



GenePharma

吉玛基因

www.genepharma.com

吉玛基因 自噬荧光检测系统 使用说明

B030-V001-20181226

如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

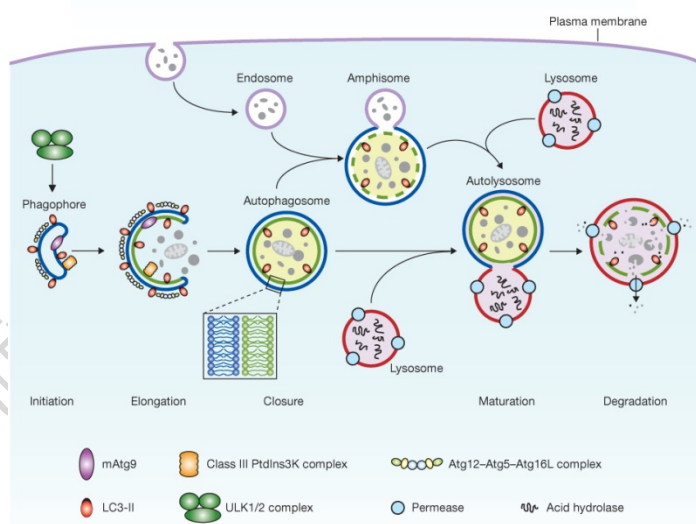
<http://www.genepharma.com>

自噬系统使用指南

自噬 (Autophagy) 一词来源于古希腊语, 是“auto” (自我) 与“phagein” (吞噬) 的结合。自噬发生在细胞内, 是一个吞噬自身细胞质蛋白或细胞器, 使其包被进入双层膜囊泡 (自噬体), 进而与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 降解其所包裹的内容物的过程, 自噬的意义在于实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新。

在自噬过程中, 自噬体的形成是关键, 其直径平均 500nm, 囊泡内包裹胞质成分和某些细胞器如线粒体、内吞体、过氧化物酶体等。与其他细胞器相比, 自噬体的半衰期很短, 只有 8min 左右, 说明自噬是细胞对于环境变化的有效反应。

细胞质中的线粒体等细胞器首先被囊泡所包被, 这种囊泡主要来自于内质网和高尔基体; 囊泡最终形成双层膜结构, 即自噬体 (autophagosome); 自噬体与胞内体融合形成中间自体吞噬泡, 最终自体吞噬泡的外膜与溶酶体融合形成自噬溶酶体 (autolysosome), 由溶酶体内的酶降解自体吞噬泡中的内容物和内膜。



自噬过程示意图

如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>



自噬观察检测方法:

1. 透射电镜下直接观察自噬体

Phagophore 的特征为: 新月状或杯状, 双层或多层膜;

自噬体的特征为: 双层或多层膜的液泡状结构, 内含胞浆成分, 如线粒体、内质网、核糖体等;

自噬溶酶体的特征为: 单层膜, 胞浆成分已降解。

2. 利用 Western Blot 检测 LC3-II/I 比值的变化以评价自噬形成

自噬形成过程中, 胞浆型 LC3 (LC3-I) 会酶解掉一段多肽, 转变为膜型 LC3 (LC3-II)。故而 LC3-II/LC3-I 比值的大小可估计自噬水平的高低。

3. 在荧光显微镜下采用 GFP-LC3 融合蛋白来示踪自噬形成

无自噬时, GFP-LC3 融合蛋白弥散在胞浆中; 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, 一个斑点相当于一个自噬体, 可以通过计数来评价自噬活性的高低。

吉玛基因荧光检测自噬系统

吉玛基因依据荧光检测自噬体的原理开发了荧光自噬检测系统。

单荧光检测系统

该系统通过外源表达系统在宿主细胞中过表达 GFP-LC3B 融合蛋白。外源表达的 GFP-LC3B 亦可以与内源 LC3B 蛋白一样参与自噬体的形成。故而, 当自噬发生的过程中, GFP-LC3B 参与自噬体囊泡的形成, 与 LC3B 融合的 GFP 绿色荧光蛋白便会富集在自噬体上。由此, 通过荧光显微镜 (confocal 激光共聚焦显微镜) 观察细胞中的绿色荧光蛋白信号可以指示自噬体的形成。

