



YF488/YF555/YF594/YF647 Click-iT EdU 通用款细胞增殖检测试剂盒（绿色/橙红色/红色/远红色荧光）

产品货号: E6043/E6044/E6045/E6046

储存条件: -20℃避光保存。开封后按指定温度保存，可有效放置一年

产品介绍

细胞增殖检测是评估细胞健康程度、遗传毒性及抗肿瘤药物效果的基础实验手段。检测细胞增殖最精确的方法是 BrdU 法。EdU 法检测试剂盒是 BrdU 法的革命性突破。EdU (5-乙炔基-2'-脱氧尿苷) 是一种嘧啶类似物，在 DNA 合成期整合入 DNA 双链。EdU 法检测基于“点击”反应，一种由铜催化的叠氮化合物和炔烃作用发生共价反应，形成共价键。本试剂盒中，EdU 含有炔烃，YF® 488/555/594/647A Azide 染料含有叠氮化合物。点击法的 EdU 标记增殖快速有效，易于使用。BrdU 方法需要 DNA 变性（如酸变性、热变性或者用 DNase 消化）暴露出 BrdU，从而方便 BrdU 抗体结合；而 EdU 法只需多聚甲醛固定和 Triton X-100 促渗就可以使检测试剂进入细胞，只需少量的叠氮化染料即可非常有效地标记出整合的 EdU。本试剂盒包含 EdU 法检测所需要的所有组分，可以用于体外培养细胞的增殖检测。

YF488 Azide: 495/519 nm; YF555 Azide: 555/565 nm; YF594 Azide: 590/617 nm; YF647 Azide: 650/670 nm

产品组分

组分	100T	开封后保存温度	开封后按指定温度保存，可有效放置一年
A. 10 mM EdU	200 μL	-20℃	
B. YF® 488/555/594/647Azide	50 μL	-20℃ 避光	
C. 10× Click-iT EdU 反应缓冲液	1 mL	2-8℃	
D. CuSO ₄	500 μL	2-8℃	
E. Click-iT EdU 缓冲液添加物	30 mg	2-8℃	
F. Hoechst 33342	25 μL	2-8℃	

规格：如果用于荧光显微镜检测，所能使用次数为上述各个规格的最大使用次数（针对 96 孔板培养的细胞），如 E6043/E6044/E6045/E6046可检测 20 个孔的样品（不同容器的具体用量可参考附表 1）；如果用于流式检测，所能使用次数为上述各个规格的最小使用次数，如 E6043/E6044/E6045/E6046 可检测 2 个样品。

使用方法

实验材料（自备）

10 mM PBS, pH 7.2-7.6

4 %多聚甲醛固定液 (in PBS)

促渗试剂 (0.5 %Triton X-100 in PBS)

2 mg/mL 甘氨酸溶液 (in ddH₂O)

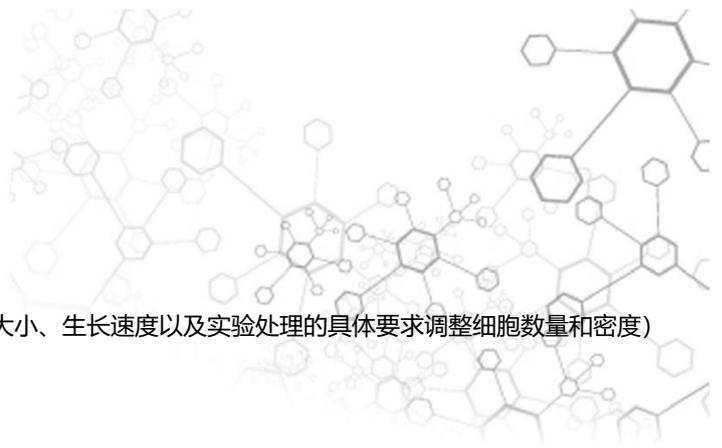
3 %BSA in PBS, pH 7.2-7.6

1 % BSA in PBS, pH 7.2-7.6

ddH₂O

96/24/12/6 孔培养板或培养皿





荧光显微镜检测方法

1. 细胞培养

取对数生长期细胞，以每孔 $4 \times 10^3 - 1 \times 10^5$ 细胞（可根据细胞大小、生长速度以及实验处理的具体要求调整细胞数量和密度）接种于 96 孔板中，培养至正常生长阶段。

