



## iClick™ EdU Andy Fluor™ 594 Imaging Kit

产品货号	包装规格
C036	250 次

储存条件：-20℃，避光保存。

激发/发射波长：Andy Fluor 594 azide: 590/615 nm; Hoechst 33342: 350/461 nm。

## 产品说明书

晶科德生物科技（武汉）有限公司

Jinkede Biotechnology(Wuhan) Co.,Ltd

邮编：430000

电话：400-662-6996

网址：[www.genecodex-bio.cn](http://www.genecodex-bio.cn)

## iClick™ EdU Andy Fluor™ 594 Imaging Kit

货号：C036

## 试剂盒组分

组分	试剂名称	包装	浓度	储存条件
C036A	EdU	2×1 ml	10 mM in DMSO	-20°C
C036B	Andy Fluor 594 azide	100 µl	NA	-20°C，避光保存
C036C	iClick EdU reaction buffer	50 ml	1×	4°C
C036D	CuSO <sub>4</sub>	1 ml	10 mM in H <sub>2</sub> O	4°C
C036E	iClick EdU buffer additive	200 mg	NA	4°C
C036F	Hoechst 33342	70 µl	5 mg/ml in H <sub>2</sub> O	4°C

注：按照推荐的储存条件保存有效期为 1 年，请注意避免反复冻融。

## 产品介绍

直接测定 DNA 合成是细胞增殖检测的最准确方法之一，是测定物质毒性、评估药物安全评价、细胞健康的基本方法，其中以前常用的方式是利用胸腺嘧啶核苷酸类似物-BrdU 进行检测。因为在细胞周期的 S 期，和细胞一起孵育的 BrdU 能掺入 DNA 分子中，再结合 BrdU 抗体与掺入 DNA 的 BrdU 特异性结合，就能够检测到 DNA 复制活跃的细胞。但 BrdU 有一大缺点，就是需要变性 DNA 后才能与抗体结合，但这就破坏了 DNA 双链结构，影响了其他染料的结合染色，导致染色弥散，准确性降低等问题。

iClick™ EdU Andy Fluor 594 细胞增殖（细胞成像）检测试剂盒采用 EdU 对细胞做标记用于细胞增殖检测。EdU (5-Ethynyl-2'- deoxyuridine) 是一种胸腺嘧啶核苷酸类似物，在细胞增殖时 EdU 能够掺入正在复制的 DNA 分子中，检测是基于一种点击化学 (Click Chemistry) 反应：铜催化的叠氮和炔的共轭结合。利用 EdU 与染料之间的点击化学反应可以进行高效快速的细胞增殖检测分析，可以有效地检测处于 S 期的细胞百分数。

与传统的免疫荧光染色 (BrdU) 检测方法相比，更简单，更快速，更准确。EdU 只有 BrdU 抗体大小的 1/500，在细胞内更容易扩散，不需要严格的样品变性（酸解、热解、酶解）处理，有效地避免了样品损伤，有助于在组织、器官的整体水平上观测细胞增殖的真实情况，具有更高的灵敏度和更快的检测速度。

## 注意事项

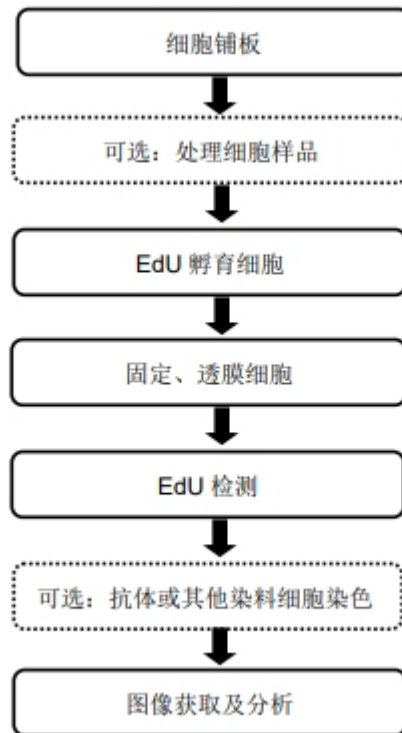
- 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 实验所需耗材（不包含在试剂盒中）

