

自噬双标腺病毒 (HBAD-mRFP-GFP-LC3) 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
• 病毒实验操作注意事项	2
• 收到病毒后的处理	2
HBAD-mRFP-GFP-LC3 腺病毒的操作	3
• 腺病毒感染细胞预实验 (MOI 的摸索)	3
• 感染目的细胞	5
(一) 细胞准备	5
(二) 病毒感染	5
I、贴壁细胞	5
II、特殊细胞	6
(三) 观察感染情况	6
(四) 结果分析与统计	7
• 参考文献:	10
附录 1	11
附录 2 实验室病毒操作应急预案	12

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, 有时多层或双层) 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, 针对于此我们汉恒生物科技 (上海) 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。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, 是我们研究自噬尤其是自噬流发生的不可或缺的利器。

病毒实验操作注意事项

- 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。

收到病毒后的处理

(一)、腺病毒的储存

收到病毒液后若在短期内使用，可将病毒放置于 4℃ 保存（一周内使用完最佳）；如需长期保存请分装后放置于 -80℃ 。

注：a. 反复冻融会降低病毒滴度（每次冻融会使病毒滴度降低 10%~50%），因此在病毒使用过程中尽量避免反复冻融。汉恒生物对病毒已进行分装（200 μL/tube），收到后请直接放置-80℃冰箱保存即可。

b. 若病毒储存时间超过 6 个月，汉恒生物建议在使用前重新测定病毒滴度。

（二）、腺病毒的稀释

需要稀释病毒时，请将病毒取出置于冰浴融解后，使用 PBS 或培养目的细胞用的无血清培养基（含血清或含双抗不影响病毒感染）混匀分装后置于 4℃ 保存（一周内使用完最佳）。如原病毒标记的滴度为 1×10^{10} PFU/mL，取 10μL 至 90μL 的常规培养基中，即可得到 1×10^9 PFU/mL 滴度的病毒。

HBAD-mRFP-GFP-LC3 腺病毒的操作

腺病毒感染细胞预实验（MOI 的摸索）

MOI（Multiplicity of Infection，感染复数）是指感染每个细胞的病毒数，通常 MOI 越高，目的蛋白的表达量越高，但是毒性也会随之变大。对于分裂活跃的细胞，比如 HeLa、293 细胞，MOI=1~3 时，80% 以上的细胞均表达目的基因。而对于非分裂细胞，比如原代细胞，感染效率较低。需要进行 MOI 梯度摸索实验，选择适合的 MOI 进行实验。

24 孔板摸索 MOI：

Day 1：细胞准备

以 293T 细胞为例，将生长状态良好的目的细胞消化计数后稀释至 3×10^5 /mL，加入 24 孔板，500 μL/孔 (1.5×10^5 个细胞)。放入 37℃，5% CO₂ 培养箱中培养过夜。因细胞的大小和生长速度略有不同，一般是建议保证第二天进行病毒感染的时候细胞汇合率介于 30% 至 50% 之间。

Day 2：病毒感染（1/2 小体积感染法）及换液

我们推荐 1/2 小体积感染法，即病毒感染时，加入 1/2 体积新鲜培养液，加入腺病毒感染 4h 后补足至培养体积。24 孔板感染时的培养体积为 250 μL。

感染前，从冰箱取出并在冰上慢慢融化病毒，如需要稀释，按原病毒标记的滴度为 1×10^{10} PFU/mL 计算，取 30 μ L 至 270 μ L 的常规培养基中，即可得到 1×10^9 PFU/mL 滴度的病毒。

分别取 MOI 为 10, 30, 100, 300, 500 进行预实验摸索最适 MOI，以腺病毒滴度 1×10^{10} PFU/mL 为例（稀释后滴度为 1×10^9 PFU/mL），不同的 MOI 值加入的病毒量见下表：

