

TransDetect[®] EdU Imaging Kit-555 Fluorophore

使用前请仔细阅读说明书

目录号: FU111

保存: 2-8°C避光保存一年。

产品说明

TransDetect[®] EdU Imaging Kit-555 Fluorophore是一种利用胸腺嘧啶脱氧核苷类似物5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)检测细胞增殖能力的试剂盒。在DNA复制过程中, EdU可以插入到新合成的DNA双链结构中, 随后通过Click it反应使EdU被荧光基团标记, 利用荧光显微镜检测, 根据荧光强度反映细胞周期S期的DNA复制活性, 从而快速、灵敏地检测细胞增殖能力。555 Fluorophore最大激发波长为541 nm, 最大发射波长为567 nm。

与传统的BrdU检测方法相比, 本试剂盒无需抗体标记等额外步骤, 操作简便, 灵敏度高, 特异性强, 适用于药物筛选、细胞增殖测定、细胞毒性测定等实验。

产品特点

- 无需使用抗体, 操作简单。
- 灵敏度高, 特异性强。
- 应用范围广。

试剂盒组成

| Component | 50 rxns |
|---------------------------|----------|
| EdU (10 mM) | 1 ml |
| 555 Fluorophore-I | 100 µl |
| EdU Reaction Buffer (ERB) | 75 ml |
| Catalyst Solution (CS) | 300 µl |
| EdU Buffer Additive (EBA) | 4×200 mg |
| Hoechst | 60 µl |

操作步骤

自备

| Product Name | Catalog |
|--------------|-------------------------|
| PBS (1×) | TransGen, Cat. FG701-01 |

甲醛固定液 (含4%多聚甲醛的1×PBS)

细胞通透液 (含0.1% Triton X-100的1×PBS)

18 mm×18 mm 盖玻片

EdU标记

以6孔细胞培养板为例

1.1 将 $0.5-1 \times 10^6$ 个细胞接种于铺有18 mm×18 mm盖玻片的6孔细胞培养板中, 培养过夜或者进行药物处理。

1.2 配制2×EdU工作液: 每1 ml细胞完全培养基中加入4 µl EdU (10 mM), 得到浓度为40 µM的2×EdU工作液。

1.3 将与原培养基等体积的2×EdU工作液加入至6孔细胞培养板中, 使培养液中EdU终浓度为20 µM, 37°C, 5% CO₂培养箱中孵育。不建议完全去掉原培养基, 否则可能会影响细胞正常增殖。

细胞最佳孵育时间与细胞生长周期有关, 一般为细胞周期的1/10至1/5, 多数细胞系均可采用2小时孵育时间。初次检测建议设置梯度摸索最佳孵育时间, 不同细胞类型推荐孵育时间如下表所示:



| 细胞类型 | 细胞名称 | 孵育时间(小时) |
|--------|---------|----------|
| 肿瘤细胞 | A549 | 2 |
| | NS-1 | 2 |
| | HeLa | 2 |
| 原代细胞 | HUVEC | 2 |
| 神经细胞 | SH-SY5Y | 2 |
| 人胚胎干细胞 | H9 | 24 |
| 其他细胞 | NIH/3T3 | 1.5 |
| | MARC145 | 1.5 |

细胞固定、通透处理

细胞固定、通透处理过程可以同时进行步骤3.1和3.2操作。

- 2.1 去掉细胞培养基，用1 ml 1×PBS清洗细胞1-2次。
- 2.2 每孔加入1 ml甲醛固定液，室温固定15分钟。
- 2.3 吸净固定液，每孔用1 ml 1×PBS清洗细胞3次。
- 2.4 吸净PBS，加入1 ml细胞通透液，室温通透10分钟。
- 2.5 吸净细胞通透液，每孔用1 ml 1×PBS清洗细胞3次。处理后的细胞可在PBS中短暂保存。

EdU检测

- 3.1 配制EdU Buffer Additive (EBA)溶液：每管EBA中加入1 ml去离子水，震荡混匀至完全溶解。建议首次使用前对溶液进行分装，避免反复取用造成氧化降解。该溶液置于2-8℃会有析出，属正常现象，震荡即可完全溶解。如果溶液变为棕黄色，说明已发生降解，则需更换。
- 3.2 配制染色工作液：在EP管中按顺序依次加入EdU Reaction Buffer (ERB)，Catalyst Solution (CS)，555 Fluorophore-I和EBA溶液，加入量如下表所示，颠倒混匀。配制完成后冰上放置，建议30分钟内使用。

| | |
|-------------------|--------------|
| ERB | 1132 μ l |
| CS | 6 μ l |
| 555 Fluorophore-I | 2 μ l |
| EBA | 60 μ l |
| Total | 1.2 ml |

