

Cell Analyze™ Autophagy Green Assay Kits(MDC)

10 min 零转染 一步点亮活细胞自噬体-自噬溶酶体 即刻可见

产品货号: C21002

产品规格: 100 T

储运条件: 组分 A -20 °C避光长期保存, 避免反复冻融, 其余组分 4 °C保存并以冰袋运输

产品简介:

Cell Analyze™ Autophagy Green Assay Kits(MDC)是一款细胞自噬染色检测试剂盒。本试剂盒采用荧光探针单丹磺酰尸胺(Monodansylcadaverine,MDC), 其作为一种嗜酸性染料, 可通过离子捕获效应与自噬体膜脂的特异性结合, 在活细胞内快速、选择性地富集于自噬性囊泡(自噬体), 并呈现明亮的绿色荧光信号, 实现对体外培养细胞模型自噬活性的直观评估。与传统自噬检测相比, 本试剂盒优势突出: 无需转染操作, 直接通过荧光染色即可实现快速检测; MDC对自噬体的特异性高。注意: MDC亦可标记其它酸性细胞器, 正常细胞存在基础背景荧光, 结果分析时需设对照。

细胞自噬(Autophagy)是进化上高度保守的细胞内分解代谢途径, 通过形成双层膜结构的自噬体(Autophagosome), 包裹并运送受损细胞器、错误折叠蛋白及入侵病原体至溶酶体进行降解与回收。该过程不仅是细胞在饥饿、氧化应激等不利环境下获取能量、维持生存、分化与稳态的核心机制, 更在生物体的生长发育、免疫应答及环境适应中扮演着至关重要的角色。自噬功能的紊乱与肿瘤、神经退行性疾病、代谢性疾病、病原体感染及衰老等重大病理过程密切相关。鉴于其在生理与病理中的双重核心作用, 准确、高效地监测细胞自噬活性已成为现代生命科学与医学研究中不可或缺的关键环节和前沿热点。

注: 效能等同 Beyotime Autophagy Staining Assay Kit with MDC(C3018)。

应用范围: 活细胞状态实时观察自噬活性变化; 无转染平台的常规自噬检测; 药物、营养素、缺氧、氧化应激等条件对自噬活性筛查与半定量分析; 与凋亡、坏死、细胞周期等联合研究;

产品特点:

- **实验快速:** 染色 10 min 即可成像, 当天即可出结果, 比传统转染法节省 1-2 天;
- **操作简便:** 无需转染, 直接对活细胞染色, 无需任何转染或稳转株构建;
- **适用性强:** 对难转染的细胞(如原代细胞)同样适用检测;
- **低毒实时:** 活细胞原位 MDC 染色, 零固定/透化损伤, 可连续追踪自噬动态;
- **高灵敏度:** MDC 嗜酸靶向自噬体/溶酶体, 点状信号清晰可辨。

产品参数:

- Ex/Em: 335 nm/512 nm

产品组分:

组分	100 T
A. 10× MDC Stain	1 mL
B. Stain Buffer	50 mL
C. Wash Buffer	100 mL

注: 100 T 为试剂盒组分 A 进行 96 孔板荧光显微镜检测贴壁细胞时可检测的微孔总数。

注意事项:



仅限体外科研用途 不得用于临床诊断或治疗
技术咨询 Contact@probelives.com
订购咨询 Sales@probelives.com

中文网址 www.probelives.cn
英文网址 www.probelives.com
Suzhou Probélives Technology CO., LTD.

- MDC Stain具有潜在毒性，实验人员必须穿实验服并佩戴一次性手套进行操作，必要时可佩戴护目镜等额外防护装备，避免试剂直接接触皮肤、黏膜及眼睛。
- 避光：由于MDC对光照特别敏感，操作过程需尽量注意避光，同时减少所有试剂暴露于强光下的时间。
- 实验中可通过设置正常细胞对照组，对比分析药物处理组与对照组的荧光强度，判断细胞自噬是否被诱导或抑制。同时，需注意排除非特异性染色的干扰，结合自噬相关指标进一步验证结果。
- 本产品仅限用于培养状态下的细胞或组织，进行细胞自噬荧光染色检测。不能用于冻存细胞或组织、固定处理后的细胞或组织切片等样本的染色检测。
- 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请遵循您所在常规实验室安全规定。

使用说明：

一、实验前准备

1. 试剂准备：

- 将试剂盒中的组分A (10× MDC Stain)、组分B (Stain Buffer)、组分C (Wash Buffer)从储存条件（如-20 °C/4 °C）取出，平衡至室温（15-25 °C）。

