

细胞自噬检测试剂盒 (IF/ICC 法, FM HCS CoFM)

说明书修订日期: 2017.11.09

Cat number: KGAF004

Store at 4°C for 12 months

For Research Use Only

一、试剂盒说明

自噬是由 Ashford 和 Porter 在 1963 年发现细胞内有“自己吃自己”的现象后提出的概念。它是指细胞内, 从粗面内质网的无核糖体附着区脱落的双层膜包裹部分胞质和细胞内需降解的细胞器、蛋白质等成分形成自噬体 (autophagosome), 并与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 降解其所包裹的内容物的过程。自噬对于细胞自身的代谢和某些细胞器的更新有着重要意义。

LC3B 蛋白在自噬活动中起着重要作用, 通常情况下, LC3B 蛋白驻留于细胞质中, 但随着磷脂酰乙醇胺的分解和脂化, LC3 蛋白与吞噬泡作用, 这一特性已成为自噬体膜上的通用标志。

本试剂盒采用 LC3B 兔多抗, 可以用于荧光显微镜、共聚焦显微镜以及高内涵成像分析。试剂盒同样提供磷酸氯喹 (chloroquine diphosphate) 以便人为控制自噬体的形成。在磷酸氯喹处理之后, 溶酶体 pH 上升, 正常的自噬过程被干扰, 形成自噬体累积。

二、试剂盒组份

组 份	KGAF004	储存条件
LC3B, 兔多抗	0.5mg/mL, 100 μ L	2-8°C, 避光
磷酸氯喹 (chloroquine diphosphate)	30mM, 200 μ L	
FITC (或罗丹明) 标记羊抗兔 IgG	1mg/mL, 100 μ L	

客户自备材料:

PBS (pH7.2~7.6), 固定液 (如: 3.7%甲醛/PBS), 促渗剂 (如: 0.2% Triton X-100/PBS)。

三、操作说明

以下操作针对荧光显微镜、高内涵细胞成像分析做了优化, 以 3.7%甲醛/PBS 固定, 以 0.2%Triton X-100/PBS 促渗为例。

- 1.1 (选做) 以 50 μ M 工作浓度的磷酸氯喹 (chloroquine diphosphate) 处理细胞 12~16 小时。
- 1.2 1:100 稀释 LC3B 兔多抗至工作浓度 (建议参考值, 具体浓度可针对您的实验方案进行优化)。
- 1.3 加入 3.7%的甲醛/PBS 到细胞中, 室温孵育 15 分钟。
- 1.4 去除固定液, 用 PBS 洗涤细胞三次。
- 1.5 去除洗涤液, 加入 0.2% Triton X-100 /PBS 促渗液到细胞中, 室温孵育 15 分钟。
- 1.6 去除促渗液, 加入 1.2 步骤中制备好的一抗工作液到细胞中, 室温孵育至少 1 小时。
- 1.7 去除抗体孵育液, PBS 洗涤细胞三次。
- 1.8 去除洗涤液, 稀释 FITC (或罗丹明) 标记羊抗兔 IgG 至 20~5 μ g/mL, 37 度避光孵育至少 30 分钟。
- 1.9 以 PBS 洗涤细胞, 进行下游染色 (如 DNA 复染, 或其他抗体染色。)
- 1.10 显微成像, 拍照分析。自噬体是水泡样结构, 通常位于核周区域。