

自噬双标慢病毒mcherry/eRFP-EGFP-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
■ 病毒安全使用注意事项.....	3
■ 收到病毒后的处理.....	4
mcherry/eRFP-EGFP-LC3 慢病毒的操作.....	4
■ 慢病毒感染细胞预实验（MOI 的摸索）.....	4
■ 感染目的细胞.....	6
（一）细胞准备.....	6
（二）病毒感染.....	6
（三）换液.....	8
（四）观察感染情况.....	8
（五）构建慢病毒稳转株-puromycin 筛选.....	8
（六）结果分析与统计.....	10
参考文献：.....	12
附 1：慢病毒 MOI 感染参考.....	13
附 2：实验室病毒操作应急预案.....	16

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RFP-GFP-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mcherry/eRFP-EGFP-LC3慢病毒，mcherry/eRFP用于标记及追踪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。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。

■ 病毒安全使用注意事项

- 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）、慢病毒的储存

收到病毒液后如在短期内使用慢病毒进行实验，可以将病毒暂时放置于4℃保存（尽量一周内用完）；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 μL/tube），收到后直接放置-80℃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）、慢病毒的稀释

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（请尽量一周内用完）。如原病毒标记的滴度为 1×10^8 TU/mL，取10 μL至90 μL的常规培养基中，即可得到 1×10^7 TU/mL滴度的病毒。

mcherry/eRFP-EGFP-LC3慢病毒的操作

■ 慢病毒感染细胞预实验（MOI的摸索）

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，病毒整合到染色体的数量以及目的蛋白的表达量越高。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，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。

96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 1×10^5 /mL，96孔板铺板，100 μL/孔（ 1×10^4 个细胞），放入37℃，5% CO₂培养箱中培养过夜。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30%至50%。

Day 2：病毒感染（1/2小体积感染法）

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，加入慢病毒感染4h后补足至培养体积。具体步骤如下。

感染前，从冰箱取出并在冰上慢慢融化病毒，吸去细胞原有培养基，加入1/2体积新鲜培养基，96孔板则加入50 μL培养基，取值MOI=3, 10, 30, 100，将病毒原液加入细胞中，轻轻混匀，对于需要加入polybrene的细胞，可同时加入适量polybrene。

以病毒滴度为 1×10^8 TU/ml为例，不同的MOI值加入的病毒量见下表。

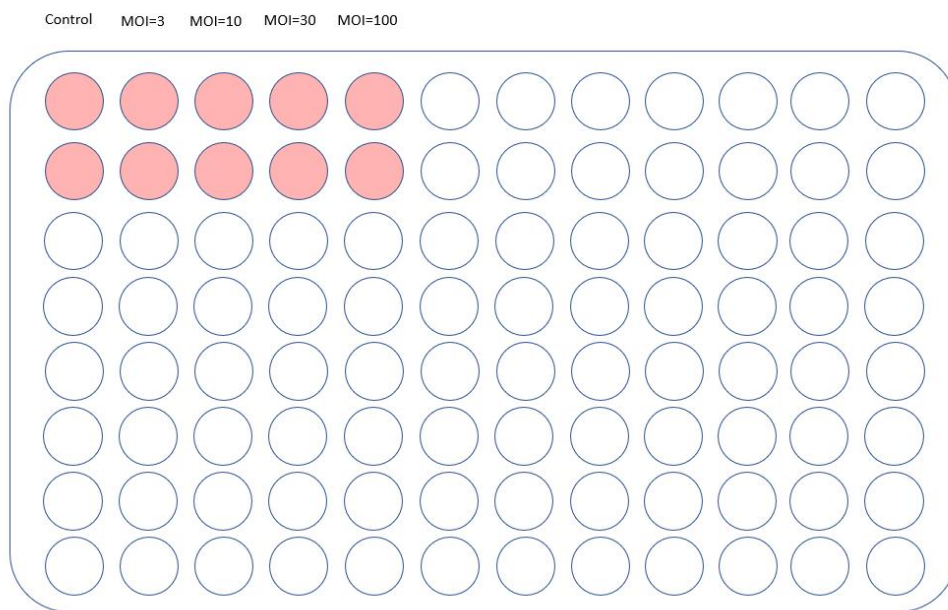


图1 96孔板示意图

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 96孔板每孔不同MOI值加入病毒液体积

细胞数量	MOI值	病毒滴度	病毒液体积
1×10^4	3	10^8 TU/mL	0.3 μL
1×10^4	10	10^8 TU/mL	1 μL
1×10^4	30	10^8 TU/mL	3 μL
1×10^4	100	10^8 TU/mL	10 μL

