

EdU 系列细胞增殖检测试剂盒产品说明书

产品类别

货号	产品名称	产品规格
QH-16-1001	EDU-488 细胞增殖检测试剂盒	50-500T / 200-2000T
QH-16-1002	EDU-555 细胞增殖检测试剂盒	50-500T / 200-2000T
QH-16-1003	EDU-594 细胞增殖检测试剂盒	50-500T / 200-2000T
QH-16-1004	EDU-647 细胞增殖检测试剂盒	50-500T / 200-2000T

产品信息

【产品名称】 EdU 系列细胞增殖检测试剂盒

【产品规格】 50-500T / 200-2000T

【产品简介】

细胞增殖是生物生长、发育、繁殖及遗传的基础。EdU 检测法利用 EdU (5'- 乙炔基 - 2'- 脱氧尿苷, 一种胸腺嘧啶核苷类似物) 在细胞增殖时掺入复制中的 DNA, 通过 “Click 反应” (铜催化的炔基与荧光标记叠氮化物探针的共价反应) 检测 EdU 标记, 从而准确反映细胞增殖情况。该方法无需 DNA 变性 (酸解、热解、酶解等), 可减少样本损伤, 在细胞和组织水平均能精准检测。

本试剂盒可检测细胞、组织样品及组织切片中单个增殖细胞, 同时能对这些样本的总体细胞增殖情况进行定量分析, 其中细胞和组织样品包括培养类型, 适用于荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪、荧光酶标仪检测及高内涵筛选 (High-Content Screening, HCS); 需注意, 流式细胞仪与荧光酶标仪检测仅适用于细胞样品, 不适用组织切片。

【检测原理】

本试剂盒能够在细胞增殖过程中, 被活跃合成 DNA 的增殖细胞摄入, 并替代胸腺嘧啶掺入到新合成的 DNA 链中。

由于 EdU 分子中含有乙炔基, 可与含叠氮基团的荧光探针或显色试剂通过高效、特异性的 “点击化学” 反应 (铜催化的叠氮 - 炔基环加成反应) 快速结合, 形成稳定的三唑环结构。通过检测结合后的荧光

信号或显色反应强度，即可特异性标记出掺入 EdU 的增殖细胞 —— 既能够识别单个增殖细胞，也能通过信号的定量分析反映细胞或组织样品中总体的细胞增殖水平，从而实现对细胞增殖情况的精准检测。

【存储条件】

1. 试剂盒有效期为 12 个月
2. -20℃ 保存，荧光染料和 Hoechst 33342 须避光保存。

【使用方法】

1. 实验材料准备

- a. PBS × 1 (pH 7.2-7.6)。
- b. 4% 的多聚甲醛固定液
- c. 含 3% BSA 的 PBS
- d. 通透液(含 0.3% Triton X-100 的 PBS)。
- e. 去离子水或超纯水。

根据实验要求：18×18 mm 盖玻片，6 孔板或其它多孔板，或流式细胞分析仪用管子(如 12×75 mm)。

2. 检测准备

- a. 以下以 6 孔板或常规切片的检测体系为操作示例，若使用 12 孔板、96 孔板或 384 孔板等其他孔板，可按比例相应缩小检测体系。
- b. 对于悬浮细胞的检测，需遵循常规悬浮细胞的操作规范。例如，与贴壁细胞操作相比，需增加离心步骤（如 1000×g 室温离心 5 分钟）等。

3. 培养细胞的 EdU 标记及固定、洗涤和通透

a. 细胞培养与处理

- 在 6 孔板中培养适量细胞（必要时可加入盖玻片）。细胞培养过夜并恢复至正常状态后，进行药物处理或其他刺激处理。

b. 2X EdU 工作液配制

- 由于 EdU 工作液需与培养液等体积加入孔板，故需配制成 2 X 浓度。推荐终浓度为 10 μM (1X)，可将 10 mM EdU 用细胞培养液按 1:500 稀释，得到 20 μM (2X) 的 EdU 工作液。

