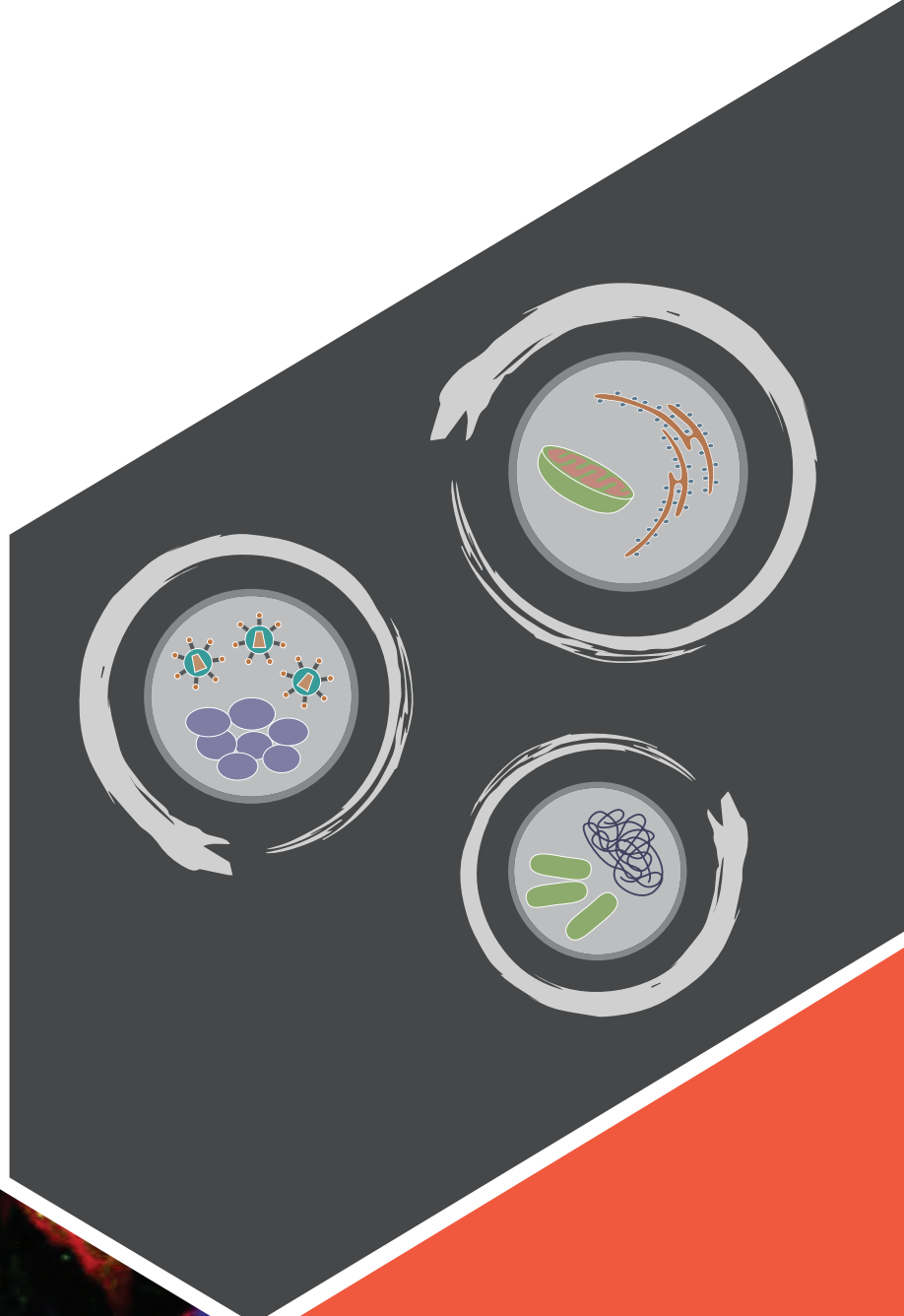
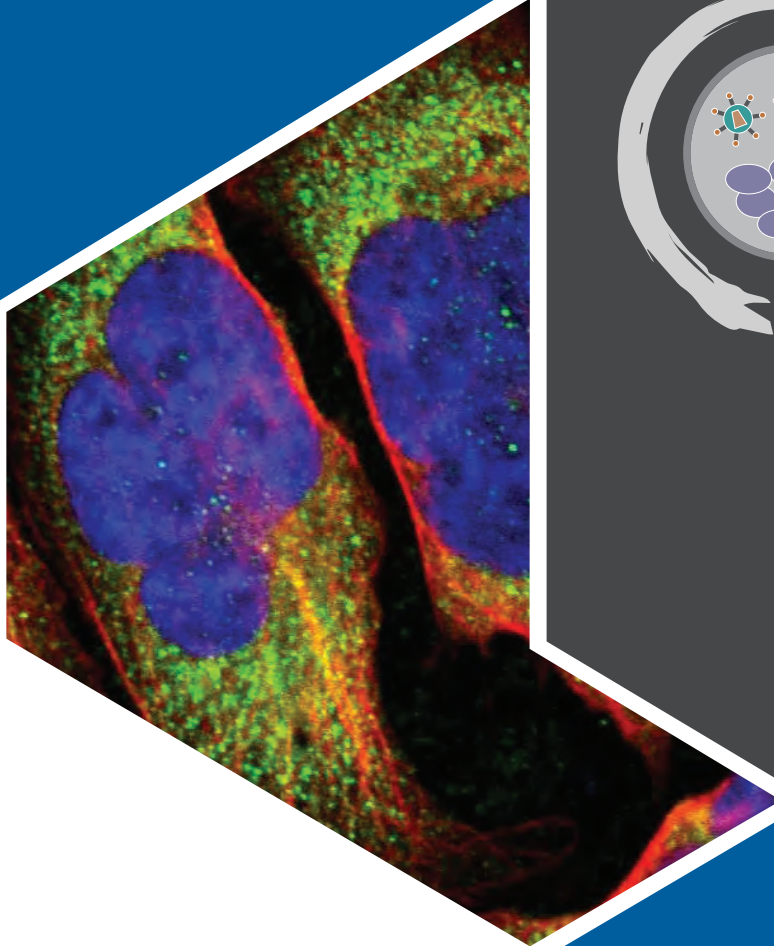
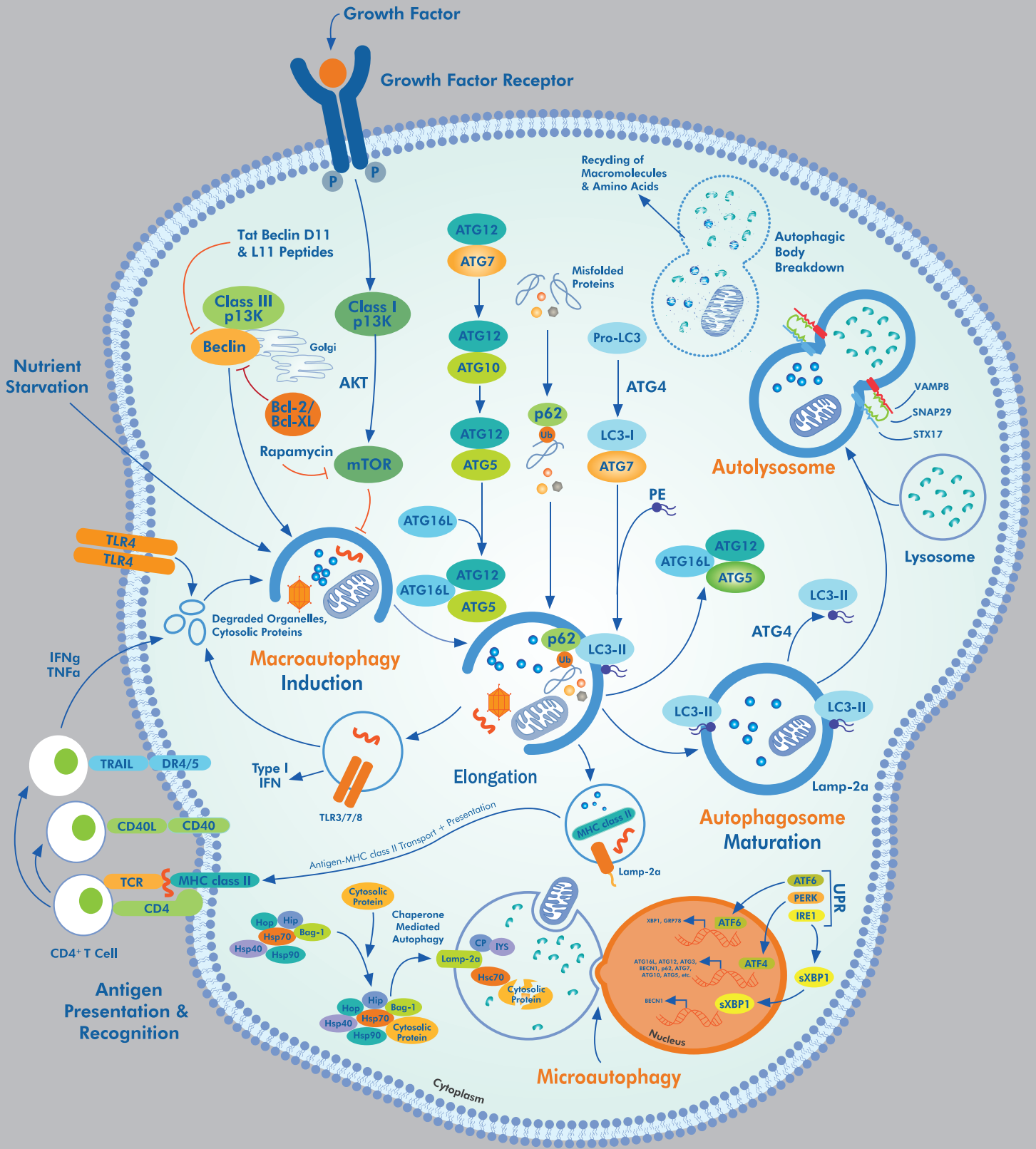


# 自噬手冊





The term "Autophagy" is derived from the Greek word αὐτόφαγος autóphagos that means "self-devouring"

# 目录

---

1	<b>前言</b>
2	<b>自噬类型</b> 巨自噬，微自噬和分子伴侣介导的自噬
3-4	<b>选择性自噬</b> 选择性自噬受体的类型 LC3异构体
5-6	<b>自噬机制和自噬流</b> 蛋白质在自噬中扮演的关键角色
7-14	<b>自噬的检测</b> 稳态分析:自噬小体数量 方案:LC3免疫细胞化学 (ICC/IF) 检测自噬小体的数量 自噬流监测 方案:Western Blot检测LC3 - II转变实验
14-16	<b>研究自噬的其他靶点</b> 自噬相关的p62/SQSTM1- 结构域 p62/SQSTM1定量要点 监测自噬流的其他推荐靶点 监测自噬流的其他方法
17	<b>Simple Western检测自噬靶点</b> Bio-technie:精选经验证的适用于Simple Western的自噬抗体
18-19	<b>自噬调节分子</b> 小分子调节 特定自噬的诱导:Tat-Beclin肽
20-21	<b>自噬的细胞核水平控制</b> 调节自噬的转录机制 自噬的表观遗传调控
22	<b>ACD RNAscope®技术</b> 通过原位杂交技术级联放大信号
23-24	<b>精选参考文献，缩略语</b>

# 前言

自噬是一种保守的细胞过程，它是将大分子和细胞器转运至溶酶体，使其降解和回收再利用的过程。这一过程的目标是消除过量或有缺陷的细胞器以及聚集的衰老蛋白。在水解之后，基本的分子原件被回收到细胞质中，作为细胞的组成材料或能量来源。因此，自噬在细胞内稳态机制中起着关键作用，控制着细胞的可用资源和能源消耗之间的平衡。包括营养剥夺、缺氧和内质网应激在内的几个细胞应激源可诱导细胞的自噬高于基础水平。此外，自噬调控异常与神经退行性疾病、癌症等疾病相关。

