

# Tools for Assessing Cell Events

## Life, Death, and Cell Proliferation

### Cell Proliferation

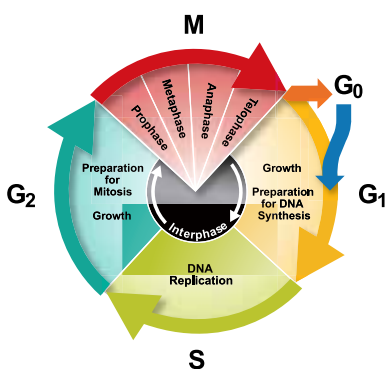
是指細胞生長、分裂導致細胞數目變多；可藉由細胞週期 (cell cycle) 來調控。在原核細胞，cell cycle 主要藉由分裂生殖 (binary fission) 來完成；在真核細胞，cell cycle 主要可分成兩個階段：

#### 1. 間期 (Interphase)：

在此時期，細胞生長、累積進行有絲分裂所需要的養分及複製 DNA。

#### 2. 分裂期 (Mitosis Phase)：

細胞在這個時候，分裂成兩個子細胞。藉由 cell cycle，生物體可以由單一受精卵變成一個成熟的個體。並且藉此，生物體可以在生長發育時，更新毛髮、皮膚、血球及一些器官和組織。



狀態	期間	簡稱	說明
靜止 / 老化 (quiescent/senescent)	Gap 0	G0	休止期；細胞離開週期階段，停止分裂生長。
	Gap 1	G1	細胞變大；合成 RNA 及蛋白質，預備進行 DNA 合成。
	Synthesis	S	此時 DNA 進行複製。
間期 (Interphase)	Gap 2	G2	在 DNA 合成和有絲分裂之間，細胞繼續成長。準備進入分裂期進行分裂。
	Mitosis and cytokinesis	M	這個時期，細胞停止生長。細胞集中進行有絲分裂，由一個母細胞變成兩個子細胞。

\* 參考資料：維基百科

## Cell cycle and proliferation 研究方法一覽表

測定標的	試劑	作用機轉	分析技術	樣本形式	相關產品	
					品名	貨號
DNA	Propidium Iodide (PI), 7-aminoactinomycin D (7-AAD)	嵌入 DNA 雙股	流式細胞儀	想分辨存活的完整細胞 (即使有固定打洞)。	Propidium Iodide Staining Solution	556463
					PI/RNase Staining Buffer	550825
					7-AAD	559925
細胞染劑	BD Horizon™ violet proliferation dye 450 (VPD450)	可擴散進入活細胞 內，和非特異性的 脂酶 (non-specific esterases) 水合，變成 會發螢光的產物。	流式細胞儀	正在增生的活細胞	Violet Proliferation Dye 450	562158
新合成 DNA	BrdU and antibodies to BrdU	在新合成 DNA 時， 用 Bromodeoxyuridine (BrdU) 取代 thymidine (T)。BrdU 可以被 BrdU 的抗體偵測。	流式細胞儀、細胞影 像、免疫組織化學染色	已固定打洞的細胞及處 理過的組織 (僅限細胞 影像、免疫組織化學染 色)	APC BrdU Flow Kit	552598
					FITC BrdU Flow Kit	559615
					BrdU In-Situ Detection Kit	550803
蛋白質階段	Ki67 及 PCNA 的抗體	當表現增加的時候， 代表有細胞增生的現 象。	流式細胞儀、生物影 像、免疫組織化學染 色、西方墨點法	已固定的細胞、組織和 萃取物	FITC Mouse Anti- Human Ki-67 Set	556026
					PE Mouse Anti- Human Ki-67 Set	556027
					FITC Mouse Anti- Human PCNA Set	556030
					PE Mouse Anti- Human PCNA Set	556031
					品項眾多，無法一一列入*	
蛋白質階段	Cyclins、 Retinoblastoma (Rb) 或其他 cell cycle marker 的抗體	在 cell cycle 不同週 期，這些蛋白的表現 會增加或減少。	流式細胞儀、生物影 像、免疫組織化學染 色、西方墨點法	已固定的細胞、組織和 萃取物	FITC Mouse Anti- Human Cyclin A Set	554107
					FITC Mouse Anti- Human Cyclin D3 Set	554111
					FITC Mouse Anti- Underphosphorylated Retinoblastoma (Rb) Set	550501
					FITC Mouse Anti- Retinoblastoma (Rb) Set	556538
					品項眾多，無法一一列入*	
蛋白質修飾	Phosphorylated histone H3、Cyclin Dependent Kinases (cdk) 的抗體	在 cell proliferation 或 cell cycle 不同時期進 行，這些蛋白會磷酸 化。	流式細胞儀、生物影 像、免疫組織化學染 色、西方墨點法	已固定的細胞、組織和 萃取物	Alexa Fluor® 488 Rat anti-Histone H3 (pS28)	558610
					Alexa Fluor® 555 Rat anti-Histone H3 (pS28)	558613
					V450 Rat Anti-Histone H3 (pS28)	560606
					Alexa Fluor® 647 Rat anti-Histone H3 (pS28)	558609
					品項眾多，無法一一列入*	
BD CBA (定量)			流式細胞儀	已固定的細胞、組織和 萃取物	品項眾多，無法一一列入*	

