

产品说明书

产品名称: YF[®] 488/555/594/647A Click-iT EdU Flow Cytometry Assay Kits

产品货号: BN16019(YF[®]488)、BN16020(YF[®]555)、BN16021(YF[®]594)、BN16022(YF[®]647A)

产品规格:20 T、50 T

产品内容:

组分	20 T	50 T	保存温度	稳定性
组分 A 10mM EdU	0.4 mL	1 mL	-20°C	按指定温度保存可 有效放置 一年
组分 B YF [®] 488/555/594/647A Azide	100 µL	250 µL	-20°C, 避光	
组分 C CuSO ₄	0.8 mL	2mL	2-8°C	
组分 D Click-iT EdU 缓冲液添加物	60 mg	150 mg	2-8°C	

规格: 上述反应次数是针对 6 孔板培养的细胞。(不同容器的具体用量可参考附表 1.EdU 培养基及染色反应液的使用量参考)

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

其他所需试剂

10 mM PBS, pH7.2-7.6

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, pH7.4

去离子水

储存条件

-20°C避光保存, 可保存 12 个月。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。此前, 最精确的检测细胞增殖方法是 BrdU 法, 而 EdU 法检测是 BrdU 方法的革命性突破。EdU (5-乙炔基-2-脱氧尿嘧啶核苷) 是一种嘧啶类

类似物, 可以在 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。

在本试剂盒中, EdU 含有炔烃, YF[®]488/555/594/647A 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非常有效地标记出整合的 EdU。标准化的多聚甲醛固定和 Triton X-100 促渗可以使检测试剂进入细胞, 无需 DNA 变性。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 流式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。

实验步骤

1、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,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。您也可以参考本操作说明附表 2. 细胞实验 EdU 孵育浓度及时间参考。

1.1 每孔 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ 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。

1.2 EdU 加入细胞培养基至所需的浓度混匀,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。阴性对照组不用 EdU 处理。

1.3 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。

(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 μ M,长时间孵育(>24 h)宜采用低浓度,如: 1~10 μ M)。

2、细胞固定及促渗

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。

注意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 in PBS 洗涤 2 次细胞后,在细胞固定促渗之前进行。

2.1 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

2.2 100 μ L 4% 多聚甲醛 in PBS 重悬细胞。

2.3 室温避光孵育细胞 15 min。

2.4 1% BSA in PBS 的洗涤液洗涤细胞 2 次。

2.5 0.1 mL 0.5% Triton X-100 促渗液重悬细胞,室温孵育 20 min。

3、EdU 检测

注意:对于 6 孔板收集的细胞样本可参考每个反应需要 1 mL 的反应工作液来进行。可以根据自己的样本情况调整等比例减少所用的溶液体积。

3.1 制备一份 5 \times 的 Click-iT EdU 缓冲液添加物储液:加 0.6 mL 去离子水至 60 mg 的 D 组分试管中(100 mg/mL),混匀至全部溶解(注:对于 50 T 的规格,需添加 1.5 mL 去离子水)。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 D 均按照此比例加去离子水溶解为 5 \times 储液备用)。

3.2 准备 1 \times Click-iT EdU 缓冲液添加物:以去离子水稀释 5 \times 储液至 1 \times ,溶液应新鲜配置,当天用完。

3.3 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 Click-iT 反应混合物

反应组分	每单次反应所需的加液体积
PBS, D-PBS, or TBS	875 μ L
CuSO ₄ (组分 C)	20 μ L
YF [®] 488/555/594/647A Azide (组分 B)	5 μ L
1 \times 缓冲液添加物 (步骤 3.1 所准备)	100 μ L
总体积	1 mL

3.4 加入 1 mL Click-iT 反应混合物至每管，混匀。

3.5 室温避光孵育反应混合物 30 min。

3.6 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：如需同时进行其他标志物检测可参考 4.1-4.3）。

4、细胞内抗原标记（可选步骤）

4.1 加入所需抗体的孵育工作液，混匀。

4.2 避光条件下，以合适的温度及时间孵育抗体。

4.3 以 0.5% Triton X-100 促渗液洗涤每管样品，收集细胞，去除上清液。

4.4 以 1% BSA 的 PBS 重悬细胞，上机检测。

5、DNA 含量计算（可选步骤）

5.1 如有需要，可加入适量 RNase 至每管，混匀。

5.2 加入合适的 DNA 染色液至每管，混匀，避光孵育 10-15 min。

5.3 上机待检。

附录:
表 1. EdU 培养基及染色反应液的使用量参考

	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

表 2. 细胞实验 EdU 孵育浓度及时间参考

PubMed ID	Reference	Cell Line	Concentration	Time
18272492	Salic A, <i>et al.</i> PNAS.2008	NIH3T3, HeLa	10 nM~10 μ M	1 hr
18521918	Cappella P, <i>et al.</i> Cytometry A.2008	HL-60, A2780, U2OS	1~10 μ M	30 min
18996411	Chehrehasa F, <i>et al.</i> Neurosci Methods.2009	Neurospheres	1~20 μ M	24 hr
19179371	Limsirichaikul S, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res.2009	Primary fibroblasts	10 μ M	1,2,4 hr
19253396	Warren M, <i>et al.</i> Dev Dyn.2009	Chick embryos	10 μ M~2 mM	4 hr
19647746	Yu Y, <i>et al.</i> J Immunol Methods.2009	Spleen cells	50 μ M	24 hr
19544417	Momicilovic O, <i>et al.</i> Stem Cells.2009	Human ES cells	10 μ M	30 min
20080700	Cinquin O, <i>et al.</i> PNAS.2010	emb-30	1 μ M	12 hr
20025889	Han W, <i>et al.</i> Life Sci.2009	VSMC	50 μ M	2 hr
20659708	Huang C, <i>et al.</i> J Genet Genomics.2010	ESC	50 μ M	2 hr
21310713	Hua H, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res.2011	Fission yeast strains	10 μ M	3 hr
20824490	Lv L, <i>et al.</i> Mol Cell Biochem.2011	EJ cells	50 μ M	4 hr
21248284	Yang S, <i>et al.</i> Biol Reprod.2011	GC cells	50 μ M	2 hr
21227924	Zhang YW, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res.2011	U2OS, HT29	30 μ M	90 min
21829621	Guo T, <i>et al.</i> PloS One. 2011	HIT-T15	50 μ M	4 hr
21980430	Zeng T, <i>et al.</i> PloS One. 2011	MCF-10A	25 μ M	2 hr
22012572	Ding D, <i>et al.</i> Int Orthop.2011	C3H10T1/2	10 μ M	24 hr
22000787	Zeng W, <i>et al.</i> Biomaterials.2011	EPC	50 μ M	4 hr
21913215	Xue Z, <i>et al.</i> J Cell Biochem.2011	SGC7901	25 μ M	24 hr
22016038	Peng F, <i>et al.</i> Lasera Med Sci.2011	MSC	50 μ M	2 hr
21878637	Li D, <i>et al.</i> J Biol Chem.2011	HCC	50 μ M	2 hr