Click 594-EdU Cell Proliferation Kit（594-EdU 细胞增殖检测试剂盒）

货号：BRK0041

规格：100 T

◆ 产品简介

细胞增殖是细胞通过分裂产生子细胞的过程，是生物体生长、发育、组织修复和再生的重要基础。EdU 检测法是基于铜催化的炔基和荧光标记的叠氮化物探针之间的原子共价反应，即“Click 反应”。EdU（5'-乙炔基-2'-脱氧尿苷）是一种胸腺嘧啶核苷类似物，能够在细胞增殖过程中代替胸腺嘧啶核苷掺入到正在复制的 DNA 分子中。通过检测 EdU 标记便能准确地反映细胞的增殖情况。

荧光光谱数据如下：

荧光染料	Ex/Em（nm）	检测的激光器（nm）	效能等同检测通道
Azide 488	495/519	488	Alexa Fluor 488，DyLight 488，FITC，FAM，Cy2
Azide 594	590/617	594	Alexa FLuor 594，mCherry，Texas Red Dye，DyLight 594
Azide 647	650/670	640	Alexa Fluor 647，APC，Cy5

◆ 产品组成

产品编号	名称	规格（100 T）	保存条件
BRK0041-1	EdU（10 mM）	200 μl	-20℃，避光
BRK0041-2	Click Reaction Buffer	9 ml	-20℃
BRK0041-3	$CuSO_4$	300 μl	-20℃
BRK0041-4	Azide 594	50 μl	-20℃，避光
BRK0041-5	Click Additive Solution	1 ml	-20℃，避光
BRK0041-6	Hoechst 33342	25 μl	-20℃，避光

◆ 保存条件

-20℃保存，有效期 12 个月。

◆ 自备实验材料

1×PBS，4%多聚甲醛固定液，0.5% Triton X-100 渗透剂（in PBS），2 mg/ml 甘氨酸溶液（in ddH_2O），1% BSA（in PBS）。

◆ 操作流程

荧光显微成像（以 96 孔板，贴壁细胞为例）

400-999-6126 cn.market@abclonal.com www.abclonal.com.cn

1. 细胞培养

取对数生长期的细胞，按每孔 4×10^3-1×10^5 个细胞接种于 96 孔板中，培养至细胞完全贴壁。（可根据细胞的形态大小、倍增时间以及实验处理的具体需求调整至合适的细胞接种密度）。

2. 药物处理

根据实验的具体需要，使用合适的药物处理。

3. EdU 标记

a. 使用完全培养基将 EdU（10 mM）溶液按照一定的比例稀释至 10-50 μM 的浓度，等体积加入到 96 孔板中，混匀。同时，设置无 EdU 标记处理的阴性对照组。（一般推荐 EdU 标记的初始终浓度为 10 μM，但需要根据不同的细胞类型对标记的终浓度加以合理调整）。

b. 37℃，5% CO_2 细胞培养箱中孵育 2 h。（孵育的时间长短取决于细胞的生长速度，对于大多数肿瘤细胞系一般推荐孵育的初始时间为 2 h。通常情况下，推荐孵育的时间为细胞周期时间的 10%左右）。

4. 细胞固定、通透

a. 孵育完成后，弃去培养基，每孔加入 100 μl PBS 洗涤细胞 1-2 次，每次 5 min。以去除未掺入到 DNA 分子中的 EdU，对于贴壁不牢的细胞可考虑适当降低细胞洗涤的强度（如减少洗涤的次数和时间等）。

b. 弃去 PBS，每孔加入 100 μl 的 4%多聚甲醛固定液，室温固定 15 min。

c. 弃去固定液，每孔加入 100 μl 的 2 mg/ml 甘氨酸溶液，室温孵育 5 min，以中和残留的固定液。

d. 弃去甘氨酸溶液，每孔加入 100 μl 的 1%的 BSA 溶液，洗涤细胞 1 次，洗涤 5 min。

e. 弃去 BSA 溶液，每孔加入 100 μl 的 0.5%的 Triton X-100 渗透剂，室温孵育 10 min。

f. 弃去渗透剂，每孔加入 100 μl 的 1%的 BSA 溶液，洗涤细胞 1 次，洗涤 5 min。

5. EdU 检测

a. 按照下表准备染色工作液（以 10 个孔的样本量为例）

组分	体积
Click Reaction Buffer	865 μl
$CuSO_4$	30 μl
Azide 594	5 μl
Click Additive Solution	100 μl
总体积	1 ml

