



Cell-Light™ EdU 流式细胞仪 检测试剂盒

使用说明书 V1.1

For the Research use only, not for diagnostic or therapeutic uses.

Cat. No. C10311

广州市锐博生物科技有限公司

组成和储存

Cat. No. C10311 Size: 40 assays

Cell-Light™ EdU 流式细胞仪 检测试剂盒包括以下组分：

	试剂	C10311	浓度	储存条件
C00003	EdU 溶液 (试剂 A)	40 µl	1000X	•2-6°C储存 •干燥 •避光 •勿冻存 •按说明保存 可稳定储存半年
C00012	Apollo®反应缓冲液 (试剂 B)	1 mL	20X	
C00017	Apollo®催化剂溶液 (试剂 C)	200 µL	100X	
C00031	Apollo® 643 荧光染料溶液 (试剂 D)	60 µl	300X	
C00019	Apollo®缓冲添加剂 (试剂 E)	200 mg	粉末	
C00033	Hoechst 33342 (试剂 F)	300 µl	100X	

注：使用前请短暂离心。

产品说明

本试剂盒将直接测定细胞内DNA的变化，适用于细胞增殖、细胞凋亡、细胞分化、生长与发育、DNA修复、病毒复制等方面的研究，能够进行siRNA、miRNA、小分子化合物及其他药物的筛选实验。Cell-Light™检测方法基于EdU与Apollo®荧光染料的完美结合准确检测新合成的DNA，简单，快速，准确。

EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, 5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷)是一种胸腺嘧啶核苷类似物，其乙炔基团在天然化合物中很少见，在细胞增殖时能够插入正在复制的DNA分子中，基于EdU与染料的共轭反应可以进行高效快速地准确检测新合成的DNA。与传统的免疫荧光染色(BrdU)检测方法相比，更简单，更快速，更准确。EdU只有BrdU抗体大小的1/500，在细胞内更容易扩散，不需要严格的样品变性(酸解、热解、酶解)处理，有效地避免了样品损伤，有助于在组织、器官的整体水平上观测细胞增殖的真实情况，具有更高的灵敏度和更快的检测速度。

实验方法

检测方法简便，只需三步即可分析数据：EdU孵育样品、细胞固定化、Apollo®染料检测EdU。



图1 Cell-Light™ EdU检测方法示意图

实验准备

自备物品

- 完全细胞培养液：用于支持细胞生长的营养液
- 6孔板或其他规格培养器皿（依据您的培养需求）
- 去离子水
- PBS溶液, pH 7.2~7.6
- 细胞固定液(即含4%多聚甲醛的PBS)
注：甲醛可代替多聚甲醛，但有可能对细胞产生较大破坏；
- 渗透剂(含0.5% Triton X-100的PBS)
- 甘氨酸溶液（2 mg/mL，重要）

实验步骤

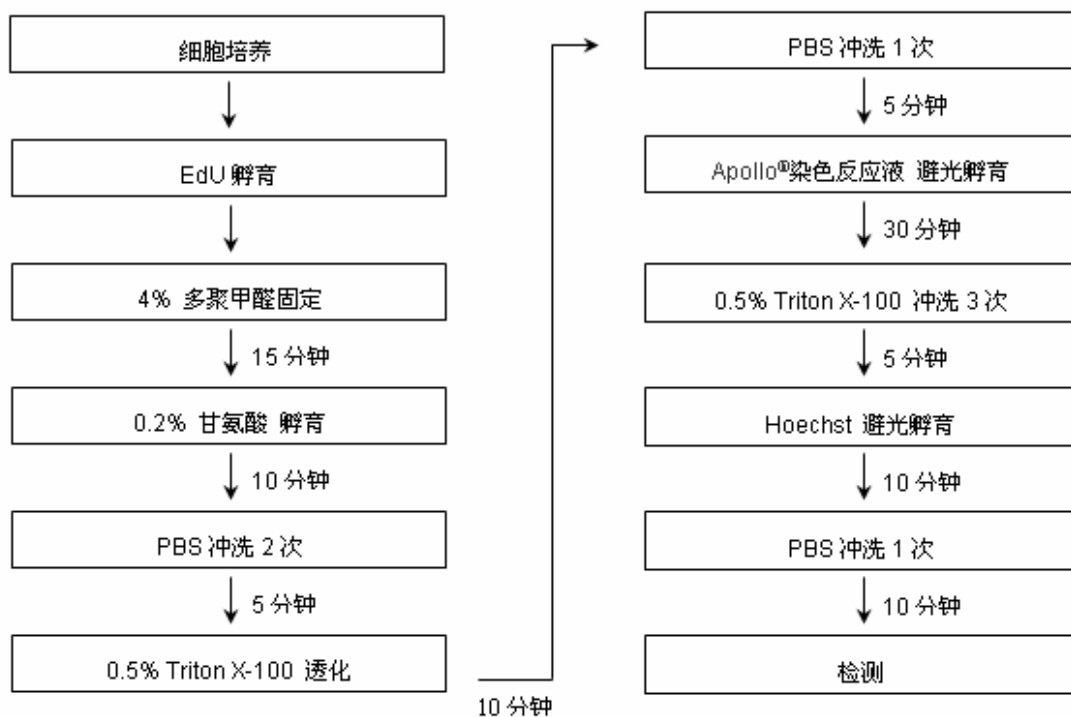


图2 Cell-Light™ EdU检测步骤流程图

注：实验时间仅供参考

EdU标记细胞

- 1.1 接种适当数量细胞，用完全细胞培养液（可以含抗生素）培养过夜；
- 1.2 制备50μM EdU培养基：用细胞培养液以1：1000的比例稀释EdU溶液（试剂A）。由

