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，其连有的炔烃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 μL
B. 反应缓冲液	1 mL
C. 催化剂溶液	400 μL
D. TAMRA 红色荧光溶液	25 μL
E. 缓冲添加剂	200 mg
F. Hoechst 33342	20 μL

运输与保存

蓝冰运输。-20°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

1. 将细胞培养基与 EdU 溶液按照 500：1 的比例混合，制成 2×EdU 标记培养基。
2. 提前将 2×EdU 标记培养基预热，然后将 150 微升 2×EdU 标记培养基与等体积细胞培养基混合，获得 1×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 150μL 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 150μL 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 300μL PBS 洗液，室温清洗 5 min。
4. 每孔加入 300μL 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 300μL 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×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±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 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

4. 每孔加入 100 μL 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 μL 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×Hoechst 染色液。
2. 每孔加入 150 μL 1×Hoechst 染色液，室温避光孵育 20-30 min 后，弃染色液。
3. 每孔加入 300 μL 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°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°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。