2. 药物处理

根据实验需要进行各种药物处理。

3. EdU 标记

(1) 用细胞完全培养基按一定比例稀释 EdU 溶液（组分 A）至合适浓度后加入细胞中，混匀；设置不加 EdU 处理的阴性对照组。

注：EdU 的标记浓度需根据细胞类型加以调整，建议以 $10 \mu\text{M}$ 的初始浓度进行摸索。预实验中，建议设置 EdU 浓度梯度，可参考附表 2 和附表 3。

(2) 细胞培养箱中孵育 2 h。

注：最佳孵育时间与细胞周期有关，大多数肿瘤细胞系均可采用 2h 的孵育时间，可参考表 2。Edu 浓度与孵育时间相关，短时间孵育 (<2 h) 宜采用高浓度，如： $10 \sim 50 \mu\text{M}$ ；长时间孵育 (>24 h) 宜采用低浓度，如： $1 \sim 10 \mu\text{M}$ ；也可参考表 3。

4. 细胞固定及促渗

注：对于需要做细胞表面抗原标记的实验，可以考虑在完成 EdU 孵育后，以含 3% BSA 洗涤液洗涤细胞 2 次，在细胞固定促渗之前进行。

(1) 孵育完成后，去除培养基。以 1X PBS 清洗细胞两次，每次 5 min，以除去未掺入 DNA 的 EdU 残留，贴壁不牢的细胞可降低清洗强度。加入 $50 \mu\text{L}$ 4% 多聚甲醛固定液，室温孵育 20 min 后，去除固定液。

(2) 每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 2 mg/mL 甘氨酸溶液，室温孵育 5 min，中和残留的固定液。

(3) 以每孔 $100 \mu\text{L}$ 3% BSA 洗涤细胞 2 次。

(4) 去除洗涤液，加入 $100 \mu\text{L}$ 0.5% Triton X-100，室温孵育 10 min。

5. EdU 检测

注：本参考步骤每个样本使用 $100 \mu\text{L}$ 的工作液，用户可以根据自己的样本情况调整用量。

(1) 配置 1× Click-iT EdU 反应缓冲液（组分 C）：用 ddH₂O 将组分 C 稀释 10 倍。

(2) 配置 5× Click-iT EdU 缓冲液添加物（组分 E）：加 $300 \mu\text{L}$ 的 ddH₂O 至 30 mg 的 E 组分管中（终浓度 100 mg/mL），混匀至全部溶解。使用后，剩余储液存放在 -20°C ，可保存一年，溶液一旦呈现棕色，则说明有效成分降解不能再用。

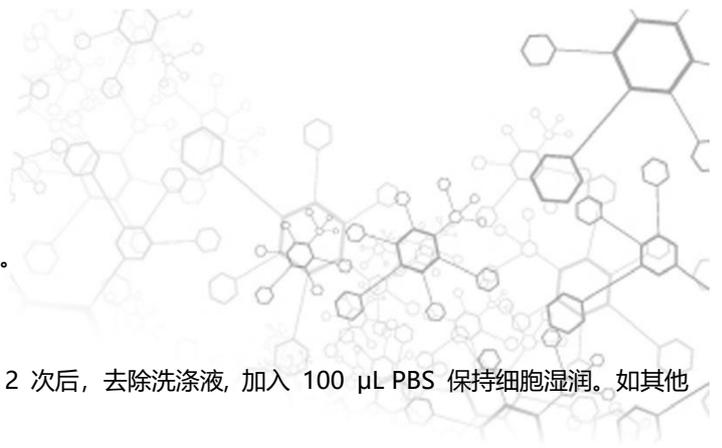
注：不同规格的组分 E 均按照此比例加 ddH₂O 溶解，制备成 5× 储液备用。