注：染色工作液需严格按着配制表中从上到下的组分顺序和体积配制，且每加入一个组分均需用移液器吹打混匀；染色液现配现用，配制后请在 15 min 内使用。

b. 弃去 BSA 溶液，每孔加入 100 μl 的染色工作液，室温避光孵育 30 min。

400-999-6126 cn.market@abclonal.com www.abclonal.com.cn

c. 弃去染色液，每孔加入 100 μl 的 1%的 BSA 溶液，洗涤细胞 3 次，每次 5 min。

d. 弃去 BSA 溶液，每孔加入 100 μl 的 PBS。若无其他染色需求，即可进行显微成像分析。

6. 其他染色（可选）

可根据实验需要进行细胞表面或细胞内抗原的染色，并根据使用的染料选择合适的检测通道，必要时进行相关染料的兼容性测试。

7. 细胞核染色

a. Hoechst 33342 染色工作液的配制：用 PBS 将 Hoechst 33342 染色液按 1：2000 的比例稀释。

b. 弃去 PBS，每孔加入 100 μl 的 Hoechst 33342 染色工作液，室温避光孵育 10 min。

C. 弃去染色液，每孔加入 100 μl 的 PBS，洗涤细胞 3 次，每次 5 min。

8. 荧光显微拍照分析

Azide 594 为红色荧光，最大激发波长是 590 nm，最大发射波长是 617 nm；Hoechst 33342 为蓝色荧光，最大激发波长为 346 nm，最大发射波长为 460 nm。使用荧光显微镜选择合适的检测通道，即可获得荧光图像。（染色完成后，建议立即检测。如不能及时检测，建议 4℃避光保存，并维持样本湿润，尽量在 3 d 之内完成检测）。

流式细胞仪检测（以 6 孔板，悬浮细胞为例）

1. 细胞培养

取对数生长期的细胞，按每孔 1×10^5-3×10^6 个细胞接种于 6 孔板中，培养 24 h。（可根据细胞的形态大小、倍增时间以及实验处理的具体需求调整至合适的细胞接种密度）。

2. 药物处理

根据实验的具体需要，使用合适的药物处理。

3. EdU 标记

a. 使用完全培养基将 EdU（10 mM）溶液按照一定的比例稀释至 10-50 μM 的浓度，等体积加入到 6 孔板中，混匀。同时，设置无 EdU 标记处理的阴性对照组。（一般推荐 EdU 标记的初始终浓度为 10 μM，但需要根据不同的细胞类型对标记的终浓度加以合理调整）。

b. 37℃，5% CO_2 细胞培养箱中孵育 2 h。（孵育的时间长短取决于细胞的生长速度，对于大多数肿瘤细胞系一般推荐孵育的初始时间为 2 h。通常情况下，推荐孵育的时间为细胞周期时间的 10%左右）。

4. 收集细胞

孵育完成后，将细胞收集至离心管中，1000 × g 离心 5 min，弃去培养基。（①对于贴壁细胞，可消化后收集细胞；②离心力的大小可根据不同类型细胞的培养经验进行设置）。

400-999-6126 cn.market@abclonal.com www.abclonal.com.cn

5. 细胞固定、通透

a. 每管加入 1 ml PBS 洗涤细胞 1 次，洗涤 5 min。以去除未掺入到 DNA 分子中的 EdU。1000 × g 离心 5 min，弃去上清培养基。

b. 每管加入 1 ml 的 4%多聚甲醛固定液，室温固定 15 min。1000 × g 离心 5 min，弃去固定液。

c. 每管加入 1 ml 的 2 mg/ml 甘氨酸溶液，室温孵育 5 min。以中和残留的固定液。1000 × g 离心 5 min，弃去甘氨酸溶液。

d. 每管加入 1 ml 的 1%的 BSA 溶液，洗涤细胞 1 次，洗涤 5 min。1000 × g 离心 5 min，弃去 BSA 溶液。

e. 每管加入 1 ml 的 0.5%的 Triton X-100 渗透剂，室温孵育 10 min。1000 × g 离心 5 min，弃去渗透剂。

f. 每管加入 1 ml 的 1%的 BSA 溶液，洗涤细胞 1 次，洗涤 5 min。1000 × g 离心 5 min，弃去 BSA 溶液。

6. EdU 检测

a. 按照下表准备染色工作液（单管反应所需用量）

组分	体积
Click Reaction Buffer	865 μl
$CuSO_4$	30 μl
Azide 594	5 μl
Click Additive Solution	100 μl
总体积	1 ml

注：染色工作液需严格按着配制表中从上到下的组分顺序和体积配制，且每加入一个组分均需用移液器吹打混匀；染色液现配现用，配制后请在 15 min 内使用。

b. 每管加入 1 ml 的染色工作液，室温避光孵育 30 min。1000 × g 离心 5 min，弃去染色液。

c. 每管加入 1 ml 的 1%的 BSA 溶液，洗涤细胞 3 次，每次 5 min。1000 × g 离心 5 min，弃去 BSA 溶液。

d. 每管加入 1 ml 的 PBS 重悬细胞，若无其他染色需求，即可进行流式细胞仪上机检测分析。

7. 其他染色（可选）

可根据实验需要进行细胞表面或细胞内抗原的染色，并根据使用的染料选择合适的检测通道，必要时进行相关染料的兼容性测试。

8. 流式检测分析

Azide 594 为红色荧光，最大激发波长是 590 nm，最大发射波长是 617 nm；使用流式细胞仪选择合适的检测通道，即可进行检测分析。

◆ 注意事项

1. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

2. 叠氮化物荧光染料可能具有生殖毒性，请采取合理防护措施。

3. 染色工作液需严格按着配制表中从上到下的组分顺序和体积配制，且每加入一个组分均需用移液器吹打混匀；染色液现配现用，配制后请在 15 min 内使用。

4. Click Additive Solution 在-20℃保存时，会有部分白色沉淀析出，此为正常现象，请放心使用。且该组分相对较难溶解，使用前请务必确保其完全溶解并充分涡旋混匀至溶液澄清透明。

5. 实验前请确保所有试剂完全溶解并涡旋混匀。