

EdU-647 荧光法细胞增殖成像检测试剂盒

产品介绍：

BrdU 作为一种胸腺嘧啶核苷的类似物（其化学结构特点是胸腺嘧啶的碱基嘧啶环上与 5 位 C 原子连接的甲基被溴代替），像胸腺嘧啶核苷一样可掺入到细胞合成的 DNA 中。当细胞处于 DNA 合成期（S 期），在培养基中加入 BrdU，其就会掺入新合成的 DNA 中，这种 BrdU 就在胞核的 DNA 中长期存留；再通过 HRP 标记的 BrdU 单克隆抗体，就可以通过 TMB 底物显色检测细胞增殖和活力情况。这种方法的缺点是；实验步骤繁琐，并且在加入抗体之前，要充分变性 DNA，才能使 BrdU 单克隆抗体顺利结合到掺入 BrdU 的 DNA 上，同时破坏了其 DNA 双链结构，影响其他染料的结合。如果变性不充分，实验很容易失败。

本试剂盒所用的核酸类似物为 EdU，其掺入新合成 DNA 的原理和过程 BrdU 相同；EdU 的集团上还有一个炔基团，与下游的荧光染料上的叠氮基团，在一价铜离子催化下，发生 Click chemistry 反应，也就是大家翻译成中文的点击化学。本方法与 BrdU 相比的主要优势是操作的流程更简单，并且 EdU 分子只有抗体分子的 1/500，不需要 DNA 的变性步骤；从效果上来说，EdU 比 BrdU 有更好的灵敏度和准确度。

其他需要自备试剂材料：

- 1×PBS (pH 7.2-7.6)
- 细胞固定液（含 3.7% 甲醛的 PBS）
- 细胞透膜液（含 0.5% Triton® X-100 的 PBS）
- 1×Hoechst 33342 染色液
- 含 3% BSA 的 PBS (pH 7.4)
- 去离子水
- 18×18 mm 盖玻片
- 各种规格吸头及移液细胞培养耗材。

储存条件：

2-8°C, 避光，干燥，不要冻存，24 个月

操作流程：

细胞爬片制备（细胞铺板培养）→细胞处理（可选）→EdU 与细胞共培养→细胞固定及细胞膜透化处理→检测 EdU（click chemistry）→抗体或者其他染料染色→图像捕获及分析

操作方法：

1. EdU 的标记

正式实验前，最好做预实验，以确定最佳的标记浓度，因为细胞类型，细胞密度，细胞培养基及培养条件不同，最佳包被浓度也不尽相同。预实验的时候，建议从 10uM 的浓度做几个浓度的梯度来确定最佳使用浓度。

1.1 将洗净灭菌的盖玻片放入细胞培养板孔，将合适浓度的细胞铺到盖玻片上，待细胞贴壁及正常生长到合适的密度；

1.2 将 EdU 溶液用培养基稀释到 20 μ M EdU 初始浓度，使用的时候，加入与细胞培养液相同体积的以上工作液；例如实验时，细胞培养液为 200ul,吸去 100ul 培养液，然后加入 100ul EdU 溶液即可；

1.3 细胞重新放入培养箱培养，培养的时间长度和培养条件是根据细胞类型确定的，确切的说就是根据细胞生长速度和周期确定的。

以下信息仅供参考：人胚胎细胞细胞周期约 30 分钟，EdU 培养 5-10 分钟；人的神经细胞周期是 5 天，EdU 培养 24 小时；人的其他细胞一般生长周期 20 小时左右，EdU 培养 2 小时左右。

2. 细胞固定及膜透化处理

吸干细胞培养液，将含有细胞爬片的板孔内加入 1ml 细胞固定液（含 3.7%甲醛的 PBS）室温固定细胞 15 分钟

吸干细胞固定液，每孔用 1ml 洗涤液(含 3% BSA 的 PBS)浸泡 5 分钟；

吸干细胞清洗液，每孔加入 1ml 细胞膜透化液（含 0.5%的 TritonX-100），室温进行膜透化处理 20 分钟。

3. EdU 的检测

3.1 10XEdU 检测液的配制，将试剂 EdU 管内加入 1ml 去离子水，即为 10XEdU 检测液，使用后及时存放在-20℃，可以稳定保存 1 年。

3.2 EdU 检测工作液配制：用去离子水将 10XEdU 检测液稀释 10 倍，即为 EdU 检测工作液（比如，需要 1mlEdU 检测工作液,取 10XEdU 检测液 100ul,加入 900ul 去离子水，混匀即可），现配现用，不可储存备用。

3.3 EdU 检测反应体系配置，参照下表配制，现配现用，存储不超过 20 分钟。

EdU 检测反应体系参考表(各组分体积单位：ul)

试剂组分	盖玻片数量	
	5	10
Reaction Buffer	430	860
CuSO ₄	20	40
Flour azide	1.5	3
EdU 检测工作液	50	100
总体积	500	1000

3.4 配制 EdU 检测反应体系的同时，立即吸干细胞膜透化液，每孔加入 1ml 含 3% BSA 的 PBS 浸泡清洗 5 分钟，重复一次；

3.5 吸干清洗液，每孔加入 100ul EdU 检测反应液，

3.6 室温避光反应 30 分钟

3.7 吸干 EdU 检测反应液，入 1ml 含 3% BSA 的 PBS 浸泡清洗 5 分钟，重复 1-2 次。

某些细胞贴壁能力较强，背景会偏高，可以使用甲醇清洗 1-2 次，再用含 3% BSA 的 PBS 浸泡清洗 5 分钟，重复 1-2 次。

4. 染色细胞核（如果需要）

推荐选用 1×Hoechst 33342 进行 DNA 染色

染色的步骤如下：

4.1 每孔加入 1 ml PBS 浸泡清洗细胞，吸干细胞清洗液。

4.2 配制 1×Hoechst 33342 染色液。

4.3 每孔加入 200 μ l 1 $\times$ Hoechst 33342 染色液。室温孵育 15 分钟，注意避光。吸干 Hoechst 33342 染色液。

4.4 每孔加入 1 ml PBS 浸泡清洗细胞 5 分钟，重复一次。吸干 PBS。

5. 成像及分析

将细胞爬片晾干，封片，选择合适的波长在荧光显微镜下观察并记录图像。

注意事项：

荧光试剂很容易淬灭，因此实验过程中尽可能选择早期时间观察记录结果，同时注意避光，以减缓淬灭；
为了您的安全，实验过程中请注意佩戴手套。