

# LC3双荧光慢病毒自噬流 检测系统产品说明书

Cat. GPL2001  
第三版

## 产品组成

- 1.Part# GPL2001A, stubRFP-sensGFP-LC3 Lentivirus,  $5 \times 10^7$  TU ( LC3慢病毒颗粒 )
- 2.Part# GPL2001B, stubRFP-sensGFP-LC3mut Lentivirus,  $5 \times 10^7$  TU ( LC3突变型慢病毒颗粒 )

## 注意事项

1. 收到产品后, 请将病毒液于-70°C或更低环境中保存 ( 若存放于4°C请于一周内用完 )
2. 如需多次使用, 请分装后存放, 避免反复冻融, 以免病毒滴度降低
3. 病毒感染实验操作部分请参见《慢病毒使用手册》

Discoverer of Chinese Innovative Drug Targets

**中国创新药物靶标发现者**

## ▶ A. 自噬介绍

**自噬 (Autophagy)** 是细胞在自噬相关基因 ( autophagy related gene , Atg ) 的调控下利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程。细胞接受自噬诱导信号后,待降解的胞内物质首先被自噬小泡包裹,形成自噬体( autophagosome),随后通过细胞骨架微管系统被运输至溶酶体内与之融合形成自噬溶酶体 ( autolysosome),最终被溶酶体中的水解酶降解,实现物质再循环,以维持细胞自身的稳定 ( 图1 )。

根据底物进入溶酶体途径的不同,可将自噬分为以下几种:

- 1.大自噬 ( Macroautophagy ) : 即通常说的自噬 ( Autophagy ) ;
- 2.小自噬 ( Microautophagy ) : 溶酶体主动、直接吞噬胞浆成分的一种方式 ;
- 3.分子伴侣介导的自噬 ( Chaperone-mediated autophagy , CMA ) : 一些分子伴侣能帮助未折叠蛋白转位进入溶酶体,在清除蛋白质时有选择性,而前两者无明显选择性。

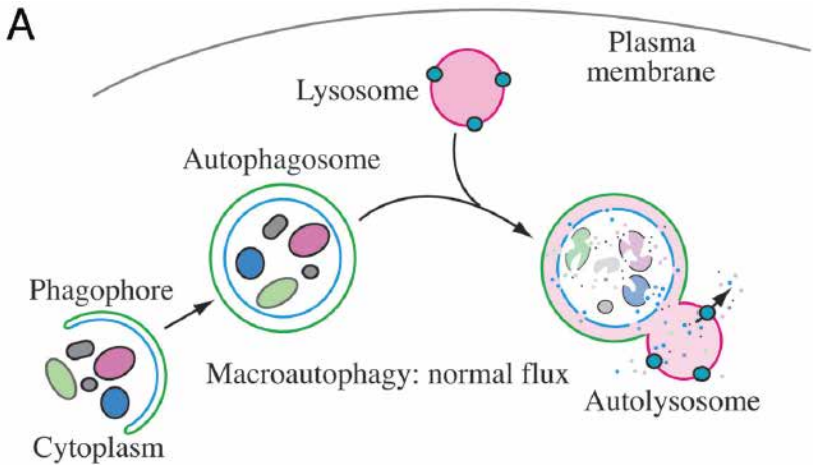


图1. 自噬的发生过程

## ▶ A. 自噬介绍

自噬的发生发展主要分以下几个阶段：

①起始阶段、②延伸阶段、③自噬体形成阶段、④自噬体与溶酶体融合阶段、⑤酸化及消化阶段（图2）。

研究者可以通过某些化学试剂、抗原、抗体、或其他研究手段（如RNAi）在自噬的不同发展阶段进行人工干预和调节，从而实现对自噬的调控。细胞经诱导或抑制后，需对自噬过程进行观察和检测，常用的策略和技术有：超微电镜法、荧光显微法、免疫印迹法、流式细胞术、同位素释放法等。

