



EdU 细胞增殖流式检测试剂盒

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 细胞增殖流式检测试剂盒	AC11L262	20 T

产品组分

组分	规格 (20 T)
A. EdU 溶液	80 μ L
B. 反应缓冲液	2 mL
C. 催化剂溶液	800 μ L
D. TAMRA 红色荧光溶液	50 μ L
E. 缓冲添加剂	400 mg
F. Hoechst 33342	40 μ L

运输与保存

常温运输。4°C保存, 有效期 12 个月。

使用方法

细胞培养: 将细胞接种于孔板中 (以下溶液加入量是以 6 孔板为例), 培养至正常生长阶段。

药物处理: 根据实验需要进行各种细胞处理。

EdU 标记

1. 设置 1 个不加 EdU 标记培养基的 NC 对照组, 以便进行流式检测数据的背景分析。
2. 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。
3. 提前将 2 \times EdU 标记培养基预热, 然后将 500 微升 2 \times EdU 标记培养基与等体积细胞培养基混合, 获得 6 孔板中每孔 1ml 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。
4. 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。



- 将细胞收集至流式管中, 1000rpm 离心 5 min, 用枪头吸弃上清。【注】: ①如贴壁细胞, 请先消化收集; ②离心转速可按特定细胞培养经验进行设置。
- 以 1×PBS 清洗细胞, 1000rpm 离心 5 min, 用枪头吸弃上清。

细胞的固定和通透

- 每管加入 1mL 4%多聚甲醛细胞固定液固定 15-30 min, 1000rpm 离心 5 min, 弃固定液。
- 每管加入 2mL 2mg/mL 甘氨酸, 摇床孵育 5 min, 以中和过量的多聚甲醛。
- 1000rpm 离心 5 min, 弃甘氨酸溶液, 每管加入 2mL PBS 洗液清洗, 1000rpm 离心 5 min, 弃上清。
- 每管加入 1mL 0.5% Triton X-100 细胞通透液, 室温通透 10 min, 1000rpm 离心 5 min, 弃细胞通透溶液。
- 每管加入 2mL PBS 洗液, 室温清洗 5 min, 1000rpm 离心 5 min, 吸弃上清。

EDU 染色

- 通过用 10: 1 去离子水稀释反应缓冲液, 进行配制 1×反应缓冲液。
- 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±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。
- 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 μL	1 mL	2 mL	5 mL
1X 反应缓冲液	430 μL	860 μL	1.8 mL	4.3 mL
催化剂溶液	20 μL	40μL	80 μL	200 μL
TAMRA 红色荧光溶液	1.2 μL	2.5 μL	5 μL	12.5 μL
缓冲添加剂	50 μL	100 μL	200 μL	500 μL

- 每管加入配置好的检测混合液, 体积以覆盖细胞为宜, 充分重悬细胞, 避光、室温孵育 10-30 min。
- 1000rpm 离心 5 min, 吸弃染色反应液, 每管加入 2mL 0.5% Triton X-100 细胞渗透液清洗 2 次, 每次 10 min; 离心弃细胞渗透液, 用 500uL PBS 重悬细胞。

DNA 染色

- 将 Hoechst 33342 *超级纯*(货号: AC12L021)用 PBS 溶液 1:1000 进行稀释得到 1×Hoechst 染色液。
- 每管加入 1×Hoechst 染色液, 以覆盖细胞为宜, 室温避光孵育 10-15 min 后, 弃染色液。
- 加入 500 μL PBS 重悬细胞。

其它染色 (自备)

(可选) 可以根据实验需要进行细胞表面或细胞内抗原的抗体染色。染色完的样品上机检测时, 根据使用的染料选择合适的通道检测。

流式检测及分析

- 建议染色完成后立即进行流式检测; 如果条件限制, 请于 4°C 条件下避光湿润保存 3 d 之内完成检测。
- 检测细胞数量建议尽量能达到 10⁷ 级, 若细胞数量较少, 检测的细胞数量可调整为 10⁶ 起始进行实验。

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

- 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。