## Cytosolic Processing

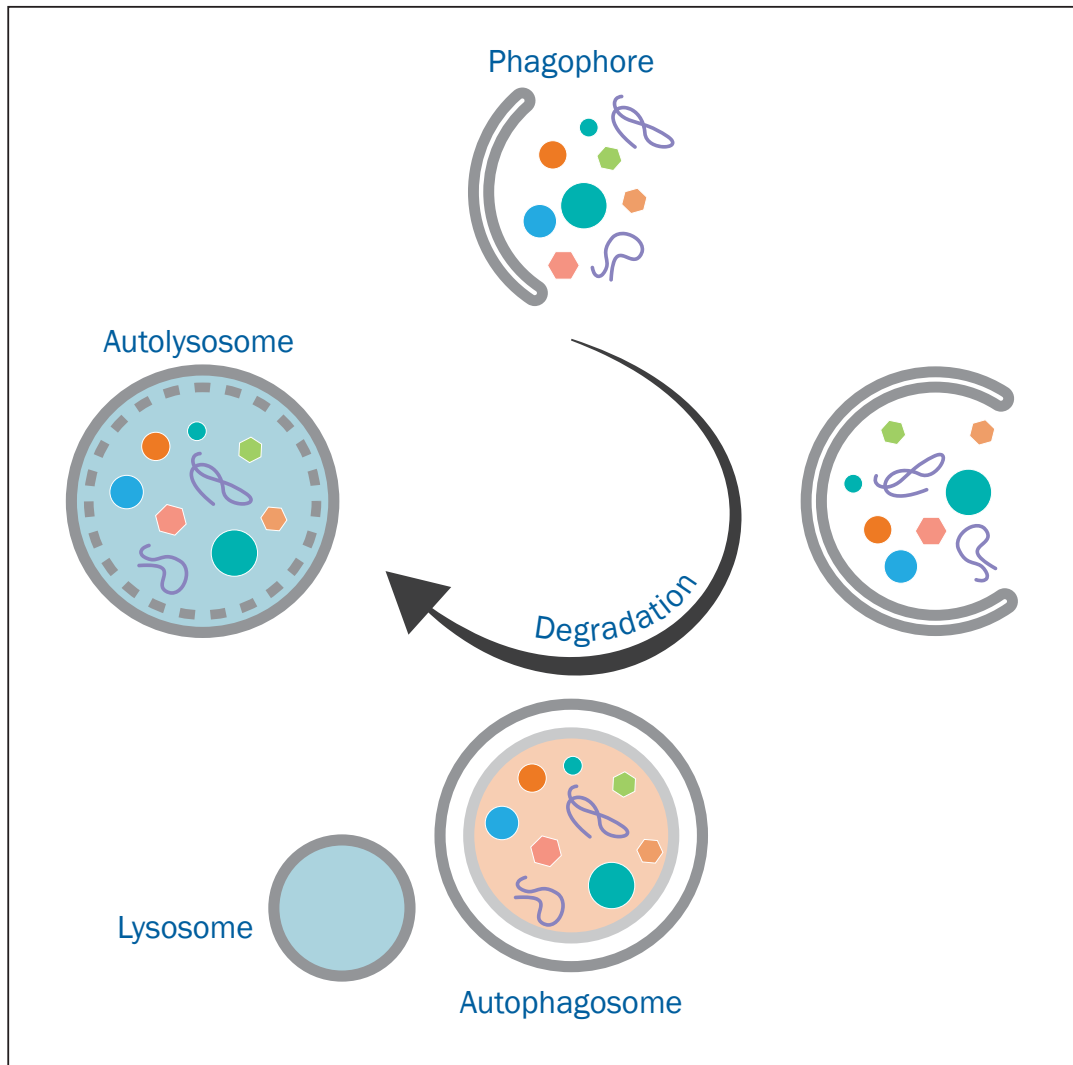


图1:自噬依赖于双膜细胞器或自噬小体的形成。在诱导后，初始的。与溶酶体融合产生自噬溶酶体，并于此降解底物。

本指南概述自噬的过程，介绍自噬过程中涉及的主要分子和调控途径。并着重提供经验证的标准方法对自噬活动进行量化，从而为研究人员提供基本工具，实现在特定系统的自噬测量最优化。

# 自噬的类型

公认的自噬类型有三种，包括巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬。在所有这些过程中，胞质组分都是到达溶酶体降解，只是不同自噬类型在传递机制有所差异。

## 自噬机制

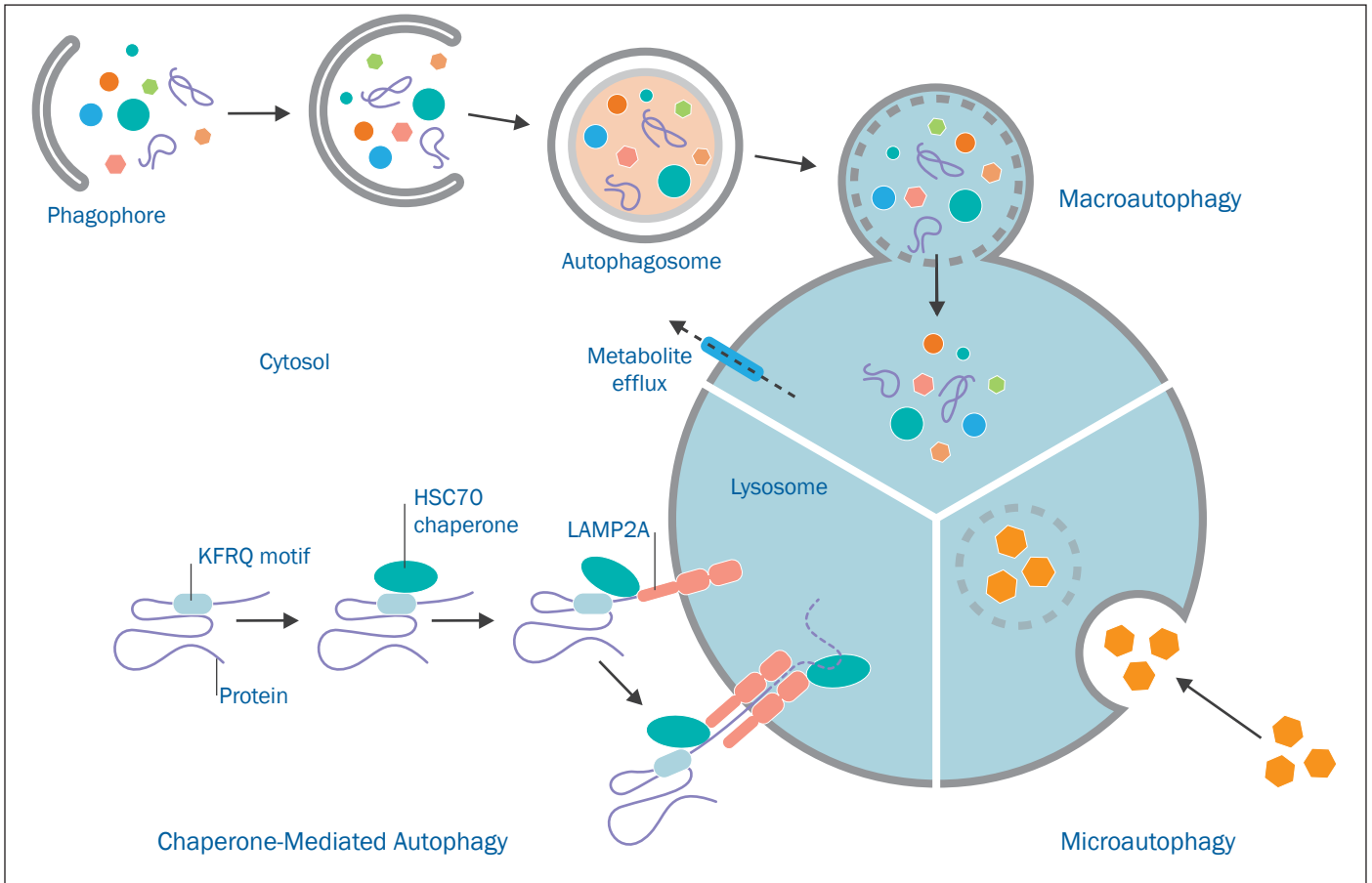


图2: 自噬的三种主要类型是巨自噬，微自噬和分子伴侣介导的自噬。自噬小体仅在巨自噬过程中参与胞质成分的降解。

- **巨自噬** 胞质成分被隔离在双膜细胞器或自噬小体内。自噬小体与溶酶体的融合形成了自噬溶酶体，并降解底物。本指南主要关注的是巨自噬的过程(以下简称自噬)。
- **微自噬** 溶酶体通过溶酶体膜的内陷直接吞噬胞质成分。
- **分子伴侣介导的自噬** 伴侣蛋白(如热休克同源蛋白70 : HSC-70)与胞质蛋白相互作用使其降解。这个复合物被溶酶体相关膜蛋白2A (LAMP - 2A)识别，使得未折叠的细胞质蛋白转移进入溶酶体。

# 选择性自噬

胞质成分会被成批降解或选择性自噬靶向降解，哺乳动物的选择性自噬依赖于两种主要成分：选择性自噬受体和脂化LC3(微管相关蛋白轻链3)蛋白。它们的相互作用使得不同细胞成分发生特异性降解，这些细胞成分包括线粒体、内质网、聚集蛋白和核糖体等。

## 选择性自噬受体的类型

选择性自噬通路被广泛地归类为非泛素依赖或泛素依赖两种类型，并涉及到衔接蛋白或选择性自噬受体，直接或通过泛素与细胞靶点相互作用。

- **泛素依赖性自噬**：选择性自噬受体通过泛素结合域(UBD)与泛素化的分子相互作用。这种选择性自噬通路与泛素-蛋白酶体系统相互作用，以消除蛋白聚集物。许多其他细胞成分通过这些受体被靶向降解。影响与分子相互作用的受体特异性的因素尚未完全阐明。值得注意的是受体的选择性有很大部分的重叠。
- **非泛素依赖性自噬**：受体直接将各种分子和细胞器作为靶标，包括蛋白质、脂类、过氧化物酶体和溶酶体，以及许多其他细胞成分。