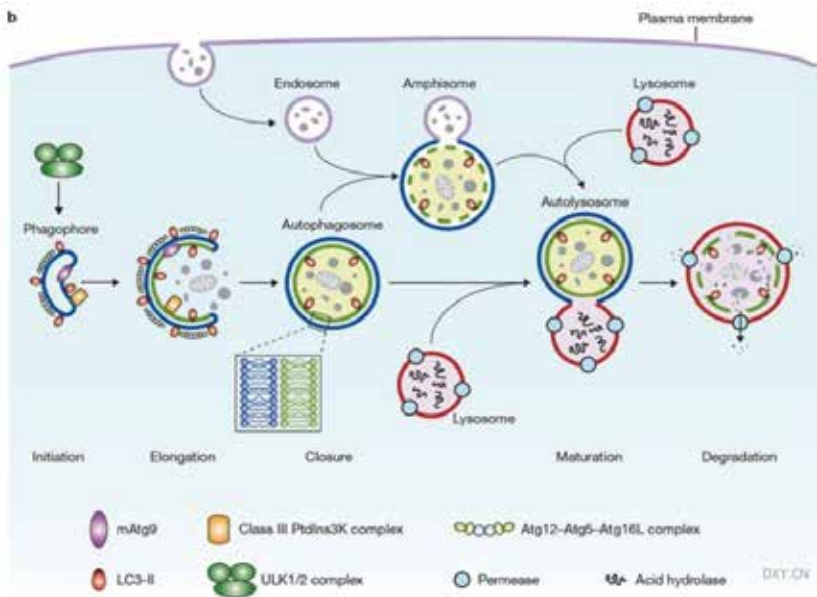


图2. 自噬流程图及关键复合体

自噬能清除不正常构型的蛋白质，并消化受损和多余的细胞器，是真核细胞中广泛存在的降解/再循环系统。在细胞新陈代谢、结构重建、生长发育中起着重要作用。常见的自噬诱导信号包括饥饿、营养缺乏等。

细胞自噬与肿瘤的关系十分复杂，其所起的作用是正面还是负面尚未完全阐明。一方面，正常细胞自噬增强，可表现出抑制肿瘤发生的功能；与此相反，抑制细胞自噬有潜在的致癌可能。另一方面，肿瘤细胞也可通过增强细胞自噬来对抗由缺氧、代谢产物、治疗药物诱导的应激反应。

## ▶ LC3双荧光慢病毒自噬流检测系统

### 检测系统介绍

微管相关蛋白轻链3 (MAP-LC3)，简称LC3，是目前唯一被证实全程参与了自噬形成的蛋白，并作为哺乳类自噬作用的标记蛋白被频繁使用 (如图2)。自噬发生的初期，胞浆型LC3 (即LC3-I) 会酶解掉一小段多肽，跟磷脂酰乙醇胺 (PE) 结合转变为膜型LC3 (即LC3-II)，并聚集在自噬体上。

吉凯基因LC3双荧光慢病毒自噬流检测系统是一种经专门优化设计，用来监控细胞自噬流的慢病毒工具产品。其融合蛋白元件包含红色荧光蛋白Stub-RFP、绿色荧光蛋白Sens-GFP和自噬标记蛋白LC3 (载体图谱如图3左) 或其功能丧失突变体LC3mut (载体图谱如图3右)。其中Sens-GFP是酸敏感型蛋白，而Stub-RFP则是稳定的荧光蛋白，不受外界影响。

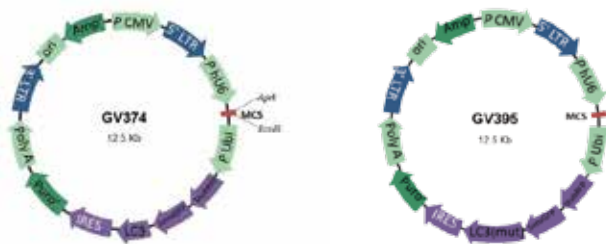


图3. LC3自噬流检测慢病毒载体图谱

自噬发生初期，胞浆型LC3转变为膜型LC3，并引导Stub-RFP- Sens-GFP聚集在自噬体上，荧光显微镜下可观察到红色/绿色共定位的点状聚集。自噬发生后期，溶酶体与自噬体融合形成自噬溶酶体，环境pH值发生改变。当环境pH<5时Sens-GFP 荧光发生淬灭，只能检测到红色荧光点状聚集。因此，Sens-GFP的减弱可指示自噬溶酶体形成的顺利程度，Sens-GFP越少，从自噬小体到自噬溶酶体阶段流通得越顺畅；反之，则表示自噬小体和溶酶体融合被抑制，自噬溶酶体进程受阻。Stub-RFP不受酸性环境影响，因而可以通过Sens-GFP与Stub-RFP的亮点比例来评价自噬流进程。其检测自噬发生机制的原理如图4。

LC3的Gly120氨基酸对其酯化过程至关重要，缺失此氨基酸的LC3mut蛋白丧失其自噬体定位功能，可作为自噬流监控过程中的严谨Version GA118.1，P17,图6左。

