

Yefluor 647 EdU Fluorescence Imaging & Flow Cytometry Assay kit

Yefluor 647 Click-iT EdU 通用款细胞增殖检测试剂盒（远红外色荧光）

产品简介

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。常用的检测细胞增殖方法是 BrdU 法。EdU 法检测是 BrdU 方法的升级和突破。EdU（5-溴-2-脱氧尿嘧啶）是一种嘧啶类似物，可在 DNA 合成期整合入 DNA 双链。EdU 法检测是基于“点击”反应，一种由铜催化的叠氮化合物和炔烃的原子共价反应。

试剂盒中 EdU 试剂含有炔烃，而 Yefluor 647 Azide 染料试剂含有叠氮化合物。点击法的 EdU 标记增殖快速有效，易于使用。只需少量的叠氮化染料即可有效地标记出整合的 EdU。标准化的戊二醛固定和去污剂促渗可以使检测试剂进入细胞，而 BrdU 方法则需要 DNA 变性（如酸变性、热变性或者用 DNase 消化）去暴露 BrdU 从而方便 BrdU 抗体结合。

本试剂盒包含 EdU 法检测所需要的所有组份，可以检测细胞增殖与细胞周期分析，适用于荧光显微镜和流式细胞仪检测。

对于细胞周期的分析，试剂盒提供了细胞核染料 Hoechst 33342。

产品信息

货号	40277ES60 / 40277ES76
规格	100 T / 500 T（适用于荧光显微镜）；或 10 T / 50 T（适用于流式细胞仪）
光谱特性	Yefluor 647 Azide: Ex/Em=650/670 nm; Hoechst 33342: Ex/Em=350/461nm, bound to DNA
适用设备	荧光显微镜；流式细胞仪

组分信息

组分编码	组分名称	40277ES60 (100 T / 10 T)	40277ES76 (500 T / 50 T)
40277-A	10 mM EdU	0.2 mL	1 mL
40277-B	Yefluor 647 Azide	50 μ L	250 μ L
40277-C	10 \times Click-iT EdU 反应缓冲液	1 mL	5 mL
40277-D	CuSO ₄	0.5 mL	2 \times 1.25 mL
40277-E	Click-iT EdU 缓冲液添加物	30 mg	150 mg
40277-F	Hoechst 33342	25 μ L	125 μ L

储存条件

-25~-15 $^{\circ}$ C避光储存，有效期1年。开封后，组分 A（10 mM EdU）需-25~-15 $^{\circ}$ C储存，组分 B（Yefluor 647 Azide）需-25~-15 $^{\circ}$ C避光储存，其余组分 2-8 $^{\circ}$ C存储即可。

使用说明

荧光显微镜检测方法

1. 其他所需试剂

10 mM PBS, pH 7.2-7.6

中性多聚甲醛固定液 (4%多聚甲醛 in PBS)

2 mg/ml 甘氨酸溶液 (去离子水配制)

促渗试剂 (0.5% Triton X-100 in PBS)

3% BSA in PBS, pH 7.2-7.6

去离子水

18×18 mm 盖玻片

2. EdU 标记细胞

注意：EdU 的标记浓度应根据所用的细胞类型做相应的优化选择，推荐客户以 10 μ M 的 EdU 初始浓度进行摸索。细胞培养基、细胞生长密度及细胞类型和其他实验条件都有可能影响细胞的标记效果。预实验中我们建议客户设置一系列的 EdU 浓度梯度，以确定最佳的合适您的细胞的实验浓度。

- 1) 以每孔 4×10^3 - 1×10^5 细胞接种于 96 孔板中，进行您所需要的药物处理或者其他刺激处理。
- 2) 准备一份 2 \times 的 EdU 工作液 (组分 A)：以完全培养基稀释 10 mM 的储液至合适的工作浓度。建议您以 10 μ M 的初始工作浓度开始预实验。
- 3) 预热 2 \times 的 EdU 工作液，加入等体积的培养基，使浓度变为 1 \times (如：需要得到 10 μ M 的终浓度，应以新鲜培养基等体积加入到 20 μ M 的 EdU 工作液中)。
- 4) 合适时间合适条件孵育细胞，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时间的长度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。

