

## EdU Flow Cytometry Assay Kits (Cy5)

### 产品描述

测量细胞增殖和细胞周期是评估细胞健康、确定遗传毒性和评估药物药效的基本方法，常用的方法是直接测量DNA的合成。在以往的实验中常用方法包括掺入放射性核苷（<sup>3</sup>H-thymidine）或BrdU等。而EdU Flow Cytometry Assay Kits (Cy5)则采用了一种新的方法：点击化学-CuAAC（铜催化的叠氮化物-炔烃环加成反应），使用该反应可直接测量在细胞周期S期的DNA合成。

在基于BrdU的检测中，需要额外的DNA变性（通常使用HCl、加热或用DNase消化）以使BrdU暴露于抗BrdU抗体。胸腺嘧啶核苷类似物EdU（5-ethynyl-2'-deoxyuridine）是BrdU的理想替代品，因为它不受苛刻的DNA变性条件的影响，EdU可以在DNA合成过程中掺入DNA链中。EdU的炔基是一种生物惰性基团，可以通过CuAAC反应与染料的叠氮基发生极强的选择性反应，从而生成1, 2, 3-三唑产物。EdU和Cy5 Azide具有生物学上独特的基团，其连接后可以荧光标记增殖细胞的DNA，具有低背景和高检测灵敏度。这种CuAAC反应可在极温和的条件下提供出色的区域选择性和定量转化。该反应是高效的，并且可以通过流式细胞术或荧光显微镜定量地使用。

EdU Flow Cytometry Assay Kits (Cy5)采用的是Cy5 Azide与EdU进行连接后荧光标记增殖细胞的DNA，可通过流式细胞仪进行检测（Cy5 Azide最大激发波长为646 nm，最大发射波长为662 nm）。

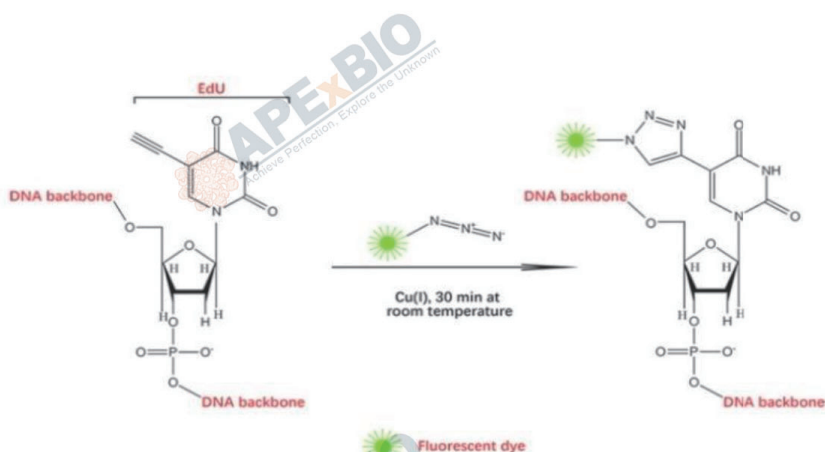


Figure 1. Click reaction(CuAAC) between EdU and azide-modified dye

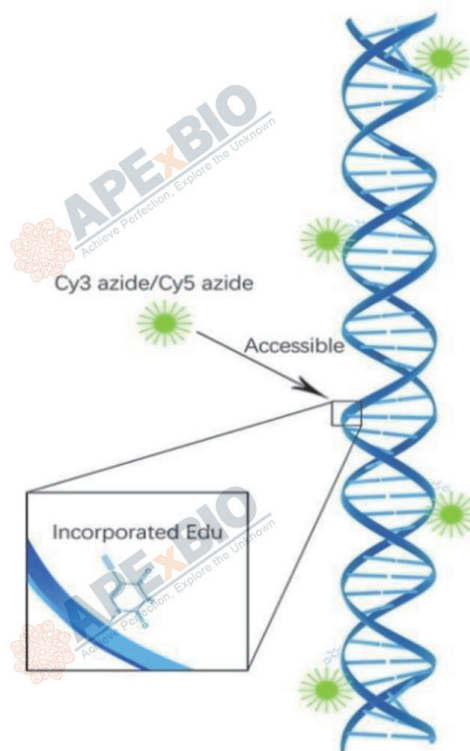


Figure 2. Detection of the incorporated EdU with Cy3/Cy5 azide

## 组分和储存条件

Components	K1078-100 Test
EdU (Component A)	20 mg
Cy5 Azide (Component B)	260 $\mu$ L
DMSO (Component C)	8.5 mL
CuSO <sub>4</sub> (100 mM Aqueous Solution) (Component D)	1 mL
EdU Buffer Additive (Component E)	400 mg

Store the kit at -20°C away from light and moisture, stable for 1 year.

