



默科南京

Hotline: 025-69867707

## Click EdU-555 细胞增殖检测试剂盒

### Click EdU Cell Proliferation Kit with AF555

#### 包装清单

| Cat No.  | 组分                    | 包装规格-50T |
|----------|-----------------------|----------|
| MCK-0054 | EdU (10mM)            | 200 μL   |
|          | Azide 555             | 55μL     |
|          | Click Reaction Buffer | 30 mL    |
|          | CuSO4                 | 1.1 mL   |
|          | Click Additive        | 2 管      |
|          | Hoechst 33342 (1000X) | 50 μL    |
|          | 说明书                   | 1 份      |

#### 产品简介

Click EdU-555 细胞增殖检测试剂盒(Click EdU Cell Proliferation Kit with AF555)，是一种基于 DNA 合成过程中胸腺嘧啶脱氧核苷(thymidine)类似物 EdU(5-ethynyl-2'-deoxyuridine)的掺入，并通过随后的点击反应(Click reaction)使 EdU 被 AF555 所标记，从而实现简单、快速、高灵敏地检测细胞增殖的试剂盒。

本试剂盒可以检测到细胞或组织样品中单个的增殖细胞，同时也可以对细胞或组织样品总体的细胞增殖情况进行定量检测。本试剂盒可以检测培养的细胞或组织样品，也可以检测组织切片。经本试剂盒处理后，增殖的细胞在荧光显微镜下呈现非常明亮的红色荧光，可以用于荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪或荧光酶标仪检测，也可以用于高内涵筛选(High-Content Screening, HCS)。流式细胞仪或荧光酶标仪检测仅适用于细胞样品，不适用于组织切片。

细胞增殖能力的检测是评估细胞活性、基因毒性和抗肿瘤药物效果等的基本方法。公认的最精确的检测细胞增殖的方法是直接检测细胞中 DNA 的合成。最初广泛使用的通过检测 DNA 合成来检测细胞增殖的方法是放射性标记核苷掺入法，如氚标记胸腺嘧啶脱氧核苷([<sup>3</sup>H]thymidine)掺入法。但该方法由于有放射性污染并且很难实现单细胞检测而受到很大的限制，随后逐渐被基于抗体检测的 BrdU(bromo-deoxyuridine)法所替代。BrdU 法步骤繁多，且需要使用 BrdU 抗体，影响因素较多，稳定性比较差。并且由于 BrdU 法需要使用抗体，有时会和其它目的蛋白基于抗体的检测相互产生干扰。EdU 法基于 EdU 掺入和后续的点击反应，无需使用抗体、操作便捷、检测灵敏度高，是一种在 BrdU 法基础上升级换代的新方法，将会逐步取代 BrdU 法。

MTT 法、WST-1 法、CCK-8 法和 CellTiter-Lumi™化学发光法都是基于细胞活性的细胞增殖检测方法，能检测到细胞的总体增殖效果，但无法检测到单个的增殖细胞。这几种方法尽管都不是检测 DNA 合成的，但被广泛用于替代[<sup>3</sup>H]thymidine 掺入法。CFDA SE 法基于细胞荧光示踪的原理能检测到单个的增殖细胞，但由于每增殖一次荧光减弱一半，在荧光显微镜下较难区分荧光减弱一半的细胞，检测灵敏度不是很高，通常仅适用于流式细胞仪检测。在进行科学的研究时，上述这些基于细胞活性或 CFDA SE 的方法可以作为 EdU 法的补充性检测方法。

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)，其反应原理参见图 1。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。

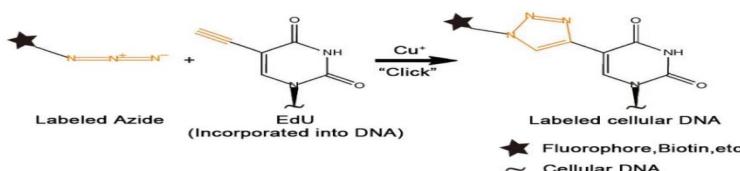


图 1：Click EdU 检测法中的点击反应(Click reaction)原理图。(荧光探针等标记的叠氮化物(Labeled Azide)与掺入到细胞 DNA 中的 EdU，在铜离子的催化发生共价反应，形成稳定的三唑环，最终使细胞 DNA 标记上荧光探针或其它探针。)



