Elabscience® E-Click EdU Cell Proliferation Imaging Assay Kit (Green, FITC)

货号：E-CK-A375

规格：50 Assays/200 Assays

产品组分

产品编号	产品名称	50 Assays	200 Assays	Storage
E-CK-A37A	EdU(10mM)	200 μL	800 μL	-20℃/-80℃
E-CK-A37B2	Click Reaction Buffer II	25 mL	50 mL×2	-20°C
E-CK-A375C	FITC Azide II	60 μL	250 μL	-20℃/-80℃, shading light
E-CK-A37D	$CuSO_4$	1.25 mL×2	8 mL	-20°C
E-CK-A37E	Click Additive	220 mg	220 mg×4	-20°C
E-CK-A163	DAPI Reagent (25μg/mL)	1.25 mL	1.25 mL×4	2-8℃/-20℃, shading light
说明书	一份			

注：规格 50 Assays 指是用 6 孔板进行实验可以检测 50 个样本。

产品简介

Elabscience® E-Click EdU Cell Proliferation Imaging Assay Kit，操作便捷、灵敏度高，适用于细胞爬片和涂片的增殖检测，检测结果可通过荧光显微镜观察。

检测原理

细胞增殖检测广泛应用于细胞活性、遗传毒性及抗肿瘤药物效果的评价中，直接检测细胞中的 DNA 合成被认为是最精确的检测细胞增殖的方法。最初广泛使用的检测细胞中 DNA 合成的方法是放射性标记核苷掺入法，但该方法由于有放射性污染并且很难实现单细胞检测而受到很大的限制，随后逐渐被基于抗体检测的 BrdU 法所替代。BrdU 法步骤繁多，且需要使用 BrdU 抗体，影响因素较多，稳定性较差。

EdU 法基于 EdU 掺入和后续的点击反应，无需使用抗体、操作便捷、检测灵敏度高，是一种在 BrdU 法基础上升级换代的新方法，将会逐步取代 BrdU 法。EdU(5-ethynyl-2-deoxyuridine)，中文名 5-乙炔基-2-脱氧尿苷，是胸腺嘧啶脱氧核苷类似物，EdU 可以在 DNA 合成过程中替代胸腺嘧啶脱氧核苷掺入到新合成的 DNA 中。另一方面，EdU 上的乙炔基能与荧光标记的小分子叠氮化物探针（如 FITC Azide、Elab Fluor® 488 Azide、Elab Fluor® 594 Azide、Elab Fluor® 647 Azide），通过一价铜离子的催化发生共价反应，形成稳定的三唑环，该反应非常迅速，被称作点击反应（Click reaction）。通过点击反应，新合成的 DNA 会被相应的荧光探针所标记，从而可以使用适当的荧光检测设备检测到增殖的细胞。

检测样本类型

☑细胞爬片　　☑细胞涂片

保存条件

-20 ℃ 可保存一年。EdU (10 mM) 首次使用时需要分装（推荐 50 μL/小瓶或根据实验需要分装成更少量）。

自备试剂及仪器

1. 试剂

PBS（pH7.2~7.6）。

PBS（含 3% BSA）缓冲液（pH7.2~7.6）。

通透液：0.3%Triton X-100（溶剂为 PBS，pH7.2~7.6）。

固定液：4%多聚甲醛（溶剂为 PBS，pH7.2~7.6）。

去离子水。

2. 仪器

荧光显微镜。

试剂配制

1. Click Additive Solution

取 1.1 mL 去离子水加入到一管 Click Additive(220 mg)中，混匀至全部溶解。配制后可以适当分装，并于-20°C 保存。

注：建议使用完一管 Click Additive 后再配制下一管。

2. DAPI 工作液

取 4 μL DAPI Reagent (25μg/mL) 加入 96 μL PBS 中混匀。现配现用。

实验步骤

1. EdU 和细胞共培养

1) EdU 的标记浓度应根据所用的细胞类型做相应的优化选择，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，推荐以 10 μM 的 EdU 初始浓度进行摸索。

2) 预实验中，建议设置不同浓度梯度的 EdU 染色液，以确定最佳的实验浓度。也可以参考本操作说明《附表 2.常见细胞系 EdU 孵育时间设定参考》以及《附表 3.细胞实验 EdU 孵育浓度及时间参考》。

注：建议使用不添加 EdU 的细胞样本作为阴性对照。

2. 固定与通透

注：以下步骤中试剂使用量以 6 孔板为参考，其他培养孔可根据实验需要进行适当调整。

1) 孵育完成后，去除培养基。

2) 每孔加入 1 mL 含 4%多聚甲醛的 PBS，室温孵育 15 min 后去除含 4%多聚甲醛的 PBS。

3) 每孔加入 1 mL 含 3% BSA 的 PBS，充分洗涤 3 次，每次 5 min。

4) 弃上清，每孔加入 1 mL 含 0.3% Triton X-100 的 PBS，室温孵育 20 min。

3. 荧光标记

本说明书按照六孔板每孔 500 μL 的反应体系，对于 12、24、48、96 孔板，每孔加的 Click 反应液体积参考附录表 1。

1) 弃上清，每孔加入 1 mL 含 3% BSA 的 PBS，充分洗涤 3 次，每次 5 min。

2) 根据实验样本数，参考下表配制 Click 反应液。

组分	6 孔板样本数						
	1	2	4	5	10	25	50
Click Reaction Buffer II	440 μL	880 μL	1.76 mL	2.2 mL	4.4 mL	11 mL	22 mL
$CuSO_4$	40 μL	80 μL	160 μL	200 μL	400 μL	1 mL	2 mL
FITC Azide II	1 μL	2 μL	4 μL	5 μL	10 μL	25 μL	50 μL
Click Additive Solution	20 μL	40 μL	80 μL	100 μL	200 μL	500 μL	1 mL
总体积	500 μL	1 mL	2 mL	2.5 mL	5 mL	12.5 mL	25 mL

