

BeyoClick™ EdU细胞增殖检测试剂盒(TMB法)

产品编号	产品名称	包装
C0088S	BeyoClick™ EdU细胞增殖检测试剂盒(TMB法)	500次
C0088L	BeyoClick™ EdU细胞增殖检测试剂盒(TMB法)	2000次

产品简介:

- BeyoClick™ EdU细胞增殖检测试剂盒(TMB法)(BeyoClick™ EdU Cell Proliferation Kit with TMB), 是一种基于DNA合成过程中胸腺嘧啶脱氧核苷(thymidine)类似物EdU(5-ethynyl-2'-deoxyuridine)的掺入, 并通过随后的点击反应(Click reaction)使EdU被生物素(Biotin)所标记, 然后加入的辣根过氧化物酶标记链霉亲和素(HRP-Streptavidin)与生物素结合, 最后通过TMB显色, 从而实现简单、快速、高灵敏地在96孔板等多孔板中定量检测细胞增殖的试剂盒。
- 本试剂盒适合定量检测培养的细胞或组织样品的增殖水平。通常不推荐使用本试剂盒检测组织切片样品, 尽管在提前进行EdU掺入的情况下, 也是可以在多孔板中对于相同厚度和相同面积的组织切片样品进行定量检测的。
- 细胞增殖能力的检测是评估细胞活性、基因毒性和抗肿瘤药物效果等的基本方法。公认的最精确的检测细胞增殖的方法是直接检测细胞中DNA的合成。最初广泛使用的通过检测DNA合成来检测细胞增殖的方法是放射性标记核苷掺入法, 如氚标记胸腺嘧啶脱氧核苷($[^3\text{H}]$ thymidine)掺入法。但该方法由于有放射性污染并且很难实现单细胞检测而受到很大的限制, 随后逐渐被基于抗体检测的BrdU(bromo-deoxyuridine)法所替代。BrdU法步骤繁多, 且需要使用BrdU抗体, 影响因素较多, 稳定性比较差。并且由于BrdU法需要使用抗体, 有时会和其它目的蛋白基于抗体的检测相互产生干扰。EdU法基于EdU掺入和后续的点击反应, 无需使用抗体、操作便捷、检测灵敏度高, 是一种在BrdU法基础上升级换代的新方法, 将会逐步取代BrdU法。
- MTT法(C0009)、WST-1法(C0035、C0036)、CCK-8法(C0037、C0038、C0039、C0040、C0041、C0042、C0043、C0046)和CellTiter-Lumi™化学发光法(C0065、C0068)都是基于细胞活性的细胞增殖检测方法, 能检测到细胞的总体增殖效果, 但无法检测到单个的增殖细胞。这几种方法尽管都不是检测DNA合成的, 但被广泛用于替代 $[^3\text{H}]$ thymidine掺入法。CFDA SE法(C0051、C1031)基于细胞荧光示踪的原理能检测到单个的增殖细胞, 但由于每增殖一次荧光减弱一半, 在荧光显微镜下较难区分荧光减弱一半的细胞, 检测灵敏度不是很高, 通常仅适用于流式细胞仪检测。在进行科学研究时, 上述这些基于细胞活性或CFDA SE的方法可以作为EdU法的补充性检测方法。
- EdU(5-ethynyl-2'-deoxyuridine), 中文名为5-乙炔基-2'-脱氧尿苷, 是一种新型胸苷(胸腺嘧啶脱氧核苷, thymidine)类似物, EdU可以在DNA合成过程中替代胸苷掺入到新合成的DNA中。另一方面, EdU上的乙炔基能与生物素标记的叠氮化物(Biotin labeled azide)通过一价铜离子的催化发生共价反应, 形成稳定的三唑环, 该反应非常迅速, 被称作点击反应(Click reaction), 其反应原理参见图1。通过点击反应, 新合成的DNA会被相应的生物素探针所标记, 从而可以使用适当的检测设备检测到增殖的细胞。

