

自噬双标腺病毒（mRFP-GFP-LC3）说明书

背景：

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。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，针对于此我们上海安震生物科技有限公司自主研发了用于实时监测自噬(流)的 mRFP-GFP-LC3 腺病毒，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。由于腺病毒载体感染效率高，很多细胞都能达到近 99%，而且纯化后的腺病毒可以直接进行动物活体注射。另外 LC3 持续表达可能会影响细胞正常功能，因此腺病毒这种不整合基因组的载体更有适合作为种工具型病毒载体。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。

mRFP-GFP-LC3 腺病毒的操作

收到病毒后的处理

（一）、腺病毒的储存

1、腺病毒采用冰袋运输。

（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；

（2）、如客户收到时腺病毒已融化，请直接分装后置于**-80℃**冰箱保存；若短期内用于实验，可分装部分于**4℃**保存（尽量一周内用完）。

2、尽量避免反复冻融，否则会降低病毒滴度（每次冻融会降低病毒滴度**10%**）。建议不要在**-20℃**下长期保存。如果病毒储存时间超过**6**个月，应该重新测定病毒滴度。

3、建议收到病毒产品后根据实验需求自行分装或购买经过分装的小包装病毒产品（购买时请提出）。

（二）、腺病毒的稀释

需要稀释病毒时，将病毒取出后置于冰上融解，使用培养目的细胞用 **PBS** 或培养基稀释到所需浓度后混匀分装后**4℃**保存，并尽快用于实验（尽量一周内用完），动物实验建议使用注射用平衡液来稀释，并尽快用完。

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。

（一）细胞准备

将状态良好的目的细胞接种到 24 孔板，使细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 细胞，接种细胞数量因细胞的生长速度而略有不同，一般是保证第二天进行病毒感染的时候细胞汇合率介于 50%至 70%直接。

（二）病毒感染

1、贴壁细胞

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 $\text{MOI}=20\sim50$ 内，每个 MOI 值加两个孔 2 小时后换液。

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	0.3cm ²	100ul	50ul
24-well	2cm ²	500ul	250ul
12-well	4cm ²	1ml	500ul
6-well	10cm ²	2ml	1ml
60mm	20cm ²	4ml	2ml
100mm	60cm ²	10ml	5ml
感染 2 小时后直接换液			

2、悬浮细胞

上面介绍的是针对贴壁细胞的感染方法，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，然后放入培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。

