

Cell Proliferation Kit(BrdU Method)

Catalog No.: RK05884

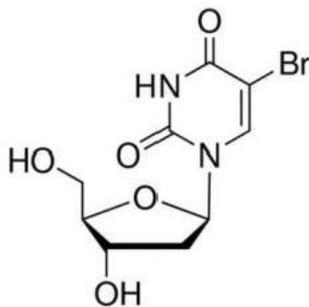
产品组成

组分	50 μ L规格	100 μ L规格	200 μ L规格
5-BrdU (RM02832)	100mg	100mg	100mg
BrdU Mouse mAb (A1482)	50 μ L	100 μ L	200 μ L

验证应用	IF 1:50-1:200
反应物种	All
保存条件	-20°C保存, 两年有效 -20°C保存, 避免反复冻融 Buffer: PBS with 0.02% sodium azide, 50% glycerol, pH7.3.

BrdU 简介

CAS Numbe	分子式	分子量	纯度	应用级别
59-14-3	C ₈ H ₈ BrN ₂ O ₄	307.1	299%	Reagent grade



BrdU 信息

名称	BrdU, 5-BrdU 5-Bromo-2'-deoxyuridine
纯度	Reagent grade, 299% (HPLC)
中文别名	5-溴-2'-脱氧尿苷, 5-溴-1-(2-脱氧- β -D-呋喃核糖)尿嘧啶, 5-溴脱氧尿苷
别名	5-BrdU; 5-Bromo-1-(2-deoxy-beta-D-ribofuranosyl)uracil; 5-Bromouracil deoxyriboside; BUdR
溶解度	\geq 15.35 mg/mL in DMSO 216.23 mg/mL in H ₂ O with ultrasonic 211.56 mg/mL in 0.9% NS with ultrason
保存条件	-20°C保存, 两年有效

BrdU 描述

应用	5-溴-2'-脱氧尿苷(5-BrdU)是胸苷类似物, 可以结合到DNA中。5-BrdU通常广泛用于测量DNA合成和标记分裂细胞。因此, 5-BrdU用于研究细胞信号传导和其他诱导细胞增殖的过程。
生化/生理作用	胸苷类似物用作遗传研究中的诱变剂。在5期选择性地结合到细胞DNA中。

使用方法

BrdU 储存液的准备: 用1XDPBS 充分溶解适量的BrdU 配置10 mg/mL 的母液, 过滤除菌后, 按照0.5mL/ 管的量分装放在-20° °C 或者-80°C长期保存, 避免反复冻融。BrdU 储存液再融化后, 4°C可稳定存放一周。

1. 体内BrdU 标记

(1) 腹腔注射法(常用): 无菌的10 mg/mL (溶于DPBS)适合用于体内注射用。按照100-200 μ L(1-2 mg) BrdU的量腹腔注射到小鼠体内。注意: 最短在注射后0.5 h后在小肠, 胸腺和骨髓瘤处就能检测到BrdU。而一般在注射后24 h内几乎所有组织都能检测到BrdU。这个时间可能对于一些快速分化的组织如小肠来说有些久。

(2) 根据自身的实验体系, 在合适的时间点处死动物, 摘除待研究的组织使用冰冻切片或者石蜡包埋的方法进行组织处理和切片制备。然后进入后续的IHC染色步骤。

2. 体外BrdU 标记(培养原代细胞或者细胞系)

注: 总的来说, 10 μ M BrdU (稀释于培养液) 是一个比较合适的方法用来标记不同物种来源的原代细胞或细胞系。当然, 建议针对具体的实验体系优化方法。

(1) 在96孔板上按标准步骤进行细胞培养, 培养时间一般为1-72 h(根据细胞生长周期做适当调整);

(2) BrdU工作液的准备: 用组织细胞培养液按照1:30的比例稀释储存液得到1mM BrdU工作液。然后取10 μ L 1mMBrdU 溶液直接加入1mL组织培养液即得到最终工作液。37°C温热。

