

Click-iT EdU 流式检测试剂盒

产品说明书

产品货号及规格：

货号	产品名称	规格
SB-C6019	488 Click-iT EdU 流式检测试剂盒（绿色荧光）	20T
SB-C6019		50T
SB-C6020	555 Click-iT EdU 流式检测试剂盒（橙红色荧光）	20T
SB-C6020		50T
SB-C6021	594 Click-iT EdU 流式检测试剂盒（红色荧光）	20T
SB-C6021		50T
SB-C6022	647A Click-iT EdU 流式检测试剂盒（远红荧光）	20T
SB-C6022		50T

产品内容：

组分 \ 规格	5T	20T	50T	保存温度	稳定性
A. 10 mM EdU	100 μ L	0.4 mL	1 mL	-20 $^{\circ}$ C	按指定温度保存 可有效放置一年
B. 488/555/594/647A Azide	25 μ L	100 μ L	250 μ L	-20 $^{\circ}$ C，避光	
C. 10 $\times$ Click-iT EdU 反应缓冲液	500 μ L	2 $\times$ 1 mL	5 mL	2-8 $^{\circ}$ C	
D. CuSO ₄	200 μ L	0.8 mL	2 $\times$ 1 mL	2-8 $^{\circ}$ C	
E. Click-iT EdU 缓冲液添加物	15 mg	60 mg	150 mg	2-8 $^{\circ}$ C	

规格：上述反应次数针对 6 孔板培养的细胞，不同容器的具体用量可参考附表 1。

荧光光谱数据：488 Azide：495/519 nm；555 Azide：555/565 nm；
594 Azide：590/617 nm；647A Azide：650/670 nm.

储存条件

-20 $^{\circ}$ C避光保存，有效期见外包装。开封后，保存温度详见说明书。

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。

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，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，方便BrdU抗体结合；而EdU法只需标准化的多聚甲醛固定和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。

使用方法

实验材料（自备）

- 10 mM PBS, pH 7.2-7.6
- 中性多聚甲醛固定液（in PBS）
- 促渗试剂（0.5 % Triton X-100 in PBS）
- 1 % BSA in PBS, pH 7.4
- ddH₂O

实验步骤

1. EdU 标记细胞

（1）每孔 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ 个细胞接种于6孔板中，培养至正常状态后进行药物处理或其他刺激处理。

（2）培养基稀释 10 mM EdU 至合适浓度，阴性对照组不用 EdU 处理。

注：EdU 的标记浓度需根据细胞类型加以调整，建议以 10 μ 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。

（3）细胞培养箱中孵育一段时间。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：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 μ M；长时间孵育（>24 h）宜采用低浓度，如：1~10 μ M；也可参考附表 3。

2. 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，1 % BSA清洗细胞1次，离心收集细胞。

（2）100 μ L 4 % 多聚甲醛重悬细胞。

（3）室温避光孵育15 min。

（4）1 % BSA 洗涤细胞2次。

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

3. 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 $\times$ Click-iT EdU反应缓冲液：用ddH₂O将组分C稀释10倍。

（2）配置5 $\times$ Click-iT EdU 缓冲液添加物（组分 E）：加600 μ L ddH₂O 至60 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 $^{\circ}$ 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 $\times$ 储液备用。对于50 T的规格，需添加1.5 mL ddH₂O。

（3）准备1 $\times$ Click-iT EdU缓冲液添加物：以ddH₂O稀释5 $\times$ Click-iT EdU缓冲液添加物储液至1 $\times$ ，溶液应现配现用。

（4）依据表 1 准备 Click-iT 工作液。

表 1: Click-iT 工作液

反应组分	单次反应所需加液体积
1 $\times$ Click-iT EdU 反应缓冲液	875 μ L
CuSO ₄ （组分 D）	20 μ L
488/555/594/647A Azide（组分 B）	5 μ L
1 $\times$ Click-iT EdU 缓冲液添加物	100 μ L
总体积	1 mL

(5) 每管加入 1 mL Click-iT 工作液，混匀。

(6) 室温避光孵育 30 min。

(7) 1% BSA 洗涤细胞 1 次，收集细胞，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。

4. 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。

5. DNA 含量计算（可选步骤）

1) 如有需要，可加入适量 RNase 至每管，混匀。

2) 每管加入适量 DNA 染色液，避光孵育 10-15 min。

3) 上机待检。

附录：

附表 1. EdU 培养基及染色反应液的参考使用量

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

注：（1）*表示贴壁细胞通常采用的培养容器，EdU培养基和染色反应液用量以覆盖细胞为宜；（2）悬浮细胞 EdU用量依据培养体积而定。

附表 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	~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

注：（1）EdU 孵育时间取决于细胞周期，一般为细胞周期的 1/10 至 1/5，但大多数细胞系均可采用 2 h 孵育时间；

（2）考虑到细胞培养基、温度、湿度、光线等其他因素的影响，细胞周期会有所变化。

附表 3. 文献中EdU孵育浓度及时间

PubMed ID	Reference	Cell Line	Concentration	Time
18272492	Salic A, <i>et al.</i> PNAS.2008	NIH3T3, Hela	10 nM~10 μ M	1 h
18521918	Cappella P, <i>et al.</i> Cytometry A.2008	HL-60, A2780, U2OS	1~10 μ M	0.5 h
18996411	Chehehasa F, <i>et al.</i> Neurosci Methods.2009	Neurospheres	1~20 μ M	24 h
19179371	Limsirichaikul S, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res.2009	Primary fibroblasts	10 μ M	1,2,4 h
19253396	Warren M, <i>et al.</i> Dev Dyn.2009	Chick embryos	10 μ M~2 mM	4 h
19647746	Yu Y, <i>et al.</i> J Immunol Methods.2009	Spleen cells	50 μ M	24 h
19544417	Momicilovic O, <i>et al.</i> Stem Cells.2009	Human ES cells	10 μ M	0.5 h
20080700	Cinquin O, <i>et al.</i> PNAS.2010	emb-30	1 μ M	12 h
20025889	Han W, <i>et al.</i> Life Sci.2009	VSMC	50 μ M	2 h
20659708	Huang C, <i>et al.</i> J Genet Genomics.2010	ESC	50 μ M	2 h
21310713	Hua H, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res.2011	Fission yeast strains	10 μ M	3 h
20824490	Lv L, <i>et al.</i> Mol Cell Biochem.2011	EJ cells	50 μ M	4 h
21248284	Yang S, <i>et al.</i> Biol Reprod.2011	GC cells	50 μ M	2 h
21227924	Zhang YW, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res.2011	U2OS, HT29	30 μ M	1.5 h
21829621	Guo T, <i>et al.</i> PloS One. 2011	HIT-T15	50 μ M	4 h
21980430	Zeng T, <i>et al.</i> PloS One. 2011	MCF-10A	25 μ M	2 h
22012572	Ding D, <i>et al.</i> Int Orthop.2011	C3H10T1/2	10 μ M	24 h
22000787	Zeng W, <i>et al.</i> Biomaterials.2011	EPC	50 μ M	4 h
21913215	Xue Z, <i>et al.</i> J Cell Biochem.2011	SGC7901	25 μ M	24 h
22016038	Peng F, <i>et al.</i> Lasera Med Sci.2011	MSC	50 μ M	2 h
21878637	Li D, <i>et al.</i> J Biol Chem.2011	HCC	50 μ M	2 h