

BeyoClick™ HPG蛋白合成检测试剂盒(WB法)

产品编号	产品名称	包装
P1215S	BeyoClick™ HPG蛋白合成检测试剂盒(WB法)	50-500次
P1215L	BeyoClick™ HPG蛋白合成检测试剂盒(WB法)	200-2000次

产品简介:

- 碧云天研发生产的BeyoClick™ HPG蛋白合成检测试剂盒(WB法) (BeyoClick™ HPG Protein Synthesis Kit by Western Blot), 也称BeyoClick™ HPG新生蛋白质检测试剂盒(WB法) (BeyoClick™ HPG Nascent Protein Assay Kit by Western Blot), 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Biotin-azide所标记, 从而通过Western blot实现简单、快速、高灵敏地检测新合成蛋白的试剂盒。
- 本试剂盒可以定量检测培养的活细胞中新生蛋白质的合成[1-2]。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、新合成蛋白质、初生蛋白质或新合成蛋白。
- HPG (L-homopropargylglycine), 中文名为L-高炔丙基甘氨酸, 是一种蛋氨酸(Methionine)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上的炔基能与生物素或荧光标记的小分子叠氮化物(如Biotin Azide、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, 新合成的蛋白会被生物素或相应的荧光探针所标记, 从而可以使用适当的检测方法检测到新合成蛋白。本试剂盒处理后, 新合成的蛋白标记上Biotin Azide, 经Western blot后, 可用Streptavidin-HRP识别并检测。

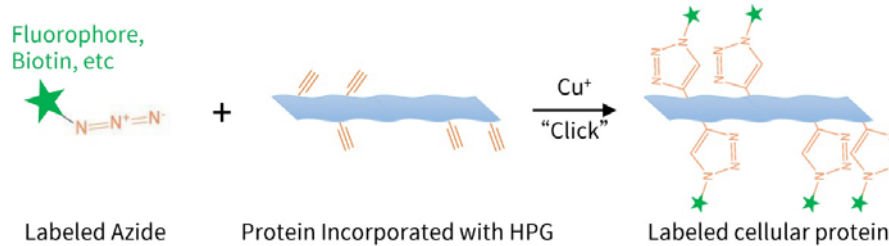


图1. 碧云天BeyoClick™系列蛋白合成检测试剂盒中的点击反应(Click reaction)原理图。生物素或相应的荧光探针等标记的叠氮化物(Labeled Azide)与掺入到细胞蛋白中的HPG, 在铜离子的催化发生共价反应, 形成稳定的三唑环, 最终使细胞蛋白标记上荧光探针或其它探针。

- **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Biotin Azide即可非常有效地标记掺入到新合成蛋白质的HPG。
- **本试剂盒使用便捷、兼容性好。**本试剂盒只需裂解细胞, 就可与Biotin Azide发生点击反应, 不会产生多余的附加产物。可以兼容后续的抗体孵育和质谱检测。
- 本试剂盒操作流程请参考图2。

