

Ad-mCherry-p62

产品编号	产品名称	包装
C3016-1ml	Ad-mCherry-p62	1ml
C3016-10ml	Ad-mCherry-p62	10ml

产品简介:

- Ad-mCherry-p62, 即adenovirus expressing mCherry-p62 fusion protein, 是一种可以表达mCherry-p62融合蛋白的腺病毒, 可以用于感染细胞或组织后进行细胞自噬(autophagy)的检测。
- p62也称sequestosome 1 (SQSTM1), 在多细胞生物(不包括植物和真菌)中高度保守, 主要分布于细胞质, 也可以定位于细胞核、自噬体(autophagosome)和溶酶体(lysosome)中。p62是一种应激诱导的蛋白, 可以作为信号枢纽(signaling hub)在氨基酸感应(amino acid sensing)和氧化应激等许多细胞事件中发挥重要作用, 并且还可以作为PKC、ERK1、mTORC1、NF- κ B和caspase-8等的支架蛋白(scaffold protein)而参与相应的信号转导。p62全长440个氨基酸, 包含一个PB1(Phox1/Bem1p)结构域, 一个锌指结构域(ZZ), 两个核定位信号(NLS1和NLS2), 一个TB (TRAF6 binding)结构域, 一个LIR结构域(LC3-interacting region), 一个KIR结构域(Keap1-interacting region), 和一个C端的UBA(Ubiquitin-associated)结构域。N端的PB1结构域负责p62寡聚化以及与其它含PB1结构域的蛋白相互作用。UBA结构域对于寡聚化的p62形成蛋白聚集体是必须的, 特别是当细胞暴露于氧化环境中, 其作为信号组织中心负责招募泛素化修饰的蛋白底物。作为支架蛋白, p62通过其UBA结构域与蛋白聚集体(protein aggregate)相结合并将其导向自噬体从而将其降解。LIR结构域含有一个富含酸性氨基酸和疏水氨基酸的簇(DDD和WxxL), 该酸性簇和LIR结构域的两个关键氨基酸Trp338/Leu341可与LC3蛋白中的多个位点(N端的碱性氨基酸以及LC3的ubiquitin fold表面的两个疏水口袋)相互作用。LIR结构域与Atg8/LC3的相互作用负责引导泛素化的蛋白到蛋白酶体(proteasome)或自噬体中降解。p62与LC3的荧光共定位和在免疫共沉淀实验过程中被一起沉淀(pull down), 说明它们参与了自噬过程中同一蛋白复合物的形成。在自噬起始的时候, p62与蛋白聚集体的复合物与LC3在自噬体的表面相结合, 进而起始了蛋白聚集体的降解过程。p62与LC3蛋白的相互作用对于p62自身的自噬降解也是必须的, 抑制自噬将导致p62的大量堆积, 然后形成p62和泛素染色阳性的聚集体。Caspase-8被报道与p62相互作用, 从而起始非死亡受体依赖的细胞凋亡信号通路。p62的功能异常与人类的多种疾病紧密相关, 在肝功能紊乱, 肿瘤和多种神经退行性疾病的病人样品中发现了异常堆积的p62聚集体。p62是蛋白聚集体(protein aggregates)中的常见组分, 例如帕金森氏病(Parkinson disease)中的Lewy body, 艾滋海默病(Alzheimer's disease)的神经纤维缠结(neurofibrillary tangles), Huntingtin disease病人的huntingtin aggregates中均含有p62。在佩吉特氏骨病(Paget's disease of bone), 肌萎缩性脊髓侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis)以及额颞叶变性(frontotemporal lobar degeneration)等疾病中都有p62的突变被报道。
- 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。
- Ad-mCherry-p62是碧云天自行研发的重组腺病毒, 感染后能够在靶细胞中有效表达红色荧光蛋白mCherry和p62的融合蛋白, 呈现明亮的红色荧光, 可以用于细胞自噬的检测。
- 在用Ad-mCherry-p62腺病毒感染细胞后, 荧光显微镜下mCherry-p62通常以红色点状(puncta)或较为弥散的斑块状(speckles)荧光存在于细胞质和细胞核中。在自噬被抑制的情况下, 这种红色的点状或斑块状物其大小会变大而且数目会变多。p62的荧光标记对于自噬的诱导、自噬的抑制以及蛋白聚集体的清除都是一个非常好的研究工具。