注：每孔加病毒量 (μL) = MOI * 细胞数 / 病毒滴度 (TU/mL) × 1000

慢病毒感染4 h后补足至培养体积，96孔板则补足至100 μ L培养体积。

Day 3: 换液

感染后第二天（约24 h），吸去含有病毒的培养液，换上新鲜的完全培养液，继续37℃培养。

Day 4~5: 观察荧光

感染48h后显微镜初步观察荧光。感染72h后，感染效率在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，将状态良好的目的细胞接种到24孔板，使细胞浓度为 3×10^5 /mL，500 μ L/孔，每孔的细胞数量约为 1.5×10^5 个，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30%至50%之间。放37℃，5% CO₂ 培养箱中培养过夜。

（二）病毒感染

1、贴壁细胞

病毒感染（1/2小体积感染法）

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，加入慢病毒感染4h后补足至培养体积。

24孔板的培养液体积为500 μ L，1/2培养体积为250 μ L，其他大小的培养皿的培养液体积见表1。

表1 不同培养皿加入的培养液体积

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

慢病毒感染4 h后补足至培养体积，感染24h后换液

感染前从冰箱取出并在冰上慢慢融化病毒，吸去细胞原有培养基，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进行感染（每孔加病毒量（ μL ）=MOI*细胞数/病毒滴度（TU/mL） \times 1000）。需要加入polybrene的细胞，可同时加入适量polybrene。慢病毒感染4 h后补足至完全培养体积。

注：融化的病毒置于冰上。反复冻溶或长时间将病毒颗粒暴露于常温会使病毒效价降低。

助转剂polybrene的选择

Polybrene是带正电的小分子，与细胞表面的阴离子结合，提高慢病毒对细胞的感染效率，通常加入polybrene能提高感染效率10~30%。

Polybrene有一定的细胞毒性，有的细胞对Polybrene的毒理反应明显，因此细胞感染时是否适合用Polybrene需要进行预实验摸索；不同细胞对Polybrene的敏感度不同，可以用1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围筛选合适的浓度，以24h内细胞无明显毒性反应为佳，另外可参考文献并进行预实验摸索，Polybrene最常用的工作浓度为4~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

注：1) 汉恒生物的自产的Polybrene 产品，用户可用以进行辅助感染。提供的Polybrene母液保存在-20 $^{\circ}\text{C}$ （可保存1年以上），避免反复冻融3次以上，否则活性受影响。4 $^{\circ}\text{C}$ 可保存2周。

2) Polybrene预实验请先使用对照病毒进行摸索，部分细胞系MOI及Polybrene 的使用范围请参见附1。

II、特殊细胞的感染注意事项

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10 min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。

3) 传代能力较差的原代细胞

对于一些传代能力较差的原代细胞，比如BMSC等，建议采用滴度更高的腺病毒进行感染。

（三）换液

感染后第二天（约24 h），吸去含有病毒的培养液，换上新鲜的完全培养液，继续37℃培养。

（四）观察感染情况

感染48小时后，可以通过荧光显微镜初步观测mcherry/eRFP、EGFP表达效率，一般感染后72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。对于携带Puromycin抗性基因的病毒，感染后待细胞状态稳定，换上含适当浓度Puromycin的新鲜完全培养液，筛选稳定转导的细胞株（详见下方）。

（五）构建慢病毒稳转株-puromycin筛选

puromycin筛选即使用带有puromycin抗性的病毒感染目的细胞，使目的细胞具有puromycin抗性。之后再利用 puromycin药物处理感染后的细胞，从而筛选出成功感染病毒的细胞。

1) 确定puromycin的最适浓度

puromycin的建议工作浓度为 $1\sim 10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。在筛选之前，需摸索能够杀死空细胞的最低puromycin浓度：可将细胞铺24孔板，使第二天融合率约为50~60%，24h后更换含不同浓度puromycin的完全培养基（可先文献查询细胞的puromycin浓度，再设置合理的浓度梯度）。puromycin梯度可设置为0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理48h，选取能够杀死90%以上空细胞的最低浓度进行后续实验。