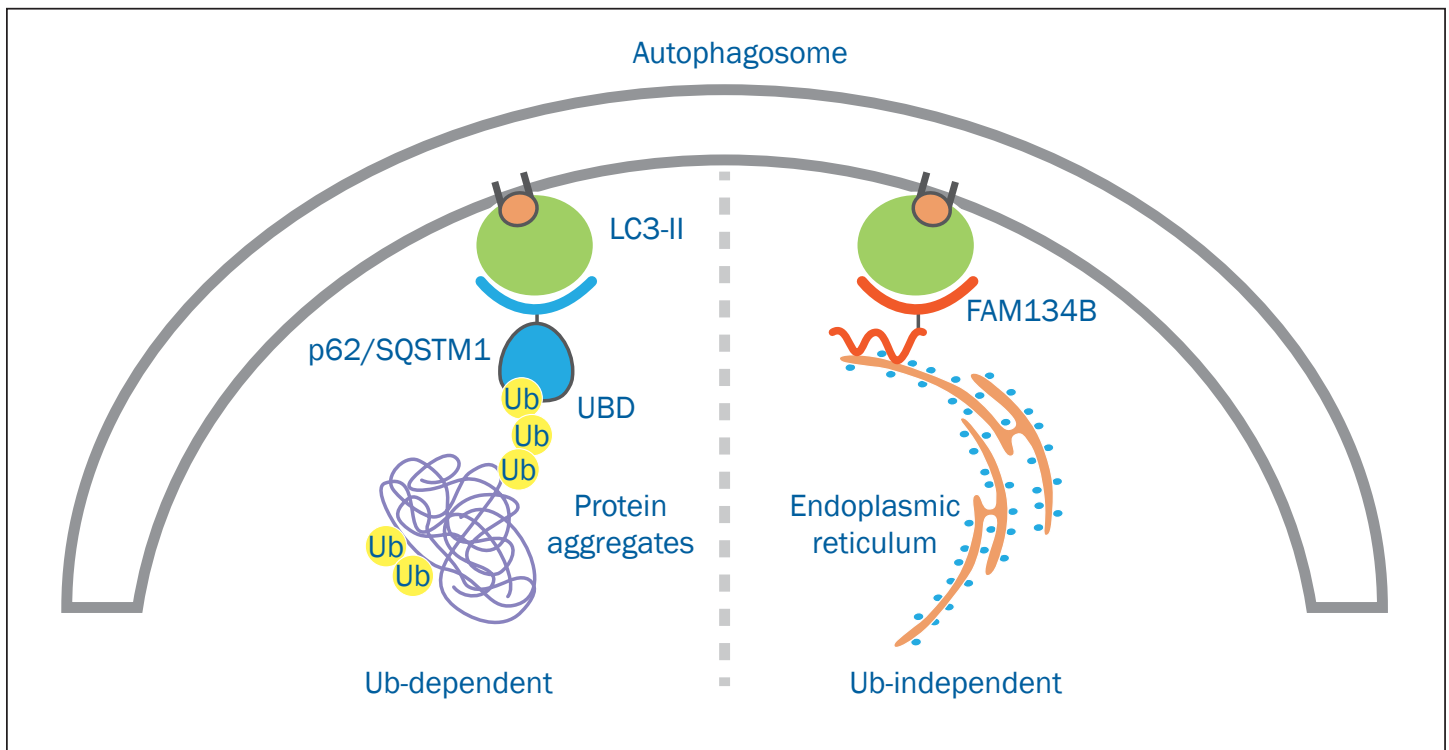


图3: 选择性自噬受体包含一个LC3交互区域(LIR motif)，用于与LC3家族成员结合。它们通过具有泛素依赖性或非依赖性的第二个结合基序与细胞分子相互作用。

# 选择性自噬受体

胞质内物质	泛素依赖	非泛素依赖
线粒体	OPTN, NDP52, TAX1BP1, p62	NIX, BNIP3, FUNDC1, ATG32
蛋白聚集体	p62, NBR1, OPTN TOLLIP, Cue5	OPTN
过氧化物酶体	NBR1, p62	ATG30, ATG36
细菌	p62, OPTN, NDP52, TAX1BP1	Galectin-8/NDP52
RNA颗粒	NDP52, p62	
蛋白酶体	RPN10	
内质网		FAM134B, ATG40
病毒		TRIM5 $\alpha$ , SMURF1, p62
核膜		ATG39

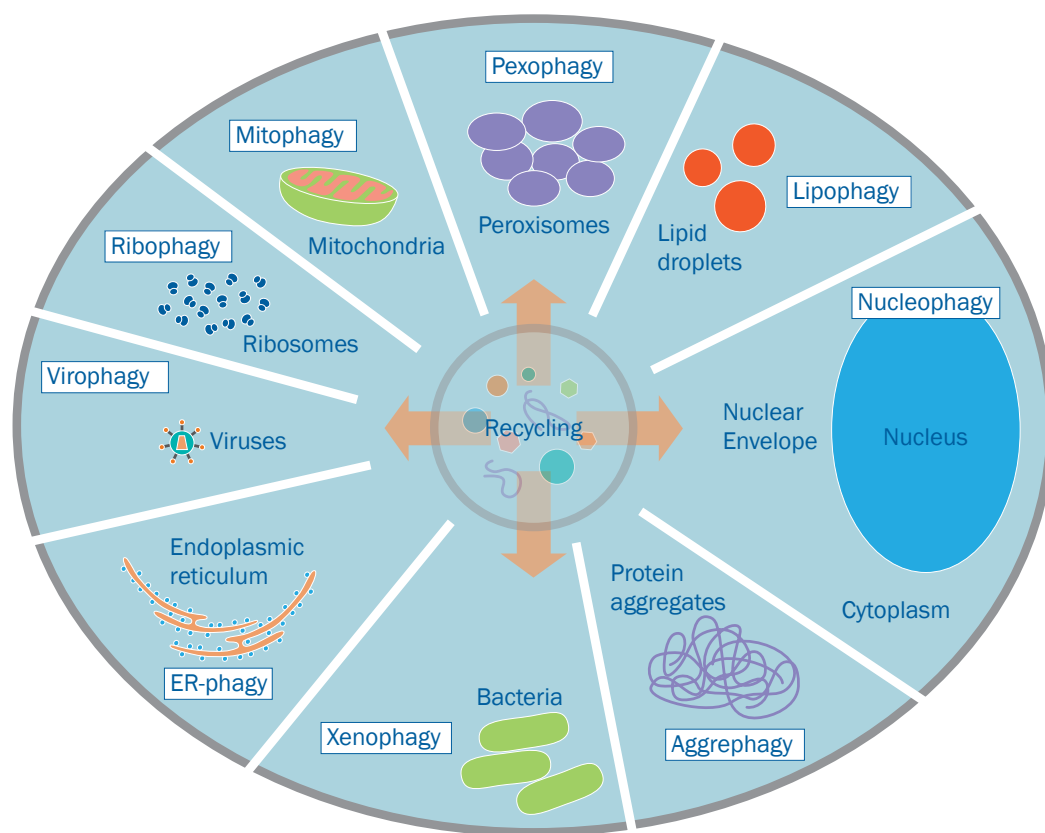


图4: 自噬可能通过多种或某一选择性机制发生。选择性自噬通路的命名是基于靶向降解的分子类型。

## LC3异构体

在哺乳动物中，已经发现了多个LC3家族成员，它们属于两个主要亚家族，LC3和GABARAP。不同的异构体在选择性自噬中可发挥特殊的作用。

## LC3和GABARAP家族成员

亚家族	异构体
LC3	MAP1LC3A, MAP1LC3B, MAP1LC3B2, MAP1LC3C
GABARAP	GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2, GABARAPL3*

异构体有29 - 94%的序列相同。\*只有亚家族成员未参与自噬小体的形成。

# 自噬的机制和自噬流

在酵母中，自噬过程共有31种自噬相关蛋白(ATG)的参与调节，许多自噬相关蛋白在哺乳动物中都是保守的。每个自噬相关蛋白都在自噬的动态过程中发挥着特定的作用。

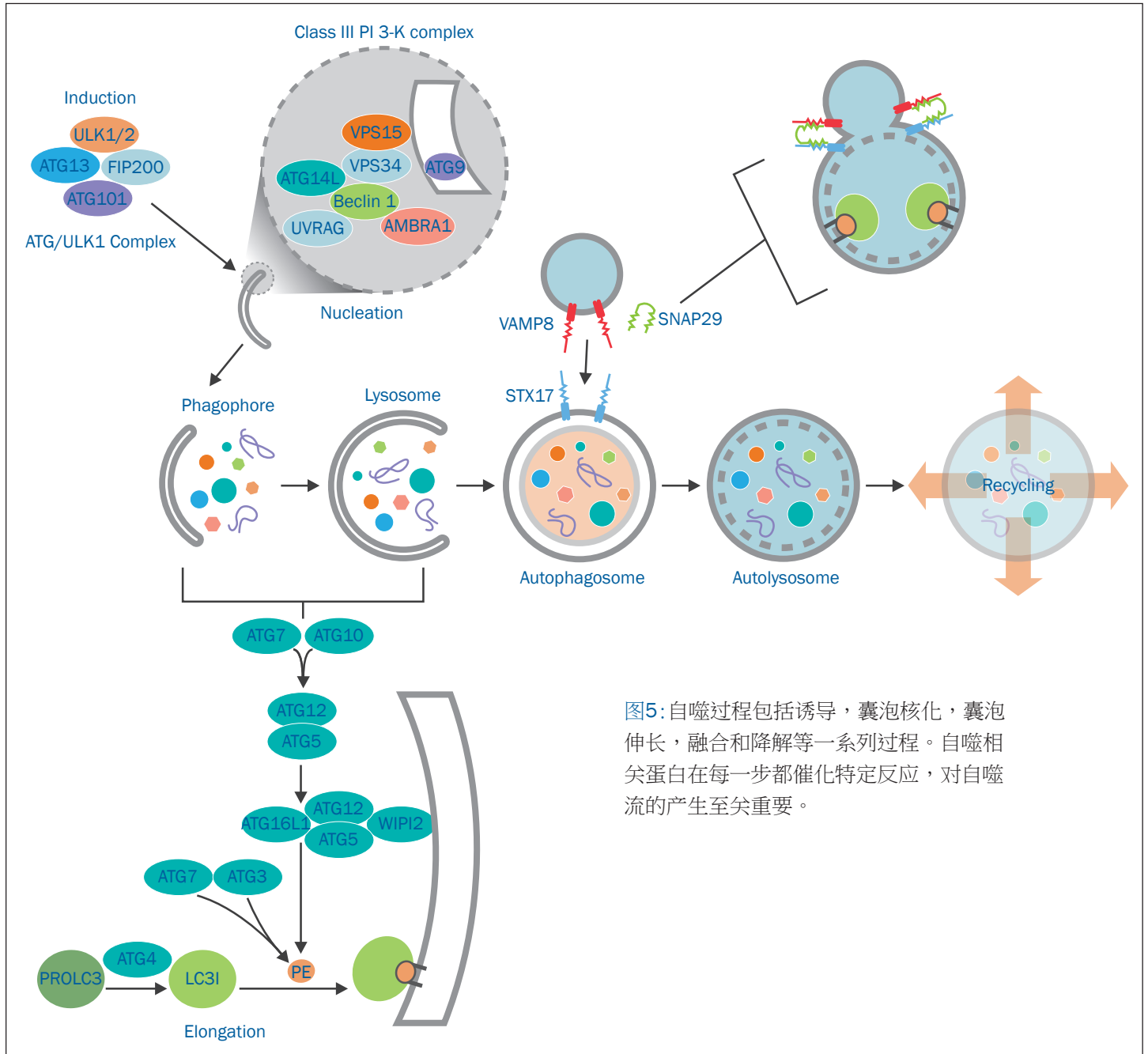


图5:自噬过程包括诱导,囊泡核化,囊泡伸长,融合和降解等一系列过程。自噬相关蛋白在每一步都催化特定反应,对自噬流的产生至关重要。

- **诱导:**在自噬研究中,饥饿或营养缺乏是应用最多的诱导方法。对饥饿诱导的自噬通常依赖于mTOR激酶(哺乳动物雷帕霉素靶蛋白)的抑制,这是营养信号的关键调控器。在mTOR抑制中,包括ULK1(unc-51样激酶-1)、ATG13和RB1CC1(RB1-卷曲螺旋-1)在内的蛋白质复合物的磷酸化同时减少,增加了ULK1的活性并诱导自噬。