注意：对于 A549、HeLa、NIH/3T3 等贴壁细胞，推荐 EdU 终浓度为 10 μ M。但 EdU 掺入量受细胞类型、培养液种类、细胞密度、增殖速度等因素影响，初次使用建议摸索适宜浓度；若曾使用 BrdU，可参考其终浓度作为 EdU 终浓度。

c. EdU 工作液加入

- 将 37°C 预热的 2X EdU 工作液（20 μ M）等体积加入 6 孔板，使 EdU 终浓度为 1X（如 10 μ M）。
例如：6 孔板中原培养基为 1 mL 时，加入 1 mL 2X EdU 工作液（20 μ M）。
若培养基体积过大，可先吸除适量培养液，再加入等体积 2X EdU 工作液；或减少工作液体积并提高 EdU 浓度（如 2 mL 培养液中加入 220 μ L 0.1mM EdU），确保最终 EdU 浓度为 10 μ M。不建议更换全部培养液，以免影响细胞增殖。

d. 孵育

- 继续孵育细胞 2 小时。孵育时间取决于细胞生长速率，通常为细胞周期的 10% 左右；
- 常见哺乳动物细胞（如 HeLa、3T3、HEK293）：细胞周期 18-25 小时，孵育约 2 小时；
- 人胚胎细胞：细胞周期约 30 分钟，孵育 5 分钟；
- 酵母细胞：细胞周期约 3 小时，孵育 20 分钟；
- 增殖神经细胞：细胞周期约 5 天，孵育 1 天。

注：孵育时间 < 45 分钟时，建议提高 EdU 浓度；> 20 小时时，建议适当降低浓度。

e. 固定

- EdU 标记完成后，去除培养液，每孔加入 1 mL 固定液（如 4% 多聚甲醛固定液），室温固定 15 分钟。
- **流式细胞仪检测专用：**贴壁细胞需经胰酶消化，用培养液重悬后再固定。

f. 洗涤

- 去除固定液，每孔用 1 mL 洗涤液洗涤细胞 3 次，每次 3-5 分钟。

g. 通透

- 去除洗涤液，每孔用 1 mL 通透液（如含 0.3% Triton X-100 的 PBS），室温孵育 10-15 分钟。

h. 洗涤

- 去除通透液，每孔用 1 mL 洗涤液洗涤细胞 1-2 次，每次 3-5 分钟。

i. 转至步骤 5

4. 动物体内 EdU 的标记及切片样品的处理（以小鼠为例，其他动物可参考相关文献）

EdU 可通过注射、进食等方式进行动物体内标记，具体操作如下：

a. EdU 给药

- 对于小鼠，EdU 用量为 10-200 mg/kg，需用 PBS 配制成适宜浓度，可采用腹腔注射、特定组织 / 器官局部注射或加入饮用水等方式给药。
- 具体用量需根据动物种类、体重及给药方式调整，初次使用建议摸索浓度，或直接以 50 mg/kg 进行测试；若曾使用 BrdU，可参考其终浓度确定 EdU 用量。
- EdU 可单独购买启和产品。

b. 组织取样与切片制备

- 给药后 4 小时（或根据实验需求设定时间），快速处死小鼠，取出目标组织，按常规步骤制备冰冻切片或石蜡切片。
- EdU 标记时间可参考相关文献灵活调整。

c. 冰冻切片处理

- 加入适量固定液（如 4% 多聚甲醛固定液），室温固定 15 分钟。
- 去除固定液，用适量洗涤液洗涤 3 次，每次 3-5 分钟。
- 去除洗涤液，加入适量通透液（如含 0.3% Triton X-100 的 PBS），室温孵育 10-15 分钟。
- 去除通透液，用适量洗涤液洗涤 1-2 次，每次 3-5 分钟。
- **抗原修复（选做）**：若需同时进行目的蛋白免疫荧光染色且有必要修复抗原，可使用适当抗原修复液（可自行配制溶液）处理。
- 转至步骤 5。

d. 石蜡切片处理

脱蜡：

- 二甲苯中脱蜡 5-10 分钟，更换新鲜二甲苯再脱蜡 5-10 分钟；
- 依次经无水乙醇（5 分钟）→ 新鲜无水乙醇（3 分钟）→ 95% 乙醇（3 分钟）→ 85% 乙醇（3 分钟）→ 75% 乙醇（3 分钟）→ 50% 乙醇（3 分钟）→ PBS（5 分钟）处理。

