



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107703292 B

(45)授权公告日 2019.07.12

(21)申请号 201610646905.5

审查员 张婷

(22)申请日 2016.08.09

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107703292 A

(43)申请公布日 2018.02.16

(73)专利权人 杨琴

地址 400015 重庆市渝中区袁家岗友谊路1号

专利权人 余萍萍

(72)发明人 杨琴 余萍萍

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 1/30(2006.01)

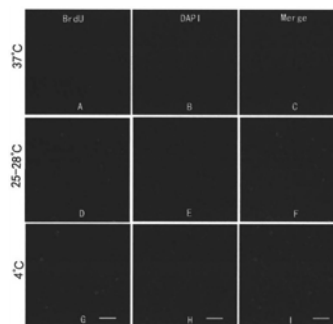
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

BrdU标记免疫荧光检测细胞增殖的改良方法

(57)摘要

本发明公开了一种免疫荧光检测BrdU标记增殖细胞的改良方法。将变性温度固定在4℃,复性统一采用0.01M Tris-HCL处理,之后进行单标、双标及三标染色,并与常规方法进行比较。结果显示本发明方法具有非常好的染色效果,成功率高,重复性好,操作简单且节约实验时间。



1. BrdU标记免疫荧光检测细胞增殖的改良方法,其具体步骤如下:

- a、破膜:取组织切片室温下晾15分钟,然后加0.4%triton室温下反应20分钟;
  - b、修复:经过步骤a处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,用0.01mmol/L枸橼酸盐进行微波热修复,大火5分钟,小火20分钟,待自然冷却1h;
  - c、变性:经过步骤b处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,加2M HCL于4℃下作用30分钟;
  - d、复性:经过步骤c处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,加0.01M Tris-HCL室温下反应10分钟;
  - e、封闭:经过步骤d处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,山羊血清封闭2小时;
  - f、孵一抗:经过步骤e处理后的组织切片甩掉多余山羊血清,不洗,加BrdU、DCX/BrdU单抗体4℃孵育过夜;
  - g、孵二抗:经过步骤f处理后的组织切片37℃复温1小时,加二抗37℃孵育1小时;
  - h、复核:经过步骤g处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,DAPI复染胞核5-8分钟;
  - i、封片:经过步骤h处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,甘油封片;
- 其特征在于:将变性温度固定为4℃,复性统一采用0.01M Tris-HCL,进行单标、双标及三标染色。

## BrdU标记免疫荧光检测细胞增殖的改良方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物领域,特别涉及免疫荧光检测BrdU标记增殖细胞的改良方法。

### 背景技术

[0002] 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 是人工合成的胸腺嘧啶类似物,在DNA合成期(S期),BrdU能够代替胸腺嘧啶而渗入正在复制的DNA分子中,而组织细胞内无内源性BrdU存在。细胞培养或活体注射加入BrdU,之后采用免疫荧光染色,BrdU阳性细胞即为增殖细胞。同时结合其它细胞标记物,双重染色,可定性、定量检测增殖细胞的种类、增殖速度及增殖细胞的分化、迁移和存活,对细胞动力学的研究有重要意义。BrdU标记免疫荧光检测细胞增殖的方法被广泛用于各种细胞增殖的研究。

[0003] 目前BrdU标记免疫荧光检测细胞增殖的染色方法多种多样,无统一步骤。下面是两种常用的染色方法的步骤。

[0004] 第一种染色方法步骤如下:

[0005] a、破膜:取组织切片,加0.4% triton室温下反应20分钟;

[0006] b、修复:经过步骤a处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,用0.01mlol/L枸橼酸盐进行微波热修复,大火5分钟,小火20分钟,待自然冷却约1h;

[0007] c、变性:经过步骤b处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,加2MHCL于37°C下作用30分钟;

[0008] d、复性:经过步骤c处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,然后加0.01M Tris-HCL室温下反应10分钟;

[0009] e、封闭:经过步骤d处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,山羊血清封闭2小时;

[0010] f、孵一抗:经过步骤e处理后的组织切片甩掉多余山羊血清,不洗,加BrdU与其双标抗体4°C孵育过夜;

