

自噬单标、双标腺相关病毒使用指南

HANBIO  汉恒生物

汉恒生物科技（上海）有限公司

www.hanbio.net

目录

■ 背景.....	2
■ 病毒实验注意事项.....	2
■ 腺相关病毒的存储与稀释.....	3
自噬单标/双标腺相关病毒的操作.....	3
■ 腺相关病毒的感染与使用.....	4
(一) AAV 感染目的细胞.....	4
(二) AAV 感染组织.....	5
(三) 结果分析.....	8
附 1 实验室病毒操作应急预案.....	10

■ 背景

自噬 (Autophagy) 是通过溶酶体的水解酶非特异的降解细胞质中蛋白质、细胞器等底物的一种过程，是细胞正常生命活动的一部分。自噬异常往往是引起细胞损伤和老化的首要驱动因素，在肿瘤、衰老、炎症、免疫应答、心脑血管疾病、氧化应激、神经退行性疾病、代谢、发育等生物学过程中几乎都有自噬参与。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。

LC3 是用来标记定位自噬小体到自噬溶酶体的动态变化，特别是利用 mRFP-GFP-LC3 差异化标记酸性和中性 LC3 阳性的囊泡，用颜色变化来指示自噬的不同阶段（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）可以在活细胞水平动态监测自噬流的强弱，满足定性和定量分析的要求。GFP-LC3 和 RFP-LC3 单标探针可以监测 LC3 蛋白参与自噬起始过程自噬较少时，GFP-LC3 和 RFP-LC3 融合蛋白主要弥散在胞浆中；自噬增加时，GFP-LC3 和 RFP-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）。

对于单标探针 GFP-LC3 或 RFP-LC3 与双标探针 mRFP-GFP-LC3 的主要区别需要作进一步的说明：GFP-LC3 和 RFP-LC3 单标探针对于监测自噬体的形成特别有用，但这两种单标探针不利于自噬流的整个过程进行动态检测，比如无法精确监测溶酶体是否参与也无法示踪自噬体的成熟过程等。因此，单标探针往往需要联合其他探针，比如溶酶体探针 Lamp1-RFP、Lamp1-GFP 一起使用，根据共定位的信息来更加精细的示踪自噬体的成熟过程。而 mRFP-GFP-LC3 串联双标记探针则可以解决这个问题比如从自噬小体到自噬溶酶体的动态变化等。

汉恒生物构建 RFP-GFP-LC3 双标的腺相关病毒 (AAV) 载体，包装成双标的腺相关病毒，可在体观察自噬，实时检测自噬流的强弱，更加准确、清晰、直观！弥补了 LC3 自噬双标腺病毒在体转染的缺陷，并且可根据组织器官的亲嗜性，选择不同的 AAV 血清型，是最有效的在体自噬流检测工具！

■ 病毒实验注意事项

- 1) 病毒相关实验请在生物安全柜 (BL-2 级别) 内操作。
- 2) 操作病毒时请穿实验服, 佩戴口罩和手套, 尽量不要裸露双手及手臂的皮肤。
- 3) 操作病毒时特别小心病毒溅出。如果操作时超净工作台有病毒污染, 请立即用 70% 乙醇加 1% 的 SDS 溶液擦拭干净。接触过病毒的枪头, 离心管, 培养板, 培养液请于 84 消毒液浸泡后统一处理。
- 4) 如需要离心, 应使用密封性好的离心管, 如有必要请用封口膜封口后离心。
- 5) 病毒相关的废弃物需要特殊收集, 统一经高温灭菌处理, 实验完毕通过肥皂水清洗双手。
- 6) 未尽事宜请咨询汉恒生物技术人员了解详情, 汉恒生物全国免费热线 400-092-0065;
- 7) 您可登录汉恒生物官网 www.hanbio.net 观看病毒实验操作视频, 并与我们的客服人员互动交流。

