

## 细胞增殖的流式检测 (BrdU 法)

### BrdU Assay for Cell Proliferation Analysis by Flow Cytometry

丁宇波, 王雪冬, 边玮\*

细胞分析技术平台, 中国科学院生物化学与细胞生物学研究所, 上海

\*通讯作者邮箱: [weibian@sibcb.ac.cn](mailto:weibian@sibcb.ac.cn)

引用格式: 丁宇波, 王雪冬, 边玮. (2019). 细胞增殖的流式检测 (BrdU 法). *Bio-101* e1010330. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010330.

How to cite: Ding, Y. B., Wang, X. D. and Bian, W. (2019). BrdU Assay for Cell Proliferation Analysis by Flow Cytometry. *Bio-101* e1010330. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010330. (in Chinese)

**摘要:** 细胞增殖是生物体的重要生命特征, 细胞以分裂的方式进行增殖。研究细胞增殖, 对于理解细胞发育和分化, 探索肿瘤发生和治疗, 以及评估细胞健康状况和药物安全性评价等都具有重要意义。在检测细胞增殖的多种方法中, 直接测定 DNA 合成是一种敏感并高精度的分析方法。5-溴-脱氧尿嘧啶核苷 (Bromodeoxyuridine, BrdU), 是一种胸腺嘧啶核苷的类似物。当细胞处于细胞周期中的 DNA 合成期 (S 期) 时, BrdU 可以掺入到新合成的 DNA 中。利用抗 BrdU 的单克隆抗体荧光染色, 就可通过流式细胞术检测 BrdU 的含量, 从而定量细胞群体的增殖情况 (Davies 和 Allen, 2007)。另外, 结合核酸染料测定单个细胞的 DNA 含量, 还可以定性特定细胞在细胞周期中的具体进程。该实验方案中, 运用脱氧核糖核酸酶 DNase I 消化解开 DNA 双链, 使抗体与 DNA 链上的 BrdU 得以接近和结合。与传统的醇固定和强酸变性处理的方法相比, 该方案更温和, 可同时对细胞表面及胞内的其他标记物进行多色流式分析。

**关键词:** 细胞增殖检测, 细胞周期, 5-溴-脱氧尿嘧啶核苷 (Bromodeoxyuridine, BrdU), 脱氧核糖核酸酶 DNase I, 流式细胞术

#### 材料与试剂

1. 15 ml 离心管 (BD Falcon, catalog number: 352097)
2. 12 × 75 mm 的 5 ml 聚苯乙烯流式管 (BD Falcon, catalog number: 352008)
3. 200 目过滤尼龙网

4. 0.22  $\mu\text{m}$  滤器 (Pall, catalog number: 4612)
5. HeLa 细胞
6. 脱氧核糖核酸酶 DNase I (Promega, catalog number: M6101)
7. 胎牛血清 FBS (杭州四季青)
8. 小鼠抗 BrdU 单克隆抗体, 克隆号 Bu20a (Cell Signaling Technology, catalog number: 5292)
9. Alexa Fluor<sup>TM</sup>488 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗 (Invitrogen, catalog number: A11001)
10. 核糖核酸酶(RNase) (Roche, catalog number: 11119915001)
11. 5-溴-脱氧尿嘧啶核苷(BrdU) (Roche, catalog number: 10280879001)
12. 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) (Sigma-Aldrich, catalog number: D8417)
13. 7-氨基放线菌素 (7-AAD) (BD Pharmingen, catalog number: 559925)
14. 皂甙 Saponin (Sigma-Aldrich, catalog number: 47036)
15. 碘化丙啶 (PI) (Sigma-Aldrich, catalog number: P4170)
16. NaCl
17. KCl
18.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
19.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
20. 多聚甲醛 (PFA) (Sigma-Aldrich, catalog number: 76240)
21. 1 $\times$  PBS 磷酸盐缓冲液 (见溶液配方)
22. BrdU 溶液 (见溶液配方)
23. 10% PFA 储液 (见溶液配方)
24. 10% Saponin 储液 (见溶液配方)
25. 固定/通透液 4% PFA/1% Saponin (见溶液配方)
26. 通透液 1% Saponin (见溶液配方)
27. 染色缓冲液 3% FBS/0.5% Saponin (见溶液配方)
28. PI 染色液 (见溶液配方)
29. 7-AAD 染色液 (见溶液配方)
30. DAPI 染色液 (见溶液配方)

