



腺病毒载体包装 Ad-GFP-LC3 说明书

一、产品描述

重组腺病毒表达 GFP-LC3B 融合蛋白 (Recombinant adenoviruses expressing GFP-LC3B fusion protein, Ad-GFP-LC3B)，可用于感染细胞或组织后进行细胞自噬 (autophagy) 的检测。

LC3B 被认为是细胞自噬中的标志性蛋白。LC3B 是一个具有 125 个氨基酸残基的蛋白，在蛋白合成后，被 Atg4 酶切而失去了 C 端的 22 个氨基酸蛋白，从而暴露出 C 端的甘氨酸，人们把它命名为胞质形式的 LC3B I。在细胞自噬的过程中，其 C 端暴露的甘氨酸经过一个类似泛素化的过程，以 ATG7 为 E1 样激活酶 (E1-like activating enzyme)，以 ATG3 为 E2 样连接酶 (E2-like conjugation enzyme)，以 Atg12-Atg5-Atg16 复合物为 E3 样连接酶 (E3-like ligase)，在 C 端甘氨酸上共价连接上磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine, PE) 而成为 LC3B-PE 即 LC3B II。与胞质定位的 LC3B I 不同，LC3B II 定位于自噬体 (autophagosome) 的内膜和外膜上。在自噬体与溶酶体融合后，自噬体外膜上的 LC3B II 被 Atg4 所酶切，而自噬体内膜上的 LC3B II 则被溶酶体内的蛋白酶所降解。尽管 LC3B II 比 LC3B I 的分子量要大，但由于其极强的疏水性，在 SDS-PAGE 电泳时，LC3B II 比 LC3B I 迁移得更快，其表观分子量分别为 14kD 和 16kD。在用 GFP-LC3B 腺病毒感染细胞后，在非自噬的情况下，荧光显微镜下 GFP-LC3B 以弥散的形式存在于细胞质中；而在自噬的情况下，荧光显微镜下 GFP-LC3B 则聚集在自噬体膜上，以斑点的形式表现出来 (LC3B dots or punctae)。

腺病毒感染细胞后为瞬时表达，通常不会与基因组 DNA 重组，不能用于筛选稳定细胞株。本产品感染体内外细胞后，有效表达时间通常不少于 7 天，不同细胞和组织的有效表达时间有所不同。感染 10-14 天后蛋白的表达很可能会大大减弱。

二、组分和说明

本产品的滴度 $\geq 2 \times 10^9$ pfu/ml。

如果按照 20 MOI 感染 6 孔板的细胞，每孔 50 万细胞计算，200 μ l 本产品共可以感染 40 个孔；如果按照 20 MOI 感染 24 孔板的细胞，每孔 10 万细胞计算，200 μ l 本产品共可以感染 200 个孔。

如果 MOI 值提高，则相应可以感染的孔数会减少；如果 MOI 值降低，则相应可以感染的孔数会增加。

三、保存条件

-80°C 保存，1 年有效；-20°C 保存，1-2 个月内有效；4°C 保存，1 周内有效。

四、使用说明

1. 感染条件的确定：不同种类的细胞感染所需的 MOI 值是不同的，如果是初次使用腺病毒感染需要通过实验确定最佳的感染条件。

1.1 细胞培养 (以 6 孔板 HeLa 细胞为例，其它培养板或培养皿参考 6 孔板进行操作)：感染前 1 天在 6 孔板中以 5×10^5 /孔接种 HeLa 细胞，每孔加入 2 ml 完全培养液 (具体的接种数量由细胞大小和细胞生长速度而定)，使第 2 天病毒感染时细胞密度达到约 70% 左右。

1.2 按照 MOI 分别为 2、5、10、20、40，计算所需病毒量，计算方法请参考附录。



南京善本生物技术有限公司

Nanjing Sciben Biotech Co., Ltd.

1.3 冰上解冻病毒，混匀后备用。

1.4 从细胞培养箱中取出 6 孔板，在显微镜下确定每孔的细胞均生长良好，分别加入特定 MOI 值的病毒液，同时设置未加入病毒的细胞孔作为对照组。对于培养液体积比较小的多孔板，例如 96 孔板和 48 孔板，也可以先把病毒用培养液稀释至所需的 MOI 值后再加入。

1.5 感染后约 12 h，除去含有病毒的培养液，每孔加入 2 ml 新鲜的完全培养液，继续培养 24 h 后观察细胞生长状况及荧光蛋白表达情况，以不显著影响细胞生长、荧光较强且感染效率便于荧光观察的 MOI 值和感染后时间为最佳条件。

2. 感染细胞、诱导自噬和荧光观察：根据步骤 1 获得的最佳 MOI 进行感染实验，在荧光显微镜下观察 LC3B 的荧光变化情况。

五、注意事项

1、反复冻融会降低病毒滴度，如有必要请在收到本产品后分装保存。病毒融解后，如果在 1 周内使用，可以放置于 4℃。如果 -80℃ 保存时间超过 1 年，可能会导致滴度下降，此时建议重新测定病毒滴度。

2、腺病毒感染需要细胞表面 CAR 受体，请确认拟使用的细胞或组织可以被腺病毒感染。

3、本产品使用前请仔细阅读《腺病毒使用安全规范》。本产品生物安全等级为 Biosafety Level 1 (BSL-1)，没有确凿证据显示会导致健康成人产生疾病，可以按照常规的微生物实验操作要求进行操作。

4、本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。

5、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

六、附录

病毒 MOI 的计算

MOI (Multiplicity of Infection)定义：病毒感染细胞时，病毒数量与细胞数量的比值。

pfu (plaque forming units)定义：具有生物活性的病毒颗粒数量。可以根据如下公式计算所需 pfu：所需 pfu=细胞数量×MOI

例如，需要向 1×10^5 细胞中加入 20 MOI 的病毒，即所需 pfu = $(1 \times 10^5 \text{ cells}) \times (20 \text{ MOI}) = 2 \times 10^6$ pfu。若病毒母液滴度为 1×10^9 pfu/ml，则细胞培养液中应加入 $(2 \times 10^6 \text{ pfu}) / (1 \times 10^9 \text{ pfu/ml}) = 0.002 \text{ ml}$ 病毒母液，即 2 μl 病毒母液。

南京善本生物技术有限公司

网址：<http://www.sciben.com>

电话：025-85300038

产品订购：sales@sciben.com

技术支持：support@sciben.com

产品编号：AD1022

生产批号：



善本生物网站



微信公众号