2) 进行puromycin筛选

筛选时，请设置未感染病毒的空细胞对照实验组，并加入等量浓度的puromycin。

慢病毒感染48-72h后，感染效率约在80%左右并且细胞汇合度在60-70%时，以摸索到的puromycin浓度进行处理（具体以细胞状态而定，细胞状态稳定后加）。加药约48h观察对照组空细胞的死亡情况，若空细胞组细胞死亡率达90%以上，撤掉puromycin换新鲜的培养基培养。后期可根据空细胞的生长速度进行定期药筛。

3) 筛选细胞的放大培养

puromycin筛完后，待细胞长满可按适当比例传代培养，等到扩增到一定的细胞数量后即可进行单克隆稳定株筛选或混合克隆稳定株筛选。

表2 不同细胞稳转株筛选Puromycin推荐使用浓度

Cell line	Species	Puromycin($\mu\text{g}/\text{ml}$)
293系列	Human	3
HeLa	Human	3
B16	Mouse	1-3
PC1.0	Hamster	10
MC3T3-E1	Mouse	10
H9C2	Rat	1
MCF-7	Human	1-3
MDA-MB-xxx	Human	1-3
HepG2	Human	2
HT1080	Human	1
A549	Human	1.5
H1299	Human	2

Human embryonic stem cells(Human escs)	Human	1
---	-------	---

(六) 结果分析与统计

mcherry/eRFP-EGFP-LC3 串联荧光蛋白慢病毒中表达的 EGFP 和 mcherry/eRFP 用于标记及追踪 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 (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, 原理如图 1 所示)。

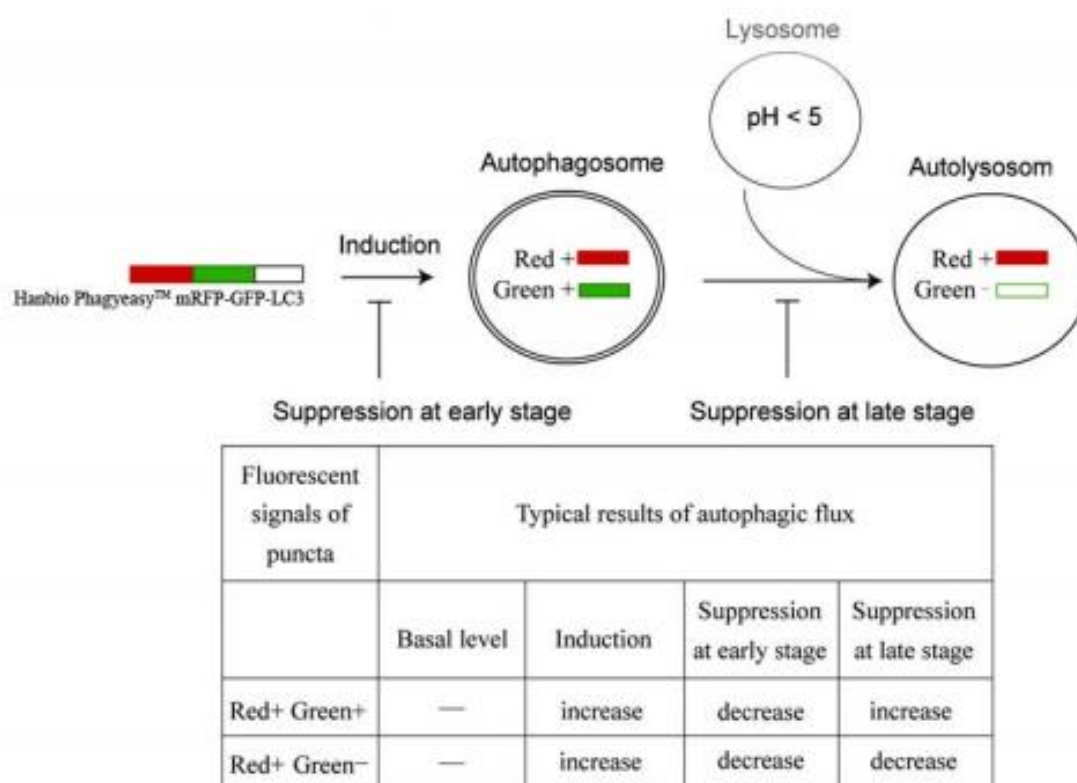


图 1 汉恒串联荧光蛋白病毒监测自噬流的检测原理图

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 2: 细胞转染自噬双标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)。

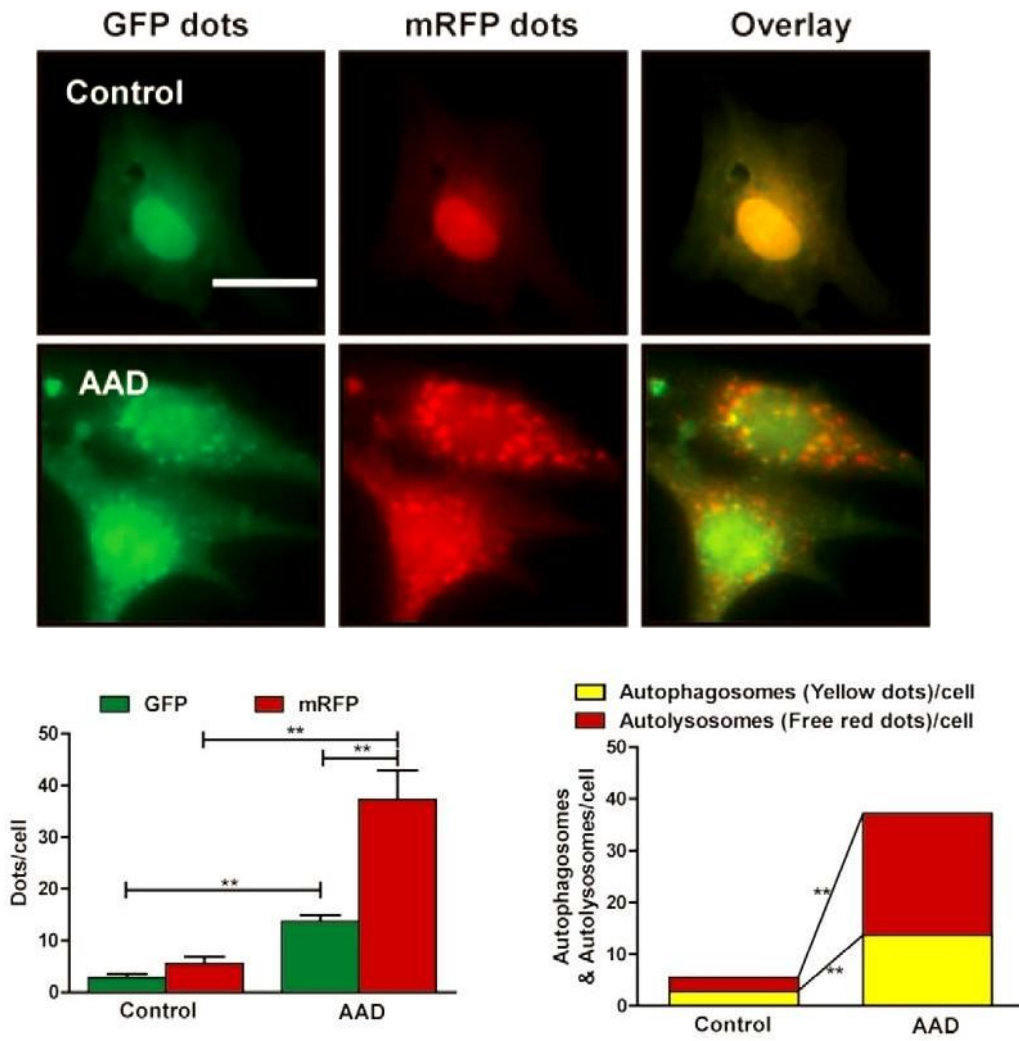


图 2. 在合并后的图像中，黄色斑点表示自噬体，而红色斑点表示自噬溶酶体。Antioxid Redox Signal 14(11): 2179-2190.

