

## 服务手册

## 自噬慢病毒使用手册

For research use only!

公司产品仅供科研使用，严禁用于治疗！

Genomeditech

### 产品描述:

细胞自噬(autophagy)是真核生物中进化保守的对细胞内物质进行周转的重要过程。自噬是细胞内的一种“自食(Self-eating)”的现象，凋亡是“自杀(Self-killing)”的现象，二者共用相同的刺激因素和调节蛋白，但是诱发阈值和门槛不同，如何转换和协调目前还不清楚。自噬是指膜（目前来源还有争议，大部分表现为双层膜，有时多层或单层）包裹部分胞质和细胞内需降解的细胞器、蛋白质等形成自噬体，最后与溶酶体融合形成自噬溶酶体，降解其所包裹的内容物，以实现细胞稳态和细胞器的更新。细胞本底水平的自噬发生在营养充足的条件下，可保护细胞免受错误折叠蛋白或受损细胞器的影响，从而防止某些疾病的发生（如神经退行性疾病和癌症）。饥饿等也可以诱导自噬的发生，通过降解大分子物质和细胞器为细胞活动提供营养和能量。

目前文献对自噬过程进行观察和检测常用的策略和手段有：通过 Western Blot 检测 LC3 的剪切；通过电镜观测自噬体的形成；在荧光显微镜下采用 GFP (-RFP) -LC3 等融合蛋白来示踪自噬体形成以及降解。

近几年对自噬流的研究日趋增多，检测自噬形成时，使用电镜耗时长，不利于监测(Monitoring)自噬形成，而 hLC3 在自噬形成过程中会发生聚集的现象，因此吉满生物利用 hLC3 这种现象，构建了带 GFP 和 RFP 标记的用于细胞自噬检测的慢病毒产品。

### GFP-LC3 单荧光自噬指示体系:

利用 LC3 在自噬形成过程中发生聚集的现象开发出了 GFP-LC3 指示技术。无自噬发生时，GFP-LC3 融合蛋白弥散在胞浆中；在自噬形成时，GFP-LC3 融合蛋白转位至自噬体膜，在荧光显微镜下形成多个明亮的绿色荧光斑点，一个斑点即相当于一个自噬体，可以通过对其计数来评价自噬活性的高低。吉满生物已开发出高效的 GFP-LC3 慢病毒载体，通过高效感染细胞，配合活细胞工作站成功评价自噬流。但这里绿色斑点增多并不一定代表自噬活性增强，也有可能是自噬溶酶体降解途径受阻，可通过 Western Blot 检测游离的 GFP、p62 表达来进行辅助验证。

单荧光自噬慢病毒现货：

产品名称	产品编码	产品规格型号
PGMLV-GFP-hLC3-Puro Lentivirus	GM-0220LV04-2	100ul*10 管(>1*10 <sup>8</sup> TU/ml)
pGMLV-GFP-hLC3-Puro Lentivirus	GM-0220LV04-1	100ul*5 管(>1*10 <sup>8</sup> TU/ml)

### mRFP-GFP-LC3 双荧光自噬指示体系：

使用 mRFP 和 GFP 同时标记及追踪 LC3 以及自噬流的变化，其中 GFP 是酸敏感型 GFP 蛋白，而 mRFP 是稳定的荧光表达基团，不受外界影响。由于自噬小体进入第二阶段后，与溶酶体进行融合，形成自噬溶酶体。自噬溶酶体由于溶酶体内部的酸性环境，可以导致 PH 下降，GFP 淬灭，此时只能检测到 mRFP 红色荧光。因此，GFP 的减弱可指示自噬溶酶体形成的顺利程度，GFP 越少，则从自噬小体到自噬溶酶体阶段流通得越顺畅。反之，自噬小体和溶酶体融合被抑制，自噬溶酶体进程受阻。mRFP 是一直稳定表达的，因而可以通过 GFP 与 mRFP 的亮点比例来评价自噬流进程。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。

双荧光自噬慢病毒现货：

产品名称	产品编码	产品规格型号
PGMLV-CMV-TurboRFP-EGFP-H_LC3 Lentivirus	GM-0220LV07-2	100ul*10 管(>1*10 <sup>8</sup> TU/ml)
PGMLV-CMV-TurboRFP-EGFP-H_LC3 Lentivirus	GM-0220LV07-1	100ul*5 管(>1*10 <sup>8</sup> TU/ml)
pGMLV-CMV-RFP-GFP-hLC3-Puro Lentivirus	GM-0220LV05-2	100μl*10 管(>1*10 <sup>8</sup> TU/ml)
pGMLV-CMV-RFP-GFP-hLC3-Puro Lentivirus	GM-0220LV05-1	100μl*5 管(>1*10 <sup>8</sup> TU/ml)

