



## 细胞自噬染色检测试剂盒(MDC法)

产品货号: RK1005

产品规格: 100ul

产品简介:

细胞自噬染色检测试剂盒(MDC法), 即Autophagy Staining Assay Kit with MDC, 是一种使用丹酰尸胺, 也称单丹磺酰尸胺、丹酰尸胺或丹酰戊二胺(monodansylcadaverine, MDC)作为荧光探针快速便捷地检测细胞自噬的试剂盒。

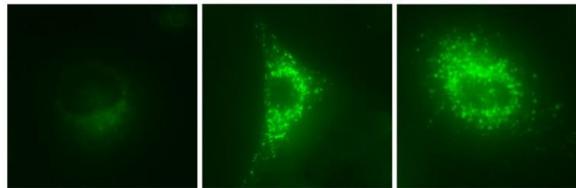
自噬(autophagy)是一种在进化上高度保守的通过溶酶体吞噬并降解部分自身组分的细胞内分解代谢途径。自噬与多种生理功能有关, 在饥饿等环境条件下, 细胞通过自噬降解多余或异常的细胞内组分, 为细胞的生存提供能量及原材料, 促进生物体的生长发育、细胞分化及对环境变化产生应答。自噬异常与多种病理过程如肿瘤、神经退行性疾病、代谢疾病、病原体感染等都有密切关系。由于细胞自噬在生理和病理过程中都有重要作用, 自噬已经成为细胞生物学领域的一个研究热点。

MDC是细胞自噬检测最常用的荧光探针之一。MDC可以通过离子捕获(ion trapping)和与膜脂的特异性结合, 从而特异性标记自噬体(autophagosome), 也称autophagic vacuole, 因而常用于细胞自噬的检测。MDC是一种嗜酸性荧光探针, 很多酸性膜性结构也会被MDC染色, 因此MDC染色时正常的细胞也会有一定的染色背景。

本产品的染色原理决定了本产品只能用于培养的细胞或者组织的细胞自噬荧光染色检测, 不能用于冻存的或固定的细胞、组织或者组织切片的染色检测。

使用本产品染色后可以通过荧光显微镜拍照观察, 也可以通过荧光酶标仪或流式细胞仪进行荧光检测。荧光显微镜观察时可以使用紫外区激发光激发, 发出绿色荧光。荧光酶标仪或流式细胞仪推荐的激发波长为 335nm (330-360nm 均可), 发射波为512nm (510-540nm 均可/酶标仪)。

DMEM                      PBS                      阳性诱导剂组



本产品用于细胞自噬染色的效果参考图:

图1. 细胞自噬染色检测试剂盒(MDC法)的染色效果图。A549细胞用PBS处理1h后, 使用本试剂盒进行荧光染色, 最后使用紫外光激发后观察绿色荧光。图中PBS或EBSS处理后出现的绿色荧光亮点即为自噬的特征性变化。本图仅供参考, 实际检测效果可能会因为实验条件的不同而有所差异。

本产品如果用于6孔板或96孔板的检测, 可以检测100或1000个孔(24孔板爬片, 200t)。

保存条件:

-20 °C保存, 一年有效。其中MDC (1000X)需要避光保存。Assay Buffer (10X)可以4°C保存, 至少6个月有效。

使用说明:

一、试剂盒的准备。

- 根据待检测样品的数量, 取适量Assay Buffer (10X)用水稀释10倍成为Assay Buffer (1X), 后续称为Assay Buffer。整个检测过程中96、48、24、12、6孔板每孔所需的Assay Buffer的用量约为0.5、0.75、1.25、2.5和5ml。
- 根据待检测样品的数量, 取适量MDC (1000X)按照1:1000的比例用Assay Buffer稀释为MDC (1X), 后续称为MDC 染色液。96、48、24、12、6孔板每孔推荐使用的MDC染色液用量为100、150、250、500和1000  $\mu$ l。涉及MDC操作的时候, 均需尽量注意避光操作。

