

产品信息

 Vigen <hr/> VigenLenti	Lenti-mCherry-C1-eGFP-LC3B (human) 慢病毒滴度液
	货号: VGV-B007-1H11
	规格: 1 mL
	品牌: Vigen/镇江维根
	货期: 2~3周

产品介绍

mCherry·eGFP·LC3B 自噬双标系统的工作原理: 未发生自噬的细胞及含有自噬体的细胞中, 由于 mCherry 与 GFP 共同表达, 细胞呈现黄色荧光。当自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体后, 酸性的溶酶体环境使酸敏感的 GFP 荧光淬灭, 而 mCherry 不受影响, 进而使自噬溶酶体呈现红色荧光。因此, 红色荧光可指示自噬溶酶体形成的顺利程度。红色荧光越多, 绿色荧光越少, 则从自噬体到自噬溶酶体阶段流通得越顺畅。反之, 自噬体和溶酶体融合被抑制, 自噬溶酶体进程受阻 (Fig.1)。

本产品为人源 LC3B 基因融合 mCherry-eGFP 过表达慢病毒质粒包装而成的病毒滴度液, 含有嘌呤霉素 (Puromycin) 抗性基因。pLenti-mCherry-C1-eGFP-LC3B (h) 的质粒图谱如下 Fig.2 所示。

注意事项:

- 1、病毒滴度 $\geq 1 \times 10^8$ IU/mL。
- 2、保存于 -80°C , 避免反复冻融。
- 3、病毒操作时必须要在二级或以上生物安全实验室或生物安全柜中进行, 不可使用普通超净工作台操作病毒。
- 4、病毒操作时请穿好实验服, 戴口罩和乳胶手套。
- 5、如果使用时本品不慎溅到眼睛、



皮肤或其他身体部位请立即使用大量清水冲洗。6、使用本品所产生的实验废弃物需要通过高压灭菌处理后按照医疗废弃物处理要求进行处理。7、本产品仅作科研用途!

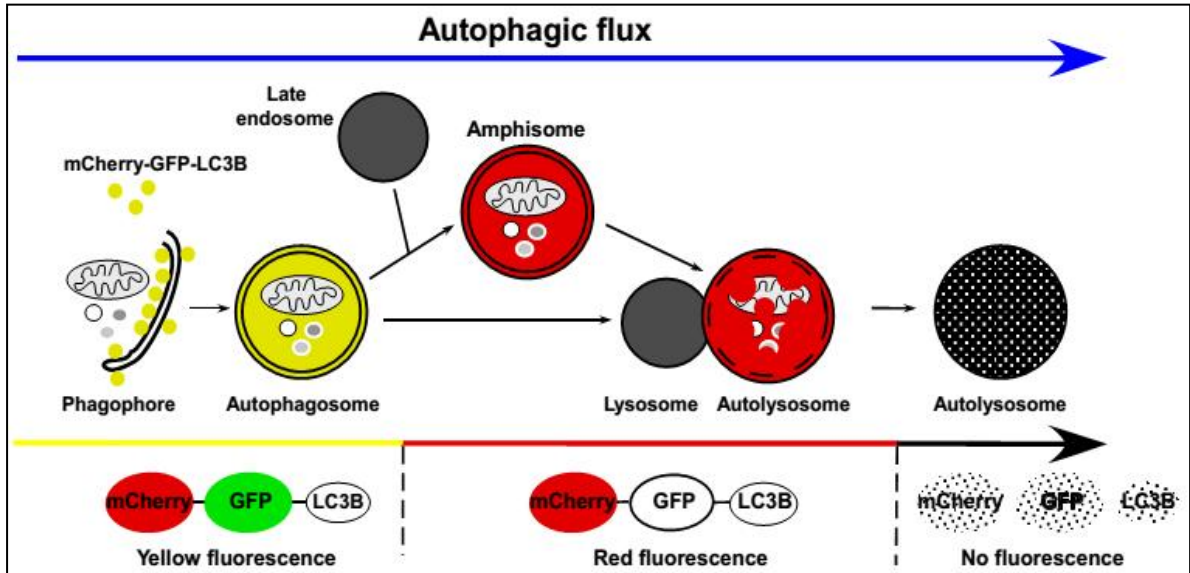


Fig.1 mCherry·eGFP·LC3B 双标系统工作原理

(该图片来源于 Tom Egil Hansen and Terje Johansen, BMC Biology, 2011)