(3) 准备 1× Click-iT EdU 缓冲液添加物：用 ddH₂O 稀释 5× Click-iT EdU 缓冲液添加物至 1×，溶液应现配现用。

(4) 依据下表准备 Click-iT 工作液。

反应组分	以10个孔的样本数为例
1×Click-iT EdU 反应缓冲液	855 μL
CuSO ₄ (组分 D)	40 μL
YF 488A Azide (组分 B)	5 μL
1× Click-iT EdU 缓冲液添加物	100 μL
总体积	1 mL





- (5) 去除促渗剂，每孔 100 μL 的 3% BSA 洗涤液洗涤 2 次。
- (6) 每孔加入 100 μL Click-iT 工作液，均匀覆盖细胞。
- (7) 室温避光孵育 30 min。
- (8) 除去 Click-iT 工作液，以 100 μL 3% BSA 洗涤细胞 2 次后，去除洗涤液，加入 100 μL PBS 保持细胞湿润。如其他无特别要求，即可进行拍照分析。

6. DNA 复染 (可选)

- (1) 用 100 μL PBS 洗涤细胞 1 次，去除洗涤液。
- (2) 用 PBS 将 Hoechst 33342 (组分 F) 稀释 2000 倍。
- (3) 每孔加 100 μL $1\times$ Hoechst 33342 溶液，室温避光孵育 15-30 min。
- (4) 去除 Hoechst 33342 溶液，用 100 μL PBS 洗涤细胞 2 次。

7. 成像及分析

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 天之内完成拍照。

流式细胞仪检测方法

1. 细胞培养

每孔 1×10^5 - 3×10^6 细胞接种于 6 孔板中。

2. 药物处理

根据实验需要进行各种药物处理。

3. EdU 标记细胞

(1) 用细胞完全培养基按一定比例稀释 EdU 溶液 (组分 A) 至合适浓度后加入细胞中，混匀；设置不加 EdU 处理的阴性对照组。

注：EdU 的标记浓度需根据细胞类型加以调整，建议以 $10\ \mu\text{M}$ 的初始浓度进行摸索。预实验中，建议设置 EdU 浓度梯度，可参考附表 2 和附表 3。

(2) 细胞培养箱中孵育 2 h。EdU 孵育细胞的时间可以直接用作测定细胞 DNA 合成的指标，时间点选择以及孵育的时间取决于细胞生长速率。通过短暂的 EdU 孵育进行的脉冲式标记细胞可以用于研究细胞周期动力学。

注：最佳孵育时间与细胞周期有关，大多数肿瘤细胞系均可采用 2 h 的孵育时间，可参考附表 2。EdU 浓度与孵育时间相关，短时间孵育 ($<2\ \text{h}$) 宜采用高浓度，如： $10\sim 50\ \mu\text{M}$ ；长时间孵育 ($>24\ \text{h}$) 宜采用低浓度，如： $1\sim 10\ \mu\text{M}$ ；也可参考附表 3。

