



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
 订货热线: 400-1683301或800-8283301
 订货e-mail: order@beyotime.com
 技术咨询: info@beyotime.com
 网址: http://www.beyotime.com

AAV-mCherry-GFP-LC3B

产品编号	产品名称	包装
C3013-250μl	AAV-mCherry-GFP-LC3B (AAV9, 10 ¹³ vp/ml)	250μl

产品简介:

- AAV-mCherry-GFP-LC3B (AAV9), 即AAV9 serotype adeno-associated virus (AAV) expressing mCherry-GFP-LC3B fusion protein, 是一种可表达mCherry-GFP-LC3B融合蛋白的腺相关病毒, 用于注射小鼠等动物后进行细胞自噬(autophagy)检测。
- LC3是酵母自噬关键蛋白ATG8在哺乳动物中的同源蛋白。LC3最初被分析鉴定为microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1LC3)。LC3蛋白家族包括LC3A、B、C和GABARAP等亚家族, 其中对于LC3B的研究最为广泛。到目前为止, LC3B被认为是细胞自噬信号通路最为关键的标志性蛋白。LC3B是一个具有125个氨基酸残基的蛋白, 在蛋白合成后, 被Atg4所酶切而失去了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。
- 自噬(Autophagy)是一种在进化上高度保守的通过溶酶体吞噬并降解部分自身组分的细胞内分解代谢途径。自噬与多种生理功能有关, 在饥饿等不利的环境条件下, 细胞通过自噬降解多余或异常的细胞内组分, 为细胞的生存提供能量及原材料, 促进生物体的生长发育、细胞分化及对环境变化产生应答。自噬异常与多种病理过程如肿瘤、神经退行性疾病、代谢疾病、病原体感染等都有密切关系。由于细胞自噬在生理和病理过程中都有重要作用, 自噬已经成为细胞生物学领域的一个新的研究热点。
- AAV-mCherry-GFP-LC3B是碧云天自行研发的重组腺相关病毒, 感染后能够在靶细胞中有效表达红色荧光蛋白mCherry、绿色荧光蛋白(GFP)和LC3B的融合蛋白, 呈现明亮的红色和绿色荧光, 可以用于细胞自噬的检测。
- 自噬小体在与溶酶体融合过程中, 溶酶体内的酸性环境会导致GFP荧光淬灭, 这为追踪GFP-LC3B的细胞定位增加了难度。mCherry是一种来自于蘑菇珊瑚(mushroom coral)的单体红色荧光蛋白, 当其与GFP进行LC3B的共同标记时, 在GFP被溶酶体酸性环境所淬灭的情况下, 可以发出红色荧光的mCherry因为其卓越的稳定性而被保留。因此, 通过融合表达mCherry-GFP-LC3B蛋白, 可以非常有效地追踪自噬过程。在用AAV-mCherry-GFP-LC3B腺相关病毒感染细胞后, 在非自噬的情况下, 荧光显微镜下mCherry-GFP-LC3B以弥散的黄色荧光(mCherry和GFP的综合效果)形式存在于细胞质中; 而在自噬的情况下, 荧光显微镜下mCherry-GFP-LC3B则聚集在自噬体膜上, 以黄色斑点的形式表现出来(LC3B dot or punctae); 当自噬体与溶酶体融合后, 因GFP荧光的部分淬灭而以红色斑点的形式表现出来。
- 腺相关病毒感染细胞后通常不会与基因组DNA重组, 但可以长期稳定地表达目的蛋白, 特别是在很多不分裂的细胞中长期稳定表达。AAV还具有滴度高, 体内注射不产生明显的免疫反应, 对于增殖和非增殖细胞感染效率高等优点。
- 碧云天的AAV-mCherry-GFP-LC3B是复制缺陷型的, 感染普通的细胞后不能进行复制和扩增, 必须在辅助病毒存在的情况下才能复制和扩增, 从而有效降低了本产品 in 活体生物中的风险。
- 腺相关病毒目前发现主要有12种血清型(AAV1-AAV12), 不同血清型AAV有不同的衣壳蛋白, 其识别结合的细胞膜表面受体也有所不同, 因此不同血清型AAV感染不同类型细胞的感染效率也各不相同。不同血清型AAV的组织亲和性参见下表。

AAV Serotype	Tissue Tropism							
	Liver	Muscle	Brain	Retina	Lung	Heart	Pancreas	Kidney
AAV1		√	Neuron & glia	√		√	√	
AAV2	√			√				√
AAV3	√			√		√		
AAV4			√			√		
AAV5			Neuron & glia	√	alveolar cells			
AAV6		√			√	√		
AAV7		√	Neuron	√				
AAV8	√	√	Neuron	√			√	
AAV9	√	√	Neuron	√	√	√	√	√

