

产品说明书

YF® Click-iT EdU通用款细胞增殖检测试剂盒

产品货号及规格:

货号	产品名称	规格
BN16043	YF®488 Click-iT EdU 通用款细胞增殖检测试剂盒 (绿色荧光)	2-20T
BN16043		10-100T
BN16043		50-500T
BN16044	YF®555 Click-iT EdU 通用款细胞增殖检测试剂盒 (橙红色荧光)	2-20T
BN16044		10-100T
BN16044		50-500T
BN16045	YF®594 Click-iT EdU 通用款细胞增殖检测试剂盒 (红色荧光)	2-20T
BN16045		10-100T
BN16045		50-500T
BN16046	YF®647A Click-iT EdU 通用款细胞增殖检测试剂盒 (远红荧光)	2-20T
BN16046		10-100T
BN16046		50-500T

产品内容:

组分	规格	规格			开封后保存温度	稳定性
		2-20T	10-100T	50-500T		
A. 10 mM EdU		40 µL	200 µL	1 mL	-20°C	开封后按指定温度保存 可有效放置 一年
B. YF® 488/555/594/647A Azide		10 µL	50 µL	250 µL	-20°C, 避光	
C. 10×Click-iT EdU 反应缓冲液		200 µL	1 mL	5 mL	2-8°C	
D. CuSO ₄		100 µL	500 µL	2×1.25 mL	2-8°C	
E. Click-iT EdU 缓冲液添加物		6 mg	30 mg	150 mg	2-8°C	
F. Hoechst 33342		5 µL	25 µL	125 µL	2-8°C	

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 BN16043 2-20T 可检测 20 个孔的样品 (不同容器的具体用量可参考附表 1); 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 BN16043 2-20T 可检测 2 个样品。

荧光光谱数据: YF® 488 Azide: 495/519 nm; YF® 555 Azide: 555/565 nm; YF® 594 Azide: 590/617 nm

YF® 647A Azide: 650/670 nm; Hoechst 33342: 350/461 nm (bound to DNA)

储存条件

-20°C避光保存，有效期见外包装。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。检测细胞增殖最精确的方法是BrdU法。EdU法检测试剂盒是BrdU法的革命性突破。EdU（5-乙炔基-2'-脱氧尿苷）是一种嘧啶类似物，在DNA合成期整合入DNA双链。EdU法检测基于“点击”反应，一种由铜催化的叠氮化合物和炔烃作用发生共价反应，形成共价键。

本试剂盒中，EdU含有炔烃，YF®488/555/594/647A Azide染料含有叠氮化合物。点击法的EdU标记增殖快速有效，易于使用。BrdU方法需要DNA变性（如酸变性、热变性或者用DNase消化）暴露出BrdU，从而方便BrdU抗体结合；而EdU法只需多聚甲醛固定和Triton X-100促渗就可以使检测试剂进入细胞，只需少量的叠氮化染料即可非常有效地标记出整合的EdU。

本试剂盒包含EdU法检测所需要的所有组分，可以用于体外培养细胞的增殖检测。

使用方法

实验材料（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
- 1 % BSA in PBS, pH 7.2-7.6
- ddH₂O
- 96/24/12/6 孔培养板或培养皿

荧光显微镜检测方法

1. 细胞培养

取对数生长期细胞，以每孔 4×10^3 - 1×10^5 细胞（可根据细胞大小、生长速度以及实验处理的具体要求调整细胞数量和密度）接种于96孔板中，培养至正常生长阶段。

2. 药物处理

根据实验需要进行各种药物处理。

3. EdU标记

（1）用细胞完全培养基按一定比例稀释 EdU 溶液（组分 A）至合适浓度后加入细胞中，混匀；设置不加 EdU 处理的阴性对照组。

注：EdU 的标记浓度需根据细胞类型加以调整，建议以 10 μM 的初始浓度进行摸索。预实验中，建议设置 EdU 浓度梯度，可参考附表 2 和附表 3。

（2）细胞培养箱中孵育 2 h。

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，可参考附表 2。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 ; 也可参考附表 3。

