

EdU细胞增殖流式检测试剂盒(红色, PriFluor 647)

货号: P-CA-081

产品简介

EdU细胞增殖流式检测试剂盒, 操作便捷、灵敏度高, 适用于细胞悬液样本的增殖检测, 检测结果可通过流式细胞仪进行分析。

检测原理

细胞增殖检测广泛应用于细胞活性、遗传毒性及抗肿瘤药物效果的评价中, 直接检测细胞中的DNA合成被认为是最精确的检测细胞增殖的方法。最初广泛使用的检测细胞中DNA合成的方法是放射性标记核苷掺入法, 但该方法由于有放射性污染并且很难实现单细胞检测而受到很大的限制, 随后逐渐被基于抗体检测的BrdU法所替代。BrdU法步骤繁多, 且需要使用BrdU抗体, 影响因素较多, 稳定性较差。

EdU法基于EdU掺入和后续的点击反应, 无需使用抗体、操作便捷、检测灵敏度高, 是一种在BrdU法基础上升级换代的新方法, 将会逐步取代BrdU法。EdU(5-ethynyl-2-deoxyuridine), 中文名5-乙炔基-2-脱氧尿苷, 是胸腺嘧啶脱氧核苷类似物, EdU可以在DNA合成过程中替代胸腺嘧啶脱氧核苷掺入到新合成的DNA中。另一方面, EdU上的乙炔基能与荧光标记的小分子叠氮化物探针(如FITC Azide、PriFluor 488 Azide、PriFluor 594 Azide、PriFluor 647 Azide), 通过一价铜离子的催化发生共价反应, 形成稳定的三唑环, 该反应非常迅速, 被称作点击反应(Click reaction)。通过点击反应, 新合成的DNA会被相应的荧光探针所标记, 从而可以使用适当的荧光检测设备检测到增殖的细胞。

检测样本类型

悬浮细胞 贴壁细胞

产品组分

| 产品名称 | 50Assays | 200Assays | Storage |
|-------------------------|--------------------|-------------------|--------------|
| EdU(10mM) | 200 μ L | 800 μ L | -5~-20°C |
| Click Reaction Buffer I | 25 mL | 50 mL \times 2 | -5~-20°C |
| PriFluor 647 Azide I | 60 μ L | 250 μ L | -5~-20°C, 避光 |
| CuSO ₄ | 1.25 mL \times 2 | 8 mL | -5~-20°C |
| Click Additive | 220 mg | 220 mg \times 4 | -5~-20°C |
| 说明书 | | 一份 | |

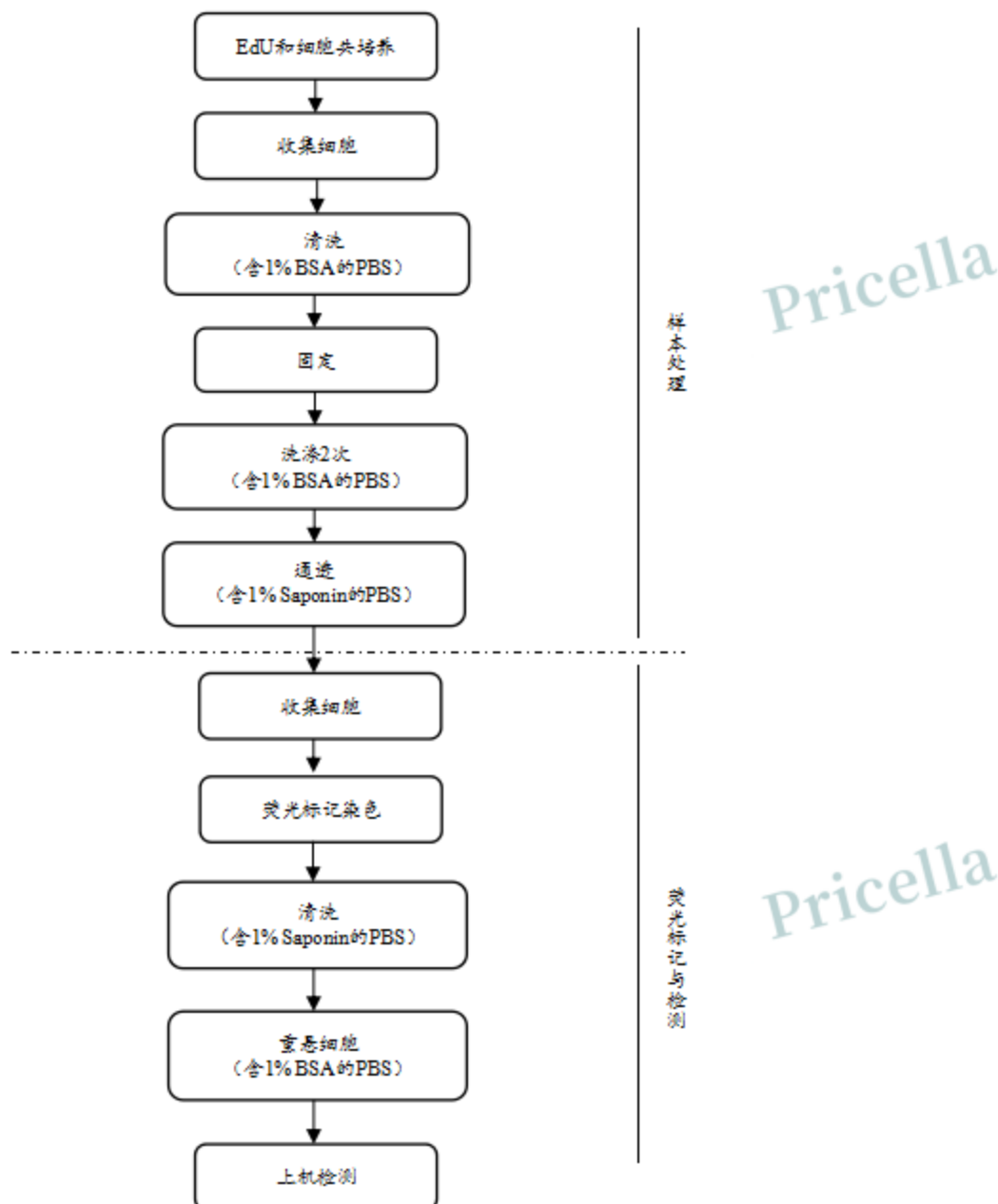
注: 规格 50Assays 指的是用 6 孔板进行实验可以检测 50 个样本。