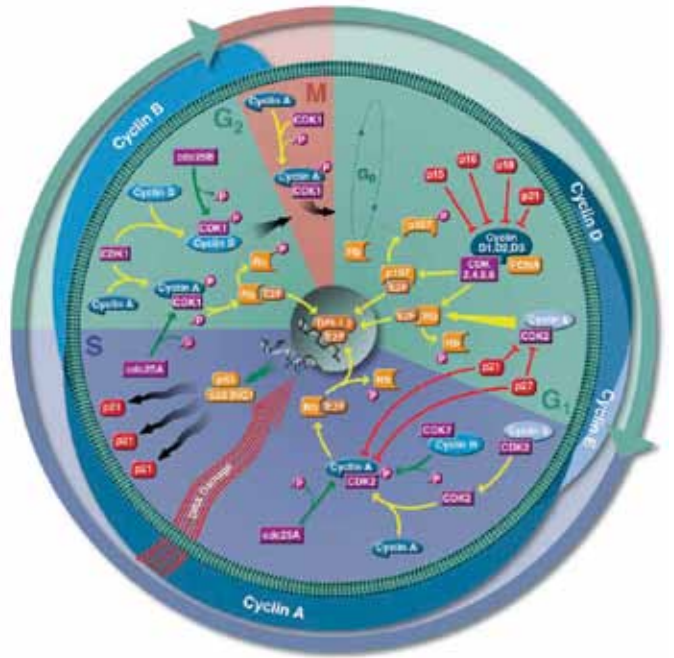
\* 品項眾多，無法詳列，請至 BD 網站 <http://www.bdbiosciences.com/home.jsp> 或洽騰達行業專員



BD Bioscience 提供了最新穎的技術平台及高品質的試劑來偵測細胞週期、細胞增生及細胞凋亡。從基礎研究到新藥篩選等方面皆適用，可以應用範圍相當廣泛。



# 武功秘笈 大公開



## BrdU Interphase 標定分析

對於細胞功能 (Cell Function) 研究，Cell Proliferation 的偵測是很重要的。有很多方法可以來偵測 Cell Proliferation，包括了使用放射性  $[3H]$ -thymidine。

在 1982 年，Gratzner 等人，發表了可以偵測細胞週期 S 期 (合成期) 的方式。就是在實驗中加入 thymidine 的類似物，Bromodeoxyuridine (BrdU)。在 S 期的時候，BrdU 可以代替 thymidine，嵌入新合成的 DNA 內。再用 BrdU 的抗體與其結合，以流式細胞儀 (Flow Cytometry) 或免疫化學染色 (Immunohistochemistry) 等常用的細胞分析方式來系列量化 BrdU-positive cell，進而得知細胞週期 S 期的表現。

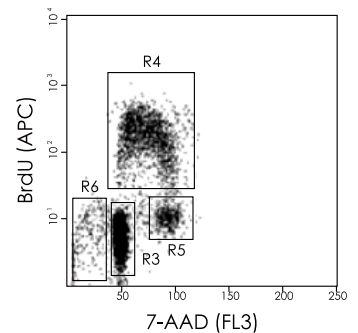
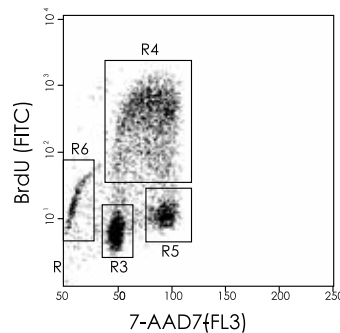
### 分析方式 流式細胞儀 (Flow Cytometry)

