

Yefluor 488 EdU Flow Cytometry Assay kit

Yefluor 488 EdU 细胞流式试验试剂盒（绿色荧光）

产品信息

产品名称	产品编号	规格
Yefluor 488 EdU Flow Cytometry Assay kit	40278ES25	20 T
Yefluor 488 EdU 细胞流式试验试剂盒（绿色荧光）	40278ES50	50 T

产品描述

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。常用的检测细胞增殖方法是 BrdU 法。EdU 法检测是 BrdU 方法的升级和突破。EdU（5-溴-2-脱氧尿嘧啶）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。

本试剂盒中 EdU 试剂含有炔烃，而 Yefluor 488 Azide 染料含有叠氮化合物。点击法的 EdU 标记增殖快速有效，使用方便，只需少量的叠氮染料即可非常有效地标记出整合的 EdU。标准化的戊二醛固定和去污剂促渗可以使检测试剂进入细胞，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，可以进行细胞增殖检测与细胞周期分析。

光谱特性：Yefluor 488 Azide: Ex/Em=495/519 nm

产品组分

编号	组分名称	产品编号/规格		
		40278ES25 (20 T)	40278ES50 (50 T)	保存条件
40278-A	10 mM EdU	0.4 mL	1 mL	-20 °C
40278-B	Yefluor 488 Azide	100 μL	250 μL	-20 °C, 避光
40278-C	CuSO ₄	0.8 mL	2 mL	2-8 °C
40278-D	Click-iT EdU 缓冲液添加物	60 mg	150 mg	2-8 °C
40278-E	10×Click-iT EdU 反应缓冲液	1 mL×2	5 mL	2-8 °C

【注】：上述反应次数是按照6孔板培养细胞检测计算。

运输与保存方法

冰袋（wet ice）运输。-20 °C避光保存，有效期1年。开封后，保存温度请详见说明书。

注意事项

- 1) 操作时请采取防护措施，穿防护服、戴一次性手套等。
- 2) 本产品仅作科研用途！

其他所需试剂

10 mM PBS, pH 7.2-7.6

中性多聚甲醛固定液（4%多聚甲醛 in PBS）

促渗试剂（0.5% Triton X-100 in PBS）

1% BSA in PBS, pH7.4

使用方法

1、EdU 标记

【注】: 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 μ 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, 以确定适合待测细胞的最佳实验浓度。

1.1 按每孔 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ 个细胞接种于 6 孔板中, 培养至正常生长阶段。进行您所需要的药物处理或者其他刺激处理。

1.2 EdU 加入细胞培养基至所需的浓度混匀, 推荐客户以 10 μ 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。

1.3 以合适时间和条件孵育细胞, 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】: EdU 浓度与孵育时间相关, 短时间孵育 (< 2 h) 宜采用高浓度, 如: 10~50 μ M, 长时间孵育 (>24 h) 宜采用低浓度, 如: 1~10 μ M。

2、细胞固定及促渗操作

2.1 孵育完成后, 收集细胞, 1% BSA in PBS 清洗细胞 1 次, 离心收集细胞。

2.2 100 μ L 4% 多聚甲醛 in PBS 重悬细胞。

2.3 室温避光孵育 15 min。

2.4 1% BSA in PBS 的洗涤液洗涤细胞 2 次。

2.5 0.1 mL 0.5% Triton X-100 促渗液重悬细胞, 室温孵育 20 min。

【注】: ①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, 同时也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等。

②对于需要同时做细胞表面抗原标记的实验, 可以考虑在完成 EdU 孵育后, 用含 1% BSA-PBS 洗涤 2 次细胞后, 在细胞固定促渗之前进行。

3、EdU 检测

3.1 制备 5 \times 的 Click-iT EdU 反应添加物储液 (**组分 D**): 加 1 mL 去离子水至 100 mg 的 D 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 ≤ -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 D 均按照此比例加去离子水溶解为 5 \times 储液备用)。

3.2 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 D**) 至 1 \times , 溶液应现用现配, 当天用完。

3.3 准备 1 \times Click-iT EdU 反应缓冲液: 10 \times Click-iT EdU 反应缓冲液 (**组分 E**) 以去离子水稀释 10 倍即可。

3.4 依据表 1 准备 Click-iT 反应混合物。

【注】: 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	每单次反应所需的加液体积
1 \times Click-iT EdU 反应缓冲液 (步骤 3.3 所准备)	875 μ L
CuSO ₄ (组分 C)	20 μ L
Yefluor 488 Azide (组分 B)	5 μ L
1 \times 反应缓冲液添加物 (步骤 3.2 所准备)	100 μ L
总体积	1 mL

3.5 加入 1 mL Click-iT 反应混合物至每管, 混匀。

3.6 室温避光孵育反应混合物 30 min。

3.7 以 1% BSA in PBS 洗涤细胞一次, 收集细胞去除上清, 以 1 mL 含 1% BSA 的 PBS 重悬细胞, 上机检测。

【注】: 对于 6 孔板收集的细胞样本可参考每个反应需要 1 mL 的反应工作液来进行。用户可以根据自己的样本情况等比例调整所用的溶液体积。