默科南京

Hotline: 025-69867707

本试剂盒反应简单、检测灵敏度高。本试剂盒基于简单高效的点击反应，无需 DNA 变性，只需少量的小分子叠氮化物探针即可非常有效地标记出掺入的 EdU，并且可以检测到单个细胞的增殖情况。

本试剂盒使用便捷、兼容性好。本试剂盒只需常用的多聚甲醛固定和 Triton X-100 穿透，就可以使叠氮化物探针有效进入细胞并发生点击反应，不会影响细胞形态，不会影响基于抗体的免疫荧光和免疫组化检测，也不会影响 DNA 的荧光染色(如 PI 染色检测细胞周期、DAPI 或 Hoechst 染料检测细胞核)。而 BrdU 法为了使大分子的 BrdU 抗体进入细胞并与 DNA 上的 BrdU 结合，需要对双链 DNA 进行变性处理(如酸变性、热变性或者 DNase 消化等)，这种变性可能会影响细胞形态，影响后续的免疫荧光和免疫组化检测、DNA 的荧光染色等。

本试剂盒检测快速，定性定量检测都非常便捷。相对于至少需要 4 小时的 BrdU 法，本试剂盒采用的 Click EdU 法检测新合成的 DNA 只需 1.5-2 小时，时间上大大缩短。本试剂盒同时提供了染色细胞核的 Hoechst 33342，以方便染色观察所有的细胞核。可以使用荧光显微镜或流式细胞仪等进行定性和定量检测。

本试剂盒 50T 包装如果用于培养的细胞(6 孔板)的检测，可以检测 50 个样品，每个样品的反应体系为 500  $\mu$ L 的 Click 反应液；如果用于 96 孔板检测，可以检测 500 个样品，每个样品的检测体系为 50  $\mu$ L 的 Click 反应液；如果用于 12 孔、24 孔、48 孔或 384 孔板样品的检测，分别可以检测 125、250、350 和 1250 个样品，每个样品推荐的 Click 反应液用量为 200  $\mu$ L、100  $\mu$ L、70  $\mu$ L 和 20  $\mu$ L。50T 包装如果用于流式细胞仪检测，可以检测 50 个样品，每个细胞样品的细胞数量宜为 10-100 万，每个样品的反应体系为 500  $\mu$ L 的 Click 反应液。如果用于冰冻或石蜡切片的检测，可以检测 125-250 个样品，每个样品的反应体系为 100-200  $\mu$ L 的 Click 反应液。

## 保存条件

-20℃ 保存，有效期一年。Azide 555 和 Hoechst 33342 须避光保存。

## 注意事项

- Click Additive 配制成溶液后请注意适当分装。如果溶解后有白色物质析出，请上下颠倒多次，待全部溶解后使用。如果该溶液颜色变成棕色，说明该组分的有效成分已失效，请弃用。
- 由于本产品需要铜离子催化进行点击反应，请注意如下的兼容性问题及解决方案。本产品完全兼容有机类染料如 Alexa Fluor® 系列普通染料及 fluorescein (FITC)、Allophycocyanin (APC) 及 APCE-tandems 染料；对于 Qdot® 纳米晶体探针、Horseradish peroxidase (HRP)、R-phycocerythrin (R-PE) 和 R-PE-tandems 染料如 Alexa Fluor® 680-R-PE 等，需要在点击反应完成后进行反应和检测；本产品会影响 GFP、RFP、mCherry 等荧光蛋白的荧光，对于荧光类蛋白如 Green Fluorescent Protein (GFP)、TC-FlAsH™ 和 TC-ReAsH™ 类试剂，需要在点击反应前进行反应和检测。由于 Phalloidin (鬼笔环肽) 不兼容点击反应，推荐使用 Tubulin-Tracker Red 进行细胞微管的检测。
- 本产品仅限于专业人员的科学的研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用说明

### 1. 需要用户自己准备的耗材和试剂

- (1) PBS (pH7.2-7.6)。
- (2) 固定液(免疫染色固定液，或 4% 的多聚甲醛)。
- (3) 洗涤液(免疫染色封闭液，QuickBlock™ 免疫染色封闭液，或含 3% BSA 的 PBS)。
- (4) 通透液(免疫染色强力通透液，免疫染色洗涤液，或含 0.3% Triton X-100 的 PBS)。
- (5) 去离子水或超纯水。
- (6) 根据实验要求：18×18mm 盖玻片，6 孔板或其它多孔板，或流式细胞分析仪用管子(如 12×75mm)。