## 实验操作

### 1. 试剂准备

- 1) 室温下将试剂盒的各组分解冻完全。
- 2) **配制10 mM EdU储存液:** 向Component A中加入8 mL DMSO (Component C) 或水溶液 (PBS、生理盐水等缓冲液) 并充分混合。配制好的10 mM EdU储存液可在-20°C稳定保存1年。
- 3) **配制10X EdU Buffer Additive储存液:** 向Component E中加入2 mL的ddH<sub>2</sub>O, 并充分混合直至EdU Buffer Additive完全溶解。配制好的10X EdU Buffer Additive储存液在-20°C条件下可稳定保存1年; **如果储存液呈棕色, 则说明已降解, 应立即丢弃。**
- 4) 其他需要自备的试剂 (本试剂盒不提供):
  - ① 1X PBS (pH 7.2-7.4)
  - ② 洗涤液 (如含1% BSA的PBS)
  - ③ 固定剂 (如含4%多聚甲醛的PBS)
  - ④ 皂苷类透化和洗涤液 (如PBS (pH 7.4) + 1% FBS (或 BSA) + 0.1% NaN<sub>3</sub> + 0.1%皂苷)

### 2. EdU标记细胞

- 1) 将适量细胞接种于6孔板中, 待细胞培养过夜并且恢复到正常生长状态, 可根据实验需要进行药物等处理。
- 2) 将事先配制的10 mM EdU储存液用完全培养基稀释成2X EdU工作液 (如所需要的EdU终浓度为10  $\mu$ M, 则用完全培养基先稀释成20  $\mu$ M的2X EdU工作液)。建议孵育时间为1-2 h时EdU工作液浓度可为10  $\mu$ M; 若孵育时间更长则使用更低浓度的EdU工作液, 孵育时间更短则使用更高浓度的EdU工作液。

**\*Note:** 设置实验组时建议增加一个不添加EdU但同步进行点击反应的组作为阴性对照, 以排除染料非特异性染色的干扰。

- 3) 37°C培养箱预热2X EdU工作液, 然后等体积加入到含有细胞的6孔板中, 使6孔板中的EdU终浓度变为1X (如所需EdU工作液的终浓度为10  $\mu$ M, 则用含20  $\mu$ M的EdU新鲜培养基替换掉一半的培养基); 并不建议更换所有培养基, 因为这可能会影响细胞增殖速率。

- 4) 继续孵育细胞一定时间。孵育时间的长短取决于细胞生长速率,通常宜继续孵育细胞周期10%左右的时间,如常见的细胞系HeLa、HEK293等,细胞周期大约在18-25小时,则EdU孵育时间在2小时左右。

**\*Note:**因细胞类型、细胞密度、细胞增殖速度等的不同均会影响 EdU 掺入到细胞中的量,因此建议在初始实验时,测试一系列的 EdU 使用浓度,以确定适合您的细胞类型和实验条件的最佳浓度。如果您之前使用过基于 BrdU 的细胞增殖检测方法,则可以参考 BrdU 的终浓度作为 EdU 的终浓度。

- 5) 如果需要标记细胞表面抗原,则收集细胞进行“细胞表面抗原标记”步骤;如果不需要标记则进行“固定和透化”步骤。

### 3. 细胞表面抗原标记(可选)

- 1) 将悬浮细胞收集到流式管中,离心沉淀细胞,弃去上清。贴壁细胞可以先消化后再进行收集。
- 2) 用 3 mL 含 1% BSA 的 PBS 洗涤细胞 1 次,离心沉淀细胞,除去上清液。
- 3) 用含 1% BSA 的 PBS 重悬细胞,使细胞密度为  $1 \times 10^7$  cells/mL。
- 4) 吸取 100  $\mu$ L 细胞悬液转移到流式管中。
- 5) 加入标记表面抗原的抗体并充分混匀。

**\*Note:** 本试剂盒可以兼容有机类染料如 Alexa Fluor 染料、FITC、PerCP、APC 以及 APC 串联染料;对于 R-PE、R-PE 偶联或 Qdot 纳米晶体,如需使用可在点击反应后进行反应和检测。本试剂盒会影响 GFP、RFP、mCherry 等荧光蛋白的荧光,所以点击反应后无法直接检测这些荧光蛋白的信号,需要在点击反应之前进行反应和检测。

