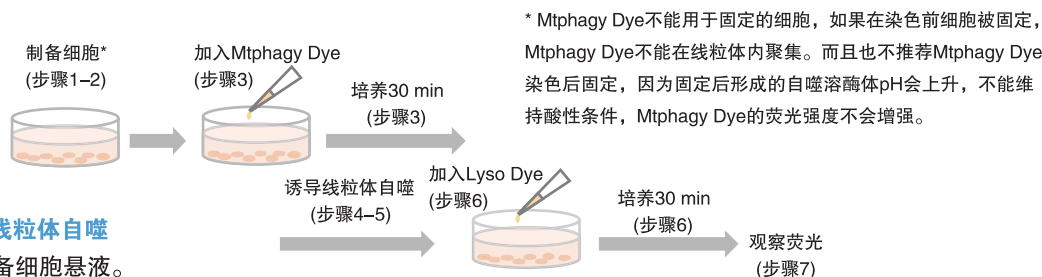


操作步骤



检测线粒体自噬

1. 制备细胞悬液。
2. 去除培养基，用Hanks' HEPES缓冲液或无血清培养基洗涤细胞2次。
3. 加入适量体积的100 nmol/l Mtpagy Dye工作液，在37°C培养30 min。
4. 弃上清，用Hanks' HEPES缓冲液或无血清培养基洗涤细胞2次。
5. 加入含有线粒体自噬诱导剂的培养基，在37°C培养合适的时间，然后在荧光显微镜下观察并确认产生线粒体自噬现象。
6. 如要观察线粒体自噬和溶酶体双染，可以加入1 μmol/l Lyso Dye工作液，在37°C培养箱中培养30 min。
7. 弃上清，用Hanks' HEPES缓冲液或无血清培养基洗涤细胞2次，然后在荧光显微镜下观察。

实验例

用羧基氰化物间氯苯胺 (CCCP, 一种线粒体解偶联剂) 诱导Parkin表达的Hela细胞线粒体自噬

1. 将Hela细胞接种在 μ-Slide 8 well (ibidi) 中。
2. 在37°C, 5%的CO₂培养箱中过夜培养。
3. 用HilyMax转染试剂 (Dojindo, 货号: H357) 将Parkin质粒载体转染到Hela细胞中。
4. 在37°C过夜培养。
5. 去除培养基，用Hanks' HEPES缓冲液洗涤Parkin表达的Hela细胞2次。
6. 加入250 μl的100 nmol/l的Mtpagy Dye工作液 (含有100 nmol/l MitoBright Deep Red (Dojindo, 货号: MT08)), 在37°C培养30 min。
7. 用Hanks' HEPES缓冲液洗涤细胞2次。
8. 向每孔中加入含10 μmol/l CCCP的培养基，培养24 h，用荧光显微镜观察线粒体自噬。
9. 弃上清，在细胞中加入250 μl, 1 μmol/l 的Lyso Dye工作液，在37°C培养30 min。
10. 用Hanks' HEPES缓冲液洗涤细胞2次，用激光共聚焦显微镜观察线粒体自噬染色，溶酶体染色及MitoBright Deep Red染色的结果。

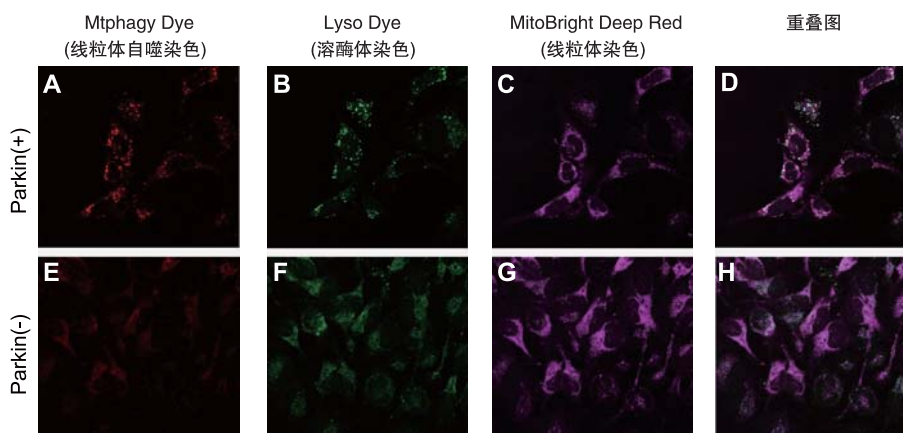


图2. 观察Parkin表达的Hela细胞 (上排) 和正常Hela细胞 (下排) 的线粒体自噬

A, E) Mtpagy Dye染色图;	Ex(nm)	Em (nm)
B, F) Lyso Dye染色图;	Mtpagy Dye	561
C, G) MitoBright Deep Red染色图;	Lyso Dye	488
D, H) Mtpagy, Lyso Dye 和MitoBright Deep Red染色重叠图	MitoBright Deep Red	640
		650 (长波通型滤光片)
		502-554
		656-700

DOJINDO 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

2017年07月