### 2. 检测体系的准备

- (1) 如下以 6 孔板或常规切片检测体系为例，如果使用 12 孔板、96 孔板或 384 孔板等孔板，检测体系可以相应按比例缩小。
- (2) 如果检测的是悬浮细胞，请按常规的悬浮细胞的操作方式进行。例如和贴壁细胞相比，相关步骤需要增加离心步骤等，如 1000  $\times g$  室温离心 5min。

### 3. 培养细胞的 EdU 标记及固定、洗涤和通透

- (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 10  $\mu$ 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  $\mu$ M)。
- 注意：**对于 A549、HeLa 和 NIH/3T3 等贴壁细胞，推荐 EdU 的使用终浓度为 10  $\mu$ M。但细胞类型、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。如果之前使用过 BrdU 进行实验，则可以参考 BrdU 的终浓度作为 EdU 的终浓度。
- (3) 将 37℃ 预热的 2X 的 EdU 工作液(20  $\mu$ M)，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 10  $\mu$ M，原先 6 孔板中的培养基为 1mL，则将 1mL 2X 的 EdU 工作液(20  $\mu$ M) 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



默科南京

Hotline: 025-69867707

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 10  $\mu$ M，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 小时时，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，室温固定 15 分钟。

**注：**对于流式细胞仪检测，贴壁细胞胰酶消化后用培养液重悬后再固定。

(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，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) 转步骤 5。

#### 4. 动物体内的标记及切片样品的处理

EdU 可以通过注射或进食等适当方式进行动物的体内标记。如下以小鼠为例，其它动物体内 EdU 的标记请参考相关文献。

(1) 对于小鼠，可以按照 10-200mg/kg 的用量，把 EdU 用 PBS 配制成一定浓度，腹腔注射、特定组织或器官局部注射或者加入饮用水中。具体用量跟所用动物的种类、体重和使用方式有关，可以参考相关文献，因此初次使用时建议对 EdU 的使用浓度进行一定的摸索，或者直接使用 50mg/kg 的浓度进行测试。如果之前使用过 BrdU 进行实验，则可以参考 BrdU 的终浓度作为 EdU 的终浓度。

(2) 4 小时后或根据特定实验确定的适当时间后，快速处死小鼠，取出所需的组织，按照常规步骤制作冰冻切片或石蜡切片。EdU 标记的时间也可以参考相关文献自行调整。

(3) 对于冰冻切片：

(a) 加入适量固定液，室温固定 15 分钟。

(b) 去除固定液，用适量洗涤液洗涤 3 次，每次 3-5 分钟。

(c) 去除洗涤液，用适量通透液，室温孵育 10-15 分钟。

(d) 去除通透液，用适量洗涤液洗涤 1-2 次，每次 3-5 分钟。

(e) 抗原修复(选做)：如果同时需要进行目的蛋白的免疫荧光染色，并有必要进行抗原修复，可以使用适当的抗原修复液或者自行配制的适当的抗原修复液进行抗原修复处理。

(f) 转步骤 5。

(4) 对于石蜡切片：

(a) 脱蜡：二甲苯中脱蜡 5-10 分钟。换用新鲜的二甲苯，再脱蜡 5-10 分钟。无水乙醇 5 分钟，换新的无水乙醇 3 分钟。95%乙醇 3 分钟。85%乙醇 3 分钟。75%乙醇 3 分钟。50%乙醇 3 分钟。PBS 5 分钟。

(b) 抗原修复(选做)：如果同时需要进行目的蛋白的免疫组化染色，可以使用适当的抗原修复液，例如柠檬酸钠抗原修复液(50X)、改进型柠檬酸钠抗原修复液(50X)、EDTA 抗原修复液(50X)、柠檬酸钠-EDTA 抗原修复液(40X)、通用型强力抗原修复液(10X)、漂片抗原修复液(10X)，或者自行配制适当的抗原修复液进行抗原修复处理。