3. 细胞固定及促渗操作

- 1) 孵育完成后，去除培养基加入 50 μ L 4%中性多聚甲醛至各个孔，室温孵育 15-30 min 后，去除固定液。
- 2) 每孔加入 50 μ 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 0.1 mL 3% BSA in PBS 的洗涤液洗涤细胞 2 次。
- 4) 去除洗涤液，加入 0.1 mL 0.5% Triton X-100 in PBS 到每个孔中，室温孵育 20 min。

注意：本参考步骤是针对以 4%中性多聚甲醛固定且以 0.5% Triton X-100 促渗操作样本而优化的操作方法，但本参考所介绍的步骤同样可用于其他类似操作的样本，如以甲醇固定以皂苷固定的样本等。

4. EdU 检测

注意：本参考步骤每孔反应使用 100 μ L 的 Click-iT 反应混合物。用户可根据自己的样本情况调整等比例减少所用的溶液体积。

- 1) 准备 1 \times Click-iT EdU 反应缓冲液 (组分 C)：10 \times 组分 C 试剂以去离子水稀释 10 倍即可。
- 2) 制备一份 5 \times 的 Click-iT EdU 反应添加物储液 (组分 E)：加 0.3 mL 去离子水至 30 mg 的 E 组分试管中 (100 mg/mL)，混匀至全部溶解。使用后，剩余储液存放在 $\leq -20^\circ\text{C}$ ，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 (注意：不同规格的组分 E 均按照此比例加去离子水溶解为 5 \times 储液备用)。
- 3) 准备 1 \times Click-iT EdU 缓冲液添加物：以去离子水稀释 5 \times 储液 (组分 E) 至 1 \times ，溶液应新鲜配置，当天用完。

4) 依据表 1 准备 Click-iT 反应混合物。表 1 要求添加的组分对于反应来说非常重要，否则反应无法有效进行。

表 1.用于荧光显微镜检测的 Click-iT 反应混合物

组分名称	以 10 个孔的样本数为例
1× Click-iT EdU 反应缓冲液 (组分 C)	855 μ L
CuSO ₄ (组分 D)	40 μ L
Yefluor 647 Azide (组分 B)	5 μ L
1× 反应缓冲液添加物 (步骤 4.3 所准备)	100 μ L
总体积	1 mL

5) 去除促渗剂，以每孔 0.1 mL 的 3% BSA in PBS 的洗涤液洗涤 2 次，去除洗涤液。

6) 加入 0.1 mL Click-iT 反应混合物至每个孔，简短摇晃培养板以确保反应混合物可以均匀覆盖细胞。

7) 室温避光孵育 30 min。

8) 除去反应混合物，每孔以 0.1 mL 3% BSA in PBS 洗涤两次，去除洗涤液。

对于核染色，可以进行 DNA 复染。如其他无特别要求，即可进行拍照分析。

5. DNA 复染 (可选)

1) 以 0.1 mL PBS 洗涤每孔 1 次，去掉洗涤液。

2) 以 PBS 稀释 Hoechst 33342 (组分 F) 储液 1:2000 至 1× Hoechst 33342 溶液，终浓度为 5 μ g/mL。

3) 每孔加 0.1 mL 1× Hoechst 33342 溶液，室温避光孵育 15-30 min。除去 Hoechst 33342 溶液。

4) 0.1 mL PBS 洗涤每孔 2 次，去除洗涤液。

流式细胞仪检测方法

6. 其他所需试剂

10 mM PBS, pH 7.2-7.6

中性多聚甲醛固定液 (4%多聚甲醛 in PBS)