- 6) 在推荐的温度下孵育一定时间,注意避光。
- 7) 继续下一步骤进行细胞固定和透化。

### 4. 固定和通透

- 1) 将悬浮细胞收集到流式管中,离心沉淀细胞,弃去上清。贴壁细胞可以先消化后再进行收集。
- 2) 用 3 mL 含 1% BSA 的 PBS 洗涤细胞 1 次,离心沉淀细胞,除去上清液。
- 3) 加入 100  $\mu$ L 含 4%多聚甲醛的 PBS 重悬细胞并充分混合,室温避光孵育细胞 15 分钟。
- 4) 用 3 mL 含 1% BSA 的 PBS 洗涤细胞,离心沉淀细胞,除去上清。
- 5) 用 100  $\mu$ L 皂苷类透化和洗涤液重悬细胞并充分混合,室温孵育 15 分钟。

### 5. 点击反应

- 1) 将配制的 10X EdU Buffer Additive 储存液用去离子水按 1:10 稀释配制成 1X EdU Buffer Additive 工作液(该工作液需现用现配)。
- 2) 参考下表配制 Click 反应液(需完全按照下表中的组分顺序和体积配制 Click 反应液,否则点击反应可能无法有效地进行);同时,配制的 Click 反应液必须在配制后的 15 分钟内使用。

Components	1	2	5	10
PBS	438 $\mu$ L	875 $\mu$ L	2.19 mL	4.38 mL
CuSO <sub>4</sub> (Component D)	10 $\mu$ L	20 $\mu$ L	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Cy5 Azide (Component B)	2.5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	12.5 $\mu$ L	25 $\mu$ L
1X EdU Buffer Additive	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L
总体积	500 $\mu$ L	1 mL	2.5 mL	5 mL

- 3) 通透结束后离心去除细胞中的通透液，并用 1 mL 含 1% BSA 的 PBS 洗涤细胞 2 次。
- 4) 离心除去洗涤液，每孔加入 500  $\mu$ L Click 反应液并充分混匀，室温避光孵育 30 分钟。
- 5) 吸去 Click 反应液，用 3 mL 皂苷类透化和洗涤液洗涤 1 次，离心沉淀细胞，除去上清液。
- 6) 如果需要进行细胞内或表面抗原染色，则加入 100  $\mu$ L 皂苷类透化和洗涤液重悬细胞，然后参照“细胞内或表面抗原染色”步骤进行；如果需要对细胞核进行染色，则可参照“细胞核染色”步骤进行。如无其它特殊需要，则加入 500  $\mu$ L 皂苷类透化和洗涤液重悬细胞上流式细胞仪进行分析。

## 6. 细胞内或表面抗原染色（可选）

- 1) 加入标记胞内抗原的抗体或R-PE、R-PE偶联、Qdot等标记细胞表面抗原的抗体，充分混匀，在推荐的温度下孵育一定时间，注意避光。
- 2) 用 3 mL 皂苷类透化和洗涤液洗涤 1 次，离心沉淀细胞，除去上清液。
- 3) 如果需要对细胞核进行染色，则可参照“细胞核染色”步骤进行；如无其它特殊需要，则加入500  $\mu$ L皂苷类透化和洗涤液重悬细胞上流式细胞仪进行分析。

## 7. 细胞核染色（可选）

可加入一定浓度的DNA染料，如Hoechst 33342，充分混匀，避光孵育一段时间。

## 8. 流式检测及分析

建议染色完成后立即进行流式检测。Cy5 Azide最大激发波长为646 nm，最大发射波长为662 nm。Hoechst 33342 为蓝色荧光，最大激发波长为350 nm，最大发射波长为461 nm。

## ■ 注意事项

1. EdU Buffer Additive配制后可以适当分装，以免反复冻融。如果溶解后有白色物质析出，可以上下颠倒促进溶解，待全部溶解后使用。如果其颜色变为棕色，说明该组分已经失效，请勿使用。
2. 如果需要羟基脲（Hydroxyurea）作为实验对照，可以按我们的货号（B2102 Hydroxyurea）购买。
3. 如果动物实验需要更多的EdU，可以按我们的货号（B8337 5-EdU）购买。
4. 本试剂盒可以兼容有机类染料如Alexa Fluor染料、FITC、PerCP、APC以及APC串联染料；对于R-PE、R-PE

偶联或Qdot纳米晶体，如需使用可在点击反应后进行反应和检测。本试剂盒会影响GFP、RFP、mCherry等荧光蛋白的荧光，所以点击反应后无法直接检测这些荧光蛋白的信号，需要在点击反应之前进行反应和检测。

5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
6. 本产品仅限于科研使用，不得用于临床诊断或治疗。



**APEX BIO Technology**

**[www.apexbt.com](http://www.apexbt.com)**

7505 Fannin street, Suite 410, Houston, TX 77054.

Tel: +1-832-696-8203 | Fax: +1-832-641-3177 | Email: [info@apexbt.com](mailto:info@apexbt.com)