

线粒体自噬慢病毒操作指南

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
一、汉恒线粒体自噬表型研究工具.....	2
二、汉恒线粒体自噬通路研究工具.....	3
病毒安全使用注意事项.....	4
收到病毒后的处理.....	4
慢病毒的使用.....	5
助转剂 polybrene 的选择.....	5
慢病毒感染细胞预实验（MOI 的摸索）.....	5
感染目的细胞.....	7
（一）细胞准备.....	7
（二）病毒感染.....	7
（三）观察感染情况.....	8
（四）构建慢病毒稳转株-Puromycin 筛选.....	8
（五）结果分析.....	10

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。

线粒体自噬是细胞在应对氧化应激等压力条件下一种基本的生物学现象，细胞通过自噬的机制选择性地清除线粒体的过程。选择性清除受损伤或功能不完整的线粒体对于整个线粒体网络的功能完整性和细胞生存来说十分关键。

一、汉恒线粒体自噬表型研究工具

我们用自噬小体单标工具 LC3-EGFP 标记自噬小体，用 mito-dsred 标记线粒体。EGFP-LC3 和 mcherry-LC3 等单标记的荧光探针可以监测 LC3 蛋白参与自噬起始过程。mito-dsred 线粒体特异性定位荧光探针 (pHBmito-dsred) 可准确标记定位线粒体，两者共转染细胞即可准确实时地追踪线粒体自噬的动态过程。

除此外，我们研发了专用于监测线粒体自噬的工具 mKeima 和 Cox8-EGFP-mCherry，可独立应用于线粒体自噬的研究，是我们研究线粒体自噬不可或缺的利器。

mKeima 工具: Keima 来源于珊瑚虫，是一种发射峰为 620nm 的荧光蛋白，具有 PH 值依赖性的双峰激发光谱，在中性和酸性环境中分别于 440nm 和 550nm 处被激发，因此，随着时间的推移，递送到溶酶体的 keima 量可以通过在 550nm 处激发的信号强度和 440nm 处激发的信号强度的比值来估计。鉴于发生自噬的线粒体最终会进入酸性的溶酶体中，所以将特异性定位于线粒体基质的靶向序列与 keima 融合形成 mt-keima，可指示通过自噬途径进入溶酶体中的线粒体。

Cox8-EGFP-mCherry 工具: 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。

相关产品列表:

产品名称	融合标签	产品规格
HBLV-EGFP-LC3	EGFP	1x10 ⁸ TU/ml
HBLV-mito-dsred	dsred	1x10 ⁸ TU/ml
HBLV-mKeima	Keima	1x10 ⁸ TU/ml
HBLV-Cox8-EGFP-mCherry	EGFP-mCherry	1x10 ⁸ TU/ml

注: 汉恒生物同时提供相关基因腺病毒和腺相关病毒包装服务, 满足广大科研工作者不同实验需求, 如使用腺病毒和腺相关病毒产品, 具体操作参考相应技术文档。

二、汉恒线粒体自噬通路研究工具

线粒体自噬具有 3 条典型的信号通路: Pink/Parkin pathway、Bnip3/Nix pathway、FUNDC1 pathway。我们用线粒体自噬通路单标工具 Parkin-EGFP/FUNDC1-EGFP/ Bnip3-EGFP+Nix-EGFP 标记线粒体自噬通路关键信号因子, 用 mito-dsred 标记线粒体。Parkin-EGFP、FUNDC1-EGFP、 Bnip3-EGFP+Nix-EGFP 等单标记的荧光探针可以监测参与线粒体自噬的自噬通路。mito-dsred 线粒体特异性定位荧光探针 (pHBmito-dsred) 可准确标记定位线粒体, 两者共转染细胞即可准确实时地鉴别相关信号分子的线粒体转位, 是我们线粒体自噬通路研究的良好工具。

相关产品列表:

