

EdU apollo 567in vitro kit EdU 细胞增殖检测试剂盒（成像检测）

货号：D100752

规格：100T

保存：2-8°C保存（荧光试剂请避光保存），勿冻存，有效期1年。

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) 渗入正在复制的 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准确地反映 DNA 复制活性。

本试剂盒适用于体外培养细胞的增值成像检测。按本说明书的标准实验方法使用 96 孔细胞培养板进行细胞增殖成像检测实验，足够进行 100 个孔的细胞增殖检测。本试剂盒亦适用于流式细胞术检测，按本说明书推荐的 6 孔细胞培养板进行实验，足够进行 20 个样本的流式细胞术细胞增殖检测。

产品组成：

试剂	浓度	规格
EdU 溶液 (试剂 A)	1000×	20 μ L
Apollo 反应缓冲液 (试剂 B)	20×	500 μ L
Apollo 催化剂溶液 (试剂 C)	100×	100 μ L
Apollo 567 荧光染料溶液 (试剂 D)	300×	30 μ L
Apollo 缓冲添加剂 (试剂 E)	粉末	100 mg
Hoechst 33342 (试剂 F)	100×	150 μ L

实验准备：

- 1 \times 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

操作步骤（仅供参考）：

荧光成像检测方法（以 96 孔板，贴壁细胞为例）

1. 细胞培养

取对数生长期细胞，以每孔 4×10^3 - 1×10^5 个细胞(可根据细胞大小，生长速度及实验处理的具体要求调整细胞数目和密度)接种于 96 孔板中，培养至正常生长阶段。

2. 药物处理

(可选) 根据实验需要进行各种药物处理。

3. EdU 标记

- 1) 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： a. 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)；

b. 如果需配置 10 μ M EdU 培养基，需调整为 5000: 1 稀释比例；

c. 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。

- 2) 每孔加入 100 μ L 50 μ M EdU 培养基孵育 2 小时，弃培养基；

注： a. 最佳孵育时间与细胞周期相关 (表 2)，大多数肿瘤细胞系均可采用 2 小时孵育时间；

b. EdU 培养基用量以没过细胞为宜，但需保证 EdU 孵育时间内的营养物质持续供给（表 1）；

3) PBS 清洗细胞 1-2 次，每次 5 分钟。

注：清洗目的是将未渗入 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。

4. 细胞固定化

1) 每孔加入 50 μ L 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：低浓度的多聚甲醛有利于细胞结构的保持，也可采用其他方式进行细胞固定。

2) 每孔加入 50 μ L 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；

3) 每孔加入 100 μ L PBS，脱色摇床清洗 5 分钟，弃 PBS；

4) 每孔加入 100 μ L 渗透剂(0.5%TritonX-100 的 PBS)脱色摇床孵 10 分钟；PBS 清洗 1 次，5 分钟。

注：必要时可延长通透时间以增强细胞膜通透性。

5. Apollo 染色

1) 每孔加入 100 μ L 的 1 \times 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：a. 染色液用量与细胞量相关，以覆盖细胞为宜（表 1）；

b. 孵育时间可以进行适当调整，调整范围为 10-30 分钟。

2) 加入 100 μ L 渗透剂(0.5% Triton X-100 的 PBS) 脱色摇床清洗 2-3 次，每次 10 分钟，弃渗透剂；

3) （可选）每孔每次加入 100 μ L 甲醇清洗 1-2 次，每次 5 分钟；PBS 清洗 1 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。

6. 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。

注：染料兼容性请参照表 4

7. DNA 染色

1) 用去离子水按 100: 1 的比例稀释试剂 F，制备适量 1 \times Hoechst33342 反应液，避光保存；

2) 每孔加入 100 μ L 1 \times Hoechst 33342 反应液，避光、室温、脱色摇床孵育 30 分钟，弃染色反应液；

3) 每孔每次加入 100 μ L PBS 清洗 1-3 次；

4) 客户可选择进行其他染色步骤，否则每孔加入 100 μ L PBS 保存待用。

8. 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 避光保存以提高保存效果。

流式细胞术检测方法（以 6 孔板，悬浮细胞为例）

1. 细胞培养

取每孔 1×10^5 - 3×10^6 个细胞(可根据细胞大小，生长速度及实验处理的具体要求调整细胞数目和密度)接种于 6 孔板中，培养至正常生长阶段。

2. 药物处理

（可选）根据实验需要进行各种药物处理。

3. EdU 标记

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色背景分析；

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：a. 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)；