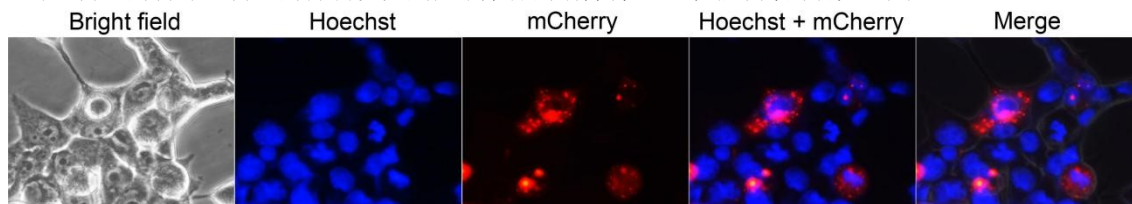


图1. Ad-mCherry-p62感染NIH3T3细胞48小时后进行Hoechst 33342染色的效果图。图中可见清晰的点状或斑块状分布的p62的红色荧光。

- 腺病毒感染细胞后为瞬时表达, 通常不会与基因组DNA重组, 不能用于筛选稳定细胞株。本产品感染体内外细胞后, 有效表达时间通常不少于7天, 不同细胞和组织的有效表达时间有所不同。感染10-14天后融合蛋白的表达很可能会大大减弱。
- 碧云天的Ad-mCherry-p62采用了成熟的E1缺陷型重组腺病毒载体系统, 感染普通的细胞后不能进行扩增和重组, 从而可以有效降低本产品在同体生物中的风险。

- 本产品可以在表达E1的HEK293A、HEK293等适当细胞中扩增。
- 本产品的滴度 $\geq 1 \times 10^8$ pfu/ml，使用时可以按照 10^8 pfu/ml进行计算。对于1ml和10ml包装，如果按照20 MOI感染6孔板的细胞，每孔50万细胞计算，共可以感染10或100个孔；如果按照20 MOI感染24孔板的细胞，每孔10万细胞计算，共可以感染50或500个孔。如果MOI值提高，则相应可以感染的孔数会减少；如果MOI值降低，则相应可以感染的孔数会增加。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
C3016-1ml	Ad-mCherry-p62	1ml
C3016-10ml	Ad-mCherry-p62	10ml
—	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。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。
- 腺病毒感染需要细胞表面的CAR受体，请确认拟使用的细胞或组织可以被腺病毒感染。
- 本产品使用前请仔细阅读附录1《腺病毒使用安全规范》。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. 感染条件的确定：

不同种类的细胞感染所需的MOI值是不同的，如果是初次使用腺病毒感染需要通过实验确定最佳的感染条件。

- 细胞培养(以6孔板NIH3T3细胞为例，其它培养板或培养皿参考6孔板进行操作)：感染前一天在6孔板中以 5×10^5 /孔接种NIH3T3细胞，每孔加入2ml完全培养液(具体的接种数量由细胞大小和细胞生长速度而定)，使第二天病毒感染时细胞密度达到约50%左右。
- 按照MOI分别为2、5、10、20、40，计算所需病毒量，计算方法请参考附录2。
- 冰上解冻病毒，混匀后备用。
- 从细胞培养箱中取出6孔板，在显微镜下确定每孔的细胞均生长良好。吸弃旧培养液，每孔加入1.2ml新鲜培养液，并分别加入特定MOI值的病毒液，同时设置未加入病毒的细胞孔作为对照组。须特别注意在病毒感染时加入尽量少的的新鲜培养液，以提升病毒的感染效率。对于培养液体积比较小的多孔板，例如96孔板和48孔板，也可以先把病毒用培养液稀释至所需的MOI值后再加入。
- 感染后约24小时，除去含有病毒的培养液，每孔加入2ml新鲜的完全培养液，继续培养24小时后观察细胞生长状况及荧光蛋白表达情况(参考图2)，以不显著影响细胞生长、荧光较强且感染效率便于荧光观察的MOI值和感染后时间为最佳条件。