产品名称	融合标签	产品包装
LV-Parkin-EGFP	EGFP	1x10 ⁸ TU/ml
LV-Bnip3-EGFP+LV-Nix-EGFP	EGFP	1x10 ⁸ TU/ml
LV-FUNDC1-EGFP	EGFP	1x10 ⁸ TU/ml
HBLV-mito-dsred	dsred	1x10 ⁸ TU/ml

注: 汉恒生物同时提供相关基因腺病毒和腺相关病毒包装服务, 满足广大科研工作者不同实验需求, 如使用腺病毒和腺相关病毒产品, 具体操作参考相应技术文档。

■ 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

收到病毒液后若在短期内使用，可将病毒放置于 4°C 保存（一周内使用完最佳）；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°C 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）慢病毒的稀释

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°C 保存（请尽量在三天内用完）。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。

慢病毒的使用

■ 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，因此细胞是否适用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 μ g/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的最常用工作浓度为4~8 μ g/mL。

注：汉恒生物自产的Polybrene产品，用户可用以进行辅助感染。提供的Polybrene母液保存在-20 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C可保存2周。

■ 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。

Day1: 细胞准备

以293T细胞，96孔板摸索MOI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 μ L/孔（ 1×10^4 个细胞），放入37 $^{\circ}$ C，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%之间。

Day2: 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体积新鲜培养液，96孔板则加入50 μ L培养基，分别取MOI为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：

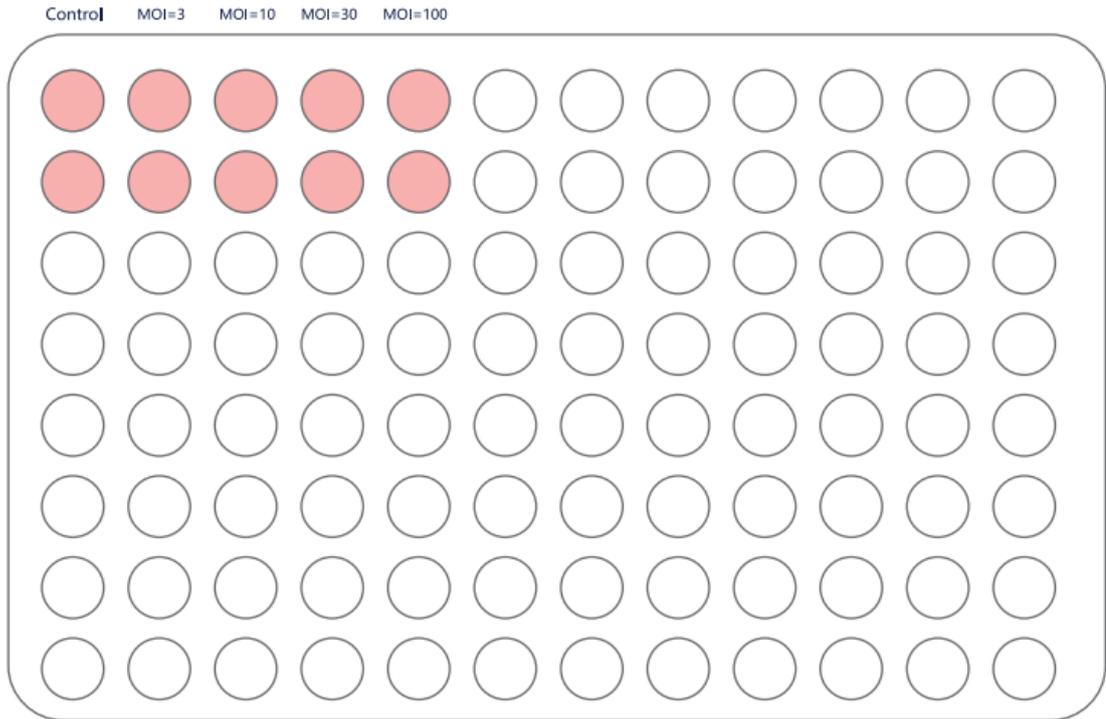


图1. 24孔板示意图

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. 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 (TU/mL)	病毒液体积 (μL)
1×10^4	3	1×10^8	0.3
1×10^4	10	1×10^8	1
1×10^4	30	1×10^8	3
1×10^4	100	1×10^8	10

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

MOI = (病毒滴度 × 病毒体积) / 细胞数目

慢病毒加入4h后，补足至100μL培养体积。

Day 3: 换液

感染后第二天 (约24h)，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。

Day 4-5: 观察荧光

感染48h显微镜初步观察荧光。感染72h后，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。

备注：若使用 mKeima 线粒体自噬工具，此处建议直接将细胞铺到玻底/共聚焦培养皿中。mKeima 成像需要在活细胞或新鲜组织细胞中进行，不适合固定的细胞或组织样品（固定会破坏溶酶体膜上的 pH 梯度从而影响结果的观察）。

（二）病毒感染

I、贴壁细胞

由于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，条件允许的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galetin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，加入慢病毒感染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(TU/mL)×1000]。需要加入polybrene的细胞，可同时加入适量polybrene。感染4h后补足至完全培养体积。感染后第二天（约24 h），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。

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2。

表2. 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
慢病毒感染 4 h 后补足至培养体积，感染 24h 后换液			

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（1200g）离心1h，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15min（尽量不要超过30min，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24h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）观察感染情况

感染后48h，可以开始观察到荧光蛋白的表达，48-72h可以进行细胞固定（若使用mKeima，不可以固定）、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）。

备注：若使用 mKeima 线粒体自噬工具，可以使用带有温度控制细胞培养系统的共聚焦显微镜进行成像分析，且培养室温度需控制在 37℃，共聚焦显微镜可以使用 ZeissLSM780 进行成像。

（四）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1~10 µg/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 µg/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 3. 不同细胞稳转株筛选 Puromycin 推荐使用浓度

Cell line	Species	Puromycin(ug/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
---	-------	---

（五）结果分析

使用 EGFP-LC3 和 mito-dsred 共转观察线粒体自噬的时候，EGFP-LC3 慢病毒中表达的荧光蛋白 EGFP 用于标记及追踪 LC3，mito-dsred 中表达的 dsred 用于标记及定位线粒体，confocal 观察双荧光共定位的情况，检测线粒体自噬的发生，如果共定位，则存在线粒体自噬，然后根据相应荧光比例观察线粒体自噬的发生情况。

单独使用 mKeima 观察线粒体自噬的时候，用 440nm 和 550nm 两个不同波长的激光分别激发，用同一个发射光 620nm 波长分别采集图像，然后用 550nm 激发对应的 620nm 采集的图像荧光强度/440nm 激发对应的 620nm 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 约偏于中性，从而来指示线粒体自噬流水平。

注：keima 在不同激发光下发射出的光都是 620nm 的红光，为方便观察统计，一般人为将 440nm 处激发出的光的颜色调成绿色（如操作有难度，可咨询仪器工程师）。

单独使用 Cox8-EGFP-mCherry 观察线粒体自噬时，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，绿色荧光蛋白淬灭，只剩下红色荧光信号，指示自噬溶酶体。通过 confocal 观察，根据 merge 后的红色荧光斑点来判断线粒体自噬的发生情况。

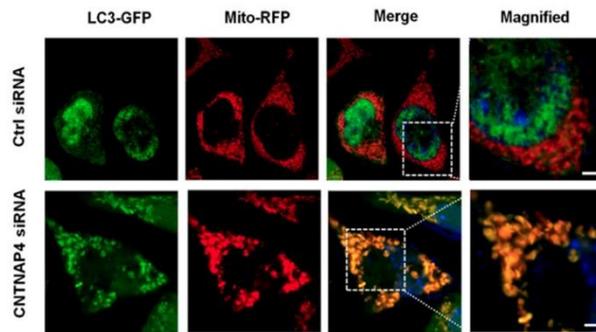
Parkin-EGFP/FUNDC1-EGFP/Bnip3-EGFP+Nix-EGFP 表达的 EGFP 用于标记相关通路信号因子，mito-dsred 中表达的 dsred 用于标记及定位线粒体，confocal 观察双荧光共定位的情况，merge 后出现的黄色斑点即为线粒体自噬所研究相关通路自噬的发生情况。

统计方法

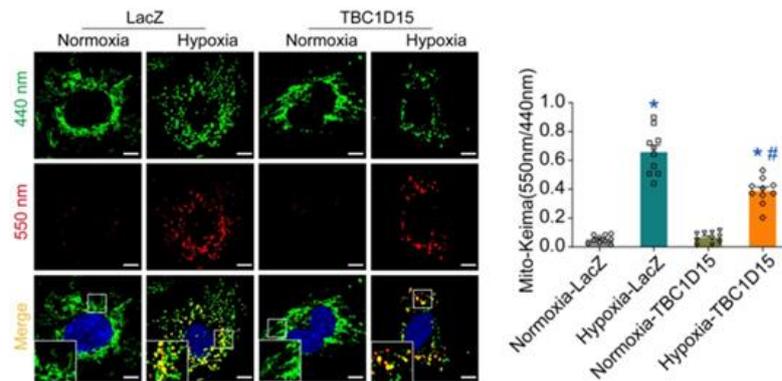
（一）、线粒体自噬表型研究工具

使用 EGFP-LC3 和 mito-dsred 观察线粒体自噬时，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线粒体自噬体，红色的斑点指示线粒体，通过不同颜色斑点的计数可以清晰的看出线粒体自噬发生的强弱，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

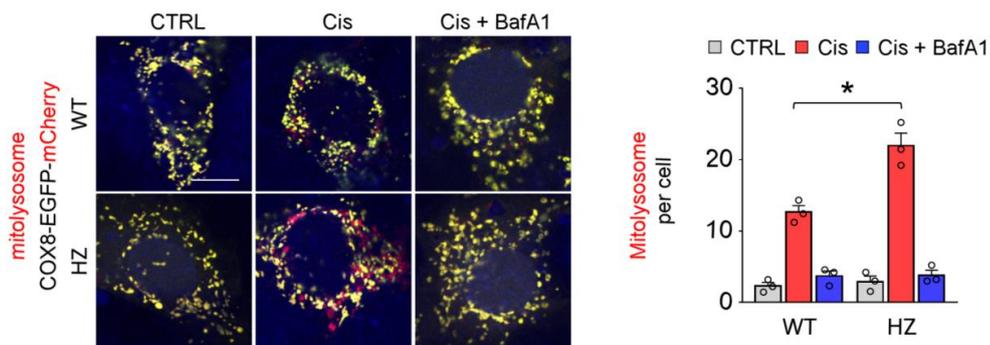
(PMID: 32194851)。



使用 mKeima 观察线粒体自噬时，在显微镜成像后，通过红绿荧光的分布情况及比例可以看出线粒体自噬发生的强弱及自噬流情况。采用人为计数的方法统计在不同激发光波长下的红色斑点和绿色斑点的数目，然后做出 bar 图，分析线粒体自噬情况。(PMID: 33042281)。



使用 Cox8-EGFP-mCherry 观察线粒体自噬时，在显微镜成像后红绿荧光 merge 后，出现的红色斑点即指示线粒体自噬溶酶体，通过对红色荧光斑点计数可以反映线粒体自噬发生的强弱，一般统计采用人为计数的方法，也就是统计叠加 (overlay) 之后红色斑点的数目，然后做出 bar 图 (PMID:34739325)。



(二)、汉恒线粒体自噬通路研究工具

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为线粒体自噬所研究相关通路自噬的发生情况，红色的斑点指示线粒体，通过不同颜色斑点的计数可以清晰的看出线粒体自噬中此通路自噬的发生比例，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(PMID: 19966284, 此图 Parkin 为 YFP 标记，仅供参考)。

