

For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures

Version 2.0

EdU-Alexa Fluor 555细胞增殖检测试剂盒(适用于FACS、FM)

EdU Cell Proliferation Kit with Alexa Fluor 555 (For FACS & FM)



Do not eat

Store at -20° C & in the dark.



Cat.No. MF7858

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

产品简介

EdU-Alexa Fluor 555细胞增殖检测试剂盒(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 555 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)。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。

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

555-Azide: 红色荧光, Ex/Em=555/567 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 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。

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基1:500稀释EdU(10mM)至浓度为20 μ M, 即配成2XEdU工作液(20 μ 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 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 μ M, 6孔板中每孔原有培养基1ml, 则将1ml 2XEdU工作液(20 μ 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 μ l

10XEdU工作液(100 μ 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 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 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	6孔板的单一样品为例
Click Reaction Buffer	430 μ l
CuSO ₄ Solution	20 μ l
555-Azide	1 μ l
Click-iT Additive Solution	50 μ l
Total volume	500 μ l

- (3) 去除上一步骤中的洗涤液。每孔加入500 μ 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、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 μ l	800 μ l
555-Azide Solution	55 μ l	220 μ l
CuSO ₄ 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 ₂ O to dissolve before use	Add 1.0ml / tube ddH ₂ O to dissolve before use
DAPI 1000X	50 μ l	200 μ l

保存条件

-20 $^{\circ}$ C保存, 1年有效。555-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.