



## EdU apollo 643in vitro kit

货号: CA1171

规格: 100T

保存: 4°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检测。贴壁细胞宜采用荧光检测方式, 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。

### 产品组成:

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

### 实验准备:

1. 1× PBS (pH 7.2~7.6)
2. 渗透剂 (含 0.5% Triton X-100 的 PBS)
3. 甘氨酸溶液 (2 mg/mL) (去离子水配置)
4. 细胞固定液 (含 4%多聚甲醛的 PBS)
5. 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。

## 操作步骤（仅供参考）：

### 荧光显微镜检测方法（以 96 孔板，A549 贴壁细胞为例）

#### 1. 细胞培养

取对数生长期细胞，以每孔  $4 \times 10^3$ - $1 \times 10^5$  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 $\mu$ 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 $\mu$ M)，长时间孵育 (>24h) 宜采用低浓度 (1-10 $\mu$ M)；

b. 如果需配置 10  $\mu$ 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 $\mu$ L 50 $\mu$ 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 和表 5），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  $\mu$ 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：a.低浓度的多聚甲醛有利于细胞结构的保持；b.可采用其他方式进行细胞固定。

2) 每孔加入 50  $\mu$ 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  $\mu$ L PBS，脱色摇床清洗 5 分钟，弃 PBS；

4) 每孔加入 100 $\mu$ 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：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。

#### 5. Apollo 染色

1) 每孔加入 100 $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

## 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×Hoechst33342 反应液，避光保存；
- 2) 每孔加入 100 μL 1×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 μL 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 μL 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°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°C 保存及进行检测。

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

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：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。

## 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。

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值速度进行调整，若细胞增值速度慢，需要采用长时间的 EdU 处理时间，

2) 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 小时或者 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。

3) 染色过程干片等因素，导致未染上信号。

4. 细胞中表达 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。