如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>



GenePharma

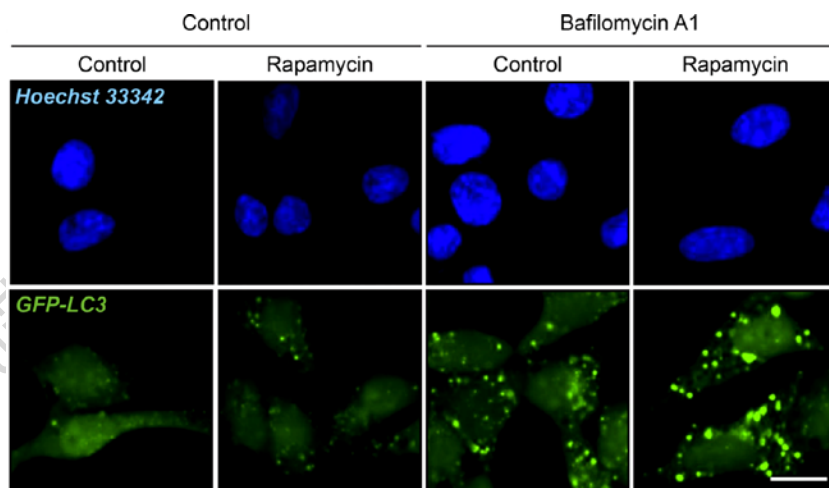
吉玛基因

www.genepharma.com

A



B

*Methods in Enzymology*, Volume 587

ISSN 0076-6879

吉玛基因单荧光自噬检测系统(自噬单标系统) A. 吉玛基因单荧光自噬检测系统,包括质粒型,慢病毒,腺病毒以及腺相关病毒; B. 单荧光自噬检测案例: Rapamycin 为自噬体形成的诱导剂; Bafilomycin 为自噬溶酶体形成的抑制剂,可以使自噬体停留在初始自噬体阶段而无法进入自噬溶酶体阶段。

双荧光检测系统

相较于单荧光检测系统,双荧光检测系统可以揭示出更多的信息。该系统通过外源过表达系统在宿主细胞中表达 mCherry-EGFP-LC3B 融合蛋白。与 GFP-LC3B 类似, mCherry-EGFP-LC3B 参与自噬体的形成,定位在自噬体囊泡的膜上。由

如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>



GenePharma

吉玛基因

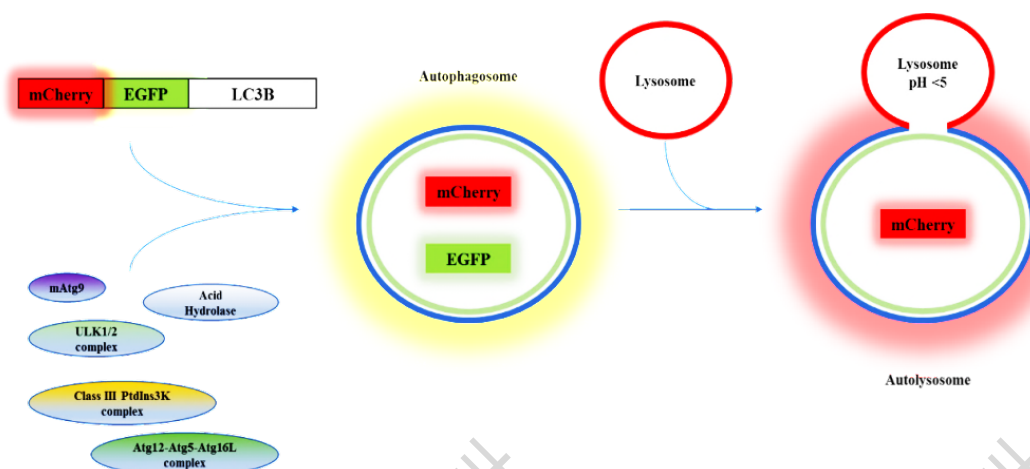
www.genepharma.com

于融合了红色荧光的 mCherry 和绿色荧光的 EGFP，LC3B 在参与了自噬体形成后，在荧光显微镜下观察到宿主细胞内的自噬体上既可以激发出红色荧光，也可以激发出绿色荧光。Merge 后的镜像则会呈现出黄光（斑点）。自噬体形成后会与溶酶体融合形成自噬溶酶体，从而使囊泡内的内环境变为酸性环境。在酸性环境下，GFP 绿色荧光信号会淬灭。这时的自噬体中只呈现出红色荧光信号（mCherry）。基于以上原理，通过观察计算黄色荧光斑点的数量和红色荧光斑点的数量，即可区分细胞内初始自噬体以及与自噬溶酶体的数量。

C



D



如有疑问欢迎垂询

上海电话：021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话：0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>