# 自噬的机制和自噬流

- **成核和吞噬泡形成:**新生的吞噬泡膜起源于高尔基体、内质网、线粒体或核内体。原始吞噬细胞器或吞噬泡的形成依赖于从抑制因子**bcl-2**中释放的**Beclin1**和**AMBRA1**(激活存在于**BECN1**调控的自噬蛋白1中的分子)。从抑制中释放得以形成的**PtdIns3K**复合物(III类磷脂酰肌醇-3激酶),包括**ATG14**、**VPS15**和**VPS34**(空泡分选蛋白)。这种复合物产生**磷脂酰肌醇-3-磷酸**,并促进**ATG**蛋白的招募进入新生膜。
- **延伸, 自噬小体形成:**两种泛素样共轭复合体的激活促进囊泡延伸。在第一个复合物中, **ATG7**和**ATG10**参与了**ATG12**与**ATG5**的共价结合。**ATG12 / ATG5**的共价结合复合物与**ATG16 (ATG16样-1)**的相互作用可以促进第二个泛素样共轭复合体的形成。在第二种复合物中, **ATG4**、**ATG7**和**ATG3**参与到可溶性**LC3**转化为脂质共轭体**LC3-II**的过程。**LC3**是与吞噬泡膜相关的**磷脂酰乙醇胺基脂类**。概括起来说, 这两个泛素样的共轭复合体参与了自噬小体的形成。在延伸期结束时, 吞噬泡膜已经扩张并闭合, 完成了胞内成分的隔离。所有的自噬相关蛋白脱离自噬小体并返回细胞质。只有脂化的 **LC3** 是唯一的被认为与自噬小体膜有关的自噬相关蛋白。
- **融合和降解:**饥饿时, **SNARE**蛋白**STX17**(突触融合蛋白-17)位于自噬小体上。**STX17**与**SNAP29**和溶酶体的**VAMP8**相互作用使自噬小体与溶酶体融合, 形成成熟的水解细胞器。融合之后, 质子泵和水解酶被释放进入自噬小中, 形成自噬溶酶体, 使细胞内容物酸化和水解。

## 相关蛋白在自噬中的关键作用

自噬相关蛋白	在自噬中的作用
ULK-1复合物	磷酸化减少, 激活 <b>ULK1, ULK2, ATG13, ATG101</b> 和 <b>FIP200</b> 的复合物参与诱导
第III类磷脂酰肌醇3-激酶 PtdIns3K	<b>VPS34, VPS15, AMBRA1, UVRAG, BIF1, ATG14</b> 和 <b>Beclin-1</b> 的复合物 <b>Bcl-2</b> 的位移激活 <b>VPS34</b> 复合体 参与成核
ATG9	跨膜蛋白, 只存在于吞噬泡中 参与成核
Beclin/ATG6	与 <b>Bcl-2</b> 相互作用 与 <b>GAPR-1</b> (自噬的负性调控分子)相互作用
ATG7和ATG10	<b>E1</b> 和 <b>E2</b> -样酶 参与了 <b>ATG12 - ATG5</b> 的共轭
ATG12-ATG复合物	自噬泡延长所必须
ATG4	半胱氨酸蛋白酶, 裂解 <b>LC3</b>
ATG3	<b>E2</b> -样酶, 和 <b>ATG7</b> 参与了 <b>LC3-I</b> 转变为脂化 <b>LC3-II</b> 的过程
p62/SQSTM1	被自噬优先降解的细胞内容物受体
LC3/ATG8	唯一与自噬小体膜相关的自噬相关蛋白

# 自噬的测量

自噬是一个多步骤的动态过程，这就为其定量检测带来困难。传统方法利用电子显微镜对自噬过程进行研究。自噬相关蛋白的发现和表征促进了鉴别和量化自噬活性的分子工具和方法的发展。理想情况下，应该使用组合测量方法，使用包括稳态和自噬流测定等来评估不同体系的自噬活动。

## 稳态分析实验:自噬小体数量

自噬小体的数量分析实验通常测定的是LC3蛋白。LC3存在于胞质和核室中。脂化型或LC3 - II是已知的唯一与自噬小体内膜相关的蛋白。免疫荧光(ICC/IHC/IF)和免疫印记(WB)可以检测LC3-II水平，通过它可以较好地评估自噬小体的数量。有超过500篇文献显示:我们的LC3B抗体(产品编号#NB100-2220)是被广泛信任和使用的可以检测LC3水平的抗体。

- **LC3-II 斑点实验(ICC /IHC/ IF):**该方法结合使用LC3抗体与荧光显微镜来定量检测荧光斑点，这些斑点的数量和自噬小体的数量相关。这个实验可以得知每个细胞的斑点数或有斑点的细胞数量。然而，在大多数细胞均有基础的自噬活动，因此大多数细胞将会有斑点出现。

## 方案:通过LC3免疫细胞化学实验检测自噬小体数量

### 材料

- > 1×PBS
- > 4%的多聚甲醛（新鲜配置，用PBS稀释）
- > 1×PBS，包含0.5%的Triton X-100
- > LC3一抗，包含1%正常血清或1×PBS稀释的BSA，（~5 µg/mL产品编号#NB100-2220, 1:200稀释；产品编号#NB600-1384, 1:5,000 稀释）
- > 荧光-偶联抗兔二抗:包含1%正常血清或1×PBS稀释的BSA
- > 含1-5%正常血清或1×PBS 稀释的BSA
- > 核染: DAPI或Hoechst( 1-10 µg/mL)

## 方案:通过LC3免疫细胞化学实验检测自噬小体数量

### 方法

- 01** 收集处于半汇合状态的细胞，并将其放在无菌盖玻片上。为了达到最佳的附着力，有些细胞类型可能需要使用涂层处理过的玻片(如，多聚赖氨酸)；  
**提示:**可通过酒精、火焰或暴露于紫外线辐射等方法灭菌玻片。为了便于操作和孵育，可在一个培养皿中放置几个小的圆形玻片。
- 02** 细胞生长至半汇合状态(70-75%)；  
**提示:**轻轻地将已经接种好细胞的玻片放进培养箱，以确保有足够的细胞粘附在玻片上。不要让玻片变干，并避免直接在细胞上加溶液，以减少细胞脱片。
- 03** 吸出培养皿中的培养基，在室温下用1×PBS轻轻洗涤；
- 04** 在室温下将玻片用新鲜配制的1×PBS稀释的4%多聚甲醛孵育10分钟；  
**提示:**获取更多信息，可参见免疫细胞化学手册 [novusbio.com/icc-handbook](http://novusbio.com/icc-handbook)。
- 05** 用1×PBS清洗玻片2分钟；
- 06** 室温下用1×PBS稀释的0.5% Triton X-100孵育5分钟；
- 07** 室温下1×PBS孵育5分钟，清除透膜缓冲液；
- 08** 在1-5%的正常血清或BSA(1×PBS稀释)室温下封闭1小时；
- 09** 在1%正常血清或BSA(1×PBS稀释)中稀释一抗。使用5μg/mL的兔抗LC3一抗(产品编号#NB100-2220)室温孵育玻片，(37°C最佳)或4°C孵育16小时。  
**提示:**抗体浓度的范围可以是5-20μg/mL。

# 自噬的测量

## 方案:通过LC3免疫细胞化学实验检测自噬小体数量

- 10 用1×PBS清洗盖玻片，3次×5分钟；
  - 11 在1%正常血清或BSA(1× PBS稀释)中，稀释兔抗荧光蛋白二抗。浓度范围通常为1-2 µg/mL，但是抗体浓度需要针对每个系统进行优化；
  - 12 孵育二抗:室温1小时，避光；
  - 13 用1×PBS清洗玻片，3次×5分钟；
  - 14 当所有的清洗步骤完成以后，使用DAPI或Hoechst(1-10 µg/mL)染核；
  - 15 使用封片剂封片。建议使用抗淬灭的封片剂以减少荧光淬灭。
  - 16 小心地去除多余的封片剂，用指甲油密封玻片边缘。
  - 17 使用荧光显微镜对细胞进行观察和拍照记录。
- 注意:**通过使用合适的软件进行图像分析，可以手动或自动地对LC3-II的阳性斑点进行定量分析。但是，应该在样本间采用标准化的方法，以防止引入偏差并确保重复性良好。

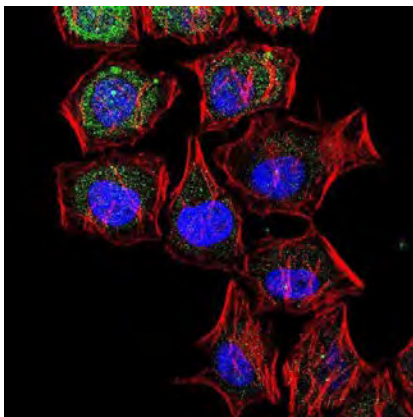


图6:免疫细胞化学/免疫荧光:共聚焦分析Hela-细胞，使用的是LC3B抗体(产品编号 #NB600-1384, 1:5000)。采用Alexa Fluor 488-结合的山羊抗兔IgG作为二抗(绿色)。肌动蛋白被标记为Alexa Fluor 568 Phalloidin(红色)。DAPI用于染细胞核(蓝色)。

# 自噬的测量

- **LC3-转化 (免疫印迹法):**该方法测量LC3的转化，从未脂化的LC3-I到脂化的LC3-II型。转化率的增加与自噬小体的数量增加有关。量化应该基于LC3-II水平与内参蛋白(如ACTIN)水平的比较。然而，在某些系统中，内参蛋白的水平受到自噬的影响，此时LC3-I可被用来作比较。

使用LC3评估自噬活动的注意事项	免疫细胞/组织 化学 (ICC/IHC)	免疫印迹 (WB)
1. LC3数量的转变在不同的组织和细胞中不同。	√	√
2. 单纯LC3-II水平不足以评价自噬。	√	√
3. LC3-II可能与其他膜结构相关。	√	√
4. 有些抗体可能无法与LC3-I充分结合。	√	√
5. LC3-I的降解比LC3-II更敏感。		√
6. 在细胞或组织中，LC3蛋白水平可能是不同的。		√
7. 不同的LC3家族成员可能都参与了自噬，需要使用多种抗体来检测自噬水平。	√	√

## 自噬流监测

自噬流牵涉到细胞内物质的整个变化过程，从分离到降解，再将基本组分回收到胞质的整个过程。

- **LC3转变分析(WB, ICC/IF):**这一检测方法可以监测自噬小体的累积，以确定自噬流。用溶酶体药物和蛋白酶抑制剂可以阻断自噬流和LC3-II的降解。用有无这些试剂时LC3-II的数量差异来反映自噬流的变化。这一实验使研究人员能够区分真实的自噬诱导和自噬流的阻断。

# 自噬的测量

	自噬流分析试剂	抑制机理	
Pharmacological	氯喹 菌丝霉素A1 氯化铵 阿奇霉素	溶酶体酸化抑制剂	
	E64d 抑肽素A1	蛋白酶抑制剂	
	黄腐酚 ML240	自噬小体成熟抑制剂	
	诺考达唑 长春花碱	溶酶体-自噬小体融合抑制剂	
	Genetic	*LAMP2/CD107b RNAi	自噬小体成熟抑制剂
		LAMP2基因敲除技术	自噬小体成熟抑制剂

可在Tocris获取: [www.tocris.com](http://www.tocris.com)

\*可在Novus生物获取: [www.novusbio.com](http://www.novusbio.com)

## 方案: Western Blot检测LC3-II转变实验

### 材料

- > 10 mM磷酸氯喹 (CQ), 用蒸馏水溶解
- > 1×PBS
- > 样品缓冲液, 2×Laemmli缓冲液: 4% SDS, 5% β-巯基乙醇, 20%甘油, 0.004%溴蓝, 0.125M Tris-盐酸, pH6.8
- > RIPA缓冲液: 150 mM氯化钠, 1% NP-40或Triton X-100, 0.5%脱胆酸钠, 0.1% SDS, 50 mM Tris-盐酸, pH 8.0; 20 mM Tris-盐酸, pH 7.5
- > 1×电泳液: 25 mM Tris碱, 192 mM甘氨酸, 0.1% SDS. 调整pH为 8.3
- > 1×转膜液 (湿): 25 mM Tris碱, 192 mM 甘氨酸, 20%甲醇, pH 8.3
- > TBS
- > TBST, TBS和0.1% 吐温
- > 封闭液: TBST, 5% 脱脂奶粉
- > 2µg/mL的兔抗LC3一抗 (产品编号#NB100-2220), 用封闭液稀释

