



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104198720 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201410355901. 2

(22) 申请日 2014. 07. 24

(71) 申请人 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路 2 号

(72) 发明人 杜卫华 孙尉俊

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

用于哺乳动物囊胚细胞凋亡检测的试剂盒

(57) 摘要

本发明提供一种用于哺乳动物囊胚细胞凋亡检测的试剂盒,所述试剂盒包括含 0.5% BSA 的 PBS 液、含 2% 多聚甲醛的 PBS 液、含 0.5% Triton X-100 和 0.05% Tween20 的 PBS 液、含 10% 山羊血清和 0.05% Tween20 的 PBS 液、兔抗 caspase-3 一抗、带有 Alexa Fluor594 红色荧光素标记的山羊抗兔 IgG 二抗,以及含 20 μ M H33342 的 PBS 液。本发明主要基于免疫荧光技术,以细胞凋亡过程中的重要的半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3) 为靶点,采用针对 caspase-3 一抗和携带荧光素的二抗进行抗原抗体反应,对胚胎中的凋亡细胞进行荧光标记和计数;再用 DNA 染料着色所有细胞的细胞核,从而计算出囊胚细胞的凋亡率。本发明结合荧光显微镜,能对凋亡细胞进行准确定性和定量检测,灵敏度高、特异性强,操作简单,重复性好,效率高。

1. 用于哺乳动物囊胚细胞凋亡检测的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括含 0.5% BSA 的 PBS 液、含 2% 多聚甲醛的 PBS 液、含 0.5% Triton X-100 和 0.05% Tween20 的 PBS 液、含 10% 山羊血清和 0.05% Tween20 的 PBS 液、兔抗 caspase-3 一抗、带有 Alexa Fluor594 红色荧光素标记的山羊抗兔 IgG 二抗,以及含 20 μ M H33342 的 PBS 液。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述兔抗 caspase-3 一抗是用合成的人 caspase-3 蛋白中靠近 Asp175 的氨基末端残基的多肽抗原免疫兔子获得的多克隆抗体。

3. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于,所述兔抗 caspase-3 一抗按 1:500 的体积比稀释于封闭液中;其中,所述封闭液为含 10% 山羊血清和 0.05% Tween20 的 PBS 液。

4. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于,所述山羊抗兔 IgG 二抗按 1:500 的体积比稀释于封闭液中;其中,所述封闭液为含 10% 山羊血清和 0.05% Tween20 的 PBS 液。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述哺乳动物包括但不限于牛、猪、鼠。

6. 根据权利要求 5 所述的试剂盒,其特征在于,所述哺乳动物为牛。

用于哺乳动物囊胚细胞凋亡检测的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及细胞生物学领域及免疫荧光技术,具体地说,涉及一种用于哺乳动物囊胚细胞凋亡检测的试剂盒。

背景技术

[0002] 细胞凋亡 (apoptosis) 是细胞为维持内环境稳定,更好地适应生存环境而主动形成的一种自我死亡过程,它涉及一系列基因的激活、表达及调控等作用。大量的光镜及超微结构的研究分析证明哺乳动物附植前的胚胎就可以观察到细胞凋亡的发生,胚胎细胞的凋亡有利于胚胎去除发育异常的细胞,但研究发现细胞凋亡与胚胎发育的停滞相关,超出某一程度的凋亡不利于胚胎的发育。因此研究着床前胚胎细胞的凋亡将有助于正确理解胚胎的发育过程,改进体外培养体系,提高胚胎质量,解决哺乳动物胚胎流产率高的问题。

[0003] 囊胚细胞的凋亡程度是评判胚胎质量的重要指标,一般地常用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 断口标记 (TUNEL) 方法检测胚胎细胞的凋亡。TUNEL 法不需特殊设备,是目前应用较为广泛的方法。但由于坏死细胞也有 DNA 断裂点形成,亦呈 TUNEL 反应阳性;细胞代谢中 DNA 重组、修复、有丝分裂,实验过程中的人为因素如样本固定、蛋白酶预处理等均可造成假阳性,因此实验须设阴、阳性对照。另外,在操作过程中,需要摸索细胞的固定及消化时间,以提高该技术的敏感性和获得较低的背景值。