### 自噬慢病毒保存条件：

-80℃ 保存，一年有效。4℃ 保存，建议 3 天内使用完毕。

### 注意事项：

1. 慢病毒使用干冰运输，收到慢病毒后，请及时将病毒置于-80℃冰箱保存，使用前置于 4℃融化使用。（若病毒储存时间超过 6 个月，吉满生物建议使用前重新测滴度）

2. 反复冻融对慢病毒滴度有较大影响，单次冻融会使病毒滴度降低 10%左右，因此尽量避免反复冻融，建议在首次融化时按小体积（根据后续具体实验用量确定）分装。

3. 如需稀释病毒，可以先将病毒 4℃ 融化，再用不完全培养基（培养目的细胞用）稀释保存。若用完全培养基稀释，建议现配现用。

### 自噬双标慢病毒操作方法：

#### （一）慢病毒安全操作规范

1. 吉满生物使用第二代、第三代慢病毒高效包装系统，具有很高的安全性（将 gag, pol 和 rev 基因分到了不同质粒中；去掉了 tat transactivation 基因）。

2. 病毒操作时推荐使用生物安全柜，若使用普通超净工作台操作病毒，必须关闭风机。

3. 病毒操作时必须穿实验服，戴口罩和手套。

4. 操作病毒时必须特别小心，避免产生气雾或飞溅。如果操作时生物安全柜有病毒污染，立即用 10%次氯酸钠溶液擦拭干净。接触过病毒的枪头、离心管、培养板、培养液于 10%次氯酸钠溶液内浸泡过夜才可丢弃。

5. 用显微镜观察细胞感染情况时应遵从以下步骤：拧紧培养瓶或盖紧培养板。用 70%乙醇清理培养瓶外壁后到显微镜处观察拍照。离开显微镜实验台之前，用 70%乙醇清理显微镜实验台。

6. 病毒操作完毕后，脱掉手套，用肥皂和水清洗双手。

7. 病毒飞溅或是气溶胶与人体接触（眼、皮肤或粘膜），请用大量清水冲洗眼睛或其他接触部位至少 15 分钟。

#### （二）慢病毒感染目的细胞预实验

慢病毒颗粒对不同的组织和细胞亲嗜性不同，因此在使用慢病毒颗粒之前查阅相关文献，了解 Lentivirus 对靶细胞的亲嗜性、感染复数（MOI 值）及体内注射所需的病毒量，如无相应的文献支持，则需要预实验检测病毒对靶细胞的亲嗜性以及和合适的感染复数（MOI 值）。

慢病毒感染细胞后，至少要在感染后 24~48 小时才能检测目的基因的表达。

预实验步骤如下：

1. 第一天细胞的准备

细胞铺板，要求第 2 天感病毒前细胞密度约 30%左右，37℃培养过夜（为保证细胞生长良好，请保证细胞贴壁过夜）。

2. 第二天病毒的感染（Polybrene 以 5 μg/ml 为例）

配置含 5 μg/ml Polybrene 的新鲜培养基（Polybrene 在大部分细胞中可以有效提高感染效率，如病毒滴度较高，可不用添加 Polybrene），按设定的 MOI 加入病毒原液或稀释液，混匀后放于二氧化碳培养箱（37℃、5%CO<sub>2</sub>）孵育过夜。

3. 第三天更换培养液

感染病毒 16h 后将含有慢病毒的培养液更换成全体系正常培养液。

4. 感染效率检测

感染后的 48~72h 在倒置荧光显微镜观察荧光，荧光效率在 80%左右是合适的 MOI 值。

注：MOI=病毒滴度\*感染的病毒量/细胞个数（以 293 细胞为例，24 孔板密度 20% 密度细胞数大约  $1 \times 10^4$  个/孔；病毒滴度单位 TU/mL）