b. 如果需配置 10 μ M EdU 培养基，需调整为 5000: 1 稀释比例；

c. 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。

3) 细胞培养基更换为 EdU 培养基，每孔加入 1mL，孵育 2 小时；

注：a. 最佳孵育时间与细胞周期相关（表 2），大多数肿瘤细胞系均可采用 2 小时孵育时间；

b. EdU 培养基用量以没过细胞为宜，但需保证 EdU 孵育时间内的营养物质持续供给（表 1）；

4. 细胞收集

- 1) 将细胞收集至流式管中，350×g 离心 5 分钟，用枪头吸弃上清；
 注：a. 如贴壁细胞，请先消化收集；
 b. 离心力可按特定细胞培养经验进行设置。
- 2) 用 1mLPBS 重悬细胞，350×g 离心 5 分钟，用枪头吸弃上清；
- 3) 每管加入 1 mL 4%多聚甲醛固定 15~30 分钟后，600 ×g 离心 10 分钟，用枪头吸弃上清；
 注：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。
- 4) 每管加入 2~3mL 2mg/mL 甘氨酸中和 5 分钟，600 ×g 离心 10 分钟吸弃上清，2mL PBS 清洗 1 次，600 ×g 离心 5 分钟吸弃上清；
- 5) 每管加入 1mL 0.5% TritonX-100 渗透剂室温孵育 10 分钟，600 ×g 离心 10 分钟吸弃上清，2mLPBS 清洗 1 次吸弃上清。
 注：通透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通透后的离心条件。

5. Apollo 染色

- 1) 每管加入 100~500uL 的 1×Apollo 染色反应液(表 3)，充分重悬细胞，避光、室温孵育 10 分钟后，600×g 离心 10 分钟，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。

- 2) 每管加入 3mL 0.5% TritonX-100 渗透剂室温清洗 1~3 次，600×g 离心 10 分钟，吸弃上清，500μL PBS 重悬。

6. 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，根据使用的染料选择合适的通道检测，必要时进行相关的染料兼容性测试。

注：染料兼容性请参照表 4

7. 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°C 湿润保存待测,但不应超过 3 天。
- 2) 如有需要可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 复染再检测。
- 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。对于细胞得率过少的情况，可能不利于做流式图，对此可适当减少步骤 5.2 中的清洗次数。

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) *表示贴壁细胞常用的培养容器，EdU 培养基及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) *表示通常配置的 Apollo 反应液的体积；
 2)按顺序配制适量 1 \times 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 $\pm 20\%$ 。
 4) 试剂 E 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

荧光染料	最大激发波长	最大发射波长	类似光谱性质染料
Apollo 567	550nm	565nm	Cy3
Apollo 643	653nm	667nm	Cy5
Apollo 488	490nm	520nm	FAM
Hoechst 33342	350nm	461nm	DAPI

注：请根据荧光染料的光谱信息选择合适的通道进行检测，常规荧光显微镜通常搭配了适合检测 Apollo 488 及 Apollo 567 的通道，其他仪器请在使用前确认仪器配置的检测通道情况。

FAQ

1.什么样的信号才是真正的 EdU 阳性信号？

- 1) Apollo 染色信号与核酸染色信号（Hoechst 33342 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。
- 3) 对于流式细胞术检测，则是通过设置阴性对照样品（不做 EdU 处理但同时进行 Apollo 染色），高于阴性对照样品信号强度的为阳性信号。

2.整个细胞都有 EdU 信号，或背景信号很强是什么情况？

- 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) 没有阳性信号曝光过度导致背景严重。

3.没有阳性信号是什么原因？

- 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) EdU 处理时细胞已经长得过满而产生接触抑制等情况使得细胞没有发生增殖。
- 3) 实验时如果未使用完全培养基配制 EdU 培养基而是使用无血清培养基配制 EdU 培养基，可能会使细胞同步化在 G0/G1 期而导致没有阳性信号或阳性信号很少。
- 4) 染色过程干片等因素导致未染上信号。
- 5) 对于阴性结果，可设置阳性对照（常见肿瘤细胞株如 A549、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阳性信号，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 抗体进行复染以检测 GFP。

5.悬浮细胞是否可以使用成像检测？

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。