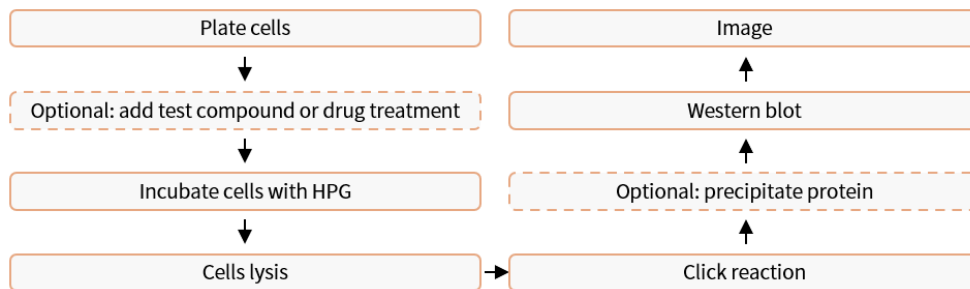


图2. 碧云天BeyoClick™ HPG蛋白合成检测试剂盒(WB法) (P1215)实验操作流程。

- 本试剂盒检测HeLa细胞新合成蛋白的效果参见图3。

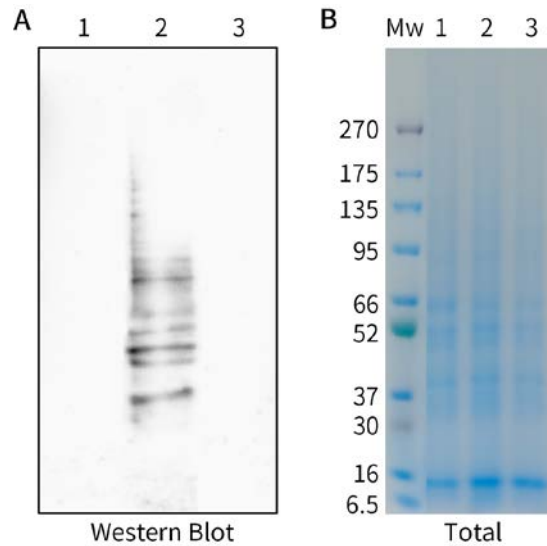


图3. 碧云天BeyoClick™ HPG蛋白合成检测试剂盒(WB法) (P1215)检测HeLa细胞新合成蛋白的效果图。HPG孵育0.5小时后裂解细胞进行Western blot检测, 无HPG组无条带(图A样品1); HPG组有明显的条带(图A样品2); 而用蛋白合成抑制剂茴香霉素(Ansiomycin) (50 μ M)提前预处理0.5小时后, 无明显条带, 说明蛋白合成抑制后, HPG的掺入被显著抑制(图A样品3)。图B为电泳后考马斯亮蓝染色总蛋白结果, 三组均可以观察到明显的条带。实际检测效果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中效果仅供参考。

- 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孔或48孔板样品的检测, 分别可以检测125、250和350个样品, 每个样品推荐的Click反应液用量为200 μ l、100 μ l和70 μ l。大包装可检测样品的数量为小包装的4倍。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P1215S-1	HPG (100X)	1.1ml
P1215S-2	细胞裂解液	11ml
P1215S-3	Biotin Azide	200 μ l
P1215S-4	Click Reaction Buffer	10ml
P1215S-5	CuSO ₄	0.25ml
P1215S-6	Click Additive	1管
P1215S-7	Streptavidin-HRP	100 μ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P1215L-1	HPG (100X)	4.4ml
P1215L-2	细胞裂解液	44ml
P1215L-3	Biotin Azide	800 μ l
P1215L-4	Click Reaction Buffer	40ml
P1215L-5	CuSO ₄	1ml
P1215L-6	Click Additive	1瓶
P1215L-7	Streptavidin-HRP	400 μ l
—	说明书	1份

保存条件:

-20 $^{\circ}$ C保存, 一年有效。Biotin Azide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) (\geq 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Western蛋白条带的强度, 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。
- 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)。
- 甲醇、氯仿(可选步骤中使用)。
- PBS，推荐使用PBS (C0221A)。
- 超纯水，推荐使用BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876)。
- 其它常规Western相关产品。

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标记及裂解

- 在6孔板中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℃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，检测到的Western蛋白条带越强。如果孵育时间较长的可以适当降低HPG的工作浓度。
- HPG标记细胞完成后，去除HPG工作液，并用PBS洗1次。
- 细胞裂解液在使用前数分钟内加入PMSF (ST505/ST2573)，使PMSF的最终浓度为1mM，或者根据实验需要加入适当的蛋白酶抑制剂混合物。每孔加入200μl细胞裂解液，用枪吹打数下，使裂解液和细胞充分接触，冰上继续裂解10分钟。如果需要更多裂解液，可以从碧云天订购SDS裂解液(P0013G)。如果裂解液太粘稠，可以使用超声或者用超级核酸酶处理。超声过程中请一定要注意保持样品处于冰浴中，超声处理的条件通常可以设置为每次超10秒，停10秒，共3-4次循环，最大功率为950W的仪器设置为最大功率的10-30%，采用2mm超声头，不同的超声处理仪器的设置会有所差异。或使用碧云天的超级核酸酶(D7121)，250U/ml室温处理3-5分钟。
- 充分裂解后，收集裂解液至1.5ml离心管，10,000-14,000×g 4℃离心3-5分钟，取上清，用于后续Click反应。
注：可以使用碧云天BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0012)测定该裂解液的蛋白浓度。如果不能及时实验，可以短期保存于-20℃或-80℃。

