EdU apollo 567in vitro kit EdU细胞增殖检测试剂盒

（成像检测）

产品货号: BA1987

产品规格: 100T

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。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:

产品名称	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)	粉剂	100mg
Hoechst 33342 (试剂F)	100×	150μL

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(2mg/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50μM EdU培养基；

1）EdU浓度与孵育时间相关，短时间孵育（<2h）宜采用高浓度（10-50μM），长时间孵育（>24h）宜采用低浓度（1-10μM）；

2）如果需配置10μM 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100μL 50μM EdU培养基孵育2小时，弃培养基；
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50μL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；
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50μL 2mg/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100μL PBS，脱色摇床清洗5分钟，弃PBS；
2.4 每孔加入100μL 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100μL的1×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；
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100μL渗透剂(0.5% TritonX-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100μL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×Hoechst33342反应液，避光保存；
4.2 每孔加入100μL 1×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100μL 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100μL 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	5.5cm小皿
EdU培养基	100μL	200μL	300μL	500μL	1mL	2mL

染色反应液	100μL	200μL	300μL	500μL	1mL	2mL

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	1mL	5mL	10mL
1	去离子水	469μL	938μL	4.69mL	9.38mL
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)	5mg	9mg	44mg	88mg

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±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。

保存条件：室温运输，2-8℃储存，勿冻存，荧光试剂请避光保存，可稳定储存一年。

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，建议可以使用 GFP 抗体进行复染医间接检测 GFP。