**注意：**如果使用蛋白酶 K 或胰酶进行抗原修复，必须反复洗涤干净，否则残留的酶会严重干扰后续标记反应。

(c) 转步骤 5。

#### 5. EdU 检测

**注意：**本步骤六孔板中每孔的反应体系为 500  $\mu$ L 的反应混合物。对于 12、24、48、96 和 384 孔板，每孔的反应的体系分别为 200  $\mu$ L、100  $\mu$ L、70  $\mu$ L、50  $\mu$ L 和 20  $\mu$ L 的反应混合物。对于较小的孔，单位培养面积的液体用量已经适当增加，以有效避免液体蒸发可能带来的负面影响。对于切片，可以根据切片大小，每个切片使用 100-200  $\mu$ L 的反应混合物。如下以六孔板中的细胞样品为例说明具体的操作方法，对于其它孔板或切片，仅每步溶液的用量按比例调整即可，其余方法相同。

(1) 配制 Click Additive Solution：用 1.3mL 去离子水溶解一管 Click Additive，混匀至全部溶解，即为 Click Additive Solution；配制后可以适当分装，并-20℃保存。

(2) 参考下表配制 Click 反应液。

**注意：**请严格按照下表中组分顺序和体积配制 Click 反应液，否则点击反应可能无法有效进行；同时，Click 反应液须在配制后 15 分钟内使用。

| 组分                      | 6 孔板样品数     |             |             |             |             |             |            |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
|                         | 1           | 2           | 4           | 5           | 10          | 25          | 50         |
| Click Reaction Buffer   | 430 $\mu$ L | 860 $\mu$ L | 1.72mL      | 2.15mL      | 4.3mL       | 10.75mL     | 21.5mL     |
| CuSO <sub>4</sub>       | 20 $\mu$ L  | 40 $\mu$ L  | 80 $\mu$ L  | 100 $\mu$ L | 200 $\mu$ L | 500 $\mu$ L | 1mL        |
| Azide 555               | 1 $\mu$ L   | 2 $\mu$ L   | 4 $\mu$ L   | 5 $\mu$ L   | 10 $\mu$ L  | 25 $\mu$ L  | 50 $\mu$ L |
| Click Additive Solution | 50 $\mu$ L  | 100 $\mu$ L | 200 $\mu$ L | 250 $\mu$ L | 500 $\mu$ L | 1.25mL      | 2.5mL      |
| 总体积                     | 500 $\mu$ L | 1mL         | 2mL         | 2.5mL       | 5mL         | 12.5mL      | 25mL       |

(3) 去除上一步骤中的洗涤液。

(4) 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。

(5) 室温避光孵育 30 分钟。

(6) 吸除 Click 反应液，用洗涤液洗涤 3 次，每次 3-5 分钟。

(7) 如果需要对细胞核进行染色，可以参照步骤 6 进行。如无其它的特殊需要，即可在荧光显微镜下观察，或者使用流式细胞仪、多功



默科南京

Hotline: 025-69867707

能酶标仪进行荧光检测，或者用高内涵筛选仪器(一般高内涵筛选需要使用染料对细胞核进行染色)进行检测。Azide555 的最大激发波长是 555nm，最大发射波长是 565nm。

#### 6. 细胞核染色

为了检测细胞增殖的比例，可以考虑使用 Hoechst 33342 进行细胞核染色。一般高内涵筛选仪器也需要对细胞核进行染色。

- (1) 1X Hoechst 33342 溶液的配制：按 1:1000 比例用 PBS 稀释 Hoechst 33342。
- (2) 接上述步骤 5 (7)，吸除洗涤液后，每孔加 1X Hoechst 33342 溶液 1ml，室温避光孵育 10 分钟。
- (3) 吸除 1X Hoechst 33342 溶液。
- (4) 用洗涤液洗涤 3 次，每次 3-5 分钟。
- (5) 随后即可进行荧光检测。Hoechst 33342 为蓝色荧光，最大激发波长为 346nm，最大发射波长为 460nm。

#### 7. 流式细胞仪检测

对于经步骤 5 或 6 获得的细胞悬液样品进行流式检测。如果使用传统的流体动力学聚焦的流式细胞仪来测量总 DNA 含量，请在检测过程中使用低流速，实验中的每个样品应使用相同的收集速率和细胞浓度。EdU 标记产生的荧光信号一般使用对数刻度的横坐标 Azide 555 的最大激发波长是 555nm，最大发射波长是 565nm。

**注 1：**建议使用未经 EdU 标记的细胞样品作为流式细胞仪检测的阴性对照，并选择合适的电压。

**注 2：**由于流式细胞仪检测比较灵敏，可根据细胞类型和实际染色情况对 Azide555 的使用量进行适当调整。