

解锁自噬 Autophagy

机制解析、检测方案与研究工具
Mechanism Analysis, Detection Protocols
and Research Tools

HANBIO

汉恒生物—专注病毒包装

☎400-092-0065

📍上海市浦东新区蔡伦路150号1号楼
✉service@hanbio.net



汉恒生物微信公众号

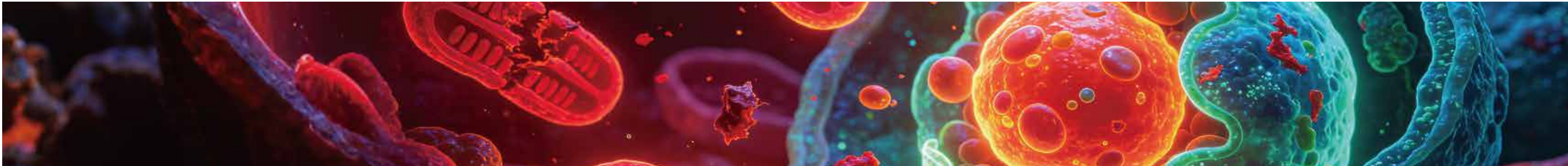


汉恒生物小红书科研平台



汉恒客户服务中心

一、自噬的基本概念与研究的切入角度	P02
二、衡量自噬的“黄金标准”	P05
三、调控自噬流的两种常见方法	P05
四、汉恒生物自噬领域的金牌研究工具	P06
①主流定位示踪工具-LC3	P06
②主流定位示踪工具-p62	P07
③pH敏感自噬工具-Keima	P08
④线粒体自噬工具-Cox8	P09
⑤内质网自噬工具-KDEL/RAMP4	P09
⑥分子伴侣自噬工具-KFERQ	P10
⑦基因操作在自噬研究过程中的应用	P11
五、自噬现货产品概览及客户发表文献节选	P12
附：病毒使用方法	P17



一、自噬的基本概念与研究的切入角度

自噬 (Autophagy)，是指溶酶体中的水解酶非特异地降解细胞质中蛋白质、细胞器等底物的过程。自噬是细胞正常生命活动的一部分，但自噬异常往往也是引起细胞损伤和老化的重要因素。自噬参与着肿瘤、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、发育等重要生物学过程。

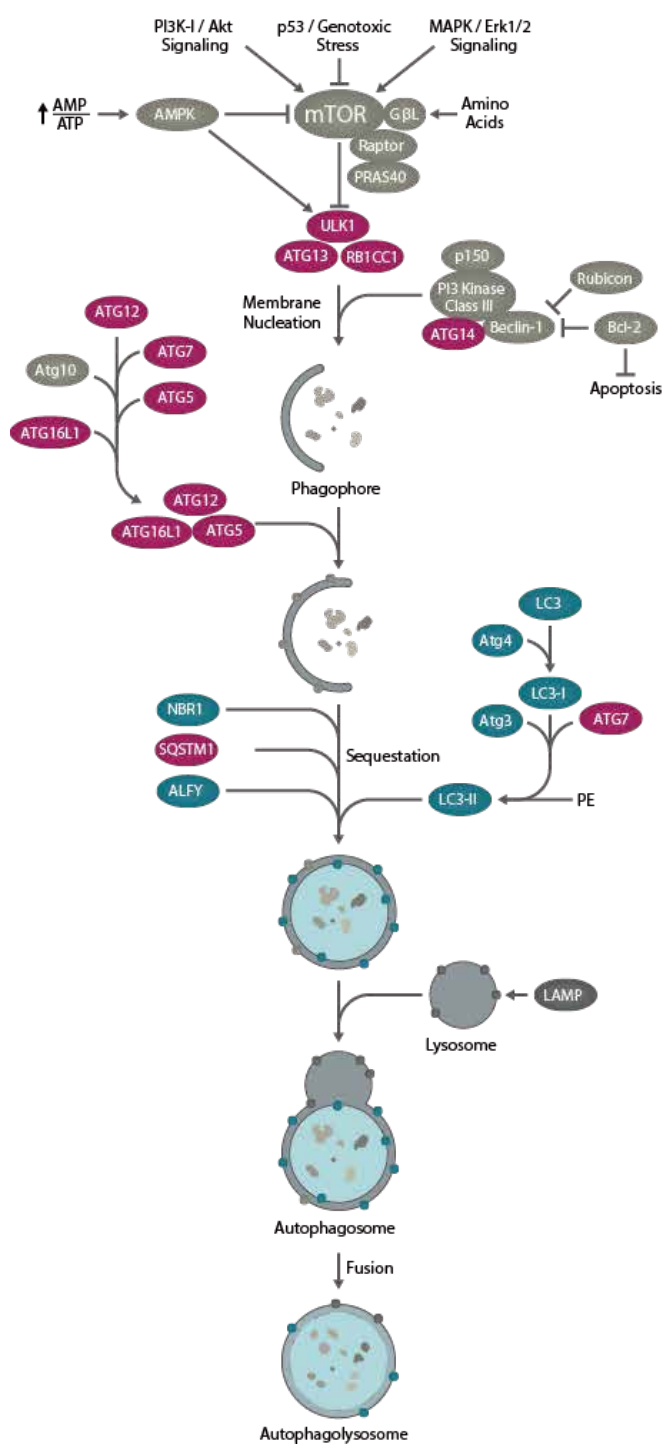


图1. 调控自噬的主要信号通路

自噬可分为非选择性自噬和选择性自噬。非选择性自噬是不加选择地将细胞质成分或细胞器运送到溶酶体；选择性自噬是降解特定的靶点，如受损的细胞器（线粒体、内质网、核糖体自噬）、聚集蛋白（聚集自噬）或入侵细菌（异体自噬）等。选择性自噬研究最为广泛的是细胞器自噬中的线粒体自噬（是指通过特定的线粒体外膜受体或与线粒体表面蛋白质结合的泛素分子促进的，从而形成线粒体周围的自噬体）（图2）和内质网自噬（是指内质网功能发生改变时，细胞激活选择性自噬清除细胞内受损的内质网、内质网膜或蛋白的过程，以维持细胞内的环境稳态）（图3）。细胞器自噬可分为：大细胞器自噬（包裹细胞器碎片的自噬体与溶酶体融合以降解其内容物）和微细胞器自噬（细胞器碎片直接被溶酶体吞噬），此外，溶酶体也可直接与细胞器来源的囊泡融合并进行降解。

