

BeyoClick™ HPG-555蛋白合成检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
P1206S	BeyoClick™ HPG-555蛋白合成检测试剂盒	50-500次
P1206L	BeyoClick™ HPG-555蛋白合成检测试剂盒	200-2000次

产品简介:

- 碧云天研发生产的BeyoClick™ HPG-555蛋白合成检测试剂盒(BeyoClick™ HPG Protein Synthesis Kit with Alexa Fluor 555), 也称BeyoClick™ HPG-555新生蛋白质检测试剂盒(BeyoClick™ HPG-555 Nascent Protein Assay Kit), 是一种基于蛋白合成过程中蛋氨酸(Methionine)类似物HPG (L-homopropargylglycine)的掺入, 并通过随后的点击反应(Click reaction)使HPG被Alexa Fluor 555所标记, 从而实现简单、快速、高灵敏地检测新合成蛋白的试剂盒。
- 本试剂盒可以原位检测培养的活细胞中新生蛋白质的合成[1-2], 并可以定量检测新生蛋白质的合成。该检测过程不需要放射性同位素(如³⁵S-methionine)和抗体, 只需要简单的两步反应即可完成。新生蛋白质又称新生蛋白、新生成蛋白质、初生蛋白质或新合成蛋白。
- 经本试剂盒处理后, 有新合成蛋白的细胞在荧光显微镜下呈现非常明亮的红色荧光, 可以用于荧光显微镜、激光共聚焦显微镜或荧光酶标仪等检测, 也可以用于高内涵筛选(High-content screening, HCS)。
- HPG (L-homopropargylglycine), 中文名为L-高炔丙基甘氨酸, 是一种蛋氨酸(Methionine)即甲硫氨酸的类似物, HPG可以在蛋白合成过程中替代蛋氨酸掺入到新合成的蛋白中。另一方面, HPG上的炔基能与荧光标记的小分子叠氮化物探针(如Azide Alexa Fluor 488、Azide Alexa Fluor 555、Azide Alexa Fluor 594、Azide Alexa Fluor 647等)通过一价铜离子的催化发生共价反应, 形成稳定的三唑环, 该反应非常迅速高效, 被称作点击反应(Click reaction), 其反应原理参见图1。通过点击反应, 新合成的蛋白会被相应的荧光探针所标记, 从而可以使用适当的荧光检测设备检测到新合成蛋白。

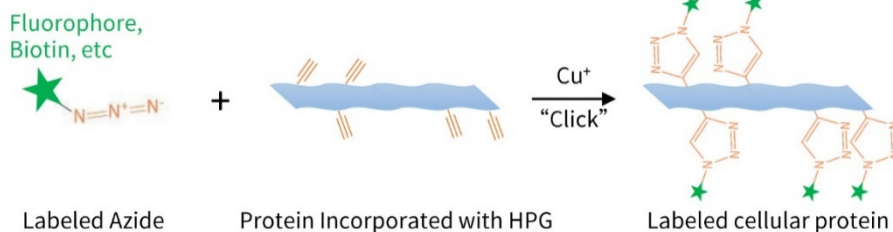


图1. 碧云天BeyoClick™系列蛋白合成检测试剂盒中的点击反应(Click reaction)原理图。荧光探针等标记的叠氮化物(Labeled Azide)与掺入到细胞蛋白中的HPG, 在铜离子的催化发生共价反应, 形成稳定的三唑环, 最终使细胞蛋白标记上荧光探针或其它探针。

- 本试剂盒反应简单、检测灵敏度高。**本试剂盒基于简单高效的点击反应, 无需特殊温度, 只需少量的小分子叠氮化物探针即可非常有效地标记掺入到新合成蛋白质的HPG, 并且可以检测到单个细胞的蛋白合成情况, 同时也能进行蛋白合成的总体定量检测。
- 本试剂盒使用便捷、兼容性好。**本试剂盒只需常用的多聚甲醛固定和Triton X-100穿透, 就可以使叠氮化物探针有效进入细胞并发生点击反应, 不会影响细胞形态, 不会产生多余的附加产物, 不会影响基于抗体的免疫荧光和免疫组化检测, 也不会影响DNA的荧光染色(如PI染色检测细胞周期、DAPI或Hoechst染料检测细胞核等)。
- 本试剂盒检测快速。**本试剂盒检测新合成的蛋白仅需1.5-2小时。本试剂盒操作流程请参考图2。

