



iClick™ EdU Andy Fluor 555 Imaging Kit

——EdU 法细胞增殖（细胞成像）检测试剂盒

产品货号	包装规格
A004	250 次

储存条件：-20℃，避光保存。

激发/发射波长：Andy Fluor 555 azide: 555/565 nm; Hoechst 33342: 350/461 nm。

产品说明书

安迪福诺生物科技（武汉）有限公司

Wuhan ABP-Biosciences Co.,Ltd

武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号
武汉光谷国际生物医药企业加速器 1 号楼 511
邮编：430000

电话：400-066-7718

邮箱：sales@abpbio.cn

网址：www.abpbio.com (英文)
www.abpbio.com.cn (中文)

© 2017 ABP Biosciences, Inc.

iClick™ EdU Andy Fluor 555 Imaging Kit

产品货号: A004

试剂盒组份

组份	试剂名称	包装	浓度	储存条件
组份 A	EdU	2x1 ml	10 mM in DMSO	-20°C
组份 B	Andy Fluor 555 azide	100 µl	NA	-20°C 避光保存
组份 C	iClick EdU reaction buffer	50 ml	1x	4°C
组份 D	CuSO₄	1 ml	10 mM in H ₂ O	4°C
组份 E	iClick EdU buffer additive	200 mg	NA	4°C
组份 F	Hoechst 33342	70 µl	5 mg/ml in H ₂ 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 555 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

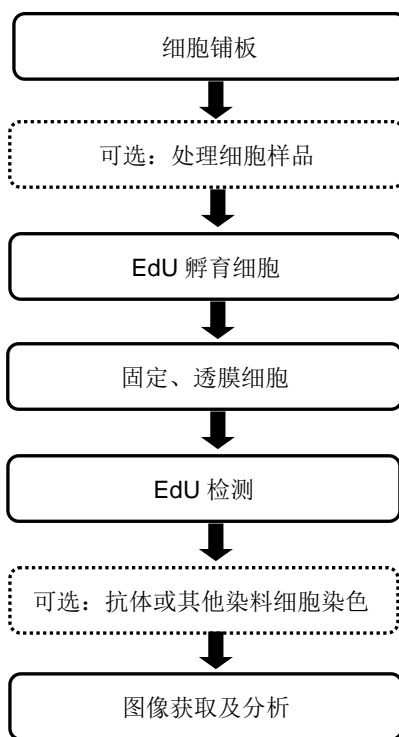
- 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。

➤ 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 μ 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 μM EdU 初始浓度。

1.3 预热 2×EdU 工作液到 37℃，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 μM，配置 20 μM EdU 工作液并用 20 μM 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	人肾细胞	人神经细胞
细胞周期	~30 min	~3 h	~18 h	~21 h	~25 h	~5 d
孵育时间	5 min	20 min	2 h	2 h	2h	1 d

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 μl 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×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℃ 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×iClick EdU 缓冲添加剂。用去离子水做 10 倍稀释 10×iClick EdU 缓冲添加剂。现用现配。

3.3 配制 1×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× iClick 反应液体系配制参考

试剂	盖玻片数量			
	5	10	20	50
iClick EdU reaction buffer (组份 C)	430 μl	860 μl	1.8 ml	4.3 ml
CuSO ₄ (组份 D)	20 μl	40 μl	80 μl	200 μl
Andy Fluor 555 azide (组份 B)	1.5 μl	3 μl	6 μl	15 μl
1× iClick EdU 缓冲添加剂 (步骤 3.2)	50 μl	100 μl	200 μl	500 μl
总体积	500 μl	1 ml	2 ml	5 ml

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 555 azide	555	565
Hoechst 33342	350	461

实验案例

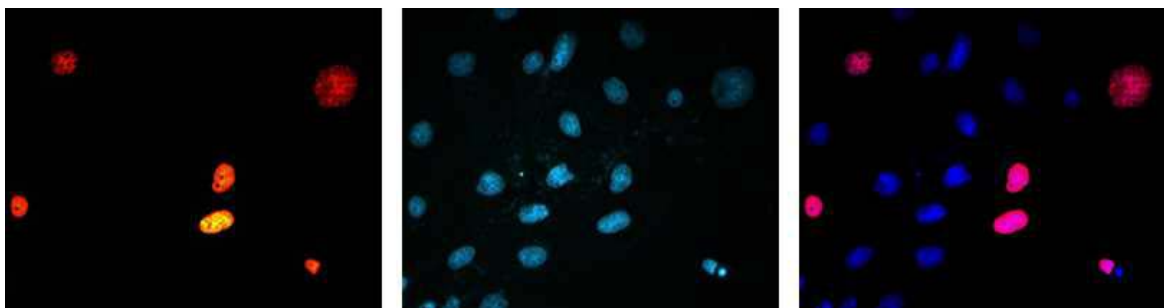


图 1. iClick™ EdU Andy Fluor 555 细胞增殖检测试剂盒检测 A549 细胞增殖的细胞成像分析结果图。

使用 10 μM EdU 处理 A549 细胞 2 小时，然后使用 Andy Fluor™ 555 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。