## 仪器设备

1. -80 °C 冰箱 (Thermo, model: 905)
2. 二氧化碳培养箱 (Heraeus, model: HERAcell 150)
3. 旋涡混匀器 (Scientific Industries, model: Vortex-Genie 2)
4. 水浴锅 (精宏, model: DK-80)
5. 恒温磁力搅拌器 (虹浦, model: 85-2 型)
6. 电子天平 (METTLER-TOLEDO, model: PB602-S)
7. pH 计 (METTLER-TOLEDO, model: FE-20)
8. 台式冷冻离心机 (Eppendorf, model: 5810R, 配 A-4-62 水平转子)
9. 流式细胞分析仪 (BD LSRFortessa, 配有 355 nm/405 nm/488 nm/561 nm/638 nm 五根激光器)

## 软件

1. FlowJo 软件

## 实验步骤

### 1. BrdU 掺入

处于对数生长期的 HeLa 细胞, 培养液中加入终浓度 10  $\mu$ M 的 BrdU, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续在 37 °C 下避光培养 60 分钟。同时, 培养一份未加入 BrdU 的细胞, 此后的实验处理与掺入组保持一致, 作为实验对照用于流式分析时确定 BrdU 的阳性圈门位置。

*注: 根据细胞和实验目的不同, 具体的孵育时间可为 30 分钟至 48 小时。在不同时间点短时间掺入 (一般为 30 分钟到 2 小时), 可以分析细胞周期。长时间如 24 小时以上持续的 BrdU 掺入可以用于确定和分析处于 DNA 合成活跃状态的细胞, 将其与静止期细胞区分开来, 从而进行增殖细胞比例的分析。针对具体的细胞类型和状态, BrdU 的掺入浓度和培育时间需进行预实验测试确定。实验中, 我们对生长旺盛状态的 HeLa 细胞加 10  $\mu$ M BrdU 处理一小时, 掺入效果显著。*

### 2. 终止掺入, 收集细胞

2.1 吸净含有 BrdU 的培养液, PBS 清洗细胞两次, 用 0.05%胰酶消化细胞, 得到

的单细胞悬液收集至 15 ml 离心管中，细胞计数确定细胞数量。

2.2 4 °C，300 × g 离心 5 分钟，弃上清。

2.3 用 1× PBS 重悬细胞，依据细胞数量调整重悬体积，使细胞浓度控制在约 2 × 10<sup>7</sup> 细胞/ml。

2.4 分装细胞，每个 15 ml 离心管中装 50 μl 细胞悬液作为一个反应体系。

可选：如想对细胞表面标记进行染色可在此步进行。

*注：消化时不可过度吹打细胞，注意离心转速，操作中减少细胞碎片的产生。如要做表面蛋白染色，可改用 0.5 mM EDTA/PBS，37 °C 孵育 10 分钟，再吹打细胞，以获得单细胞悬液。做好细胞计数，确保不同处理的样品用于流式染色的细胞数保持一致。*

### 3. 细胞固定与通透

3.1 1 ml 1× PBS 清洗细胞，4 °C，300 × g 离心 5 分钟，弃上清。

3.2 先用旋涡混匀器中速转动，将沉在管底的细胞轻轻重悬弹起，再逐滴加入 100 μl 固定/通透液，充分混匀后，置冰上避光孵育 30 分钟。

3.3 清洗，加入 1 ml 染色缓冲液，4 °C，300 × g 离心 5 分钟，弃上清。

可选：该步骤固定清洗后的细胞，可于 4 °C 避光保存，72 小时内继续后面的染色过程即可。这对实验中需要比较加药处理不同时间点的样品，较为适用。

*注：固定及通透步骤对于胞内染色至关重要，为确保工作溶液的稳定和实验的重复性，推荐实验前新鲜配制，并于 4 °C 避光保存。*

### 4. 通透

细胞轻轻重悬弹起，加入 100 μl 通透液，充分混匀后，室温避光孵育 10 分钟。

### 5. 清洗

加入 1 ml 染色缓冲液，4 °C，300 × g 离心 5 分钟，弃上清。

### 6. 二次固定

重复第 3 步固定与通透过程，100 μl 固定/通透液，置冰上避光孵育 30 分钟。同第 5 步方法，清洗一次。

### 7. 脱氧核糖核酸酶 DNase I 处理

细胞轻轻重悬弹起，加入 500 μl DNase I 反应缓冲液，充分混匀后，加入 25 μl DNase I，放入 37 °C 水浴锅中避光反应 45 分钟。同第 5 步方法，清洗两次。

## 8. 一抗标记

小鼠抗 BrdU 单克隆抗体 1:200 稀释于染色缓冲液中。细胞轻轻重悬弹起，加入 50  $\mu$ l 一抗反应液，充分混匀后，置冰上避光孵育 45 分钟。同第 5 步方法，清洗两次。

## 9. 荧光二抗标记

Alexa Fluor™488 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗 1:500 稀释于染色缓冲液中。细胞轻轻重悬弹起，加入 50  $\mu$ l 二抗反应液，充分混匀后，置冰上避光孵育 20 分钟。同第 5 步方法，清洗两次。

