

内质网自噬 (ER-phagy) 慢病毒说明书

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 |
| 汉恒生物内质网自噬 (ER-phagy) 研究工具 | 2 |
| ■ 病毒安全使用注意事项 | 3 |
| ■ 收到病毒后的处理 | 4 |
| 慢病毒的使用 | 4 |
| ■ 助转剂 polybrene 的选择 | 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) 观察感染情况 | 7 |
| (四) 构建慢病毒稳转株-Puromycin 筛选 | 8 |
| (五) 结果分析 | 9 |

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。自噬一般是由应激诱导形成的现象，如缺氧、能量或营养缺乏、照射、药物等。根据降解底物的选择性不同，自噬可分为非选择性自噬和选择性自噬。非选择性自噬是不加选择地将细胞质成分或细胞器运送到溶酶体；选择性自噬是降解特定的靶点，如受损的细胞器（线粒体自噬、内质网自噬、核糖体自噬）、聚集蛋白（聚集自噬）或入侵细菌（异物自噬）等。

内质网自噬属于选择性自噬，是指内质网功能发生改变时，细胞激活选择性自噬清除细胞内受损的内质网、内质网膜或蛋白的过程，以维持细胞内的环境稳态。内质网自噬可分为：大内质网自噬（包裹内质网碎片的自噬体与溶酶体融合以降解其内容物）；微内质网自噬（内质网碎片直接被溶酶体吞噬）；此外，溶酶体也可直接与内质网来源的囊泡融合并进行降解（图 1）。内质网自噬和人类多种疾病相关，如神经退行性疾病、癌症和代谢性疾病等。因此，建立高效的内质网自噬监测工具对于内质网自噬、内质网相关疾病等的研究很有意义。

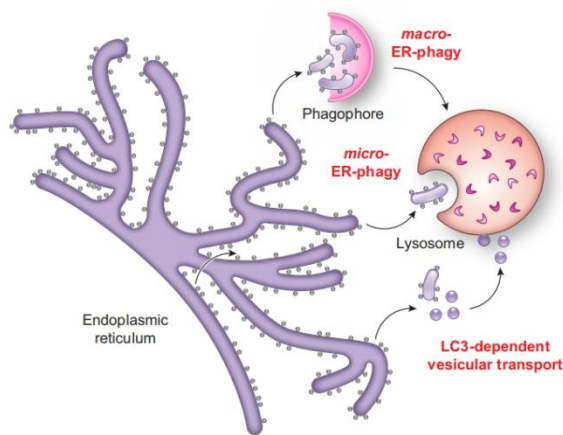


图 1. 内质网自噬解析图

汉恒生物内质网自噬 (ER-phagy) 研究工具

通过将内质网定位序列与 RFP-GFP 荧光串联序列融合表达来构建内质网自噬报告载体 ssmRFP1-EGFP-KDEL (ss: 内质网信号肽序列, ER signal sequence; KDEL 内质网滞留序列) 和 mCherry-EGFP-RAMP4 (RAMP4: 即 SERP1 基因, Stress-associated

endoplasmic reticulum protein 1, 可以特异性定位到内质网膜上)。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; 若发生内质网自噬, 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。此外, 在溶酶体中, 报告载体 ssmRFP1-EGFP-KDEL 中的 mRFP1 与 EGFP 间的 linker 会被剪切, 因此也可通过 Western Blot 结果统计 mRFP1/mRFP1-EGFP 比值来指示内质网自噬。

内质网自噬报告载体 mCherry-RAMP4 表达定位于内质网的融合蛋白 mCherry-RAMP4, 当发生内质网自噬时, 融合蛋白会被水解酶切割, 从而产生游离的 mCherry, 此时通过 Western Blot 方法检测 mCherry 可指示内质网自噬水平。

相关产品列表

| 种类 | 产品用途 | 慢病毒 (LV) 规格 | 腺病毒 (AD) 规格 | 腺相关病毒 (AAV) 规格 |
|--------------------|-------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| ssmRFP1-EGFP-KDEL | 内质网自噬 | 10 ⁸ TU/ml, 1ml | 10 ¹⁰ PFU/ml, 1ml | 10 ¹² v.g/ml, 1ml |
| mCherry-EGFP-RAMP4 | 内质网自噬 | 10 ⁸ TU/ml, 1ml | 10 ¹⁰ PFU/ml, 1ml | 10 ¹² v.g/ml, 1ml |
| mCherry-RAMP4 | 内质网自噬 | 10 ⁸ TU/ml, 1ml | 10 ¹⁰ PFU/ml, 1ml | 10 ¹² v.g/ml, 1ml |

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（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：

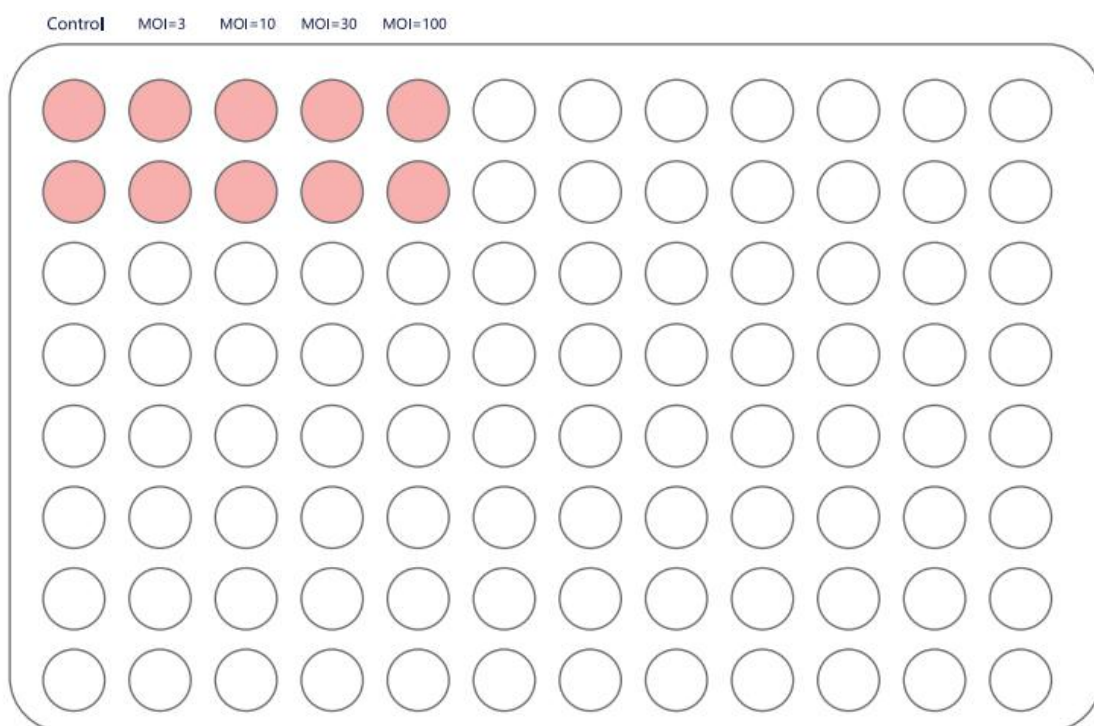


图2. 24孔板示意图

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 $\mu\text{L}/\text{孔}$ (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。

(二) 病毒感染

I、贴壁细胞

由于该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galectin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(μL) = MOI \times 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 μL，1/2培养体积为250 μL，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，可以开始观察荧光蛋白的表达情况，48-72h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，亦可取细胞样品进行Western Blot实验等。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）。

（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

使用 ssmRFP1-EGFP-KDEL 报告载体观察内质网自噬时，在细胞质中 mRFP1 和 EGFP 均表达，merge 后为黄色；若发生内质网自噬，EGFP 在偏酸性的溶酶体中淬灭，此时观察到荧光为红色。因此，可通过统计红色荧光斑点数来衡量内质网自噬。另外，报告载体中 mRFP1 和 EGFP 间的 linker 序列在溶酶体中会被剪切，可以结合 Western Blot 结果统计 mRFP1 和 mRFP1-EGFP 条带强度比值 mRFP1/mRFP1-EGFP 来衡量内质网自噬水平。

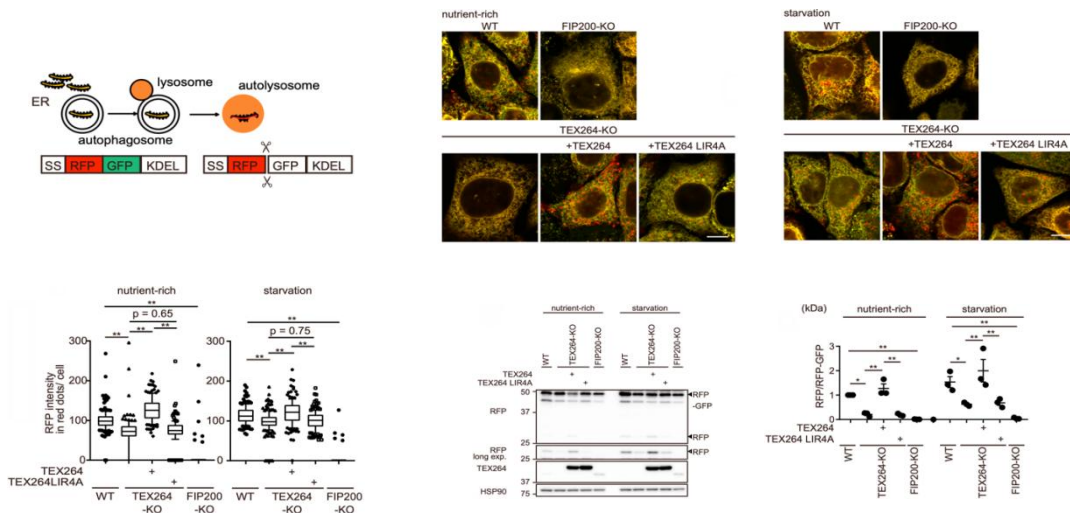


图 3. Mol Cell. 2019;74(5):909-921.e6.

