

通用型 FT™ Click-iT EdU 细胞增殖检测试剂盒

1 产品基本信息

产品名称（中文）：通用型 FT™ Click-iT EdU 细胞增殖检测试剂盒

产品名称（英文）：Universal FT™ Click-iT EdU Cell Proliferation Kits

产品信息

货号	名称	规格
MX1543S	FT™ 488 Click-iT EdU 通用款细胞增殖检测试剂盒（绿色荧光）	2-20 T
MX1543M		10-100 T
MX1543L		50-500 T
MX1544S	FT™ 555 Click-iT EdU 通用款 细胞增殖检测试剂盒（橙红色荧光）	2-20 T
MX1544M		10-100 T
MX1544L		50-500 T
MX1545S	FT™ 647A Click-iT EdU 通用款细胞增殖检测试剂盒（远红荧光）	2-20 T
MX1545M		10-100 T
MX1545L		50-500 T

产品组分

组分	2~20T	10~100T	50~500T	开封前保存温度	开封后保存温度
A. 10 mM EdU	40 μ L	200 μ L	1 mL	-20°C避光保存	-20°C
B. FT™488/555/647A Azide	10 μ L	50 μ L	250 μ L		-20°C,避光
C. 10×Click-iT EdU 反应缓冲液	200 μ L	1 mL	5 mL		2~8°C
D. CuSO ₄	100 μ L	500 μ L	2×1.25 mL		2~8°C
E. Click-iT EdU缓冲液添加物	6 mg	30 mg	150 mg		-20°C
F. Hoechst 33342	5 μ L	25 μ L	125 μ L		2~8°C,避光

规格：如果用于荧光显微镜检测，所能使用次数为上述各个规格的最大使用次数（针对 96 孔板培养的细胞），如 MX1543S 可检测 20 个孔的样品（不同容器的具体用量可参考表 2）；如果用于流式检测，所能使用次数为上述各个规格的最小使用次数，如 MX1543S 可检测 2 个样品。

2 产品介绍

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。检测细胞增殖最精确的方法是 BrdU 法，EdU 法检测试剂盒是 BrdU 法的革命性突破。EdU（5-乙炔基-2' -脱氧尿苷）是一种嘧啶类似物，在 DNA 合成期整合入 DNA 双链，检测基于“点击”反应，一种由铜催化的叠氮化合物和炔烃作用发生共价反应形成共价键。点击法的 EdU 标记增殖快速有效、易于使用，只需多聚甲醛固定和 Triton X-100 促渗就可以使检测试剂进入细胞，只需少量的叠氮化染料即可非常有效地标记出整合的 EdU；BrdU 方法需要 DNA 变性（如酸变性、热变性或者用 DNase 消化）暴露出 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分，可以用于体外培养细胞的增殖检测。

产品特点：

- 简单高效：无需抗原抗体反应，基于小分子化学反应的检测方法简单高效，反应仅需要几分钟；
- 灵敏度高：无需抗体，检测染料仅 BrdU 抗体的 1/500，很容易扩散，即便是单个增殖细胞也能准确检测；
- 快速省时：无需过夜，省却了抗原抗体反应的复杂繁琐步骤，完成整个检测周期仅需 5 小时。

适用范围：

细胞增殖、分化、生长与发育、DNA 损伤修复、病毒复制等方面的研究

3 产品参数

荧光光谱数据：

FTTM488 Azide: 495/519 nm;

FTTM555 Azide: 555/565 nm;

FTTM647A Azide: 650/670 nm;

Hoechst33342: 350/461 nm (bound to DNA)

4 储存与运输

储存条件：-20 °C 避光保存

运输条件：冰袋运输

5 使用方法（仅供参考）

一、自备材料

1. 耗材

96/24/12/6 孔培养板或培养皿

2. 试剂

(1)10 mM PBS, pH7.2~7.6

(2)4%多聚甲醛固定液 (in PBS)

(3)促渗试剂 (0.5% Triton X-100 in PBS)

(4)2 mg/mL 甘氨酸溶液 (in ddH₂O)

(5)3% BSA in PBS, pH7.2~7.6

(6)1% BSA in PBS, pH7.2~7.6

(7)ddH₂O

二、操作步骤

注：开封后不同组分按指定温度保存。

1. 荧光显微镜检测方法

(1)细胞培养

取对数生长期细胞，以每孔 4×10^3 ~ 1×10^5 细胞（可根据细胞大小、生长速度以及实验处理的具体要求调整细胞数量和密度）接种于 96 孔板中，培养至正常生长阶段。