于细胞之间的差异，最佳EdU的终浓度和培养时间可根据具体实验调整；

1.3 培养基、细胞类型、细胞密度、培养时间、细胞活力等因素都可能影响EdU的标记效率。我们建议使用50 μ M EdU培养基孵育，但您可以在预实验时根据细胞类型和实验目的以一系列浓度(10~100 μ M)的EdU培养基孵育进行优化。

培养至合适阶段后（贴壁细胞贴壁，悬浮细胞密度达到合适要求），弃培养液，6孔板每次加入500 μ L 50 μ M EdU培养基孵育2小时。

对照：用完全培养基不加EdU设一阴性对照。

浓度：可以根据细胞类型以一系列浓度(10~100 μ M)的EdU培养基孵育进行优化。

使用量：可以根据您的培养器皿进行调整，以浸没细胞为宜。

孵育时间：孵育的时间不同，细胞增殖率也不同。

以下方法已于A549细胞系的实验结果得出的经验值，仅供参考。

孵育时间	细胞增殖率	EdU浓度	
<45分钟	~10%	较高浓度	50~100 μ M
2小时	~30%	中浓度	50 μ M
>24小时	~80%	较低浓度	10~50 μ M

该试剂盒将直接检测细胞中EdU孵育期间的DNA合成情况，判断增殖细胞的种类及增殖速度，全面分析增殖细胞的定位、分布。

细胞固定化

- 2.1 收集细胞，用1% PBS洗涤，沉淀弃上清；
- 2.2 用1% PBS重悬细胞，调整为适当浓度（ 1×10^7 cells/mL）；
- 2.3 加100 μ L细胞悬液至流式管；
- 2.4 加入100 μ L 细胞固定液（即含4% 多聚甲醛的PBS）室温孵育15~30 分钟；
- 2.5 2 mg/mL 甘氨酸孵育10分钟；
- 2.6 PBS冲洗2次；
- 2.7 弃上清，加入100 μ L渗透剂（0.5% TritonX-100的PBS）透化细胞；
- 2.8 PBS冲洗1次。

染色液配制

3.1 Apollo[®]染色反应液需先用现配，请在20分钟内使用。按下表制备适量的1X Apollo[®]反应液：

1) Apollo[®]染色反应液容易氧化，随着时间的推移可能影响Cell-Light[™]反应混合液的反应效力，需现用现配。

2) 请按下列顺序依次配置，以免破坏正常的反应体系：去离子水-- Apollo[®]反应缓冲液（试剂B）-- Apollo[®]催化剂溶液（试剂C）-- Apollo[®]荧光染料（试剂D）-- Apollo[®]缓冲添加剂

(试剂E) ;

Apollo [®] 染色反应液	4管	20管	40管
去离子水	938 μ L	4.69 mL	8.39 mL
Apollo [®] 反应缓冲液 (试剂B)	50 μ L	250 μ L	500 μ L
Apollo [®] 催化剂溶液 (试剂C)	10 μ L	50 μ L	100 μ L
Apollo [®] 荧光染料溶液 (试剂D)	3 μ L	15 μ L	30 μ L
Apollo [®] 缓冲添加剂 (试剂E)	9 mg	44 mg	88 mg
总体积	1 mL	5 mL	10 mL

3.2 制备1X Hoechst33342反应液: Hoechst 33342 (试剂F) 按1: 100比例用去离子水进行稀释, 避光保存;

EdU检测

- 4.1 加入500 μ L的1X Apollo[®]染色反应液, 避光, 室温孵育30分钟 (孵育时间可以根据具体实验优化, 染色反应液加入量以浸没细胞为宜);
- 4.2 加入500 μ L渗透剂(0.5% TritonX-100的PBS)冲洗3次, 沉淀细胞, 弃上清;

如果需要进行细胞核染色, 请接下来进行DNA染色步骤操作; 如果无需进行细胞核染色, 请跳过DNA染色步骤, 直接进行图像获取及分析操作。

DNA染色

- 5.1 弃上清, 加入500 μ L 1X Hoechst 33342反应液 (染色反应液加入量以浸没细胞为宜), 避光, 室温孵育10-30分钟;
- 5.2 PBS冲洗1次, 洗脱Hoechst 33342反应液。

流式分析

- 6.1 下表列有相应荧光染料的波长;

荧光染料	Excitation(nm)	Emission(nm)	Filter(nm)
Apollo [®] 567	550	565	555 \pm 15
Apollo [®] 643	643	667	635 \pm 15
Hoechst 33342	350	461	488 \pm 15

注: 试剂盒中包含有Apollo[®] 567和Apollo[®] 643中一种染料。

- 6.2 建议组织细胞染色完成后, 立即进行成像观察; 如果条件限制, 请避光 4 $^{\circ}$ C 保存待测, 但不要超过3天。

相关文献

1. Salic A, Mitchison TJ. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 19;105(7):2415-20.

联系方式

广州市锐博生物科技有限公司 广州市萝岗区科学城国际企业孵化器D906 电话: (020) 32290221 传真: (020) 32290137
本公司产品仅用于实验研究, 请参照实验说明进行实验, 不详之处请致电020-32290221 或E-mail至support@ribobio.com。

锐博生物 Ribobio