## ▶ LC3双荧光慢病毒自噬流检测系统

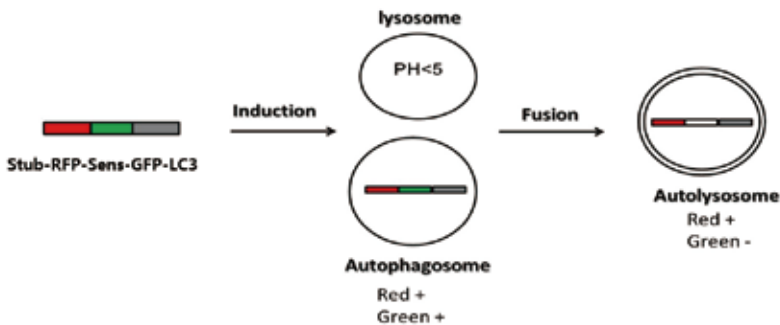


图4. LC3双荧光自噬流检测系统检测机制

相较于常用荧光蛋白，本系统使用的绿色荧光蛋白Sens-GFP和红色荧光蛋白Stub-RFP具有以下优点：

- Sens-GFP和Stub-RFP均具有高荧光强度，其激发波长分别为488nm和588nm；
- 绿色荧光标记Sens-GFP对pH值更为敏感，在自噬溶酶体中淬灭更完全；
- Sens-GFP和Stub-RFP具有更低的细胞毒性，对细胞状态影响更小。

除此之外，本系统使用慢病毒载体，具有对细胞状态影响小，感染效率高和感染细胞谱系宽的特点，可将外源基因有效地整合到宿主染色体上，保证其稳定持续的表达。本慢病毒载体还具有以下特性：

- 载体结构中预留shRNA片段框架，可以同时对自噬相关基因进行RNAi；
- 载体结构中包含puromycin抗性，当病毒感染效率不高时，可以采用一定浓度的puromycin进行筛选，并进一步得到自噬工具细胞株。

## ▶ LC3双荧光慢病毒自噬流检测系统

### 检测系统使用

本系统可用于监控多种不同处理条件下细胞内自噬流的变化，参见图5。

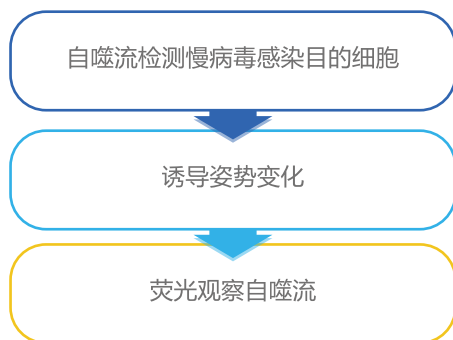


图5. 自噬流检测系统使用流程图

- 使用本产品提供的LC3mut及野生型LC3慢病毒颗粒分别感染目的细胞。**病毒感染实验操作部分参见《慢病毒使用手册》。**
- 调控细胞内自噬流变化时，将感染LC3mut的细胞与感染野生型LC3的细胞进行对比，具体实验分组可参照表1。

	自噬实验处理	
	实验组	对照组
LC3mut	实验组	对照组
LC3	实验组	对照组

表1. 自噬流检测实验分组设置

## ▶ LC3双荧光慢病毒自噬流检测系统

- 实验处理后，荧光观察自噬流变化。

### a. 诱导处理

相比对照组，感染野生型LC3的实验组可观察到红/绿色共定位的点状聚集（黄色斑点），标示着自噬早期自噬小体的形成；当绿色荧光猝灭，只能检测到红色单荧光点状聚集时，标示自噬晚期自噬溶酶体的形成。

### b. 抑制处理

相比对照组，若感染野生型LC3的实验组中黄色和红色斑点数量都下降，表明自噬流在自噬早期被抑制；若是黄色上升，红色下降，则标示自噬流在晚期被抑制。

利用本系统检测自噬流进程的具体判断标准如下表。

自噬流变化	本底	自噬流发生	早期抑制	晚期抑制
Red+ Green+（黄斑点）	-	上升	下降	上升
Red+ Green-（红斑点）	-	上升	下降	下降

表2. 利用LC3自噬慢病毒检测自噬流判断标准



## ▶ LC3双荧光慢病毒自噬流检测系统

### 检测系统应用示例

用 $2\mu\text{M}$  Rapamycin对感染LC3野生型或突变型（对照）自噬慢病毒的细胞分别诱导6h和24h。诱导6h后，相较于对照组，加入自噬诱导剂的LC3野生型蛋白出现红/绿荧光共定位荧光点的增加。通过将红色和绿色荧光信号进行Merge，观察到细胞中黄绿色荧光点即为自噬体（图6）。

