

EdU 细胞增殖（流式检测）使用说明

RN: R11056.6

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。

C10338-1/-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
C10338-1/-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 储存，勿冻存，荧光试剂请避光保存，可稳定储存一年。

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
C10338-1	Apollo [®] 567	550 nm	565 nm	Cy3
C10338-2	Apollo [®] 643	653 nm	667 nm	Cy5
C10338-3	Apollo [®] 488	490 nm	520nm	FAM
C10338-1/-2/-3	Hoechst 33342	350 nm	461 nm	DAPI

注：1) 试剂盒包括 Hoechst 33342 染料和 1 种 Apollo 荧光染料；

2) 流式细胞仪检测宜采用 Apollo[®] 488 荧光染料，能够兼容荧光显微镜和大多数流式细胞仪；

3) 流式细胞仪具有细胞计数功能，可不染 Hoechst33342。

流式细胞仪检测方法

细胞培养

每孔 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ 细胞接种于 6 孔板中，培养至正常生长阶段。

药物处理

根据实验需要进行各种细胞处理。

EdU 标记

1.1 设置 1 个不加 EdU 培养基的 NC 对照组，以便进行流式检测数据的染料背景分析；

1.2 用细胞培养基按 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。

1.3 细胞培养基更换为 EdU 培养基，每孔加入 1mL，孵育 2 小时。

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)；

细胞收集

2.1 将细胞收集至流式管中，350 x g 离心 5min，用枪头吸弃上清；

注：1) 如贴壁细胞，请先消化收集；

2) 离心力可按特定细胞培养经验进行设置。

2.2 （可选）用 1mL PBS 重悬细胞，350 x g 离心 5min，用枪头吸弃上清；

2.3 每管加入 1mL 4%多聚甲醛固定 15~30min 后，600 x g 离心 10min，用枪头吸弃上清；

注：1) 固定处理后细胞沉降系数发生变化，需增加离心力进行沉淀，需根据具体细胞的情况调整离心力，可参考该细胞在其它实验中固定后的离心条件。

2.4 每管加入 2~3mL 2mg/mL 甘氨酸中和 5min，600 x g 离心 10min 吸弃上清，2mL PBS 清洗 1 次，600 x g 离心 5min 吸弃上清；

2.5 每管加入 1mL 0.5% TritonX-100 渗透剂室温孵育 10min，600 x g 离心 10min 吸弃上清，2mL PBS 清洗 1 次吸弃上清。

Apollo 染色

3.1 每管加入 100~500 μ L 的 1X Apollo[®]染色反应液（表 3），充分重悬细胞，避光、室温孵育 10min 后，600 x g 离心 10min，吸弃染色反应液。

注：Apollo 染色液体积依据细胞量而定，以没过细胞为宜。

3.2 每管加入 3mL 0.5% TritonX-100 渗透剂室温清洗 1~3 次，600 x g 离心 10min 吸弃上清，500 μ L PBS 重悬。

其他染色（自备）

（可选）客户可以根据实验需要进行细胞表面或细胞内抗原的抗体染色。染色完的样品上机检测时，根据使用的染料选

择合适的通道检测

注：染料兼容性请参照表 4。

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℃ 湿润保存待测，但不应超过 3 天。
- 2) (预实验) 取少许细胞进行荧光显微镜观察，以便观察增殖细胞的染色情况，需进行 Hoechst 复染。如需要，可将预实验结果（包括荧光显微图像及流式检测结果）发至 support@ribobio.com，以便优化实验步骤及分析方法。
- 3) 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 3.2 中的清洗次数。

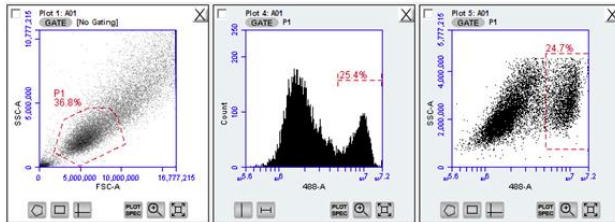


图 1 采用 50μM EdU 标记 HeLa 细胞 2h 后，采用 BD Accuri™ C6 流式细胞仪检测 Apollo®488 通道荧光。

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

22012572	Ding D, <i>et al. Int Orthop.</i> 2011	C3H10T1/2	10 μ M	24hr
22000787	Zeng W, <i>et al. Biomaterials.</i> 2011	EPC	50 μ M	4hr
21913215	Xue Z, <i>et al. J Cell Biochem.</i> 2011	SGC7901	25 μ M	24hr
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
C10310-1	Cell-Light™ EdU Apollo567 In Vitro Kit(100T)	100T
C10310-2	Cell-Light™ EdU Apollo643 In Vitro Kit(100T)	100T
C10310-3	Cell-Light™ EdU Apollo488 In Vitro Kit(100T)	100T
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。