## 10. 核酸染料染色，检测单个细胞的 DNA 含量

细胞轻轻重悬弹起，再加入 100  $\mu$ l 染色液，充分混匀后，室温避光孵育 30 分钟。加入 0.5 ml 染色缓冲液，无需清洗，样品经 200 目尼龙网过滤后转移至流式管，放置冰上，等待上机检测。

*注：常见的 DNA 染料如 PI、7-AAD 和 DAPI，均可用来与 BrdU 结合分析细胞周期。这三种染料的最大激发和发射波长分别为 PI 538 nm/ 617 nm，7-AAD 545 nm/ 650 nm 和 DAPI 359 nm/ 461 nm。实验设计中，可根据流式细胞仪的配置和蛋白标记物染色所用的荧光素，灵活选择。*

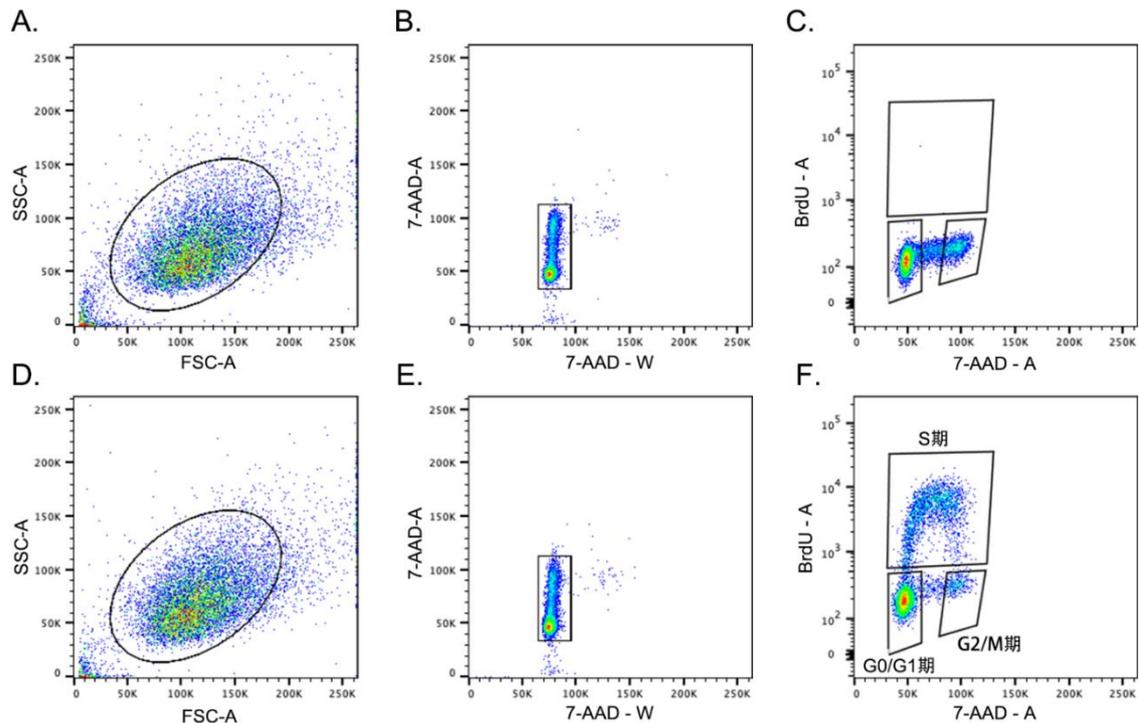
## 11. 上机，采集流式数据分析样本

实验中所用的 BD LSRFortessa 流式细胞分析仪，配有 355 nm/405 nm/488 nm/561 nm/638 nm 五根激光器。根据细胞仪配置，BrdU 的信号由 Alexa Fluor™488 荧光信号标记，用 488 nm 激光器激发，采集 530/30 波段的信号。PI 的信号，用 561 nm 激光器激发，采集 610/20 波段。7-AAD 的信号，用 561 nm 激光器激发，采集 670/30 波段。DAPI 的信号，用 355 nm 激光器激发，采集 450/50 波段。

*注：为确保分析精度，检测细胞浓度应调整为  $0.5\sim 2 \times 10^6/ml$ ，进样速度为低速，每秒事件数不大于 400，记录总数不小于 20,000 细胞。分析时通过 DNA 染料的荧光脉冲信号的宽度和面积，区分样本中的粘连细胞群体，最大程度的减少粘连细胞的影响。DNA 染料，特别是 PI 具有较强的粘性，样本上机检测之后，必须仔细清洗流式细胞仪，以免对后续的检测造成影响。*

