RIBOBIO 锐博

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 μL
	Apollo®反应缓冲液 (试剂 B)	20X	500 μL
	Apollo®催化剂溶液 (试剂 C)	100X	100 μL
	Apollo®荧光染料溶液 (试剂 D)	300X	30 μL
	Apollo®缓冲添加剂 (试剂 E)	粉末	100 mg
	Hoechst 33342 (试剂 F)	100X	150 μL

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 μL	200 μL	300 μL	500 μL	1 mL	2 mL
染色反应液	100 μL	200 μL	300 μL	500 μL	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	500μL*	1 mL	5 mL	10 mL
1	去离子水	469 μL	938 μL	4.69 mL	9.38 mL
2	Apollo®反应缓冲液 (试剂B)	25 μL	50 μL	250 μL	500 μL
3	Apollo®催化剂溶液 (试剂C)	5 μL	10 μL	50 μL	100 μL
4	Apollo®荧光染料溶液 (试剂D)	1.5 μL	3 μL	15 μL	30 μL
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±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 4×10^3~1×10^5 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。

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 50μM 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 μM），长时间孵育（>24h）宜采用低浓度（10μM）；

2）如果需配置 10μM 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 100μL 50μM 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 50μL 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 50μL 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 μL PBS，脱色摇床清洗 5 分钟，弃 PBS；

2.4 每孔加入 100μL 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 μL 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 μL 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 μL 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 μL 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 μL 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 μL 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℃ 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℃ 保存及进行检测。

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

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