[0011] g、孵二抗:经过步骤f处理后的组织切片37°C复温1小时,加二抗37°C孵育1小时;

[0012] h、复核:经过步骤g处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,DAPI复染胞核5-8分钟;

[0013] i、封片:经过步骤h处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,甘油封片。

[0014] 第二种染色方法步骤如下:

[0015] a、变性:取组织切片,加1M HCL于冰上孵育10分钟,然后加2M HCL于室温下孵育10分钟,再于37°C下作用20分钟;

[0016] b、复性:经过步骤a处理后的组织切片加0.1M硼酸缓冲液室温下中和10分钟;

[0017] c、破膜:取组织切片,加0.4% triton室温下反应20分钟;

[0018] d、修复:经过步骤a处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,用0.01mlol/L枸橼酸盐进行微波热修复,大火5分钟,小火20分钟,待自然冷却约1h;

[0019] e、封闭:经过步骤d处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,山羊血清封闭2小时;

[0020] f、孵一抗:经过步骤e处理后的组织切片甩掉多余山羊血清,不洗,加BrdU与其双标抗体4°C孵育过夜;

[0021] g、孵二抗:经过步骤f处理后的组织切片37℃复温1小时,加二抗37℃孵育1小时;

[0022] h、复核:经过步骤g处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,DAPI复染胞核5-8分钟;

[0023] i、封片:经过步骤h处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,甘油封片。以上两种方法为目前常用的免疫荧光染色方法,具有以下几方面不足:

[0024] 1. 变性温度不固定。第一种方法直接采用37°变性,BrdU阳性标记定位模糊不清晰,双标染色时第二个标志物不能正常显色,DAPI或PI染色不能清晰显示细胞核。第二种方法采用冰上10分钟→常温10分钟→37℃20分钟处理细胞或组织进行变性,操作流程复杂,“常温”受外界因素影响大,如:冬季和夏季常温不同,因而影响染色结果。我们之前实验也验证了冬季常温做出结果较好,而夏季常温结果显示DAPI染核时难以染上。

[0025] 2. 复性方法不同。第一种方法采用0.01M Tris-HCL复性,第二种方法采用0.1M硼酸复性。还有方法采用不复性。我们的实验验证了采用0.01M Tris-HCL复性效果最好。

[0026] 3. 步骤繁琐且不统一。

[0027] 4. 上述两种常规方法使BrdU单标染色效果极差,双标及核染色无法实施,严重影响实验结果,因此,需要对此方法进行改良。

#### 发明内容:

[0028] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种改良的BrdU标记免疫荧光染色检测细胞增殖的方法,可以进行单标、双标、三标染色,染色效果清晰,重复性高,方法简便、经济,可控性强,不利因素极少。

[0029] 本发明改良的BrdU标记免疫荧光染色检测细胞增殖的方法步骤如下:

[0030] a、破膜:取组织切片室温下晾15分钟,然后加0.4%triton室温下反应20分钟;

[0031] b、修复:经过步骤a处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,用0.01mmol/L枸橼酸盐进行微波热修复,大火5分钟,小火20分钟,待自然冷却约1h;

[0032] c、变性:经过步骤b处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,加2MHCL于4℃下作用30分钟;

[0033] d、复性:经过步骤c处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,加0.01M Tris-HCL室温下反应10分钟;

[0034] e、封闭:经过步骤d处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,山羊血清封闭2小时;

[0035] f、孵一抗:经过步骤e处理后的组织切片甩掉多余山羊血清,不洗,加BrdU、BrdU/DCX抗体4℃孵育过夜;

[0036] g、孵二抗:经过步骤f处理后的组织切片37℃复温1小时,加二抗37℃孵育1小时;

[0037] h、复核:经过步骤g处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,DAPI复染胞核5-8分钟;

[0038] i、封片:经过步骤h处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,甘油封片。

[0039] 本发明的有益效果在于:本发明方法对常规的免疫荧光染色方法作了改进,在原方法中“变性”这一步骤,将2M HCL的反应温度固定为4℃,再经过0.01M Tris-HCL复性重建免疫荧光所需的碱性环境,充分暴露BrdU,结果显示单标、双标、三标染色均清晰,假阳性低。