[0004] 细胞程序化死亡就是在预定的时间和位点去除一些特殊的细胞,这些被去除的细胞所表现出的形态和生化方面的变化就定义为“凋亡”。哺乳动物胚胎细胞的凋亡在哺乳动物繁殖和发育中具有重要的作用。

[0005] 在胚胎着床前的发育过程中,凋亡的一个重要作用是去除少数异常的、有害的或过剩的细胞,以此控制胚胎细胞的数量和质量。体外受精与体细胞核移植胚胎的囊胚发育率低,许多胚胎移植后不能着床,胚胎细胞凋亡可能是其原因之一。Pomar 等研究发现,体外生产的胚胎与体内获得的胚胎相比具有较高的凋亡率,而克隆的胚胎又比体外受精的胚胎具有较高的凋亡比率。Betts 等证明,胚胎细胞的凋亡能指示胚胎是否培养在适度的环境及压力下,凋亡的增加指示胚胎培养在不适应的环境下,如不适合的培养液成分或不适合的培育密度。

[0006] 凋亡的卵裂球被排到卵周隙或囊胚腔中,凋亡细胞发生皱缩,染色质凝集, DNA 断裂。末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 断口标记 (TUNEL) 法能有效地标记 DNA 的断裂,显示出凋亡的细胞,因此其是目前检测胚胎细胞凋亡的常用方法。对牛体内和体外培养的囊胚, TUNEL 法检测到 91-100% 的胚胎含有凋亡细胞;猪体内发育的囊胚中有 56-71% 的胚胎含有凋亡细胞,而体外培养的囊胚中 90% 的胚胎含有凋亡细胞。关于凋亡细胞的类型,对于牛、小鼠和大鼠的囊胚,内细胞团的细胞凋亡率要高一些;对于人和猪的囊胚,凋亡细胞均匀地分布于内细胞团和滋养层。徐薇等采用 TUNEL 方法证明热应激能增加牛孤雌激活胚胎的凋亡数,孙国杰等研究表明,转基因胚胎的凋亡率也显著高于非转基因胚胎。总之,与体内发育的囊胚相比,体外培养的囊胚的细胞凋亡率要高。

[0007] 随着对细胞凋亡分子机制研究的不断深入,发现有两个家族的基因调节哺乳动物细胞的凋亡,即 Bcl-2 家族和天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白水解酶 (cysteinyll aspartate specific proteinase, caspases) 家族。前者包括促凋亡成员 (Bax、Bcl-Xs、Bak、Bad 等) 和抗凋亡成员 (Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-W) 两大类。Bcl-2 家族成员主要与核膜、线粒体膜和内质网膜结合,该家族的基因通过死亡特异性酶来启动和调节细胞凋亡。多数死亡特异性酶都是 caspase 家族的成员,其存在于胞浆或核内的半胱氨酸/天冬氨酸特异性蛋白酶,其中 caspase-3 是细胞凋亡过程中的关键元件,其激活与超常表达均引起细胞凋亡,可通过与众多蛋白因子的相互作用调控细胞凋亡。另外, Caspase-3 处于凋亡有序级联反应的下游,是最重要的效应型 Caspase,是 Caspase 家族中的最重要的凋亡执行者之一,因此 Caspase-3 常被用作细胞凋亡检测的标志物。

发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种用于哺乳动物囊胚细胞凋亡检测的试剂盒。

[0009] 为了实现本发明目的,本发明的用于哺乳动物囊胚细胞凋亡检测的试剂盒,其中包括含 0.5% BSA 的 PBS 液、含 2% 多聚甲醛的 PBS 液、含 0.5% Triton X-100 和 0.05% Tween20 的 PBS 液、含 10% 山羊血清和 0.05% Tween20 的 PBS 液、兔抗 caspase-3 一抗、带有 Alexa Fluor594 红色荧光素标记的山羊抗兔 IgG 二抗,以及含 20 μ M H33342 的 PBS 液。