■ 腺相关病毒的存储与稀释

(一) 腺相关病毒的储存

收到病毒液后如在短期内使用腺相关病毒进行实验, 可以将病毒暂时放置于 4 °C 保存 (尽量一周内用完); 如需长期保存请分装后放置于 -80 °C。

注: a. 反复冻融会降低病毒滴度 (每次冻融会降低病毒滴度 10%-50%); 在病毒使用过程中应尽量避免反复冻融, 所以我们前期对病毒进行了分装 (200 μ L/tube), 收到后直接放置 -80 °C 保存即可。

b. 如果病毒储存时间超过 6 个月, 我们建议在使用前重新测定病毒滴度。

(二) 腺相关病毒的稀释

当需要稀释病毒时, 请将病毒取出置于冰浴融解后, 使用培养目的细胞的 PBS 或生理盐水混匀分装后置于 4 °C 保存 (请尽量一周内用完)。

自噬单标/双标腺相关病毒的操作

■ 腺相关病毒的感染与使用

(一) AAV 感染目的细胞

AAV 对离体细胞的感染能力比较有限，所需病毒 MOI 大于 10^4 ，一般不推荐用 AAV 进行细胞感染实验。虽然 AAV 感染离体细胞能力较差，通过选择合适的血清型并使用合适的病毒感染 MOI 仍然可以达到一定的感染效果。

表 1. 不同血清型 AAV 感染体外培养细胞比较

Cell Line	AAV-1	AAV-2	AAV-3	AAV-4	AAV-5	AAV-6	AAV-8	AAV-9	AAV-DJ	AAV-DJ/8
Huh-7	13	100	2.5	0	0.1	10	0.7	0	500	0.2
HEK293	25	100	2.5	0.1	0.1	5	0.7	0.1	500	0.3
HeLa	3	100	2	0.1	6.7	1	0.2	0.1	667	0.2
HepG2	3	100	16.7	0.3	1.7	5	0.3	ND	1250	0.5
Hep1A	20	100	0.2	1	0.1	1	0.2	0	400	0.1
911	17	100	11	0.2	0.1	17	0.1	ND	500	0
CHO	100	100	14	1.4	333	50	10	1	25000	5
COS	33	100	33	3.3	5	14	2	0.5	500	0.3
MeWo	10	100	20	0.3	6.7	10	1	0.2	2857	1
NIH3T3	10	100	2.9	2.9	0.3	10	0.3	ND	500	0.1
A549	14	100	20	ND	0.5	10	0.5	0.1	1000	0.1
HT1180	20	100	10	0.1	0.3	33	0.5	0.1	333	0.2
Monocytes	1111	100	ND	ND	125	1429	ND	ND	100	ND
Immature DC	2500	100	ND	ND	222	2857	ND	ND	200	ND
Mature DC	2222	100	ND	ND	333	3333	ND	ND	100	ND

1. 细胞培养:

将状态良好的目的细胞接种到细胞培养皿中，尽量使用小孔培养皿（24 孔板或者 48 孔板），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%之间。

2. 确定 MOI:

MOI (Multiplicity of Infection, 感染复数) 是指每个细胞感染的病毒数。通常 MOI 越高，AAV 病毒感染后宿主细胞内保留的腺病毒基因组数量以及目的蛋白的表达量越高。

AAV 病毒对于不同种类不同来源的细胞，其最适 MOI 各有差别，原则上最适 MOI 是感染效率较好的最低 MOI。每种细胞对应每种类型的病毒都应该进行最适 MOI 摸索实验，

设置 MOI 梯度摸索实验，选择适合的 MOI 进行实验。MOI 一般以 10^4 : 10^5 : 10^6 进行梯度摸索。

3. MOI 对应病毒体积的换算

转染时细胞数（一般以传代计数细胞数 $\times 2$ 计算） \times MOI=病毒个数；则加入的病毒体积数=病毒个数/病毒滴度。

例子：转染细胞数为 10^5 个，MOI 为 10^5 ，则需要病毒的个数为 10^{10} 个，病毒如果滴度为 10^{12} v. g/ml，则需要加入的病毒体积为 $10^{10} / (10^{12}$ v. g/ml) = 10^{-2} ml = 10 μ l。

4. 病毒感染：

感染实验分为两组，分别添加相应腺体病毒载体和等滴度同体积的对照病毒载体，1/2 体积培养液感染（详见下表格）。加入的病毒量范围推荐 MOI 为 10^4 ; 10^5 ; 10^6 内。1/2 体积感染 2 小时后，不换液，追加 1/2 新鲜培养液，继续 37 度感染过夜。感染 24 小时时候换新鲜培养液。

对于 polybrene 适用的细胞，1/2 体积感染的培养液中，polybrene 浓度为固定值（5~8 μ g/ml）；如 2 小时后停止感染置换新鲜培养液，则无需再加入 polybrene（针对上述增殖能力弱的细胞）；如 2 小时 1/2 体积感染后继续追加培养液感染过夜，则补充的新鲜培养液中要含有等终浓度的 polybrene。

表 2. 不同培养皿加入的培养液体积参考表格

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

（二）AAV 感染组织

1. AAV 血清型选择

AAV 病毒主要应用于在体组织器官的感染，根据不同的组织选择合适的血清型，可

用于神经系统、眼睛、心肌、肝脏、肺脏、肾脏和肌肉等组织器官。

表 3. 不同血清型 AAV 对各组织器官细胞的亲和性

组织亲和性	推荐血清型
肝脏	AAV8、AAV9
心脏	AAV9
肺	AAV6
肌肉	AAV9
脑组织	AAV2、AAV9、AAV5、AAV8
眼部-视网膜	AAV2、AAV-DJ
眼部-角膜	Anc80L65
内耳	AAV-Anc
脂肪	AAV9
胰腺	AAV8
穿血脑屏障感染脑组织	AAV-BBB
逆行示踪	AAV-retro

2. AAV 注射方式

关注汉恒生物微信公众号：菜单栏——微官网——实验视频，可以观看动物不同部位的 AAV 具体注射方式。

表 4. 注射方式及血清型选择

注射部位	推荐的血清型	注射方式	动物	注射体积 (μL)
心脏	9型	原位多点注射	大鼠	10-15μL/点, 3-5 个点
			小鼠	10-15μL /点, 3-5 个点
		尾静脉注射	大鼠	250μL (200g 体重)
			小鼠	100μL
肝脏	8型 (特异)	尾静脉注射	大鼠	200μL (200g 体重)
	9型 (较亮)		小鼠	100μL
全脑	AAV-BBB	尾静脉注射	大鼠	250-300μL
			小鼠	100μL
大脑 (局部)	9型, 2型, 5型, 8型	立体定位注射	大鼠	1-5μL
			小鼠	0.2-2μL
脊髓	9型, 5型, 1型	鞘内注射	大鼠	10-20μL
			小鼠	
脂肪	9型	腹内脂肪-腹腔注射	大鼠	300μL
			小鼠	150-200μL
		皮下脂肪-原位注射	大鼠	10-15μL /点, 5-8个点
			小鼠	10-15μL /点, 5-8个点
骨骼肌	9型	原位多点注射	大鼠	10-15μL /点, 3-5个点
			小鼠	10-15μL /点, 3-5个点
眼睛	2型——玻璃体腔	玻璃体腔注射	大鼠	3-5μL
	DJ型——视网膜下腔		小鼠	1-2μL
		视网膜下腔注射	大鼠	3-5μL
	小鼠		1-2μL	
肺脏	6型 (特异)	无创气管注射	大鼠	100-150μL (200g体重)
			小鼠	50-75μL
肾脏	2型或9型	肾脏肾盂注射	大鼠	100-150μL
			小鼠	50-75μL
肠道	1型或5型	灌肠	大鼠	1000μL (200g 体重)
			小鼠	500μL
血管 (内皮为主)	1型或5型	腹主动脉局部感染	大鼠	50μL

3. AAV 注射后的观察

AAV 注射感染组织器官至少 3 周后可取材进行冰冻切片直接观察荧光 (如 GFP, RFP 等)、石蜡切片 (可以组化染色)、荧光定量 PCR (qPCR), 甚至免疫印迹 (WB) 来考察