(2)药物处理

根据实验需要进行各种药物处理。

(3)EdU 标记

1)用细胞完全培养基按一定比例稀释 EdU 溶液（组分 A）至合适浓度后加入细胞中，混匀；设置不

加 EdU 处理的阴性对照组。

注：EdU 的标记浓度需根据细胞类型加以调整，建议以 10 μM 的初始浓度进行摸索。预实验中，建议设置 EdU 浓度梯度，可参考表 3 和表 4。

2) 细胞培养箱中孵育 2 h。

注：最佳孵育时间与细胞周期有关，大多数肿瘤细胞系均可采用 2 h 的孵育时间，可参考表 3。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 μM ；长时间孵育(>24 h)宜采用低浓度，如：1~10 μM ；也可参考表 5。

(4) 细胞固定及促渗

注：对于需要做细胞表面抗原标记的实验，可以考虑在完成 EdU 孵育后，以含 3% BSA 洗涤液洗涤细胞 2 次，在细胞固定促渗之前进行。

1) 孵育完成后，去除培养基。以 1× PBS 清洗细胞两次，每次 5 min，以除去未掺入 DNA 的 EdU 残留，贴壁不牢的细胞可降低清洗强度。加入 50 μL 4% 多聚甲醛固定液，室温孵育 20 min 后，去除固定液。

2) 每孔加入 50 μL 2 mg/mL 甘氨酸溶液，室温孵育 5 min，中和残留的固定液。

3) 以每孔 100 μL 3% BSA 洗涤细胞 2 次。

4) 去除洗涤液，加入 100 μL 0.5% Triton X-100，室温孵育 10 min。

(5) EdU 检测

注：本参考步骤每个样本使用 100 μL 的工作液，用户可以根据自己的样本情况调整用量。

1) 配置 1× Click-iT EdU 反应缓冲液（组分 C）：用 ddH₂O 将组分 C 稀释 10 倍。

2) 配置 5× Click-iT EdU 缓冲液添加物（组分 E）：加 300 μL 的 ddH₂O 至 30 mg 的 E 组分管中（终浓度 100 mg/mL），混匀至全部溶解。请注意适当分装后，-20°C 保存。如果溶解后有白色物质析出，请上下颠倒多次，待全部溶解后使用。如果该溶液颜色变成棕色，说明该组分的有效成分已失效，请弃用。

注：不同规格的组分 E 均按照此比例加 ddH₂O 溶解，制备成 5× 储液备用。

3) 准备 1× Click-iT EdU 缓冲液添加物：用 ddH₂O 稀释 5× Click-iT EdU 缓冲液添加物至 1×，溶液应现配现用。

4) 依据表 1 准备 Click-iT 工作液（工作液须在配制后 15 分钟内使用）。

表 1 Click-iT 工作液

反应组分	以10个孔的样本数为例
1×Click-iT EdU反应缓冲液	855 μL
CuSO ₄ (组分D)	40 μL
FT™488/555/647A Azide (组分B)	5 μL
1×Click-iT EdU缓冲液添加物	100 μL
总体积	1 mL

5) 去除促渗剂，每孔 100 μL 的 3% BSA 洗涤液洗涤 2 次。

6) 每孔加入 100 μL Click-iT 工作液，均匀覆盖细胞。

7) 室温避光孵育 30 min。

8) 除去 Click-iT 工作液，以 100 μL 3% BSA 洗涤细胞 2 次后，去除洗涤液，加入 100 μL PBS 保持细胞湿润。如其他无特别要求，即可进行拍照分析。

(6) DNA 复染（可选）

- 1)用 100 μ L PBS 洗涤细胞 1 次，去除洗涤液。
- 2)用 PBS 将 Hoechst 33342 (组分 F) 稀释 2000 倍。
- 3)每孔加 100 μ L 1×Hoechst 33342 溶液，室温避光孵育 15-30 min。
- 4)去除 Hoechst 33342 溶液，用 100 μ L PBS 洗涤细胞 2 次。

(7)成像及分析

建议染色完成后立即进行荧光显微镜拍照观察；如果条件限制，请于 4 °C 条件下避光湿润保存 3 天之内完成拍照。

2. 流式细胞仪检测方法

(1)细胞培养

每孔 1×10^5 ~ 3×10^6 个细胞接种于 6 孔板中。

(2)药物处理

根据实验需要进行各种药物处理。

(3)EdU 标记细胞

1)用细胞完全培养基按一定比例稀释 EdU 溶液 (组分 A) 至合适浓度后加入细胞中，混匀；设置不加 EdU 处理的阴性对照组。

注：EdU 的标记浓度需根据细胞类型加以调整，建议以 10 μ M 的初始浓度进行摸索。预实验中，建议设置 EdU 浓度梯度，可参考表 3 和表 4。

2)细胞培养箱中孵育 2 h。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的时间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：最佳孵育时间与细胞周期有关，大多数肿瘤细胞系均可采用 2 h 的孵育时间，可参考表 3。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；也可参考表 4。

(4)细胞固定及促渗

注：对于需要做细胞表面抗原标记的实验，可以考虑在完成 EdU 孵育后，以含 1% BSA 洗涤细胞 2 次，在细胞固定促渗之前进行。

1)孵育完成后，收集细胞，每管加入 1 mL PBS 清洗细胞，1000 rpm 离心 5 min，吸弃上清，以除去未掺入 DNA 的 EdU 残留。

2)每管加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定液重悬细胞。

3)室温孵育 20 min，1000 rpm 离心 5 min，吸弃上清。

4)每管加入 1 mL 2 mg/mL 甘氨酸孵育 5 min，中和残留的固定液，1000 rpm 离心 5 min，吸弃上清，每管加入 1 mL PBS 清洗 1 次，1000 rpm 离心 5 min，吸弃上清。

5)每管加入 1 mL 0.5% Triton X-100 促渗液重悬细胞，室温孵育 10 min。

(5)EdU 检测

注：针对 6 孔板样本可参考每孔 1 mL 的工作液来进行，用户可以根据自己的样本情况调整用量。

1)配置 1×Click-iT EdU 反应缓冲液：用 ddH₂O 将组分 C 稀释 10 倍。

2)配置 5×Click-iT EdU 缓冲液添加物 (组分 E)：加 300 μ L ddH₂O 至 30 mg 的组分 E 试管中 (终浓度 100 mg/mL)，混匀至全部溶解。请注意适当分装后，-20 °C 保存。如果溶解后有白色物质析出，请上下颠倒多次，待全部溶解后使用。如果该溶液颜色变成棕色，说明该组分的有效成分已失效，请弃用。

注：不同规格的组分 E 均按照此比例加 ddH₂O 溶解为 5×储液备用。

3)准备 1×Click-iT EdU 缓冲液添加物: 以 ddH₂O 稀释 5×Click-iT EdU 缓冲液添加物储液至 1×, 溶液应现配现用。

4)依据表 2 准备 Click-iT 工作液 (工作液须在配制后 15 分钟内使用)。

表 2 Click-iT 工作液

反应组分	单次反应所需加液体积
1×Click-iT EdU 反应缓冲液	875 μ L
CuSO ₄ (组分 D)	20 μ L
FT™488 / 555 / 647A Azide (组分 B)	5 μ L
1×Click-iT EdU 缓冲液添加物	100 μ L
总体积	1 mL

5)1000 rpm 离 5 min, 吸弃上清, 去除促渗剂, 每管加入 1mL 的 1% BSA 洗涤液洗涤 2 次, 1000 rpm 离 5 min, 吸弃上清。

6)每管加入 1 mL Click-iT 工作液, 混匀。

7)室温避光孵育 30 min。

8)1000 rpm 离心 5 min, 吸弃染色反应液, 每管加入 1% BSA 洗涤细胞 2 次, 1000 rpm 离心 5min, 吸弃上清, 用 1 mL 1% BSA 再次重悬细胞 (重悬细胞的溶液体积可根据细胞的数量加以调整), 流式细胞仪检测。

注: 如需进行其他标志物检测可参考步骤 4。

(6)DNA 复染

1)用 100 μ L PBS 洗涤细胞 1 次, 去除洗涤液。

2)用 PBS 将 Hoechst 33342 (组分 F) 稀释 2000 倍。

3)每孔加 100 μ L 1×Hoechst 33342 溶液, 室温避光孵育 15~30 min。

4)去除 Hoechst 33342 溶液, 用 100 μ L PBS 洗涤细胞 2 次。

(7)细胞内抗原标记 (可选)

1)加入抗体工作液, 混匀。

2)避光条件下, 以合适的温度及时间孵育抗体。

(8)流式检测及分析

1)建议染色完成后立即进行流式检测; 如果条件限制, 请避光 4 °C湿润保存待测, 但不应超过 3 天。

2)检测的细胞数量建议尽量能达到百万级, 若细胞数量较少, 检测的细胞数量可调整为十万级起始进行实验。对于细胞得率过少 (刚到万级) 的情况, 可能不利于做流式图, 对此可适当减少步骤 (五) 8 中的清洗次数。

3. 结果展示

(1)图 1 使用 EdU 对增殖的 HeLa 细胞进行细胞增殖分析

用 EdU 孵育 HeLa 细胞 2 小时, 然后固定、促渗并用 FT™ Dye 叠氮化物和本司 Hoechst 33342 染色。结果是根据 HeLa 细胞的光散射特征通过荧光显微镜拍照得出。

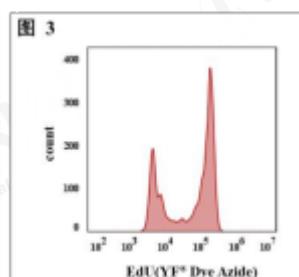
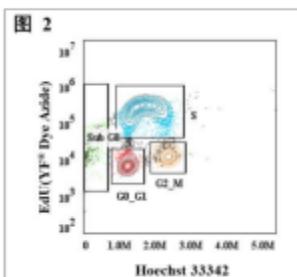
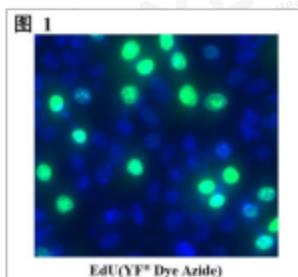
(2)图 2 使用 EdU 对增殖的 HeLa 细胞进行细胞周期分析

用 EdU 孵育 HeLa 细胞 2 小时, 然后固定、促渗并用 FT™ Dye 叠氮化物和本司 Hoechst 33342 染色。细胞周期的不同区段可通过 DNA 含量和 EDU 结合。结果是根据 HeLa 细胞的光散射特征通过流式细

胞仪画门分析得出的。

(3)图 3 使用 EdU 对增殖的 HeLa 细胞进行细胞增殖分析

用 EdU 孵育 HeLa 细胞 2 小时, 然后固定、促渗并用 FT™ Dye 叠氮化物染色。结果是根据 HeLa 细胞的光散射特征通过流式细胞仪画门分析得出的。



附录

表 3 EdU 培养基及染色反应液的参考使用量

试剂	96孔板	48孔板	24孔板	12孔板	6孔板	5.5 cm小皿
EdU培养基	100 μ L	150 μ L	200 μ L	500 μ L	1 mL	2 mL
染色反应液	100 μ L	150 μ L	200 μ L	500 μ L	1 mL	2 mL

表 4 EdU 的参考孵育时间

细胞系	人胚胎细胞	酵母细胞	鼠成纤维细胞	人宫颈癌细胞	人胚肾细胞系	人神经细胞
细胞周期	~30 min	~3 h	~18 h	~21 h	~25 h	~5 d
孵育时间	5 min	20 min	2 h	2 h	2 h	1 d

注: 1. EdU 孵育时间取决于细胞周期, 一般为细胞周期的 1/10 至 1/5, 但大多数细胞系均可采用 2 h 孵育时间。

2. 考虑到细胞培养基、温度、湿度、光线等其他因素的影响, 细胞周期会有所变化。

表 5 文献中 EdU 孵育浓度及时间

PubMed ID	Reference	Cell Line	Concentration	Time
18272492	Salic A, et al. PNAS.2008	NIH3T3,HeLa	10 nM~10 μ M	1 h
18521918	Cappella P, et al. Cytometry A.2008	HL-60,A2780, U2OS	1~10 μ M	0.5 h
18996411	Chehahsa F, et al. Neurosci Methods.2009	Neurospheres	1~20 μ M	24 h
19179371	Limsirichaikul S, et al. Nucleic Acids Res.2009	Primary fibroblasts	10 μ M	1,2,4 h
19253396	Warren M, et al. Dev Dyn.2009	Chick embryos	10 μ M~2 mM	4 h
19647746	Yu Y, et al. J Immunol Methods.2009	Spleen cells	50 μ M	24 h
19544417	Momcilovic O, et al. Stem Cells.2009	Human ES cells	10 μ M	0.5 h
20080700	Cinquin O, et al. PNAS.2010	emb-30	1 μ M	12 h
20025889	Han W, et al. Life Sci.2009	VSMC	50 μ M	2 h
20659708	Huang C, et al. J Genet Genomics.2010	ESC	50 μ M	2 h
21310713	Hua H, et al. Nucleic Acids Res.2011	Fission yeaststrains	10 μ M	3 h

PubMed ID	Reference	Cell Line	Concentration	Time
20824490	Lv L, et al. Mol Cell Biochem. 2011	EJ cells	50 μM	4 h
21248284	Yang S, et al. Biol Reprod. 2011	GC cells	50 μM	2 h
21227924	Zhang YW, et al. Nucleic Acids Res. 2011	U2OS, HT29	30 μM	1.5 h
21829621	Guo T, et al. PloS One. 2011	HIT-T15	50 μM	4 h
21980430	Zeng T, et al. PloS One. 2011	MCF-10A	25 μM	2 h
22012572	Ding D, et al. Int Orthop. 2011	C3H10T1/2	10 μM	24 h
22000787	Zeng W, et al. Biomaterials. 2011	EPC	50 μM	4 h
21913215	Xue Z, et al. J Cell Biochem. 2011	SGC7901	25 μM	24 h
22016038	Peng F, et al. Lasera Med Sci. 2011	MSC	50 μM	2 h
21878637	Li D, et al. J Biol Chem. 2011	HCC	50 μM	2 h

6 常见问题

Q1 : 什么样的信号才是真正的 EdU 阳性信号？

答：(1) FT™ Dye Azide 染色信号与核染色信号 (Hoechst33342 或 DAPI 等核染信号) 完全重合，或者与核重合的信号明显强于胞浆上的信号 (染料附着等)。

(2) 一般部分细胞上的信号呈现上述特征，而不是全部细胞。

(3) 对于流式细胞术检测，则是通过设置阴性对照样品 (不做 EdU 处理但同时进行 FT™ Dye Azide 染色)，高于阴性对照样品信号强度的为阳性信号。

Q2 : 问：整个细胞都有 EdU 信号，或背景信号很强是什么原因？怎么解决？

答：(1) 染色后洗涤不充分，可尝试加强洗涤解决。

(2) 染色过程中干片，导致染料粘附严重。

(3) 多聚甲醛固定时间过长而未使用甘氨酸中和。

(4) 没有阳性信号而曝光过度导致背景严重。

Q3 : 没有阳性信号是什么原因？怎么解决？

答：(1) EdU 处理时间太短导致没有阳性信号。体外细胞实验一般 EdU 处理时间宜为细胞周期长度的 1/5~1/10，阳性率约为 20~30%，体内实验需根据目的组织细胞的增殖速度进行调整，若细胞增殖速度慢，需要采用长时间的 EdU 处理时间。

(2) EdU 处理时细胞已经长得过满而产生接触抑制等情况使得细胞没有发生增殖。

(3) 实验时如果未使用完全培养基配制 EdU 培养基而是使用无血清培养基配制 EdU 培养基，可能会使细胞同步化在 G0/G1 期而导致没有阳性信号或阳性信号很少。

(4) 染色过程干片等因素导致未染上信号。

(5) 对于阴性结果，可设置阳性对照 (常见肿瘤细胞株如 A549、HeLa EdU 处理 2 小时或 EdU 处理 6 小时以上的小鼠小肠上皮组织) 以确认染色过程无误，对于目的样品，可先使用较长的 EdU 处理时间以尽量先检测出阳性信号，再根据具体信号比例进行 EdU 处理时间的调整。

7 注意事项

- 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
- EdU (10 mM)首次使用时建议根据实验需要分装，-20°C 保存。
- Click-iT EdU 缓冲液添加物溶液首次配制时建议根据实验需要适当分装，-20°C 保存。如果溶解后有白色物质析出，请上下颠倒多次，待全部溶解后使用。如果该溶液颜色变成棕色，说明该组分的有效成分已失效，请弃用。
- 可设置未进行 EdU 处理的细胞经 FT™ Dye Azide 染色作为阴性对照样品，用于确定合适的检测条件，此设置对干流式细胞术检测尤为重要，可以明确阴性信号的强度以划分阴性信号跟阳性信号的界限。
- 本品不建议与 TUNEL 试剂盒同时检测。这是由于 EdU 的结构中有-OH 存在，会影响 TUNEL 的反应过程。
- 本产品属于铜离子催化的点击反应，可能会造成部分荧光蛋白或荧光染料淬灭，建议在点击反应完成后进行反应和检测，目前已确定受影响的染料有 PE 及 PE tandems 染料。
- 铜离子会影响 GFP、RFP、mCherry 等荧光蛋白的荧光，因此本产品不适用于带 GFP、RFP、mCherry 等荧光的细胞检测。
- 由于铜离子会破坏肌动蛋白结构，影响鬼笔环肽检测，所以 Phalloidin (鬼笔环肽)与本产品不兼容，推荐使用 Tubulin-Tracker Red (MX1404)进行细胞微管的检测。
- 开封后的组分保存条件请按照说明书上进行保存。
- 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 本产品仅限于科研，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。