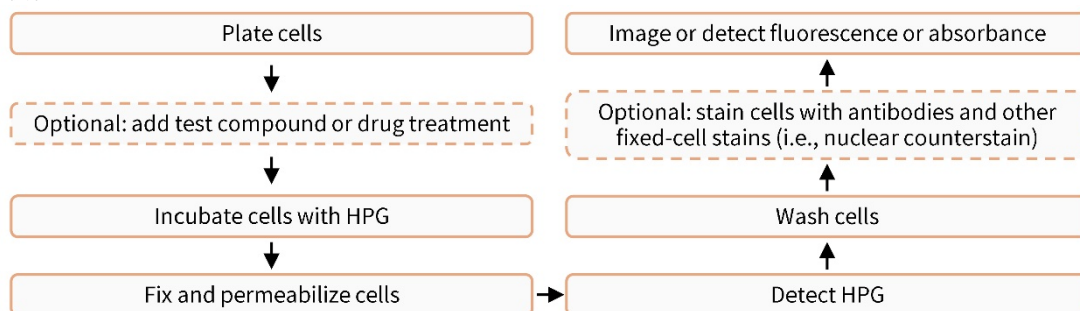


图2. 碧云天BeyoClick™系列蛋白合成检测试剂盒实验操作流程。

- 本试剂盒同时提供了染色细胞核的Hoechst 33342, 以方便染色观察所有的细胞核。HeLa细胞用本试剂盒检测新合成蛋白的效果参见图3和图4。

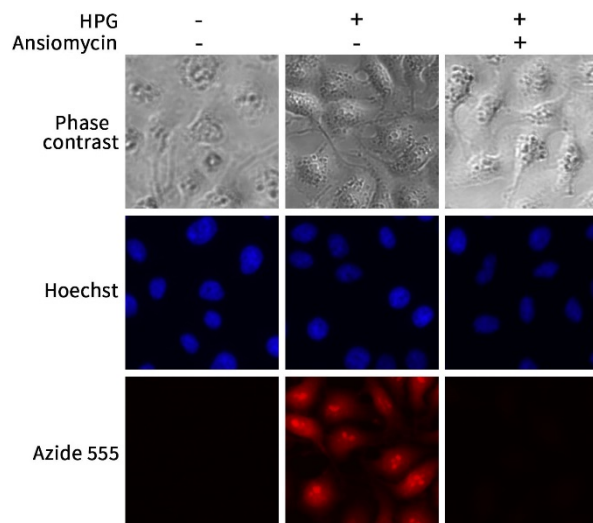


图3. 碧云天BeyoClick™ HPG-555蛋白合成检测试剂盒(P1206)用荧光显微镜检测HeLa细胞新合成蛋白的效果图。HPG孵育0.5小时后检测，无HPG组观察不到红色荧光(最左侧一列)；HPG组有明亮的红色荧光(中间一列)；而用蛋白合成抑制剂茴香霉素(Ansiomycin) (50 μ M)提前预处理0.5小时后，红色荧光显著减弱，说明蛋白合成抑制后，HPG的掺入被显著抑制(最右侧一列)。实际检测效果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中效果仅供参考。

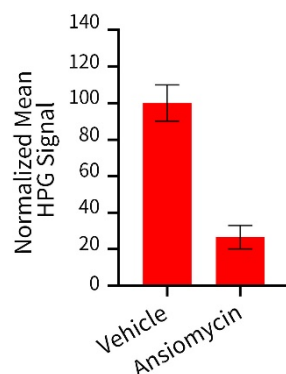


图4. 碧云天BeyoClick™ HPG-555蛋白合成检测试剂盒(P1206)检测HeLa细胞新合成蛋白的荧光酶标仪检测结果。无抑制剂组(Vehicle)荧光信号较强；用蛋白合成抑制剂茴香霉素(Ansiomycin) (50 μ M)提前预处理组荧光信号较弱。实际检测效果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中效果仅供参考。