- 1×PBS (pH 7.2~7.6)

- 细胞固定液（含 3.7%甲醛的 PBS）
- 细胞透膜液（含 0.5% Triton® X-100 的 PBS）
- 含 3% BSA 的 PBS（pH 7.4）
- 去离子水
- 18×18 mm 盖玻片

### EdU 法细胞增殖（细胞成像）检测实验流程



## 实验步骤

### 1. EdU 标记

注意：EdU 标记的最佳浓度根据细胞类型而变化。建议使用 EdU 的起始浓度为 10  $\mu\text{M}$ 。细胞培养基，细胞浓度，细胞类型及其它因素都可能影响标记 EdU 标记效率。所以，在进行初始实验时，要先根据自身的细胞类型和实验条件，选用几组不同的 EdU 浓度来确定最佳的 EdU 浓度。

1.1 以合适的细胞浓度，将细胞铺到盖玻片上，将细胞培养过夜至正常生长阶段。

1.2 制备 2×EdU 工作液。用细胞培养基按一定比例稀释 EdU 溶液（组份 A）。建议使用 10  $\mu\text{M}$  EdU 初始浓度。

1.3 预热 2×EdU 工作液到 37°C，往含培养基的细胞中加入等体积的 2×EdU 工作液。例如实验选用 EdU 的终浓度为 10  $\mu\text{M}$ ，配置 20  $\mu\text{M}$  EdU 工作液并用 20  $\mu\text{M}$  EdU 工作液取代一半的细胞培养基。我们不建议去除所有的细胞培养基，然后加入 1×EdU 工作液。因为这样操作会影响细胞正常生长。

1.4 根据细胞类型孵育一段时间，最佳孵育时间与细胞周期相关，大多数肿瘤细胞可采用 2

小时孵育时间。不同细胞类型的孵育时间可参考如下表 1。

表 1 : EdU 孵育时间参考表

细胞类型	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	人神经细胞
细胞周期	~30 min	~3 h	~18 h	~21 h	~25 h	~5d
孵育时间	5 min	20 min	2 h	2 h	2 h	1d

## 2. 细胞固定、透膜处理

注意: 本实验操作采用含 3.7% 甲醛的 PBS 进行细胞固定, 含 0.5% Triton X-100 的 PBS 进行细胞透膜处理。但是, 其它的细胞固定及透膜方法比如甲醇、皂素等同样适用于本实验操作。

2.1 移除细胞培养液, 往含盖玻片的多孔板里每孔加入 1 ml 细胞固定液 (含 3.7% 甲醛的 PBS), 室温孵育 15 分钟。

2.2 移除细胞固定液, 每孔加入 1 ml 含 3% BSA 的 PBS 清洗细胞 5 分钟, 重复一次。

2.3 移除细胞清洗液, 每孔加入 1 ml 细胞透膜液 (含 0.5% Triton X-100 的 PBS), 室温孵育 20 分钟。

## 3. EdU 检测

注意: 本实验操作采用 100  $\mu$ l iClick 反应液体系, 也可按实际需求使用更大或更小体积的 iClick 反应液体系, 但须保证配置的反应液中各试剂组份保持同一个比例。3.1 配制 10 $\times$ iClick EdU 缓冲添加剂。取试剂盒组份 E, 加入 1ml 去离子水, 颠倒混匀直到溶质完全溶解。使用后建议储存剩余的缓冲添加剂于 -20 $^{\circ}$ C 或更低温度, 可以稳定保存至少 1 年以上。如果溶液变成棕黄色, 说明该试剂发生降解, 则需更换。3.2 配制 1 $\times$ iClick EdU 缓冲添加剂。用去离子水做 10 倍稀释 10 $\times$ iClick EdU 缓冲添加剂。现用现配。

3.3 配制 1 $\times$ iClick 反应液体系, 按照如下表 2 的顺序依次配制, 否则无法达到最佳的使用效果。注意反应液体系需在 15 分钟之内使用。

