

概述

在细胞内损坏的蛋白或细胞器降解的过程，称为细胞自噬。在此过程中会形成一种由双层膜组成的分离膜，通过不断包裹堆积的蛋白或受损的细胞器，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，已成为一个研究热门。在药物筛选等实验中，研究人员急需有一种更简单的细胞自噬检测方法。

DAPGreen是一种小分子荧光染料，可以用来检测自噬体及自噬溶酶体。由于其特殊的结构，在自噬体形成双层膜结构时染料可以进入其中，并在疏水环境中产生荧光。DAPGreen具有很好的细胞透膜性，通过荧光显微镜可进行活细胞荧光成像，也可使用流式细胞仪进行定量检测。

如需检测自噬溶酶体，建议使用我公司DALGreen [货号：D675]，只有当溶酶体融合自噬体后，DALGreen才可产生荧光。

原理



图1. DAPGreen检测细胞自噬原理

试剂盒内含

- DAPGreen - Autophagy Detection 5 nmol × 1

储存条件

-20 避光.

所需的设备 和材料

- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- HBSS或无血清培养基

溶液制备

加入50 μ l DMSO至DAPGreen (5 nmol)管中并吹打混匀。

* 配制后的储存液在-20℃避光可保存1个月。

配制DAPGreen工作液

用培养基稀释0.1 mmol/l 的DAPGreen DMSO储存液，配制成0.1-0.5 μ mol/l的DAPGreen工作液。

* 请根据细胞种类摸索最适浓度。

操作步骤



1. 在培养皿中接种细胞后培养。
2. 弃去上清液后，用培养基洗涤1次。
3. 添加适量DAPGreen Working Solution后，
在37℃培养30 min。
4. 弃去上清液，用培养基洗涤2次。
5. 加入含有细胞自噬诱导剂的培养基后，
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。

仪器类型	Ex (nm)	Em (nm)
荧光显微镜	425-475	500-560
流式细胞仪	488	485-525

用共聚焦显微镜检测

在8孔U型板 (ibidi公司) 中接种HeLa细胞, 在37 °C 5% CO₂培养箱中过夜培养。用培养基洗涤1次, 加入250 μl浓度为0.1 μmol/l DAPGreen Working Solution后, 在37 °C 继续培养30 min。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5 h。用HBSS Buffer洗涤2次后, 用激光共聚焦显微镜观察。

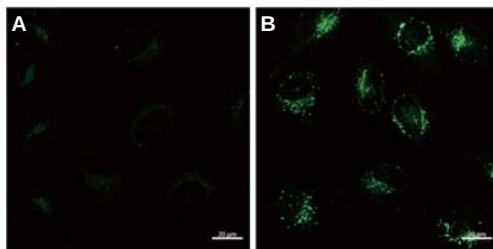


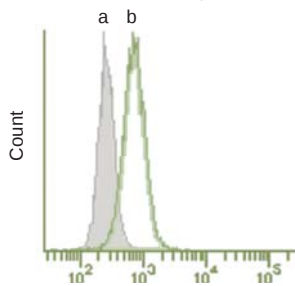
图2.激光共聚焦显微镜下观察DAPGreen (0.1 μmol/l)染色后的HeLa细胞

A: 培养基 (Nutrient-rich) B: 不含氨基酸的培养基

仪器: 激光共聚焦显微镜, Ex=488 nm, Em=500-563 nm, 比例尺: 20 μm

用流式细胞仪检测

在6孔板中接种HeLa细胞, 在37 °C 5% CO₂培养箱中过夜培养。用培养基洗涤1次, 加入浓度为0.1 μmol/l DAPGreen Working Solution后, 在37 °C 继续培养30 min。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3 h。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HBSS Buffer重悬细胞后, 进行流式细胞仪检测



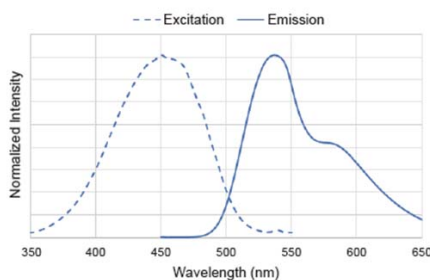
a: 培养基 (Nutrient-rich)

b: 不含氨基酸的培养基

Ex=488 nm / Em=485-535 nm

图3. 流式细胞仪检测

DAPGreen的激发及发射光谱图



参考文献

H. Iwashita, H. T. Sakurai, N. Nagahora, M. Ishiyama, K. Shioji, K. Sasamoto, K. Okuma, S. Shimizu, and Y. Ueno, "Small fluorescent molecules for monitoring autophagic flux", *FEBS Lett.*, **2018**, 592, 559-567.



东仁化学科技 (上海) 有限公司

如果您需要更多的信息或者有任何问题可以通过以下方式联系我们：

网址：http://www.dojindo.cn

E-mail: info@dojindo.cn

上海

北京

上海市零陵路899号飞洲国际广场27楼J座

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：200030

邮编：100029

电话：400-823-9388

电话：010-8225-1765

2018年3月