[0010] 其中,兔抗 caspase-3 一抗是用合成的人 caspase-3 蛋白中靠近 Asp175 的氨基末端残基的多肽抗原免疫兔子获得的多克隆抗体。兔抗 caspase-3 一抗按 1:500 的体积比稀释于封闭液中。所述封闭液为含 10% 山羊血清和 0.05% Tween20 的 PBS 液。

[0011] 山羊抗兔 IgG 二抗按 1:500 的体积比稀释于上述封闭液中。

[0012] 本发明中涉及的哺乳动物包括但不限于牛、猪、鼠等。优选为牛。

[0013] 本发明主要基于免疫荧光技术,以细胞凋亡过程中的重要的半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 为靶点,采用针对 caspase-3 一抗和携带荧光素的二抗进行抗原抗体反应,对胚胎中的凋亡细胞进行荧光标记和计数;再用 DNA 染料着色所有细胞的细胞核,从而计算出囊胚细胞的凋亡率。本发明结合荧光显微镜,能对凋亡细胞进行准确定性和定量检测,灵敏度高、特异性强,操作简单,重复性好,效率高。

附图说明

[0014] 图 1 为本发明实施例 1 中牛囊胚中的凋亡细胞染色结果。

[0015] 图 2 为本发明实施例 1 中牛囊胚总细胞染色结果。

具体实施方式

[0016] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,所用原料均为市售商品。

[0017] 以下实施例中使用的兔抗 caspase-3 一抗是用合成的人 caspase-3 蛋白中靠近 Asp175 的氨基末端残基的多肽抗原免疫兔子获得的多克隆抗体,购自 Cell Signal Technology 有限公司,货号 9661。

[0018] 实施例 1 用于牛囊胚细胞凋亡检测的试剂盒及应用

[0019] 基于免疫荧光技术,开发出用于牛囊胚细胞凋亡检测的试剂盒,所述试剂盒中包括以下试剂:

[0020] 1、洗液:含 0.5% BSA 的 PBS 液;

[0021] 2、固定液:含 2% 多聚甲醛 (PFA) 的 PBS 液;

[0022] 3、通透液:含 0.5% Triton X-100、0.05% Tween20 的 PBS 液;

[0023] 4、封闭液:含 10% 山羊血清、0.05% Tween20 的 PBS 液;

[0024] 5、一抗:兔抗 caspase-3 抗体(按 1:500 的体积比稀释于封闭液中);

[0025] 6、二抗:标记有 Alexa Fluor594 红色荧光素的山羊抗兔 IgG(按 1:500 的体积比稀释于封闭液中);

[0026] 7、H33342 染色液:含 20 μ M H33342 的 PBS 液。

[0027] 差异染色程序如下(以下所有染色操作均在四孔板中完成):

[0028] a. 将牛囊胚在 37°C 洗液中洗 3 次;

[0029] b. 使用固定液室温固定 20min,四孔板每孔最多 25 枚囊胚;

[0030] c. 在通透液中室温处理 30min,每孔 500 μ L 通透液,每孔最多 25 枚囊胚;

[0031] d. 取出囊胚,在洗液中清洗 3 次;

[0032] e. 在 2M HCl 中室温处理 20min;

[0033] f. 在 100mM Tris-HCl 中室温处理 20min;

[0034] g. 取出囊胚,在洗液中清洗 3 次;

[0035] h. 放入封闭液中,4°C 过夜;

[0036] i. 取出囊胚移入兔抗 caspase-3 一抗中,室温孵育 2h;

[0037] j. 取出囊胚,在洗液中洗 3 次,每次 5min 以上;

[0038] k. 将囊胚放入标记 Alexa Fluor594 的山羊抗兔 IgG 中,室温孵育 2h,避光;

[0039] l. 取出囊胚,在洗液中洗 3 次,每次 5min 以上;

[0040] m. 将囊胚放入 H33342 染色液中,室温染色 10min;