## 结果与分析

流式细胞仪上采集的数据导出后,运用 FlowJo 软件分析,具体流程及结果如图 1 所示。



**图 1. BrdU 法检测 HeLa 细胞的细胞增殖.** (A-C) 为没有 BrdU 掺入的对照组; (D-F) 为 10  $\mu$ M BrdU 孵育 60 分钟后收集的细胞。(A 和 D) 通过前、侧向散射光信号 FSC 和 SSC 散点图,排除细胞碎片,圈出主群细胞。(B 和 E) 通过 DNA 染料 7-AAD 的荧光脉冲信号的宽度 W 和面积 A,进一步排除样本中的粘连体,圈出单细胞群体。(C 和 F) 使用 BrdU (对数显示) 和 7-AAD (线性显示) 的散点图显示细胞周期分布,实验组 (F) 呈现典型的马蹄形分布。通过对照 (C) 确定 BrdU 阳性信号的位置,可以在 (F) 上清楚的区分出 G0/G1 期、G2/M 期和 S 期,S 期比例体现细胞增殖的状态,不同细胞周期的细胞分群明显。

## 溶液配方

### 1. 1x PBS 磷酸盐缓冲液

- 1) 800 ml 蒸馏水中溶解 NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g
- 2) 调节 pH 值到 7.2~7.4

- 3) 加去离子水定容至 1 L
- 4) 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后, 室温保存
2. BrdU 溶液  
BrdU 溶于 1 $\times$  PBS 配成 10 mg/ml 储液, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌, 分装成 31  $\mu\text{l}$ /管, 保存于-80  $^{\circ}\text{C}$ , 避免反复冻融  
实验前, 于冰上解冻, 每 31  $\mu\text{l}$  加入 1 ml 1 $\times$  PBS 稀释成 1 mM 工作液备用
3. 10% PFA 储液
  - 1) 预先加热 80 ml 去离子水, 烧杯放于通风橱内的磁力搅拌器上, 确认水温低于 60  $^{\circ}\text{C}$
  - 2) 称取 10 g 多聚甲醛加入热水中, 缓慢搅拌, 滴加约 200  $\mu\text{l}$  10 N NaOH 使溶液变为碱性以助溶
  - 3) 磁力搅拌器加热使溶液温度维持在 50  $^{\circ}\text{C}$  左右, 持续搅拌约 1 小时, 溶液澄清, 显示 PFA 充分溶解
  - 4) 停止加热, 加入 10 ml 10 $\times$  PBS, 待溶液冷却至室温, 加入盐酸调整 pH 值至 7.2~7.4, 加去离子水定容到 100 ml
  - 5) 分装成 4 ml/管, 冻存于-20  $^{\circ}\text{C}$ , 避免反复冻融
  - 6) 使用前, 在室温充分融化后备用
4. 10% Saponin 储液  
用去离子水配制, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌, 4  $^{\circ}\text{C}$  避光保存
5. 固定/通透液 4% PFA/1% Saponin  
将 10% PFA 和 10% Saponin 的储液稀释配制于 1 $\times$  PBS 溶液中, 实验前新鲜配制, 4  $^{\circ}\text{C}$  避光保存
6. 通透液 1% Saponin  
实验前于 1 $\times$  PBS 溶液中新鲜配制, 4  $^{\circ}\text{C}$  避光保存
7. 染色缓冲液 3% FBS/0.5% Saponin  
于 1 $\times$  PBS 溶液中配制, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后备用
8. PI 染色液  
50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNase 于 1 $\times$  PBS 溶液中配制
9. 7-AAD 染色液

储液为 1 mg/ml 溶于 DMSO，4 °C 避光保存

染色时以 1:1,000 稀释于 1× PBS 溶液

#### 10. DAPI 染色液

储液为 5 mg/ml 溶于去离子水，4 °C 避光保存

染色时以 1:1,000 稀释于 1× PBS 溶液

### 致谢

感谢中国科学院生物化学与细胞生物学研究所细胞分析技术平台全体成员的建议和帮助。该研究受国家自然科学基金 (31401157-丁宇波) 的支持。本方法参考改编自 2006 年发表在 *Cytometry Part A* 的 *Evaluation of intranuclear BrdU detection procedures for use in multicolor flow cytometry* (Rothaeusler 和 Baumgarth, 2006)。

### 参考文献

1. Davies, D. and Allen. P. (2007). [Chapter 7: DNA Analysis by Flow Cytometry](#). In: *Flow Cytometry. Principles and Applications*. Totowa, New Jersey: Humana Press. ISBN: 978-1-58829-691-7.
2. Rothaeusler, K. and Baumgarth, N. (2006). [Evaluation of intranuclear BrdU detection procedures for use in multicolor flow cytometry](#). *Cytometry A* 69(4): 249-259.