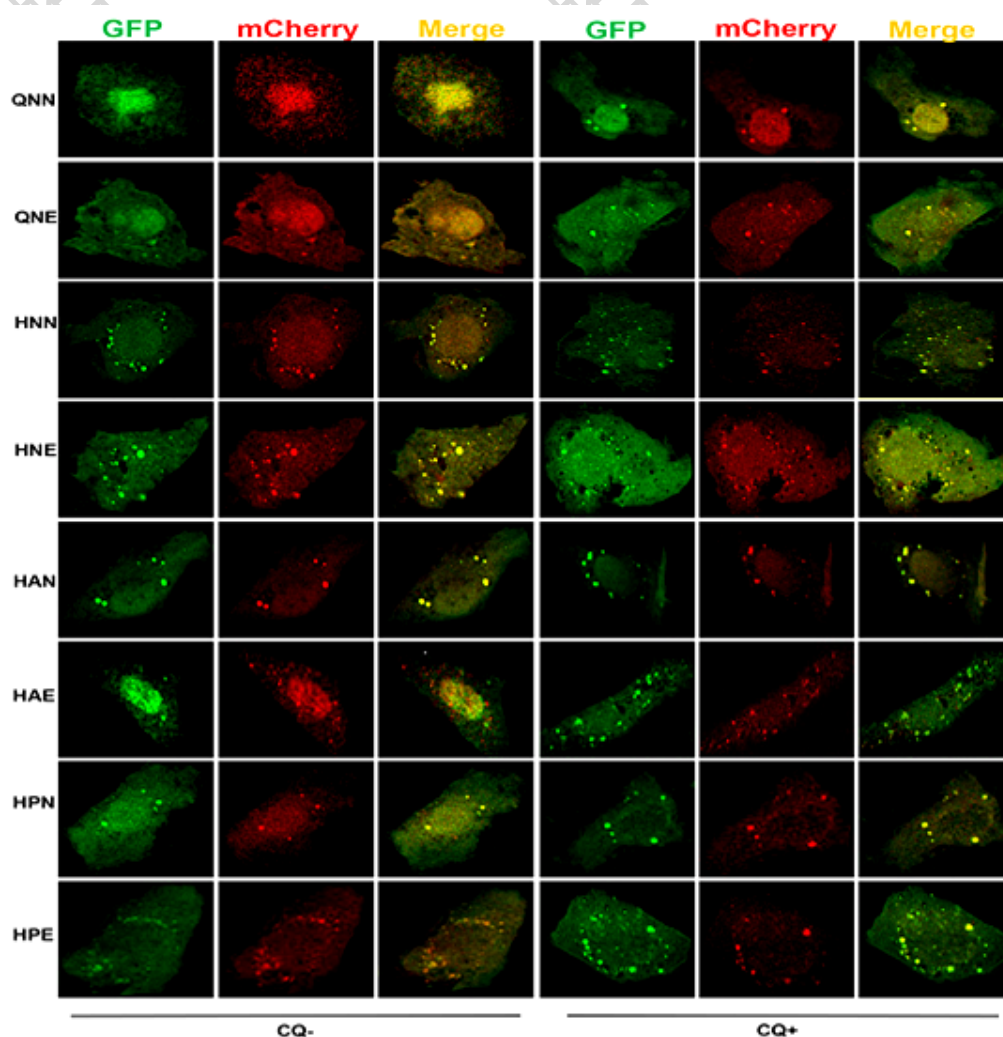


GenePharma

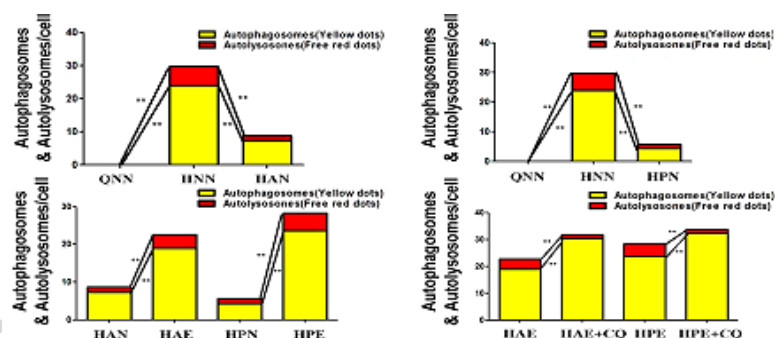
吉玛基因

www.genepharma.com

E



F



Cell Physiol Biochem 2017;42:2418-2429

如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>



吉玛基因双荧光自噬检测系统(自噬双标系统) C. 吉玛基因双荧光自噬检测系统, 包括质粒型, 慢病毒, 腺病毒以及腺相关病毒; D. 自噬双标系统工作原理示意图; E. 单荧光自噬检测案例; F. 统计方法: 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为自噬体。红色的斑点为自噬溶酶体。通过不同颜色斑点的计数可以统计自噬流的强弱。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的数目, 然后做出 bar 图。