4. 细胞固定及促渗

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。

(1) 孵育完成后, 去除培养基。以 1X PBS 清洗细胞两次, 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。加入 50 μL 4% 多聚甲醛固定液, 室温孵育 20 min 后, 去除固定液。

(2) 每孔加入 50 μL 2 mg/mL 甘氨酸溶液, 室温孵育 5 min, 中和残留的固定液。

(3) 以每孔 100 μL 3% BSA 洗涤细胞 2 次。

(4) 去除洗涤液, 加入 100 μL 0.5% Triton X-100, 室温孵育 10 min。

5. EdU 检测

注: 本参考步骤每个样本使用 100 μL 的工作液, 用户可以根据自己的样本情况调整用量。

(1) 配置 1 \times Click-iT EdU 反应缓冲液 (组分 C): 用 ddH₂O 将组分 C 稀释 10 倍。

(2) 配置 5 \times Click-iT EdU 缓冲液添加物 (组分 E): 加 300 μL 的 ddH₂O 至 30 mg 的 E 组分管中 (终浓度 100 mg/mL), 混匀至全部溶解。使用后, 剩余储液存放在 -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: 不同规格的组分 E 均按照此比例加 ddH₂O 溶解, 制备成 5 \times 储液备用。

(3) 准备 1 \times Click-iT EdU 缓冲液添加物: 用 ddH₂O 稀释 5 \times Click-iT EdU 缓冲液添加物至 1 \times , 溶液应现配现用。

(4) 依据表 1 准备 Click-iT 工作液。

表 1. Click-iT 工作液

反应组分	以 10 个孔的样本数为例
1 \times Click-iT EdU 反应缓冲液	855 μL
CuSO ₄ (组分 D)	40 μL
YF [®] 488/555/594/647A Azide (组分 B)	5 μL
1 \times Click-iT EdU 缓冲液添加物	100 μL
总体积	1 mL

(5) 去除促渗剂, 每孔 100 μL 的 3% BSA 洗涤液洗涤 2 次。

(6) 每孔加入 100 μL Click-iT 工作液, 均匀覆盖细胞。

(7) 室温避光孵育 30 min。

(8) 除去 Click-iT 工作液, 以 100 μL 3% BSA 洗涤细胞 2 次后, 去除洗涤液, 加入 100 μL PBS 保持细胞湿润。如其他无特别要求, 即可进行拍照分析。

6. DNA 复染 (可选)

(1) 用 100 μL PBS 洗涤细胞 1 次, 去除洗涤液。

(2) 用 PBS 将 Hoechst 33342 (组分 F) 稀释 2000 倍。

(3) 每孔加 100 μL 1 \times Hoechst 33342 溶液, 室温避光孵育 15-30 min。

(4) 去除 Hoechst 33342 溶液, 用 100 μL PBS 洗涤细胞 2 次。

7. 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 天之内完成拍照。

流式细胞仪检测方法

1. 细胞培养

每孔 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ 个细胞接种于 6 孔板中。

2. 药物处理

根据实验需要进行各种药物处理。

3. EdU 标记细胞

(1) 用细胞完全培养基按一定比例稀释 EdU 溶液（组分 A）至合适浓度后加入细胞中，混匀；设置不加 EdU 处理的阴性对照组。

注：EdU 的标记浓度需根据细胞类型加以调整，建议以 10 μM 的初始浓度进行摸索。预实验中，建议设置 EdU 浓度梯度，可参考附表 2 和附表 3。

(2) 细胞培养箱中孵育 2 h。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的时间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，可参考附表 2。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 ；也可参考附表 3。