- 本试剂盒小包装如果用于6孔板培养细胞的检测，可以检测50个样品，每个样品的反应体系为500 μ l的Click反应液；如果用于96孔板检测，可以检测500个样品，每个样品的检测体系为50 μ l的Click反应液；如果用于12孔、24孔、48孔或384孔板样品的检测，分别可以检测125、250、350和1250个样品，每个样品推荐的Click反应液用量为200 μ l、100 μ l、70 μ l和20 μ l。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P1206S-1	HPG (100X)	1.1ml
P1206S-2	Azide 555	55 μ l
P1206S-3	Click Reaction Buffer	30ml
P1206S-4	CuSO ₄	1.1ml
P1206S-5	Click Additive	2管
P1206S-6	Hoechst 33342 (1000X)	50 μ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P1206L-1	HPG (100X)	4.4ml
P1206L-2	Azide 555	220 μ l
P1206L-3	Click Reaction Buffer	120ml
P1206L-4	CuSO ₄	4.4ml
P1206L-5	Click Additive	1瓶
P1206L-6	Hoechst 33342 (1000X)	200 μ l
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。Azide 555和Hoechst 33342须避光保存。

注意事项：

- Click Additive配制成溶液后请注意适当分装冻存。如果溶解后有白色物质析出，请上下颠倒多次，待全部溶解后使用。如果该溶液颜色变成棕色，说明该组分的有效成分已失效，请弃用。
- 如果需要使用茴香霉素(Anisomycin)作为对照，可以从碧云天订购Anisomycin (JNK激活剂) (SC0132)。
- 如果需要更多HPG，可以从碧云天订购L-Homopropargylglycine (HPG) (≥98%, BioReagent) (ST2057)。
- 含蛋氨酸培养液和血清因为含正常蛋氨酸，所以会竞争性影响HPG的掺入，进而影响荧光的强度，推荐使用DMEM高糖培养液(无蛋氨酸) (C0891)或RPMI 1640培养液(无蛋氨酸) (C0893)。
- 由于动物体内无法去除内源蛋氨酸，所以本试剂盒不建议用于动物组织切片样品的检测。
- 由于本产品需要铜离子催化进行点击反应，请注意如下的兼容性问题及解决方案。本产品完全兼容有机类染料如Alexa Fluor®系列普通染料及Fluorescein (FITC)、Allophycocyanin (APC)及APCE-tandems染料；对于Qdot®纳米晶体探针、Horseradish peroxidase (HRP)、R-phycoerythrin (R-PE)和R-PE-tandems染料如Alexa Fluor® 680-R-PE等，需要在点击反应完成后进行反应和检测；本产品会影响GFP、RFP、mCherry等荧光蛋白的荧光，对于荧光类蛋白如Green Fluorescent Protein (GFP)、TC-FlAsH™和TC-ReAsH™类试剂，需要在点击反应前进行反应和检测。由于Phalloidin (鬼笔环肽)不兼容点击反应，推荐使用Tubulin-Tracker Red (抗体法微管红色荧光探针) (C1050)进行细胞微管的检测。
- 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

使用说明：

1. 需要自备的耗材和试剂

- 无蛋氨酸培养液，推荐使用DMEM高糖培养液(无蛋氨酸) (C0891)或RPMI 1640培养液(无蛋氨酸) (C0893)。
- PBS，推荐使用PBS (C0221A)。
- 固定液，推荐使用免疫染色固定液(P0098)或4%多聚甲醛固定液(P0099)。
- 洗涤液，推荐使用免疫染色封闭液(P0102)、QuickBlock™免疫染色封闭液(P0260)或含3% BSA的PBS。
- 通透液，推荐使用免疫染色强力通透液(P0097)、免疫染色洗涤液(P0106)或含0.3% Triton X-100的PBS。
- 超纯水，推荐使用BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876)。
- 根据实验要求准备：18×18mm盖玻片，6孔板或其它多孔板。