#### Cell cycle analysis of a population stained for incorporated BrdU and total DNA levels (7-AAD).

Human PBMC 用 anti-CD3 和 anti-CD28 刺激 48 小時後，再用 PMA、Ionomycin 處理 4 小時。在最後一個小時，加入 BrdU。收集細胞後進行 BrdU 染色步驟。

- 可與其他抗體一起進行染色，實驗設計更彈性
- 可用於 96-well plate 的染色分析

Region	Cell Cycle Phase
R3	G0/G1
R4	S
R5	G2+M
R6	Sub-G0/G1



#### 訂購資訊

品名	內容物	包裝	貨號
FITC BrdU Flow Kit	FITC-conjugated Anti-BrdU Antibody, BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution,	50 tests	559619
FITC BrdU Flow Kit	BD Perm/Wash™ Buffer (10×), BD Cytoperm™ Plus Permeabilization Buffer, 7-AAD, BrdU, Dnase	200 tests	557891
APC BrdU Flow Kit	APC-conjugated Anti-BrdU Antibody, BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution,	50 tests	557872
APC BrdU Flow Kit	BD Perm/Wash™ Buffer (10×), BD Cytoperm™ Plus Permeabilization Buffer, 7-AAD, BrdU, Dnase	200 tests	557892

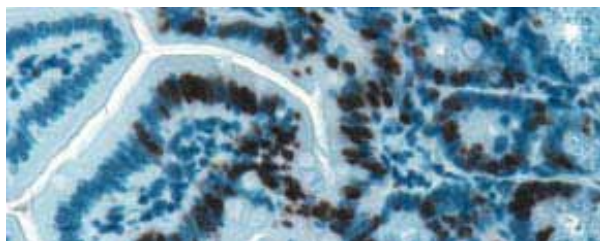
品名	包裝	貨號
BrdU Solution	25 mg	550891
Purified Mouse Anti- BrdU	100 ug	555627

## 分析方式 免疫組織化學染色 (Immunohistochemistry)

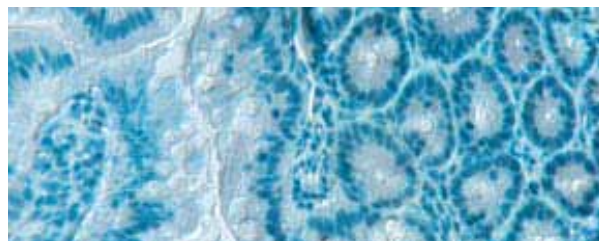
### Immunohistochemical staining of BrdU in paraffin sections

將 1mg BrdU 以 IP 方式打入 BALB/c mice，24 小時後取出腸胃道細胞製作成 paraffin 檢體。用 BrdU in situ kit 進行染色。

- 用可於所有的物種及固定方式
- 可維持組織型態
- 可於其他 IHC 抗體一起染色



深藍色點代表可以在正在增殖的細胞的核內偵測到 BrdU 的存在。



注射生理水的陰性對照組。

#### 訂購資訊

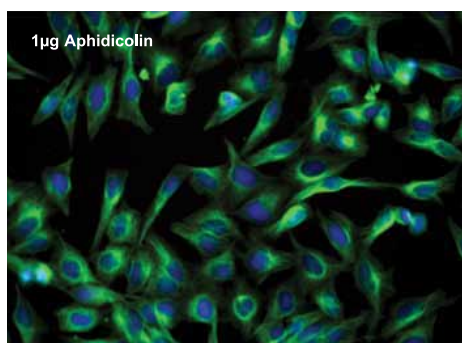
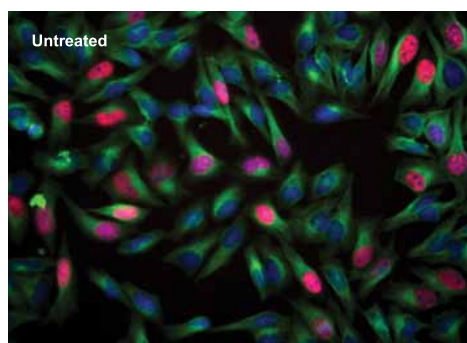
品名	內容物	包裝	貨號
BrdU In-situ Detection Kit	Biotinylated Anti-BrdU Antibody, Diluent Buffer, BD™ Retrieval A, Solution 1, BD™ Retrieval A, Solution 2,	50 slides	550803
BrdU In-situ Detection Kit II	Fixation Buffer, DAB Chromogen, DAB Buffer, Streptavidin-HRP, Control Slides	200 slides	551321