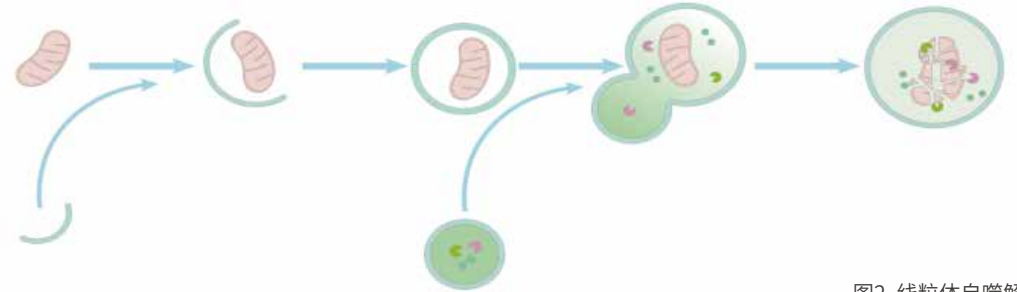


图2. 线粒体自噬解析图

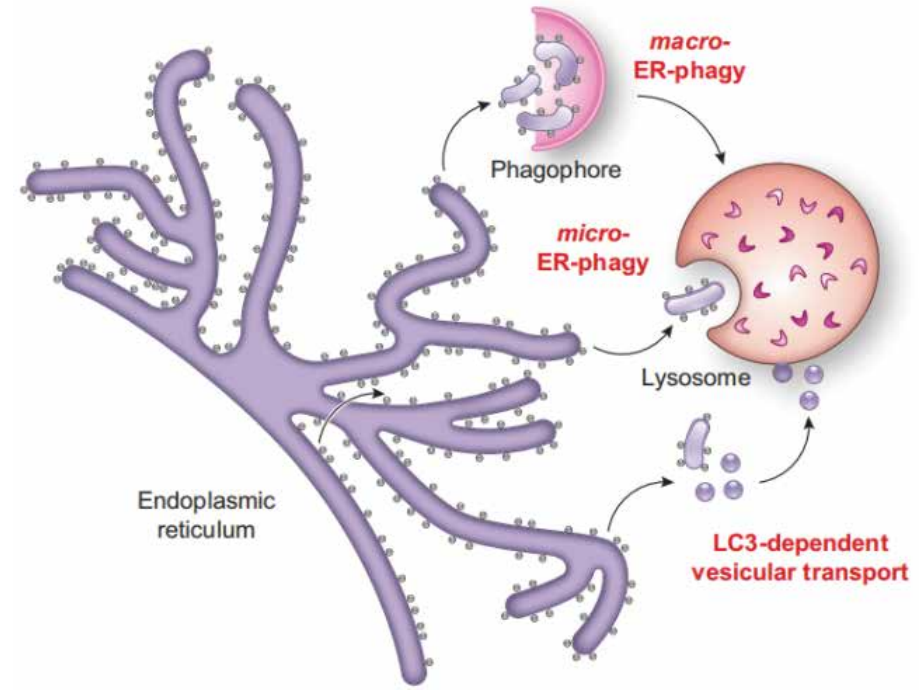
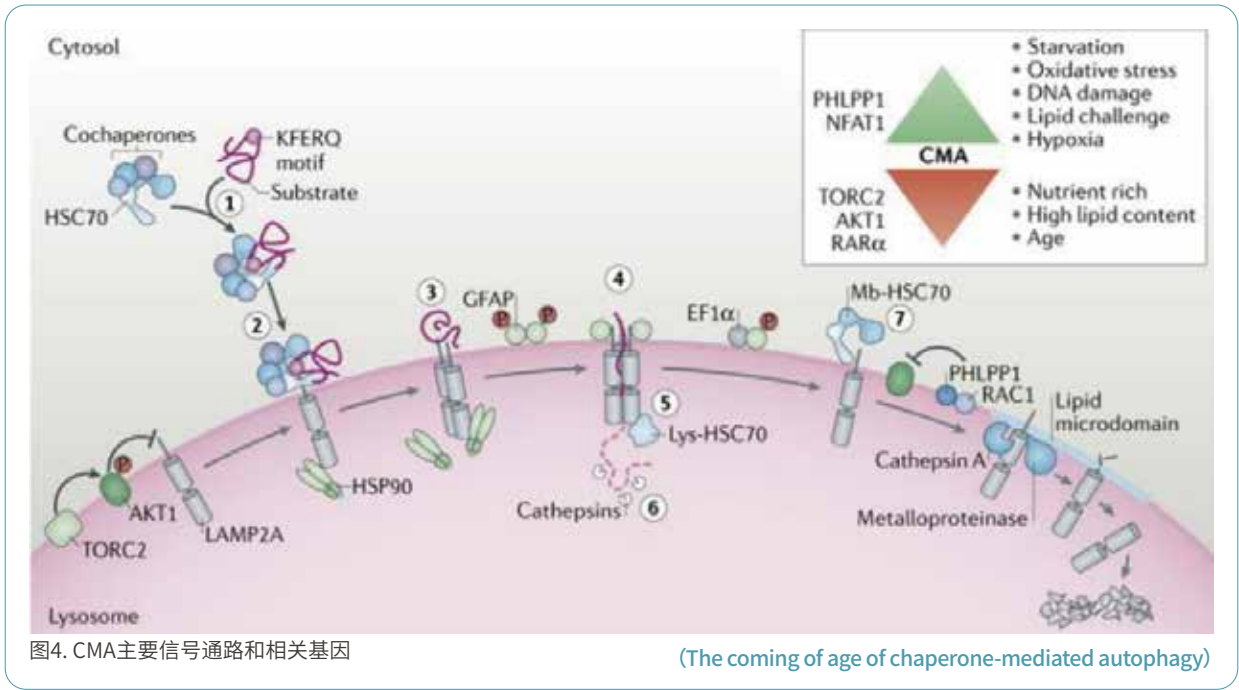


图3. 内质网自噬解析图
(ER-PHAGY: MECHANISMS, REGULATION, AND DISEASES CONNECTED TO THE LYSOSOMAL CLEARANCE OF THE ENDOPLASMIC RETICULUM)

自噬还可以根据底物进入溶酶体的方式大致分为三类:大自噬(Macroautophagy),即我们通常所指的自噬,其通过形成双层膜的囊泡结构—自噬小体,来隔离和转运胞质物质到溶酶体,大自噬过程一般分为三个阶段:自噬起始阶段、自噬小体形成阶段、自噬溶酶体阶段;微自噬(Microautophagy),溶酶体膜内陷,直接吞噬胞质物质;分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA),分子伴侣直接转运未折叠的蛋白质跨过溶酶体膜进入溶酶体(图4)。



自噬是一个受复杂信号精细调控的生物学过程(图1),研究比较清楚的有PI3K-I和PI3K-III、mTOR等。自噬过程一般分为以下几个阶段(图5):

1.自噬起始阶段:

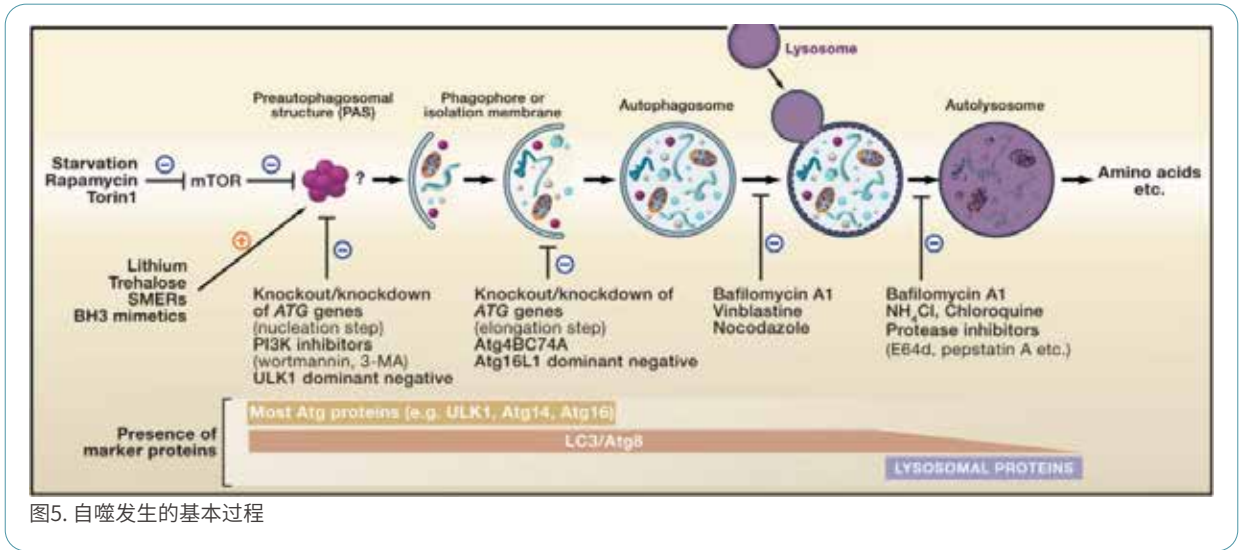
细胞接收到自噬诱导信号后,在胞浆内形成一个小的类似脂质体双分子层的扁平状膜结构。该结构可在电镜下观察到,被称为Phagophore。Phagophore随着自噬的发展过程不断扩张,是自噬发生的第一个铁证。

2.自噬小体形成阶段:

Phagophore 不断延伸,LC3B逐渐募集。随后,p62带着需要降解的细胞内容物结合上来,磷脂双层膜将胞浆中的细胞成分,包括细胞器,全部揽入膜结构中,然后“收口”,成为密闭的球状的autophagosome,即“自噬体”。电镜下观察到自噬体是自噬发生的第二个铁证。自噬体必须要有两个特征:一是双层膜,二是含有胞浆成分,如线粒体、内质网碎片等。

3.自噬溶酶体阶段:

自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体。形成自噬溶酶体后,自噬体的内膜被溶酶体中的蛋白水解酶降解,两者的内容物合二为一。自噬小体中的细胞组分被降解之后,对机体有用的产物(如氨基酸、脂肪酸等)被输送到胞浆中,供细胞重新利用,而残渣或被排出细胞外或滞留在胞浆中。



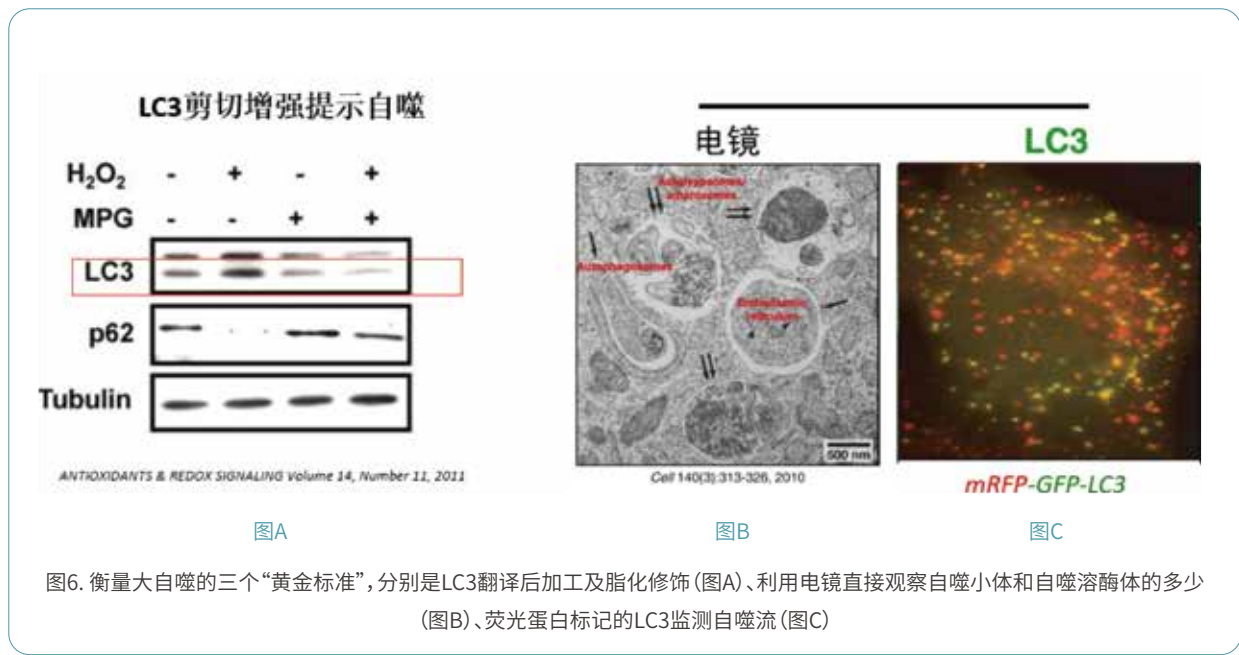
自噬是一个需要多种蛋白质因子参与的复杂过程,可以通过基因操作或者药物人为干预其中某些关键步骤,实现对自噬过程的调控。

二、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”能够证明自噬的发生。即如何衡量研究对象系统内(比如药物或基因干预细胞系/原代细胞,甚至动物个体组织/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”是国际上自噬研究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6)。

这些“黄金标准”指标具体如下:

大自噬——LC3剪切的变化	大自噬——电镜直接观察到自噬囊泡
大自噬——荧光蛋白标记的LC3监测自噬流	细胞器自噬——细胞器定位肽融合荧光变化监测自噬流



三、调控自噬流的两种常见方法

怎么判断自噬是否参与了在研的某个表型?首先我们可以通过改变自噬的强弱来观测自噬与表型之间的正向或者反向关系,以此初步判断自噬与表型的相关性。在此我们主要介绍两种操控自噬的方法:

①诱导自噬:

利用饥饿培养(如EBSS饥饿培养基,不含有血清和氨基酸)来激活自噬流。

5.33 mM KCl
26.19 mM NaHCO ₃
117.24 mM NaCl
1.01 mM Na ₂ H ₂ PO ₄
5.56 mM D-Glucose
2 mM CaCl ₂
2 mM MgCl ₂
20 mM HEPES

图7. EBSS配方成分

EBSS处理细胞超过16h可以有效的激活自噬。类似的还有用mTOR抑制剂雷帕霉素(Rapamycin)及其类似物处理细胞,在1-20μM的浓度下处理2 h就可以有效诱导自噬。

②抑制自噬:

最常用的抑制剂是溶酶体抑制剂—氯喹(chloroquine diphosphate),通常使用浓度在30-100μM,处理时间为12-16h。氯喹处理过的细胞由于溶酶体功能被抑制而无法降解溶酶体内容物,这会致使自噬流由于自噬溶酶体降解阻断而变相增强。类似的抑制晚期自噬进程的的药物还有Bafilomycin A1、NH₄Cl以及溶酶体蛋白酶抑制剂Leupeptin A、E64d、pepstatin A等,均可以抑制溶酶体对底物的降解,显著增加自噬囊泡的数量。需要说明的是,3-MA也属于常用自噬抑制药物,但其抑制的是自噬发生的较早期,会显著抑制自噬小体的形成。

四、汉恒生物自噬领域的金牌研究工具

通过前期了解到如何操纵自噬，但操纵自噬之后还必须要有的检测手段来直观体现这种干预效果。下面介绍的荧光蛋白标记探针就是针对这种需求而开发，如大自噬工具LC3 (LC3B)、分子伴侣自噬工具、细胞器定位标记的系列工具以及自噬相关基因载体等，详述如下：

①主流自噬示踪工具:mCherry-EGFP-LC3 /mCherry-LC3/EGFP-LC3

LC3可以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mCherry-EGFP标记及追踪LC3，EGFP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EGFP荧光蛋白对酸性敏感，当自噬体与溶酶体融合后EGFP荧光发生淬灭,此时只能检测到红色荧光。用颜色变化来指示自噬的不同阶段，可以在细胞水平动态监测自噬流的强弱，满足定性和定量分析的实验要求。
值得注意的是：外源过表达的LC3如果过量，会导致LC3非特异性的自发聚集，为了区分自发聚集与自噬诱导的聚集，我们提供了不能参与自噬的LC3突变体 (G120A) 来作为对照。

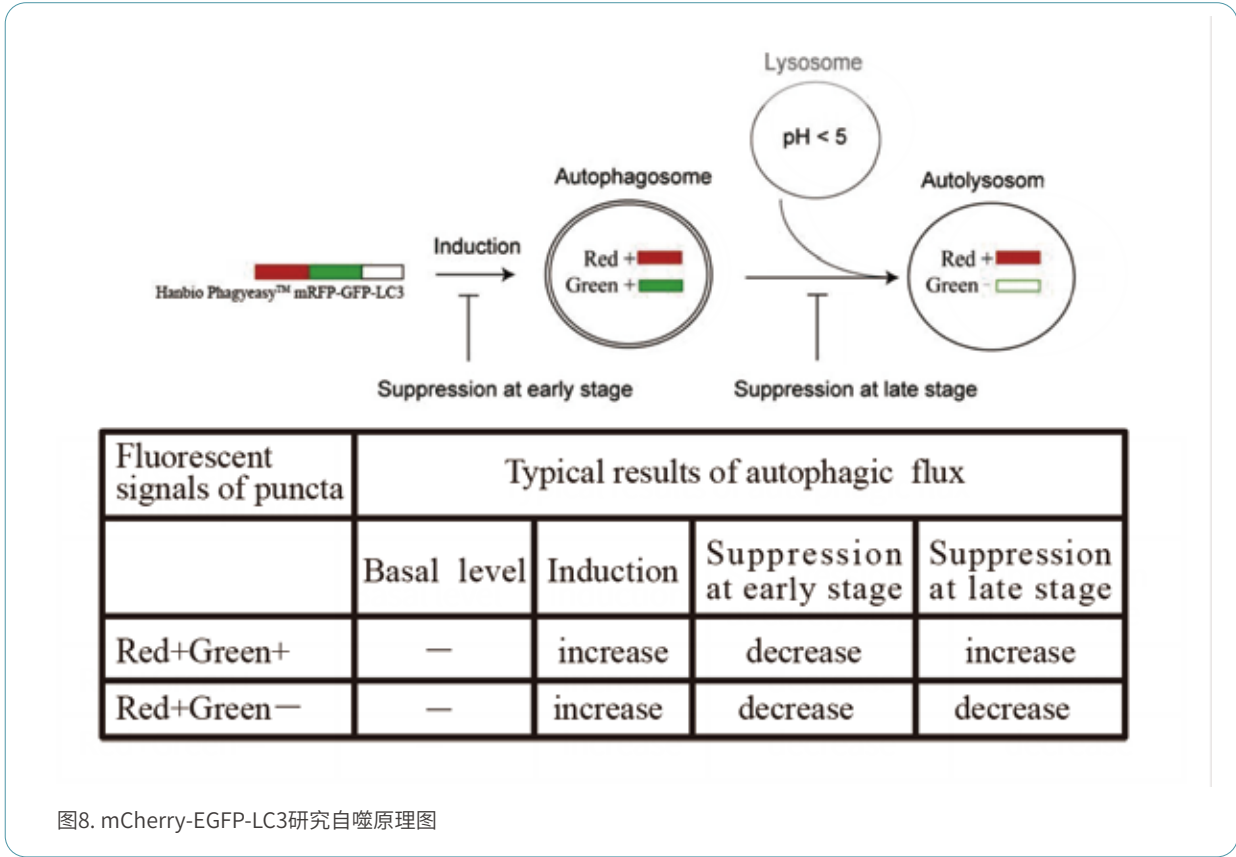
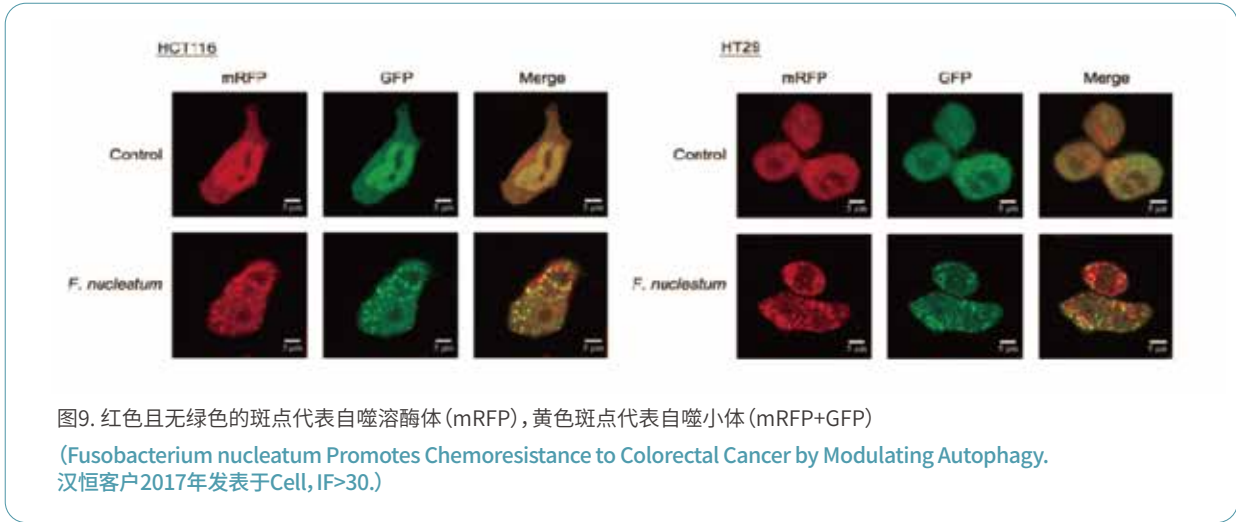