保存条件

-5~-20℃可保存一年。EdU(10mM)首次使用时需要分装（推荐 50μL/小瓶或根据实验需要分装成更少量）。

实验流程



自备试剂及仪器

1) 试剂

PBS (含 1% BSA) 缓冲液 (pH7.2~7.6)。

通透液: 1% Saponin (溶剂为 PBS, pH7.2~7.6)。

固定液: 4%多聚甲醛 (溶剂为 PBS, pH7.2~7.6)。

去离子水。

2) 仪器

流式细胞仪、离心机。

试剂配制

Click Additive Solution

取 1.1 mL 去离子水加入到一管 Click Additive(220 mg)中, 混匀至全部溶解。配制后可以适当分装, 并于-5~20°C保存。

注: 建议使用完一管 Click Additive 后再配制下一管。

实验步骤

1. EDU和细胞共培养

1) EdU 的标记浓度应根据所用的细胞类型做相应的优化选择, 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, 推荐以 10 μ M 的 EdU 初始浓度进行摸索。

2) 预实验中, 建议设置不同浓度梯度的 EdU 染色液, 以确定最佳的实验浓度。也可以参考本操作说明《附表 2. 常见细胞系 EdU 孵育时间设定参考》以及《附表 3. 细胞实验 EdU 孵育浓度及时间参考》。

注: 建议使用不添加 EdU 的细胞样本作为阴性对照。

2. 固定与通透

注: 以下步骤中试剂使用量以 6 孔板为参考, 其他培养孔可根据实验需要进行适当调整。

1) 收集细胞, 300 \times g 离心 5 min, 弃上清。

2) 加入 1 mL 含 1% BSA 的 PBS 溶液重悬细胞, 充分混匀后 300 \times g 离心 5 min, 弃上清。

3) 加入 1 mL 含 4%多聚甲醛的 PBS 重悬细胞, 充分混匀后室温避光孵育 15 min。

4) 300 \times g 离心 5 min, 弃上清, 加入 1 mL 含 1% BSA 的 PBS 溶液重悬细胞, 充分混匀。

5) 300 \times g 离心 5 min, 弃上清, 加入 1 mL 含 1% BSA 的 PBS 溶液重悬细胞, 充分混匀后 300 \times g 离心 5 min, 弃上清。

6) 加入 0.5 mL 含 1% Saponin 的 PBS 溶液混匀, 室温孵育 20 min。



3. 荧光标记

本说明书按照六孔板每孔 500 μL 的反应体系，对于 12、24、48、96 孔板，每孔加的 Click 反应液体积参考附录表 1。

1) 根据实验样本数，参考下表配制 Click 反应液。

| 组分 | 样本数 | | | | | | |
|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| | 1 | 2 | 4 | 5 | 10 | 25 | 50 |
| Click Reaction Buffer I | 440 μL | 880 μL | 1.76 mL | 2.2 mL | 4.4 mL | 11 mL | 22 mL |
| CuSO ₄ | 40 μL | 80 μL | 160 μL | 200 μL | 400 μL | 1 mL | 2 mL |
| PriFluor 647 Azide I | 1 μL | 2 μL | 4 μL | 5 μL | 10 μL | 25 μL | 50 μL |
| Click Additive Solution | 20 μL | 40 μL | 80 μL | 100 μL | 200 μL | 500 μL | 1 mL |
| 总体积 | 500 μL | 1 mL | 2 mL | 2.5 mL | 5 mL | 12.5 mL | 25 mL |