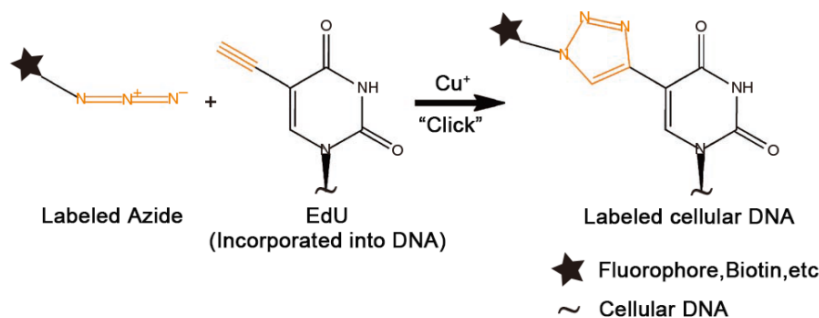


图1. BeyoClick™ EdU检测法中的点击反应(Click reaction)原理图。生物素或荧光探针等标记的叠氮化物(Labeled Azide)与掺入到细胞DNA中的EdU, 在铜离子的催化发生共价反应, 形成稳定的三唑环, 最终使细胞DNA标记上生物素等探针。

- **本试剂盒反应简单、检测灵敏度高。**本试剂盒基于简单高效的点击反应, 无需DNA变性, 只需少量的小分子叠氮化物探针即可非常有效地标记出掺入的EdU, 并且可以检测到单个细胞的增殖情况。
- **本试剂盒使用便捷、兼容性好。**本试剂盒只需常用的多聚甲醛固定和Triton X-100穿透, 就可以使叠氮化物探针有效进入细胞并发生点击反应, 不会影响细胞形态, 不会影响基于抗体的免疫荧光和免疫组化检测, 也不会影响DNA的荧光染色(如PI染色检测细胞周期、DAPI或Hoechst染料检测细胞核)。而BrdU法为了使大分子的BrdU抗体进入细胞并与DNA上的BrdU结合, 需要对双链DNA进行变性处理(如酸变性、热变性或者DNase消化等), 这种变性可能会影响细胞形态, 影响后续的免疫荧光和免疫组化检测、DNA的荧光染色等。BrdU法和BeyoClick™ EdU法检测原理的比较参见图2。

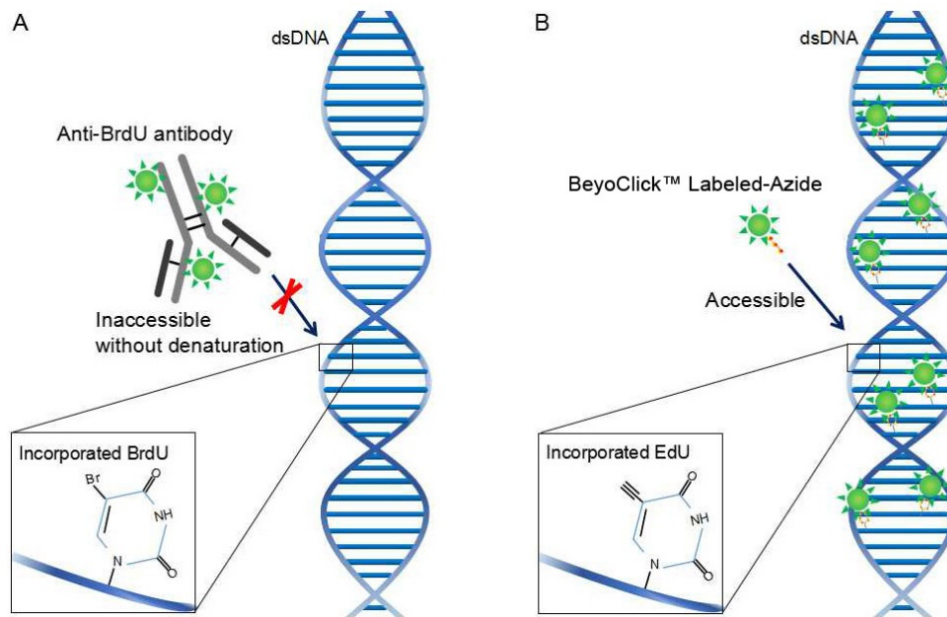


图2. BrdU法和BeyoClick™ EdU法检测原理的比较。A. BrdU法需使用大分子的BrdU抗体，由于空间位阻，双链DNA须变性后才能使BrdU抗体与BrdU结合。B. EdU法使用小分子标记的叠氮化物(Azide)，无需DNA变性，操作更便捷，兼容性好，检测结果更加稳定可靠。

- **本试剂盒检测快速。**相对于BrdU法，本试剂盒采用BeyoClick™ EdU法检测新合成的DNA，所需时间显著缩短。
- 使用本试剂盒最终TMB显色时，增殖的细胞会产生可溶性蓝色产物，该蓝色产物通常可以在370nm或620-650nm测定吸光度；也可以加入2M H₂SO₄终止上述反应，同时使溶液呈黄色，此时可以在450nm测定吸光度。使用本试剂盒的检测效果的示例请参考图3。

