项目结题报告

项目名称：细胞增殖实验（EdU）

# 仪器与试剂

## 实验仪器

## 实验试剂

# 实验方法和分组

## 实验方法

实验原理：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上的乙炔基能与荧光标记的小分子叠氮化物探针(如Azide Alexa Fluor 488、Azide Alexa Fluor 555、Azide Alexa Fluor 594、Azide Alexa Fluor 647等)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)。通过点击反应，新合成的DNA会被相应的荧光探针所标记，从而可以使用适当的荧光检测设备检测到增殖的细胞。

具体步骤：

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：不同细胞类型、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。

3、将37ºC预热的2X的EdU工作液(20μM)，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10μM，原先6孔板中的培养基为1ml，则将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2ml培养液中加入220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。

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小时后，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(可以使用碧云天的免疫染色固定液P0098，或4%的多聚甲醛P0099)，室温固定15分钟。

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。

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。

9、去除洗涤液，每孔用1ml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。

## 实验分组

# 结果与讨论

## 数据平均值和标准差

## 显著性差异(t-test)

## 图表绘制

## 原始实验数据

《原始实验数据》文件夹内含有显微镜视野原始结果图。

## 实验结论