大激发波长为346nm, 最大发射波长为460nm。

#### 产品内容

产品组分	500 RXNS	2000 RXNS
EdU Solution 10mM	200 $\mu$ l	800 $\mu$ l
488-Azide Solution	55 $\mu$ l	220 $\mu$ l
CuSO <sub>4</sub> Solution	1.2 ml	4.8 ml
Click Reaction Buffer	30 ml	120 ml
Click Reaction Additive	2 tubes	8 tubes
	Add 1.0ml / tube ddH <sub>2</sub> O to dissolve before use	Add 1.0ml / tube ddH <sub>2</sub> O to dissolve before use
DAPI 1000X	50 $\mu$ l	200 $\mu$ l

#### 保存条件

-20 $^{\circ}$ C保存, 1年有效。488-Azide和DAPI(1000X)须避光保存。

#### 产品仅供科学研究 禁止用于临床诊断

For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures.