

Cell Analyze™ Autophagy/Cytotoxicity Dual-Color Assay Kits(MDC/PI)

10 min 零转染 一步法 双重检测细胞自噬、细胞毒性

产品货号: C21003

产品规格: 100 T, 10×100 T

储运条件: 组分 A、D 在-20 °C长期避光保存, 避免反复冻融, 组分 B、C 在 4 °C保存, 冰袋运输

产品简介:

Cell Analyze™ Autophagy/Cytotoxicity Dual-Color Assay Kits (MDC/PI)试剂盒, 为细胞水平研究自噬与细胞毒性的调控机制提供便捷工具。该试剂盒以单丹磺酰尸胺(MDC)作为自噬检测探针, 以碘化丙啶(PI)作为细胞死亡标志物, 可实现两种指标的同步分析。

自噬是细胞重要的生理过程, 具体是指细胞借助溶酶体对自身内部成分(如细胞器、蛋白质等)进行降解与消化。这一过程不仅能帮助细胞高效调动、循环利用自身组分, 还可阻止受损细胞器、错误折叠蛋白质及入侵微生物在细胞内积累。自噬的发生需经历多步反应: 首先, 细胞质中的待降解成分会被双层膜结构包裹, 形成自噬体; 随后, 自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 内部的细胞物质最终在自噬溶酶体内完成降解。

在检测原理方面, MDC作为一种荧光化合物, 可通过离子捕获机制与膜脂质相互作用, 特异性富集到自噬体中, 呈现绿色荧光, 从而实现自噬的可视化检测。同时, 试剂盒中的PI可用于细胞毒性分析, PI能对坏死细胞及凋亡晚期膜完整性受损的细胞进行染色, 使这类细胞呈现红色荧光。需注意的是, MDC也可能标记其他酸性细胞器, 且正常细胞会存在基础背景荧光, 因此在结果分析时需设置对照组以确保准确性。

正常的自噬对细胞存活、分化、发育及内环境稳态至关重要, 而自噬调控异常则与癌症、感染性疾病、衰老及退行性疾病密切相关。值得关注的是, 自噬在应对应激时通常发挥促进细胞存活的作用, 但在特定条件下也可能诱导细胞死亡; 且自噬与细胞凋亡的关系十分复杂, 二者不仅拥有共同的刺激因素和组成成分, 还能相互调控彼此的活性。因此, 深入研究细胞选择自噬或凋亡途径的具体影响因素及调控机制, 具有重要的科研意义。

注: 效能等同Abcam Autophagy/Cytotoxicity Dual Staining试剂盒(ab133075)。

应用范围: 药物、营养素、缺氧、氧化应激等条件对细胞自噬及细胞毒性的分析

产品特点:

- **同步双检:** 一次实验即可检测细胞自噬与细胞毒性, 便于探究二者关联;
- **多设备适配:** 染色后可经荧光显微镜实时观察形态, 或用酶标仪、流式细胞仪定量分析, 满足不同检测需求;
- **真实性:** MDC对细胞毒性较低, 能更接近生理状态下的自噬水平, 避免固定或透化处理对细胞结构的破坏;
- **实验快速:** 无需复杂预处理, 10 min 染色流程简单, 节省实验时间;
- **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;
- **结果直观:** 荧光颜色区分明确, 易观察, 且支持量化分析, 数据清晰易解读。

产品参数

- MDC Stain Ex/Em: 335/512 nm;
- PI Ex/Em: 493/636 nm(without DNA);
- PI Ex/Em: 535/617 nm(with DNA)。



产品组分：

组分	100 T	10×100 T
A. 10× MDC Stain	1 mL	10×1 mL
B. Stain Buffer	50 mL	10×50 mL
C. Wash Buffer	100 mL	10×100 mL
D. PI	500 μL	10×500 μL

注：100 T 为试剂盒组分 A(10× MDC Stain)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：

- 荧光染料易受光照影响而淬灭，请务必避光操作，以保持染料稳定性。
- 染料对人体有一定危害，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。
- 操作过程中需尽量注意避光，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)、组分D (PI)从储存条件(如-20 °C/4 °C)取出，平衡至室温(15-25 °C)，准备足量PBS缓冲液。

2. 仪器准备：

- 荧光显微镜：MDC检测选择紫外激发滤光片330-350 nm；发射波长510-530 nm，发出绿色荧光；PI和DNA结合形成复合物后最大激发波长为535 nm；最大发射波长617 nm。

3. 对照组设置：

组别	MDC	PI	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 孵育 30 min 至 4 h 并设置时间梯度，以确定最佳诱导时间。
- 实验组：根据实验设计，提前对细胞进行相应的处理（如药物、饥饿处理等）。

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、HEK 293）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. 细胞处理：

- （1）按照所需的实验设计处理细胞。

2. 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. 细胞重悬与计数:

(1) 加入适量组分 C (Wash Buffer)重悬并细胞计数。

(2) 取 5×10^4 - 10^5 个细胞, 1000 rpm 低速离心 5 min, 去除组分 C。

(3) 使用 100 μ L 组分 B (Stain Buffer)重悬。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。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约 70%-85% 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。

4. 细胞染色:

(1) 按组分 A (10 $\times$ MDC Stain) : 组分 B (Stain Buffer) : 组分 D (PI)=2 : 17 : 1 的比例配置 MDC/PI 染色工作液, 将染色液加入到细胞中 (现用现配、避光配置)。工作液配制见表 1。