## 分析方式 生物影像 (Bioimage)

### Cell cycle analysis of HeLa cells monitored by BrdU staining.

HeLa cells 用 Aphidicolin (DNA polymerase inhibitor) 刺激後，用 BrdU 染色分析。細胞影像以 BD Pathway™ 855 bioimaging system 偵測後，用 BD Attovision™ 軟體分析。

- **BD Pharmingen / Bioimaging Certified Reagent**



Hoechst – Blue  
BrdU – Red  
Histone H3 (pS28) – Yellow  
Tubulin – Green

#### 訂購資訊

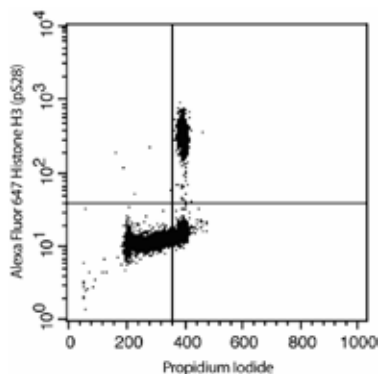
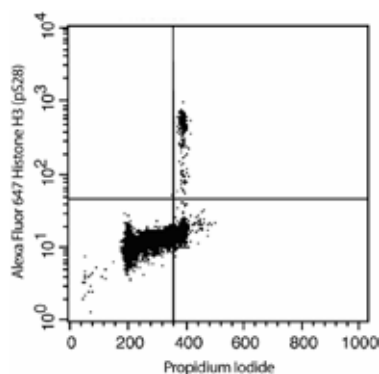
品名	包裝	貨號
Alexa Fluor® 488 Mouse anti-BrdU	100 tests	558599
Alexa Fluor® 555 Mouse anti-BrdU	100 tests	560210
Alexa Fluor® 647 Mouse anti-BrdU	100 tests	560209



# Histone H3

## Mitotic phase 標定分析

Histone 會和 DNA 複合形成染色質 (Chromatin)。Histone H3 蛋白質大小約 15kDa，在哺乳類動物細胞進行有絲分裂或減數分裂時候，會在 serine 28 (S28)、S10 和 threonine 11 等位置會磷酸化。S10 會在 G2 phase 晚期到 anaphase 期間發生磷酸化；S28 會在 prophase 到 anaphase 期間發生磷酸化。



Mouse cytotoxic T cell line 用 1  $\mu$ g/ml 的 demecolcine (microtubule depolymerizer) 處理 4 hrs。可以發現，跟未經處理的組別比較，M phase 的細胞比例，從 20% 增加到 52%。M phase 的細胞上，Histone H3 (pS28) 的表現，也從 15% 增加到 51%。

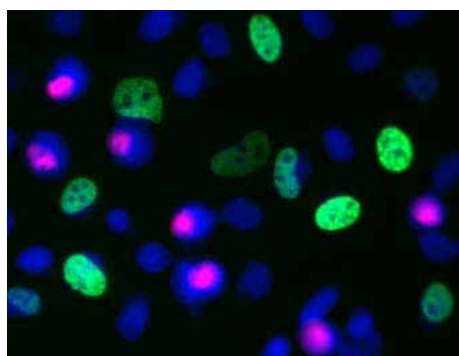
### 訂購資訊

品名	包裝	貨號
Alexa Fluor® 647 Rat anti-Histone H3 (pS28)	50 tests	558217
Alexa Fluor® 555 Rat anti-Histone H3 (pS28)	100 tests	558613
Alexa Fluor® 647 Rat anti-Histone H3 (pS28)	100 tests	558609
Alexa Fluor® 488 Rat anti-Histone H3 (pS28)	100 tests	558610
V450 Rat Anti-Histone H3 (pS28)	50 tests	560606



# Cell Cycle Kit

## 高通量 快速篩檢



Confocal image, using the BD Pathway™ 435 Bioimaging system and a 20x (0.75 NA) objective, of HeLa cells that were stained with the three kit components, Alexa Fluor® 488 Mouse anti-BrdU (pseudo-colored green), Alexa Fluor® 647 Rat anti-Histone H3 (pS28) (pseudo-colored red) and Hoechst 33342 (pseudo-colored blue). Co-staining of Hoechst 33342 and Histone H3 (pS28) appears pink.