## 方案: Western Blot检测LC3-II转变实验

### 方法

- 01** 体外培养细胞至半汇合状态（70-75%）（如Hela或Neuro2A细胞）。
- 02** 向培养皿中加入氯喹，使其终浓度为50 $\mu$ M，孵育16小时。请记住将未经处理的样品作为阴性对照。  
**注意:**使用经验证的自噬诱导剂作为阳性对照。
- 03** 用冷的1 $\times$ PBS冲洗细胞，然后在样品缓冲液中裂解细胞。  
**注意:**LC3-I和LC3-II很容易降解，且LC3-I更不稳定。这些蛋白质对反复冻融和SDS样品缓冲液十分敏感。应迅速检测新鲜样品，以防止蛋白质降解。
- 04** 超声裂解并于95 $^{\circ}$ C孵育细胞5分钟。  
**注意:**细胞直接在样品缓冲液中裂解，或者在RIPA缓冲液中裂解。
- 05** 每个泳道按10-40 $\mu$ g加入经氯喹处理和未处理的细胞样品至4-20%聚丙烯酰胺梯度凝胶(SDS - PAGE)。  
**注意:**对于LC3的检测，需要特别注意的是监测凝胶的电泳过程，因为这种蛋白质相对较小(~ 14kDa)，以免跑出凝胶。
- 06** 将蛋白转印到0.2 $\mu$ m 的PVDF膜上，100 V，30分钟。  
**注意:**有关免疫印迹的更多信息，请参见我们的免疫印迹手册[novusbio.com/wb-handbook](http://novusbio.com/wb-handbook)。
- 07** 转膜后，用蒸馏水冲洗膜，并用丽春红染色1~2分钟，以确认蛋白转移效率。
- 08** 在蒸馏水中冲洗膜，去除多余的污渍，用铅笔标记已有蛋白的泳道和分子量。

## 方案：Western Blot 检测LC3-II转变实验

- 09 使用封闭缓冲液(5%脱脂奶粉，TBST稀释)封闭，室温1小时。
- 10 TBST洗膜，5分钟。
- 11 用封闭液稀释兔抗LC3一抗（产品编号#NB100-2220）至约2 $\mu$ g/mL，室温孵育1小时。
- 12 蒸馏水洗膜。
- 13 TBST洗膜，10分钟 $\times$ 3次。
- 14 用封闭液稀释的二抗（如抗兔IgG-辣根过氧化物酶标记）孵育膜，室温1小时。  
**注意:** 只要不干扰抗原抗体结合，可将吐温20添加到封闭液或抗体稀释缓冲液中，使其最终浓度为0.05-0.2%。
- 15 TBST洗膜，10分钟 $\times$ 3次。
- 16 根据产品说明书，使用合适的显影试剂(如BioFX Super + ECL)。
- 17 印记拍照。

**小提示:** LC3-I和它的脂化型LC3-II具有不同的电泳迁移特性，在SDS-PAGE凝胶中，脂化型的移动更快，即使它的分子量更大。LC3-II跑胶位置为14-16kDa，LC3-I跑胶位置为16-18 kDa。

**注意:** 本实验测定了在是否有抑制剂(例如，溶酶体药物)情况下，LC3-II信号的差异。当自噬流被激活或诱导时，加入抑制剂后，应观察到LC3-II信号的增加。



# 自噬的测量

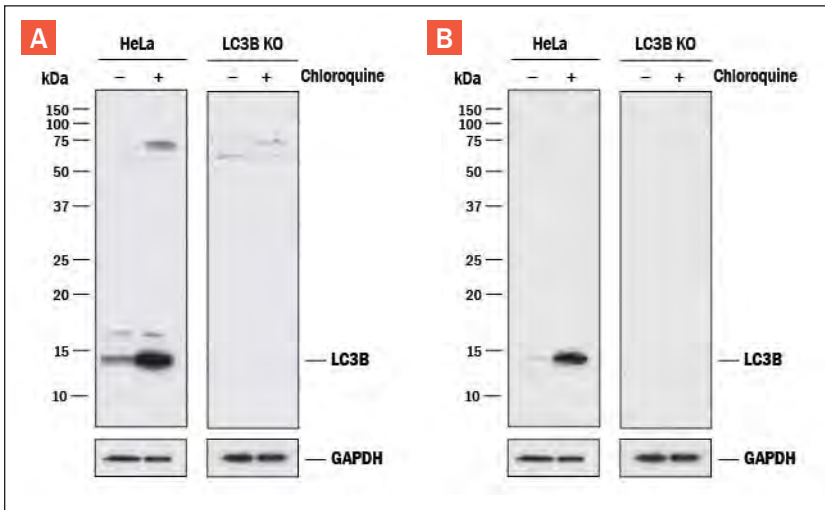


图7: HeLa人类宫颈上皮癌敏感细胞系和LC3B敲除的HeLa细胞系, 不处理或50 $\mu$ M氯喹处理18 h。全细胞蛋白裂解物在1 $\times$ Laemmli的样品缓冲液中溶解, 以每个裂解物10 $\mu$ g上样至4-15% SDS-PAGE凝胶分离蛋白, 转膜至0.2  $\mu$ m 的PVDF膜, 用含5%的脱脂奶粉的TBST封闭液来封闭。PVDF膜用(A)兔抗LC3B多克隆抗体(产品编号#NB100-2220)和(B)兔抗LC3B单克隆抗体(产品编号#NBP2-46892)作为一抗, 二抗为HRP-标记的抗兔IgG。在亲本HeLa细胞系中, 特异的LC3B条带在约15kDa(如图所示), 但在LC3B敲除的HeLa细胞系中检测不到。GAPDH为内参蛋白。此实验条件被简化过。

## LC3自噬流实验要点

1. 在基础自噬流高的细胞或组织中, 可能很难发现额外诱导的自噬。
2. 为避免信号饱和, 抑制剂的使用应限制在1-2小时内。
3. 应密切监测抑制剂的浓度和孵育时间, 防止引起细胞死亡。
4. 融合阻滞剂(自噬小体-溶酶体)的应用, 可能会导致大的自噬小体的形成和自噬活性的分析变得更复杂。

免疫细胞/组织化学 (ICC/IHC)      免疫印迹 (WB)

√      √  
√      √  
√      √  
√

## 自噬研究的其他靶点

**p62/SQSTM1降解实验(WB, FC, ELISA, ICC/IF):** 胞质p62 / SQSTM1的去留主要通过自噬途径。因此, p62/SQSTM1的水平与自噬活性呈负相关。与LC3-II相似, 用氯喹阻断胞质成分的降解, 抑制自噬流, 导致p62/SQSTM1的累积。p62/SQSTM1的水平可以通过流式细胞术、免疫印迹和ELISA进行定量分析, 并作为生物标志物分析自噬流。



图8: 通过其LIR域, p62/SQSTM1与LC3-II相互作用, 定位至自噬小体。UBD域允许p62/SQSTM1结合泛素化的胞质成分(如蛋白质聚集物), 并将其降解。通过PB1域p62/SQSTM1寡聚或与NBR1形成二聚体。

# 自噬研究的其他靶点

## p62/SQSTM1- 自噬相关的结构域

结构域	功能
PB1(Phox和Bem1结构域)	寡聚或与NBR1形成异二聚体
UBD(泛素结合域)	与泛素蛋白相互作用
LIR(LC3结合域)	人LIR基序: 335-DDDWTHLS-342

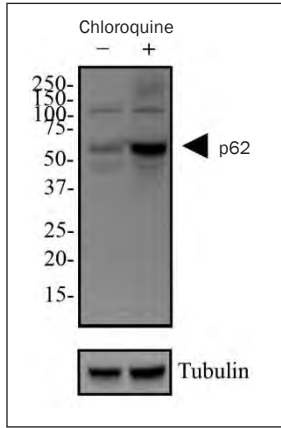


图9: 培养的Hela细胞用对照品(水)或50 $\mu$ M氯喹处理24h。制备好细胞裂解物,在12%的SDS-PAGE凝胶上分离蛋白。转移蛋白质到PVDF膜上,5%的脱脂奶粉封闭。用1 $\mu$ g/mL的p62/SQSTM1抗体[产品编号#NBP1-48320]和抗兔的辣根过氧化物二抗,使用化学发光剂显示成像。注意经氯喹处理的p62(箭头所指)上调,说明自噬被阻断。

## p62/SQSTM1定量要点

对于p62/SQSTM1的免疫印迹分析,必须考虑使用特定的裂解液和样品缓冲液。自噬被抑制时(如,亲溶酶体药物),p62/SQSTM1寡聚,并在蛋白质聚集的情况下,导致其在Triton X-100中有不溶性片段累积。因此,包含1% SDS的裂解缓冲液效果更好,这使得研究人员能够评估全部p62/SQSTM1在细胞内的变化情况。

与LC3-II相比,p62/SQSTM1变化的速度较慢,因此对降解的评价(如自噬诱导后)应有24小时后的时间点。通过p62/SQSTM1的降解对自噬流进行评估,推荐采用在自噬抑制剂和诱导剂是否存在的情况下,结合western blot和免疫染色进行分析。

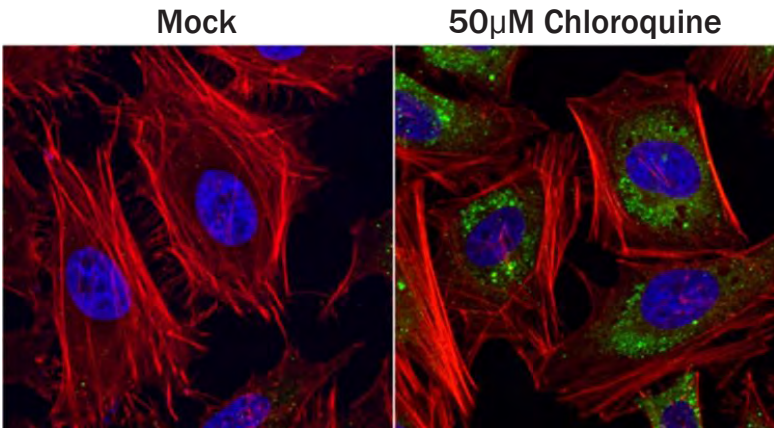


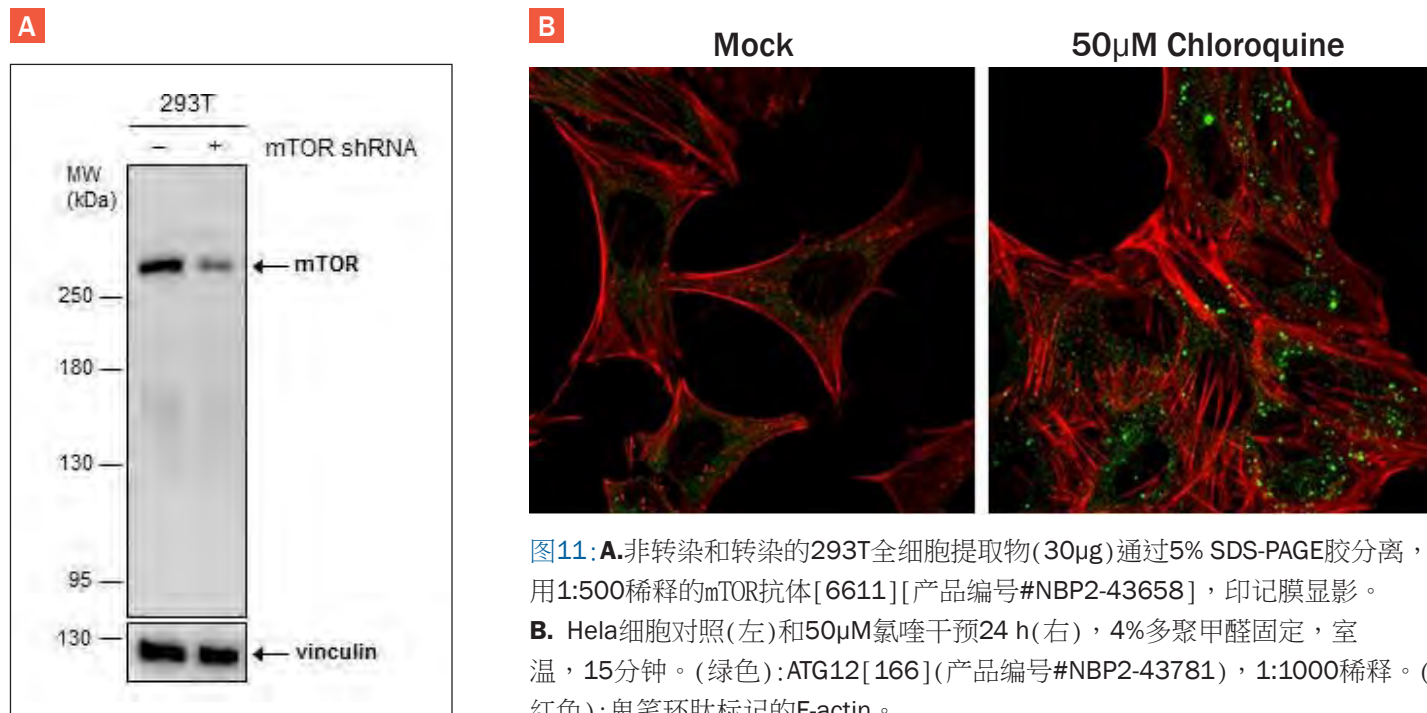
图10: HeLa细胞用对照组(左)和50 $\mu$ M氯喹干预24 h(右),4%多聚甲醛固定,室温,15分钟。(绿色):SQSTM1蛋白(SQSTM1抗体(1478)[产品编号#NBP2-43663],1:1000稀释)。(红色):肌动蛋白用鬼笔环肽染色,1:200稀释。(蓝色):Hoechst 33342染色。