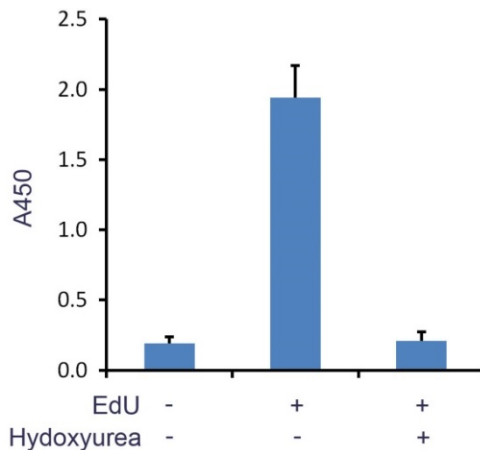


图3. HeLa细胞使用本试剂盒检测细胞增殖的效果图。无EdU组(阴性对照组)呈现较低的吸光度；EdU (10μM)组(阳性组)吸光度较高；而用DNA合成抑制剂Hydroxyurea (10mM)提前预处理0.5小时(抑制剂组)后，吸光值显著降低，几乎和阴性对照组一致，说明DNA合成被抑制后，EdU的掺入被显著抑制。

- 碧云天各种细胞增殖和细胞毒性检测试剂盒的比较和选择，请参考<http://www.beyotime.com/support/cell-proliferation.htm>。
- 本试剂盒小包装C0088S如果用于96孔板检测，可以检测500个样品，每个样品的检测体系为50μl的Click反应液；如果用于384孔板样品的检测，可以检测1250个样品，每个样品推荐的Click反应液用量为20μl。其它多孔板可以检测的样品数和每个样品所需的反应液用量以此类推。大包装C0088L可检测样品的数量为小包装C0088S的4倍。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
C0088S-1	EdU (10mM)	200μl
C0088S-2	Biotin Azide	55μl
C0088S-3	Click Reaction Buffer	30ml
C0088S-4	CuSO ₄	0.6ml
C0088S-5	Click Additive	2管
C0088S-6	Streptavidin-HRP	220μl
C0088S-7	Streptavidin-HRP稀释液	10ml

C0088S-8	TMB显色液	50ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C0088L-1	EdU (10mM)	800μl
C0088L-2	Biotin Azide	220μl
C0088L-3	Click Reaction Buffer	120ml
C0088L-4	CuSO ₄	2.4ml
C0088L-5	Click Additive	1瓶
C0088L-6	Streptavidin-HRP	900μl
C0088L-7	Streptavidin-HRP稀释液	40ml
C0088L-8	TMB显色液	200ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。Biotin Azide、TMB显色液须避光保存。

注意事项：

- Click Additive配制成溶液后请注意适当分装。如果溶解后有白色物质析出，请上下颠倒多次，待全部溶解后使用。如果该溶液颜色变成棕色，说明该组分的有效成分已失效，请弃用。
- TMB对人体有刺激性，操作时请小心，并注意适当防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 如果需要使用羟基脲(Hydroxyurea)作为对照，可以从碧云天订购(S1961 Hydroxyurea)。
- 如果用于动物实验需要更多EdU，也可以从碧云天订购(ST067 EdU)。
- 由于本产品需要铜离子催化进行点击反应，请注意如下的兼容性问题及解决方案。本产品完全兼容有机类染料如Alexa Fluor®系列普通染料及fluorescein (FITC)、Allophycocyanin (APC)及APCE-tandems染料；对于Qdot®纳米晶体探针、Horseradish peroxidase (HRP)、R-phycoerythrin (R-PE)和R-PE-tandems染料如Alexa Fluor® 680-R-PE等，需要在点击反应完成后进行反应和检测；本产品会影响GFP、RFP、mCherry等荧光蛋白的荧光，对于荧光类蛋白如Green Fluorescent Protein (GFP)、TC-FIAsH™和TC-ReAsH™类试剂，需要在点击反应前进行反应和检测。由于Phalloidin (鬼笔环肽)不兼容点击反应，推荐使用Tubulin-Tracker Red (C1050)进行细胞微管的检测。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 需要用户自己准备的耗材和试剂

