

产 品 说 明 书

YF® Click-iT EdU 流式检测试剂盒

产品货号及规格：

货号	产品名称	规格
C6019S	YF® 488 Click-iT EdU 流式检测试剂盒（绿色荧光）	5T
C6019M		20T
C6019L		50T
C6020S	YF® 555 Click-iT EdU 流式检测试剂盒（橙红色荧光）	5T
C6020M		20T
C6020L		50T
C6021S	YF® 594 Click-iT EdU 流式检测试剂盒（红色荧光）	5T
C6021M		20T
C6021L		50T
C6022S	YF® 647A Click-iT EdU 流式检测试剂盒（远红荧光）	5T
C6022M		20T
C6022L		50T

产品内容：

组分 \ 规格	5T	20T	50T	保存温度	稳定性
A. 10 mM EdU	100 µL	0.4 mL	1 mL	-20°C	按指定温度保存 可有效放置一年
B. YF® 488/555/594/647A Azide	25 µL	100 µL	250 µL	-20°C，避光	
C. 10× Click-iT EdU 反应缓冲液	500 µL	2×1 mL	5 mL	2-8°C	
D. CuSO ₄	200 µL	0.8 mL	2× 1 mL	2-8°C	
E. Click-iT EdU 缓冲液添加物	15 mg	60 mg	150 mg	2-8°C	

规格：上述反应次数针对 6 孔板培养的细胞，不同容器的具体用量可参考附表 1。

荧光光谱数据：YF® 488 Azide: 495/519 nm; YF® 555 Azide: 555/565 nm;

YF® 594 Azide: 590/617 nm; YF® 647A Azide: 650/670 nm.

储存条件

-20°C 避光保存，有效期见外包装。开封后，保存温度详见说明书。

产品介绍

细胞增殖检测是评估细胞健康程度、遗传毒性及抗肿瘤药物效果的基础实验手段。检测细胞增殖最精确的方法是 BrdU 法。EdU 法检测试剂盒是 BrdU 法的革命性突破。EdU



(5-乙炔基-2'-脱氧尿苷)是一种嘧啶类似物,在DNA合成期整合入DNA双链。EdU法检测基于“点击”反应,一种由铜催化的叠氮化合物和炔烃作用发生共价反应,形成共价键。

本试剂盒中,EdU含有炔烃,YF® 488/555/594/647A Azide染料含有叠氮化合物。点击法的EdU标记增殖快速有效,易于使用。BrdU方法需要DNA变性(如酸变性、热变性或者用DNase消化)暴露出BrdU,方便BrdU抗体结合;而EdU法只需标准化的多聚甲醛固定和Triton X-100促渗就可以使检测试剂进入细胞,只需少量的叠氮化染料即可非常有效地标记出整合的EdU。

本试剂盒包含EdU法检测所需要的所有组分,可以用于体外培养细胞的增殖检测。

使用方法

实验材料(自备)

- 10 mM PBS, pH 7.2-7.6
- 中性多聚甲醛固定液(in PBS)
- 促渗试剂(0.5 % Triton X-100 in PBS)
- 1 % BSA in PBS, pH 7.4
- ddH₂O

实验步骤

1. EdU 标记细胞

(1) 每孔 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ 个细胞接种于6孔板中,培养至正常状态后进行药物处理或其他刺激处理。

(2) 培养基稀释 10 mM EdU 至合适浓度,阴性对照组不用 EdU 处理。

注:EdU 的标记浓度需根据细胞类型加以调整,建议以 10 μ M 的初始浓度进行摸索。预实验中,建议设置 EdU 浓度梯度,可参考附表 2 和附表 3。

(3) 细胞培养箱中孵育一段时间。EdU 孵育细胞的时间可以直接用作测定细胞 DNA 合成的指标,时间点选择以及孵育的时间取决于细胞生长速率。通过短暂的 EdU 孵育进行的脉冲式标记细胞可以用于研究细胞周期动力学。

注:EdU 浓度与孵育时间相关,短时间孵育(<2 h)宜采用高浓度,如:10~50 μ M;长时间孵育(>24 h)宜采用低浓

度,如:1~10 μ M;也可参考附表 3。

2. 细胞固定及促渗

注:对于需要做细胞表面抗原标记的实验,可以考虑在完成 EdU 孵育后,以含 1 % BSA 洗涤细胞 2 次,在细胞固定促渗之前进行。

(1) 孵育完成后,收集细胞,1 % BSA清洗细胞1次,离心收集细胞。

(2) 100 μ L 4 % 多聚甲醛重悬细胞。

(3) 室温避光孵育 15 min。

(4) 1 % BSA 洗涤细胞 2 次。

(5) 100 μ L 0.5 % Triton X-100 促渗液重悬细胞,室温孵育 20 min。

3. EdU 检测

注:针对 6 孔板样本可参考每孔 1 mL 的工作液来进行,用户可以根据自己的样本情况调整用量。

(1) 配置1× Click-iT EdU反应缓冲液:用ddH₂O将组分C稀释10倍。

(2) 配置 5× Click-iT EdU 缓冲液添加物(组分 E):加 600 μ L ddH₂O 至 60 mg 的组分 E 试管中(终浓度 100 mg/mL),混匀至全部溶解。使用后,剩余储液存放在-20°C,可保存一年,溶液一旦呈现棕色,则说明有效成分降解不能再用。