注1：检测细胞自噬时并非感染效率越高越好，通常约20-70%的感染效率已经足以进行自噬检测，感染效率过高反而容易产生细胞毒性而干扰检测。

注2：通常在腺病毒感染细胞后24小时即可观察到荧光蛋白表达的出现，在48小时左右有较强的表达效果。

注3：对于感染腺病毒后出现较强细胞毒性的情况，可以尝试在感染后6-12小时更换成新鲜的完全培养液。

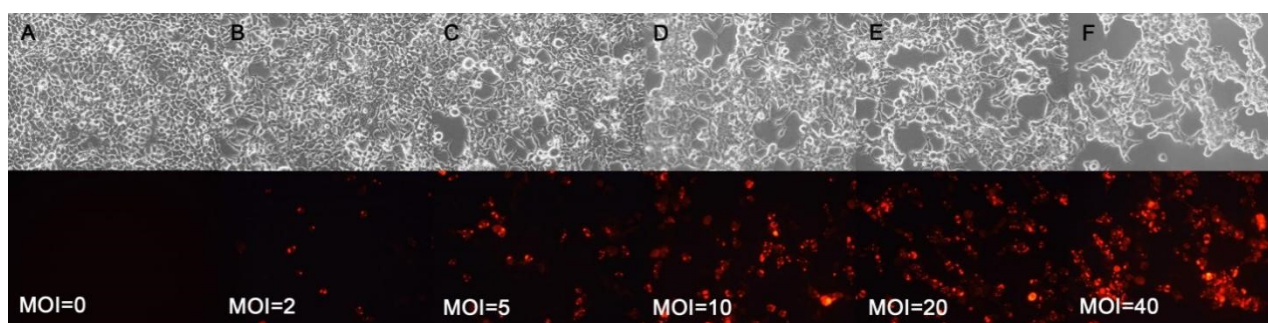


图2. Ad-mCherry-p62感染细胞的效果图。A、B、C、D、E和F依次为Ad-mCherry-p62分别在MOI值为0、2、5、10、20和40时感染NIH3T3细胞48小时后的实拍效果图。上侧为明场照片，下侧为相同视野的荧光照片。

2. 感染细胞、抑制自噬和荧光观察

按照步骤1获得的条件进行感染实验。在不诱导自噬或使用EBSS等诱导自噬的情况下，使用chloroquine或bafilomycin A1等细胞自噬抑制剂抑制自噬，随后可在荧光显微镜下观察p62的荧光变化情况。

附录：

1. 腺病毒使用安全规范

- 作为一种相对安全的病毒，尽管腺病毒基因组在感染后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>。
- 腺病毒操作时应使用相应级别的生物安全柜，不同的腺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，以避免可能污染病毒的尘埃正面吹向操作人员而被吸入。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。

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 post 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
C3015-1ml	Ad-GFP-p62	1ml
C3015-10ml	Ad-GFP-p62	10ml
C3016-1ml	Ad-mCherry-p62	1ml
C3016-10ml	Ad-mCherry-p62	10ml
AA820	Atg7抗体	>20次
AL221	LC3B抗体	>20次
AS391	Sir1/Sir2抗体	>20次

使用本产品的文献:

1. Zhang Z,Wei Y,Liu B,Wu Y,Wang H,Xie X,Feng Z,Shao G,Xiong Q. Hsp90/Sec22b promotes unconventional secretion of mature-IL-1 β through an autophagosomal carrier in porcine alveolar macrophages during Mycoplasma hyopneumoniae infection. Mol Immunol . 2018 Sep;101:130-139.

Version 2021.12.13