产 品 说 明 书

Click-iT EdU 通用款细胞增殖检测试剂盒

产品货号及规格:

货号	产品名称	规格（荧光镜检）	规格（流式）
SB-C6043S	488 Click-iT EdU 通用款细胞增殖检测试剂盒（绿色荧光）	20T	2 次
SB-C6043M		100T	10 次
SB-C6043L		500T	50 次
SB-C6043XL		1000T	100 次
SB-C6044S	555 Click-iT EdU 通用款细胞增殖检测试剂盒（橙红荧光）	20T	2 次
SB-C6044M		100T	10 次
SB-C6044L		500T	50 次
SB-C6044XL		1000T	100 次
SB-C6045S	594 Click-iT EdU 通用款细胞增殖检测试剂盒（红色荧光）	20T	2 次
SB-C6045M		100T	10 次
SB-C6045L		500T	50 次
SB-C6045XL		1000T	100 次
SB-C6046S	647A Click-iT EdU 通用款细胞增殖检测试剂盒（远红荧光）	20T	2 次
SB-C6046M		100T	10 次
SB-C6046L		500T	50 次
SB-C6046XL		1000T	100 次

产品内容：

组分 \ 规格	镜检	20T	100T	500T	1000T	开封后保存温度	稳定性
	流式	2 次	10 次	50 次	100 次		
A. 10 mM EdU		40 μL	200 μL	1 mL	2× 1 mL	-20℃	开封后按指定温度保存，可有效放置一年
B. 488/555/594/647A Azide		10 μL	50 μL	250 μL	500 μL	-20℃，避光	
C. 10× Click-iT EdU 反应缓冲液		200 μL	1 mL	5 mL	10 mL	2-8℃	
D. CuSO4		100 μL	500 μL	2× 1.25 mL	5 mL	2-8℃	
E. Click-iT EdU 缓冲液添加物		6 mg	30 mg	150 mg	2 × 150 mg	2-8℃	
F. Hoechst 33342		5 μL	25 μL	125 μL	250 μL	2-8℃	

规格：上述荧光显微镜检测方法反应次数针对 96 孔板培养的细胞，流式细胞仪检测方法反应次数针对 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；Hoechst 33342：350/461 nm（bound to DNA）

储存条件

-20℃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。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，从而方便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
- 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 ddH_2O）
- 3 %BSA in PBS, pH 7.2-7.6
- 1 % BSA in PBS, pH 7.4
- ddH_2O

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 4×10^3-1×10^5 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

客户可以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），制备适量EdU培养基；

注：EdU的标记浓度需根据细胞类型加以调整，建议以10 μM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）细胞培养箱中孵育一段时间。

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 μM；长时间孵育（>24 h）宜采用低浓度，如：1~10 μM；也可参考**附表3**。

4. 细胞固定及促渗

（1）孵育完成后，去除培养基。加入50 μL 4 % 多聚甲醛固定液，室温孵育15-30 min后，去除固定液。

（2）每孔加入50 μL 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 μL 3 % BSA洗涤细胞2次。

（4）去除洗涤液，加入100 μL 0.5 % Triton X-100，室温孵育20 min。

（5）去除促渗剂，每孔100 μL的3% BSA洗涤液洗涤2次。

5. EdU 检测

注：本参考步骤每个样本使用100 μL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ddH_2O将组分C稀释10倍。

（2）配置5× Click-iT EdU缓冲液添加物（组分E）：例如加300 μL的ddH_2O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℃，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ddH_2O溶解，制备成5× 储液备用。

（3）准备1× Click-iT EdU缓冲液添加物：用ddH_2O稀释5×Click-iT EdU缓冲液添加物至1×，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	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
488/555/594/647A Azide（组分 B）	5 μL
1× Click-iT EdU 缓冲液添加物	100 μL
总体积	1 mL

