

EDU 实验报告

一、实验材料

试剂名称	试剂厂家	试剂货号
青链霉素	合肥知恩生物	ZNCA-008
胰蛋白酶	合肥知恩生物	ZNCA-009
胎牛血清	合肥知恩生物	ZNCA-007
EDU 检测试剂盒	碧云天	C0071S
4%多聚甲醛	赛维尔	G1101

二、实验仪器

仪器名称	仪器厂家	仪器型号
超净工作台	苏州安泰	SW-CJ-2FD
显微镜	江南永新	XD202
CO2 培养箱	Thermo	3111
荧光显微镜	广州明美	MF52

三、实验方法

将细胞以 1×10^5 /孔接种于 24 孔板中,按实验方案进行转染或给药等处理后进行 EDU 检测,检测步骤参考碧云天试剂盒说明书。

EdU 染色操作说明:

- 1) 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 $10\mu\text{M}$ (1X),用细胞培养液 1:500 稀释 EdU (10mM) 即可得到 2X 的 EdU 工作液($20\mu\text{M}$)。
- 2) 将 37°C 预热的 2X 的 EdU 工作液($20\mu\text{M}$), 等体积加入 24 孔板中, 使 24 孔板中的 EdU 终浓度变为 1X。
- 3) 继续孵育细胞 2 小时。
- 4) EdU 标记细胞完成后, 去除培养液, 并加入 0.5ml 4% 的多聚甲醛, 室温固定 15 分钟。
- 5) 去除固定液, 每孔用 0.5ml PBS 洗涤细胞 3 次, 每次 3-5 分钟。
- 6) 去除洗涤液, 每孔加入通透液 (0.5ml 含 0.3% Triton X-100 的 PBS), 室温孵育 10-15 分钟。
- 7) 去除通透液, 每孔用 0.5ml PBS 洗涤细胞 1-2 次, 每次 3-5 分钟。
- 8) 参考下表配制 Click 反应液 (以 6 孔板为例, 24 孔板体积为 $200\mu\text{l}$ /孔)。

组分	6 孔板样品数						
	1	2	4	5	10	25	50
Click Reaction Buffer	430 μl	860 μl	1.72ml	2.15ml	4.3ml	10.75ml	21.5ml
CuSO ₄	20 μl	40 μl	80 μl	100 μl	200 μl	500 μl	1ml
Azide 488	1 μl	2 μl	4 μl	5 μl	10 μl	25 μl	50 μl
Click Additive Solution	50 μl	100 μl	200 μl	250 μl	500 μl	1.25ml	2.5ml
总体积	500 μl	1ml	2ml	2.5ml	5ml	12.5ml	25ml

- a. 去除上一步骤中的洗涤液。
 - b. 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。
 - c. 室温避光孵育 30 分钟。
 - d. 吸除 Click 反应液，用洗涤液洗涤 3 次，每次 3-5 分钟。
- 9) 细胞核染色：每孔加入 DAPI 溶液 300 μ l，室温避光孵育 10 分钟。用 PBS 洗涤 3 次，每次 3-5 分钟。
- 10) 拍照。