吉玛基因自噬检测系统产品列表:

产品名称	表达蛋白	载体类型	规格
单标质粒型	GFP-LC3B	pEX-3	50 µg
双标质粒型	mCherry-EGFP-LC3B	pEX-3	50 µg
单标慢病毒	GFP-LC3B	LV6	1×10^8 TU/ml, 1ml
双标慢病毒	mCherry-EGFP-LC3B	LV6	1×10^8 TU/ml, 1ml
单标腺病毒	GFP-LC3B	ADV	1×10^8 PFU/ml, 1ml
双标腺病毒	mCherry-EGFP-LC3B	ADV	1×10^8 PFU/ml, 1ml
单标腺相关病毒	GFP-LC3B	AAV-GP-11	1×10^8 vg/ml, 1ml
双标腺相关病毒	mCherry-EGFP-LC3B	AAV-GP-11	1×10^8 vg/ml, 1ml

产品储存方法:

1. 质粒型载体以干粉形式常温寄送。收到后可以-20℃保存, 也可用 ddH₂O 溶解后在 20℃保存;
2. 病毒型产品以病毒液形式用干冰低温寄送。收到病毒液后请置于-80℃冰箱, 下次使用时再进行分装; 如果病毒已融化, 请直接分装后置于-80℃冰箱保存; 尽量避免反复冻融, 否则会降低病毒滴度。建议病毒储存时间不超过 6 个月, 否则建议重新测定病毒滴度。

如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>



GenePharma

吉玛基因

www.genepharma.com

产品使用说明及注意事项:

质粒型产品 通过细胞转染试剂转染进入宿主细胞,行使自噬检测功能。转染试剂的选择根据不同类型的宿主细胞而异。目前市面上可选的转染试剂类型很多,例如 Lipofectamine 2000, Lipofectamine 3000, FuGENE, GP-transfect mate 等。转染过程具体操作,参见具体转染试剂说明书。转染试剂选择的原则在于将吉玛自噬检测质粒转染入宿主细胞的转染效率不低于 70%。根据自噬诱导条件,在转染自噬质粒 24-48 h 后或条件性诱导后 2-8 h,可用于 confocal 激光共聚焦显微镜或检测自噬蛋白变化观察自噬情况。

病毒型产品 通过病毒侵染方式使自噬检测系统进入宿主细胞,行使自噬检测功能。病毒侵染方法可参考吉玛病毒操作手册。

慢病毒型产品操作,请参考《吉玛慢病毒使用手册》

<http://www.genepharma.com/public/upload/1495416183.pdf>

腺病毒型产品操作,请参考《吉玛腺病毒使用手册》

<http://www.genepharma.com/public/upload/1521447689.pdf>

腺相关病毒型产品操作,请参考《吉玛腺相关病毒使用手册》

<http://www.genepharma.com/public/upload/1521447650.pdf>

注意事项:

1. 操作病毒时请使用生物安全柜;
2. 操作时需戴上帽子,双层手套,双层口罩等防护设备;
3. 病毒操作中绝对禁止在安全柜内有皮肤直接暴露的情况;
4. 剩余的病毒及接种用的注射器等耗材需高压灭菌后才能扔弃;
5. 操作完毕要及时用肥皂和水洗手消毒;

如有疑问欢迎垂询

上海电话: 021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话: 0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>



GenePharma

吉玛基因

www.genepharma.com

6. 以上产品仅供科学实验研究，严禁用于临床诊断与治疗。未尽事宜请咨询吉玛基因技术人员了解详情。

热线： 021-51320195-8002；

0512-86668828-8043；

邮件： support@genepharma.com；

szsupport@genepharma.com；

7、您可登吉玛基因官网 www.genepharma.com 观看实验操作视频，并与我们的客服人员互动交流。

参考文献：

1. Daniel J., et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8:4, 445–544; April 2012;
2. Huiying Shi, et al. Na^+/H^+ Exchanger Regulates Amino Acid-Mediated Autophagy in Intestinal Epithelial Cells. *Cell Physiol Biochem* 2017;42:2418-2429
3. Ying Peng, et al. M4IDP, a zoledronic acid derivative, induces G1 arrest, apoptosis and autophagy in HCT116 colon carcinoma cells via blocking PI3K/Akt/mTOR pathway. *Life Sciences* 185 (2017) 63–72
4. <https://baike.baidu.com/item/%E8%87%AA%E5%99%AC/5217450?fr=aladdin>

如有疑问欢迎垂询

上海电话：021-51320195-8009

E-mail: rnaisupport@genepharma.com

苏州电话：0512-86668828-8042

E-mail: szsupport@genepharma.com

<http://www.genepharma.com>