4. 细胞固定及促渗

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 洗涤细胞 2 次，在细胞固定促渗之前进行。

(1) 孵育完成后，收集细胞，每管加入 1 mL PBS 清洗细胞，1000 rpm 离心 5 min，吸弃上清，以除去未掺入 DNA 的 EdU 残留。

(2) 每管加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定液重悬细胞。

(3) 室温孵育 20 min，1000 rpm 离心 5 min，吸弃上清。

(4) 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。

(5) 每管加入 1 mL 0.5% Triton X-100 促渗液重悬细胞，室温孵育 10 min。

5. EdU 检测

注：针对 6 孔板样本可参考每孔 1 mL 的工作液来进行，用户可以根据自己的样本情况调整用量。

(1) 配置 1 \times Click-iT EdU 反应缓冲液：用 ddH₂O 将组分 C 稀释 10 倍。

(2) 配置 5 \times Click-iT EdU 缓冲液添加物（组分 E）：加 300 μL ddH₂O 至 30 mg 的组分 E 试管中（终浓度 100 mg/mL），混匀至全部溶解。使用后，剩余储液存放在 -20℃，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：不同规格的组分 E 均按照此比例加 ddH₂O 溶解为 5 \times 储液备用。

(3) 准备 1 \times Click-iT EdU 缓冲液添加物：以 ddH₂O 稀释 5 \times Click-iT EdU 缓冲液添加物储液至 1 \times ，溶液应现配现用。

(4) 依据表 2 准备 Click-iT 工作液。

表 2. Click-iT 工作液

反应组分	单次反应所需加液体积
1×Click-iT EdU 反应缓冲液	875 μL
CuSO ₄ (组分 D)	20 μL
YF® 488/555/594/647A Azide (组分 B)	5 μL
1×Click-iT EdU 缓冲液添加物	100 μL
总体积	1 mL

(5) 1000 rpm 离 5 min, 吸弃上清, 去除促渗剂, 每管加入 1mL 的 1% BSA 洗涤液洗涤 2 次, 1000 rpm 离 5 min, 吸弃上清。

(6) 每管加入 1 mL Click-iT 工作液, 混匀。

(7) 室温避光孵育 30 min。

(8) 1000 rpm 离 5 min, 吸弃染色反应液, 每管加入 1% BSA 洗涤细胞 2 次, 1000 rpm 离心 5min, 吸弃上清, 用 1 mL 1% BSA 再次重悬细胞 (重悬细胞的溶液体积可根据细胞的数量加以调整), 流式细胞仪检测。

注: 如需进行其他标志物检测可参考步骤 4。

6. 细胞内抗原标记 (可选步骤)

(1) 加入抗体工作液, 混匀。

(2) 避光条件下, 以合适的温度及时间孵育抗体。

7. 流式检测及分析:

(1) 建议染色完成后立即进行流式检测; 如果条件限制, 请避光 4°C 湿润保存待测, 但不应超过 3 天。

(2) 检测的细胞数量建议尽量能达到百万级, 若细胞数量较少, 检测的细胞数量可调整为十万级起始进行实验。对于细胞得率过少 (刚到万级) 的情况, 可能不利于做流式图, 对此可适当减少步骤 5 (8) 中的清洗次数。

注意事项

- 使用前请将产品瞬时离心至管底, 再进行后续实验。
- 荧光染料均存在淬灭问题, 实验操作时请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
- Click-iT EdU 缓冲液添加物溶液最好现配现用, 以保证最佳结果。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

附录：
附表 1. EdU 培养基及染色反应液的参考使用量

	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

附表 2. EdU 的参考孵育时间

细胞系	人胚胎细胞	酵母细胞	鼠成纤维细胞	人宫颈癌细胞	人胚肾细胞系	人神经细胞
细胞周期	~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

注：（1）EdU 孵育时间取决于细胞周期，一般为细胞周期的 1/10 至 1/5，但大多数细胞系均可采用 2 h 孵育时间；
 （2）考虑到细胞培养基、温度、湿度、光线等其他因素的影响，细胞周期会有所变化。