



## EDU 实验报告

### 一、实验器材及试剂

#### 1、实验器材

名称	厂家	型号
立式冷藏柜	海尔	SC-332
台式高速冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司	2-16R
超净工作台	苏净安泰	SW-CJ-1FD
CO <sub>2</sub> 细胞培养箱	Thermo	4131
电热恒温水浴锅	恩谊	HH-48

#### 2、主要实验试剂及耗材

耗材	厂家	货号
1.5 ml 离心管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-15-W
2 ml 研磨管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-20-W
10 $\mu$ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-10
100 $\mu$ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-100
200 $\mu$ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-200
1000 $\mu$ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-1000
5000 $\mu$ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-5000
T25	安徽科兔生物科技有限公司	KTP-25-T
胰酶	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-18
PBS 缓冲液	安徽科兔生物科技有限公司	RG-RT-01
DMEM 培养基	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-2
血清	安徽科兔生物科技有限公司	CG-SR-02
6 孔板	安徽科兔生物科技有限公司	KTB-6
EdU-594 细胞增殖检测试剂盒	碧云天	C0079S
12 孔板	安徽科兔生物科技有限公司	KTB-0296-4
Hoechst 33342	碧云天	C1022

## 二、EDU 实验步骤

1、在 6 孔板中(如有必要可以加入盖玻片)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。

2、配制 2X 的 EdU 工作液:由于 EdU 工作液是与培养液等体积加入到孔板中,所以需要配制成 2X 的工作液。推荐的 EdU 终浓度为 10 $\mu$ M (1X),用细胞培养液 1:500 稀释 EdU (10mM)即可得到 2X 的 EdU 工作液(20 $\mu$ M)。

注意:对于 A549、HeLa 和 NIH/3T3 等贴壁细胞,推荐 EdU 的使用终浓度为 10 $\mu$ M。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。

3、将 37 $^{\circ}$ C 预热的 2X 的 EdU 工作液(20 $\mu$ M),等体积加入 6 孔板中,使 6 孔板中的 EdU 终浓度变为 1X。例如设计终浓度为 10 $\mu$ M,原先 6 孔板中的培养基为 1ml,则将 1ml 2X 的 EdU 工作液(20 $\mu$ M)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 10 $\mu$ M,例如 2ml 培养液中加入 220 $\mu$ l 的 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。

4、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。

5、EdU 标记细胞完成后,去除培养液,并加入 1ml 固定液(可以使用碧云天的 P0098 免疫染色固定液,或 P0099 4%多聚甲醛固定液),室温固定 15 分钟。注:对于流式细胞仪检测,贴壁细胞胰酶消化后用培养液重悬后再固定。

6、去除固定液,每孔用 1ml 洗涤液洗涤细胞 3 次,每次 3-5 分钟。

7、去除洗涤液,每孔用 1ml 通透液(可以使用碧云天的 P0097 免疫染色强力通透液, P0106 免疫染色洗涤液,或含 0.3% Triton X-100 的 PBS),室温孵育 10-15 分钟。

8、去除通透液,每孔用 1ml 洗涤液洗涤细胞 1-2 次,每次 3-5 分钟。

i.EdU 检测。

注意：本步骤六孔板中每孔的反应体系为 500 $\mu$ l 的反应混合物。对于 12、24、48、96 和 384 孔板，每孔的反应的体系分别为 200 $\mu$ l、100 $\mu$ l、70 $\mu$ l、50 $\mu$ l 和 20 $\mu$ 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，以有效避免液体蒸发可能带来的负面影响。对于切片，可以根据切片大小，每个切片使用 100-200 $\mu$ l 的反应混合物。如下以六孔板中的细胞样品为例说明具体的操作方法，对于其它孔板或切片，仅每步溶液的用量按比例调整即可，其余方法相同。

9、配制 Click Additive Solution：对于 S 小包装，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 L 大包装，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。

10、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。

Components	Wells of 6-well plates						
	1	2	4	5	10	25	50
Click Reaction Buffer	430 $\mu$ l	860 $\mu$ l	1.72ml	2.15ml	4.3ml	10.75ml	21.5ml
Copper and Protectant	20 $\mu$ l	40 $\mu$ l	80 $\mu$ l	100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	500 $\mu$ l	1ml
Picolyl Azide 594	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l	4 $\mu$ l	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	25 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Click Additive Solution	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	250 $\mu$ l	500 $\mu$ l	1.25ml	2.5ml
Total Volume	500 $\mu$ l	1ml	2ml	2.5ml	5ml	12.5ml	25ml

11、去除上一步骤中的洗涤液。每孔加入 0.5ml 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。室温避光孵育 30 分钟。吸除 Click 反应液，用洗涤液洗涤 3 次，每次 3-5 分钟。

12、如果需要对细胞核进行染色，可以参照步骤 6 进行。如无其它的特殊需要，即可在荧光显微镜下观察，或者使用流式细胞仪、多功能酶标仪进行荧光检测，或者用高内涵筛选仪器(通常高内涵筛选需要使用染料对细胞核进行染色)进行检测。Picolyl Azide 594 的最大激发波长是 590nm，最大发射波长是 615nm。

13、细胞核染色。



为了检测细胞增殖的比例，可以考虑使用 Hoechst 33342 进行细胞核染色。通常高内涵筛选仪器也需要对细胞核进行染色。

14、1X Hoechst 33342 溶液的配制：按 1:1000 比例用 PBS 稀释 Hoechst 33342 (1000X)。

15、接上述步骤 5g，吸除洗涤液后，每孔加 1X Hoechst 33342 溶液 1ml，室温避光孵育 10 分钟，吸除 1X Hoechst 33342 溶液，用洗涤液洗涤 3 次，每次 3-5 分钟。

16、随后即可进行荧光检测。Hoechst 33342 为蓝色荧光，最大激发波长为 346nm，最大发射波长为 460nm。

### 三、结果判读：

EdU 实验中，EdU 阳性细胞比例越高，说明细胞 DNA 合成越活跃、增殖能力越强；EdU 阳性比例下降则提示细胞增殖受到抑制。

### 四、注意事项：

- 1、细胞状态要好
- 2、铺板密度要合适
- 3、EdU 显色反应和 DAPI/Hoechst 核染均应注意避光。染色后尽量减少强光照射，拍照前也不要长时间放在显微镜光源下。