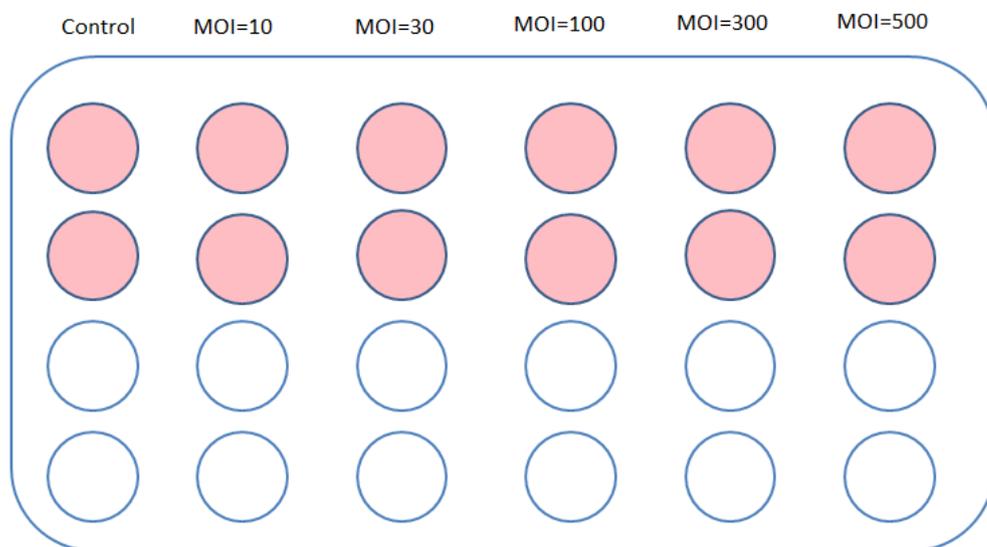


图 1 24 孔板示意图

注：保持细胞形态清晰、生长良好、无污染，为了减小误差，推荐平行感染 2~3 个复孔。

表 1 24 孔板每孔不同 MOI 值加入病毒液体积

注：每孔加病毒量 (μ L) = MOI * 细胞数 / 病毒滴度 (PFU / mL) \times 1000

细胞数量	MOI 值	稀释后滴度 (PFU/mL)	稀释后病毒液体积 (μ L)
1.5×10^5	10	1×10^9	1.5
1.5×10^5	30	1×10^9	4.5
1.5×10^5	100	1×10^9	15
1.5×10^5	300	1×10^9	45
1.5×10^5	500	1×10^9	75

MOI = (病毒滴度 \times 病毒体积) / 细胞数目

腺病毒加入 4h 后，补足至 500 μ L 培养体积。感染后 6-8h，吸去含病毒的培养液，换上新鲜的完全培养液，继续 37 $^{\circ}$ C 培养。

Day 3-4: 观察荧光

感染 36-48h 显微镜观察荧光。感染效率 80%左右，且细胞生长状态良好的组，对应的感染条件和 MOI 即可最为后续感染实验的参考 MOI。

注：如果病毒不表达荧光，还可以通过目的基因的 qPCR、WB、免疫荧光、免疫组化等方法摸索最佳 MOI。

感染目的细胞

（一）细胞准备

以 293T 细胞为例，将生长状态良好的目的细胞消化计数后稀释至 3×10^5 /mL，加入 24 孔板，500 μ L/孔 (1.5×10^5 个细胞)。放入 37°C，5% CO₂ 培养箱中培养过夜。因细胞的大小和生长速度略有不同，一般是建议保证第二天进行病毒感染的时候细胞汇合率介于 30%至 50%之间。

（二）病毒感染

I、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，条件允许情况下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（部分细胞贴壁能力不是很强，此时需要预先在玻片上包被 galectin 甚至 laminin）。

我们推荐 1/2 小体积感染法，即病毒感染时，加入 1/2 体积新鲜培养液，加入腺病毒感染 4h 后补足至正常培养体积。具体步骤如下：感染前，从冰箱取出并在冰上慢慢融化病毒，吸取细胞原有培养基，加入 1/2 体积新鲜培养基，根据摸索的 MOI 值，加入合适体积的病毒轻轻混匀，进行感染（每孔加病毒量（ μ L）=MOI*细胞数/病毒滴度（PFU /mL） \times 1000）。感染 4h 后补足至完全培养体积。感染后 8-16h，吸去含病毒的培养液，换上新鲜的完全培养液，继续 37°C 培养。