4. Click反应

- 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5.2ml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℃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	Volume
Click Reaction Buffer	122μl
CuSO ₄	4μl
Biotin Azide	4μl
Click Additive Solution	20μl
Total Volume	150μl

- 取50μl细胞裂解液加入150μl Click反应液，室温颠倒混匀20分钟，使新生蛋白标记上Biotin。推荐使用BeyoVortex™基础型旋转混匀仪(E6800)。

5. 蛋白沉淀(选做)

- 每200μl蛋白样品加600μl甲醇，涡旋混匀。
- 加150μl氯仿，涡旋混匀。
- 加400μl超纯水，涡旋混匀。
- 10,000-14,000×g室温离心5分钟，尽可能去除上层水相，保留下层含蛋白沉淀溶液。
- 加450μl甲醇，涡旋混匀。

- f. 10,000-14,000×g室温离心5分钟，去掉上清，收集蛋白沉淀。
g. 室温放置晾干蛋白质沉淀5-10分钟，用40μl裂解液溶解蛋白质，反复吸打，可用50°C温浴使其完全溶解。

6. Western blot检测

- a. 取5-10μl Click反应后的蛋白样品，加入适量浓缩的SDS-PAGE蛋白上样缓冲液。例如2X或5X的SDS-PAGE蛋白上样缓冲液。使用5X的SDS-PAGE蛋白上样缓冲液可以减小上样体积，在相同体积的上样孔内可以上样更多的蛋白样品。推荐使用碧云天生产的SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5X) (P0015)或SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5X) (P0015L)。
b. 90°C或沸水浴加热3-5分钟，以充分变性蛋白。
c. 按照常规的Western步骤进行PAGE胶电泳、转膜、封闭。
d. 封闭后，加入按1:2000稀释的Streptavidin-HRP，在翘板摇床室温孵育1小时。推荐使用碧云天的Western一抗稀释液(P0023A)，更多Streptavidin-HRP (A0305)可从碧云天订购。推荐使用BeyoShaker™数字式翘板摇床(E6673)。
e. 去除Streptavidin-HRP，使用Western洗涤液(P0023C/P0023C3/P0023C6)在翘板摇床上缓慢摇动洗涤5-10分钟，重复洗涤3次。
f. 使用BeyoECL Star (P0018A)或BeyoECL Moon (P0018F)等ECL类试剂来检测蛋白。详细的Western操作可以参考碧云天相关网页：<http://www.beyotime.com/support/western.htm>。

7. 目的蛋白的Western检测

- a. 如果希望检测特定目的蛋白新生蛋白质合成情况，可以在步骤4后，可以使用Streptavidin Agarose (链霉亲和素琼脂糖凝胶) (P2159)或BeyoMag™ Streptavidin Magnetic Beads (链霉亲和素磁珠) (P2151)沉淀生物素标记的所有新生蛋白，具体沉淀的方法请参考Streptavidin Agarose或Streptavidin Magnetic Beads的说明书。
b. 对于沉淀产物，可以通过目的蛋白特异性的抗体进行Western检测，这样就能检测到特定目的蛋白的蛋白新合成情况了。推荐使用文献中明确报道有新生蛋白质合成的目的蛋白作为阳性对照，以确保整个检测体系是能正常工作的，例如炎症诱导的炎性细胞因子新生蛋白质的表达等。

参考文献：

1. Narita M, Young AR, Arakawa S, Samarajiwa SA, Nakashima T, et al. Science. 2011. 332(6032):966-70.
2. 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

Version 2024.05.27