

EdU 细胞增殖检测（成像检测）使用说明

RN: R11053.9

产品简介

EdU (5-Ethynyl-2'- deoxyuridine) 是一种胸腺嘧啶核苷类似物，能够在细胞增殖时期代替胸腺嘧啶 (T) 掺入正在复制的 DNA 分子中，通过基于 EdU 与 Apollo[®] 荧光染料的特异性反应快速检测细胞 DNA 复制活性，可快速准确的检测细胞的增殖能力。

与 BrdU 检测方法相比，EdU 检测方法更快速、更灵敏、更准确。EdU 与 T 非常相似，而 EdU 染料只有 BrdU 抗体的 1/500，在细胞内很容易扩散，无需 DNA 变性（酸解、热解、酶解等），可有效避免样品损伤，而且无需抗原抗体反应，能在细胞和组织水平更快速便捷地反映 DNA 复制活性。

C10310-1/-2/-3 试剂盒适用于体外培养细胞的增殖检测，三种试剂盒的差别为所含 Apollo[®] 荧光染料不同，分别是 Apollo[®]567、Apollo[®]643 和 Apollo[®]488，可根据仪器检测通道及其它复染情况选择合适试剂盒进行实验。

试剂盒内容

产品编号	试剂	浓度	试剂量
C10310-1/-2/-3	EdU 溶液 (试剂 A)	1000X	20 μ L
	Apollo [®] 反应缓冲液 (试剂 B)	20X	500 μ L
	Apollo [®] 催化剂溶液 (试剂 C)	100X	100 μ L
	Apollo [®] 荧光染料溶液 (试剂 D)	300X	30 μ L
	Apollo [®] 缓冲添加剂 (试剂 E)	粉末	100 mg
	Hoechst 33342 (试剂 F)	100X	150 μ L

运输与保存

室温运输，4°C 长期储存，勿冻存，荧光试剂请避光保存，可稳定储存一年。

使用前须知

贴壁细胞宜采用成像检测方式，适用于荧光显微镜、共聚焦显微镜、高内涵筛选仪检测。悬浮细胞可在孵育 EdU 后进行涂片，涂片后从固定开始跟贴壁细胞采用相同的染色检测流程。

实验准备

- 1X PBS (pH 7.2~7.6)
- 渗透剂(含 0.5% Triton X-100 的 PBS)
- 甘氨酸溶液(2 mg/mL)（去离子水配置）
- 细胞固定液(含 4% 多聚甲醛的 PBS)
- 96/24/12/6 孔培养板或培养皿等

注意：请使用一次性手套，废液请妥善处理。

实验参考

表 1 EdU 培养基及染色反应液的使用量参考

	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	200 μ L	300 μ L	500 μ L	1 mL	2 mL
染色反应液	100 μ L	200 μ L	300 μ L	500 μ L	1 mL	2 mL

注：1) *表示贴壁细胞通常采用的培养容器，EdU 培养基与染色反应液用量以覆盖细胞为宜；2) 悬浮细胞 EdU 用量依据培养体积而定。

表 2 EdU 孵育时间设定参考

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*	~30min	~3h	~18h	~21h	~25h	~5d
孵育时间	5min	20min	2h	2h	2h	1d

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 2h 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 3 Apollo[®]染色反应液的配置参考 (现用现配)

配制顺序	Apollo [®] 染色反应液	500 μ L*	1 mL	5 mL	10 mL
1	去离子水	469 μ L	938 μ L	4.69 mL	9.38 mL
2	Apollo [®] 反应缓冲液 (试剂B)	25 μ L	50 μ L	250 μ L	500 μ L
3	Apollo [®] 催化剂溶液 (试剂C)	5 μ L	10 μ L	50 μ L	100 μ L
4	Apollo [®] 荧光染料溶液 (试剂D)	1.5 μ L	3 μ L	15 μ L	30 μ L
5	Apollo [®] 缓冲添加剂 (试剂E)	5 mg	9 mg	44 mg	88 mg

注：1) *表示通常配制的 Apollo[®]反应液的体积；

2) 按顺序配制适量 1X Apollo[®]染色反应液，以免破坏正常的反应体系(现用现配，30 分钟用完)；

3) 试剂 E 为白色粉末，较难准确称量，称量误差范围可稍微放宽，但不应超过 $\pm 20\%$ 。且其较易氧化，使用后请旋紧管盖，如试剂出现棕黄色，则需报废或更换。

表 4 配套染料的相关波长信息

产品编号	荧光染料	最大激发波长	最大发射波长	类似光谱性质染料
C10310-1	Apollo [®] 567	550 nm	565 nm	Cy3
C10310-2	Apollo [®] 643	653 nm	667 nm	Cy5
C10310-3	Apollo [®] 488	490 nm	520nm	FAM
C10310-1/-2/-3	Hoechst 33342	350 nm	461 nm	DAPI

注：1) 荧光显微镜宜采用 Apollo[®] 488 及 Apollo[®] 567 进行 DNA 复制活性检测；

2) 激光共聚焦显微镜采用 Apollo[®] 488、Apollo[®] 567 或 Apollo[®] 643 均可。

荧光显微镜检测方法（以96孔板，A549贴壁细胞为例）

细胞培养

取对数生长期细胞，以每孔 $4 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ 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。

药物处理

（可选）客户可以根据实验需要进行各种药物处理。

EdU 标记

- 1.1 用细胞完全培养基按 1000: 1 的比例稀释 EdU 溶液（试剂 A），制备适量 50 μ M EdU 培养基；
注：1）EdU 浓度与孵育时间相关，短时间孵育（<2h）宜采用高浓度（10-50 μ M），长时间孵育（>24h）宜采用低浓度（10 μ M）；
2）如果需配置 10 μ M EdU 培养基，需调整为 5000: 1 稀释比例；
3）配置好的培养基的保存时间取决于培养基的性质，建议现配现用。
- 1.2 每孔加入 100 μ L 50 μ M EdU 培养基孵育 2 小时，弃培养基；
注：1）最佳孵育时间与细胞周期相关（表 2 和表 5），大多数肿瘤细胞系均可采用 2 小时孵育时间；
2）EdU 培养基用量以没过细胞为宜，但需要保证 EdU 孵育时间内的营养物质持续供给（表 1）；
- 1.3 PBS 清洗细胞 1~2 次，每次 5 分钟。
注：清洗目的是将未掺入 DNA 的 EdU 洗脱，清洗方式依据不同的细胞类型而定，贴壁不牢的细胞请降低清洗强度。

细胞固定化

- 2.1 每孔加入 50 μ L 细胞固定液（即含 4% 多聚甲醛的 PBS）室温孵育 30 分钟，弃固定液；
注：1）低浓度的多聚甲醛有利于细胞结构的保持；
2）可采用其他方式进行细胞固定。
- 2.2 每孔加入 50 μ L 2 mg/mL 甘氨酸，脱色摇床孵育 5 分钟后，弃甘氨酸溶液；
注：目的是中和过量的醛基，保证染色反应体系。当采用非醛类固定剂进行细胞固定时可酌情省略此步骤；
- 2.3 每孔加入 100 μ L PBS，脱色摇床清洗 5 分钟，弃 PBS；
- 2.4 每孔加入 100 μ L 渗透剂(0.5% TritonX-100 的 PBS)脱色摇床孵育 10 分钟；PBS 清洗 1 次，5 分钟。
注：当实验需要进行其他抗体染色时，或由于某些细胞类型对染料的吸附性较高，可能需要增强细胞膜通透性。

Apollo 染色

- 3.1 每孔加入 100 μ L 的 1X Apollo[®]染色反应液（表 3），避光、室温、脱色摇床孵育 30 分钟后，弃染色反应液；
注：1）染色液用量与细胞量相关，以覆盖细胞为宜（表 1）；2）孵育时间可以进行适当调整，调整范围为 10-30 分钟。
- 3.2 加入 100 μ L 渗透剂(0.5% TritonX-100 的 PBS) 脱色摇床清洗 2~3 次，每次 10 分钟，弃渗透剂；
- 3.3 （可选）每孔每次加入 100 μ L 甲醇清洗 1~2 次，每次 5 分钟；PBS 清洗 1 次，每次 5 分钟。
注：一般情况下可省略这一步，只有某些细胞对染料的吸附性较高，需采用加强方式洗脱以降低染料背景。

其他染色(自备)

（可选）可以根据实验需要进行细胞表面或细胞内抗原的染色，提前计划好染色方案和检测通道，必要时进行相关的染

料兼容性测试。

DNA 染色

- 4.1 用去离子水按 100: 1 的比例稀释试剂 F, 制备适量 1X Hoechst33342 反应液, 避光保存;
- 4.2 每孔加入 100 μ L 1X Hoechst 33342 反应液, 避光、室温、脱色摇床孵育 30 分钟后, 弃染色反应液;
- 4.3 每孔每次加入 100 μ L PBS 清洗 1~3 次;
- 4.4 可选择进行其他染色步骤, 否则每孔加入 100 μ L PBS 保存待用。

图像获取及分析

建议染色完成后立即进行观测; 如果条件限制, 请避光 4 $^{\circ}$ C 湿润保存待测, 但不应超过 3 天。若为细胞爬片或涂片, 可使用抗荧光淬灭封片剂封片后 4 $^{\circ}$ C 保存及进行检测。