- 本产品为组织亲和性最为广泛的AAV9血清型，能感染多种组织，使用相对比较广泛。
- 不同血清型AAV的感染不同种类体外培养细胞的效率参见下表(以AAV2感染效率100%为标准)。参考下表，本产品感染培养细胞的效率很低，不太适合用于感染培养的细胞。

Cell line	AAV1	AAV2	AAV3	AAV4	AAV5	AAV6	AAV8	AAV9
Huh-7	13	100	2.5	0	0.1	10	0.7	0
HEK293	25	100	2.5	0.1	0.1	5	0.7	0.1
Hela	3	100	2	0.1	6.7	1	0.2	0.1
HepG2	3	100	16.7	0.3	1.7	5	0.3	ND
Hep1A	20	100	0.2	1	0.1	1	0.2	0
911	17	100	11	0.2	0.1	17	0.1	ND
CHO	100	100	14	1.4	333	50	10	1
COS	33	100	33	3.3	5	14	2	0.5
MeWo	10	100	20	0.3	6.7	10	1	0.2
NIH3T3	10	100	2.9	2.9	0.3	10	0.3	ND
A549	14	100	20	ND	0.5	10	0.5	0.1
HT1180	20	100	10	0.1	0.3	33	0.5	0.1
Monocytes	1111	100	ND	ND	125	1429	ND	ND
Immature DC	2500	100	ND	ND	222	2857	ND	ND
Mature DC	2222	100	ND	ND	333	3333	ND	ND

- 实验室常用的逆转录病毒、慢病毒、腺相关病毒和腺病毒的主要特之间的比较和差别参见下表。具体的特定病毒的一些特征和下表相比可能会有一定差异。

	Retrovirus	Lentivirus	AAV	Adenovirus
Genome	ssRNA(+)	ssRNA(+)	ssDNA	dsDNA
Coat	Enveloped	Enveloped	Naked	Naked
Particle size	90-100nm	90-100nm	20-30nm	60-90nm
Genome size	7-10kb	9kb	5kb	38-39kb
Genome integration	Yes	Yes	No	No
Packaging capacity	2.5-5kb	2.5-6kb	2.5-4.5kb	3-8kb
Infection tropism	Dividing cells	Dividing and non-dividing cells	Dividing and non-dividing cells	Dividing and non-dividing cells
Relative Transduction Efficiency	ND	70%	70%	100%
Expression started	48-72h	48-72h	72-96h	24-48h
Expression duration	> 2 months	> 2 months	> 6 months	3-4 weeks
Expression level	Medium	Medium	Medium	High
Immune response	Low	Low	Very low	High
In vivo safety	Medium	Medium	High	Low
Titer before concentration (IFU/ml)	10 ⁶	10 ⁷	10 ¹¹	10 ⁷
Titer after concentration (IFU/ml)	ND	10 ⁸	0.5-1x10 ¹³	10 ¹⁰
Able to obtain high MOI	No (≤ 10 copies integrated)	No (≤ 10 copies integrated)	Yes	Yes
Biosafety level	BSL-2	BSL-2	BSL-1	BSL-2

- 碧云天提供腺病毒和腺相关病毒两种类型的表达mCherry-GFP-LC3B的产品(C3011 AD-mCherry-GFP-LC3B, C3013 AAV-mCherry-GFP-LC3B)。两种产品的比较和选择请参见下表。其中C3013 AAV-mCherry-GFP-LC3B适合用于动物实验，C3011 AD-mCherry-GFP-LC3B更适合于细胞实验，由于表达起始时间短，适合用于能被腺病毒感染并且希望快速获得实验结果的情况。另外，C3011 AD-mCherry-GFP-LC3B可以在表达E1的HEK293A、HEK293等适当细胞中扩增，便于后续长期使用。

产品名称	AD-mCherry-GFP-LC3B	AAV-mCherry-GFP-LC3B
产品编号	C3011	C3013
主要用途	细胞实验	动物实验
筛选稳定株	不可以	不适合
表达起始时间	24-48 小时	48-72 小时

表达时长	3-4周	长期
表达量	高	中等
感染细胞类型	较多细胞	多种组织, 不适合细胞株
可扩增性	不可以	不可以

- 本产品的滴度为 1×10^{13} vp/ml。vp, viral particle, 即病毒颗粒。如果用于尾静脉注射8-12周的小鼠, 每只小鼠的推荐注射量为 2.5×10^{11} vp, 此时一个包装的本产品可以用于注射5-12只小鼠。用于小鼠脑内(intracerebral)和心室内(intraventricular)注射的推荐用量是 1.5×10^9 vp, 用于鼻内(intranasal)注射时的推荐用量为 1.3×10^{10} vp, 用于眼内(intravitreal)注射时的推荐用量为 1.4×10^9 vp。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C3013-250 μ l	AAV-mCherry-GFP-LC3B (AAV9, 10^{13} vp/ml)	250 μ l
—	说明书	1份