基因表达情况。(一般情况下,对于心肌、骨骼肌、肝脏、肾脏、皮肤等适合原位注射的组织器官,如果 AAV 带有 GFP 荧光标记,注射感染适量病毒 3~4 周后肉眼即可观察到注射部位组织发绿。)

(三) 结果分析

mRFP-GFP-LC3 串联荧光蛋白腺相关病毒中表达的 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,原理如下图所示)。

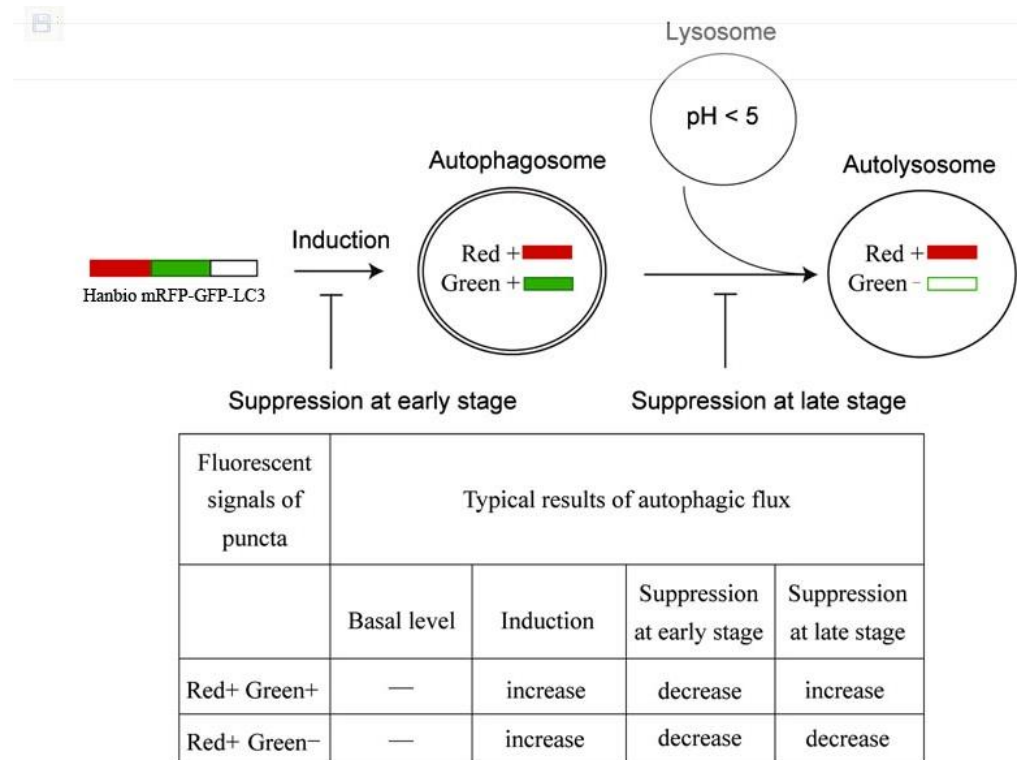


图 1. mRFP-GFP-LC3 原理

使用激光共聚焦显微镜拍照,然后用 ImageJ 软件分析荧光的相对强度。GFP 在酸性环境中会降解,而 RFP 则不会。因此,黄色斑点(由红色和绿色之间的重叠形成)表示自噬体,而红色斑点表示自噬溶酶体。如果自噬被激活,红色信号将多于黄色。如果自噬被抑制,则黄色信号多于红色信号,如下图所示。