注: 如对结果有疑问可发至 support@ribio.com, 共同分析解决。

表 5 细胞实验 EdU 孵育浓度及时间参考

PubMed ID	Reference	Cell line	Concentration	Time
18272492	Salic A, <i>et al.</i> PNAS. 2008	NIH3T3, HeLa	10 nM~10 μ M	1 hr
18521918	Cappella P, <i>et al.</i> Cytometry A. 2008	HL-60, A2780, U2OS	1~10 μ M	30 min
18996411	Chehrehasa F, <i>et al.</i> J Neurosci Methods. 2009	Neurospheres	1~20 μ M	24 hr
19179371	Limsirichaikul S, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res. 2009	Human primary fibroblasts	10 μ M	0.5,1,2,4 hr
19253396	Warren M, <i>et al.</i> Dev Dyn. 2009	Chick embryos	10 μ M~2 mM	4 hr
19647746	Yu Y, <i>et al.</i> J Immunol Methods. 2009	Spleen cells	50 μ M	24 hr
19544417	Momcilović O, <i>et al.</i> Stem Cells. 2009	Human ES cells	10 μ M	30 min
20080700	Cinquin O, <i>et al.</i> PNAS. 2010	emb-30	1 μ M	12 hr
20025889	Han W, <i>et al.</i> Life Sci. 2009	VSMC	50 μ M	2 hr
20659708	Huang C, <i>et al.</i> J Genet Genomics. 2010	ESC	50 μ M	2 hr
21310713	Hua H, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res. 2011	fission yeast strains	10 μ M	3 hr
20824490	Lv L, <i>et al.</i> Mol Cell Biochem. 2011	EJ cells	50 μ M	4hr
21248284	Yang S, <i>et al.</i> Biol Reprod. 2011	GC cells	50 μ M	2 hr
21227924	Zhang YW, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res. 2011	U2OS, HT29	30 μ M	90 min
21829621	Guo T, <i>et al.</i> PloS One. 2011	HIT-T15	50 μ M	4hr
21980430	Zeng T, <i>et al.</i> PloS One. 2011	MCF-10A	25 μ M	2hr
22012572	Ding D, <i>et al.</i> Int Orthop. 2011	C3H10T1/2	10 μ M	24hr
22000787	Zeng W, <i>et al.</i> Biomaterials. 2011	EPC	50 μ M	4hr
21913215	Xue Z, <i>et al.</i> J Cell Biochem. 2011	SGC7901	25 μ M	24hr

PubMed ID	Reference	Cell line	Concentration	Time
22016038	Peng F, <i>et al. Lasers Med Sci.</i> 2011	MSC	50 μ M	2hr
21878637	Li D, <i>et al. J Biol Chem.</i> 2011	HCC	50 μ M	2hr
21511813	Feng S, <i>et al. Nucleic Acids Res.</i> 2011	A549、H460	100 μ M	2 hr
22105365	Zhang S, <i>et al. Oncogene.</i> 2012	HepG2	-	-
24339740	Zhang T, <i>et al. Neoplasia.</i> 2013	HepG2-X, HepG2.2.15	-	-
25032870	Luo W, <i>et al. Cell Death Dis.</i> 2014	primary myoblasts	10 μ M	24 hr
26535064	Zhao Y, <i>et al. J Cancer.</i> 2015	Capan-2 cells	-	6 hr
25623055	Shu YJ, <i>et al. Mol Cancer.</i> 2015	GBC-SD, NOZ cells	25 μ M	2 hr
26250571	Zhou H, <i>et al. Sci Rep.</i> 2015	MSC	-	2 hr
27061862	Zhong C, <i>et al. J Cell Mol Med.</i> 2016	cardiac fibroblast	10 μ M	24 hr
26824182	Chen X, <i>et al. Oncotarget.</i> 2016	U87	50 μ M	2 hr
27312528	Liu X, <i>et al. Cancer Res.</i> 2016	Huh7, SW620, MDA-MB231, PANC-1, MHCC97H	-	5 hr

注：如果有采用 BrdU 进行实验的经验，可以参照 BrdU 实验的细胞处理及孵育时间等进行 EdU 实验。

相关产品

产品编号	产品名称	规格
C10338-1	Cell-Light™ EdU Apollo567 In Vitro Flow Cytometry Kit(20T)	20T
C10338-2	Cell-Light™ EdU Apollo643 In Vitro Flow Cytometry Kit(20T)	20T
C10338-3	Cell-Light™ EdU Apollo488 In Vitro Flow Cytometry Kit(20T)	20T
C00052	EdU 2mg	2mg
C00053	EdU 10mg	10mg
C00054	EdU 50mg	50mg
C10371-1	Cell-Light™ Apollo 567 Stain Kit (100T)	100T
C10371-2	Cell-Light™ Apollo 643 Stain Kit (100T)	100T
C10371-3	Cell-Light™ Apollo 488 Stain Kit (100T)	100T

FAQ

1. 什么样的信号才是真正的 EdU 阳性信号？

- 1) Apollo 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。

2. 整个细胞都有 EdU 信号, 或背景信号很强。

- 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。

3. 没有阳性信号。

- 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) 染色过程干片等因素导致未染上信号。
- 3) 对于阴性结果, 可设置阳性对照 (常见肿瘤细胞株如 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信号, 再根据具体信号比例进行 EdU 处理时间的调整。

4. 细胞中表达有 GFP, Apollo 染色后检测不到 GFP 的荧光信号。

Apollo 染料会造成 GFP 的失活, 故 Apollo 染色后无法直接检测 GFP, 建议可以使用 GFP 抗体进行复染以间接检测 GFP。