保存条件:

-80°C保存, 一年有效。-20°C保存, 1-2个月内有效。4°C保存, 一周内有效。

注意事项:

- 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。分装时必须在冰浴上进行。病毒融解后, 如果在一周内使用, 可以放置于4°C。如果-80°C保存时间超过一年, 可能会导致滴度下降, 此时建议重新测定病毒滴度。
- 本产品对于小鼠等动物在体感染的效率很高, 但对大多数常见的体外培养细胞的感染效率很低。因此, 本产品适合用于小鼠等动物的体内感染, 不太适合用于培养细胞的感染。如果用于培养细胞的自噬研究, 推荐选购C3011 AD-mCherry-GFP-LC3B。
- 如果希望使用本产品之外的其它血清型的AAV-mCherry-GFP-LC3B, 可以联系碧云天的技术服务部进行定制。
- 对于一些比较珍贵的基因敲除或转基因动物或者疾病模型动物, 建议先注射1-2个野生型正常小鼠进行预实验, 确定注射方式和注射剂量后再开始正式实验。
- 本产品使用前请仔细阅读附录1《腺相关病毒使用安全规范》。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(Not known to consistently cause diseases in healthy adults), 可以按照常规的微生物实验操作要求进行操作(Standard microbiological practices)。
- 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。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 根据拟感染的动物组织, 选择合适的特定血清型的AAV。AAV9血清型使用最为广泛, 可以感染多种小鼠组织, 具体请参见本说明书的不同血清型AAV的组织亲和性表。
2. 根据拟感染的动物组织, 通过尾静脉注射、局部注射等方式注射本产品。如果用于尾静脉注射8-12周的小鼠, 每只小鼠的推荐注射量为 2.5×10^{11} vp; 用于小鼠脑内(intracerebral)和心室内(intraventricular)注射的推荐用量是 1.5×10^9 vp; 用于鼻内(intranasal)注射时的推荐用量为 1.3×10^{10} vp; 用于眼内(intravitreal)注射时的推荐用量为 1.4×10^9 vp。对于特定组织自噬研究的最佳注射剂量, 请参考文献数据或自行通过预实验进行摸索。
3. 通常注射后3-4天即可以检测到mCherry-GFP-LC3B融合蛋白的表达, 也可以在注射后更长时间检测mCherry-GFP-LC3B融合蛋白的表达, 以确定特定组织中的细胞自噬情况。

附录:

1. 腺相关病毒使用安全规范

- a. 作为一种相对安全的病毒, 尽管腺相关病毒基因组在感染后通常不会整合进入宿主细胞基因组中, 也不会细胞体内进行复制, 但是仍然具有可能的潜在生物学危险。我们建议使用者在病毒操作前应仔细阅读本规范, 并在实验中严格按照本规范的要求进行操作。更为严格的美国CDC的生物安全等级及其操作与防护要求参考附表1, 也可以访问如下网页: <https://www.cdc.gov/labs/pdf/CDC-BiosafetyMicrobiologicalBiomedicalLaboratories-2020-P.pdf>。
- b. 腺相关病毒操作时应使用相应级别的生物安全柜, 不同的腺相关病毒的生物安全等级会有所不同。如果使用普通超净工作台操作病毒, 请不要打开排风机, 以尽量避免可能污染病毒的尘埃正面吹向操作人员而被吸入。
- c. 实验操作时必需佩戴一次性帽子、口罩, 穿戴实验手套及专门的实验服, 避免身体直接接触病毒。手部及面部有开放性创口时, 禁止进行病毒操作。
- d. 操作病毒时需小心谨慎, 不要产生气雾或飞溅。如果操作时超净工作台或其它器皿上有病毒污染, 请立即用70%乙醇或2%SDS溶液擦拭干净, 或者采取其它的妥善措施。
- e. 如果需要离心, 应使用密封性好的离心管, 或用封口膜密封后离心, 最好使用专门的离心机。
- f. 用显微镜观察细胞感染情况时应遵从以下步骤: 拧紧培养瓶或盖紧培养板, 用70%乙醇清理培养瓶或培养板外壁后到显微镜处观察拍照。离开显微镜实验台之前, 用70%乙醇擦洗显微镜实验台。
- g. 所有被病毒污染过的枪头、离心管、培养板(皿、瓶)、培养液、手套等, 在丢弃前请用84消毒液或2%SDS浸泡过夜。

脱掉手套后，用肥皂或洗手液清洗双手。

- h. 病毒飞溅或是含有病毒的气溶胶与人体接触，须用大量清水冲洗眼睛、皮肤或粘膜等接触的部位至少15min。
- i. 含病毒的针头或是其它利器刺破皮肤，伤口应立即用10%的碘伏溶液擦洗数分钟，然后用大量清水冲洗。