- **抗原修复（选做）**：若需同时进行目的蛋白免疫组化染色，可使用适当抗原修复液（可自行配制溶液）处理。

特别注意：若使用蛋白酶 K 或胰酶修复抗原，需反复洗涤至无残留，否则会严重干扰后续标记反应。

转至步骤 5。

5. EdU 检测

反应体系与操作步骤（以 6 孔板细胞样品为例，其他孔板或切片仅调整溶液用量，操作一致）

反应体系说明

- 6 孔板每孔反应体系为 500 μL 反应混合物；
- 其他孔板对应体系：12 孔板 200 μL 、24 孔板 100 μL 、48 孔板 70 μL 、96 孔板 50 μL 、384 孔板 20 μL （小孔设计已增加单位面积液体用量，减少蒸发影响）；
- 切片样品：根据切片大小，每片使用 100-200 μL 反应混合物。

操作步骤

1. 配制 Click Additive Solution

- 对于 C0071S：用 1.3 mL 去离子水溶解 1 管 Click Additive，混匀至完全溶解；
- 对于 C0071L：用 10.4 mL 去离子水溶解试剂盒中的 1 瓶 Click Additive，混匀至完全溶解。配制后可适当分装，于 -20°C 保存。

2. 配制 Click 反应液

参考下表配制，**注意**：需严格按照表中组分顺序和体积操作（否则可能影响反应效率），且反应液需在配制后 15 分钟内使用。

3. 去除上一步骤中的洗涤液。

4. 每孔加入 0.5 mL Click 反应液，轻轻摇晃培养板，确保反应混合物均匀覆盖样品。

5. 室温避光孵育 30 分钟。

6. 吸除 Click 反应液，用洗涤液洗涤 3 次，每次 3-5 分钟。

7. 后续检测

- 若需细胞核染色，可参照步骤 6 操作；
- 无特殊需求时，可直接通过荧光显微镜观察，或使用流式细胞仪、多功能酶标仪进行荧光检测，也可采用高内涵筛选仪器检测（高内涵筛选通常需用染料进行细胞核染色）。

6. 细胞核染色步骤

为检测细胞增殖比例，可使用 Hoechst 33342 进行细胞核染色（高内涵筛选仪器通常需此步骤），操作如下：

a. 配制 1X Hoechst 33342 溶液

➤ 按 1:1000 比例用 PBS 稀释 1000X Hoechst 33342 储备液。

b. 染色处理

➤ 承接上述步骤 5 g，吸除洗涤液后，每孔加入 1mL 1X Hoechst 33342 溶液，室温避光孵育 10 分钟。

c. 终止染色与洗涤

➤ 吸除 1X Hoechst 33342 溶液；

➤ 用洗涤液洗涤 3 次，每次 3-5 分钟。

d. 荧光检测

➤ 处理后可直接进行荧光检测。Hoechst 33342 呈蓝色荧光，最大激发波长为 346 nm，最大发射波长为 460 nm。

7. 流式细胞仪检测

流式细胞悬液样品的流式检测步骤（适用于经步骤 5 或 6 处理的样品）

a. 检测条件设置

若使用传统流体动力学聚焦流式细胞仪测量总 DNA 含量，检测时需采用低流速，且每个样品需保持相同的收集速率和细胞浓度。EdU 标记产生的荧光信号建议使用对数刻度的横坐标

注意事项：

注 1：建议以未经 EdU 标记的细胞样品作为阴性对照，并选择适宜的检测电压。

注 2：因流式细胞仪检测灵敏度较高，可根据细胞类型及实际染色情况，适当调整荧光染料的使用量。

注意事项

➤ Click Additive 溶液配制后请适当分装；若有白色物质析出，需上下颠倒至完全溶解后使用，若变为棕色则表明失效，应弃用。

- 本产品依赖铜离子催化点击反应，与有机类染料（如 Alexa Fluor® 系列、FITC、APC 等）完全兼容；Qdot® 探针、HRP、R-PE 及其串联染料需在点击反应后检测；GFP、RFP 等荧光蛋白及 TC-FlAsH™、TC-ReAsH™类试剂需在点击反应前检测；
- 鬼笔环肽不兼容，推荐用 Tubulin-Tracker Red (C1050) 检测细胞微管。
- 本产品仅限专业人员科研使用，严禁用于临床、食品、药品等领域，不得存放于普通住宅。操作时请穿实验服并戴一次性手套。