表 1 不同培养皿加入的培养液体积参考用量

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

II、特殊细胞

1) 感染悬浮细胞

感染悬浮或半悬浮细胞，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（1200×g）离心 1 h，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，轻轻吹打混匀 5-10 下，室温放置 15 min（尽量不要超过 30 min，间隔 10min 可以再吹打一次），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过夜后换液即可。

2) 对于极难感染的细胞

对于极难感染的细胞，如 DC（树突状细胞）等，可采用多次感染的方法，即感染 24 h 后，直接二次加入病毒液进行重复感染，可显著提升感染效率。

（三）观察感染情况

感染后 36-48 h，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) 结果分析与统计

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, 原理如图 1 所示)。

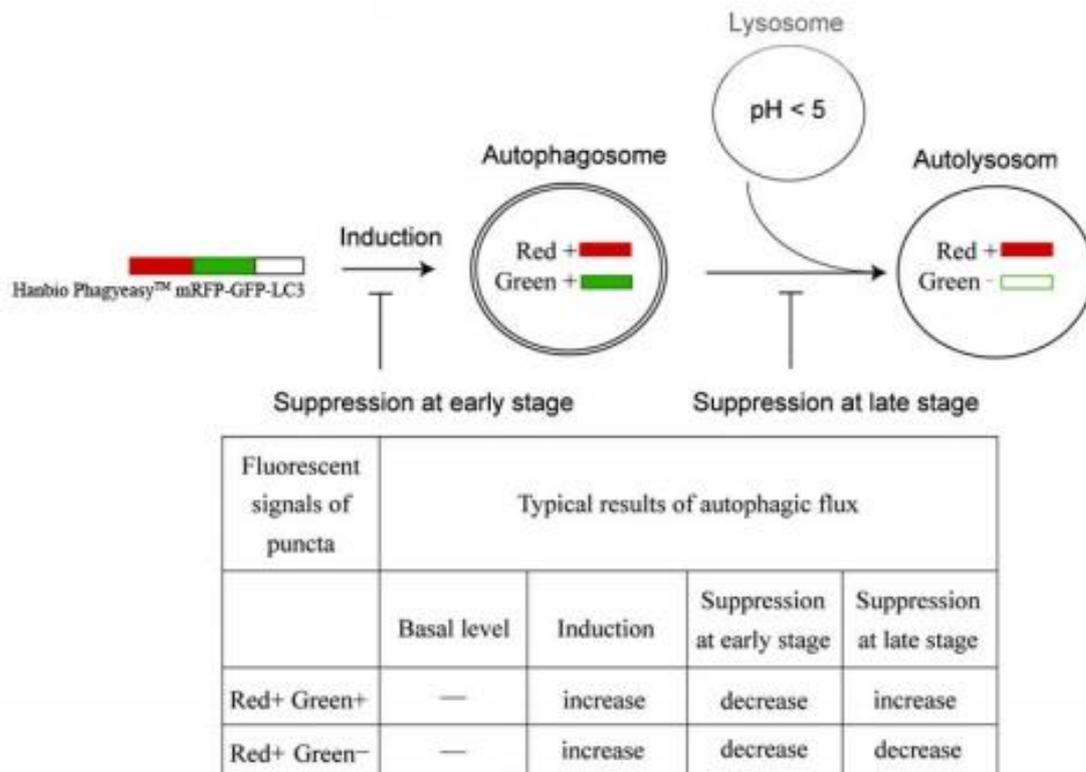


图 1 汉恒串联荧光蛋白病毒监测自噬流的检测原理图

衡量自噬的“黄金标准”

