

### 概述

在细胞内损坏的蛋白或细胞器降解和循环利用的过程，称为细胞自噬。在此过程中，形成的一种双层膜组成的分离膜在延伸过程中，不断包裹损坏的蛋白或细胞器，形成自噬体。在酸性环境中自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体，自噬溶酶体的内容物质会被溶酶体内的消化酶所降解。此细胞自噬机制逐渐被发现与帕金森病等神经退行性疾病及老化有关，成为一个热门研究，研究人员需要有一种更简单的细胞自噬检测方法。

DALGreen是一种小分子染料，由于它具有在疏水和酸性环境中产生荧光的特性，因此它可以检测自噬溶酶体。DALGreen具有很好的细胞透膜性，无需基因转染等方法就可轻松进入细胞内，可用于使用荧光显微镜的活细胞成像及使用流式细胞仪的定量检测。

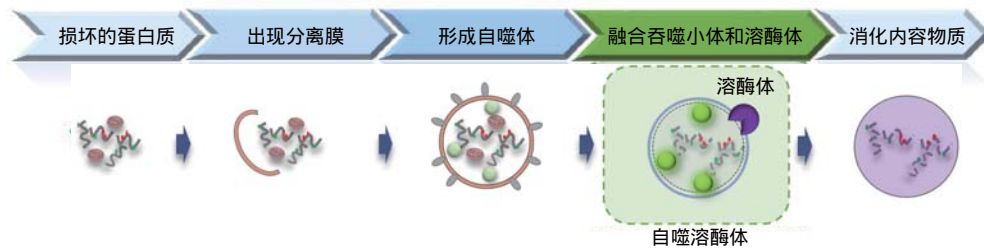


图1. 用DALGreen检测细胞自噬

### 试剂内含 储存条件 所需的设备 和材料

DALGreen ..... 20 nmol x 1

-20 避光储存。

Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

培养基

Hanks' HEPES Buffer或不含酚红的培养基

移液器

### 配制溶液

#### 配制1 mmol/l DALGreen DMSO Stock Solution

在DALGreen的管子中加入20  $\mu$ l DMSO，吹打溶解，配制成1 mmol/l 的DALGreen DMSO Stock Solution。

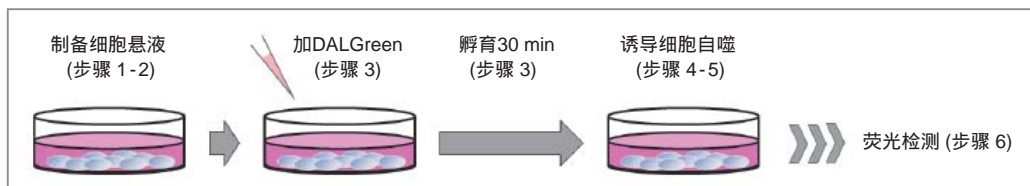
\* 配制后的溶液请放在-20 保存，可稳定保存1个月。

#### 配制DALGreen Working Solution

用培养基稀释1 mmol/l DALGreen DMSO Stock Solution，配制成终浓度为0.1-1.0  $\mu$ mol/l的DALGreen Working Solution。

\* 请根据细胞种类，选择最合适的浓度和条件。

### 操作步骤



1. 在培养皿中接种细胞后培养。
2. 吸除培养基后，用培养基洗涤1次。
3. 加入DALGreen Working Solution后，在37 培养30 min。
4. 吸除培养基后，用培养基洗涤2次。
5. 加入细胞自噬诱导剂后，在37 培养。

\* 请根据细胞自噬诱导条件选择合适的培养时间。

6. 用荧光显微镜或流式细胞仪检测。

用激光共聚焦显微镜观察

在8孔U型板 (Ibidi公司) 中接种HeLa细胞, 在37 5% CO<sub>2</sub>培养箱中过夜培养。用培养基洗涤1次, 加入250 μl 1 μmol/l DALGreen Working Solution后, 培养30分钟。用培养基洗涤2次, 加入培养基或不含氨基酸的培养基 (和光, Code: 048-33575) 培养6小时。用Hanks' HEPES Buffer洗涤2次后, 用激光共聚焦显微镜观察。

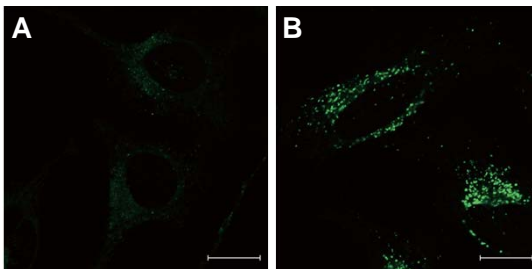


图2. 各种细胞自噬诱导条件下的荧光成像

加入DALGreen 后, 细胞在培养基 A) 或不含氨基酸的培养基 B) 中培养, 用激光共聚焦显微镜观察  
荧光成像。检测波长: 488 nm (Ex), 500-563 nm (Em) 比例尺: 20 μm

用流式细胞仪检测

在24孔板中接种HeLa细胞, 在37 5% CO<sub>2</sub>培养箱中过夜培养。用培养基洗涤1次, 加入1 μmol/l DALGreen Working Solution后, 培养30分钟。用培养基洗涤2次后, 加入培养基或不含氨基酸的培养基培养20小时。用PBS洗涤1次后, 用胰蛋白酶消化细胞。通过离心收集细胞, 用Hanks' HEPES Buffer重悬细胞后, 用流式细胞仪检测。

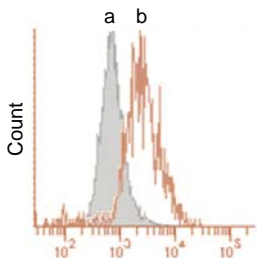
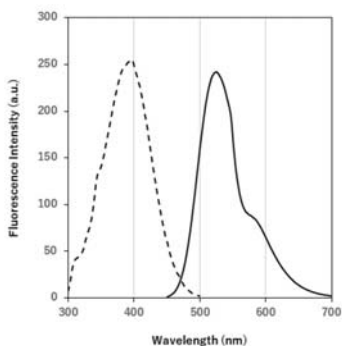


图3. 流式细胞仪检测结果

加入DALGreen 后, 细胞在培养基(a)或不含氨基酸的培养基(b)中培养, 用流式细胞仪检测  
检测波长: 405 nm (Ex), 485-535 nm (Em)

荧光特性

DALGreen的激发及发射光谱图



ex: 405 nm  
em: 525 nm  
<Recommended filter>  
Ex: 350-450 nm  
Em: 500-560 nm



如果您需要更多的信息或者有任何问题可以通过以下的方式联系我们:

网址: <http://www.dojindo.cn>

E-mail: [info@dojindo.cn](mailto:info@dojindo.cn)

上海

上海市零陵路899号飞洲国际广场27楼J座

邮编: 200030

电话: 400-823-9388

北京

北京市朝阳区德外马甸裕民路12号元辰鑫大厦E1-210室

邮编: 100029

电话: 010-8225-1765

2017年11月