- a. 碧云天的PBS C0221A，或PBS (pH7.2-7.6)。
- b. 固定液(碧云天的免疫染色固定液P0098，或4%的多聚甲醛P0099)。
- c. 洗涤液(碧云天的免疫染色洗涤液P0106、P0106C或P0106L，或PBS)。
- d. 通透液(碧云天的免疫染色强力通透液P0097，免疫染色洗涤液P0106，或含0.3% Triton X-100的PBS)。
- e. 内源性过氧化物酶封闭液(碧云天的内源性过氧化物酶封闭液P0100A，或PBS配制的0.3%过氧化氢溶液)。
- f. 去离子水或超纯水。
- g. 根据实验要求：96孔板或其它多孔板。

2. 检测体系的准备

- a. 如下以96孔板检测体系为例，如果使用384孔板等孔板，检测体系可以相应按比例调整。
- b. 如果检测的是悬浮细胞，请按常规的悬浮细胞的操作方式进行。例如和贴壁细胞相比，相关步骤需要增加离心步骤等。

3. 培养细胞的EdU标记及固定、洗涤和通透

- a. 在96孔板中培养适当数量的细胞。细胞培养过夜并且恢复到正常状态后，进行所需的药物处理或者其它刺激处理等。
- b. 配制2X的EdU工作液：推荐的EdU终浓度为10μM (1X)，用细胞培养液1:500稀释EdU (10mM)即可得到2X的EdU工作液(20μM)。

注意：对于A549、HeLa和NIH/3T3等贴壁细胞，推荐EdU的使用终浓度为10μM。但细胞类型、培养液种类、细胞密度、细胞增殖速度等多方面的因素会影响EdU掺入到细胞中的量，因此初次使用时建议对EdU的使用浓度进行一定的摸索。如果之前使用过BrdU进行实验，则可以参考BrdU的终浓度作为EdU的终浓度。

- c. 将37°C预热的2X的EdU工作液(20μM)，与培养液等体积加入96孔板中，使96孔板中的EdU终浓度变为1X。例如设计终浓度为10μM，原先96孔板中的培养基为0.1ml，则将0.1ml 2X的EdU工作液(20μM)加入到孔板中。如果培养基体积过大，可以先吸除适量的培养液，再加入等体积的2X的EdU工作液；或者可以减少工作液的体积并增加EdU的浓度，使最终培养液中的EdU浓度为10μM，例如0.2ml培养液中加入22微升0.1mM EdU。更换所有的培养液可能会对细胞的增殖有影响，因此不建议替换所有的培养液。

- d. 继续孵育细胞2小时。该孵育时间的长短取决于细胞生长速率，通常宜继续孵育细胞周期10%左右的时间。对于常见的哺乳动物细胞如HeLa、3T3、HEK293等，细胞周期大约在18-25小时，孵育时间宜在2小时左右。人胚胎细胞的细胞周期约30分钟，推荐的孵育时间为5分钟；酵母细胞的细胞周期约3小时，推荐的孵育时间为20分钟，增殖的神经细胞其细胞周期约5天，推荐的孵育时间为1天。孵育时间小于45分钟时，建议提高EdU的浓度；孵育时间大于20小时时，建议适当降低EdU的浓度。
- e. EdU标记细胞完成后，去除培养液，并加入0.1-0.2ml固定液(可以使用碧云天的免疫染色固定液P0098，或4%的多聚甲醛P0099)，室温固定15分钟。
- f. 去除固定液，每孔用0.1-0.2ml 洗涤液洗涤细胞3次，每次3-5分钟。
- g. 去除洗涤液，每孔用0.1-0.2ml通透液(可以使用碧云天的免疫染色强力通透液P0097，免疫染色洗涤液P0106，或含0.3% Triton X-100的PBS)，室温孵育10-15分钟。
- h. 去除通透液，每孔用0.1-0.2ml 洗涤液洗涤细胞1-2次，每次3-5分钟。
- i. 再用内源性过氧化物酶封闭液室温孵育20分钟，以灭活切片内源的过氧化物酶。随后用洗涤液洗涤3次，每次2分钟。
- j. 转步骤4。

4. EdU检测

注意：本步骤96孔板中每孔的反应体系为50 μ l的反应混合物。对于384孔板，每孔的反应的体系为20 μ l的反应混合物。对于较小的孔，单位培养面积的液体用量已经适当增加，可以有效避免液体蒸发可能带来的负面影响。

- a. 配制Click Additive Solution：对于C0088S，用1.3ml去离子水溶解一管Click Additive，混匀至全部溶解，即为Click Additive Solution；对于C0088L，加入10.4ml去离子水溶解试剂盒中提供的一瓶Click Additive，混匀至全部溶解，即为Click Additive Solution。配制后可以适当分装，并-20 $^{\circ}$ C保存。
- b. 参考下表配制Click反应液。注意：请严格按照下表中组分顺序和体积配制Click反应液，否则点击反应可能无法有效进行；同时，Click反应液须在配制后15分钟内使用。

