

mt-Keima 慢病毒使用说明书

背景介绍

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。根据降解底物的选择性不同，可以将自噬分为非选择性自噬和选择性自噬，非选择性自噬通常是饥饿引起的应激反应，能为细胞提供氨基酸等以满足营养需要。根据细胞内底物运送到溶酶体腔方式的不同，非选择性自噬一般分为大自噬 (Macroautophagy)、小自噬 (Microautophagy) 和分子伴侣介导的自噬 (Chaperone-mediated autophagy)。大自噬是指膜 (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；小自噬是溶酶体膜自身变形，包裹吞噬细胞浆中的底物；分子伴侣介导的自噬是指分子伴侣将细胞内的蛋白质先从折叠状态恢复为未折叠的状态，再转位入溶酶体。而选择性自噬则主要用于保护细胞的结构，如及时清除受损的细胞器，线粒体自噬就属于选择性自噬一种。

线粒体自噬是细胞在应对氧化应激等压力条件下的生物学现象，是一种选择性清除多余或受损线粒体的自噬过程，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。由于线粒体自噬是一个动态的细胞生物学过程，如何灵敏、客观地评价其发生水平是该研究领域的重要问题。

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在 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 (mitochondrial) 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。将 mt-keima 序列构建到汉恒慢病毒载体中，包装成慢病毒并高效感染细胞，通过激光共聚焦显微镜观察不同激发光下的荧光比例可以反映细胞内线粒体的自噬情况。

■ 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（一周内使用完最佳）。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 μg/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 μg/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°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°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 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 96孔板铺板, $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ (1×10^4 个细胞), 放入 37°C , 5% CO_2 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 $50 \mu\text{L}$ 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 $1 \times 10^8 \text{ TU}/\text{mL}$ 为例, 不同的MOI值加入的病毒量见下表:

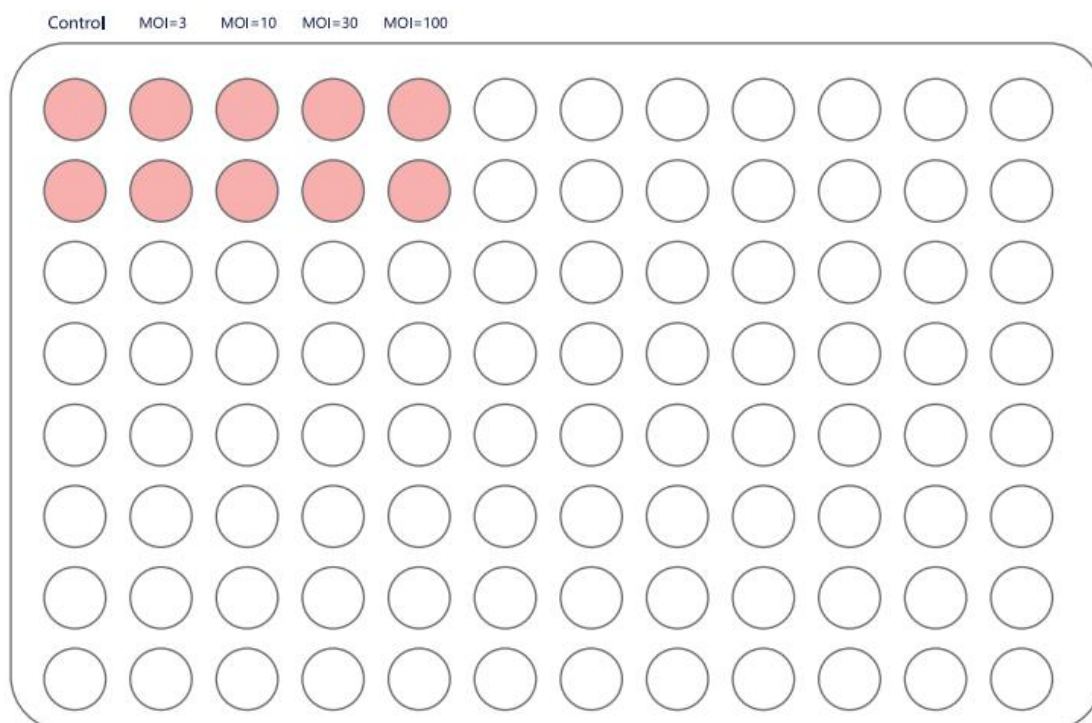


图1. 24孔板示意图

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 \times 细胞数 / 病毒滴度 (TU / ml) \times 1000

MOI = (病毒滴度 \times 病毒体积) / 细胞数目

慢病毒加入4h后，补足至100 μL 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 $^{\circ}\text{C}$ 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。

■ 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 $3 \times 10^5/\text{mL}$ ，加入24孔板，500 μL /孔 (1.5×10^5 个细胞)。放入37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 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：

mt-keima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）。

慢病毒可以整合基因组进行稳定转染，可以先构建好稳转细胞株后，再铺一定量稳转细胞到玻底/共聚焦培养皿中，待细胞生长状态稳定后进行活细胞成像；也可以直接在玻底/共聚焦培养皿中进行病毒感染，待病毒表达后直接进行活细胞成像。

(二) 病毒感染

I、贴壁细胞

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(μL)= $\text{MOI} \times \text{细胞数} / \text{病毒滴度}(\text{TU}/\text{mL}) \times 1000$]。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。

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

对于携带Puromycin抗性基因的病毒,感染表达后待细胞状态稳定,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)。之后将一定量的稳转细胞铺到玻底/共聚焦培养皿中,待细胞生长状态稳定后进行活细胞成像;若是在玻底/共聚焦培养皿中直接进行的病毒感染,可待病毒表达后(约48-72h)直接进行活细胞成像。需要注意的是:活细胞成像需要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(共聚焦显微镜可以使用Zeiss LSM 780),且培养室温度需控制在37°C。

(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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。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 3. 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

(五) 结果分析

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。

如图2：细胞感染mt-keima病毒并进行9h缺氧处理后，550nm激发光下的荧光明显增强而440nm激发光下的荧光减弱，表明线粒体自噬增强。（图引自汉恒生物客户已发表文章）

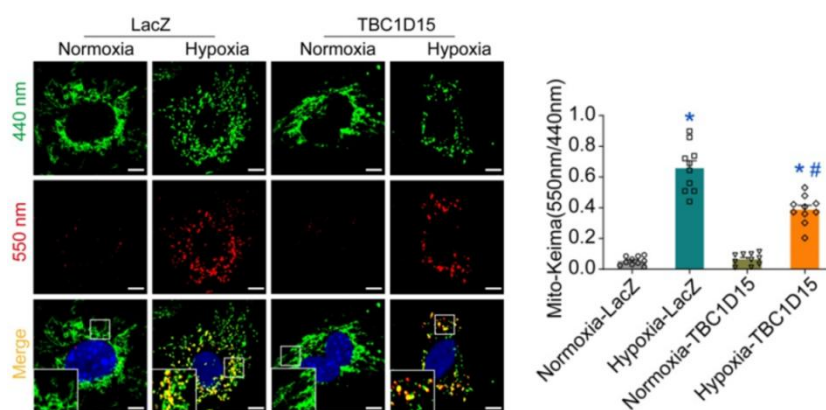


图2. Theranostics.2020 Sep 14;10(24):11244-11263.

如图3：细胞感染mt-keima病毒后进行相应处理，在显微镜成像后，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。（图引自汉恒生物客户已发表文章）

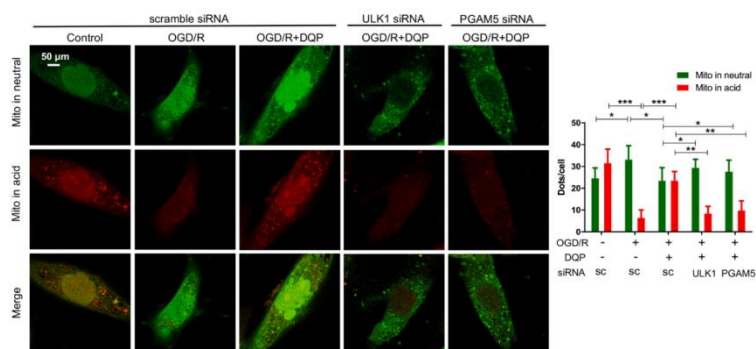


图3. Phytomedicine.2022 Feb 18;99:154009

参考文献：

Yoshii, S.R. and N. Mizushima. Monitoring and Measuring Autophagy. Int J Mol Sci.2017; 18(9): 1865. doi:10.3390/ijms18091865.

Yu WJ, Sun SQ, Xu HX, Li CY, Ren J, Zhang YM. TBC1D15/RAB7-regulated mitochondria-lysosome interaction confers cardioprotection against acute myocardial infarction-induced cardiac injury. Theranostics. 2020; 10(24): 11244-11263. doi:

10.7150/thno.46883.

Wang XP, Jiang YY, Zhang YW, et al. The roles of the mitophagy inducer Danqi pill in heart failure: A new therapeutic target to preserve energy metabolism. *Phytomedicine*. 2022 Feb 18;99:154009. doi: 10.1016/j.phymed.2022.154009.

Choi, A. M., S. W. Ryter and B. Levine. Autophagy in human health and disease. *N Engl J*. 2013 Feb 14;368(7):651-62. doi: 10.1056/NEJMra1205406.

Levine, B. and G. Kroemer. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008 Jan 11;132(1):27-42. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018.

Sun N, Malide D, Liu J, Rovira II, Combs CA, Finkel T. A fluorescence-based imaging method to measure in vitro and in vivo mitophagy using mt-Keima. *Nat Protoc*. 2017;12(8):1576-1587. doi:10.1038/nprot.2017.060