

TransDetect[®] EdU Imaging Kit-647 Fluorophore

使用前请仔细阅读说明书

目录号: FU131

保存: 2-8°C避光保存一年。

产品说明

TransDetect[®] EdU Imaging Kit-647 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DNA复制活性, 从而快速、灵敏地检测细胞增殖能力。647 Fluorophore最大激发波长为650 nm, 最大发射波长为665 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
647 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)，647 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
647 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，647 Fluorophore最大激发波长为650 nm，最大发射波长为665 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

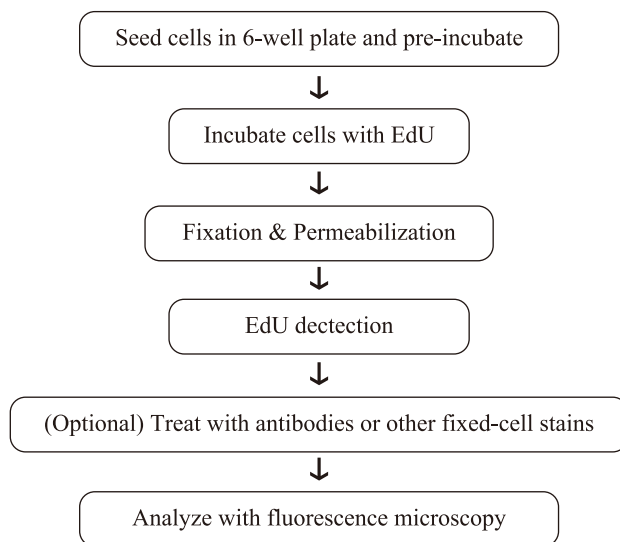
表2 不同用量染色工作液配制参考

	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
647 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

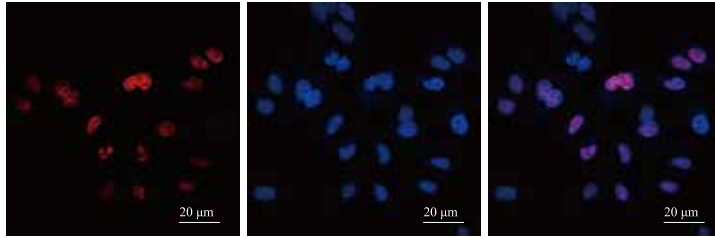
注意事项

- 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-647 Fluorophore检测A549细胞增殖的荧光成像结果



647 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