组分	96孔板样品数						
	10	20	40	50	100	250	500
Click Reaction Buffer	440 μ l	880 μ l	1.8ml	2.2ml	4.4ml	11ml	22ml
CuSO ₄	10 μ l	20 μ l	40 μ l	50 μ l	100 μ l	250 μ l	500 μ l
Biotin Azide	1 μ l	2 μ l	4 μ l	5 μ l	10 μ l	25 μ l	50 μ l
Click Additive Solution	50 μ l	100 μ l	200 μ l	250 μ l	500 μ l	1.25ml	2.5ml
总体积	500 μ l	1ml	2ml	2.5ml	5ml	12.5ml	25ml

- c. 去除上一步骤中的洗涤液。
- d. 每孔加入50 μ l Click反应液，轻轻摇晃培养板以确保反应混合物可以均匀覆盖样品。
- e. 室温避光孵育30分钟。孵育时需注意在多孔板的空隙中加水，以尽量减少反应液的蒸发。
- f. 吸除Click反应液，用洗涤液洗涤3次，每次3-5分钟。

5. Streptavidin-HRP工作液的配制：

- a. Streptavidin-HRP工作液的配制：

参考下表配制适量的Streptavidin-HRP工作液，须充分混匀。注意：配制好的Streptavidin-HRP工作液必须一次使用完毕，不宜冻存。

组分	96孔板样品数						
	10	20	40	50	100	250	500
Streptavidin-HRP	4 μ l	8 μ l	16 μ l	20 μ l	40 μ l	100 μ l	200 μ l
Streptavidin-HRP稀释液	196 μ l	392 μ l	784 μ l	980 μ l	1.96ml	4.9ml	9.8ml
Streptavidin-HRP工作液	200 μ l	400 μ l	800 μ l	1ml	2ml	5ml	10ml

6. 样品的显色：

- a. 在样品上加20 μ l Streptavidin-HRP工作液，室温孵育30分钟。
注：Streptavidin-HRP工作液的用量以完全覆盖样品为准。孵育时需注意在多孔板的空隙中加水来保持湿润，以尽量减少Streptavidin-HRP工作液的蒸发。
- b. 用洗涤液洗涤3次，每次2分钟。
- c. 加入0.1ml TMB显色液，室温孵育5-30分钟或根据显色情况孵育适当时间。
注：如果显色很强可以短于5分钟即停止显色，如果显色很弱，可以适当延长显色时间，甚至显色过夜。
- d. 直接在370nm或620-650nm测定吸光度。或加入25微升2M H₂SO₄终止反应，随后在450nm测定吸光度。

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0071S	BeyoClick™ EdU-488细胞增殖检测试剂盒	50-500次
C0071L	BeyoClick™ EdU-488细胞增殖检测试剂盒	200-2000次
C0075S	BeyoClick™ EdU-555细胞增殖检测试剂盒	50-500次

C0075L	BeyoClick™ EdU-555细胞增殖检测试剂盒	200-2000次
C0078S	BeyoClick™ EdU-594细胞增殖检测试剂盒	50-500次
C0078L	BeyoClick™ EdU-594细胞增殖检测试剂盒	200-2000次
C0081S	BeyoClick™ EdU-647细胞增殖检测试剂盒	50-500次
C0081L	BeyoClick™ EdU-647细胞增殖检测试剂盒	200-2000次
C0085S	BeyoClick™ EdU细胞增殖检测试剂盒(DAB法)	50-500次
C0085L	BeyoClick™ EdU细胞增殖检测试剂盒(DAB法)	200-2000次
C0088S	BeyoClick™ EdU细胞增殖检测试剂盒(TMB法)	500次
C0088L	BeyoClick™ EdU细胞增殖检测试剂盒(TMB法)	2000次
S1961-10mM	Hydroxyurea (DNA Synthesis抑制剂)	10mM×1ml
S1961-200mg	Hydroxyurea (DNA Synthesis抑制剂)	200mg
S1961-1g	Hydroxyurea (DNA Synthesis抑制剂)	1g
S1961-5g	Hydroxyurea (DNA Synthesis抑制剂)	5g
ST067-50mg	EdU	50mg
ST067-250mg	EdU	250mg
ST067-1g	EdU	1g

Version 2018.08.01