4. 细胞固定及促渗

注：对于需要做细胞表面抗原标记的实验，可以考虑在完成 EdU 孵育后，以含 1% BSA 洗涤细胞 2 次，在细胞固定促渗之前进行。

(1) 孵育完成后，收集细胞，每管加入 1 mL PBS 清洗细胞，1000 rpm 离心 5 min，吸弃上清，以除去未掺入 DNA 的 EdU 残留。

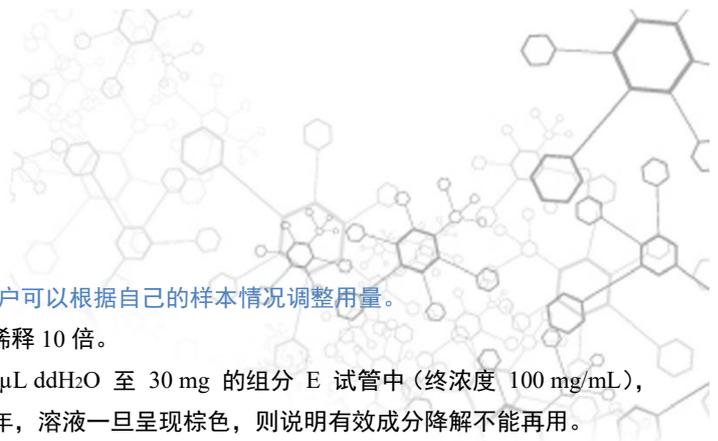
(2) 每管加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定液重悬细胞。

(3) 室温孵育 20 min，1000 rpm 离心 5 min，吸弃上清。

(4) 每管加入 1 mL 2 mg/mL 甘氨酸孵育 5 min，中和残留的固定液，1000 rpm 离心 5 min，吸弃上清，每管加入 1 mL PBS 清洗 1 次，1000 rpm 离心 5 min，吸弃上清。

(5) 每管加入 1 mL 0.5% Triton X-100 促渗液重悬细胞，室温孵育 10 min。





5. EdU 检测

注：针对 6 孔板样本可参考每孔 1 mL 的工作液来进行，用户可以根据自己的样本情况调整用量。

- (1) 配置 1× Click-iT EdU 反应缓冲液：用 ddH₂O 将组分 C 稀释 10 倍。
- (2) 配置 5× Click-iT EdU 缓冲液添加物（组分 E）：加 300 μL ddH₂O 至 30 mg 的组分 E 试管中（终浓度 100 mg/mL），混匀至全部溶解。使用后，剩余储液存放在 -20°C，可保存一年，溶液一旦呈现棕色，则说明有效成分降解不能再用。

注：不同规格的组分 E 均按照此比例加 ddH₂O 溶解为 5× 储液备用。

- (3) 准备 1× Click-iT EdU 缓冲液添加物：以 ddH₂O 稀释 5× Click-iT EdU 缓冲液添加物储液至 1×，溶液应现配现用。
- (4) 依据下表准备 Click-iT 工作液。

反应组分	单次反应所需加液体积
1× Click-iT EdU 反应缓冲液	875 μL
CuSO ₄ (组分 D)	20 μL
YF 488A Azide (组分 B)	5 μL
1× Click-iT EdU 缓冲液添加物	100 μL
总体积	1 mL

- (5) 1000 rpm 离 5 min，吸弃上清，去除促渗剂，每管加入 1 mL 的 1% BSA 洗涤液洗涤 2 次，1000 rpm 离 5 min，吸弃上清。
- (6) 每管加入 1 mL Click-iT 工作液，混匀。
- (7) 室温避光孵育 30 min。
- (8) 1000 rpm 离 5 min，吸弃染色反应液，每管加入 1% BSA 洗涤细胞 2 次，1000 rpm 离心 5 min，吸弃上清，用 1 mL 1% BSA 再次重悬细胞（重悬细胞的溶液体积可根据细胞的数量加以调整），流式细胞仪检测。

注：如需进行其他标志物检测可参考步骤 4。

6. DNA 复染 (可选)

- (1) 用 100 μL PBS 洗涤细胞 1 次，去除洗涤液。
- (2) 用 PBS 将 Hoechst 33342 (组分 F) 稀释 2000 倍。
- (3) 每孔加 100 μL 1× Hoechst 33342 溶液，室温避光孵育 15-30 min。
- (4) 去除 Hoechst 33342 溶液，用 100 μL PBS 洗涤细胞 2 次。

7. 细胞内抗原标记 (可选步骤)