2. 仪器准备：

- 荧光显微镜：激发滤光片330-350 nm（如DAPI滤片）；发射滤光片510-530 nm（如FITC滤片）；

3. 细胞准备：

- 根据实验设计，对细胞进行相应的处理（如药物诱导、饥饿诱导等）。

4. 对照组设置：

组别	MDC	样品细胞
空白对照	-	不做任何处理
阴性对照	+	不做任何处理
阳性对照	+	自噬诱导细胞
实验组	+	实验组细胞

- 空白对照：未染色细胞，用于评估细胞自发荧光。
- 阴性对照：未进行自噬诱导的染色细胞，作为基础自噬水平。
- 阳性对照：使用EBSS(Earle's Balanced Salt Solution)饥饿处理细胞以诱导自噬,建议初次实验时在37 °C下孵育30 min-4 h并设置时间梯度，以确定最佳诱导时间。

注：阳性对照中 EBSS 缺乏氨基酸和血清，可模拟“饥饿状态”，是细胞自噬研究中常用的阳性对照诱导方法。

注：不同细胞系对自噬诱导的敏感性存在差异，请根据具体细胞类型优化处理时长。如部分非神经元细胞(如HeLa、HEK293)在EBSS处理30 min后即可观察到自噬激活，但具体响应时间应结合实验检测手段评估。

二、操作步骤

方案一：荧光显微镜检测（适用于悬浮细胞）

1. 收集与洗涤细胞：

- (1) 收集待测悬浮细胞悬液至离心管中。
- (2) 1000 rpm，室温离心 5 min，小心吸弃上清液。
- (3) 加入适量组分 C (Wash Buffer)轻柔重悬细胞。

2. 细胞重悬与计数：

- (1) 细胞计数，取 1×10^5 个细胞，1000 rpm 低速离心 5 min，去除上清。

注：显微镜法对细胞密度要求不严格，只要实验组与对照组密度一致即可（推荐范围： 10^5 - 10^7 cells/mL）。具体可根据样本种类与实验条件灵活调整，以显微镜下视野中细胞分布清晰可辨为宜。

注：组分 B (Stain Buffer)为我司自主创新的染色缓冲液，配方经多重优化，可在检测期间持续维持细胞生理状态并提供基础营养，并显著提升染料稳定性。若样本类型差异导致用量不足，可直接用 PBS、HBSS 等常规缓冲液补足体积重悬，不影响检测结果。

3. 细胞染色：

- (1) 加入 90μL 组分 B (Stain Buffer)，并加入 10 μL 组分 A (10× MDC Stain)，轻轻吹打混匀（此时 MDC Stain 终浓度为



1×)。

(2) 37 °C 避光孵育 15 min, 孵育时长可根据实际观察到的染色效果进行灵活调整, 调整区间为 10-60 min。

注: 各染料的使用量可以根据不同的细胞种类、预实验或实验条件设置的使用量进行调整。

4. 洗涤与重悬:

- (1) 孵育结束后, 1000 rpm, 室温离心 5 min, 收集细胞。
- (2) 小心吸弃含染料的上清液 (此为废液, 需妥善处理)。
- (3) 加入 100 μ L 组分 C (Wash Buffer) 轻柔重悬细胞, 进行洗涤。重复此洗涤步骤共 3 次, 以充分去除未结合的游离染料, 降低背景。
- (4) 末次洗涤后, 彻底吸净上清液, 加入 100 μ L 组分 C 重悬细胞, 制成待测样品。

5. 显微镜观察与拍照:

- (1) 96孔板法: 将100 μ L细胞悬液加入96孔板中, 静置片刻, 待细胞自然沉降贴底后, 置于荧光显微镜下观察。
- (2) 载玻片法: 取20-30 μ L细胞悬液滴加于洁净载玻片上, 轻轻盖上盖玻片, 避免产生气泡, 置于荧光显微镜下观察。
- (3) 在预设的滤光片条件下, 寻找并拍摄绿色点状或囊泡状荧光 (即自噬体/自噬溶酶体)。

方案二: 荧光显微镜检测 (适用于贴壁细胞)

1. 细胞清洗:

- (1) 直接在培养板中吸弃细胞培养液。
- (2) 根据培养板规格, 加入对应体积的组分C (Wash Buffer) 轻柔洗涤细胞一次 (例如: 96孔板加100 μ L/孔, 48孔板加150 μ L/孔, 24孔板加250 μ L/孔, 12孔板加500 μ L/孔, 6孔板加1 mL/孔)。洗涤后吸净组分C。