在明白如何切入自噬研究方向之后, 我们还需要知晓有哪些“标准”能提示有自噬的发生。也即如何衡量研究对象系统内 (比如药物或者基因干预细胞系、原代细胞, 甚至动物个体组织和脏器) 是否发生了自噬、以及自噬流的强弱变化。这些“标准”无论是对基金的申请、论文的发表还是课题研究都十分的重要, 因为这些“标准”是国际上研究自噬领域的专家们一致性的观点。在此, 我们姑且称之为自噬研究的“黄金标准” (图 2)。这些“黄金标准”包括 LC3 剪切的变化、电镜直接观察到自噬囊泡、荧光蛋白标记的 LC3 监测自噬流。LC3 剪切和电镜相对比较简单, 下面我们会有详细内容讨论如何利用荧光蛋白探针研究自噬流的变化。

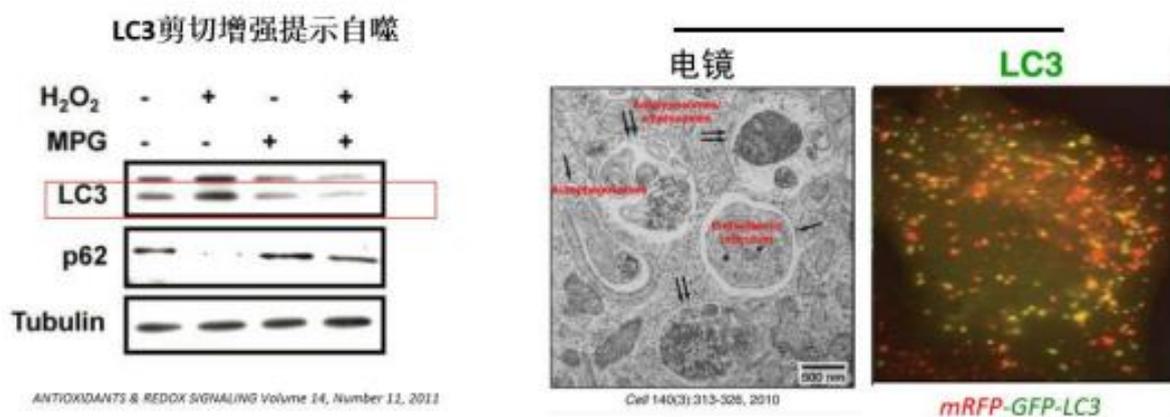


图 2 衡量自噬的三个“黄金标准”，分别是 LC3 的翻译后加工及脂化修饰、利用电镜直接观察自噬小体和自噬溶酶体的多少、荧光蛋白标记的 LC3 监测自噬流。

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) 之后黄色斑点和红色斑点的数目, 然后做出 bar 图。** 如图 3: 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)。