### 訂購資訊

品名	內容物	包裝	貨號
Cell Cycle Kit	Alexa Fluor® 488 Mouse anti-BrdU Alexa Fluor® 647 Rat anti-Histone H3 (pS28) 5x Fixation Buffer Perm Buffer II Stain Buffer (FBS) PBS (10X) Concentrate Hoechst 33342 Solution BRDU DNase	100 tests	558662

建議搭配產品：BD Falcon 96-Well Imaging Plate(353219)  
BD Falcon 384-Well Imaging Plate(353962)



# Violet Proliferation Dye 450

## New Tool to Determine Cell Divisions

BD Horizon™ Violet Proliferation Dye 450 (VPD450) 是種紫光雷射 (violet laser) 激發的酯化染劑，可以用流式細胞儀分析的方式，來偵測單一細胞的細胞分裂 (cell division) 的情況。

### 原理

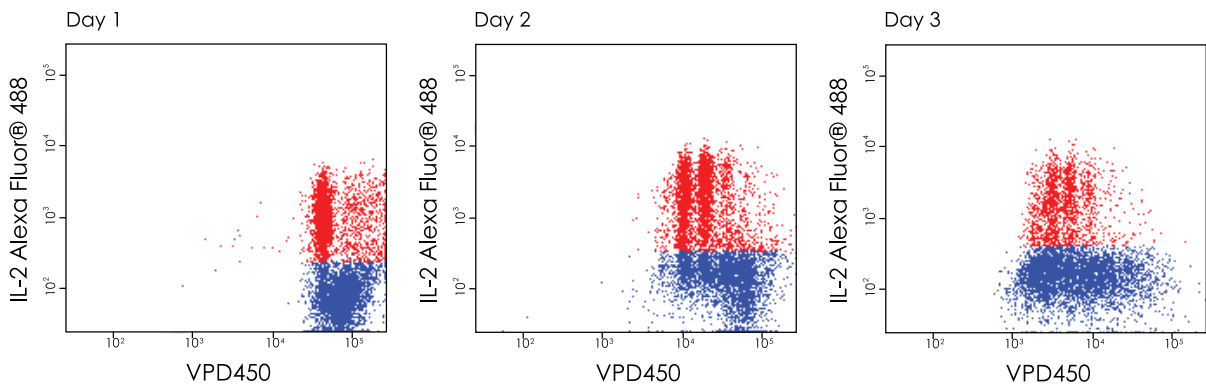
VPD450 原本是非螢光型式的染劑。其酯基 (ester group) 的部份可以讓它以被動運輸的方式進入到細胞內。當 VPD450 進入到活細胞內的時候，酯酶 (esterase) 會使其酯基裂解，使 VPD450 轉變成發螢光型式並以 succinimidyl ester group 共價鍵結細胞內的蛋白質的胺基 (amine group)。死細胞就不會發螢光。

當活細胞分裂的時候，VPD450 會平均分配到兩個子細胞裡面；每一個子細胞所含的螢光量大約為原本母細胞的螢光量一半。

VPD450 與細胞內蛋白質的共價鍵結非常堅固，即使細胞經過固定、打洞等步驟，VPD450 仍可以維持在細胞內。

### Cell cycle analysis of a population stained for incorporated BrdU and total DNA levels (7-AAD).

CD4+ enriched mouse splenocytes 加入 1 μM VPD450。10 分鐘後，細胞用 anti-CD3/CD28 刺激。在收集細胞前的 4-6 小時，細胞加入 PMA 和 Ionomycin、BD Golgi-Stop™ (protein transport inhibitor)。細胞在固定、打洞後，進行 IL-2 染色。



Features	Benefits
Amount of fluorescent per cell is halved as cells divide.	Enables measurement of cell proliferation (as CFSE).
Violet Laser Excitable	<ul style="list-style-type: none"> <li>* VPD450 can be used in multi-color assays in the presence of GFP transfected cells and/or when FITC or Alexa Fluor 488 measurements are desired.</li> <li>* Other multicolor reagents can be used to make measurements from the VPD450 population.</li> </ul>
Compatible with fixation and permeabilization.	Experimental flexibility.



- Study of Cell Division
- Study of Cell Proliferation
  - Immunology : T-reg suppression; T cell proliferation
  - Cancer Proliferation
  - Stem Cell Proliferation
  - GFP expressing Cell
- Study of Cell Cycle
- Cytotoxicity test (Target Cell Labeling)
- Lymphocyte Migration
- Pharma and CRO
  - T-cell driven antigenicity of drug candidates
  - ADNEX Tox
  - Cancer Drug Screening

### 訂購資訊

品名	包裝	貨號
BD Horizon™ Violet Proliferation Dye 450	1.0 mg	562158