2. 制备染色工作液:

- (1) 根据样品孔数, 按组分A : 组分B = 1 : 9的比例, 提前在避光条件下配制MDC染色工作液 (现用现配)。例如, 为1个96孔板染色, 需配制10 mL工作液 (1 mL组分A + 9 mL组分B)。

3. 细胞染色:

- (1) 向各孔中加入对应体积的MDC染色工作液 (体积同步步骤1, 例如: 96孔板加100 μ L/孔, 48孔板加150 μ L/孔, 24孔板加250 μ L/孔, 12孔板加500 μ L/孔, 6孔板加1 mL/孔)。
- (2) 37 °C避光孵育15 min, 孵育时长可根据实际观察到的染色效果进行灵活调整, 调整区间为10-60 min。

注: 各染料的使用量可以根据不同的细胞种类、预实验或实验条件设置的使用量进行调整。

4. 洗涤:

- (1) 孵育结束后, 吸弃各孔中的染色工作液。
- (2) 按步骤1的体积, 加入组分C (Wash Buffer) 洗涤细胞。重复此洗涤步骤共3次, 每次都要彻底吸净洗涤液。

5. 显微镜观察与拍照:

- (1) 末次洗涤后, 每孔加入对应体积的组分C, 以保持细胞湿润。
- (2) 直接将培养板置于荧光显微镜下观察和拍照。滤光片设置同方案一。

三、结果判读:

● 定性分析 (显微镜):

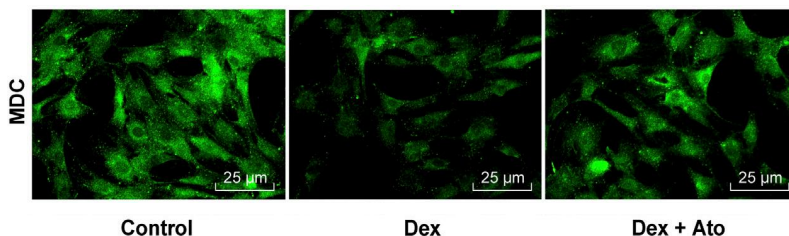


图 1.MDC 染色效果图

- 验证 Ato 能否促进 OB-6 细胞自噬, 设置空白对照组、Dex 组、Dex+Ato 组排除单一成分干扰, 其中 Dex(1.0 μ M)、Ato(0.1 μ M), 经 MDC 探针孵育。在荧光显微镜下, 细胞质中呈现绿色点状或囊泡状的荧光信号即为自噬体或自噬溶酶体, 结果表明 Ato 可促进细胞自噬。

注: 图片引自《Atorvastatin Upregulates microRNA-186 and Inhibits the TLR4-Mediated MAPKs/NF- κ B Pathway to Relieve Steroid-Induced Avascular Necrosis of the Femoral Head. Front Pharmacol》(doi:10.3389/fphar.2021.583975.)

注: MDC 是含有氨基的酸性染料, MDC 亦可标记其它酸性细胞器, 正常细胞存在基础背景荧光, 结果分析时需设对照。



常见疑问与解答：

- 问：对于贴壁细胞，胰酶消化是必须的吗？胰酶消化多久算“不过度”？有没有更温和的替代方案？

答：是的，室温下 0.25% 胰酶 30-60 s 轻摇即可脱落，>2 min 易诱导应激性自噬假阳性。

a. 细胞刮刀：对于贴壁牢固的细胞，可以直接用细胞刮刀在冰上轻轻刮下，然后用缓冲液收集。此方法更温和，但可能得到一些细胞团块，需通过吹打或滤网（如 40 μm 细胞筛）制成单细胞悬液。

b. 非酶解细胞分离液：市面上有基于 EDTA 或特殊缓冲液的细胞分离液，可以不依赖蛋白酶而使细胞脱落，对细胞表面结构影响更小，是研究自噬等细胞活动时的更优选择。