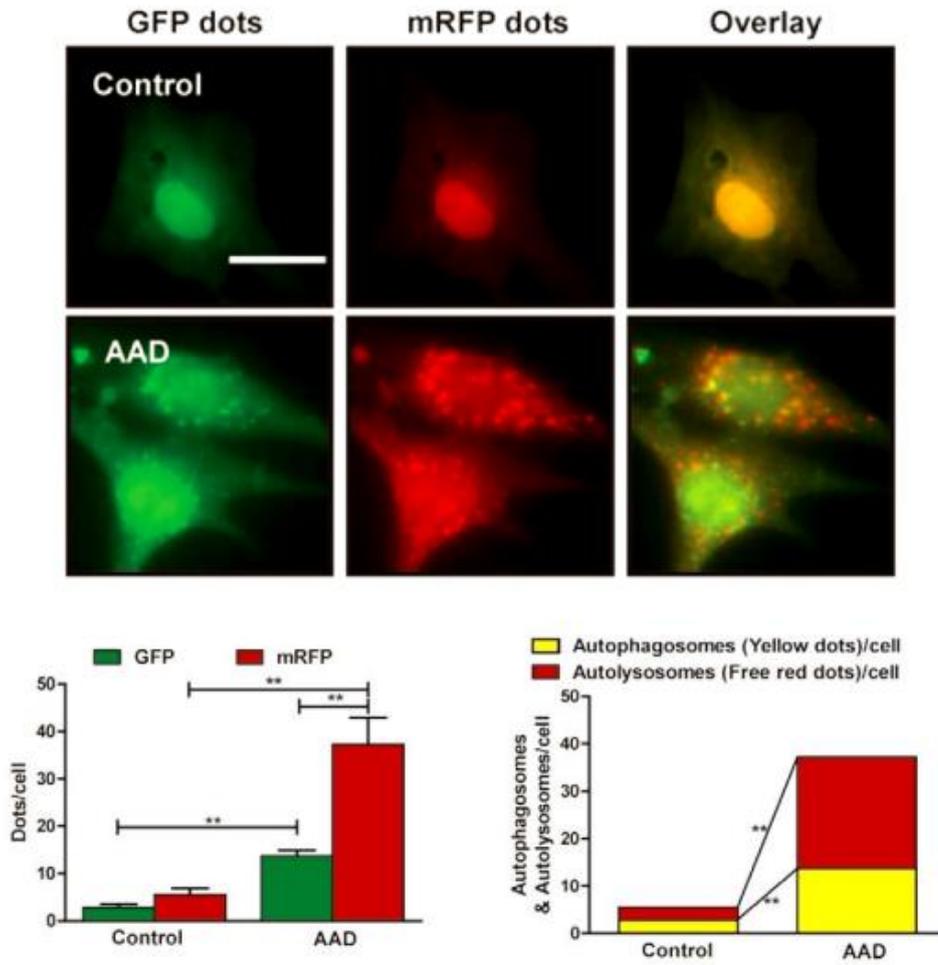


图 3.在合并后的图像中，黄色斑点表示自噬体，而红色斑点表示自噬溶酶体。 *Antioxid Redox Signal*

14(11): 2179-2190.

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.

附录 1

汉恒生物腺病毒感染复数 (MOI) 与体积对应表					
规格	大约数目	MOI 值	加入病毒数量	腺病毒	MOI 摸索时的体积梯度 /ul
96well	2.5×10^4	50-100	1.5×10^6	0.1-0.5ul	0.1; 0.3; 1
48well	1.2×10^5	50-100	$0.5-2 \times 10^7$	0.5-2ul	0.5; 2; 6
24well	2.3×10^5	50-100	1.3×10^7	1-3ul	1; 3; 10
12well	5×10^5	50-100	$2.5-5 \times 10^7$	2.5-5ul	2.5; 7.5; 25
6well	1.2×10^6	50-100	$0.5-2 \times 10^8$	5-20ul	5; 15; 50
35mmdish	1.2×10^6	50-100	$0.5-2 \times 10^8$	5-20ul	5; 15; 50
60mmdish	2.4×10^6	50-100	1.4×10^8	10-40ul	10; 30; 100
100mmdish	$6-10 \times 10^6$	50-100	$3-10 \times 10^8$	30-80ul	30; 100; 300
150mmdish	1.2×10^7	50-100	$0.5-2 \times 10^9$	50-200ul	60; 180; 600
腺病毒滴度以 10^{10} /ml 为准, 其他滴度需相应换算;					
大约细胞数目是根据 80%~100% 细胞密度估算而出, 具体细胞数请种细胞时进行细胞计数。					

注:

1) 24 板长满了细胞大约有 3×10^5 个细胞。如果一天后要长到 70% (2.1×10^5), 建议 $1.2-1.4 \times 10^5$ 个细胞。因为细胞刚放进去的前几个小时需要粘在生长表面及适应新的生长条件, 不会达到 24 小时翻一倍的速度。其他规格培养可参照此

确定相应 culture 细胞量。确定相应 culture 细胞量。

2) MOI 值: MOI 是 multiplicity of infection 的缩写, 中文译为感染复数, 实际的含义即为每个细胞被多少个有活力病毒所感染。各种细胞的最适 MOI 值有差别, 请客户正式实验前先进进行预实验摸索最适 MOI。

附录 2 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，应立刻停止离心，离开实验室，开启实验室紫外灯 60 分钟。离心机一个小时候后打开，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。