



## iClick™ EU Andy Fluor 488 Imaging Kit

——EU 法细胞增殖（细胞成像）检测试剂盒

产品货号	包装规格
<b>A009</b>	<b>50 次</b>

储存条件：-20℃，避光保存。

激发/发射波长：Andy Fluor 488 azide: 495/520 nm; Hoechst 33342: 350/461 nm。

## 产品说明书

GeneCopoeia, Inc.      广州易锦生物技术有限公司

广州高新技术产业开发区广州科学城

掬泉路 3 号广州国际企业孵化器 F 区 8 楼

邮编：510663

电话：4006-020-200

邮箱：sales@igenebio.com

网址：[www.abpbio.com](http://www.abpbio.com) [www.igenebio.com](http://www.igenebio.com)

© 2015 GeneCopoeia, Inc.

## iClick™ EU Andy Fluor 488 Imaging Kit

产品货号: A009

### 试剂盒组份:

组份	试剂名称	包装	浓度	储存条件
组份 A	<b>EU</b>	500 µl	100 mM in DMSO	-20℃
组份 B	<b>Andy Fluor 488 azide</b>	100 µl	NA	-20℃, 避光保存
组份 C	<b>iClick EU reaction buffer</b>	50 ml	1×	4℃
组份 D	<b>CuSO<sub>4</sub></b>	1 ml	10 mM in H <sub>2</sub> O	4℃
组份 E	<b>iClick EU buffer additive</b>	200 mg	NA	4℃
组份 F	<b>Hoechst 33342</b>	70 µl	5 mg/ml in H <sub>2</sub> O	4℃

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 RNA 合成及 RNA 水平的变化是测定物质毒性、评估药物安全评价、细胞健康的基本方法。EU 法细胞增殖（细胞成像）检测试剂盒采用一种尿嘧啶核苷类似物-EU（5-乙炔基-尿嘧啶核苷），能够在 RNA 转录时期代替尿嘧啶（U）掺入正在合成的 RNA 分子，利用 EU 与染料之间的点击化学(Click Chemistry)反应可以在体内和体外水平检测时间和空间上 RNA 合成的变化，能够更方便地研究 RNA 转录位点，结合相关抗体标记能够检测与 RNA 有相互作用的蛋白。结合 EdU 和 EU 进行检测新合成的 DNA 和新合成的 RNA，可以深入开展细胞增殖、细胞周期、细胞毒性、DNA 复制及修复、信号通路等方面的研究。

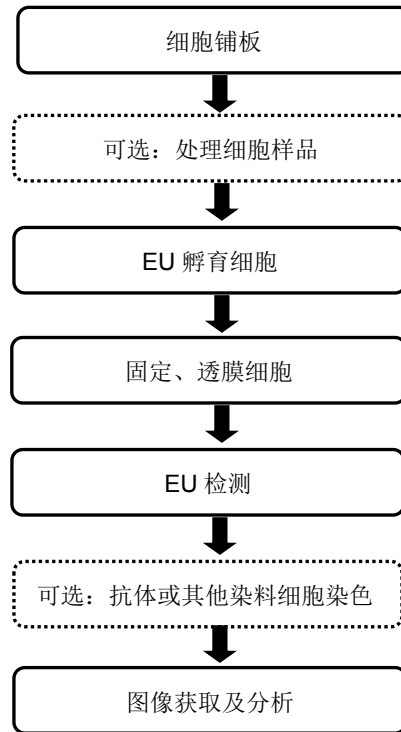
### 注意事项

- 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

## EU 法细胞增殖（细胞成像）检测实验流程



### 实验步骤

#### 1. EU 标记

**注意：**EU 标记的最佳浓度根据细胞类型而变化。建议使用 EU 的起始浓度为 100  $\mu\text{M}$ 。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 EU 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 EU 浓度来确定最佳的 EU 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 （可选）对细胞按实验设计进行处理。

1.3 制备 2 $\times$ EU 工作液。用细胞培养基按一定比例稀释 EU 溶液（组份 A）。建议使用 100  $\mu\text{M}$  EU 初始浓度。

1.4 预热 2 $\times$ EU 工作液到 37 $^{\circ}\text{C}$ ，往含培养基的细胞中加入等体积的 2 $\times$ EU 工作液。例如实验选用 EU 的终浓度为 100  $\mu\text{M}$ ，配置 200  $\mu\text{M}$  EU 工作液并用 200  $\mu\text{M}$  EU 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 $\times$ EU 工作液。因为这样操作会影响细胞正常生长。

1.5 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: EU 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

## 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. EU 检测

**注意:** 本实验操作采用 500  $\mu$ l 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。

3.1 配制 10 $\times$  iClick EU 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 EU 缓冲添加剂。用去离子水做 10 倍稀释 10 $\times$  iClick EU 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

试剂	盖玻片数量			
	1	2	4	10
iClick EU reaction buffer (组份 C)	430 $\mu$ l	860 $\mu$ l	1.8 ml	4.3 ml
CuSO <sub>4</sub> (组份 D)	20 $\mu$ l	40 $\mu$ l	80 $\mu$ l	200 $\mu$ l
Andy Fluor 488 azide (组份 B)	1.5 $\mu$ l	3 $\mu$ l	6 $\mu$ l	15 $\mu$ l
1 $\times$ iClick EU 缓冲添加剂 (步骤 3.2)	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	500 $\mu$ l
总体积	500 $\mu$ l	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 500  $\mu$ l 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 $\times$  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 $\times$  Hoechst 33342 染色液的终浓度为 5  $\mu$ g/ml。

4.3 每孔加入 1 ml 1 $\times$  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 488 azide	495	520
Hoechst 33342	350	461

### 实验案例

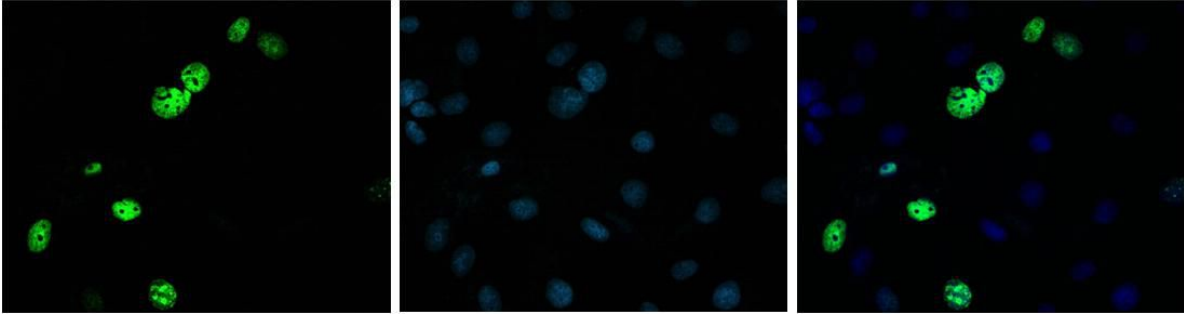


图 1. iClick™ EU Andy Fluor 488 细胞增殖检测试剂盒检测 A549 细胞增殖的细胞成像分析结果图。

使用 100  $\mu$ M EU 处理 A549 细胞 2 小时，然后使用 Andy Fluor™ 488 Azide（绿色荧光）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。

© 2015, GeneCopoeia, Inc.

广州易锦生物技术有限公司  
广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路 3 号  
广州国际企业孵化器 F 区 8 楼  
邮编：510663  
电话：4006-020-200  
邮箱：sales@igenebio.com  
网址：[www.abpbio.com](http://www.abpbio.com)（英文） [www.igenebio.com](http://www.igenebio.com)（中文）