

EdU Apollo488 in vitro kit

货号: CA1172

规格: 100 T

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

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

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。

技术参数:

Apollo488: 最大激发波长 (Ex): 490nm; 最大发射波长 (Em): 520nm

Hoechst 33342: 最大激发波长 (Ex): 350nm; 最大发射波长 (Em): 461nm

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°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 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 \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)；

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，建议可以使用 GFP 抗体进行复染间接检测 GFP。