# 自噬研究的其他靶点

## 推荐的其他监测自噬的靶点

靶点	方法	要点
mTOR, AMPK 和ATG1/ULK1*	WB, IP, 激酶实验	某些系统中的ULK1水平太低，无法检测到磷酸化的形式。 TOR独立通路也控制自噬，TOR活动与自噬活性呈负相关。
ATG12, ATG5 和 ATG16L1	ICC/IF	ATG12 - ATG5的结合可反映自噬活性，但在某些细胞中，这些蛋白主要存在于共轭形式中。
WIPI (内源性的WIPI1或WIPI2)	ICC/IF	WIPI阳性斑点可能不会在所有的细胞中都有。

\* ULK1作为自噬调节的开关，mTOR和AMPK直接磷酸化ULK1，抑制或激活其功能。



**图11: A.** 非转染和转染的293T全细胞提取物(30 $\mu$ g)通过5% SDS-PAGE胶分离，用1:500稀释的mTOR抗体[6611][产品编号#NBP2-43658]，印记膜显影。  
**B.** HeLa细胞对照(左)和50 $\mu$ M氯喹干预24 h(右)，4%多聚甲醛固定，室温，15分钟。(绿色):ATG12[166](产品编号#NBP2-43781)，1:1000稀释。(红色):鬼笔环肽标记的F-actin。

## 监测自噬的其他方法

实验	方法
自噬小体和溶酶体的形态学鉴定和定量。	透射电镜(TEM)
GFP-LC3，把监测光斑的数量作为自噬流的测量指标。	荧光显微镜(FM)
串联mRFP/mCherry-GFP-LC3，监测荧光的变化(黄色到红色)测量自噬流。	荧光显微镜(FM)
GFP-LC3溶酶体的转运和蛋白水解，监测游离的GFP来测量自噬流。	免疫印迹(WB)

# Simple Western检测自噬靶点

Simple Western是传统Western Blotting的一种新的替代方法。它为靶标蛋白的可重复性检测和定量提供了自动化监测平台，该平台用毛细管构成。蛋白质分离是基于分子量大小或电荷性质，而大多数的大小为2-440 kDa的蛋白都可以在多通道的实验平台上解决。

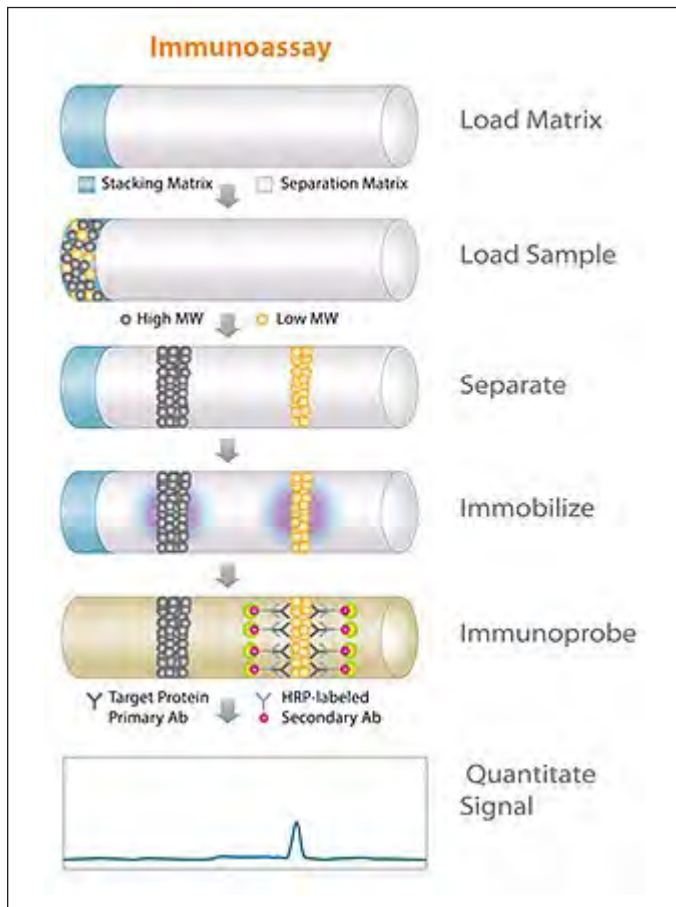


图12: 在Simple Western系统中，蛋白分离和免疫是在毛细管腔内进行的。

1. 样品首先被加载到一个堆叠矩阵中，蛋白质根据大小或电荷在分离矩阵中移动。
2. 蛋白被固定后，免疫蛋白与一抗和二抗的结合是自动执行的。
3. 用化学发光试剂检测信号。
4. Simple Western系统自动提供检测到的蛋白的定量信息，包括分子量、信号强度和背景或噪声测定。
5. 样本分离是一个虚拟图像，类似于传统的blot。

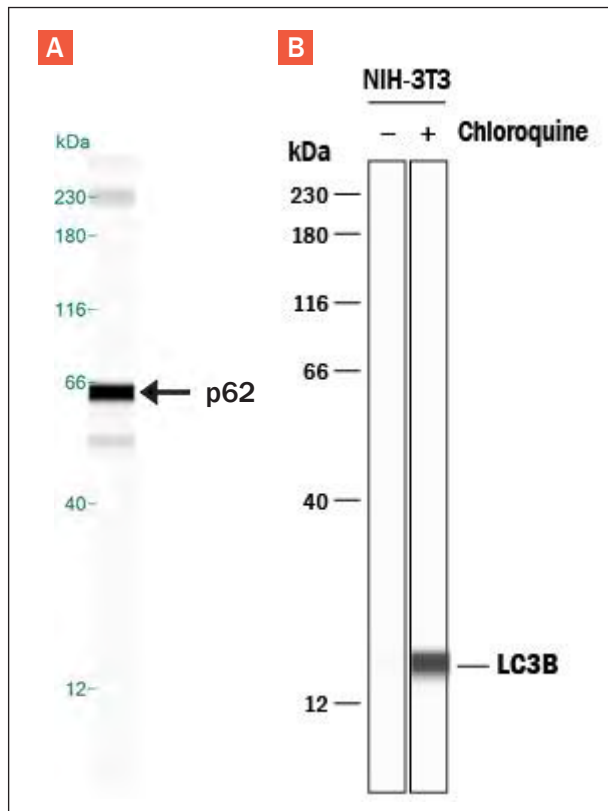


图13: **A.** Simple Western实验显示了HeLa裂解物（1.0 mg/mL）中p62/SQSTM1[产品编号#NBP1-48320]的特有条带。**B.** Simple Western条带图显示NIH-3T3小鼠胚胎成纤维细胞系未处理或经50  $\mu$ M的氯喹处理后的裂解产物，以0.2mg/mL的上样量显示的条带。检测到一个特定的LC3B条带，在大约17kDa处(如图所示)，使用5 $\mu$ g/mL的兔抗LC3B单克隆抗体(产品编号#NBP2-59800)。

此实验条件被简化，使用12-230kDa分离系统。

## 精选经验证的适用于Simple Western的自噬抗体

Target	
LC3A	HIF1 $\alpha$
LC3B	ATG5
p62/SQSTM1	ATG7
PINK1	Beclin1

想学习更多，请到：[www.proteinsimple.com/simple\\_western\\_overview](http://www.proteinsimple.com/simple_western_overview)

# 自噬调节分子

自噬调节极具吸引力，因为这一过程和癌症、神经退行性病变和心肌病有关联。一些小分子物质能够抑制或诱导自噬活性，为人们可以在单细胞和器官水平上调节和研究自噬提供了一种途径。与遗传模型不同，药物可以进行时间和剂量的控制。此外，自噬调节剂的作用通常是可逆的。对于动物模型系统，自噬调节剂的一个重要的优势是可以将自噬调节剂定向分布到特定的器官和组织。

## 小分子调节

	药物	作用模式
自噬抑制剂	3-甲基腺嘌呤	AMPK抑制剂
	(±)Bay K 8644	L型钙离子通道激活剂
	Spautin 1	USP10和USP13抑制剂
	LY 294002 <sup>*,a</sup>	VPS34抑制剂
	渥曼青霉素 <sup>a</sup>	
	MRT 67307 MRT 68921	ULK抑制剂
自噬激活剂	辛伐他汀 <sup>a</sup> A 769662 <sup>a</sup>	AMPK激活剂
	雷帕霉素 Torins (1和2) 依维莫司 PI 103	mTOR抑制剂
	地塞米松	抗炎糖皮质激素，也可作用于mTOR通路
	L-690330	单磷酸肌醇抑制剂，不依赖mTOR的抑制
	Dorsomorphin	AMPK抑制非依赖
	A23187，游离酸 <sup>a</sup> Brefeldin A <sup>a</sup> 毒胡萝卜内酯 <sup>a</sup> 衣霉素 <sup>a</sup>	引起内质网应激
	胺碘酮	引起线粒体分裂和细胞死亡
	GF 109203X	蛋白激酶C抑制剂
	NF 449 <sup>a</sup>	高选择性P2X1拮抗剂; Gsα-选择性拮抗剂
	哌立福新 <sup>a</sup>	PKB/AKT抑制剂
	曲古抑菌素 A	组蛋白去乙酰化酶抑制剂
	尼莫地平 维拉帕米	钙离子通道阻滞剂(L型)
	3-硝基丙酸	不可逆的线粒体呼吸复合物抑制剂
	Rilmenidine <sup>a</sup>	α2受体激动剂和I1配体; 被认为可加强自噬
	丙戊酸	降低肌醇水平

<sup>a</sup>常用的分子调节剂。\*VPS34抑制剂与3-甲基丁胺和渥曼青霉素相比更具有选择性。

Tocris提供自噬调节分子: [www.tocris.com/autophagy](http://www.tocris.com/autophagy)

# 自噬调节分子

## 特定自噬的诱导:Tat-Beclin肽

Tat-Beclin肽为诱导自噬提供了一种非常专一的方法，阻止了其他生物学意义上的重要途径的激活。以 Beclin 1/Nef相互作用序列为基础，结合HIV-1 Tat蛋白转导域(PTD)序列设计了Tat-Beclin肽。由此产生的肽穿过细胞膜，进入其关键的相互作用分子，GAPR-1(与Golgi相关的植物病原体相关蛋白1)，从而诱导自噬。新的Tat Beclin肽(Tat-D11,Tat-L11)比原肽短，并能更有效地诱导自噬。想要了解更多：