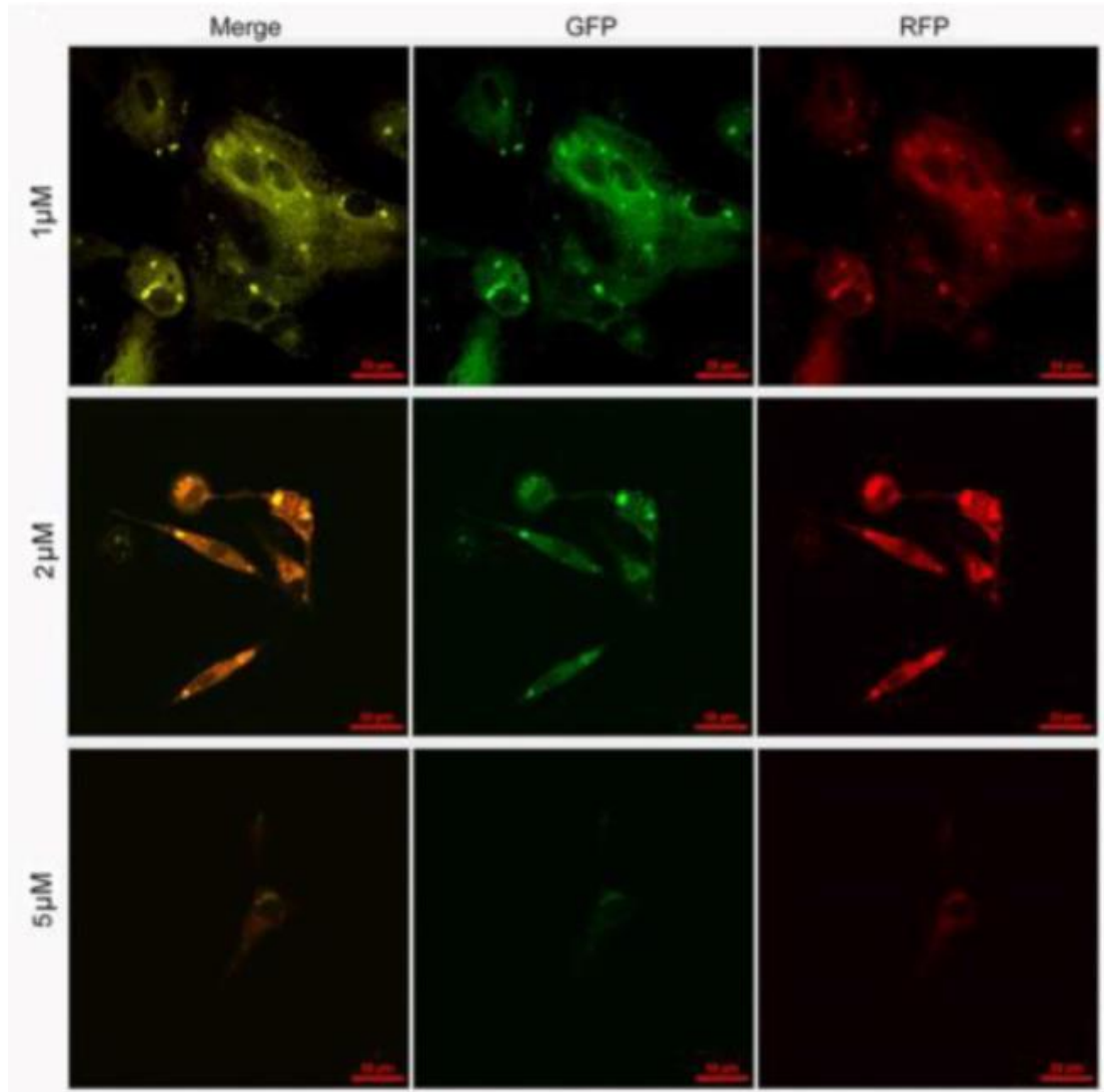
（三）慢病毒感染目的细胞，步骤同感染预实验

注：实验前请按照预实验的 MOI 值和细胞数计算所需要的病毒量。

第一天分板（12 孔板或 6 孔板）；第二天原孔弃掉培养基，加入新鲜含有 polybrene 的培养基（半量换液），加入病毒；第三天换液（全量换液）；感染后 48h~72h 后，使用倒置荧光显微镜观察荧光，计算慢病毒感染目的细胞的效率，（需要加入抗生素药筛成稳转株）

统计方法：

通过显微镜成像，红绿荧光 merge 后出现的黄色斑点即指示自噬体。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）之后的黄色斑点和红色斑点的数目，然后做出 bar 图。



图片来源客户文章: Wei WJ, et al. Obatoclax and LY3009120 Efficiently Overcome Vemurafenib Resistance in Differentiated Thyroid Cancer. *Theranostics*. 2017 Feb 23;7(4):987-1001.