

EdU Imaging Kits (HF594)

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（³H-thymidine）或BrdU等。而EdU Imaging Kits (HF594) 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HyperFluor™ 594 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 Imaging Kits (HF594) 采用的是HyperFluor™ 594 azide与EdU进行连接后荧光标记增殖细胞的DNA，可通过荧光显微镜进行观察（HyperFluor™ 594 azide最大激发波长为590 nm，最大发射波长为617 nm）。

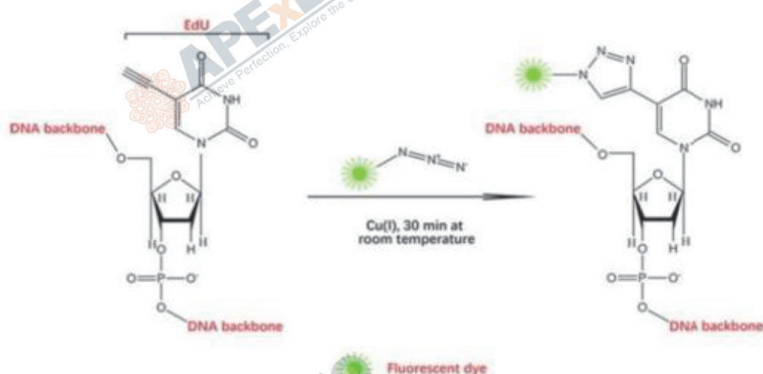


Figure 1. Click reaction (CuAAC) between EdU and azide-modified dye

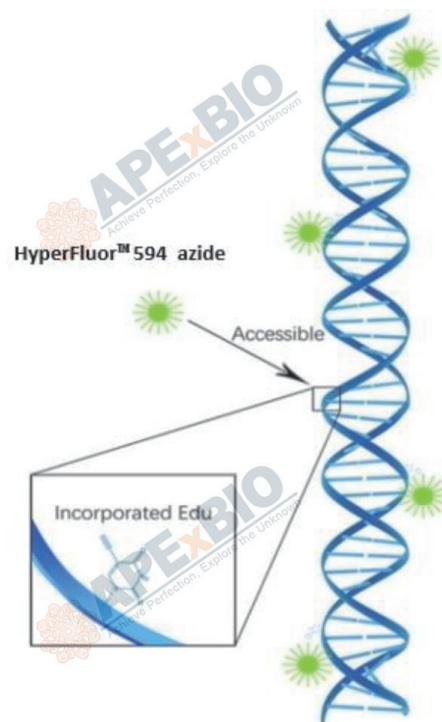


Figure 2. Detection of the incorporated EdU with HyperFluor™ 594 azide

组分和储存条件

Components	50-500 Tests
EdU (Component A)	5 mg
HyperFluor™ 594 azide (Component B)	25 µL
DMSO (Component C)	4 mL
10X EdU Reaction Buffer (Component D)	4 mL
CuSO ₄ (100 mM Aqueous Solution) (Component E)	1 vial
EdU Buffer Additive (Component F)	400 mg
Hoechst 33342 (10 mg/mL in Water) (Component G)	35 µL

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2 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 1X EdU Reaction Buffer:** 将4 mL Component D溶液加入到 36 mL ddH₂O中 (可通过使用一些稀释的1X EdU Reaction Buffer冲洗D瓶以确保转移所有的10X EdU Reaction Buffer), 如若一次实验只需配制少量的1X EdU Reaction Buffer, 则可用ddH₂O按照1:10的比例稀释Component D中的溶液。配制好的1X EdU Reaction Buffer在2-6°C条件下可稳定保存长达6个月。
- 4) **配制10X EdU Buffer Additive储存液:** 向Component F中加入2 mL的ddH₂O, 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。**
- 5) 其他需要自备的试剂 (本试剂盒不提供):
 - ① 1X PBS (pH 7.2-7.6)
 - ② 洗涤液 (如含3% BSA的PBS)
 - ③ 固定液 (如含4%多聚甲醛的PBS)
 - ④ 通透液 (如含0.3% Triton X-100的PBS)

2. EdU标记细胞

- 1) 将适量细胞接种于6孔板中 (如有必要可以加入盖玻片), 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 μ M, 则用完全培养基先稀释成 20 μ M 的 2X EdU 工作液)。

***Note:** 设置实验组时可以考虑增加一个不添加 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 μ M, 则用含 20 μ 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。

3. 固定和通透

- 1) EdU 孵育完成后, 去除培养基, 每个孔中加入 1 mL 含 4% 多聚甲醛的 PBS (或其它固定液), 室温下固定 15 min。
- 2) 去除固定液, 然后每个孔用 1 mL 含 3% BSA 的 PBS 洗涤细胞, 洗涤 2 次, 每次 3-5 min。
- 3) 去除洗涤液, 向每个孔中加入 1 mL 含 0.3% Triton X-100 的 PBS (或其它通透液), 室温下孵育 10-15 min。

4. 点击反应

- 1) 通透结束后离心去除细胞中的通透液, 并用 1 mL 含 3% BSA 的 PBS 洗涤细胞 2 次。
- 2) 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)。
- 3) 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 min 内使用。

Components	6 孔板样品数			
	1	2	4	5
1X EdU Reaction Buffer	430 μ L	860 μ L	1.8 mL	2.2 mL
CuSO ₄ (Component E)	20 μ L	40 μ L	80 μ L	100 μ L
HyperFluor™ 594 azide (Component B)	0.5 μ L	1 μ L	2 μ L	2.5 μ L
1X EdU Buffer Additive	50 μ L	100 μ L	200 μ L	250 μ L
总体积	500 μ L	1 mL	2 mL	2.5 mL

- 4) 离心除去洗涤液, 每孔加入 500 μ L Click 反应液 (您可以根据之前的实验需要调整 Click 反应液的体积), 轻轻摇晃培养板以确保 Click 反应液均匀分布覆盖样品, 室温避光孵育 30 min。
- 5) 吸去 Click 反应液, 用 1 mL 含 3% BSA 的 PBS 洗涤每孔 3 次, 每次 3-5 min。

6) 如果需要对细胞核进行染色，可以参照下述步骤进行。如无其它的特殊需要，即可在荧光显微镜下观察。

7) 可选步骤：若同时需用抗体对样品进行标记，则在孵育过程中保持避光非常重要。

2 细胞核染色

1) 1X Hoechst 33342溶液配制：将Hoechst 33342（Component G）溶液用PBS按1:2000的比例稀释，即可得到1X Hoechst 33342溶液（终浓度为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

2) 每孔加入1 mL 1X Hoechst 33342溶液，室温避光孵育15 min。

3) 除去Hoechst 33342溶液。

4) 每孔用1 mL PBS洗涤3次，每次3-5 min。

3 成像分析

HyperFluor™ 594 azide的最大激发波长为590 nm，最大发射波长为617 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。

同时可以根据实验需要进行细胞表面或细胞内抗原的染色。

APEX BIO Technology

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