表 1. MDC/PI 染色工作液配制

(按照 96 孔板每孔 100 μ L 染色工作液体系, 参考下表配制 MDC/PI 染色工作液, 并充分混匀)

反应组分	1 Sample	5 Samples
A. 10 $\times$ MDC Stain	10 μ L	50 μ L
B. Stain Buffer	85 μ L	425 μ L
D. PI	5 μ L	25 μ L
总体积	100 μ L	500 μ L

注: 表 1. (配制反应混合物体积可按该比例根据具体情况而定)

(2) 向每孔加入 100 μ L MDC/PI 染色工作液后, 在 37 $^{\circ}$ C 避光条件下孵育 15 min。其中, 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。

5. 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 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。

6. 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)。

注: 细胞悬液使用量可以根据细胞计数的数量自行调整, 显微镜视野中细胞分布 70%-85% 为最佳。

注: 染色完成后必须立即对样品进行分析。建议先检测 MDC 染色情况, 再检测 PI 染色情况, 以避免 MDC 荧光在分析过程中耗竭。

方案二: 荧光显微镜检测 (适用于贴壁细胞)

1. 细胞处理:

(1) 提前一天在孔板中接种细胞, 使得细胞汇合度达到 70%-85%, 待细胞贴壁后按照实验设计处理细胞。

2. 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。

3. 制备染色工作液:

(1) 根据样品孔数, 按分 A (10 $\times$ MDC Stain) : 组分 B (Stain Buffer) : 组分 D (PI)=2 : 17 : 1 的比例, 提前在避光条件下配制 MDC/PI 染色工作液 (现用现配), 将染色液加入到细胞中。工作液配制见上表 1。

4. 细胞染色:



- 向各孔中加入对应体积的MDC/PI 染色工作液（体积同步步骤1，例如：96孔板加100 μL /孔，48孔板加150 μL /孔，24孔板加250 μL /孔，12孔板加500 μL /孔，6孔板加1 mL/孔）。
- 向每孔加入100 μL MDC/PI染色工作液后，在37 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下，孵育15 min。其中，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。

5. 洗涤：

- 孵育结束后，吸弃各孔中的染色工作液。
- 按步骤1的体积，加入组分C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。

6. 显微镜观察与拍照：

- 末次洗涤后，每孔加入对应体积的组分C，以保持细胞湿润。
- 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。

注：染色完成后必须立即对样品进行分析。建议先检测 MDC 染色情况，再检测 PI 染色情况，以避免 MDC 荧光在分析过程中耗尽。

三、结果判读：

● 定性分析（显微镜）：

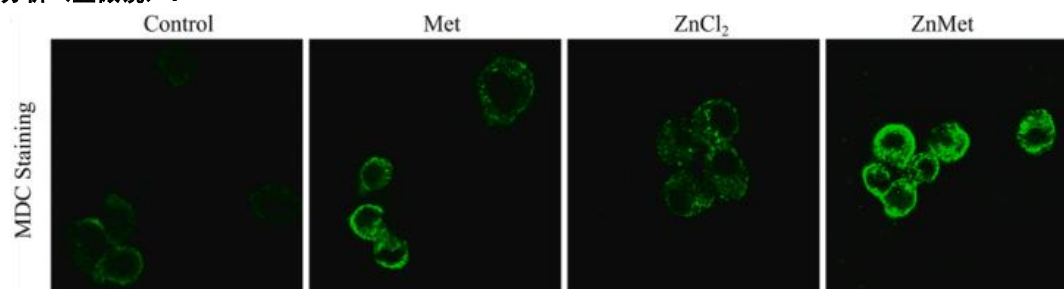


图 1.MDC 染色效果图

- 检测 ZnMet 是否能诱导成纤维细胞产生更多自噬体，设置空白对照组、Met 组、ZnCl₂ 组、ZnMet 组排除单一成分干扰。经 MDC 探针孵育并通过 Nikon confocal A1R 采集荧光成像。结果表明 ZnMet 可激活自噬通路。

注：图片引自《A novel sprayable thermosensitive hydrogel coupled with zinc modified metformin promotes the healing of skin wound. Bioact Mater.》(doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.06.008.)

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

● 结果判读（推荐）

细胞状态	自噬探针荧光（MDC，绿色）	细胞毒性探针荧光（PI，红色）	结果说明
正常活细胞	弱荧光/无荧光	无荧光	自噬水平低，细胞膜完整
自噬激活活细胞	强荧光（自噬体点状分布）	无荧光	自噬水平高，细胞存活
濒死/死细胞	弱荧光/无荧光	强荧光（胞质弥漫分布）	细胞膜受损，细胞毒性阳性
自噬激活濒死细胞	强荧光	红色荧光	自噬激活但细胞已受损

常见疑问与解答：

- 问：染色后大量贴壁细胞脱落，该如何解决？

答：对贴壁能力弱的细胞，提前用多聚赖氨酸、鼠尾胶原或明胶预处理培养板，增强细胞与培养板的吸附力。操作时轻柔加样，避免直接冲击细胞层；洗涤时缓慢倾斜培养板，沿壁加入洗涤液，减少液体流动对细胞的扰动。

- 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）做一个预实验如 30 min，再根据预实验结果调整染色时间在 10-60 min 范围内。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。

● 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，确保激发波长为350-380 nm，发射波长为512-532 nm；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）。

● 问：MDC和PI染色荧光强度均较低，可能是什么原因？

答：可能的原因是细胞密度过低；细胞在处理过程中丢失。

