BrdU细胞增殖检测试剂盒 B3035

描述：BrdU 检测试剂盒用于细胞和组织切片的细胞增殖检测。BrdU(5-Bromo-2-deoxyUridine)，即 5-溴脱氧尿嘧啶核苷，是胸腺嘧啶核苷(T)类似物，检测原理为 BrdU 可以通过竞争替代胸腺嘧啶核苷 T 掺入 DNA 合成期(S 期)。当处于旺盛分裂的细胞掺入 BrdU 后，利用抗 BrdU 抗体和抗体连接酶或荧光素作为指示系统，即可检测出含有 BrdU 的细胞，结合其它细胞标记物进行双重标记，可判断出增殖细胞的种类、增殖速度等，对研究细胞动力学有重要意义。BrdU 经活体注射或细胞培养时进入组织细胞，掺入 DNA 定位准确，可有效反应 S 期细胞新合成 DNA 的水平，而且受细胞内外环境影响小，标记不会丢失。

组成:

破膜液	30 mL	4℃
封闭液（3%BSA）	30 mL	4℃
4%多聚甲醛	30 mL	常温
1M HCl	30 mL	4℃
Anti-BrdU (mouse mAb)	50 μL	-20℃
有效期一年		

操作步骤:

细胞样品：

1. 细胞准备：提前准备细胞爬片，确保细胞状态正常，贴壁良好；

2. BrdU孵育：细胞经含BrdU的培养基于培养箱中避光孵育一定时间，BrdU浓度及细胞孵育时间依据细胞种类不同，建议预实验摸索最佳条件。注意事项中已测试细胞实验条件可供参考；

3. 细胞固定：上述经BrdU孵育的细胞爬片，PBS洗3次，每次5min。向孔板内加入1mL 4%多聚甲醛覆盖细胞，室温固定20-30min。PBS洗3次，每次5min；

4. 通透：向孔板内滴加破膜液覆盖细胞处理8-10min，PBS洗3次，每次5min；

5. 细胞核染色（可选）：

若后续白光检测，则用苏木素染细胞核：向孔板内滴加苏木素染液室温染色5min，吸弃苏木素染液，PBS洗3次，每次5min；

若后续荧光检测，则用DAPI染细胞核：向孔板内滴加DAPI染液室温染色5min，吸弃DAPI染液，PBS洗3次，每次5min；

6. 再固定：向孔板内滴加4%多聚甲醛室温孵育10min，PBS洗3次，每次5min；

7. 酸化：向孔板内滴加1M HCl覆盖细胞，37℃处理10min，PBS洗3次，每次5min；

8. 后固定：再次向孔板内滴加4%多聚甲醛室温孵育10min，PBS洗3次，每次5min；

9. 封闭：向孔板内滴加封闭液（3% BSA）室温孵育30min。吸弃封闭液，不要清洗；

10. Anti-BrdU抗体孵育：向孔板内滴加anti-BrdU一抗工作液覆盖细胞，4℃孵育过夜。吸弃anti-BrdU一抗工作液，PBS洗3次，每次5min；

11. 二抗孵育：向孔板内滴加二抗工作液覆盖细胞，室温孵育1h。吸弃二抗工作液，PBS洗3次，每次5 min。注意，若是用荧光标记的二抗，孵育及洗涤时均需避光；

12. 封片及镜检：

若是HRP标记的二抗(C1308)，则用DAB显色试剂对细胞样品进行显色，脱水，透明，用尖头镊子轻轻将爬片挑起，倒扣在洁净的载玻片上封片，显微镜观察；

若是荧光标记的二抗，在洁净载玻片上滴加抗荧光衰减封片剂（C1210），用尖头镊子轻轻将爬片挑起，倒扣在载玻片上封片，荧光显微镜观察；

组织切片样品：

1. 动物准备：需提前准备实验动物，并进行体内BrdU标记。体内标记后根据实验需要进行取材、固定及制备石蜡切片；

2. 组织石蜡切片脱蜡复水；

3. 修复：组画笔画圈圈住组织，将切片浸没在抗原修复液中，微波加热修复。自然冷却；

4. 细胞核染色（可选）：

若后续白光检测，则用苏木素染细胞核：切片入苏木素染液室温染色5min，PBS洗3次，每次5min；

若后续荧光检测，则用DAPI染细胞核：向组织上滴加DAPI染液室温染色5min，倾去DAPI染液，切片经PBS洗3次，每次5min；

5. 再固定：向组织上滴加4%多聚甲醛室温孵育10min，PBS洗3次，每次5min；

6. 酸化：向切片上滴加1 M HCl覆盖组织，37℃处理10min，PBS洗3次，每次5min；

7. 后固定：再次向切片上滴加4%多聚甲醛覆盖组织室温孵育10min，PBS洗3次，每次5min；

8. 内源性过氧化物酶淬灭（可选）：向切片上滴加3% H_2O_2室温孵育25-30min，去除内源性过氧化物酶。随后切片经PBS洗3次，每次5min；

9. 封闭：向切片上滴加封闭液（3% BSA）覆盖组织，室温孵育30min。去除封闭液，不要清洗；

10. Anti-BrdU抗体孵育：向切片上滴加anti-BrdU一抗工作液覆盖组织，4℃孵育过夜。去除anti-BrdU一抗工作液，PBS洗3次，每次5min；

11. 二抗孵育：向切片上滴加二抗工作液覆盖组织，室温孵育1h。去除二抗工作液，PBS洗3次，每次5 min。注意，若是用荧光标记的二抗，孵育及洗涤时均需避光；

12. 封片及镜检：

若是HRP标记的二抗(C1308)，则用DAB显色试剂对组织切片进行显色，脱水，透明，封片后显微镜观察；

若是荧光标记的二抗，则滴加抗荧光淬灭封片剂（C1210）封片后荧光显微镜观察。

结果观察

如果用HRP标记的二抗检测，细胞核呈深蓝色，增殖细胞呈棕色。如果是荧光标记的二抗，细胞核呈蓝色荧光（Ex=358 nm，Em=461 nm），增殖细胞为对应二抗的荧光。

注意事项

1. 对于细胞爬片样品，BrdU的使用浓度和处理时间与细胞种类有关。一般来说，处理肿瘤细胞所需浓度和时间都较低，成纤维细胞或上皮细胞等增殖较慢的细胞需要提高浓度并延长作用时间，建议浓度范围为20-100μM，作用时间为40min-4h，可根据具体细胞的种类进行摸索调整。

下表为测试的常用细胞处理浓度及时间，仅供参考。

细胞	BrdU浓度（μM）	孵育时间（min）
A549	40	40
Hela	40	40
NRK-52e	40	40
SKOV3	80	120
H9C2	40	40

2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。