上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co.， Ltd
电话：400-666-5481　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：3008007435@qq.com

自噬检测试剂盒（荧光显微镜，MDC法）

货号：R41166

规格：100T

储存条件：2-8℃，12个月

产品简介：

细胞自噬（autophagy）是细胞受到刺激后吞噬自身的细胞质或细胞器，最终将吞噬物在溶酶体内降解的过程。自噬体（autophagosome）为双层膜包被的圆形或椭圆形结构，内含细胞质、长寿蛋白质和异常蛋白聚集物，损伤或多余细胞器如线粒体、粗面内质网和微体、病毒和细菌等。

单丹磺酰尸胺（monodansylcadaverin, MDC）是一种荧光色素，其检测激发滤光片波长 355 nm。阻断滤光片波长 512 nm。MDC 是一种嗜酸性染色剂，通常被用作检测自噬体形成的特异性标记染色剂。

产品组成：

组分	R41166-100T	储存条件
MDC 染液	1 mL	2-8℃ , 避光
10×Wash Buffer	15 mL	2-8℃
Collection buffer	10 mL	

注：

1. 100 tests 针对 24 孔细胞爬片（荧光显微镜观察），如果您通过荧光酶标仪读数检测结果，本试剂盒可以做 30~50tests。

2. 10×Wash Buffer 需以去离子水稀释至 1×Wash Buffer 后，再使用。

试剂盒以外自备仪器和试剂

荧光显微镜、低速离心机、微量移液器、1.5 mL Micro-tube、载玻片、盖玻片、EB（自备、选做）

注意事项：

MDC 染液有毒，操作时请戴手套。

操作步骤：

悬浮细胞

1．800g，5 min 离心收集细胞，加入 300 μL 1×Wash Buffer 洗一次，加适量的 1×Wash Buffer 重悬，调节细胞浓度约为 10^6/ mL。

2．吸取 90 μL 的细胞悬液至新的管中，加入 10 μL 的 MDC 染液，轻轻混匀。

3．室温避光染色 15~45 min 后，800g，5 min 离心收集细胞，1×Wash Buffer，300 μL 洗三次，再以100 μL 的 Collection buffer 重悬。

4．将重悬液滴加于载玻片上，加盖玻片。

5．荧光显微镜，激发滤光片波长 355 nm。阻断滤光片波长 512 nm 观察，计数、拍照。

贴壁细胞

1．贴壁细胞于 24 孔板内爬片至所需要的汇合度，弃去培养液，加入 300 μL 1×Wash Buffer 洗二次。

2．以 1×Wash Buffer：MDC 染色液体积比=9:1 稀释染色液至工作浓度，计算一次实验所需要的染色液体积，配制 MDC 染色工作液，轻轻混匀。

3．每孔加入 100 μL MDC 染色工作液，室温避光染色 15~45 min 后，弃去染色液，以 1×WashBuffer，300 μL 洗三次，再以 100 μL 的 Collection buffer 覆盖细胞爬片，荧光显微镜，激发滤光片波长355 nm。阻断滤光片波长 512 nm 观察，计数、拍照。（注意：此步骤在 1×Wash Buffer 洗涤完成之后以防淬灭封片剂封片后在荧光显微镜下检测）。

4．与 EB 双染（选做步骤）

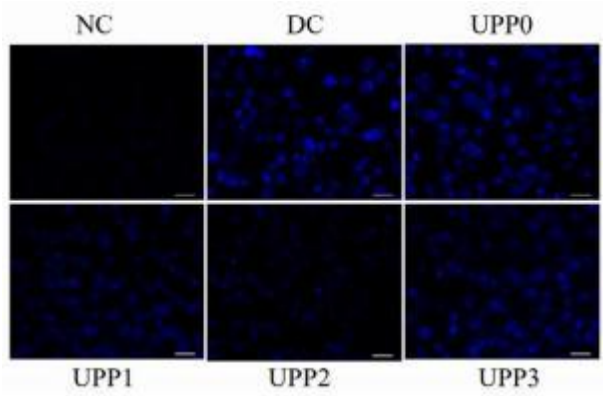
(1) 收集细胞，1×Buffer A 洗一次，加适量的 1×Buffer A 重悬，调整细胞浓度约为 10^6/ mL。

(2) 吸取 90 μL 的细胞悬液，加入 EB 染料（0.2μM）和 MDC 染液各 10 μL，轻轻混匀；（EB：Ex-530 nm，Em-590 nm）。

(3) 滴加于载玻片上，室温避光染色 15~30 min 后，加盖玻片。

(4) 荧光显微镜，滤光片 512 nm 观察，计数、拍照。

实验范例：



例图 1 UPPs 修复受损 HK-2 细胞前后，细胞内自噬活性的变化图

图片来源：Chen XW, Zheng YY, Ouyang JM. Sulfated Undaria pinnatifida Polysaccharide Promotes Endocytosis of Nano-Calcium Oxalate Dihydrate by Repairing Subcellular Organelles in HK-2 Cells. Antioxidants(Basel). 2023 Apr 28;12(5):1015. doi: 10.3390/antiox12051015. PMID: 37237881; PMCID: PMC10215875.