2. 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2 MOI的病毒，即所需pfu= $(1 \times 10^5 \text{ cells}) \times (2 \text{ MOI}) = 2 \times 10^5 \text{ pfu}$ 。若病毒母液滴度为 $1 \times 10^8 \text{ pfu/ml}$ ，则细胞培养液中应加入 $(2 \times 10^5 \text{ pfu}) / (1 \times 10^8 \text{ pfu/ml}) = 0.002 \text{ ml}$ 病毒母液，即2 μl 病毒母液。

附表1. 生物安全等级及其操作与防护要求

Table 1. Summary of Recommended Biosafety Levels for Infectious Agents

BSL	Agents	Practices	Primary Barriers and Safety Equipment	Facilities (Secondary Barriers)
1	Not known to consistently cause diseases in healthy adults	Standard microbiological practices	<ul style="list-style-type: none"> ■ No primary barriers required. ■ PPE: laboratory coats and gloves; eye, face protection, as needed 	Laboratory bench and sink required
2	<ul style="list-style-type: none"> ■ Agents associated with human disease ■ Routes of transmission include percutaneous injury, ingestion, mucous membrane exposure 	BSL-1 practice plus: <ul style="list-style-type: none"> ■ Limited access ■ Biohazard warning signs ■ “Sharps” precautions ■ Biosafety manual defining any needed waste decontamination or medical surveillance policies 	Primary barriers: <ul style="list-style-type: none"> ■ BSCs or other physical containment devices used for all manipulations of agents that cause splashes or aerosols of infectious materials ■ PPE: Laboratory coats, gloves, face and eye protection, as needed 	BSL-1 plus: <ul style="list-style-type: none"> ■ Autoclave available
3	Indigenous or exotic agents that may cause serious or potentially lethal disease through the inhalation route of exposure	BSL-2 practice plus: <ul style="list-style-type: none"> ■ Controlled access ■ Decontamination of all waste ■ Decontamination of laboratory clothing before laundering 	Primary barriers: <ul style="list-style-type: none"> ■ BSCs or other physical containment devices used for all open manipulations of agents ■ PPE: Protective laboratory clothing, gloves, face, eye and respiratory protection, as needed 	BSL-2 plus: <ul style="list-style-type: none"> ■ Physical separation from access corridors ■ Self-closing, double-door access ■ Exhausted air not recirculated ■ Negative airflow into laboratory ■ Entry through airlock or anteroom ■ Hand washing sink near laboratory exit
4	<ul style="list-style-type: none"> ■ Dangerous/exotic agents which pose high individual risk of aerosol-transmitted laboratory infections that are frequently fatal, for which there are no vaccines or treatments ■ Agents with a close or identical antigenic relationship to an agent requiring BSL-4 until data are available to redesignate the level ■ Related agents with unknown risk of transmission 	BSL-3 practices plus: <ul style="list-style-type: none"> ■ Clothing change before entering ■ Shower on exit ■ All material decontaminated on exit from facility 	Primary barriers: <ul style="list-style-type: none"> ■ All procedures conducted in Class III BSCs or Class I or II BSCs in combination with full-body, air-supplied, positive pressure suit 	BSL-3 plus: <ul style="list-style-type: none"> ■ Separate building or isolated zone ■ Dedicated supply and exhaust, vacuum, and decontamination systems ■ Other requirements outlined in the text

BSL, biosafety level; PPE, personal protective equipment.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C3006-1ml	Ad-GFP-LC3B	1ml
C3006-10ml	Ad-GFP-LC3B	10ml
C3011-1ml	Ad-mCherry-GFP-LC3B	1ml

C3011-10ml	Ad-mCherry-GFP-LC3B	10ml
C3013-250µl	AAV-mCherry-GFP-LC3B (AAV9, 10 ¹³ vp/ml)	250µl
C3015-1ml	Ad-GFP-p62	1ml
C3015-10ml	Ad-GFP-p62	10ml
C3016-1ml	Ad- mCherry-p62	1ml
C3016-10ml	Ad- mCherry-p62	10ml
D2761-1µg	pCMV-GFP-LC3B	1µg
D2761-100µg	pCMV-GFP-LC3B	100µg
D2762-1µg	pCMV-mCherry-GFP-LC3	1µg
D2762-100µg	pCMV-mCherry-GFP-LC3	100µg
D2763-1µg	pCMV-GFP-p62	1µg
D2763-100µg	pCMV-GFP-p62	100µg
D2764-1µg	pCMV-mCherry-p62	1µg
D2764-100µg	pCMV-mCherry-p62	100µg

Version 2021.04.16