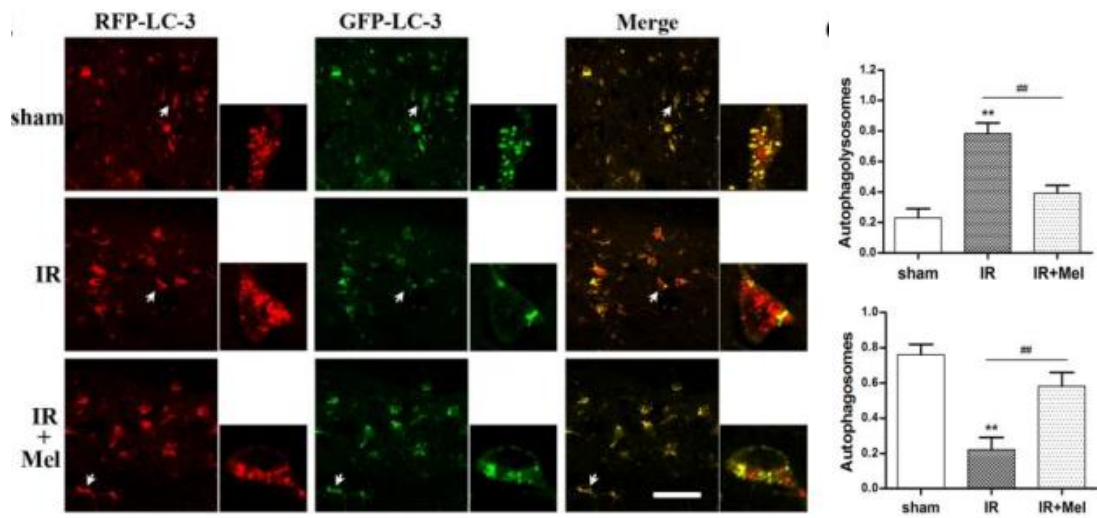


图 2. 在合并后的图像中，黄色斑点表示自噬体，而红色斑点表示自噬溶酶体。与 sham 组相比，IR 组中红色斑点百分比明显增加，黄色斑点百分比减少，说明缺血/再灌注导致自噬溶酶体增加，自噬体减少。J Pineal Res. 2017 Apr;62(3).

附 1 实验室病毒操作应急预案

一、针对病毒（慢病毒、腺病毒、腺相关病毒及逆转录病毒）溢出

1、戴一次性乳胶手套及实验用口罩，穿实验服，必要时需进行脸和眼睛防护，在生物安全柜中操作病毒实验。

2、当有少量的病毒液体泼溅，立刻停止实验，向纸巾上倾倒，适当的消毒剂，并立即覆盖周围区域（通常可以使用 84 消毒液）。

3、使用消毒剂时，从溢出区域的外围开始，朝向中心进行处理。作用适当时间后（例如 30 min），将所处理物质清理掉。

4、如果含有碎玻璃或其他锐器，则要使用镊子、簸箕或硬的厚纸板来收集处理过的物品，并将它们置于可防刺透的容器中以待处理。切勿直接用手进行操作。

5、对溢出区域再次清洁并消毒（如有必要，重复第 2~4 步）。将污染材料置于防漏、防穿透的废弃物处理容器中。

二、病毒液体接触到皮肤或眼睛

1、脱掉污染的手套或者其他防护物，立即用含 75%乙醇消毒液（或者 0.2-0.5%的过氧乙酸、500-10000 mg/L 有效氯消毒液、碘酒）的棉球擦拭，切不可用 84 消毒液，以免灼伤皮肤。并且用大量清水冲洗，至少 15 分钟。

2、如果遇到针头扎伤或者刀片割伤时，第一时间处理伤口，应立即用力捏住受伤部位，向离心方向挤出伤口的血液，不可来回挤压，同时用流动水清洗伤口，至少 15 分钟。

3、若感染性物质意外进入眼睛、口腔，立即用大量流动清水或生理盐水冲洗，至少 15 分钟。

4、病毒污染眼部或眼睛周围：立刻用洗眼器或洗眼液冲洗眼部，至少 15 分钟，并到医院开具抗病毒眼药水。

5、经简单处理或消毒后，务必立即前往急诊室就诊。保留完整适宜的医疗记录。

6、意外受伤或感染后必须在 24 小时内报告实验室管理人员，并填写生物安全事件报告书。

三、病毒溢出污染离心机

1、遇病毒溢出污染离心机，应立即停止离心，离开实验室，开启实验室紫外灯 60 分钟。离心机一个小时后打开，让病原物质沉降一下，然后工作人员戴双重口罩或 N95 口罩，用镊子和酒精擦拭污染部位。

2、处理完毕后，脱弃外层手套，再开紫外照射 60 分钟。填写意外事故登记表。