自噬双标腺病毒(mRFP-GFP-LC3)使用说明书

1ml WLA135

仅用于科学研究,不能用于诊断

产品信息

产品名称 自噬双标腺病毒（mRFP-GFP-LC3）

产品概述 mRFP-GFP-LC3腺病毒用于实时监测自噬(流)mRFP 用于标记及追踪LC3，GFP的减弱可指示溶酶体与自噬小体的融合形成自噬溶酶体，即由于GFP荧光蛋白对酸性敏感，当自噬体与溶酶体融合后GFP 荧光发生淬灭，此时只能检测到红色荧光。这种串联的荧光蛋白表达载体系统直观清晰的指示了细胞自噬流的水平，是我们自噬研究尤其是自噬流研究不可或缺的利器。

注意事项

1. 收到病毒液后如未融化请置于-80℃冰箱，下次使用时再进行分装。如收到时腺病毒已融化，请直接分装后置于-80℃冰箱保存，短期内用于实验，可分装部分置于4℃保存，尽快使用。
2. 产品滴度1×10^{10}pfu/mL,应避免反复冻融，否则会降低病毒液滴度（每次冻融会降低病毒滴度10%）。建议不要在-20℃下长期保存，如病毒储存时间超过6个月，应该重新测定病毒滴度。

操作步骤

一、感染目的细胞

由于腺病毒是自主复制性基因载体，不能插入基因组稳定遗传，因此实验中细胞感染腺病毒的实验需要具体情况具体对待。一般根据外界刺激处理的时间来选择感染腺病毒的时间，短时程处理（一周之内）建议先感染腺病毒之后再进行处理，长时程刺激的建议在刺激结束前 2~3 天进行腺病毒感染。另外不同细胞的 MOI 不同，所以在将病毒感染正式感染目的细胞前，需要做一个预实验以确定目的细胞中加入的病毒数。

二、病毒感染

（一）贴壁细胞的感染：

由于该病毒感染后续拍照需要进行自噬小点的计算，因此需要在高倍镜下拍照，条件允许最好使用共聚焦显微镜拍照，此时需要把细胞铺被在玻片上面部分细胞铁壁能力不是很强，此时需要预先在玻片上包被 galetin 甚至laminin。感染实验在 1/2 体积培养液感染（详见下表格）。加入的病毒量范围在 MOI=20～50 内（具体感染的操作量参见附录格），每个 MOI 值加两个孔2小时候换液。

病毒小培养体积感染表

培养皿类型	表面积/cm^2	对应细胞培养液体积	病毒感染对应细胞培养液体积
96-well	0.3 cm^2	100 μL	50 μL
24-well	2 cm^2	500 μL	250 μL
12-well	4 cm^2	1 mL	500 μL
6-well	10 cm^2	2 mL	1 mL
60mm	20 cm^2	4 mL	2 mL
100mm	60 cm^2	10 mL	5 mL
感染2小时后直接换液			

（二）悬浮细胞的感染：

若是悬浮或半悬浮细胞，则需要通过平角离心转染法，即将适量的病毒液加入细胞培养皿后，封好口，放入平角离心机后，低速离心 1h，然后放入养箱中正常培养即可。若由于实验条件有限，没有平角离心机，可用离心管代替，将细胞吹打吸入离心管中，进行低速离心，去掉大部分上清，然后加入适量的病毒液，室温放置 10min（不能超过半小时），然后将细胞和病毒液同时吸出转入培养皿中继续病毒感染至 2 小时后换液即可。

自噬双标腺病毒(mRFP-GFP-LC3)使用说明书

WLA135

仅用于科学研究,不能用于诊断

产品信息

三、结果

（1）mRFP-GFP-LC3 串联荧光蛋白腺病毒中表达的 GFP 和 mRFP 用于标记及追踪 LC3，GFP 的减弱可指示溶酶体与自噬小体的融合形成自噬溶酶体（由 GFP 荧光蛋白对酸性敏感，当自噬体与溶酶体融合后 GFP 荧光发生淬灭,此时只能检测到红色荧光。

（2）我们在显微镜成像后红绿荧光 merge 后通过 merge 后出现的黄色斑点即只是自噬体.红色的斑点指示自噬溶酶体,通过不同颜色斑点的计数可以清晰的看出自噬流的强弱:一般统计采用人为计数的方法，也就是统计叠加（overlay）之后黄色斑点和红色斑点数目然后做出 bar 图。

（3）如下图:细胞转染 mRFP-GFP-LC3 病毒后给予氨基酸剥夺处理 2 小时后出现明显增强的自噬以及自噬流（通过 merge 后的红色小点明显增多可以判定自噬流水平升高）。

GFP dots　　mRFP dots　　Overlay