促渗试剂 (0.5% Triton X-100 in PBS)

1% BSA in PBS, pH 7.4

7. EdU 标记

注意：EdU 的标记浓度应根据所用的细胞类型做相应的优化选择，推荐客户以 10 μ M 的 EdU 初始浓度进行摸索。细胞培养基、细胞生长密度及细胞类型和其他实验条件都有可能影响细胞的标记效果。预实验中，我们建议客户设置一系列的 EdU 浓度梯度，以确定最佳的合适您的细胞的实验浓度。

1) 按每孔 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ 个细胞接种于 6 孔板中，培养至正常生长阶段。进行您所需要的药物处理或者其他刺激处理。

2) EdU 加入细胞培养基至所需的浓度混匀, 推荐客户以 10 μM 的 EdU 初始浓度进行摸索。细胞培养基、细胞生长密度及细胞类型和其他实验条件都有可能影响细胞的标记效果。

3) 以合适时间和条件孵育细胞, 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时间的长度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。

注意: EdU 浓度与孵育时间相关, 短时间孵育(< 2 h)宜采用高浓度, 如: 10~50 μM , 长时间孵育(>24 h)宜采用低浓度, 如: 1~10 μM 。

8. 细胞固定及促渗操作

1) 孵育完成后, 收集细胞, 1% BSA in PBS 清洗细胞 1 次, 离心收集细胞。

2) 100 μL 4%多聚甲醛 in PBS 重悬细胞。

3) 室温避光孵育 15 min。

4) 1% BSA in PBS 的洗涤液洗涤细胞 2 次。

5) 0.1 mL 0.5% Triton X-100 促渗液重悬细胞, 室温孵育 20 min。

注意: ①本参考步骤是针对以 4%中性多聚甲醛固定且以 0.5% Triton X-100 促渗操作样本而优化的操作方法, 但本参考所介绍的步骤同样可用于其他类似操作的样本, 如以甲醇固定以皂苷固定的样本等等。

②对于需要同时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-PBS 洗涤 2 次细胞后, 在细胞固定促渗之前进行。

9. EdU 检测

1) 制备一份 5 \times 的 Click-iT EdU 反应添加物储液 (组分 E): 加 1 mL 去离子水至 100 mg 的 E 组分试管中 (100 mg/mL), 混匀至全部溶解。使用后, 剩余储液存放在 $\leq -20^\circ\text{C}$, 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 (注意: 不同规格的组分 E 均按照此比例加去离子水溶解为 5 \times 储液备用)。

2) 准备 1 \times Click-iT EdU 缓冲液添加物: 以去离子水稀释 5 \times 储液 (组分 E) 至 1 \times , 溶液应现用现配, 当天用完。

3) 准备 1 \times Click-iT EdU 反应缓冲液: 10 \times Click-iT EdU 反应缓冲液 (组分 C) 以去离子水稀释 10 倍即可。

4) 依据表 2 准备 Click-iT 反应混合物。

注意: 表 2 要求添加的组分对于反应来说非常重要, 否则反应无法有效进行。

表 2. 用于流式细胞仪检测的 Click-iT 反应混合物

组分名称	每单次反应所需的加液体积
1 \times Click-iT EdU 反应缓冲液 (步骤 9.3 所准备)	875 μL
CuSO ₄ (组分 D)	20 μL
Yefluor 647 Azide (组分 B)	5 μL
1 \times 反应缓冲液添加物 (步骤 9.2 所准备)	100 μL
总体积	1 mL

- 5) 加入 1 mL Click-iT 反应混合物至每管，混匀。
- 6) 室温避光孵育反应混合物 30 min。
- 7) 以 1% BSA in PBS 洗涤细胞一次，收集细胞去除上清，以 1 mL 含 1% BSA 的 PBS 重悬细胞，上机检测。

注意事项

1. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
2. 本产品仅作科研用途！