注：

- 请严格按照上表中组分顺序和体积配制 Click 反应液，否则会影响后续实验。
- Click 反应液需在配制后 15 min 内使用。

- 300 \times g 离心 5 min，弃上清，每孔加入上述表格配制的 500 μL 的 Click 反应液，混匀，室温避光孵育 30 min。
- 300 \times g 离心 5 min，弃上清，每孔加入 1 mL 含 1% Saponin 的 PBS 溶液混匀，300 \times g 离心 5 min，弃上清。
- 加入 200 μL 含 1% BSA 的 PBS 溶液混匀，上机检测。

注：

- PriFluor 647 的最大激发波长是 650 nm，最大发射波长是 670 nm。
- 为避免荧光淬灭，请尽快检测。

附录

表1 Click反应液的使用量参考

| | 96孔板 | 48孔板 | 24孔板 | 12孔板 | 6孔板 |
|-----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Click 反应液 | 100 μL | 150 μL | 250 μL | 400 μL | 500 μL |

表2 常见细胞系EdU孵育时间设定参考

| 细胞类型 | 人胚胎细胞 | 酵母细胞 | 人成纤维细胞 | 人宫颈癌细胞 | 人胚肾细胞系 | 人神经细胞 |
|------|---------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 倍增时间 | ~30 min | ~3 h | ~18 h | ~21 h | ~25 h | ~5 d |
| 孵育时间 | 5 min | 20 min | 2 h | 2 h | 2 h | 1 d |



表3 细胞实验EdU孵育浓度及时间参考

| PubMed ID | Reference | Cell line | Concentration | Time |
|-----------|--|-----------------------|---------------|-------|
| 19647746 | Yu Y, et al. J Immunol Methods. 2009 | Spleen cells | 50 μ M | 24 h |
| 19544417 | Momcilović O, et al. Stem Cells. 2009 | Human ES cells | 10 μ M | 0.5 h |
| 20080700 | Cinquin O, et al. PNAS. 2010 | emb-30 | 1 μ M | 12 h |
| 20025889 | Han W, et al. Life Sci. 2009 | VSMC | 50 μ M | 2 h |
| 20659708 | Huang C, et al. J Genet Genomics. 2010 | ESC | 50 μ M | 2 h |
| 21310713 | Hua H, et al. Nucleic Acids Res. 2011 | Fission yeast strains | 10 μ M | 3 h |
| 20824490 | Lv L, et al. Mol Cell Biochem. 2011 | EJ cells | 50 μ M | 4 h |
| 21248284 | Yang S, et al. Biol Reprod. 2011 | GC cells | 50 μ M | 2 h |
| 21227924 | Zhang YW, et al. Nucleic Acids Res. 2011 | U2OS, HT29 | 30 μ M | 1.5 h |
| 21829621 | Guo T, et al. PloS One. 2011 | HIT-T15 | 50 μ M | 4 h |
| 21980430 | Zeng T, et al. PloS One. 2011 | MCF-10A | 25 μ M | 2 h |
| 22012572 | Ding D, et al. Int Orthop. 2011 | C3H10T1/2 | 10 μ M | 24 h |
| 22000787 | Zeng W, et al. Biomaterials. 2011 | EPC | 50 μ M | 4 h |
| 21913215 | Xue Z, et al. J Cell Biochem. 2011 | SGC7901 | 25 μ M | 24 h |
| 22016038 | Peng F, et al. Lasers Med Sci. 2011 | MSC | 50 μ M | 2 h |
| 21878637 | Li D, et al. J Biol Chem. 2011 | HCC | 50 μ M | 2 h |

声明

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. EdU 的标记浓度应根据所用的细胞类型做相应的优化选择，推荐以 10 μ M 的 EdU 初始浓度进行摸索，请提前做预实验确认 EdU 的最佳使用浓度。
4. 由于 EdU 标记反应在细胞内进行，且通过荧光显微镜检测，EdU 标记前请确保细胞固定通透完全。如冬天室温过低，建议适当延长固定时间或 4 $^{\circ}$ C 固定过夜。
5. Click Additive 配制成溶液后请注意适当分装。如果溶解后有白色物质析出，请上下颠倒多次，待全部溶解后方可使用。如该溶液颜色变成棕色，说明组分的有效成分已失效，请弃用。
6. 铜离子会影响 GFP、RFP、mCherry 等荧光蛋白的荧光，因此本试剂盒不适用于带 GFP、RFP、mCherry 等荧光的细胞检测。