图8. mCherry-EGFP-LC3研究自噬原理图



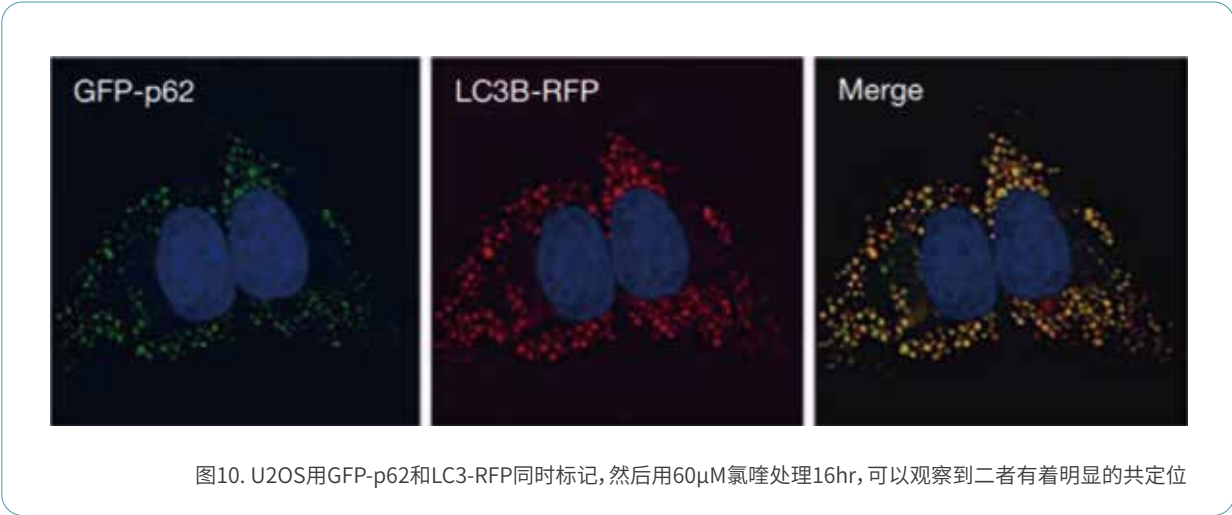
EGFP-LC3和mCherry-LC3单标记的荧光探针可以监测LC3蛋白参与自噬起始过程：自噬较少时，GFP-LC3和mCherry-LC3融合蛋白主要弥散在胞浆中；自噬增加时，EGFP-LC3和mCherry-LC3融合蛋白转位至自噬体膜，在荧光显微镜下形成多个明亮的荧光斑点，一个斑点相当于一个自噬体，可以通过计数自噬小体的数量来评价自噬程度的高低。

对于单标探针 (EGFP-LC3或mCherry-LC3) 与双标探针 (mCherry-EGFP-LC3) 的主要区别需要作进一步的说明：EGFP-LC3和mCherry-LC3单标探针对于监测自噬体的形成特别有帮助，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-mCherry、Lamp1-EGFP) 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mCherry-EGFP-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。

汉恒生物作为国内最先研发自噬病毒工具的先行者，有多种LC3标记的病毒现货可供选择。自噬产品已被用户发表引用数百篇自噬相关文献，包括《CELL》、《Autophagy》等权威杂志。公司不仅有用于细胞实验的慢病毒和腺病毒以及质粒，还有用于动物实验的腺相关病毒，多种规格，多种荧光标记，详情参考上述自噬产品现货概览表1。