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1：慢病毒MOI感染参考

细胞系	细胞描述	MOI值范围	能否添加polybrene
7402	人肝癌细胞	10~15	可
Hep 3B	人肝癌细胞	10~30	可
Hep G2	人肝癌细胞	10~30	可
SMMC-7721	人肝癌细胞	10~30	可
Huh-7	人肝癌细胞系	10~30	可
Hela	人宫颈癌细胞株	10~30	可
HOS	人骨肉瘤细胞系	20~40	可
Hep-2	人喉癌细胞株	10~30	可
HL-60	人急性髓系白血病细胞株	>100	可
HT-29	人结肠癌细胞	10~30	可
PKO	人结肠癌细胞	2~4	可
SW480	人结肠癌细胞株	10~30	可
DLD-1	人结肠直肠癌细胞株	10~30	可
SK-OV-3	人卵巢癌细胞株	2~4	可
SHG-44	人脑胶质瘤细胞	10~30	可
U251	人脑胶质母细胞瘤	1~3	可
U87	人脑星形胶质母细胞瘤	1~3	可
293T	人胚肾上皮细胞	1~3	可
HUVEC-2C	人脐静脉血管内皮细胞	10~30	可
PC-3	人前列腺癌细胞	20~40	可
MDA-MB-231	人乳腺癌细胞	10~30	可
MCF-7	人乳腺癌细胞株	20~40	不可
Tca8113	人舌鳞状细胞癌	10~30	可
RPE	人视网膜色素上皮细胞	10~30	可
AGS	人胃癌细胞	100~150	可
BGC-823	人胃癌细胞	100~150	可
SGC-7901	人胃癌细胞	10~30	可

细胞系	细胞描述	MOI值范围	能否添加polybrene
MKN-28	人胃癌细胞株	20 ~ 40	可
MKN-45	人胃低分化腺癌细胞株	20 ~ 40	可
BxPc-3	人胰腺癌细胞	20 ~ 40	可
CFPAC-1	人胰腺癌细胞	50 ~ 80	可
Panc-1	人胰腺癌细胞	2 ~ 4	可
HEC-1-B	人子宫内膜癌细胞株	2 ~ 4	可
NIH-3T3	小鼠成纤维细胞系	20 ~ 40	可
Raw264.7	小鼠单核巨噬细胞白血病细胞	10 ~ 30 (感染后分化)	不可
CHO	中国仓鼠卵巢细胞	20 ~ 40	可
HSC-T6	大鼠肝星状细胞	10 ~ 30	不可
C6	大鼠脑胶质瘤细胞	>100	可
NRK	大鼠肾细胞	10 ~ 30	可
-	大鼠软骨细胞	20 ~ 40	可
-	大鼠肝星状细胞	>100	不可
-	大鼠骨髓间充质干细胞	3 ~ 5	不可
-	大鼠乳鼠心肌细胞	20 ~ 40	可
-	大鼠软骨细胞	20 ~ 40	可
-	大鼠神经胶质细胞	20 ~ 40	不可
-	大鼠神经元细胞	1 ~ 3	不可
-	大鼠雪旺氏细胞	20 ~ 40	可
-	人骨髓间充质干细胞	100 ~ 150	不可
-	人胚胎干细胞	2 ~ 10	不可
-	人脐动脉血管平滑肌细胞	100 ~ 150	可
-	小鼠骨髓间充质干细胞	10 ~ 30	不可
-	小鼠神经元细胞	1 ~ 3	不可
-	小鼠神经干细胞	5 ~ 10	不可
-	小鼠胚胎干细胞	5 ~ 10	不可

细胞系	细胞描述	MOI值范围	能否添加polybrene
K562	人白血病细胞	20~40	可
Jurkat	人白血病细胞株	50~80	不可
kasumi	人白血病细胞株	10~30	不可
NB4	人白血病细胞株	50~80	不可
U937	人单核细胞	20~40	可
THP-1	人单核细胞株	50~80	可
GBC-SD	人胆囊癌细胞株	30~50	不可
H929	人多发性骨髓瘤症细胞系	100~150	不可
H1299	人非小细胞性肺癌细胞	1~3	可
95D	人肺巨细胞癌	2~4	可
A549	人肺腺癌	20~40	可
SPC-A-1	人肺腺癌细胞	100~150	可

附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。