二、贴壁细胞的自噬检测(以13mm (24孔板爬片为例), 后续以6孔板为例, 其它孔板检测试剂的用量参考6孔板的用量和步骤1中的推荐用量进行适当调整)。

- 经适当处理诱导自噬的细胞和未经诱导自噬的对照细胞, 吸净培养液。如果希望诱导自噬, 通常吸除正常的完全培养液后, 用PBS洗涤1次, 然后加入相应的自噬抑制剂(需自备), 在细胞培养箱中37 °C孵育1-4小时, 就可以诱导细胞自噬发生。
- 每孔加入1ml MDC染色液, 在细胞培养箱中37 °C避光孵育30min。孵育时间可以根据实际染色效果在10-60分钟范围内适当调整。
- 吸净MDC染色液, 使用Assay Buffer洗涤3次, 每次使用0.8-1ml Assay Buffer。
- 吸净Assay Buffer, 再加入1ml Assay Buffer。
- 在荧光显微镜下用紫外激发光激发, 观察绿色荧光。或者使用荧光酶标仪进行荧光检测, 推荐的激发波长为335nm (330-360nm均可), 发射波长为512nm (510-540nm均可)。荧光显微镜下的检测效果参考图1。

三、悬浮细胞的自噬检测。

- 经适当处理诱导自噬的细胞和未经诱导自噬的对照细胞, 250-1000 $\times$ g室温离心5min, 吸除上清。如果希望诱导自噬, 通常离心吸除正常的完全培养液后, 用PBS洗涤1次, 然后加入相应的自噬抑制剂(需自备), 在细胞培养箱中37 °C孵育1-4小时, 就可以诱导细胞自噬发生。
- 每50-100万细胞加入1ml MDC染色液, 轻柔重悬并分散细胞, 在细胞培养箱中37 °C避光孵育30min。孵育时间可以根据实际染色效果在10-60分钟范围内适当调整。
- 250-1000 $\times$ g室温离心5min, 吸净MDC染色液。使用Assay Buffer洗涤3次, 每次使用0.8-1ml Assay Buffer。
- 吸净Assay Buffer, 后续用于细胞涂片检测, 或者加入适量Assay Buffer后用于酶标仪或流式细胞仪检测。
- 对于细胞涂片, 在荧光显微镜下用紫外激发光激发, 观察绿色荧光。如果使用荧光酶标仪或流式细胞仪进行荧光检测, 推荐的激发波长为335nm (330-360nm均可), 发射波长为512nm (510-540nm均可)。



四、细胞爬片姿势染色(以13mm(24孔板爬片为例),后续以6孔板为例,其它孔板检测试剂的用量参考6孔板的用量和步骤1中的推荐用量进行适当调整)。

- 经适当处理诱导自噬的细胞和未经诱导自噬的对照细胞,吸净培养液。如果希望诱导自噬,通常吸除正常的完全培养液后,用PBS洗涤1次,然后加入相应的自噬抑制剂(需自备),在细胞培养箱中37℃孵育1-4小时,就可以诱导细胞自噬发生。
- 每孔加入500 $\mu$ l-1ml MDC染色液,在细胞培养箱中37℃避光孵育30min。孵育时间可以根据实际染色效果在10-60分钟范围内适当调整。
- 吸净MDC染色液,使用Assay Buffer洗涤3次,每次使用0.8-1ml Assay Buffer。
- 吸净Assay Buffer,再加入1ml Assay Buffer。
- 在荧光显微镜下用紫外激发光激发,观察绿色荧光。488/FITC荧光显微镜,推荐的激发波长为335nm(330-360nm均可),发射波长为512nm(510-540nm均可)。荧光显微镜下的检测效果参考图1。

#### 常见问题:

- 染色后,大量贴壁细胞脱落。诱导自噬后,细胞生长状态会变差,会比较容易从培养板表面脱落。对于贴壁比较弱的细胞,考虑使用多聚赖氨酸、鼠尾胶原或明胶等预处理细胞培养板,然后再进行细胞培养。
- 染色过强或过弱。染色过强的情况,可以考虑缩短染色时间;染色过弱的情况,可以考虑适当延长染色时间。染色过弱,也有可能由于MDC染色液使用时间较长或光照等原因发生淬灭,从而导致使用效果下降,此时需要购买新的试剂盒。
- 阴性对照染色比较强。确保在MDC染色后,至少洗涤3次,或洗涤更多次数,以确保阴性对照的染色比较弱。
- 没有观察到预期的荧光。请核对并确保激发光正确,请核对操作步骤是否完全正确,以及阳性对照的设置是否正确和适当。

#### 注意事项:

- MDC对光照特别敏感,操作过程中请尽量注意避光。
- MDC(1000X)对人体有害,请注意适当防护。
- 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。