[www.novusbio.com/autophagy-inducing-peptides](http://www.novusbio.com/autophagy-inducing-peptides)

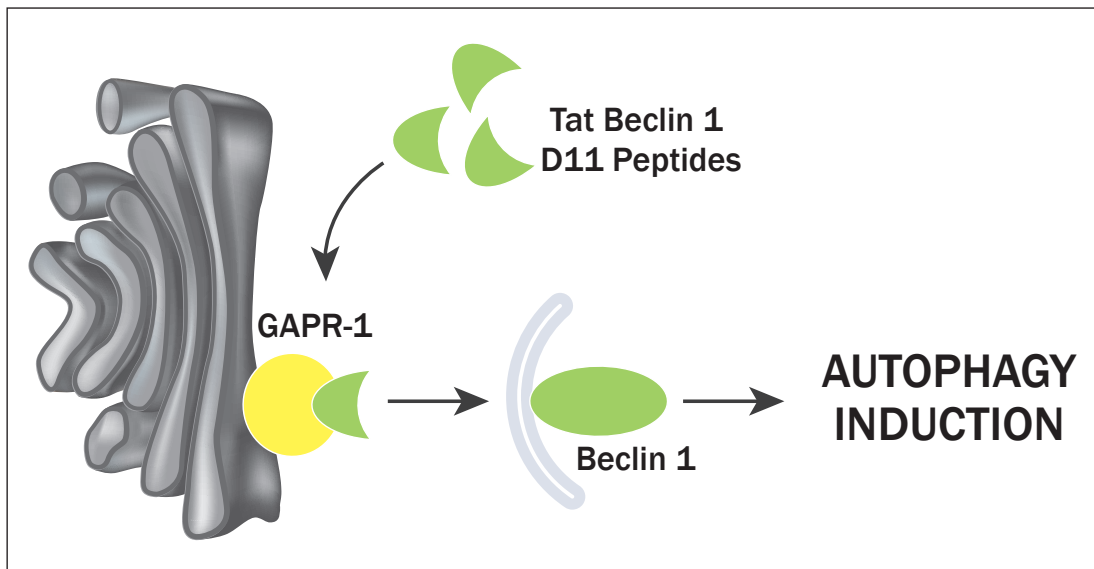


图14: GAPR-1/ GLIPR2是自噬的负性调控剂，并结合Beclin 1抑制自噬。在Tat- D11肽的存在下，Beclin 1与GAPR-1结合释放，使Beclin 1介导自噬小体的形成和诱导自噬。

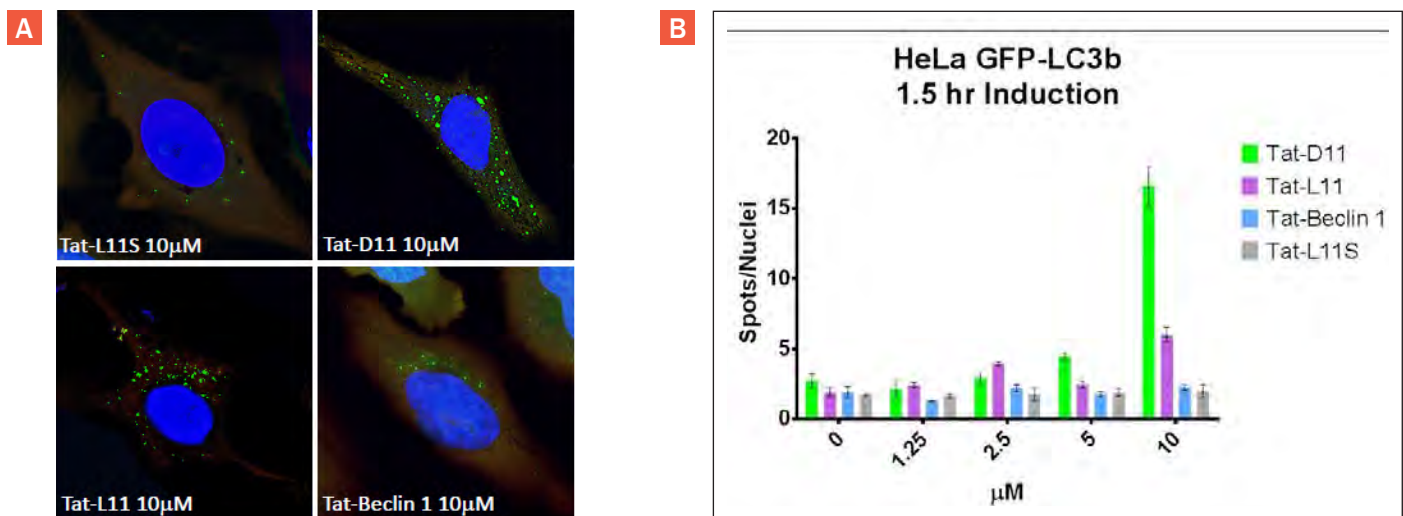


图15: Tat-D11和Tat-L11是比Tat-Beclin1更强的自噬诱导物。HeLa GFP-LC3B用Tat-D11、Tat-L11、Tat-L11s或Tat-Beclin处理1.5小时，(A)用荧光显微镜对自噬小体的数量进行评估，(B)计数GFP+/LC3B+斑点的数量。用Tat-D11处理的细胞有更多的GFP+/LC3B+斑点。

# 自噬的细胞核水平控制

已知许多转录因子调节自噬相关关键基因的表达。转录调控在自噬活性时反应迅速。通常，细胞质与细胞核的转录因子的易位，决定了它们作为自噬调节分子的特定功能。然而，每个调控轴都通过其特定的机制影响自噬。

## 调节自噬的转录机制

转录因子	自噬结果	转录调节的自噬相关基因		
FOXO1 (产品编号#NBP2-31376)	+	ATG5 ATG12 ATG14	BECN1 BINP3 LC3	VSP34
FOXO3 (产品编号#AF6165) R&D Systems	+/-	ATG4 ATG12 BECN1	BNIP3 LC3 ULK1	ULK2 VSP34
E2F1 (产品编号#AF4825) R&D Systems	+	ATG5 BNIP3	LC3 ULK1	
NF-κB (产品编号#NBP1-77395)	+/-	BCL2 BECN1	BINP3 SQSTM1	
TFEB (产品编号#MAB9170) R&D Systems	+	ATG4 ATG9 BCL2	LC3 SQSTM1 UVRAG	WIPI
ZKSCAN3 (产品编号#NBP2-47570, NBP1-31566)	-	LC3 ULK1 WIPI		

自噬结果: + (增强) , - (减少)

# 自噬的细胞核水平控制

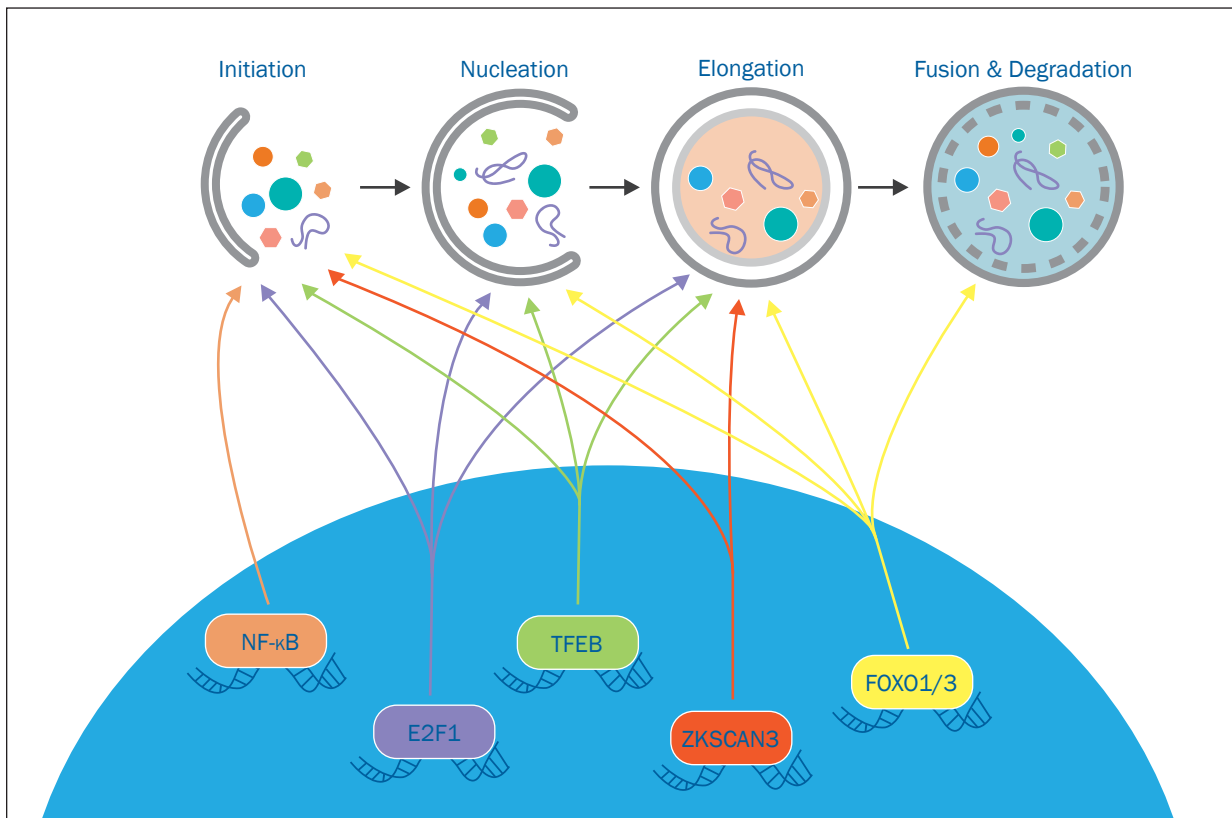


图16: 自噬的转录调节。核心的自噬机制包括了可被核转录因子调节的通路的所有环节。

## 自噬的表观遗传调控

不同的表观遗传变化，包括染色质和组蛋白修饰对自噬的调节受到了密切的关注。涉及DNA和组蛋白修饰酶的调控通路可以动态调整自噬的过程。已经发现几种重要的修饰酶可以诱导或抑制自噬的活性。

## 已知的可影响自噬的表观遗传学改变

酶促机制	自噬相关基因调节	相关自噬状态
DNMT2 甲基化	ATG5和LC3下调	自噬减少
ESA1 / RPD3轴 H4的乙酰化/脱乙酰作用	核糖体蛋白调节/表达下调 LC3表达调控	自噬减少或增加
G9A H3K9甲基化	LC3、WIPI1和DOR下调	自噬减少
hMOF / SIRT1轴 H4K16的乙酰化/脱乙酰作用	自噬相关基因诱导/抑制	平衡细胞死亡与生存
H2B的USP44 脱泛素	下调基因: 调节NF-κB和生物合成的过程 上调基因: 先天免疫和聚泛素化	自噬增加



# ACD RNAscope® 技术

RNAscope®实验是一个专有的RNA分析实验(原位杂交(ISH))，分析基于ACD的专利信号放大和背景抑制技术，在组织和细胞对RNA生物标志物分析方面，取得了领先进展。基于逐个细胞的形态内容，这门独特技术RNAscope®分析可提供定量的、敏感的和特定的RNA分子检测目标。该实验可以用于任何物种的任何基因，并在两周内交付结果。