②主流自噬示踪工具二:p62

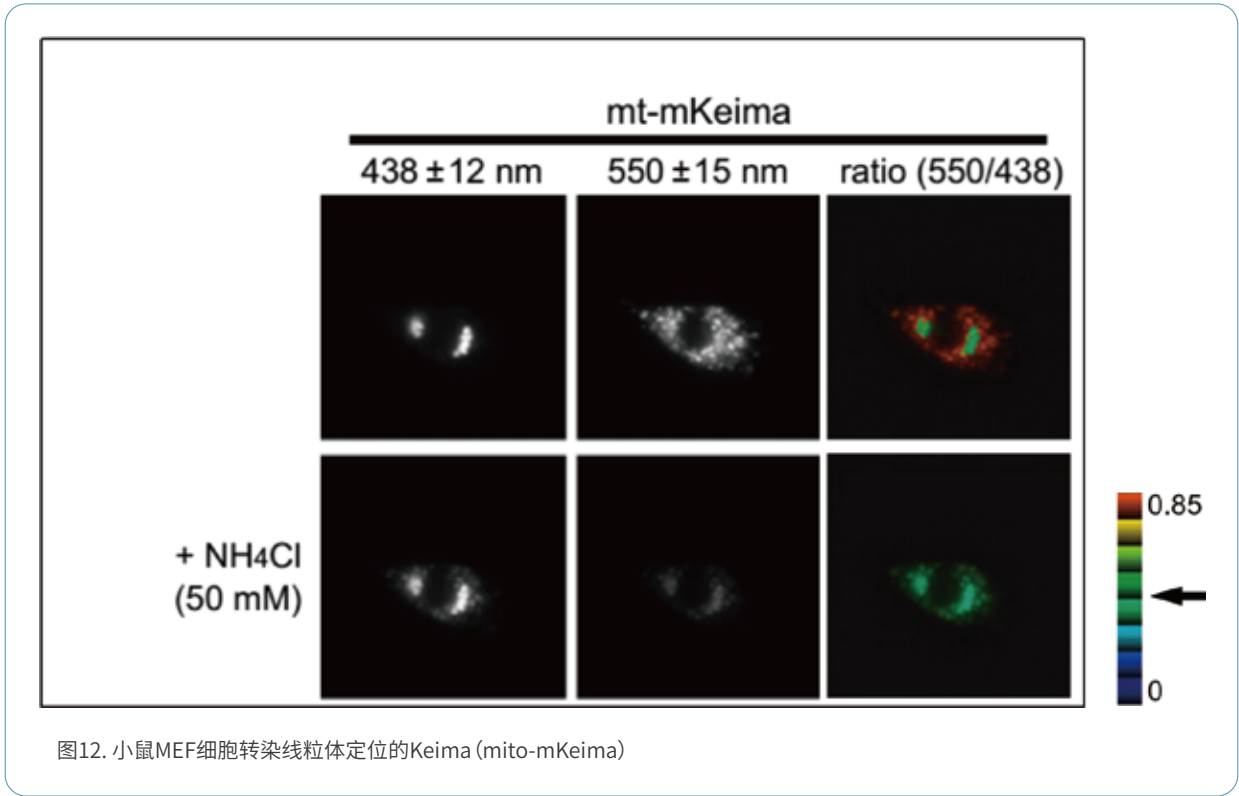
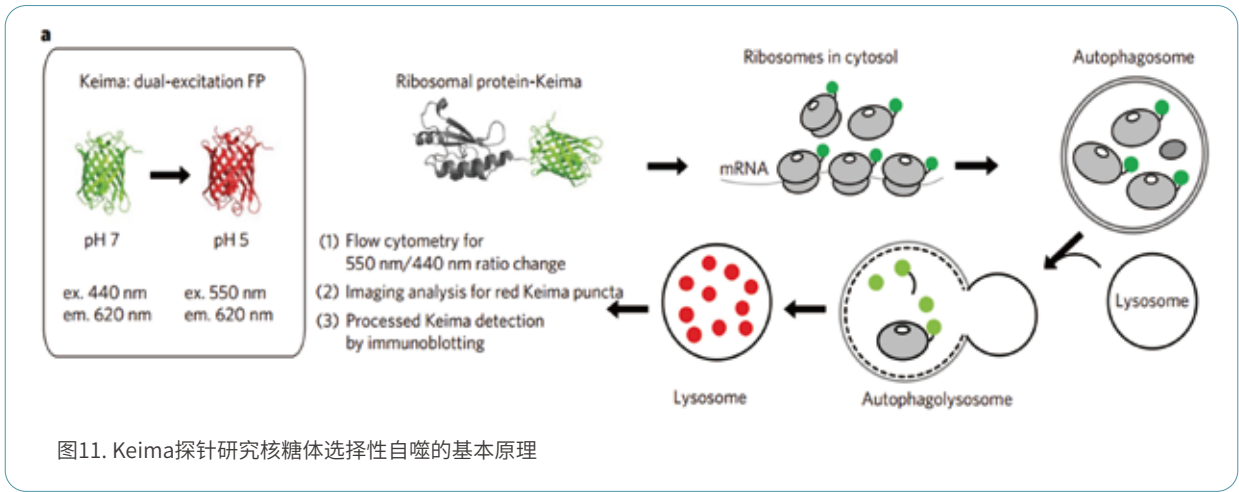
p62又称为SQSTM1，是一种泛素结合蛋白，介导底物与LC3的结合，从而被选择性的转移到自噬机器中进行降解。p62通常被看作自噬降解蛋白质底物的一个标志性marker，其亚细胞的定位可以用来监测自噬的发生、蛋白底物的清除，以及自噬的抑制等过程。自噬被诱导时，GFP-p62融合蛋白被招募到自噬小体上，呈现绿色小点。如果此时加入氯喹抑制自噬流，那么GFP-p62就会累积在自噬小体和自噬溶酶体上 (见图10)。GFP-p62也可以与其他红色探针 (如Tubulin-RFP、Lamp1-RFP、RFP-LC3等) 联合使用。



汉恒生物拥有常见物种人、大鼠、小鼠等的P62过表达载体现货，包括质粒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒等，现货产品详情参考上述自噬产品现货概览表6。

③pH敏感自噬工具-Keima探针

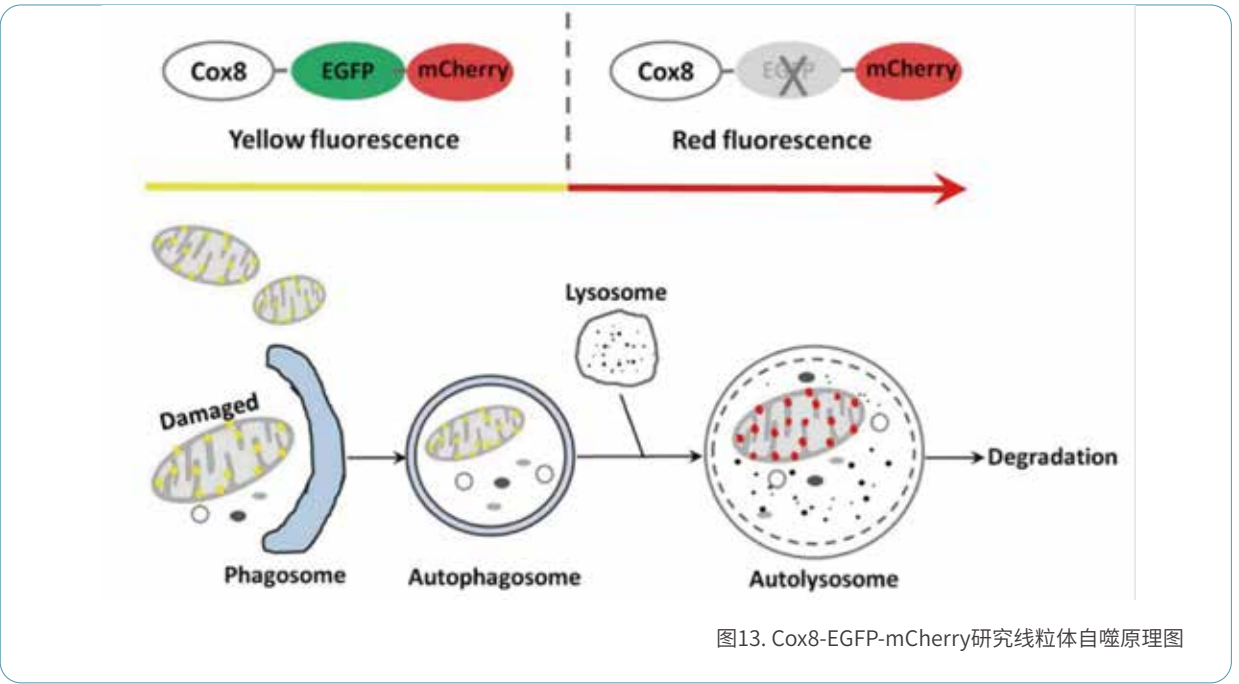
除了上面介绍的“金牌”工具之外，还有一些应用并不是那么广泛，但功能十分强大的自噬研究工具，如一种叫做Keima的探针。Keima探针其实是一种对pH敏感的荧光蛋白，由于Keima在不同的pH值下对应的激发光波长不同，在中性环境下只能被440nm激发；在自噬溶酶体的酸性pH环境下，Keima只能被550 nm激发。其定量方法是用440 nm和550 nm两个不同波长的激光分别激发，然后用同一个发射光620 nm波长分别采集图像，然后用550 nm 激发对应的620 nm采集的图像荧光强度/ 440nm激发对应的620 nm采集的图像荧光强度这一比值来指示pH值的变化：比值越大，pH值越低，反之比值越小，pH值越高。Keima可以用来做经典的自噬研究；还可以用来研究选择性自噬，比如还可以改造成定位在mito、Ribo、ER、Golgi、perioxsome等细胞器上的自噬工具，来监视特殊细胞器的自噬过程(图11, 12)。



汉恒生物拥有Keima现货，包括质粒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒等，现货产品详情参考上述自噬产品现货概览表2。

④线粒体自噬工具-Cox8

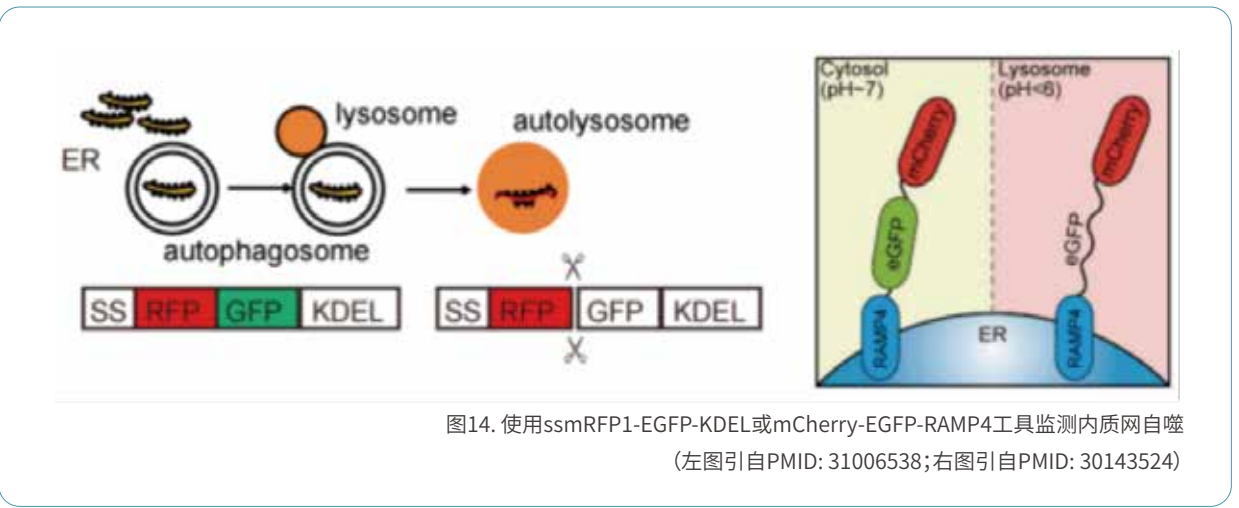
将线粒体内膜蛋白Cox8的前导肽序列与EGFP-mCherry荧光串联序列融合表达，在细胞质中，红色荧光蛋白和绿色荧光蛋白同时表达，表现为黄色；若发生线粒体自噬，由于溶酶体偏酸性的环境，在自噬溶酶体中，绿色荧光蛋白淬灭，只剩下红色荧光信号。因此可以通过统计红色荧光斑点数来衡量线粒体自噬水平。