使用 mCherry-EGFP-RAMP4 报告载体观察内质网自噬时，在细胞质中 mCherry 和

EGFP 均表达，merge 后为黄色；若发生内质网自噬，EGFP 在偏酸性的溶酶体中淬灭，此时观察到荧光为红色。通过统计红色荧光斑点数或流式分析红色和绿色荧光的相对变化来衡量内质网自噬水平。

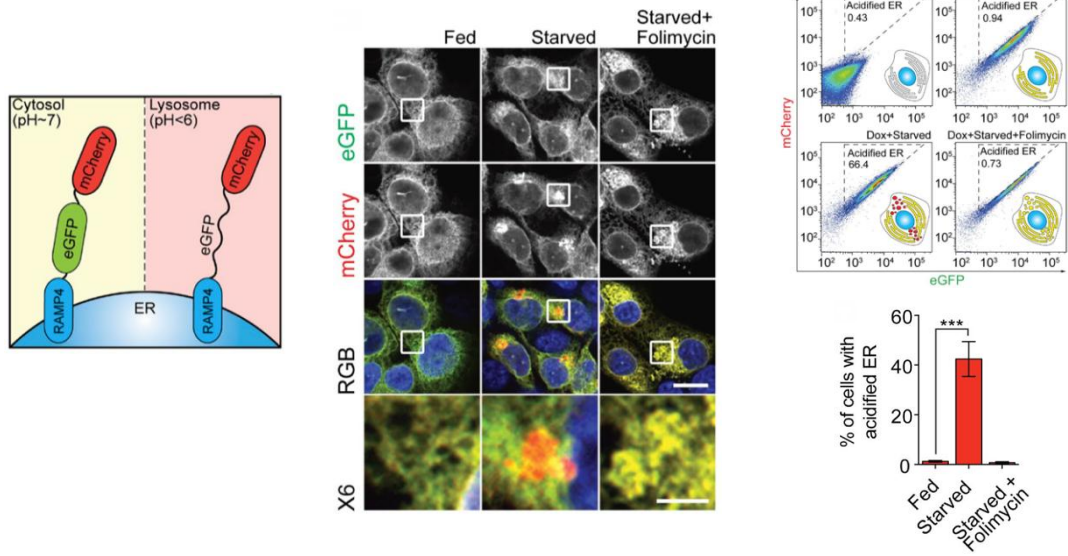


图 4. J Cell Biol. 2018;217(10):3354-3367.

使用 mCherry-RAMP4 报告载体观察内质网自噬时，在细胞质中，融合蛋白 mCherry-RAMP4 表达；若发生内质网自噬，融合蛋白会被水解酶切割，产生游离的 mCherry，结合 Western Blot 结果统计 mCherry 与 mCherry-RAMP4 条带强度的比值 mCherry/mCherry-RAMP4 来衡量内质网自噬水平。

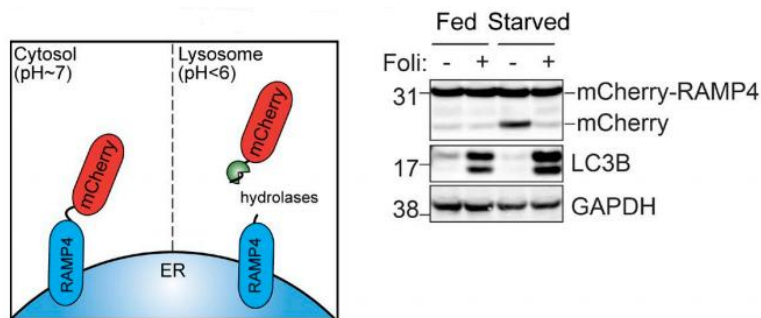


图 5. J Cell Biol. 2018;217(10):3354-3367.

参考文献

1. Reggiori F, Molinari M. ER-phagy: mechanisms, regulation, and diseases connected to the lysosomal clearance of the endoplasmic reticulum. *Physiol Rev.* 2022;102(3):1393-1448. doi:10.1152/physrev.00038.2021
2. Vargas JNS, Hamasaki M, Kawabata T, Youle RJ, Yoshimori T. The mechanisms and roles of selective autophagy in mammals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;10.1038/s41580-022-00542-2. doi:10.1038/s41580-022-00542-2
3. He L, Qian X, Cui Y. Advances in ER-Phagy and Its Diseases Relevance. *Cells.* 2021;10(9):2328. Published 2021 Sep 6. doi:10.3390/cells10092328
4. Chino H, Hatta T, Natsume T, Mizushima N. Intrinsically Disordered Protein TEX264 Mediates ER-phagy. *Mol Cell.* 2019;74(5):909-921.e6. doi:10.1016/j.molcel.2019.03.033
5. Liang JR, Lingeman E, Ahmed S, Corn JE. Atlastins remodel the endoplasmic reticulum for selective autophagy. *J Cell Biol.* 2018;217(10):3354-3367. doi:10.1083/jcb.201804185