



iClick™ EdU Andy Fluor 647 Flow Cytometry Assay Kit

——EdU 法细胞增殖流式检测试剂盒

产品货号	包装规格
A008	250 次

储存条件：-20℃，避光保存。

激发/发射波长：Andy Fluor 647 azide: 650/665 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)

iClick™ EdU Andy Fluor 647 Flow Cytometry Assay Kit

产品货号: A008

试剂盒组份

组份	试剂名称	体积/质量	浓度	储存温度
组份 A	EdU	2×1 ml	10 mM in DMSO	-20°C
组份 B	Andy Fluor 647 azide	150 µl	NA	-20°C, 避光保存
组份 C	iClick fixative	5 ml	1xsolution	4°C
组份 D	iClick permeabilization and wash reagent	50 ml	10xsolution	4°C
组份 E	CuSO₄	1 ml	100 mM in H ₂ O	4°C
组份 F	iClick EdU buffer additive	200 mg	NA	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 647 细胞增殖流式检测试剂盒采用 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。

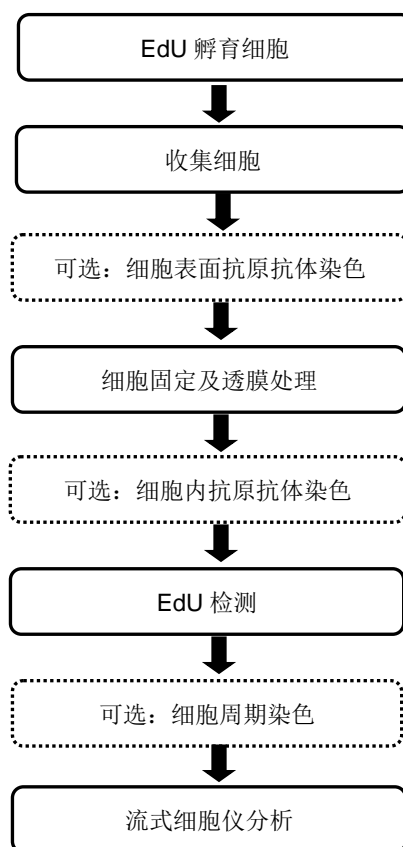
注意事项

- 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）

- 缓冲液，比如 PBS，D-PBS 或 TBS
- 含 1% BSA 的 PBS（pH 7.4）
- 去离子水
- 1.5 ml EP 管或其他流式分析管

EdU 法细胞增殖流式检测实验流程



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 μM 。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 每孔 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ 细胞接种于 6 孔板中，培养至正常生长阶段。

1.2 制备 $2 \times$ 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。EdU 浓度与孵育时间有关，长时间孵育（ >24 小时）宜采用低浓度，短时间（ <2 小时）宜采用高浓度。设置 1 个不加 EdU 培养基的对照组，以便进行流式检测数据的染料背景分析。

1.3 预热 $2 \times$ EdU 工作液到 37°C ，每孔加入等体积的 $2 \times$ 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 $1 \times$ 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	~5 d
孵育时间	5 min	20 min	2 h	2 h	2h	1 d

1.5 收集细胞。将细胞转移至 1.5 mL EP 管中，1500rpm 离心 5 min，弃上清。用 PBS 重悬细胞，1500rpm 离心 5 min，弃上清。

2. 细胞表面抗原染色（可选）

2.1 用含 1% BSA 的 PBS 重悬细胞，1500rpm 离心 5 min，弃上清。

2.2 用含 1% BSA 的 PBS 重悬细胞，并调整细胞浓度为 1×10^7 cells/ml。

2.3 转移 100 μl 悬浮细胞至流式分析管。

2.4 加入抗体，并混匀。

2.5 在室温孵育 2~4 h，注意避光。

3. 细胞固定及透膜处理

注意：用皂素做透膜剂可直接用于血细胞。

3.1 用含 1% BSA 的 PBS 重悬细胞，1500rpm 离心 5 min，弃上清。

3.2 加入 100 μl iClick fixative（组份 C），重悬细胞。

3.3 室温孵育 15 分钟，注意避光。

3.4 用含 1% BSA 的 PBS 重悬细胞，1500rpm 离心 5 min，弃上清。

3.5 加入 100 μl 1×iClick permeabilization and wash reagent（取 50 ml 试剂盒组份 D，加入 450ml 含 1% BSA 的 PBS 配制成 1×iClick permeabilization and wash reagent）重悬细胞。室温孵育 20 分钟。