汉恒生物拥有Cox8现货，包括质粒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒等，现货产品详情参考上述自噬产品现货概览表2。

⑤内质网自噬工具-ER-mTur/ssmRFP1-EGFP-KDEL/mCherry-EGFP-RAMP4/mCherry-RAMP4

通过将内质网定位序列与mCherry-EGFP荧光串联序列融合表达来构建内质网自噬报告载体ssmRFP1-EGFP-KDEL (ss:内质网信号肽序列, ER signal sequence; KDEL内质网滞留序列) 和mCherry-EGFP-RAMP4 (RAMP4:即SERP1基因, Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1, 可以特异性定位到内质网膜上)。在细胞质中，红色荧光蛋白和绿色荧光蛋白同时表达，表现为黄色；若发生内质网自噬，由于溶酶体偏酸性的环境，绿色荧光蛋白淬灭，只剩下红色荧光信号。此外，在溶酶体中，报告载体ssmRFP1-EGFP-KDEL中的mRFP1与EGFP间的linker会被剪切，因此也可通过Western Blot结果统计mRFP1/mRFP1-EGFP比值来指示内质网自噬。内质网自噬报告载体mCherry-RAMP4表达定位于内质网的融合蛋白mCherry-RAMP4，当发生内质网自噬时，融合蛋白会被水解酶切割，从而产生游离的mCherry，此时通过Western Blot方法检测mCherry可指示内质网自噬水平。



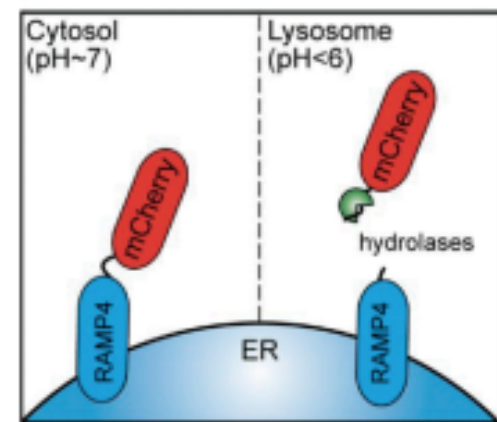


图15. 使用mCherry-RAMP4工具衡量内质网自噬水平 (图引自PMID: 30143524)

汉恒生物拥有内质网自噬工具现货, 包括质粒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒等, 现货产品详情参考上述自噬产品现货概览表3。

⑥分子伴侣自噬定位工具-KFERQ-PAmCherry1/PAmCherry1-KFERQ-NE

底物的识别主要发生在胞浆内, 所有CMA底物均含有一个可被HSC70识别的五肽样基序 (KFERQ序列), KFERQ序列保证了这种蛋白降解途径的严格选择性。

PAmCherry1作为一种光活化蛋白, 本身无光, 需在405nm波长的光暴露5-10分钟进行活化后, 才可被激活发出红色荧光 (激发564nm, 发射595nm)。KFERQ-PAmCherry1借助分子伴侣所识别的底物的基序KFERQ与光活化蛋白PAmCherry1融合, 使其转化为CMA底物, 当靶向溶酶体时便可通过观察红色荧光斑点数量来检测活细胞中的CMA活性。光活化后的初始荧光强度反映了底物蛋白的基础水平, 随着光活化蛋白逐渐被细胞代谢, 细胞荧光水平随着时间的推移而下降。“NE”是一种新型18个氨基酸的表位标签, 已被成功用于特异性免疫检测和定量PAmCherry1-KFERQ蛋白表达量。

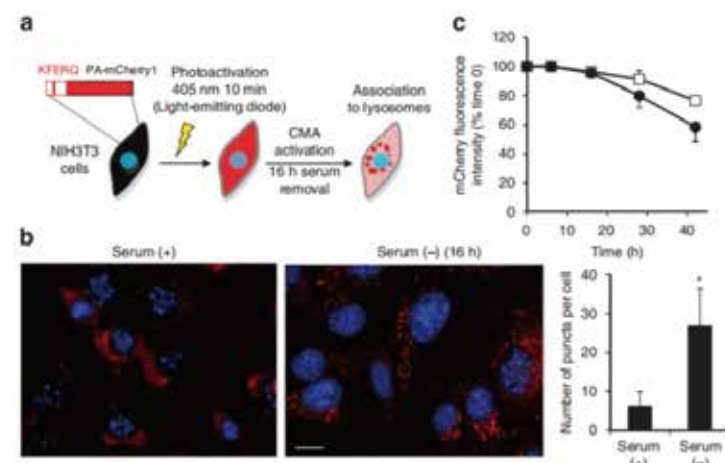


图16. 表达KFERQ-PA-mCherry3观察荧光点和荧光强度在不同血清组间差异
(A photoconvertible fluorescent reporter to track chaperone-mediated autophagy)

汉恒生物拥有分子伴侣自噬工具现货, 包括质粒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒等, 现货产品详情参考上述自噬产品现货概览表4。

⑦基因操作在自噬研究过程中的应用

为了研究自噬参与某个生物学过程的机制, 比如要证明某种处理 (药物、基因等) 通过改变自噬流进而影响某种表型, 可以敲除掉自噬关键基因的细胞系抑制自噬流的形成, 再用该处理处理细胞, 则应该看不到表型的变化, 或者变化会相应的减弱。这样的实验设计可以证明自噬确实参与或影响该种表型。在这种背景下, 研究者往往会选择参与自噬囊泡形成的相关基因, 如ATG5\ATG13\ATG16L1\SQSTM1\ATG7\ATG14\RB1CC1\ULK1\ATG12等进行干预。其中, ATG7作为泛素样激活酶 (E1-like)、ATG10作为泛素样结合酶E2 (E2-like) 依次参与催化ATG12共价连接到ATG5。ATG12-ATG5共价复合物一起作为泛素样连接酶E3催化ATG8 (LC3) 家族蛋白的剪切、脂化, 最终参与自噬囊泡的形成。

所以, 如果干扰ATG5、ATG12、ATG7或者ATG10等核心基因的表达, 会显著抑制自噬囊泡的形成, 抑制自噬流的发生。实例如图17, 野生型的U2OS-LC3-GFP细胞内, 使用氯喹抑制溶酶体活性会显著增加自噬小体的数量; 但对于转染LC3-GFP, 并且敲除ATG5基因的U2OS-细胞, 无论是否用氯喹处理, 均观察不到明显的自噬小体。这提示ATG5在自噬体形成过程中扮演重要的角色。

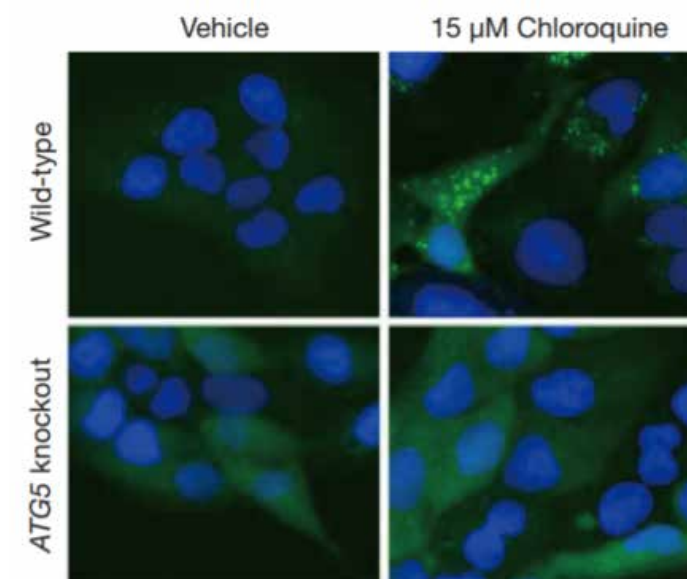


图17. U2OS细胞敲除自噬关键基因ATG5后会抑制自噬

汉恒公司还拥有多种自噬相关基因的过表达载体, 如常见的ATG5、ATG10、ATG7、ATG12、ATG13、ATG16L1、ATG14、RB1CC1 (即ATG17)、ULK1 (即ATG1)、以及线粒体相关基因Parkin、Bnip3、Nix等, 均有过表达质粒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒现货, 包含人、大鼠、小鼠等常见物种, 现货产品详情参考上述自噬产品现货概览表6。

