

# 产品说明书

## 产品名称: YF<sup>®</sup>488/555/594/647A Click-iT EdU Imaging Kits

产品货号: BN16015 (YF488)、BN16016 (YF555)、BN16017 (YF594)、BN16018 (YF647A)

产品规格: 100 T、500 T、1000 T

产品内容:

组分	100 T	500 T	1000 T	保存温度	稳定性
组分 A 10 mM EdU	0.2 mL	1 mL	2 mL	-20°C	按指定温度 保存可有效 放置一年
组分 B YF <sup>®</sup> 488/555/594/647A Azide	20 µL	100 µL	200 µL	-20°C, 避光	
组分 C 10× Click-iT EdU 反应缓冲液	1 mL	5 mL	10 mL	2-8°C	
组分 D CuSO <sub>4</sub>	0.5 mL	2.5 mL	5 mL	2-8°C	
组分 E Click-iT EdU 缓冲液添加物	30 mg	150 mg	2 × 150 mg	2-8°C	
组分 F Hoechst 33342	25 µL	125 µL	250 µL	2-8°C	

规格: 上述反应次数是针对96孔板培养的细胞。(不同容器细胞成像的具体用量可参考附表1.EdU培养基及染色反应液的使用量参考)

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

YF<sup>®</sup>647A Azide: 650/670 nm; Hoechst 33342: 350/461 nm, bound to DNA.

### 其他所需试剂:

10 mM PBS, pH7.2-7.6

中性多聚甲醛固定液 (4%多聚甲醛 in PBS)

2 mg/ml 甘氨酸溶液 (去离子水配制)

促渗试剂 (0.5% Triton X-100 in PBS)

3% BSA in PBS, pH7.2-7.6

18×18 mm 盖玻片

### 储存条件

-20°C避光保存, 可保存 12 个月。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。此前, 最精确的检测细胞增殖

方法是BrdU法，而EdU法检测是BrdU方法的革命性突破。EdU（5-乙炔基-2-脱氧尿嘧啶核苷）是一种嘧啶类似物，可以在DNA合成期整合入DNA双链。EdU法检测是基于“点击”反应，一种由铜催化的叠氮化合物和炔烃的原子共价反应。

在本试剂盒中，EdU含有炔烃，YF<sup>®</sup>488/555/594/647A Azide染料试剂含有叠氮化合物。点击法的EdU标记增殖快速有效，易于使用。只需少量的叠氮化染料即可非常有效地标记出整合的EdU。标准化的多聚甲醛固定和Triton X-100促渗可以使检测试剂进入细胞，无需DNA变性过程。而BrdU方法则需要DNA变性（如酸变性、热变性或者用DNase消化）去暴露BrdU，从而方便BrdU抗体结合。

本试剂盒包含EdU法检测所需要的所有组份，可以检测细胞增殖与细胞周期分析。对于细胞周期的分析，试剂盒可以提供蓝色细胞核染料Hoechst33342。

## 实验步骤

**注：动物成像实验步骤参考我们的EdU（货号E6032）产品说明书，以下为细胞成像步骤。**

### 1、EdU标记细胞

注意：EdU的标记浓度应根据所用的细胞类型做相应的优化选择，推荐客户以10 μM的EdU初始浓度进行摸索。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。预实验中，我们建议设置一系列的EdU浓度梯度，以确定最佳的细胞实验浓度。您也可以参考附表2.细胞实验EdU孵育浓度及时间参考表。

1.1 以每孔 $4 \times 10^3$ - $1 \times 10^5$ 细胞接种于96孔板中，进行您所需要的药物处理或者其他刺激处理。

1.2 准备一份2×的EdU工作液（组分A）：以完全培养基稀释10 mM的储液至合适的工作浓度。建议您以10 μM的初始工作浓度开始预实验。

1.3 预热2×的EdU工作液，等体积加入细胞培养液中，使终浓度变为1×（如：对于100 μL的细胞培养液，若需要得到10 μM的终浓度，则应加入100 μL的20 μM的2×EdU工作液）。

1.4 选择合适的条件和时间孵育细胞，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时间的长度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。

### 2、细胞固定及促渗

注意：本参考步骤是针对以4%中性多聚甲醛固定且以0.5% Triton X-100促渗操作样本而优化的操作方法，但本参考所介绍的步骤同样可用于其他类似操作的样本，如以甲醇固定以皂苷固定的样本等。

2.1 孵育完成后，去除培养基。加入50 μL 4%中性多聚甲醛至各个孔，室温孵育15-30 min后，去除固定液。

2.2 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。

2.3 以每孔0.1 mL 3% BSA in PBS的洗涤液洗涤细胞2次。

2.4 去除洗涤液，加入0.1 mL 0.5% Triton X-100 in PBS到每个孔中，室温孵育20 min。

### 3、EdU检测

注意：本参考步骤每个孔反应使用100 μL的Click-iT反应混合物。用户可以根据自己的样本情况调整等比例减少所用的溶液体积。

3.1 准备1× Click-iT EdU反应缓冲液（组分C）：10×组分C试剂以去离子水稀释10倍即可。

3.2 制备一份5×的Click-iT EdU反应添加物储液（组分E）：加0.3 mL去离子水至30 mg的E组分试管中（100 mg/mL），混匀至全部溶解（注：对于其他规格，由于组分E的量不同，需按比例扩大去离子水添加体积）。使用后，剩余储液存放在 $\leq -20^\circ\text{C}$ ，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（注意：不同规格的组分E均按照此比例加去离子水溶解，制备成5×储液备用）。