- (1) 加入抗体工作液，混匀。
- (2) 避光条件下，以合适的温度及时间孵育抗体。

8. 流式检测及分析:

- (1) 建议染色完成后立即进行流式检测；如果条件限制，请避光 4°C 湿润保存待测，但不应超过 3 天。
- (2) 检测的细胞数量建议尽量能达到百万级，若细胞数量较少，检测的细胞数量可调整为十万级起始进行实验。对于细胞得率过少（刚到万级）的情况，可能不利于做流式图，对此可适当减少步骤 5 (8) 中的清洗次数。

注意事项

1. 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
2. 荧光染料均存在淬灭问题，实验操作时请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
3. Click-iT EdU 缓冲液添加物溶液最好现配现用，以保证最佳结果。
4. 本品不建议与 TUNEL 试剂盒同时检测，由于 Edu 的结构中有 -OH 存在，会影响 TUNEL 的反应过程。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。



附录

表 1 EdU 培养基及染色反应液的参考用量

试剂	96 孔板	48 孔板	24 孔板	12 孔板	6 孔板	5.5cm 小皿
EdU 培养基	100 μ L	150 μ L	200 μ L	500 μ L	1mL	2mL
染色 反应液	100 μ L	150 μ L	200 μ L	500 μ L	1mL	2mL

表 2 EdU 的参考孵育时间

细胞系	人胚胎 细胞	酵母细 胞	鼠成纤维细胞	人宫颈癌细胞	人胚肾细胞系	人神经细胞
细胞周期	~30min	~3h	~18h	~21h	~25h	~5d
孵育时间	5min	20min	2h	2h	2h	1d

表 3 文献中 EdU 孵育浓度及时间

PubMed ID	Reference	CellLine	Concentration	Time
18272492	SalicA,et al.PNAS.2008	NIH3T3,Hela	10 nM~10	1h
18521918	CappellaP,etal.CytometryA.2008	HL-60,A2780 ,U2OS	1~10 μ M	0.5 h
18996411	ChehehasaF,et al.Neurosci Methods.2009	Neurospher es	1~20 μ M	24 h
19179 371	LimsirichaikulS,et al.NucleicAcids Res.2009	Primary fibroblasts	10 μ M	1,2,4h
19253396	WarrenM,etal.Dev Dyn.2009	Chick embryos	10 μ M~2 mM	4h
19647746	YuY,etal.JImmunol ethods.2009	Spleencells	50 μ M	24 h
19544417	MomcilovicO,et l.StemCells.2009	HumanES cells	10 μ M	0.5 h
20080700	CinquinO,etal. PNAS.2010	emb-30	1 μ M	12 h
20025889	HanW,etal.Life Sci.2009	VSMC	50 μ M	2h
20659 708	HuangC,etal.J Genet Genomics.2010	ESC	50 μ M	2h
21310713	HuaH,etal.Nucleic AcidsRes.2011	Fission yeaststrains	10 μ M	3h
20824490	LvL,etal.MolCell Biochem.2011	EJcells	50 μ M	4h
21248284	YangS,etal.Biol Reprod.2011	GCcells	50 μ M	2h
21227924	ZhangYW,etal.NucleicAcids Res.2011	U2OS,HT29	30 μ M	1.5 h
21829621	GuoT,etal.PloS One.2011	HIT-T15	50 μ M	4h
21980430	ZengT,etal.PloSOne.2011	MCF-10A	25 μ M	2h
22012572	DingD,etal.Int Orthop.2011	C3H10T1/2	10 μ M	24h
22000787	ZengW,etal. Biomaterials.2011	EPC	50 μ M	4h
21913215	XueZ,etal.JCell Biochem.2011	SGC7901	25 μ M	24h
22016038	PengF,etal.Lasera MedSci.2011	MSC	50 μ M	2h
21878637	LiD,etal.JBiol Chem.2011	HCC	50 μ M	2h