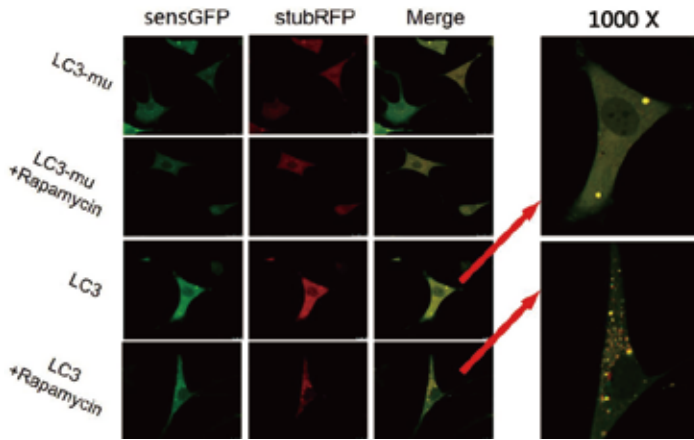


图6. 吉凯自噬慢病毒产品进行自噬发生的监控  
(MEF细胞, Rapamycin诱导处理6hr)

诱导24h后，LC3野生型蛋白绿色荧光猝灭，观察到细胞中红色荧光点即为自噬溶酶体（图7）。

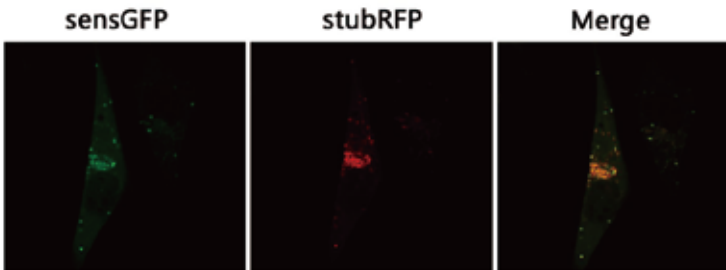


图7. 自噬慢病毒感染目的细胞（MEF）后区分自噬体与自噬溶酶体  
(Rapamycin诱导处理24hr)

## ▶ 相关服务及产品列表

- 自噬关键基因cDNA克隆模板
- 自噬关键基因ORF表达克隆
- 自噬关键基因过表达慢病毒颗粒
- 自噬关键基因shRNA克隆（慢病毒载体）
- 自噬关键shRNA慢病毒颗粒
- 自噬关键基因抗体
- 自噬关键基因qPCR引物
- Rapamycin诱导剂
- 3-MA自噬抑制剂

## ▶ 常见问题

### 1. 为何细胞感染自噬慢病毒后各个组别均有自噬体产生？

细胞自噬属于正常的细胞生理活动，在饥饿的情况下也会有大量的自噬现象发生，故在培养过程中，注意更换新鲜培养基、维持细胞密度在80%左右，保证细胞营养充分。

### 2. 若自噬慢病毒感染目的细胞后，未发现阳性自噬细胞，该如何操作呢？

首先，请确认自噬慢病毒感染目的细胞的感染效率可以达到80%甚至更高，这个结果可以通过对GFP和RFP 荧光观察获得；其次，由于不同目的细胞对rapamycin 诱导自噬产生的效果不同，建议客户在自噬慢病毒感染后对诱导剂浓度及诱导时间进行摸索确认，或根据文献进行正式实验，以确保研究的顺利进行。若您对病毒质量有疑问，也可采用细胞饥饿的方式，即用无血清的培养基进行培养24h-48h，若仍无自噬现象发生，请及时联系我公司客服，并提供您购买的凭证、病毒批次编号。如我公司确认为病毒质量问题，会有专人与您联系确认解决方案。

### 3. 感染后的细胞是否可以直接用于自噬诱导？

自噬慢病毒感染后，由于慢病毒以及感染试剂对细胞有一定的毒性，细胞需要一定的适应时间，并且慢病毒感染后，细胞中荧光标记蛋白表达还不稳定，不能很准确的判断感染效率，故不建议用刚刚感染的细胞进行自噬诱导。一般感染后4天，荧光标记蛋白表达较稳定，细胞状态稳定，可以安排后续自噬诱导。