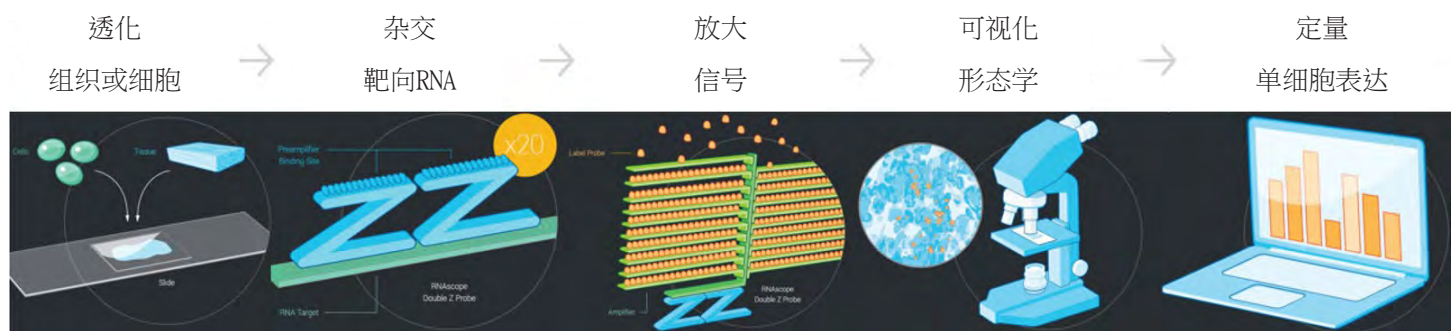
## 通过原位杂交技术级联放大信号

**步骤1:**约 20个双Z目标探针杂交到RNA目标(靶向约1kb的区域)

**步骤2:**前置放大器与双Z探针组成28个碱基结合位点。只有一个Z探针的杂交会抑制前置放大器的结合，从而提供较强的特异性。

**步骤3:**放大器在每个前置放大器上识别多个结合位点。

**步骤4:**标记包含荧光分子或显色酶的探针，与每个放大器上的众多结合位点结合。这个信号放大系统增加了检测灵敏度。



产品编号	产品名称	物种	基因别名
469441	RNAscope® Probe - Mm-Pnpla2	小鼠	Atg1
469711	RNAscope® Probe - Mm-Atg5	小鼠	Atg5
434111	RNAscope® Probe - Hs-BECN1	人	ATG6
477991	RNAscope® Probe - Mm-Map1lc3b	小鼠	Atg8f
492821	RNAscope® Probe - Hs-MAP1LC3B	人	ATG8f
445401	RNAscope® Probe - Hs-MAP1LC3A	人	ATG8e
496561	RNAscope® Probe - Hs-WIPI1	人	ATG18
434121	RNAscope® Probe - Hs-BECN1P1	人	BECN2
415881	RNAscope® Probe - Hs-SQSTM1	人	p62
444221	RNAscope® Probe - Mm-Sqstm1	小鼠	p62
477531	RNAscope® Probe - Hs-ANPEP	人	p150
439731	RNAscope® Probe - Mm-Ulk1	小鼠	Ulk1

更多信息可见于: <https://acdbio.com/science/applications>

# 精选参考文献

1. Mizushima N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 21:2861–2873. doi: 10.1101/gad.1599207
2. Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology.* 221(1), 3–12. <http://doi.org/10.1002/path.2697>
3. Yamada, E., & Singh, R. (2012). Mapping Autophagy on to Your Metabolic Radar. *Diabetes.* 61(2), 272–280. <http://doi.org/10.2337/db11-1199>
4. van der Vaart, A., Mari, M., & Reggiori, F. (2008). A picky eater: exploring the mechanisms of selective autophagy in human pathologies. *Traffic.* 9(3), 281–9. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00674.x
5. Mancias, J. D., & Kimmelman, A. C. (2016). Mechanisms of selective autophagy in normal physiology and cancer. *Journal of Molecular Biology,* 428(9 Pt A), 1659–1680. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.02.027>
6. Lippai M., & Lów P. (2014). “The Role of the Selective Adaptor p62 and Ubiquitin-Like Proteins in Autophagy,” *BioMed Research International.* 2014, Article ID 832704, 11 pages. doi:10.1155/2014/832704
7. Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 12(1), 1–222. <http://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356>
8. Mizushima, N., Yoshimori, T., & Levine, B. (2010). Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell.* 140(3), 313–326. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.028>
9. Vakifahmetoglu-Norberg, H., Xia, H., & Yuan, J. (2015). Pharmacologic agents targeting autophagy. *The Journal of Clinical Investigation,* 125(1), 5–13. <http://doi.org/10.1172/JCI73937>
10. Galluzzi L., Bravo-San Pedro J.M., Levine B., Green D.R., Kroemer G. (2017). Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles. *Nat Rev Drug Discov.* 16(7), 487–511. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2017.22>
11. Shoji-Kawata, S., Sumpter, R., Leveno, M., et al. (2013). Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. *Nature.* 494(7436), 201–206. <http://doi.org/10.1038/nature11866>
12. Füllgrabe J., Ghislat G., Cho D.H., Rubinsztein D.C. (2016). 'Transcriptional regulation of mammalian autophagy at a glance'. *Journal of Cell Science.* 129 (16), 3059–3066. doi: 10.1242/jcs.188920
13. Füllgrabe, J., Klionsky, D. J., & Joseph, B. (2014). The return of the nucleus: Transcriptional and epigenetic control of autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 15(1), 65–74. doi: 10.1038/nrm3716
14. Lapierre, L. R., Kumsta, C., Sandri, M., Ballabio, A., & Hansen, M. (2015). Transcriptional and epigenetic regulation of autophagy in aging. *Autophagy.* 11(6), 867–880. <http://doi.org/10.1080/15548627.2015.1034410>
15. Füllgrabe, J., Lynch-Day, M. A., Heldring, N., et al. (2013). The histone H4 lysine 16 acetyltransferase hMOF regulates the outcome of autophagy. *Nature.* 500(7463), 468–471. doi: 10.1038/nature12313
16. Rohde, J. R., & Cardenas, M. E. (2003). The Tor Pathway Regulates Gene Expression by Linking Nutrient Sensing to Histone Acetylation. *Molecular and Cellular Biology.* 23(2), 629–635. <http://doi.org/10.1128/MCB.23.2.629-635.2003>
17. Khalil, H., Tazi, M., Caution, K., et al. (2016). Aging is associated with hypermethylation of autophagy genes in macrophages. *Epigenetics,* 11(5), 381–388. <http://doi.org/10.1080/15592294.2016.1144007>
18. Artal-Martinez de Narvajás, A., Gomez, T. S., Zhang, J.-S., Mann, A. O., et al. (2013). Epigenetic Regulation of Autophagy by the Methyltransferase G9a. *Molecular and Cellular Biology,* 33(20), 3983–3993. <http://doi.org/10.1128/MCB.00813-13>

# 缩略语表

<b>AMBRA1</b>	Activating molecule BECN1 regulated autophagy protein 1	<b>NDP52</b>	Nuclear dot protein 52 kDa
<b>AMPK</b>	AMP-activated protein kinase	<b>NIX</b>	NIP3-like protein X
<b>ATG</b>	Autophagy related proteins	<b>OPTN</b>	Optineurin
<b>BME</b>	2-mercaptoethanol	<b>PB1</b>	Phox and Bem1 domain
<b>BNIP3</b>	BCL-2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3	<b>PE</b>	Phosphatidylethanolamine
<b>CD40</b>	Cluster of differentiation 40	<b>PKB</b>	Protein kinase B
<b>Cue5</b>	Coupling of ubiquitin conjugation to ER degradation	<b>PTD</b>	Protein transduction domain
<b>DNMT</b>	DNA methyltransferase	<b>PtdIns3K</b>	Class III phosphatidylinositol 3-kinase
<b>DOR</b>	Diabetes- and obesity-regulated	<b>RB1CC1</b>	RB1-inducible coiled-coil 1
<b>ELISA</b>	Enzyme linked immunosorbent assay	<b>RPD3</b>	Reduced Potassium Deficiency 3/Histone Deacetylase
<b>ESA</b>	Essential SAS2-related acetyltransferase	<b>RPN10</b>	Regulatory particle non-ATPase
<b>FAM134B</b>	Family with sequence similarity 134 member B	<b>SIRT1</b>	Silent Mating Type Information Regulation 2, <i>S. Cerevisiae</i> , Homolog 1
<b>FC</b>	Flow cytometry	<b>SQSTM1</b>	Sequestosome 1
<b>FIP200</b>	FAK family-interacting protein of 200 kDa	<b>SMURF1</b>	SMAD ubiquitylation regulatory factor
<b>FM</b>	Fluorescent microscopy	<b>SNAP29</b>	Synaptosome associated protein 29
<b>FOXO</b>	Forkhead box O	<b>STX17</b>	Syntaxin 17
<b>FUNDC1</b>	FUN-domain containing protein	<b>TAX1BP1</b>	Human T-Cell Leukemia Virus Type I) Binding Protein 1
<b>G9A</b>	Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2	<b>TCR</b>	T-cell receptor
<b>GAPR-1</b>	Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1	<b>TEM</b>	Transmission electron microscopy
<b>HSC-70</b>	Heat shock cognate 70 protein	<b>TFEB</b>	Transcription factor EB
<b>Hsp</b>	Heat shock protein	<b>TLR4</b>	Toll-like receptor 4
<b>ICC</b>	Immunocytochemistry	<b>TOLLIP</b>	Toll-interacting protein
<b>IF</b>	Immunofluorescence	<b>TRAIL</b>	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
<b>IHC</b>	Immunohistochemistry	<b>TRIM5a</b>	Tripartite motif
<b>ISH</b>	in situ hybridization	<b>UBD</b>	Ubiquitin binding domain
<b>KO</b>	Knockout	<b>ULK1</b>	unc-51-like kinase 1
<b>LAMP-2A</b>	Lysosomal associated membrane protein-2A	<b>USP</b>	Ubiquitin Specific Peptidase
<b>LC3</b>	Microtubule-associated protein light chain 3	<b>UVRAG</b>	UV resistance-associated gene
<b>LIR</b>	LC3 interacting region	<b>VAMP8</b>	Vesicle associated membrane protein 8
<b>MHC</b>	Major histocompatibility complex	<b>VPS</b>	Vacuolar sorting protein
<b>mTOR</b>	Mammalian target of rapamycin	<b>WB</b>	Western Blot
<b>NBR1</b>	neighbor of BRCA1 gene 1	<b>WIPI</b>	WD-repeat protein interacting with phosphoinositides
		<b>ZKSCAN3</b>	zinc finger with KRAB and SCAN domains 3

R&D公司研发和制造高质量的蛋白质，是世界上免疫分析的领导者。R&D系统还生产高质量的抗体及其抗体相关试剂、干细胞和细胞培养产品，也有细胞筛选和检测产品，为生命科学和诊断提供服务。[rndsystems.com](http://rndsystems.com)

Novus Biologicals公司制造和销售超过20,000个抗体，可以支持很广泛的研究领域。Novus建立在诚实、协作和牢固的关系之上，并继续提供可以加速研究的高质量工具。我们100%保证每个产品的质量。[novusbio.com](http://novusbio.com)

Tocris生物科学公司是生命科学领域高质量研究工具的主要供应商。Tocris提供小分子和肽，这包括新颖独特的受体配体、离子通道调节分子、酶抑制剂、笼型化合物、荧光探针和筛选库。[tocris.com](http://tocris.com)

ProteinSimple公司拥有研发和商业化的专利系统，并对外销售蛋白分析耗材，可以帮助客户揭示新的蛋白质的特性。使蛋白质分析可量化，且费用较低，组合研究工具包括Simple Western™和Simple Plex™。这些平台可以量化蛋白质表达水平，iCE以及MFI®系统可以解析蛋白结构和纯化蛋白。[proteinsimple.com](http://proteinsimple.com)

R&D SYSTEMS

NOVUS  
BIOLOGICALS

TOCRIS

protein simple

biotechne®

全球 [info@bio-techne.com](mailto:info@bio-techne.com) [bio-techne.com/find-us/distributors](http://bio-techne.com/find-us/distributors) 电话+ 16123792956  
北美 电话800 343 7475 欧洲|中东|电话+ 44(0)1235529449  
中国 [info.cn@bio-techne.com](mailto:info.cn@bio-techne.com) 电话+ 86(21)52380373

[bio-techne.com](http://bio-techne.com)