自噬已经被发现了50多年, 但直至20世纪90年代大隅良典公布其研究结果后, 其在生理学和医学领域的功能重要性才被意识到, 大隅良典也因此被授予2016年诺贝尔生理学或医学奖。汉恒生物作为国内率先关注自噬研究并研发自噬工具的公司, 拥有自噬研究的各种现货工具, 可以为广大用户解决自噬研究中用到的各种疑难问题, 有助于大家更方便、更快捷、更顺利地做好科研、申请基金, 也希望通过对自噬这把双刃剑的研究, 为人类对抗和最终解决自噬相关疾病带来新的希望。

五、自噬现货产品概览及客户发表文献节选

表1. LC3病毒现货

产品用途	产品名称	荧光标记	病毒类型	滴度 (实际参考库存)
监测自噬流	HBAD-mCherry-EGFP-LC3	红光, 绿光	腺病毒	2.2*10 ¹⁰ PFU/mL
	HBAD-mCherry-LC3	红光	腺病毒	2.2*10 ¹⁰ PFU/mL
	HBAD-EGFP-LC3	绿光	腺病毒	2.51*10 ¹⁰ PFU/mL
	HBLV-mCherry-EGFP-LC3-PURO	红光, 绿光	慢病毒	3*10 ⁸ TU/mL
	HBLV-eRFP-EGFP-LC3-PURO	红光, 绿光	慢病毒	4*10 ⁸ TU/mL
	HBLV-eRFP-LC3-PURO	红光	慢病毒	3*10 ⁸ TU/mL
	HBLV-EGFP-LC3-PURO	绿光	慢病毒	3*10 ⁸ TU/mL
	HBAAV2/9-CMV-mCherry-EGFP-LC3	红光, 绿光	腺相关病毒	3.6*10 ¹² vg/mL
	HBAAV2/8-CMV-mCherry-EGFP-LC3	红光, 绿光	腺相关病毒	1.2*10 ¹² vg/mL

表2. 线粒体自噬病毒现货 (LV/AD/AAV可定制)

产品用途	产品名称	荧光标记	病毒类型	滴度 (实际参考库存)
线粒体自噬	HBAD-mito-DsRed/ HBAD-EGFP-LC3	红光, 绿光	腺病毒	1.58*10 ¹⁰ PFU/mL/ 2.51*10 ¹⁰ PFU/mL
	HBAD-mito-DsRed/ HBAD-Parkin-EGFP	红光, 绿光	腺病毒	/
	HBAD-mito-DsRed/ HBAD-Bnip3-EGFP	红光, 绿光	腺病毒	/
	HBAD-mito-DsRed/ HBAD-Nix-EGFP	红光, 绿光	腺病毒	/
	HBAD-mito-DsRed/ HBAD-FUNDC1-EGFP	红光, 绿光	腺病毒	/
	HBAD-mito-mTurquoise2/ HBAD-mCherry-LC3	青光, 红光	腺病毒	2.2*10 ¹⁰ PFU/mL/ 2.2*10 ¹⁰ PFU/mL
	HBAD-mito-EGFP/ HBAD-mCherry-LC3	绿光, 红光	腺病毒	3.16*10 ¹⁰ PFU/mL/ 2.2*10 ¹⁰ PFU/mL
	HBAD-mKeima	红光	腺病毒	2.3*10 ¹⁰ PFU/mL
	HBLV-mKeima-PURO	红光	慢病毒	/
	HBAAV-mkeima	红光	腺相关病毒	/
	HBAD-Cox8a-EGFP-mCherry	红光, 绿光	腺病毒	/
	HBLV-Cox8a-EGFP-mCherry-PURO	红光, 绿光	慢病毒	/
	HBAAV-Cox8a-EGFP-mCherry	红光, 绿光	腺相关病毒	/

表3. 内质网自噬病毒现货

产品用途	产品名称	荧光标记	病毒类型	滴度 (实际参考库存)
内质网自噬	HBLV-ssmRFP1-EGFP-KDEL	红光, 绿光	慢病毒	2*10 ⁸ TU/mL
	HBAAV2/9-ssmRFP1-EGFP-KDEL	红光, 绿光	腺相关病毒	/
	HBLV-mCherry-EGFP-RAMP4	红光, 绿光	慢病毒	/
	HBLV-mCherry-RAMP4	红光	慢病毒	/
	HBAD-mCherry-EGFP-RAMP4	红光, 绿光	腺病毒	2.1*10 ¹⁰ PFU/mL
	HBAD-mCherry-RAMP4	红光	腺病毒	/
	HBAAV2/9-mCherry-EGFP-RAMP4	红光, 绿光	腺相关病毒	/
	HBAAV2/9-mCherry-RAMP4	红光	腺相关病毒	/

表4. 分子伴侣介导自噬病毒现货 (AD/AAV可定制)

产品用途	产品名称	荧光标记	病毒类型	滴度 (实际参考库存)
CMA活性	HBLV-KFERQ-mCherry-N1	红光	慢病毒	/
	HBLV-mCherry-KFERQ-NE	红光	慢病毒	2*10 ⁸ TU/mL
	HBLV-KFERQ-eRFP-N1	红光	慢病毒	4*10 ⁸ TU/mL
	HBLV-eRFP-KFERQ-NE	红光	慢病毒	/

表5. 细胞器定位工具产品汇总 (LV/AAV可定制)

产品用途	产品名称	荧光标记	病毒类型	滴度 (实际参考库存)
标记线粒体	HBAD-mito-DsRed	红光	腺病毒	2.1*10 ¹⁰ PFU/mL
	HBAD-mito-mTurquoise2	青光	腺病毒	2.2*10 ¹⁰ PFU/mL
	HBAD-mito-EGFP	绿光	腺病毒	3.16*10 ¹⁰ PFU/mL
标记溶酶体	HBAD-LAMP1-RFP	红光	腺病毒	/
	HBAD-LAMP1-CFP	青光	腺病毒	/
标记内质网	HBAD-mTur-ER	青光	腺病毒	1.26*10 ¹⁰ PFU/mL
标记外泌体	HBAD-CD63-EGFP	绿光	腺病毒	/
标记高尔基体	pHBAAd-mTur-Golgi	青光	腺病毒	/
标记细胞骨架	pHBAAd-mTur-Actin	青光	腺病毒	/
标记细胞质	pHBAAd-mTur-Tubulin	青光	腺病毒	/
	pHBAAd-mTur-NES	青光	腺病毒	/
标记细胞核	pHBAAd-mTur-NLS	青光	腺病毒	/
标记细胞膜	pHBAAd-mTur-Palmito	青光	腺病毒	/



