

AF 594 Click-iT EdU

Cat# CP0011

产品概述

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 AF 594 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，可以用于细胞增殖检测及细胞周期分析，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

产品名称	货号	规格
AF 594 Click-iT EdU	CP0011-10-100T	10-100T
	CP0011-50-500T	50-500T

组分信息

组分编码	产品组分	CP0011-10-100T	CP0011-50-500T
CP0011-1	10 mM EdU	200 µL	1 mL
CP0011-2	AF 594 Azide	50 µL	250 µL
CP0011-3	10×Click-iT EdU 反应缓冲液	1 mL	5 mL
CP0011-4	CuSO ₄	500 µL	2×1.25 mL
CP0011-5	Click-iT EdU 缓冲液添加物	30 mg	150 mg
CP0011-6	Hoechst 33342	25 µL	125 µL

规格：如果用于荧光显微镜检测，所能使用次数为上述各个规格的最大使用次数（针对 96 孔板培养的细胞），如 CP0011-10-100T 可检测 100 个孔的样品；如果用于流式检测，所能使用次数为上述各个规格的最小使用次数，如 CP0011-10-100T 可检测 10 个样品。

荧光光谱数据：AF 594 Azide：590/617 nm；Hoechst 33342：350/461 nm（bound to DNA）

储存方式

-25 ~ -15℃避光储存。开封后，10 mM EdU 需 -25 ~ -15℃储存，AF 594 Azide 需 -25 ~ -15℃避光储存，其余组分 2-8℃储存即可。

使用说明

荧光显微镜检测方法

1. 其他所需试剂(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 ddH₂O)
3% BSA in PBS, pH 7.2-7.6
ddH₂O
96/24/12/6 孔培养板或培养皿

2. EdU 标记细胞

【注】: 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。

- 2.1. 以每孔 4×10^3 - 1×10^5 细胞密度接种于 96 孔板中, 进行所需要的药物处理或其他刺激处理。
- 2.2. 准备一份 2 $\times$ 的 EdU 工作液 (CP0011-1): 以完全培养基稀释 10 mM 的储液至合适的工作浓度。建议以 10 μ M 的初始工作浓度开始预实验。
- 2.3. 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)。
- 2.4. 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】: 最佳孵育时间与细胞周期有关, 大多数肿瘤细胞系均可采用 2 h 的孵育时间。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。

3. 细胞固定及促渗操作

【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 3% BSA 洗涤液洗涤细胞 2 次, 在细胞固定促渗之前进行。

- 3.1. 孵育完成后, 去除培养基, 以 1 $\times$ PBS 清洗细胞 2 次, 每次 5 min, 以除去未掺入 DNA 的 EdU 残留, 贴壁不牢的细胞可降低清洗强度。每孔加 50 μ L 4%中性多聚甲醛固定, 室温孵育 15-30 min 后, 去除固定液。
- 3.2. 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。
- 3.3. 以每孔 0.1 mL 3% BSA in PBS 的洗涤液洗涤细胞 2 次。
- 3.4. 去除洗涤液, 每孔加入 0.1 mL 0.5% Triton X-100 in PBS, 室温孵育 20 min。

【注】: 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, 如以甲醇固定或以皂苷固定的样本等。

4. EdU 检测

【注】: 本参考步骤每孔反应使用 100 μ L Click-iT 反应混合物。用户可根据自己的样本情况调整, 等比例增加或减少所用溶液体积。

- 4.1. 准备 1 $\times$ Click-iT EdU 反应缓冲液 (CP0011-3): 10 $\times$ CP0011-3 试剂以去离子水稀释 10 倍即得。
- 4.2. 制备一份 5 $\times$ Click-iT EdU 反应添加物储液 (CP0011-5): 加 0.3 mL 去离子水至 30 mg 的 Click-iT EdU 缓冲液添加物中 (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 Click-iT EdU 缓冲液添加物均按照此比例加去离子水溶解为 5 $\times$ 储液备用。

- 4.3. 准备 1 $\times$ Click-iT EdU 缓冲液添加物: 以去离子水稀释 5 $\times$ 储液 (CP0011-5) 至 1 $\times$, 溶液应现用现配, 当天用完。

4.4. 依据表 1 准备 Click-iT 工作液。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	855 μL
CuSO ₄ (CP0011-4)	40 μL
AF 594 Azide (CP0011-2)	5 μL
1× 反应缓冲液添加物	100 μL
总体积	1 mL