- 问：细胞在染色和洗涤过程中（尤其是贴壁细胞方案）大量脱落，该如何解决？

答：通常发生在细胞状态不佳或本就贴壁不牢的情况下（如诱导自噬后）。

a. 事先加固：在接种细胞前，用多聚赖氨酸、鼠尾胶原或明胶溶液处理培养板/玻片表面，增强细胞的贴壁能力。

b. 全程轻操作：所有加液、吸液动作务必轻柔，避免液体直接冲击细胞层。洗涤时，将液体沿孔壁缓慢加入，吸液时枪头尖端避开细胞层。

- 问：MDC 染色时间（10-60 min）应该如何精确选择？

答：这是一个需要优化的参数。时间过短可能导致信号弱，时间过长则可能增加非特异性染色和背景。建议做法：在正式实验前，先用阳性对照细胞（EBSS 饥饿处理）做一个时间梯度实验（如 30, 45, 60, 90, 120 min 设置 5-6 个时间点梯度），通过显微镜观察或流式检测，选择信噪比最高（即阳性信号最强，背景最低）的时间点作为后续实验的标准染色时间。

- 问：为什么流式细胞术方案中只洗涤 1 次，而显微镜方案要洗涤 3 次？

答：显微镜：是直接成像，任何残留的游离染料都会在视野中形成均匀的背景荧光，严重干扰对点状自噬体信号的观察。因此需要严格洗涤（3 次）以最大化信噪比。

流式细胞仪：检测的是单个细胞通过激光时产生的瞬时荧光信号。仪器可以通过阈值设定，排除掉大部分游离染料颗粒（其大小和复杂度与细胞不同）。因此，1 次洗涤通常足以去除大部分背景，同时能更好地保留已结合的 MDC 荧光信号，操作也更快捷。

- 问：流式上机前，用 500 μL 组分 C 重悬，这个体积是固定的吗？

答：不是固定的。这个体积的目的是获得一个适合上机检测的细胞浓度。

a. 浓度过低：会导致上机时间过长，数据统计量不足。

b. 浓度过高：容易造成细胞堵塞流式管路，且细胞重叠率增加，影响数据准确性。

c. 建议：最终重悬后的细胞浓度应在 $2-5 \times 10^5$ cells/mL 左右。因此，如果起始细胞量是 1×10^5 个，用 500 μL 重悬是合适的（即 2×10^5 cells/mL）。如果细胞量多，可相应增加重悬体积。

- 问：MDC 染完能固定吗？

答：不建议用醛类固定，会淬灭荧光。MDC 是与自噬体膜脂质弱结合的疏水探针，醛类固定剂会使膜蛋白交联、脂质重排，导致染料被“挤”出来，荧光强度下降 30-70%。

a. 固定后再做通透（TritonX-100 等），信号几乎消失。

b. 固定液 pH 与渗透压不当，还会造成自噬泡肿胀或破裂，形态失真。

c. 若必须固定，建议 2-4% 多聚甲醛（PFA），PBS 配制，pH 7.2-7.4；室温固定 ≤ 15 min；固定后立即 PBS 清洗 3 次，减少游离醛残留。

d. 注意：固定完尽快（1 h 内）上机或拍照，避免继续淬灭。

- 问：染色结果过强或过弱，可能是什么原因？如何调整？

答：染色过强通常是由于 MDC 染色时间过长，导致染料非特异性结合细胞内酸性结构（如溶酶体）。可适当缩短染色时间，并严格控制孵育时间，避免超时。染色过弱则可能由染色时间不足、MDC 染色液因光照或存放过久发生淬灭（MDC 对光极敏感，易分解）引起。可适当延长染色时间；染色液需现配现用，配制和存放时全程避光；若试剂盒存放超过保质期或出现颜色变化，建议更换新试剂盒。

- 问：阴性对照染色强度高，背景干扰大，该如何排查？

答：阴性对照染色强度高可能与操作步骤不规范（如洗涤次数不足、染色时间过长）或阳性对照设置不当有关。建议严格遵循洗涤步骤，确保 MDC 染色后至少洗涤 3 次或更多，以彻底清除残留染料。同时，核对检测仪器参数，确保激发波长应设置为 335 nm（允许误差范围 ± 10 nm），发射波长应设置为 512 nm（允许误差范围 ± 10 nm），若仪器无 335 nm 激发选项，可选择 355 nm 作为替代，但需注意背景可能略有升高；并设置阳性对照（如经 EBSS 诱导 30 min-4 h 的细胞）和空白对照，通过对比验证阴性对照的可靠性。



- 问：没有观察到预期的荧光，可能是什么原因？如何解决？

答：未观察到预期荧光可能与操作步骤错误、激发光设置不正确或阳性对照设置不当有关。建议仔细核对并确保激发光波长正确，严格按照操作步骤执行实验，并确认阳性对照的设置是否合理（如使用 EBSS 诱导的细胞）。