[0040] 此改良方法具有如下优点:(1)简化了操作流程,节约实验时间。变性温度固定为4℃,复性统一采用0.01M Tris-HCL,可控性强,减小了影响因素;(2)染色效果好,重复性高,

成功率高达95%以上；(3) 可进行单标、双标、三标染色,效果均好。因此,本改良方法具有良好的应用前景和推广价值,具有突出的实质性特点和显著的进步。

### 附图说明

[0041] 为了使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合附图对本发明方法作进一步的详细描述,其中:

[0042] 图1为采用不同变性温度的BrdU<sup>+</sup>/DAPI<sup>+</sup>免疫荧光图。

[0043] 图2为采用不同变性温度的BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup>/DAPI<sup>+</sup>免疫荧光图。

### 具体实施方式

[0044] 以下将参照附图,对本发明方法的优选实施例进行详细的描述。

[0045] 本实施例采用本发明改良的免疫荧光染色方法对SD大鼠脑组织冰冻切片进行BrdU、DCX、DAPI染色,并与常规方法进行比较。

[0046] 实验动物:SD大鼠5只,由重庆医科大学实验动物中心提供。

[0047] 实验试剂:兔抗鼠BrdU单克隆抗体和兔抗鼠DCX单克隆抗体为Abcam公司产品,BrdU为索莱宝公司产品,DAPI为碧云天公司产品,二抗山羊抗兔Alexa Fluor 488488和山羊抗小鼠Alexa Fluor 594为中杉金桥生物公司,山羊血清封闭液为中杉金桥生物公司,PBS粉末购于武汉博士德生物公司。

[0048] 实验设备:Al+R荧光共聚焦(Nikon公司,日本),LIBROR AEG-220电子天平(SHIMADZU公司,日本),倒置显微镜(Olympus公司,日本),-80℃超低温冰箱(Thermo公司,美国)

[0049] 实验方法:包括以下步骤:

[0050] 1) 大鼠大脑中动脉闭塞/再灌注模型的建立:大鼠MCAO/R模型制备,选用进口鱼线,直径0.23-0.26mm,长5.0cm,1.6-1.8cm处做黑色标记,乙醇消毒后备用。麻醉:腹腔注射10%水合氯醛0.3ml/100g麻醉后。消毒后颈部正中切口,分离右侧颈总动脉和颈内外动脉,结扎颈总动脉近心端及颈外动脉远心端,在颈内动脉远端放置动脉夹,颈总动脉分叉处剪开,向颈内动脉插入鱼线1.6-1.8cm,结扎颈总动脉并固定鱼线,外留10mm线头,缝合皮肤。缺血60min后,将线栓退出至颈总动脉结扎处进行再灌注,术后维持大鼠体温,自由饮食。假手术组只分离右侧颈总动脉及颈内外动脉,但不插线。

[0051] 2) 造模成功30min后腹腔注射以100mg/kg BrdU,每天一次,连续注射7天,造模后14天经麻醉、开胸,主动脉插管,灌流取脑,4%多聚甲醛固定24h,蔗糖梯度脱水沉底后,制成10um厚的脑组织冰冻切片。

[0052] 3) 荧光步骤如下:

[0053] a、破膜:取组织切片室温下晾15分钟,然后加0.4%triton室温下反应20分钟。

[0054] b、修复:经过步骤a处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,用0.01mmol/L枸橼酸盐进行微波热修复,大火5分钟,小火20分钟,待自然冷却约1h。

[0055] c、变性:经过步骤b处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,加2M HCL于4℃下作用30分钟。

[0056] d、复性:经过步骤c处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,加0.01M Tris-HCL室温下

反应10分钟。

[0057] e、封闭:经过步骤d处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,山羊血清封闭2小时。

[0058] f、孵一抗:经过步骤e处理后的组织切片甩掉多余山羊血清,不洗,加BrdU、BrdU/DCX单抗体4℃孵育过夜。

[0059] g、孵二抗:经过步骤f处理后的组织切片37℃复温1小时,加二抗37℃孵育1小时。

[0060] h、复核:经过步骤g处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,DAPI复染胞核5-8分钟。