3.6 用 PBS 重悬细胞，1500rpm 离心 5 min，弃上清。

4. EdU 检测

注意：本实验操作采用 100 μl iClick 反应液体系，也可使用更小体积的 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。

4.1 配制 10×iClick EdU 缓冲添加剂。取试剂盒组份 F，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。

4.2 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。

4.3 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	反应数			
	5	10	25	50
PBS, D-PBS 或 TBS	438 μl	875 μl	2.19 ml	4.38 ml
CuSO4 (组份 E)	10 μl	20 μl	50 μl	100 μl
Andy Fluor 647 azide (组份 B)	2.5 μl	5 μl	12.5 μl	25 μl
1X iClick EdU 缓冲添加剂 (步骤 4.2)	50 μl	100 μl	250 μl	500 μl
总体积	500 μl	1 ml	2.5 ml	5 ml

4.4 每管加入 100 μl iClick 反应液，混合均匀。

4.5 室温孵育 30 分钟，注意避光。

4.6 加入 600 μl 1×iClick permeabilization and wash reagent 重悬细胞，1500rpm 离心 5 min，弃上清。重复一次。

5. 细胞内或细胞表面抗原染色（可选）

5.1 加入 100 μl 1× iClick permeabilization and wash reagent 重悬细胞。

5.2 加入抗体，并混匀。

5.3 在室温孵育 2~4 h，注意避光。

5.4 加入 600 μ l 1 \times iClick permeabilization and wash reagent 重悬细胞，1500rpm 离心 5 min，弃上清。重复一次。

6. DNA 染色（可选）

6.1 加入 100 μ l 1 \times iClick permeabilization and wash reagent 重悬细胞。

6.2 如果有需要，可使用 RNase A 对细胞进行处理。

6.3 每管中加入合适浓度的 DNA 染料，混匀，使用 DNA 染料推荐的时间、温度进行孵育。

6.4 用 PBS 清洗 1~2 次。

7. 流式细胞仪分析

7.1 使用流式细胞仪进行分析。检测 EdU 使用 633/635 nm 激发光源及 660/20 nm 滤光片。

实验案例

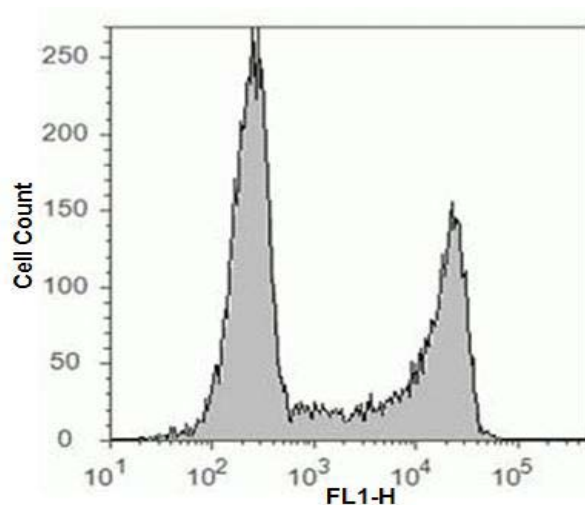


图 1. iClick™ EdU Andy Fluor 647 细胞增殖流式检测试剂盒分析 Jurkat 细胞增殖情况。

使用 10 μ M EdU 处理 Jurkat 细胞 2 小时，然后使用 Andy Fluor™ 647 Azide 进行点击化学反应检测细胞增殖情况，增殖细胞与未增殖细胞可以明显区分开来。