3.3 准备1× Click-iT EdU缓冲液添加物：以去离子水稀释5×储液至1×，溶液应新鲜配置，当天用完。

3.4 依据表1准备 Click-iT 反应混合物。**表1 要求添加的组分对于反应来说非常重要，否则反应无法有效进行。**

表 1 Click-iT 反应混合物

反应组分	以 10 个孔的样本数为例
1× Click-iT EdU 反应缓冲液 (组分 C)	860 μL
CuSO <sub>4</sub> (组分 D)	40 μL
YF <sup>®</sup> 488/555/594/647A Azide (组分 B)	2 μL
1×反应缓冲液添加物 (步骤 3.3 所准备)	100 μL
总体积	1 mL

3.5 去除促渗剂，以每孔 0.1 mL 的 3% BSA in PBS 的洗涤液洗涤 2 次，去除洗涤液。

3.6 加入 0.1 mL Click-iT 反应混合物至每个孔，简短摇晃培养板以确保反应混合物可以均匀覆盖细胞。

3.7 室温避光孵育 30 min。

3.8 除去反应混合物，每孔以 0.1 mL 3% BSA in PBS 洗涤两次，去除洗涤液。

对于核染色，可以进行 DNA 复染。如其他无特别要求，即可进行拍照分析。

#### 4、 DNA 复染

4.1 以 0.1 mL PBS 洗涤每孔 1 次，去掉洗涤液。

4.2 以 PBS 稀释 Hoechst 33342 (组分 F) 储液 1:2000 至 1× Hoechst 33342 溶液，终浓度为 5 μg/mL。

4.3 每孔加 0.1 mL 1× Hoechst 33342 溶液，室温避光孵育 15-30 min。除去 Hoechst 33342 溶液。

4.4 0.1 mL PBS 洗涤每孔 2 次，去除洗涤液。

#### 5、 成像及分析

附录:

附表 1. EdU 培养基及染色反应液的使用量参考

	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 $\mu$ L	150 $\mu$ L	200 $\mu$ L	500 $\mu$ L	1 mL	2 mL
染色反应液	100 $\mu$ L	150 $\mu$ L	200 $\mu$ L	500 $\mu$ L	1 mL	2 mL

附表 2. 细胞实验 EdU 孵育浓度及时间参考

PubMed ID	Reference	Cell Line	Concentration	Time
18272492	Salic A, <i>et al.</i> PNAS.2008	NIH3T3, HeLa	10 nM~10 $\mu$ M	1 hr
18521918	Cappella P, <i>et al.</i> Cytometry A.2008	HL-60, A2780, U2OS	1~10 $\mu$ M	30 min
18996411	Chehrehasa F, <i>et al.</i> Neurosci Methods.2009	Neurospheres	1~20 $\mu$ M	24 hr
19179371	Limsirichaikul S, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res.2009	Primary fibroblasts	10 $\mu$ M	1,2,4 hr
19253396	Warren M, <i>et al.</i> Dev Dyn.2009	Chick embryos	10 $\mu$ M~2 mM	4 hr
19647746	Yu Y, <i>et al.</i> J Immunol Methods.2009	Spleen cells	50 $\mu$ M	24 hr
19544417	Momcilovic O, <i>et al.</i> Stem Cells.2009	Human ES cells	10 $\mu$ M	30 min
20080700	Cinquin O, <i>et al.</i> PNAS.2010	emb-30	1 $\mu$ M	12 hr
20025889	Han W, <i>et al.</i> Life Sci.2009	VSMC	50 $\mu$ M	2 hr
20659708	Huang C, <i>et al.</i> J Genet Genomics.2010	ESC	50 $\mu$ M	2 hr
21310713	Hua H, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res.2011	Fission yeast strains	10 $\mu$ M	3 hr
20824490	Lv L, <i>et al.</i> Mol Cell Biochem.2011	EJ cells	50 $\mu$ M	4 hr
21248284	Yang S, <i>et al.</i> Biol Reprod.2011	GC cells	50 $\mu$ M	2 hr
21227924	Zhang YW, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res.2011	U2OS, HT29	30 $\mu$ M	90 min
21829621	Guo T, <i>et al.</i> PloS One. 2011	HIT-T15	50 $\mu$ M	4 hr
21980430	Zeng T, <i>et al.</i> PloS One. 2011	MCF-10A	25 $\mu$ M	2 hr
22012572	Ding D, <i>et al.</i> Int Orthop.2011	C3H10T1/2	10 $\mu$ M	24 hr
22000787	Zeng W, <i>et al.</i> Biomaterials.2011	EPC	50 $\mu$ M	4 hr
21913215	Xue Z, <i>et al.</i> J Cell Biochem.2011	SGC7901	25 $\mu$ M	24 hr
22016038	Peng F, <i>et al.</i> Lasera Med Sci.2011	MSC	50 $\mu$ M	2 hr
21878637	Li D, <i>et al.</i> J Biol Chem.2011	HCC	50 $\mu$ M	2 hr