



## EdU 细胞增殖成像分析试剂盒

### 产品描述

细胞增殖是评价细胞活性、代谢、生理和病理状况的重要指标。EdU (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine) 是一种胸腺嘧啶核苷类似物, 其连有的炔基团在天然化合物中很少见, 能够在细胞增殖时期代替胸腺嘧啶(T) 掺入正在复制的 DNA 分子中, 通过基于 EdU 与荧光染料的特异性共轭反应, 把荧光基团标记到新合成的含有 EdU 的 DNA 上面, 这样可以进行高效快速的检测出 DNA 复制活性, 此技术广泛应用于细胞增殖、细胞分化、生长与发育、DNA 损伤修复等方面的研究。

传统的免疫荧光染色(BrdU)检测方法需要 DNA 变性、抗原修复、抗原抗体过夜孵育等复杂繁琐的操作步骤。而 EdU 检测方法不需要剧烈的 DNA 变性, 只需温和的细胞固定化和透化处理, 能够较好地保护细胞形态、DNA 整体结构及细胞内抗原识别位点, 操作步骤更加快速、灵敏和准确。EdU 与胸腺嘧啶(T) 结构非常相似, 大小却只有 BrdU 抗体的 1/500, 很容易在细胞内扩散; 无需抗原抗体反应, 能在细胞和组织水平更快速便捷地反映 DNA 复制活性。

### 订购信息

产品名称	货号	规格
EdU 细胞增殖成像分析试剂盒	AC11L251	100 T

### 产品组分

组分	规格 (100 T)
A. EdU 溶液	40 $\mu$ L
B. 反应缓冲液	1 mL
C. 催化剂溶液	400 $\mu$ L
D. TAMRA 红色荧光溶液	25 $\mu$ L
E. 缓冲添加剂	200 mg
F. Hoechst 33342	20 $\mu$ L

### 运输与保存

常温运输。4°C 保存, 有效期 12 个月。

### 使用方法 (以 24 孔板, HK2 贴壁细胞为例)

本试剂盒是采用成像检测方法进行检测, 适用于荧光显微镜、共聚焦显微镜等仪器。以下方式适用于贴壁细胞; 非贴壁细胞可在孵育 EdU 后进行细胞涂片处理, 固定后再采用贴壁细胞的染色流程进行检测。

### EdU 标记

- 将细胞培养基与 EdU 溶液按照 500: 1 的比例混合, 制成 2 $\times$ EdU 标记培养基。
- 提前将 2 $\times$ EdU 标记培养基预热, 然后将 150 微升 2 $\times$ EdU 标记培养基与等体积细胞培养基混合, 获得 1 $\times$ EdU 溶液。【注】: ①不建议替换全部培养基, 这样可能会影响细胞增殖的速度。②配置好的培养基建议现用现配, 用量以没过细胞为宜。



3. 孵育细胞 2 h, 弃培养基。【注】：①培养时间取决于细胞的增殖速度和生长状态。②大多数肿瘤细胞以及粘附细胞系均可采用 2 h 的孵育时间。
4. 以 1xPBS 清洗细胞两次, 每次 5 min, 以除去未掺入 DNA 的 EdU 残留。【注】：对于贴壁不牢的细胞可降低清洗强度。

### 细胞的固定和通透

1. 每孔加入 150 $\mu$ L 4%多聚甲醛细胞固定液, 室温培养 30 min, 弃固定液。
2. 每孔加入 150 $\mu$ L 2mg/ml 甘氨酸, 摇床孵育 5 min, 以中和过量的多聚甲醛。
3. 弃甘氨酸溶液, 每孔加入 300 $\mu$ L PBS 洗液, 室温清洗 5 min。
4. 每孔加入 300 $\mu$ L 0.5% Triton X-100 细胞通透液, 室温通透 10 min, 弃细胞通透溶液。
5. 每孔加入 300 $\mu$ L PBS 洗液, 室温清洗 5 min。

### EdU 染色

1. 通过用 10:1 去离子水稀释反应缓冲液, 进行配制 1 $\times$ 反应缓冲液。
2. 按照溶解 200 mg 缓冲添加剂溶于 1 mL 去离子水的比例称取适量的粉末进行溶解, 即为可用的缓冲添加剂的浓度, 建议现用现配。【注】：缓冲添加剂为白色粉末, 较难准确称量, 称量范围可稍微放宽, 但是不应超过 $\pm$ 20%, 且该粉末较易氧化, 使用后请旋紧管盖, 如试剂出现棕黄色, 则需报废或更换。
3. 按照以下的表格进行染色反应液的配制:

染色反应液组分	500 $\mu$ L	1 mL	2 mL	5 mL
1X 反应缓冲液	430 $\mu$ L	860 $\mu$ L	1.8 mL	4.3 mL
催化剂溶液	20 $\mu$ L	40 $\mu$ L	80 $\mu$ L	200 $\mu$ L
TAMRA 红色荧光溶液	1.2 $\mu$ L	2.5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	12.5 $\mu$ L
缓冲添加剂	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L	500 $\mu$ L

4. 每孔加入 100  $\mu$ L 配置好的检测混合液, 以覆盖细胞为宜, 避光、室温孵育 30 min。
5. 弃染色反应液, 加入 300  $\mu$ L 0.5% Triton X-100 细胞渗透液清洗 2-3 次, 每次 10 min。
6. 弃细胞渗透液, 用 PBS 洗两次, 每次 5 min。

### DNA 染色

1. 将 Hoechst 33342 \*超级纯\*(货号:AC12L021) 用 PBS 溶液 1: 1000 进行稀释得到 1 $\times$ Hoechst 染色液。
2. 每孔加入 150  $\mu$ L 1 $\times$ Hoechst 染色液, 室温避光孵育 20-30 min 后, 弃染色液。
3. 每孔加入 300  $\mu$ L PBS 洗细胞两次, 去掉洗液。

### 图像获取及分析

建议染色完成后立即进行荧光显微镜拍照观察; 如果条件限制, 请于 4 $^{\circ}$ C 条件下避光湿润保存 3 d 之内完成拍照。若为细胞爬片或涂片, 可使用抗荧光淬灭封片剂进行封片后于 4 $^{\circ}$ C 条件下保存及拍照检测。

荧光染料	最大激发波长	最大发射波长	荧光颜色
TAMRA	541 nm	567 nm	橘红色荧光
Hoechst 33342	350 nm	461 nm	蓝色荧光

### 注意事项

1. 本产品仅限于科学实验研究使用, 不得用于临床诊断、治疗等领域。