## ▶ 技术支持

您可访问吉凯基因网站<http://www.genechem.com.cn>下载本产品说明书及相关实验操作手册，或致电咨询以获得更多产品咨询。

**售前热线：800 720 0302**

**售后热线：400 621 0302**

## ▶ 附录

### 参考文献

[1] Theophilus S. Vijaykumar, Avindra Nath, and Ashok Chauhan, "Chloroquine mediated molecular tuning of astrocytes for enhanced permissiveness to HIV infection," *Virology* 381, no. 1 (November 10, 2008): 1-5.

[2] Cuihong Zhou, et al. Monitoring autophagic flux by an improved tandem fluorescent-tagged LC3 (mtagRFP-mWasabi-LC3) reveals that high-dose rapamycin impairs autophagic flux in cancer cells. *Autophagy* 2012, 8:1215–1226.

[3] Ezgi Tasdemir, et al. Methods for Assessing Autophagy and Autophagic Cell Death. *Methods in Molecular Biology*, vol. 445.

# 买病毒 上淘基因

## 多·快·好·省

吉凯淘基因小程序激活流程

### 淘基因小程序



做基因,找吉凯  
更多优惠,扫码获取

1

微信小程序搜索【淘基因】  
或关注【吉凯基因】公众号点击底部：淘基因



慢病毒

腺病毒

# 买病毒 上淘基因

每年平均为科研用户节约35% 的科研经费

吉凯商城账户激活流程：

第一步：微信小程序搜索【淘基因】；

或者关注【吉凯基因】公众号点击底部：淘基因

第二步：进入小程序后，点击【我的】

第三步：点击顶部的【注册/登录】，授权手机号后填写个人信息完成注册

2

进入小程序后，点击【我的】



3

点击顶部的【注册/登录】，  
授权手机号后填写个人信息完成注册



腺相关病毒

质粒

试剂耗材等

# 10,000名科研人都在学习的 8大精品直播课

免费网络  
视频课程

从国自然热点研究—课题设计—工具病毒产品选择—实验操作轻松搞定

扫码或添加微信号

GeneChemV

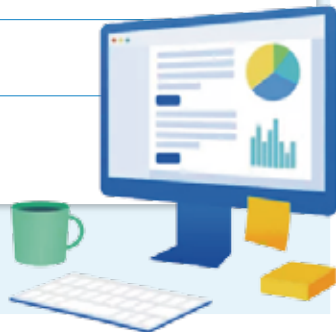
- 免费获取PPT及文献资料包
- 无限次免费观看课程
- 更有专业讲师群内实时答疑



## · 热门课程主题 ·

01. 诺奖技术『**基因编辑**』的研究应用
02. 国自然热点——**非编码RNA**的研究策略与方法👍
03. 国自然热点『**环状RNA研究**』之实验设计及功能验证
04. **临床医生如何做好科研？**——23分心血管顶刊文章这样出爐👍
05. 如何利用『**过表达、RNAi、基因编辑**』有效调控基因表达👍
06. 细胞实验中如何用好『**慢病毒**』？👍
07. **神经环路**的研究策略及工具选择
08. 教会您如何用好**腺相关病毒AAV**👍

近20年病毒包装经验，年产病毒上万次  
慢病毒、AAV、腺病毒、逆转录病毒、HSV等





联系地址: 上海张江高科技园区爱迪生路326号  
邮编: 201203  
邮箱: service@genechem.com.cn  
客服电话: 400-621-0302(总机)  
www.genechem.com.cn

# LC3双荧光慢病毒自噬流 检测系统产品说明书

Cat. GPL2001  
第三版

## 产品组成

- 1.Part# GPL2001A, stubRFP-sensGFP-LC3 Lentivirus,  $5 \times 10^7$  TU (LC3慢病毒颗粒)
- 2.Part# GPL2001B, stubRFP-sensGFP-LC3mut Lentivirus,  $5 \times 10^7$  TU (LC3突变型慢病毒颗粒)

## 注意事项

1. 收到产品后, 请将病毒液于 $-70^{\circ}\text{C}$ 或更低环境中保存 (若存放于 $4^{\circ}\text{C}$ 请于一周内用完)
2. 如需多次使用, 请分装后存放, 避免反复冻融, 以免病毒滴度降低
3. 病毒感染实验操作部分请参见《慢病毒使用手册》