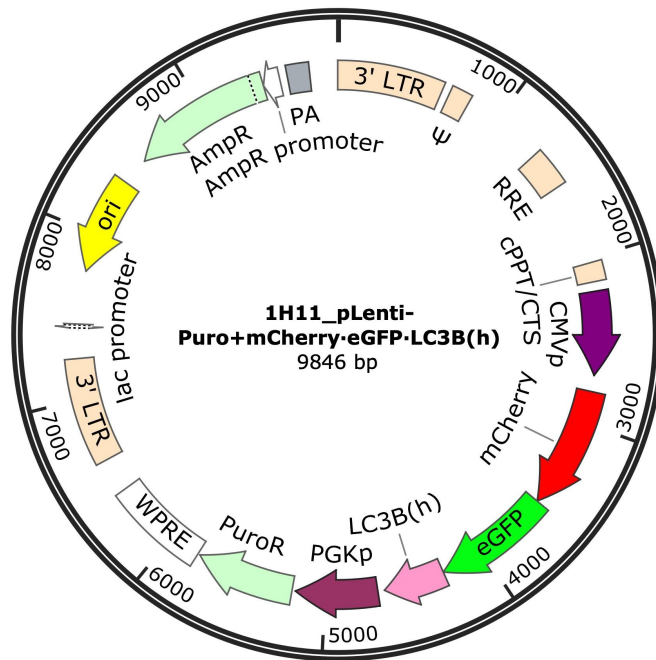


Fig.2 pLenti-mCherry-C1-eGFP-LC3B (h)质粒图



相关应用

构建自噬双标稳定细胞株（请根据实际实验设计，本方案仅供参考）

以 6 孔细胞培养板转导 HEK-293T 为例进行细胞转导实验操作步骤如下：

1、准备 HEK-293T 细胞

Day 1 在 6 孔细胞培养板接种 HEK-293T 细胞，次日细胞的汇合度达到 60~70%，每孔培养液体积为 2 mL。

2、病毒转导 HEK-293T 细胞

Day 2 根据实验设计确定合适的 MOI 值，用培养液稀释慢病毒原液。然后在相应孔分别加入计算好的病毒液及 5~10 $\mu\text{g/mL}$ 的 polybrene，混匀后放于 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 培养箱共培养过夜。

例如，6 孔细胞培养板的单孔细胞数为 2×10^5 ，细胞完全培养液为 2 mL，聚凝胺的浓度为 10 mg/mL ，转导设计的 MOI 值为 5，病毒滴度为 1×10^8 TU/mL，则单孔转导需要的病毒量为 10 μL ，polybrene 为 2 μL （polybrene 的终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ ）。

3、更换培养液

Day 3 病毒转导细胞 8~16 小时后，更换培养液。

注：如果慢病毒对细胞有明显毒性作用，影响细胞生长状态，可以缩短孵育时间。

4、药物筛选

Day 4 病毒转导细胞 48~72 小时后，以适当浓度的嘌呤霉素（Puromycin）进行药物筛选（需提前摸索最佳的嘌呤霉素筛选浓度）直至未转导的对照 HEK-293T 细胞完全死亡。用普通完全培养液继续培养细胞，进行相关研究。

5、细胞自噬诱导或抑制处理



根据试验设计对待研究细胞进行自噬诱导或抑制处理，然后通过监测红、绿荧光变化来检测细胞自噬情况。

说明：

- 1、进行慢病毒转导实验时可使用完全培养液（培养目的细胞用）稀释慢病毒。培养液中的血清、双抗或其他营养因子不会影响慢病毒的转导效率；
- 2、细胞状态对病毒转导效果有很大影响，请务必保证在进行病毒转导前的细胞处于良好的生长状态。