表6. 自噬相关基因病毒现货列表

基因名称	基因功能	标签	标签	慢病毒		腺病毒	
				标记	规格	标记	规格
ATG3	与ATG7一起将LC3-I加工成LC3-II	human/mouse	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
ATG4A	切割LC3蛋白, 形成LC3-I	human/mouse	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
ATG4B	切割LC3蛋白, 形成LC3-I	human/rat	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
ATG4C	切割LC3蛋白, 形成LC3-I	human/mouse	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
ATG4D	水解pro-LC3	human/mouse	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
ATG5	与ATG16、ATG12结合, 形成复合物, 参与自噬小体形成	human/mouse/rat	3xflag/HIS/HA	GFP+PURO/ mCherry+BSD	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
BECN1/ATG6	与PI3K形成复合体, 调控自噬活性	human/mouse/rat	3xflag/HA/MYC	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
ATG7	与ATG12结合, 并激活ATG12	human/mouse/rat	3xflag/HA	GFP+PURO/ mCherry+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
GABARAP/ATG8	ATG12-ATG5-ATG16辅助下, 形成ATG8-PE复合体, 定位于自噬膜上, 参与自噬膜形成	human/mouse	3xflag/HA	GFP+PURO/ mCherry+PURO	10 ⁸ TU/ml	/	/
ATG9A	参与PAS的形成	human/mouse	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
ATG9B	参与PAS的形成	human/mouse	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
ATG10	激活ATG12	human	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
ATG12	ATG12-ATG5-ATG16L1复合物, 参与自噬小体形成	human/mouse	3xflag/GST/HA	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
ATG13	形成ULK1复合物, 与mTOR受体互作	human/mouse	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
ATG14	atg14-vps15-vps34复合物, 参与膜泡的形成	human/mouse	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
ATG16L1	ATG12-ATG5-ATG16L1复合物, 参与自噬小体的形成	human/mouse	3xflag/HIS	GFP+PURO/ mCherry+BSD	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
ATG16L2	与ATG12、ATG5形成复合物, 参与自噬小体的形成	human/mouse	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
ATG101	与ATG13结合, 防止ATG13降解	human/mouse	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
ULK1	形成ULK复合物, 与mTOR受体相互作用	human/mouse	3xflag/HA	GFP+PURO/ mCherry+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
ULK2	形成ULK复合物, 与mTOR受体相互作用	human/mouse	3xflag	GFP+PURO/ mCherry+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
ULK3	形成ULK复合物, 与mTOR受体相互作用	human/mouse/rat	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
AMPK/PRKAA1	通过磷酸化ULK1激活其活性	human/mouse/rat/pig	3xflag/HA	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
LKB1/STK11	使AMPK活化, 激活自噬	human/mouse/rat	3xflag/HA	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
NBR1	自噬受体蛋白	human/mouse	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
EI24	介导自噬小体与溶酶体融合	human/mouse	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
DRAM1	介导自噬小体与溶酶体融合	human/mouse	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
DRAM2	抑制自噬的起始阶段	human/mouse	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml

基因名称	基因功能	标签	标签	慢病毒		腺病毒	
				标记	规格	标记	规格
BNIP3	定位于线粒体外膜, 可作为促凋亡蛋白/促线粒体自噬受体发挥作用	human/mouse/rat	3xflag/GST	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP/YFP	10 ¹⁰ PFU/ml
BNIP3L/NIX	与BNIP同源, 可诱导细胞自噬	human/mouse/rat	3xflag/HIS	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
PARL	PINK蛋白在健康状态下通过PARL的作用持续降解, 保持线粒体正常结构和功能	human/mouse/rat	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
C53/CDK5RAP3	C53参与内质网自噬, 被蛋白质共翻译转运过程中发生的核糖体滞留特异性激活, 进而降解特定的内质网蛋白	human/mouse/rat	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	ZsGreen	10 ¹⁰ PFU/ml
FAM134B/ RETREG1	内质网定位的受体, 与LC3结合, 介导自噬体对片或管状内质网的识别和包裹	human/mouse/rat	3xflag/MYC	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	/	10 ¹⁰ PFU/ml
FAM134C/ RETREG3	内质网定位的受体, 与LC3结合, 介导自噬体对状或管状内质网的识别和包裹	human/mouse	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	/	/
ATL3	ATL2/3与ULK1复合体相互作用, 促进其在内质网组装, 从而介导自噬体的形成	human/mouse	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	/	/
NUFIP1	NUFIP1周期性出入细胞核, 通过结合LC3B, 将核糖体运送到自体吞噬泡进行降解	human/mouse	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	/	/
HSC70/HSPA8	具有KFERQ样基序的胞质蛋白被伴侣蛋白HSPA8识别, 并通过LAMP2A和溶酶体进行降解	human/mouse/rat	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	EGFP/m-Cherry	10 ¹⁰ PFU/ml
YAP1	分子伴侣介导的自噬(CMA)的新底物, 依赖于KFERQ与CMA伴侣HSPA8的结合	human/mouse/rat	3xflag/HA/MYC	GFP+PURO/ ZsGreen+LUC/ LUC+PURO/ mCherry+BSD/ mCherry+PURO	10 ⁸ TU/ml	GFP	10 ¹⁰ PFU/ml
ILGST	分子伴侣介导的自噬(CMA)的新底物, 依赖于KFERQ与CMA伴侣HSPA8的结合	human/mouse	3xflag	GFP+PURO	10 ⁸ TU/ml	/	10 ¹⁰ PFU/ml

表7. 汉恒自噬产品客户发表文献节选

标题	杂志名称	IF	单位
Fusobacterium nucleatum Promotes Chemoresistance to Colorectal Cancer by Modulating Autophagy	Cell	42.501	上海交通大学附属仁济医院
FARS2 Deficiency Causes Cardiomyopathy by Disrupting Mitochondrial Homeostasis and the Mitochondrial Quality Control System	Circulation	38.601	空军医科大学
Autophagosomes coated in situ with nanodots act as personalized cancer vaccines	Nature Nanotechnology	34.899	中国科学技术大学附属第一医院
M6A-Methylated circRAPGEF5 drives lung adenocarcinoma progression and metastasis via IGF2BP2/NUP160-mediated autophagy suppression	Molecular Cancer	33.899	温州医科大学第一附属医院
Overcoming multi-drug resistance in SCLC: a synergistic approach with venetoclax and hydroxychloroquine targeting the lncRNA LYPLAL1-DT/BCL2/BECN1 pathway	Molecular Cancer	33.899	首都医科大学
Hepatocyte-specific Mas activation enhances lipophagy and fatty acid oxidation to protect against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice	Journal of Hepatology	32.999	同济大学医学院同济医院
A deep learning and large language hybrid workflow for omics interpretation	Nature Biomedical Engineering	26.600	华中科技大学
Pancreatic acinar cells-derived sphingosine-1-phosphate contributes to fibrosis of chronic pancreatitis via inducing autophagy and activation of pancreatic stellate cells	Gastroenterology	25.100	华中科技大学同济医学院附属协和医院
Apoptosis-resistant megakaryocytes produce large and hyperreactive platelets in response to radiation injury	Military Medical Research	22.899	陆军医科大学
A foam cell-targeted lipophagy restoration strategy stabilizes vulnerable atherosclerotic plaques	Bioactive Materials	20.300	重庆医科大学附属第一医院
Targeting Lp-PLA2 inhibits profibrotic monocyte-derived macrophages in silicosis through restoring cardiolipin-mediated mitophagy	Cellular & Molecular Immunology	19.799	首都医科大学
An AI-assisted fluorescence microscopic system for screening mitophagy inducers by simultaneous analysis of mitophagic intermediates	Nature Communications	15.700	复旦大学附属中山医院
Synovial inflammatory macrophage-derived extracellular vesicles exacerbate cartilage lesions with a FMRP-selectively sorted manner in osteoarthritis: OA can be ...	Bone Research	15.000	同济大学附属第四人民医院
IGF2BP3-mediated m6A modification of RASGRF1 promoting joint injury in rheumatoid arthritis	Bone Research	15.000	北京中日友好医院
Restricting intracellular Salmonella proliferation by coordinating p-TBK1 mediated mitophagy and xenophagy	Autophagy	14.300	中国农业大学
RETREG1-mediated reticulophagy is activated by an ATF4-CEBPG/C/EBPγ heterodimer and confers protection against lipotoxicity	Autophagy	14.300	中国医学科学院
Single-Cell Transcriptome Analysis Reveals That Hmga2 Regulates Neuroinflammation and Retinal Function by Modulating Müller Cell Autophagy Through PI3K/AKT Signaling Following MCAO-Induced Retinal Ischemia	Advanced Science	14.100	第四军医大学西京医院
Syntaxin 17 Translocation Mediated Mitophagy Switching Drives Hyperglycemia - Induced Vascular Injury	Advanced Science	14.100	中国药科大学
ASIC1a Induces Excessive Mitophagy and PANoptosis of Chondrocyte by the Inhibition of SIRT3 Mitochondrial Translocation	Theranostics	13.300	安徽医科大学
PHB2 Ameliorates Ferroptosis and Aortic Aneurysm/Dissection through NEDD4L-Dependent Ubiquitination of NCOA4	Redox Biology	11.900	复旦大学附属中山医院
TBBPA induced hepatocyte ferroptosis by PCBP1-mediated ferritinophagy	Journal of Hazardous Materials	11.300	东北农业大学
OMA1 competitively binds to HSPA9 to promote mitophagy and activate the cGAS-STING pathway to mediate GBM immune escape	Journal for ImmunoTherapy of Cancer	10.600	华中科技大学

附：病毒使用指南

1. 慢病毒感染目的细胞

具体步骤可参考汉恒生物《慢病毒操作手册》。



2. 腺病毒感染目的细胞

具体步骤可参考汉恒生物《腺病毒操作手册》。



3. 动物实验

(动物实验必须使用纯化的腺病毒或腺相关病毒, 以小鼠尾静脉注射为例说明) 具体步骤可参考汉恒生物《腺相关病毒操作手册》。