2. 检测体系的准备

- 如下以6孔板检测体系为例，如果使用12孔板、96孔板或384孔板等孔板，检测体系可以相应按比例缩小。
- 如果检测的是悬浮细胞，请按常规的悬浮细胞的操作方式进行。例如和贴壁细胞相比，相关步骤需要增加离心步骤等，如1000×g室温离心5分钟。

3. 培养细胞的HPG标记及固定、洗涤和通透

- 在6孔板中(如有必要可以加入盖玻片)细胞培养过夜并且恢复到正常状态后，进行所需的药物处理或者其它刺激处理等。
- 配制1X HPG工作液。推荐的HPG终浓度为(1X)，按1:100比例用无蛋氨酸、无血清的培养液稀释HPG (100X)，例如取100μl HPG (100X)加入9.9ml无蛋氨酸、无血清的培养液中，即可得到1X HPG工作液。
注：对于A549、HeLa和NIH/3T3等贴壁细胞，推荐HPG的使用终浓度为1X。但细胞类型、培养液种类、细胞密度、细胞增殖速度等多方面的因素会影响HPG掺入效果，因此初次使用时建议对HPG的使用浓度进行一定的摸索，例如最终浓度为0.5-2X。
- 去除原来的培养液，用PBS洗一遍。加入37°C预热的2ml 1X HPG工作液。如果加药处理的，也可以在1X HPG工作液中保持原来的药物浓度。
- 继续孵育细胞0.5小时。该孵育时间的长短取决于细胞的蛋白合成速度，孵育时间越长，荧光亮度越高。如果孵育时间较长，可以适当降低HPG的工作浓度。
- HPG标记细胞完成后，去除HPG工作液，并加入1ml固定液，室温固定15分钟。
- 去除固定液，每孔用1ml洗涤液洗涤细胞3次，每次3-5分钟。
- 去除洗涤液，每孔用1ml通透液，室温孵育10-15分钟。
- 去除通透液，每孔用1ml洗涤液洗涤细胞1-2次，每次3-5分钟。

4. HPG检测

注：本步骤6孔板中每孔的反应体系为500μl的反应混合物。对于12、24、48、96和384孔板，每孔的体系的分别为200μl、100μl、70μl、50μl和20μl的反应混合物。对于较小的孔，单位培养面积的液体用量已经适当增加，以有效避免液体蒸发可能带来的负面影响。如下以6孔板中的细胞样品为例说明具体的操作方法，对于其它孔板，仅每步溶液的用量按比例调整即可，其余方法相同。

- 配制Click Additive Solution：对于小包装，用1.3ml超纯水溶解试剂盒中提供的一管Click Additive，混匀至全部溶解，即为Click Additive Solution；对于大包装，加入10.4ml超纯水溶解试剂盒中提供的一瓶Click Additive，混匀至全部溶解，即为Click Additive Solution。配制后可以适当分装后在-20°C保存。
- 参考下表配制Click反应液。注：请严格按照下表中组分顺序和体积配制Click反应液，否则点击反应可能无法有效进行；

Click反应液须在配制后15分钟内使用。

Components	Wells of 6 well plates						
	1	2	4	5	10	25	50
Click Reaction Buffer	430µl	860µl	1.72ml	2.15ml	4.3ml	10.75ml	21.5ml
CuSO ₄	20µl	40µl	80µl	100µl	200µl	500µl	1ml
Azide 555	1µl	2µl	4µl	5µl	10µl	25µl	50µl
Click Additive Solution	50µl	100µl	200µl	250µl	500µl	1.25ml	2.5ml
Total Volume	500µl	1ml	2ml	2.5ml	5ml	12.5ml	25ml