(3) 按100 μ L/孔BrdU工作液量进行细胞标记, 37 $^{\circ}$ C 孵育60 min~过夜。同时设置非BrdU标记的细胞作为阴性对照。注意: 最佳的孵育时间取决于细胞增殖速度以及需要达到的实验目的。比如, 对于快速增殖细胞(如HL-60)有效孵育时间为30-45 min; 对于原代细胞(如未受外源刺激培养的外周血淋巴细胞)孵育时间可能需要24 h。细胞密度最好不要超过 2×10^6 cells/mL。

(4) 制备单细胞层玻片, 使用以下任何一种方法:

- 细胞离心涂片(cytospin)制备: 使用细胞离心涂片机, 将100 μ L 标记好的细胞(浓度为: $1-2 \times 10^6$ cells/mL)直接离心到干净, 无脂肪, poly-L-lysine包被的玻片上, 风干。
- 细胞涂片(cell-smear)制备: 取一小滴标记好的细胞悬液于干净, 无脂肪, poly-L-lysine包被玻片的一端, 然后用第二个干净玻片将其均匀涂布成一薄层。室温风干。

(5) 在细胞上覆盖过量的4%中性甲醛固定液(PBS 缓冲液配制), 置于4 $^{\circ}$ C, 固定15分钟。

(6) 去除固定液, 加入足量4 $^{\circ}$ C预冷的PBS缓冲液洗涤5分钟, 重复3次。

(7) 加入1 mol/L HCl溶液, 37 $^{\circ}$ C孵育30 min。注意: DNA 的变性对于BrdU 染色的成功至关重要。

(8) 吸去 HCl 溶液, PBS 清洗3次, 每次1min。

(9) 进入后续 ICC 染色步骤。

3. 体外BrdU 标记(组织薄片)

(1) BrdU工作液的准备: 用组织细胞培养液按照1:30的比例稀释储存液得到1 mMBrdU 工作液。然后取10-20 μ L 1 mM BrdU溶液直接加入1 mL 组织培养液即得到最终工作液。确保有足够的工作液(37 $^{\circ}$ C温热)完全浸泡组织。

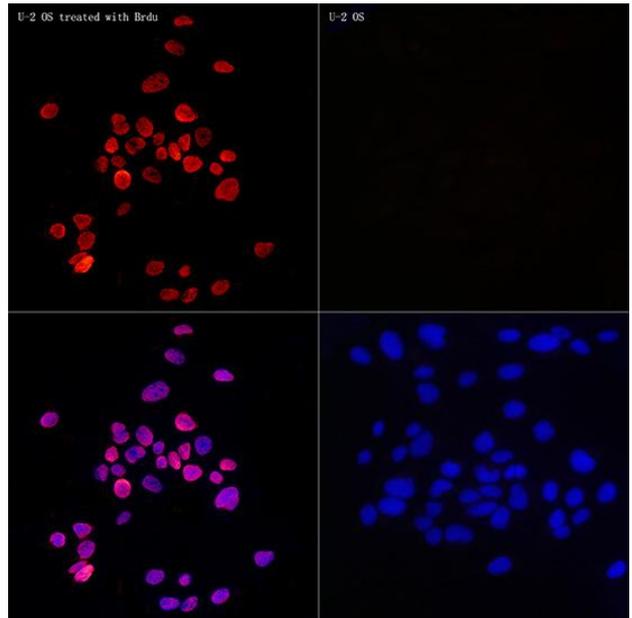
(2) 用手术刀或者锋利的刀片将组织切割成约1 mm 厚, 2mm² 大小的薄片。建议在温热的培养基内进行切片, 利于维持组织的活力。

(3) 转移组织薄片至预装有10 mL BrdU标记液的15 mL 离心管内。于37 $^{\circ}$, CO₂ 培养箱内孵育需要的时间。孵育时间可变, 取决于组织薄片类型以及需要达到的实验目的(常用的为2-4h)。直接丢弃未用完的标记液。

(4) 37 $^{\circ}$ C PBS 清洗组织薄片, 每次5min。

(5) 使用标准的冰冻切片或者石蜡包埋切片的方法固定组织。

抗体检测



Immunofluorescence analysis of BrdU treated (left figure) and untreated (right figure) U2OS cells using BrdU antibody (colored red) (A1482) at dilution of 1:100. Blue: DAPI for nuclear staining.

注意事项

本产品仅限于专业人员的科学研究用, 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。**