表 2 : 1 $\times$  iClick 反应液体系配制参考

	盖玻片数量			
	5	10	20	50
iClick EdU reaction buffer (组份 C)	430 $\mu$ l	860 $\mu$ l	1.8ml	4.3ml
CuSO <sub>4</sub> (组份 D)	20 $\mu$ l	40 $\mu$ l	80 $\mu$ l	200 $\mu$ l
Andy Fluor 594 azide (组份 B)	1.5 $\mu$ l	3 $\mu$ l	6 $\mu$ l	15 $\mu$ l

## iClick™ EdU Andy Fluor™ 594 Imaging Kit 使用说明书

1× iClick EdU 缓冲添加剂 ( 步骤 3.2 )	50µl	100µl	200µl	500µl
总体积	500µl	1ml	2 ml	5ml

3.4 移除细胞透膜液, 每孔加入 1 ml 含 3% BSA 的 PBS 清洗细胞 5 分钟, 重复一次。移除细胞清洗液。

3.5 每孔加入 100 µl iClick 反应液。确保 iClick 反应液均匀覆盖整个盖玻片。

3.6 室温孵育 30 分钟, 注意避光。

3.7 移除 iClick 反应液, 每孔加入 1 ml 含 3% BSA 的 PBS 清洗细胞 5 分钟, 重复 1~2 次。移除细胞清洗液。

注意: 某些细胞对染料的吸附性较强, 会导致较高的背景信号, 为降低染料背景信号, 可采用甲醇清洗 1~2 次, 每次 5 分钟。然后用含 3% BSA 的 PBS 清洗 5 分钟。如需做细胞核复染, 请按 DNA 染色步骤操作。如不需要额外的染色, 即可将上述 盖玻片封片后直接在荧光显微镜观察及成像分析。

### 4. DNA 染色

4.1 每孔加入 1 ml PBS 清洗细胞, 移除细胞清洗液。

4.2 配置 1×Hoechst 33342 染色液。取出试剂盒组份试剂 F, 使用 PBS 按 1:1000 比例稀释。1×Hoechst 33342 染色液的终浓度为 5 µg/ml。

4.3 每孔加入 200 µl 1×Hoechst 33342 染色液。室温孵育 15 分钟, 注意避光。移除 Hoechst 33342 染色液。

4.4 每孔加入 1 ml PBS 清洗细胞 5 分钟, 重复一次。移除细胞清洗液。

### 5. 成像及分析

将盖玻片晾干后, 用封闭液在载玻片上封片, 盖玻片四周用指甲油密封。根据如下 表 3 染料的荧光激发和发射波长选择合适的激发光源和滤光片, 荧光显微镜观察。

表 3 : 荧光染料激发/发射波长

荧光探针	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)
Andy Fluor 594 azide	590	615
Hoechst 33342	350	461

### 实验案例

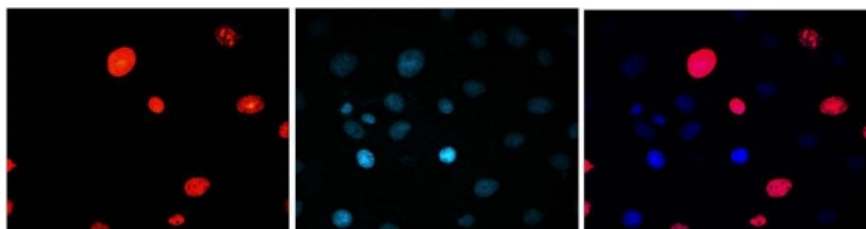


图 1. iClick™ EdU Andy Fluor 594 细胞增殖检测试剂盒检测 A549 细胞增殖的细胞成像分析结果图。

使用 10  $\mu$ M EdU 处理 A549 细胞 2 小时, 然后使用 Andy Fluor™ 594 Azide (红色荧光) 进行 点击化学反应检测细胞增殖情况, Hoechst 33342 (蓝色荧光) 进行细胞核复染。