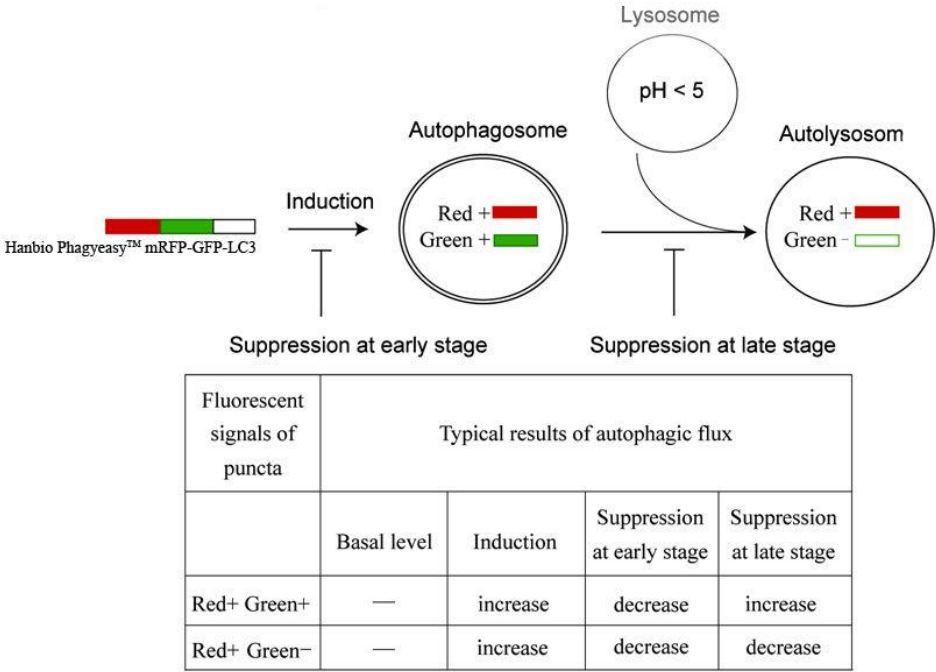
（三）观察感染情况

感染 24 小时后，可以开始观察到 GFP 以及 RFP 表达，36-48 小时可以进行细胞固定、封片（需要使用防淬灭的固定剂）、拍照分析。

（四）结果分析

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

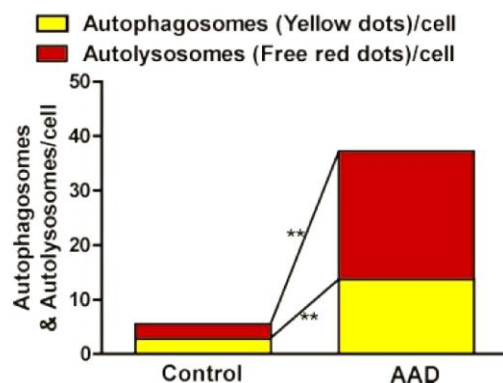
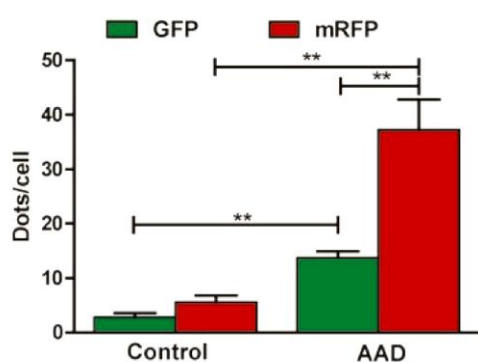
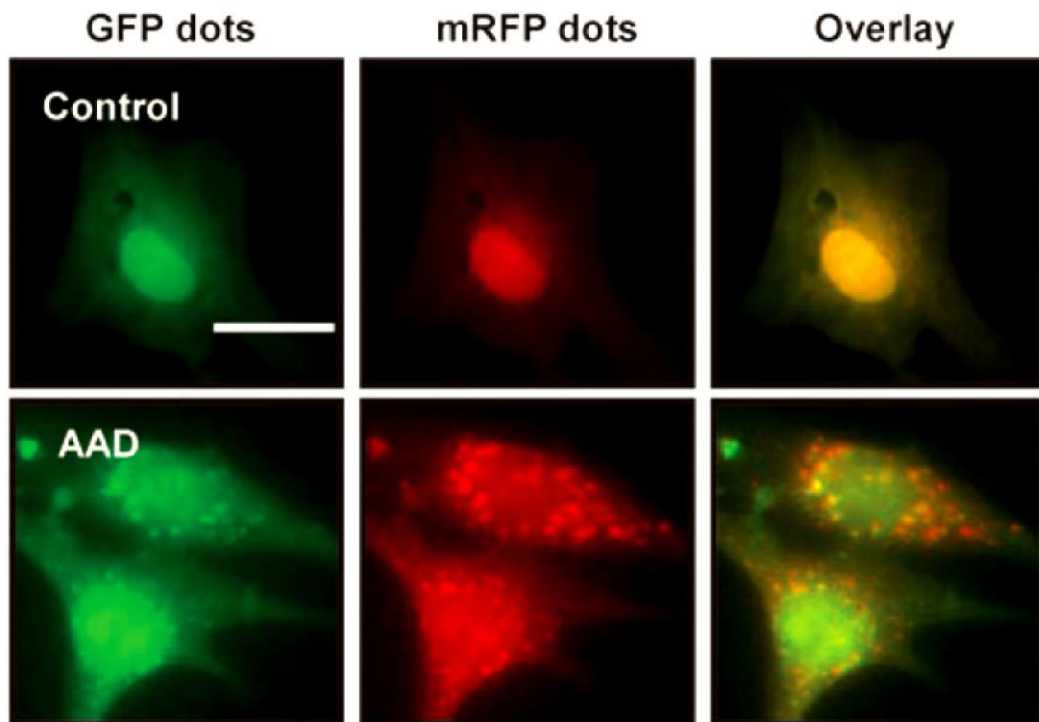
体融合后 GFP 荧光发生淬灭, 此时只能检测到红色荧光, 原理如下图所示)。



统计方法

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的数目, 然后做出 bar 图。

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)。



实验操作注意事项

- 1、操作病毒时请尽量使用生物安全柜；
- 2、操作时需戴上帽子，佩戴双层手套，双层口罩；
- 3、病毒操作中绝对禁止在安全柜内有任何皮肤直接暴露的情况；
- 4、剩余的病毒和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。

参考文献：

Hariharan, N., et al. (2011). "Oxidative stress stimulates autophagic flux during ischemia/reperfusion."

Antioxid Redox Signal **14**(11): 2179-2190.

Ma, X., et al. (2012). "Impaired autophagosome clearance contributes to cardiomyocyte death in ischemia/reperfusion injury." *Circulation* **125**(25): 3170-3181.

Choi, A. M., S. W. Ryter and B. Levine (2013). "Autophagy in human health and disease." *N Engl J Med* **368**(7): 651-662.

Gannage, M., D. Dormann, R. Albrecht, J. Dengjel, T. Torossi, P. C. Ramer, M. Lee, T. Strowig, F. Arrey, G. Conenello, M. Pypaert, J. Andersen, A. Garcia-Sastre and C. Munz (2009). "Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes." *Cell Host Microbe* **6**(4): 367-380.
Hariharan, N., Y. Maejima, J. Nakae, J. Paik, R. A. Depinho and J. Sadoshima (2010). "Deacetylation of FoxO by Sirt1 Plays an Essential Role in Mediating Starvation-Induced Autophagy in Cardiac Myocytes." *Circ Res* **107**(12): 1470-1482.

Levine, B. and G. Kroemer (2008). "Autophagy in the pathogenesis of disease." *Cell* **132**(1): 27-42.

Mizushima, N., T. Yoshimori and B. Levine (2010). "Methods in mammalian autophagy research." *Cell* **140**(3): 313-326.

Ravikumar, B., K. Moreau, L. Jahreiss, C. Puri and D. C. Rubinsztein (2010). "Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures." *Nat Cell Biol* **12**(8): 747-757.

Ravikumar, B., S. Sarkar, J. E. Davies, M. Futter, M. Garcia-Arencibia, Z. W. Green-Thompson, M. Jimenez-Sanchez, V. I. Korolchuk, M. Lichtenberg, S. Luo, D. C. Massey, F. M. Menzies, K. Moreau, U. Narayanan, M. Renna, F. H. Siddiqi, B. R. Underwood, A. R. Winslow and D. C. Rubinsztein (2010). "Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology." *Physiol Rev* **90**(4): 1383-1435.

Wei, Y., Z. Zou, N. Becker, M. Anderson, R. Sumpter, G. Xiao, L. Kinch, P. Koduru, C. S. Christudass, R. W. Veltri, N. V. Grishin, M. Peyton, J. Minna, G. Bhagat and B. Levine (2013). "EGFR-Mediated Beclin 1 Phosphorylation in Autophagy Suppression, Tumor Progression, and Tumor Chemoresistance." *Cell* **154**(6): 1269-1284