[0041] n. 取出囊胚,洗液洗 3 次;

[0042] o. 使用 DABCO 封片,压片,荧光显微镜下拍照。

[0043] 牛囊胚细胞计数:荧光显微镜下分别统计凋亡细胞数和囊胚总细胞数,计算凋亡率(凋亡细胞数/总细胞数)来评估囊胚质量。

[0044] 牛囊胚细胞凋亡率统计:实验重复 3 次,每次随机选取 10 个牛囊胚,分别在绿色、紫外激发光照射下,对凋亡细胞(图 1)、囊胚总细胞(图 2)进行计数,两者相比得出凋亡率。牛囊胚总细胞数的平均值为 64.50 个,凋亡率为 5.67%,可见胚胎凋亡比例较低,胚胎质量优秀,后期发育能力较好。(表 1)

[0045] 表 1 牛囊胚细胞凋亡率统计结果

[0046]

胚胎数(个)	总细胞数(个)	凋亡细胞数(个)	凋亡率(%)
10	64.50	3.66	5.67

[0047] 注:凋亡率=凋亡细胞数 \times 100/总细胞数

[0048] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在

本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

[0049] 参考文献

[0050] Pomar FJ, Teerds KJ, Kidson A, Colenbrander B, Tharasanit T, Aguilar B, Roelen BA. Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology*. 2005, 63:2254-2268.

[0051] Betts DH, King WA. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology*.

[0052] 2001, 55:171-91.

[0053] 徐薇,唐爽,吕志一等. 热激损伤对牛孤雌激活胚胎后续发育的影响. *畜牧兽医学报*.

[0054] 2010, 41:1253-1259.

[0055] 孙国杰,李荣,戴蕴平等. 转基因和再克隆对克隆胚胎细胞凋亡的影响. *自然科学进展*. 2009, 19:266-274.

[0056] 罗婷等. 哺乳动物附植前胚胎细胞凋亡的研究进展. *中国畜牧兽医*. 2012, 39:125-130.



图 1

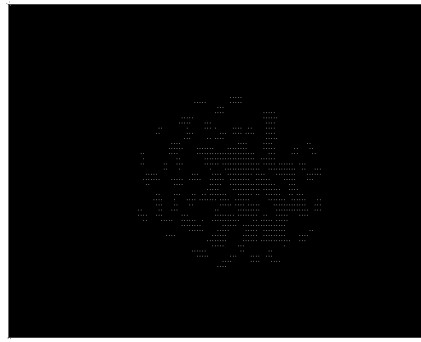


图 2

专利名称(译)	用于哺乳动物囊胚细胞凋亡检测的试剂盒		
公开(公告)号	CN104198720A	公开(公告)日	2014-12-10
申请号	CN201410355901.2	申请日	2014-07-24
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院北京畜牧兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院北京畜牧兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院北京畜牧兽医研究所		
[标]发明人	杜卫华 孙尉俊		
发明人	杜卫华 孙尉俊		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/533		
代理人(译)	王文君		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种用于哺乳动物囊胚细胞凋亡检测的试剂盒，所述试剂盒包括含0.5%BSA的PBS液、含2%多聚甲醛的PBS液、含0.5% Triton X-100和0.05% Tween20的PBS液、含10%山羊血清和0.05% Tween20的PBS液、兔抗caspase-3一抗、带有Alexa Fluor594红色荧光素标记的山羊抗兔IgG二抗，以及含20μM H33342的PBS液。本发明主要基于免疫荧光技术，以细胞凋亡过程中的重要的半胱氨酸蛋白酶3(caspase-3)为靶点，采用针对caspase-3一抗和携带荧光素的二抗进行抗原抗体反应，对胚胎中的凋亡细胞进行荧光标记和计数；再用DNA染料着色所有细胞的细胞核，从而计算出囊胚细胞的凋亡率。本发明结合荧光显微镜，能对凋亡细胞进行准确定性和定量检测，灵敏度高、特异性强，操作简单，重复性好，效率高。

