

**Yefluor 488 EdU Kits(植物细胞)**  
**Yefluor 488 EdU 植物细胞染色试剂盒**

**Cat No.40287**

**产品说明书**

## 产品信息

产品名称	产品编号	规格
Yefluor 488 EdU Kits (植物细胞)	40287ES60	100 T
Yefluor 488 EdU 植物细胞染色试剂盒		

## 产品描述

植物细胞含细胞壁，采用BrdU抗体检测方法通常需要消化植物细胞细胞壁，这易带来一些杂质干扰，甚至破坏重要的细胞形态表征，导致检测的可靠性大大降低。EdU和Yefluor系列染料分子均很小能够轻松地透过细胞壁屏障，因而无需消化细胞壁即可完成检测。而且该方法无需DNA变性、抗原修复、抗原抗体反应即可准确地检测植物生长，发育，分化等性状的细胞增殖情况，使用更加方便、快速、灵敏。本试剂盒中EdU试剂含有炔烃，而Yefluor 488 Azide染料试剂含有叠氮化合物。采用点击法的EdU标记增殖快速有效，使用方便。

**光谱特性：** Yefluor 488 Azide: Ex/Em=495/519 nm; Hoechst 33342: Ex/Em=350/461 nm, bound to DNA。

## 产品组分

编号	组分名称	产品编号/规格	
		40287ES60 (100T)	保存条件
40287-A	10 mM EdU	0.2 mL	-20℃
40287-B	Yefluor 488 Azide	20 μL	-20℃, 避光
40287-C	10× Click-iT EdU 反应缓冲液	1 mL	2-8℃
40287-D	CuSO <sub>4</sub>	0.5 mL	2-8℃
40287-E	Click-iT EdU 缓冲液添加物	30 mg	2-8℃
40287-F	Hoechst 33342	25 μL	2-8℃

注：上述反应次数是针对96孔板培养的细胞计算。

## 运输与保存方法

冰袋 (wet ice) 运输。-20℃避光保存，1年有效。

## 注意事项

操作时请采取防护措施，穿防护服、戴一次性手套等。

## 使用说明

### 1、EdU标记细胞

1.1 按每孔 $4 \times 10^3$ - $1 \times 10^5$ 个细胞接种于96孔板中，按照实验设计进行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。推荐以10 μM的初始工作浓度开始预实验。

1.3 预热2×的EdU工作液，加入等体积的培养基使浓度变为1×（如：需要得到10 μM的终浓度，应以新鲜培养基等体积加入到20 μM的EdU工作液中）。

1.4 合适时间合适条件孵育细胞，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。

**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  $\mu$ M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, 我们建议客户设置一系列的EdU浓度梯度, 以确定最佳的合适您的细胞的实验浓度。

## 2、细胞固定及促渗操作

2.1 孵育完成后, 去除培养基加入50  $\mu$ L 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  $\mu$ L 2 mg/mL甘氨酸溶液, 室温孵育5min, 中和残留的固定液。

2.3 按每孔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。

**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。

## 3、EdU检测

**注意:** 本参考步骤每孔反应使用100  $\mu$ L的Click-iT反应混合物。用户可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 $\times$  Click-iT EdU 反应缓冲液 (组分C): 10 $\times$ 组分C试剂以去离子水稀释10倍即可。

3.2 制备一份5 $\times$  的Click-iT EdU反应添加物储液 (组分E): 加0.3mL去离子水至30 mg的E组分试管中 (100 mg/mL), 混匀至全部溶解。使用后, 剩余储液存放在 $\leq$ -20 $^{\circ}$ 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为5 $\times$  储液备用)。

3.3 准备1 $\times$  Click-iT EdU缓冲液添加物: 以去离子水稀释5 $\times$ 储液 (组分E) 至1 $\times$ , 溶液应现用现配, 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 $\times$ Click-iT EdU 反应缓冲液 (组分 C)	860 $\mu$ L
CuSO <sub>4</sub> (组分 D)	40 $\mu$ L
Yefluor 488 Azide (组分 B)	2 $\mu$ L
1 $\times$ 反应缓冲液添加物 (步骤 3.3 所准备)	100 $\mu$ L
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 去除反应混合物, 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 按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 $\times$  Hoechst 33342溶液, 终浓度为5  $\mu$ g/mL。

4.3 每孔加0.1 mL 1 $\times$  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