[0061] i、封片:经过步骤h处理后的组织切片PBS洗5分钟/3次,甘油封片,共聚焦观察,拍照。

[0062] j、统计:每只大鼠随机选取2张切片,每张切片选取2个视野进行观察统计。

[0063] 实验结果:

[0064] 采用不同的变性温度方法进行BrdU的免疫荧光染色,各组的表达情况见图1、2。

[0065] 37°变性:结果显示BrdU阳性标记定位模糊不明确,与之双标的标志物DCX不能正常显色,DAPI亦不能正常显色,模糊不清,呈云雾状(图1A,B,C;图2A,B,C,D)。

[0066] 常温变性:结果显示BrdU阳性标记定位明确,与之双标的标志物DCX显色较模糊,DAPI显色不稳定,荧光亮度偏暗,但较37°变性法好(图1D,E,F;图2E,F,G,H)。

[0067] 4°变性:结果显示BrdU阳性标记定位明确,与之双标的标志物DCX显色效果好,DAPI显色效果也好,且荧光亮度适中,优于常温变性(图1G,H,I;图2I,J,K,L)。

[0068] 综上所述,不同变性温度检测结果显示4°变性法进行BrdU的免疫荧光染色效果最好。

[0069] 实验结论:

[0070] 本发明方法无论是单标、双标还是三标染色均具有非常好的染色效果,成果率高达95%以上,重复性好,操作简单且节约实验时间。

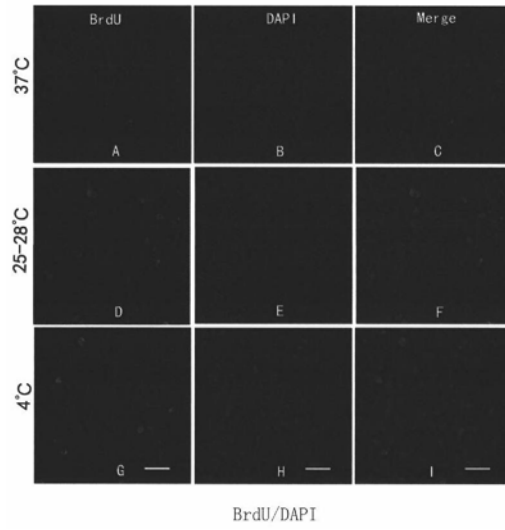


图1

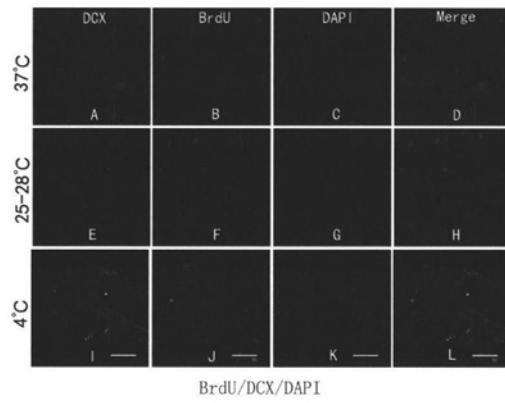


图2

专利名称(译)	BrdU标记免疫荧光检测细胞增殖的改良方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107703292B</a>	公开(公告)日	2019-07-12
申请号	CN201610646905.5	申请日	2016-08-09
[标]申请(专利权)人(译)	杨琴		
申请(专利权)人(译)	杨琴		
当前申请(专利权)人(译)	杨琴		
[标]发明人	杨琴 余萍萍		
发明人	杨琴 余萍萍		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/532 G01N33/53 G01N1/30		
CPC分类号	G01N1/30 G01N33/5306 G01N33/532 G01N33/533		
审查员(译)	张婷		
其他公开文献	CN107703292A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种免疫荧光检测BrdU标记增殖细胞的改良方法。将变性温度固定在4°C，复性统一采用0.01M Tris-HCL处理，之后进行单标、双标及三标染色，并与常规方法进行比较。结果显示本发明方法具有非常好的染色效果，成功率高，重复性好，操作简单且节约实验时间。

