

EdU Apollo488 in vitro kit

货号：CA1172

规格：100 T

保存：2-8℃，避光保存，有效期1年。

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

产品说明：

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值能力。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（Apollo488: Ex=490nm, Em=520nm）。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。

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、EdU标记





1.1. 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: 1) 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 (1-10 μ M);

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

3) 配置好的培养基建议现配现用。

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

注: 1) 最佳孵育时间与细胞周期相关 (附表), 大多数肿瘤细胞系均可采用 2 小时孵育时间;

2) EdU 培养基用量以没过细胞为宜, 但需要保证 EdU 孵育时间内的营养物质持续供给;

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。

2、细胞固定化

2.1. 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: 1) 低浓度的多聚甲醛有利于细胞结构的保持,

2) 可采用其他方式进行细胞固定。

2.2. 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: 目的是中和多聚甲醛, 保证染色反应体系;

当采用其他方式进行细胞固定时可酌情省略此步骤;

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

2.4. 每孔加入 100 μ L 渗透剂 (0.5% TritonX-100 的 PBS) 脱色摇床孵育 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。

3、Apollo 染色

3.1. 每孔加入 100 μ L 的 1 $\times$ Apollo 染色反应液, 避光、室温、脱色摇床孵育 30 分钟后, 弃染色反应液;

注: 1) 染色液用量与细胞量相关, 以覆盖细胞为宜;

2) 孵育时间可以进行适当调整, 调整范围为 10-30 分钟。

3.2. 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;

3.3. (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, 每次 5 分钟。

注: 由于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。

4、DNA 染色

4.1. 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;

4.2. 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 分钟后, 弃染色反应液;

4.3. 每孔每次加入 100 μ L PBS 清洗 1-3 次;

4.4. 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。



建议染色完成后立即进行观测；如果条件限制，请避光 4℃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℃保存及进行检测。

实验参考

表1 EdU孵育时间设定参考

细胞系	人胚胎细胞	酵母细胞	人成纤维细胞	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2 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 μ L	200 μ L	300 μ L	500 μ L	1 mL	2 mL
染色反应液	100 μ L	200 μ L	300 μ L	500 μ L	1 mL	2 mL

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) 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)；

2) 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 $\pm 20\%$ 。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。

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, 导致染料粘附严重

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, 建议使用 GFP 抗体进行复染间接检测 GFP。