注:不同规格的组分 E 均按照此比例加 ddH₂O 溶解为 5× 储液备用。对于 50T 的规格,需添加 1.5 mL ddH₂O。

(3) 准备1× Click-iT EdU缓冲液添加物:以ddH₂O稀释5× Click-iT EdU缓冲液添加物储液至1×,溶液应现配现用。

(4) 依据表 1 准备 Click-iT 工作液。

表 1: Click-iT 工作液

反应组分	单次反应所需加液体积
1× Click-iT EdU 反应缓冲液	875 μ L
CuSO ₄ (组分 D)	20 μ L
YF® 488/555/594/647A Azide (组分 B)	5 μ L
1× Click-iT EdU 缓冲液添加物	100 μ L
总体积	1 mL



- (5) 每管加入 1 mL Click-iT 工作液，混匀。
- (6) 室温避光孵育 30 min。
- (7) 1% BSA 洗涤细胞 1 次，收集细胞，用 1 mL 1 % BSA 再次重悬细胞（重悬细胞的溶液体积可根据细胞的数量加以调整），流式细胞仪检测。

注：如需进行其他标志物检测可参考步骤 4。

4. 细胞内抗原标记（可选步骤）

- (1) 加入抗体工作液，混匀。
- (2) 避光条件下，以合适的温度及时间孵育抗体。

5. DNA 含量计算（可选步骤）

- (1) 如有需要，可加入适量 RNase 至每管，混匀。
- (2) 每管加入适量 DNA 染色液，避光孵育 10-15 min。
- (3) 上机待检。

附录：

附表 1. EdU 培养基及染色反应液的参考使用量

	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	150 μ L	200 μ L	500 μ L	1 mL	2 mL
染色反应液	100 μ L	150 μ L	200 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 培养基和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。

附表 2. EdU 的参考孵育时间

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

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 2 h 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。

附表 3. 文献中 EdU 孵育浓度及时间

PubMed ID	Reference	Cell Line	Concentration	Time
18272492	Salic A, <i>et al.</i> PNAS.2008	NIH3T3, Hela	10 nM~10 μ M	1 h
18521918	Cappella P, <i>et al.</i> Cytometry A.2008	HL-60, A2780, U2OS	1~10 μ M	0.5 h
18996411	Chehehasa F, <i>et al.</i> Neurosci Methods.2009	Neurospheres	1~20 μ M	24 h
19179371	Limsirichaikul S, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res.2009	Primary fibroblasts	10 μ M	1,2,4 h
19253396	Warren M, <i>et al.</i> Dev Dyn.2009	Chick embryos	10 μ M~2 mM	4 h
19647746	Yu Y, <i>et al.</i> J Immunol Methods.2009	Spleen cells	50 μ M	24 h
19544417	Momcilovic O, <i>et al.</i> Stem Cells.2009	Human ES cells	10 μ M	0.5 h
20080700	Cinquin O, <i>et al.</i> PNAS.2010	emb-30	1 μ M	12 h
20025889	Han W, <i>et al.</i> Life Sci.2009	VSMC	50 μ M	2 h
20659708	Huang C, <i>et al.</i> J Genet Genomics.2010	ESC	50 μ M	2 h
21310713	Hua H, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res.2011	Fission yeast strains	10 μ M	3 h



20824490	Lv L, <i>et al.</i> Mol Cell Biochem.2011	EJ cells	50 μ M	4 h
21248284	Yang S, <i>et al.</i> Biol Reprod.2011	GC cells	50 μ M	2 h
21227924	Zhang YW, <i>et al.</i> Nucleic Acids Res.2011	U2OS, HT29	30 μ M	1.5 h
21829621	Guo T, <i>et al.</i> PloS One. 2011	HIT-T15	50 μ M	4 h
21980430	Zeng T, <i>et al.</i> PloS One. 2011	MCF-10A	25 μ M	2 h
22012572	Ding D, <i>et al.</i> Int Orthop.2011	C3H10T1/2	10 μ M	24 h
22000787	Zeng W, <i>et al.</i> Biomaterials.2011	EPC	50 μ M	4 h
21913215	Xue Z, <i>et al.</i> J Cell Biochem.2011	SGC7901	25 μ M	24 h
22016038	Peng F, <i>et al.</i> Lasera Med Sci.2011	MSC	50 μ M	2 h
21878637	Li D, <i>et al.</i> J Biol Chem.2011	HCC	50 μ M	2 h