- 去除上一步骤中的洗涤液。
- 每孔加入0.5ml Click反应液，轻轻摇晃培养板以确保Click反应液可以均匀覆盖样品。
- 室温避光孵育30分钟。
- 吸除Click反应液，用洗涤液洗涤3次，每次3-5分钟。
- 如果需要细胞核进行染色，可以参照步骤5进行。如无其它的特殊需要，即可在荧光显微镜下观察，或者使用多功能酶标仪进行荧光检测，或者用高内涵筛选仪器(一般高内涵筛选需要使用染料对细胞核进行染色)进行检测。Azide 555的最大激发波长是555nm，最大发射波长是565nm。

5. 细胞核染色

为了检测有明显蛋白合成细胞的比例或方便观察每个细胞，可以考虑使用Hoechst 33342进行细胞核染色。一般高内涵筛选仪器也需要对细胞核进行染色。

- 1X Hoechst 33342溶液的配制：按1:1000比例用PBS稀释本试剂盒提供的Hoechst 33342 (1000X)，例如取1µl Hoechst 33342 (1000X)加入1ml PBS中，混匀，即得1ml 1X Hoechst 33342溶液。
- 按步骤4g，吸除洗涤液后，每孔加1X Hoechst 33342溶液1ml，室温避光孵育10分钟。
- 吸除1X Hoechst 33342溶液。
- 用洗涤液洗涤3次，每次3-5分钟。
- 随后即可进行荧光检测。Hoechst 33342为蓝色荧光，最大激发波长为346nm，最大发射波长为460nm。

参考文献：

- Narita M, Young AR, Arakawa S, Samarajiva SA, Nakashima T, et al. Science. 2011. 332(6032):966-70.
- Beatty KE, Liu JC, Xie F, Dieterich DC, Schuman EM, et al. Angew Chem Int Ed Engl. 2006. 45(44):7364-7.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0071S/L	BeyoClick™ EdU-488 细胞增殖检测试剂盒	50-500/200-2000 次
C0075S/L	BeyoClick™ EdU-555 细胞增殖检测试剂盒	50-500/200-2000 次
C0078S/L	BeyoClick™ EdU-594 细胞增殖检测试剂盒	50-500/200-2000 次
C0081S/L	BeyoClick™ EdU-647 细胞增殖检测试剂盒	50-500/200-2000 次
C0085S/L	BeyoClick™ EdU 细胞增殖检测试剂盒(DAB 法)	50-500/200-2000 次
C0088S/L	BeyoClick™ EdU 细胞增殖检测试剂盒(TMB 法)	500/2000 次
R0301S/L	BeyoClick™ EU-488 RNA 合成检测试剂盒	50-500/200-2000 次
R0305S/L	BeyoClick™ EU-555 RNA 合成检测试剂盒	50-500/200-2000 次
R0309S/L	BeyoClick™ EU-594 RNA 合成检测试剂盒	50-500/200-2000 次
R0311S/L	BeyoClick™ EU-647 RNA 合成检测试剂盒	50-500/200-2000 次
P1202S/L	BeyoClick™ HPG-488 蛋白合成检测试剂盒	50-500/200-2000 次
P1206S/L	BeyoClick™ HPG-555 蛋白合成检测试剂盒	50-500/200-2000 次
P1209S/L	BeyoClick™ HPG-594 蛋白合成检测试剂盒	50-500/200-2000 次
P1213S/L	BeyoClick™ HPG-647蛋白合成检测试剂盒	50-500/200-2000 次
P1215S/L	BeyoClick™ HPG 蛋白合成检测试剂盒(WB 法)	50-500/200-2000 次
P1217S/L	BeyoClick™ HPG 蛋白合成检测试剂盒(DAB 法)	50-500/200-2000 次
C0891-100ml/500ml	DMEM 高糖培养液(无蛋氨酸)	100ml/500ml
C0893-100ml/500ml	RPMI 1640 培养液(无蛋氨酸)	100ml/500ml
ST067-50mg/250mg/1g	EdU	50mg/250mg/1g
ST2055-50mg/250mg/1g	5-Ethynyl Uridine (EU) (≥98%, BioReagent)	50mg/250mg/1g
ST2057-5mg/25mg/100mg	L-Homopropargylglycine (HPG) (≥98%, BioReagent)	5mg/25mg/100mg