注：

a) 请严格按照上表中组分顺序和体积配制 Click 反应液，否则会影响后续实验。

b) Click 反应液需在配制后 15 min 内使用。

3) 弃上清，每孔加入上述表格配制的 500 μL 的 Click 反应

液，轻轻摇晃以确保 Click 反应液均匀覆盖细胞，室温避光孵育 30 min。

4) 弃上清，每孔加入 1 mL 含 3% BSA 的 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。

4. DNA 染色

1) 弃上清，每孔加入 500 μL DAPI 工作液，室温避光孵育 5~10min。
2) 弃上清，每孔加入 1 mL 含 3% BSA 的 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。

5. 检测

在荧光显微镜下选择合适的滤光片观察结果。

Dye	Ex/Em (nm)	Filter Set
FITC	490/520	FITC Filter Set
DAPI	350/470	DAPI Filter Set

注：为避免荧光淬灭，请尽快检测。

附录

表 1 Click 反应液的使用量参考

	96孔板	48孔板	24孔板	12孔板	6孔板
Click 反应液	100 μL	150 μL	250 μL	400 μL	500 μL

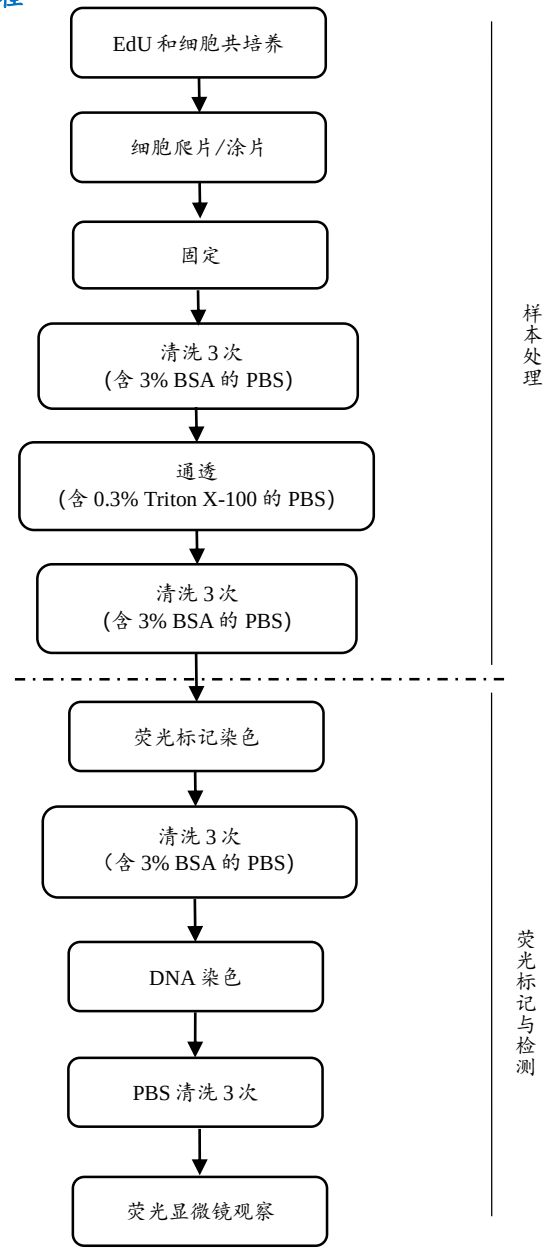
表 2 常见细胞系 EdU 孵育时间设定参考

细胞类型	人胚胎细胞	酵母细胞	人成纤维细胞	人宫颈癌细胞	人胚肾细胞系	人神经细胞
倍增时间	~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

表 3 细胞实验 EdU 孵育浓度及时间参考

PubMed ID	Reference	Cell line	Concentration	Time
19647746	Yu Y, et al. J Immunol Methods. 2009	Spleen cells	50 μM	24 h
19544417	Momcilović 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 yeast strains	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. Lasers Med Sci. 2011	MSC	50 μM	2 h
21878637	Li D, et al. J Biol Chem. 2011	HCC	50 μM	2 h

声明

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 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 μM 的 EdU 初始浓度进行摸索，请提前做预实验确认 EdU 的最佳使用浓度。
4. 由于 EdU 标记反应在细胞内进行，且通过荧光显微镜检测，EdU 标记前请确保细胞固定通透完全。如冬天室温过低，建议适当延长固定时间或 4°C 固定过夜。
5. Click Additive 配制成溶液后请注意适当分装。如果溶解后有白色物质析出，请上下颠倒多次，待全部溶解后方可使用。如该溶液颜色变成棕色，说明组分的有效成分已失效，请弃用。
6. 铜离子会影响 GFP、RFP、mCherry 等荧光蛋白的荧光，因此本试剂盒不适用于带 GFP、RFP、mCherry 等荧光的细胞检测。

实验流程