



In Situ BrdU Cell Proliferation Assay Kit

——细胞增殖检测试剂盒

产品货号	包装规格
A055	50 次

储存条件：4 °C，避光保存。

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 www.igenebio.com

© 2015 GeneCopoeia, Inc.

In Situ BrdU Cell Proliferation Assay Kit

产品货号: A055

试剂盒组份:

组份	试剂名称	包装	浓度	储存条件
组份 A	BrdU	50 mg	-	4℃
组份 B	BrdU Detection Antibody	50 µl	100×	4℃
组份 C	Anti-mouse Andy Fluor 488-labeled Antibody	50 µl	100×	4℃
组份 D	Antibody Diluent	50 ml	1×	4℃

注: 按照推荐的储存条件保存有效期为 6 个月。

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。BrdU (5-溴脱氧尿嘧啶核苷) 是一种胸腺嘧啶核苷酸类似物, 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。

BrdU 细胞增殖检测试剂盒适用于组织样本 (石蜡包埋、冰冻和超薄切片) 和细胞样本 (细胞涂片或爬片) 的 BrdU 染色, 具有荧光信号强、背景低等特点。

实验所需耗材 (不包含在试剂盒中)

- 二甲苯和乙醇
- 蒸馏水或去离子水
- PBS (pH 7.4)
- 细胞固定液 (含 3.7% 多聚甲醛的 PBS)
- 细胞通透液 (含 0.1% Triton X-100 的 PBS)
- 含 3% BSA 的 PBS (pH 7.4)
- 2N HCl
- 磷酸盐/柠檬酸缓冲液 (pH 7.4, 182 ml 0.2 M 磷酸氢二钠+ 18 ml 0.1 M 柠檬酸)
- Mini PAP Pen
- Mounting Media

实验步骤

BrdU 标记

用 BrdU 免疫组化检测细胞增殖之前, BrdU 需要掺入到活细胞或组织中。BrdU

标记可以在体内或体外进行，主要取决于实验研究的目的。BrdU 使用浓度因细胞样品或组织类型不同而不同，建议的起始浓度为 10 μ M。

1. BrdU 体外标记

首先制备 10 mM BrdU in DMSO 浓缩液，然后用培养基稀释至终浓度为 10 μ M 的工作液，在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1~4 小时。BrdU 孵育时间取决于细胞或组织样本的类型。移除培养液，用 PBS 清洗细胞，重复一次。

2. BrdU 体内标记

用 PBS 配制终浓度为 10 mg/ml 的 BrdU 工作液。小鼠腹腔注射 BrdU 工作液，以每公斤体重注射 70 mg BrdU 计算。注射 1~4 小时之后取组织样本制成组织切片。注射 1 小时之后，BrdU 可以在胸腺和骨髓处检测到；注射 24 小时之后，BrdU 可以在大部分的组织中检测到。

固定、通透和变性处理

A. 细胞样品

- 1) 移除 PBS，加入 1 ml 细胞固定液（含 3.7% 多聚甲醛的 PBS）。
- 2) 室温孵育 15 分钟。
- 3) 加入 PBS 清洗细胞，重复两次，每次 2 分钟。
- 4) 移除 PBS，加入 1 ml 细胞通透液（含 0.1% Triton X-100 的 PBS）。
- 5) 室温孵育 20 分钟。
- 6) 移除细胞通透液，加入 1 ml 2N HCl。
- 7) 冰上孵育 10 分钟，然后室温孵育 10 分钟。
- 8) 移除酸溶液，加入 1 ml 磷酸盐/柠檬酸缓冲液（PH 7.4）。
- 9) 室温孵育 10 分钟。
- 10) 加入细胞通透液清洗细胞，重复两次，每次 2 分钟。

B. 冰冻切片

- 1) 使用液氮或在液氮中预冷的异戊烷快速冷冻新鲜组织，适量加入 OCT 包埋剂浸没组织。制作切片之前可以将冷冻组织块放置于 -80 $^{\circ}$ C 储存备用。
- 2) 开始制作切片时，将冷冻组织块转移到一个低温恒温箱（比如 -20 $^{\circ}$ C 冰箱），使得冷冻组织块的温度平衡到低温恒温箱的温度。
- 3) 使用冰冻切片机将冷冻组织块切薄片到合适的厚度（一般为 5~10 μ m）。
- 4) 将组织切片铺到载玻片上，以备用于免疫组织化学分析。
- 5) 使用冰冷的丙酮或甲醇固定 10 分钟，空气干燥 30 分钟。
- 6) 加入 1 ml 2N HCl，冰上孵育 10 分钟，然后室温孵育 10 分钟。
- 7) 移除酸溶液，加入 1 ml 磷酸盐/柠檬酸缓冲液（PH 7.4）。
- 8) 室温孵育 10 分钟。
- 9) 加入细胞通透液清洗切片，重复两次，每次 2 分钟。

C. 石蜡切片

- 1) 用二甲苯对石蜡切片进行脱蜡处理，重复两次，每次 5 分钟。
- 2) 用无水乙醇进行水合处理，重复一次，每次 2 分钟。

- 3) 用 95%乙醇进行水合处理, 重复一次, 每次 2 分钟。
- 4) 用蒸馏水清洗切片。
- 5) 加入 1 ml 2N HCl, 冰上孵育 10 分钟, 然后室温孵育 10 分钟。
- 6) 移除酸溶液, 加入 1 ml 磷酸盐/柠檬酸缓冲液 (PH 7.4)。
- 7) 室温孵育 10 分钟。
- 8) 加入细胞通透液清洗切片, 重复两次, 每次 2 分钟。

BrdU 检测

- 1) 制备 1×BrdU 抗体检测液, 用抗体稀释液 1:100 稀释 BrdU 抗体 (组份 B)。
- 2) 制备 1×Andy Fluor 488 二抗溶液, 用抗体稀释液 1:100 稀释抗小鼠 Andy Fluor 488 二抗 (组份 C)。
- 3) 移除细胞通透液, 加入 100 μl 1×抗体检测液。
- 4) 4℃孵育过夜, 或室温湿盒中孵育 1 小时。
- 5) 加入细胞通透液清洗, 重复两次, 每次 2 分钟。
- 6) 移除细胞通透液, 加入 100 μl 1×Andy Fluor 488 二抗溶液。
- 7) 室温湿盒中孵育 1 小时。
- 8) 加入 PBS 清洗, 重复两次, 每次 2 分钟。
- 9) 载玻片上放上盖玻片, 抗淬灭剂封片。
- 10) 使用合适的滤光片进行荧光成像分析。

参考文献:

1. Medina Benavente JJ, Mogami H, Sakurai T, Sawada K. Evaluation of silicon nitride as a substrate for culture of PC12 cells: an interfacial model for functional studies in neurons. PLoS One. 2014, 9(2):e90189.
2. Jensen-Taubman S, Wang XY, Linnoila RI. Achaete-scute homologue-1 tapers neuroendocrine cell differentiation in lungs after exposure to naphthalene. Toxicol Sci. 2010, 117(1):238-48.
3. Tough, D. F., and J. Sprent. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. J. Exp. Med. 1994, 179:1127-1135.
4. deFazio A., Leary J. A., Hedley D. W., and Tattersall M. H. Immunohistochemical detection of proliferating cells in vivo. J Histochem Cytochem 1987, 35(5):571-577.

© 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 (英文) www.igenebio.com (中文)