- 3.3 将步骤2.5中的PBS吸净，加入1.2 ml染色工作液，室温避光孵育30分钟。
- 3.4 吸净染色工作液，用1 ml 1×PBS清洗细胞3次。处理后的细胞可在PBS中短暂保存。

其他染色（可选）

根据实验需要进行细胞内抗原的染色。

DNA染色

- 4.1 配制Hoechst反应液：用1×PBS按照1000:1的比例稀释Hoechst，配制成Hoechst反应液。
- 4.2 每孔加入1.2 ml Hoechst反应液，室温避光孵育15分钟。
- 4.3 吸净反应液，用1 ml 1×PBS清洗细胞3次。处理后的细胞可在PBS中短暂保存。

图像获取及分析

通过荧光显微镜检测荧光，555 Fluorophore最大激发波长为541 nm，最大发射波长为567 nm。



不同细胞培养板中EdU培养基、染色工作液用量及配制如下表所示：

表1 不同细胞培养板EdU培养基、染色工作液用量

| | 96-well | 48-well | 24-well | 12-well | 6-well |
|--------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| 单孔面积 | 0.3 cm ² | 1 cm ² | 2 cm ² | 4 cm ² | 10 cm ² |
| EdU培养基 | 100 μl | 250 μl | 500 μl | 1 ml | 2 ml |
| 染色工作液 | 100 μl | 200 μl | 300 μl | 600 μl | 1.2 ml |

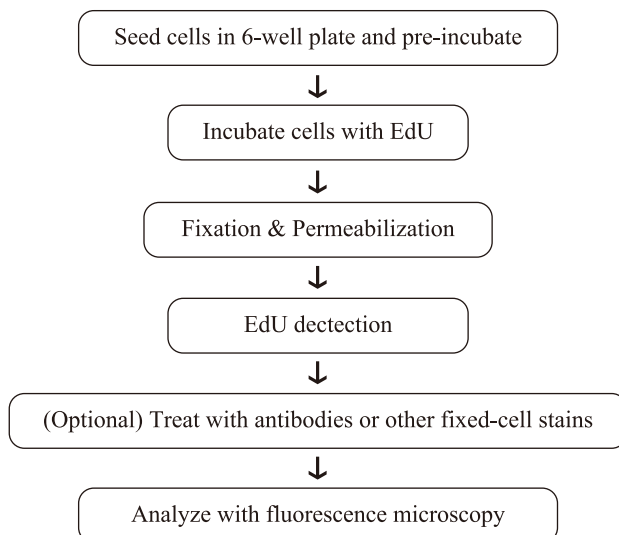
表2 不同用量染色工作液配制参考

| | 100 μl | 200 μl | 300 μl | 600 μl | 1.2 ml |
|-------------------|--------|--------|--------|--------|---------|
| ERB | 94 μl | 189 μl | 283 μl | 566 μl | 1132 μl |
| CS | 0.5 μl | 1 μl | 1.5 μl | 3 μl | 6 μl |
| 555 Fluorophore-I | 0.2 μl | 0.4 μl | 0.5 μl | 1 μl | 2 μl |
| EBA | 5 μl | 10 μl | 15 μl | 30 μl | 60 μl |

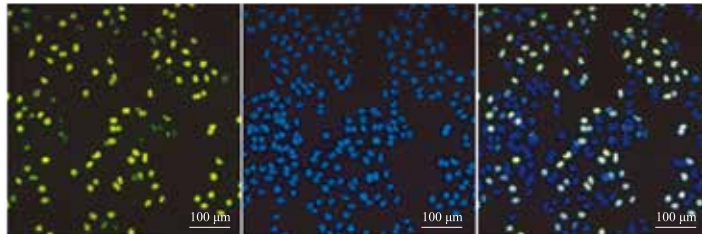
注意事项

- 实验进行前，所有组分需平衡至室温，确保各组分充分溶解混匀，点甩离心后使用。
- 不同细胞培养板/皿的细胞使用量有所差异，可根据操作步骤按照比例进行调整。
- EBA溶液在2-8℃可保存3个月，若长期保存建议-20℃保存。

操作流程



TransDetect[®] EdU Imaging Kit-555 Fluorophore检测A549细胞增殖的荧光成像结果



555 Fluorophore

Hoechst

Merge

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1-202008

服务投诉电话 +86-10-57815020

服务投诉邮箱 complaints@transgen.com.cn