（5）每孔加入 100 μL Click-iT 工作液，均匀覆盖细胞。

（6）室温避光孵育 30 min。

（7）除去 Click-iT 工作液，以 100 μL 3% BSA 洗涤细胞 2 次后，去除洗涤液。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× 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

流式细胞仪检测方法

1. 细胞培养

取对数生长期细胞，以每孔 1×10^5-3×10^6 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 6 孔板中，培养至正常生长阶段。

2. 药物处理

客户可以根据实验需要进行各种药物处理。

3. EdU 标记细胞

（1）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 μM 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 μM；长时间孵育（>24 h）宜采用低浓度，如：1~10 μM；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，1 % BSA 清洗细胞 1 次，离收集细胞。

（2）100 μL 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 μL 0.5 % Triton X-100 促渗液重悬细胞，室温孵育 20 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。

（3）配置 1× Click-iT EdU 反应缓冲液：用 ddH_2O 将组分 C 稀释 10 倍。

（4）配置 5× Click-iT EdU 缓冲液添加物（组分 E）：加 300 μL ddH_2O 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℃，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 ddH_2O 溶解为 5× 储液备用。

（3）准备 1× Click-iT EdU 缓冲液添加物：以 ddH_2O 稀释 5×Click-iT EdU 缓冲液添加物储液至 1×，溶液应现配现用。

（4）依据表 2 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
488/555/594/647A Azide（组分 B）	5 μL
1× Click-iT EdU 缓冲液添加物	100 μL
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。

6. 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。

7. 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 μL	150 μL	200 μL	500 μL	1 mL	2 mL
染色反应液	100 μL	150 μL	200 μL	500 μL	1 mL	2 mL

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,*et al.*PNAS.2008	NIH3T3,Hela	10 nM~10 μM	1 h
18521918	Cappella P, *et al.* Cytometry A.2008	HL-60,A2780,U2OS	1~10 μM	0.5 h
18996411	Chehehasa F, *et al.*Neurosci Methods.2009	Neurospheres	1~20 μM	24 h
19179371	Limsirichaikul S, *et al.*Nucleic Acids Res.2009	Primary fibroblasts	10 μM	1,2,4 h
19253396	Warren M, *et al.* Dev Dyn.2009	Chick embryos	10 μM~2 mM	4 h
19647746	Yu Y, *et al.* J Immunol Methods.2009	Spleen cells	50 μM	24 h
19544417	Momcilovic O, *et al.*Stem Cells.2009	Human ES cells	10 μM	0.5 h
20080700	Cinquin O, *et al.* PNAS.2010	emb-30	1 μM	12 h
20025889	Han W, *et al.* Life Sci.2009	VSMC	50 μM	2 h
20659708	Huang C, *et al.* J Genet Genomics.2010	ESC	50 μM	2 h
21310713	Hua H, *et al.* Nucleic Acids Res.2011	Fission yeaststrains	10 μM	3 h

20824490	Lv L, *et al.*Mol Cell Biochem.2011	EJ cells	50 μM	4 h
21248284	Yang S, *et al.*Biol Reprod.2011	GC cells	50 μM	2 h
21227924	Zhang YW, *et al.* Nucleic Acids Res.2011	U2OS, HT29	30 μM	1.5 h
21829621	Guo T, *et al.*PloS One. 2011	HIT-T15	50 μM	4 h
21980430	Zeng T, *et al.*PloS One. 2011	MCF-10A	25 μM	2 h
22012572	Ding D, *et al.*Int Orthop.2011	C3H10T1/2	10 μM	24 h
22000787	Zeng W, *et al.* Biomaterials.2011	EPC	50 μM	4 h
21913215	Xue Z, *et al.* J Cell Biochem.2011	SGC7901	25 μM	24 h
22016038	Peng F, *et al.*Lasera Med Sci.2011	MSC	50 μM	2 h
21878637	Li D, *et al.* J Biol Chem.2011	HCC	50 μM	2 h