- 4.5. 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。
- 4.6. 每孔加入 0.1 mL Click-iT 反应混合物，轻轻摇晃培养板以确保反应混合物可以均匀覆盖细胞。
- 4.7. 室温避光孵育 30 min。
- 4.8. 除去反应混合物，每孔以 0.1 mL 3% BSA in PBS 洗涤 2 次，去除洗涤液。
- 4.9. 对于核染色，可以进行 DNA 复染。如无其他特别要求，即可进行拍照分析。

5. DNA 复染（可选）

- 5.1. 以 0.1 mL PBS 洗涤每孔 1 次，去除洗涤液。
- 5.2. 以 PBS 稀释 Hoechst 33342 (CP0011-6) 储液 1:2000 至 1× Hoechst 33342 溶液，终浓度为 5 μg/mL。
- 5.3. 每孔加 0.1 mL 1× Hoechst 33342 溶液，室温避光孵育 15-30 min。去除 Hoechst 33342 溶液。
- 5.4. 0.1 mL PBS 洗涤每孔 2 次，去除洗涤液。

6. 成像及分析

建议染色完成后立即进行荧光显微镜拍照观察；如果条件限制，请于 4℃ 条件下避光湿润保存 3 天内完成拍照。

流式细胞仪检测方法

1. 其他所需试剂（自备）

- 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

2. EdU 标记

【注】：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 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。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。

- 2.1. 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。进行所需要的药物处理或者其他刺激处理。
- 2.2. 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。
- 2.3. 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】：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。

3. 细胞固定及促渗操作

【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 洗涤液洗涤细胞 2 次，在细胞固定促渗之前进行。

- 3.1. 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。
- 3.2. 100 μ L 4% 多聚甲醛 in PBS 重悬细胞。
- 3.3. 室温避光孵育 20 min，1000 rpm 离心 5 min，吸弃上清。
- 3.4. 1% BSA in PBS 的洗涤液洗涤细胞 2 次。
- 3.5. 每管加入 1 mL 2 mg/mL 甘氨酸孵育 5 min，中和残留的固定液，1000 rpm 离心 5 min，吸弃上清，每管加入 1 mL PBS 清洗 1 次，1000 rpm 离心 5 min，吸弃上清。
- 3.6. 0.1 mL 0.5% Triton X-100 促渗液重悬细胞，室温孵育 10 min。

【注】：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，如以甲醇固定或以皂苷固定的样本等。

4. EdU 检测

- 4.1. 制备一份 5 $\times$ Click-iT EdU 反应添加物储液 (CP0011-5)：加 1 mL 去离子水至 100 mg 的 Click-iT EdU 缓冲液添加物中 (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 Click-iT EdU 缓冲液添加物均按照此比例加去离子水溶解为 5 $\times$ 储液备用。

- 4.2. 准备 1 $\times$ Click-iT EdU 缓冲液添加物：以去离子水稀释 5 $\times$ 储液 (CP0011-5) 至 1 $\times$ ，溶液应现用现配，当天用完。
- 4.3. 准备 1 $\times$ Click-iT EdU 反应缓冲液：10 $\times$ Click-iT EdU 反应缓冲液 (CP0011-3) 以去离子水稀释 10 倍即可。
- 4.4. 依据表 2 准备 Click-iT 反应混合物。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	875 μ L
CuSO ₄ (CP0011-4)	20 μ L
AF 594 Azide (CP0011-2)	5 μ L
1 $\times$ 反应缓冲液添加物	100 μ L
总体积	1 mL

- 4.5. 1000 rpm 离心 5 min，吸弃上清，去除促渗剂，每管加入 1 mL 1% BSA 洗涤液洗涤 2 次，1000 rpm 离心 5 min，吸弃上清。
- 4.6. 加入 1 mL Click-iT 反应混合物至每管，混匀。
- 4.7. 室温避光孵育反应混合物 30 min。
- 4.8. 以 1% BSA in PBS 洗涤细胞 2 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。

Technical Support

Copyright © 2023 CYTOCH, All Rights Reserved. The CYTOCH logo is a registered trademark.

To place an order or to obtain a product information, please go to: www.cytoch.com.

Or contact us by:

E-mail: support@cytoch.com

Tel: 400-969-8881

For research use only.

CYTOCH