DQ-OVA-Green 溶酶体活性检测绿色荧光探针

DQ-Ovalbumin-Green Lysosome activity detection green fluorescent probe

产品简介

DQ-OVA-Green 溶酶体活性检测绿色荧光探针是基于鸡卵清蛋白（Ovalbumin, OVA～44.5 kDa，含 1 个 N-糖基化位点（高甘露糖型）的荧光溶酶体活性分子探针，蛋白表面高密度偶联的 BODIPY FL 染料对于 pH 不敏感，区别于 FITC，不受内吞囊泡 pH 变化干扰，信号更稳定。

本品使用高浓度的荧光探针对 OVA 进行标记，标记后的 OVA 分子由于高浓度的荧光探针存在高度的荧光自抑制现象，因而本底荧光强度很低，发生分子间自猝灭，几乎无荧光背景，当被内吞进入内体溶酶体，经组织蛋白酶等蛋白酶水解切割成短肽片段后，染料间距拉开、猝灭解除，释放明亮绿色荧光，荧光强度直接对应蛋白抗原的水解加工活性。是抗原呈递、胞内蛋白酶/溶酶体降解研究经典荧光示踪探针。

主要功能与应用

① 抗原加工与呈递研究：追踪 APC（巨噬细胞、DC）对 OVA 抗原的摄取、内体转运、溶酶体降解、MHC-II 抗原肽生成动力学，流式、共聚焦、活细胞时序成像均可使用；

② 溶酶体蛋白酶活性检测：作为荧光底物，定量溶酶体组织蛋白酶水解活性，常与 LysoTracker/LysoSensor 共标定位降解发生在酸性溶酶体区室；

③胞吞、吞噬与囊泡转运示踪：脉冲追踪（Pulse-chase）实验，监测甘露糖受体介导胞吞、囊泡成熟、转运时序；

④体外蛋白酶水解实验：无细胞体系检测组织蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶活性；

⑤纳米载体 / 递送系统功能验证：评估载体胞内递送、囊泡释放、载体携带抗原在胞内加工效率

⑥自噬、吞噬通路活性评估，可搭配 DQ-BSA 做双底物对照。

产品组成

名称 / 编号	FS1486	FS1486	FS1486	Storage
DQ-Ovalbumin-Green DQ-绿色荧光标记鸡卵白蛋白	1mg	5mg	10mg	-20℃
使用说明书	1 份			

运输与保存方法:低温运输。冻干粉-20℃干燥长期保存，配好的母液分装避光冻存，建议 1 个月内用完；工作液现配现用。

产品特性

中文名称：DQ 标记鸡卵白蛋白；DQ 绿色荧光标记 BSA 溶菌酶检测试剂盒;溶菌酶活性检测试剂盒;溶酶体活性荧光检测试剂盒;绿色荧光溶菌酶活性分析试剂盒;溶酶体活性染料；溶菌酶检测试剂盒 ；

英文名称：Green OVA Lysozyme Assay Kit;DQ Green Ovalbumin Protease/Lysozyme Activity Kit;DQ-OVA-Green Lysozyme Activity Detection Kit;Lysozyme Assay Kit;Fluorometric Lysozyme Assay Kit;DQ-OVA Substrate;

形态：冻干粉（可溶于 PBS、无血清基础培养基）

最大激发/发射波长（Ex/Em）：~490–509 nm/515 nm

溶解性：PBS 等缓冲液(首选推荐)，不溶于有机溶剂（如乙醇、丙酮）；

使用方法

1.冻干粉母液配制

5000rpm 离心以收集可能悬浮于管壁的粉末，于通风棚等无菌环境中，向每支染料加入 1.0mL 缓冲溶液(无菌无钙镁 PBS（pH7.2－7.4），完全培养基均可)，颠倒混匀即可快速溶解，复溶后的母溶液为 1 mg/mL。0.22μm 滤膜除菌，避光分装，-20 ℃保存。【注意】：避免反复冻融母液，反复冻融易导致蛋白变性、提前水解，基线荧光升高。

工作浓度参考（细胞实验）：5～50μg/mL，常规巨噬细胞 / DC 常用终浓度：10～20μg/mL；高背景细胞可下调至 5μg/mL，降解活性弱样本可上调至 50μg/mL。

【注意】：含血清培养基中血清蛋白会竞争胞吞、降低摄取效率，脉冲孵育阶段优先使用无血清培养基。

2.细胞染色（活细胞脉冲追踪方案，共聚焦 / 荧光显微镜）

2.1、细胞铺板

将 APC（巨噬细胞、DC 等）接种于共聚焦皿 / 盖玻片，培养至 70%–80% 汇合度。

2.2、脉冲标记（Pulse）

2.3、预热无血清基础培养基；吸去原有培养基，PBS 轻柔洗细胞 1 次；

2.4、加入稀释好 DQ-OVA 工作液（无血清培养基配制），37 ℃、5% CO_2避光孵育 15–30 min（经典脉冲时间：15 min）；

2.3、脉冲结束：弃探针溶液，预温 PBS 洗 2–3 次，彻底洗去胞外未被摄取的 DQ-OVA（胞外完整探针无荧光，但残留会增加背景）。

3. 追踪孵育（Chase，关键，用来观测降解时序）

3.1、加入含血清完全培养基，37 ℃避光继续孵育不同时间梯度（0、15、30、60、120 min），在设定时间点成像收集样品；

3.2、荧光信号随溶酶体蛋白酶水解逐步上升；可同时加 LysoTracker 红 / 深绿探针(FS1339/FS1340/FS1341)共定位溶酶体。

4. 细胞成像

4.1、染色后的细胞可直接在荧光显微镜下进行活细胞观察，或者固定后观察均可，同时，本探针还可以兼容免疫荧光或者内源荧光蛋白标记过程（同步明场、DAPI 核染色），可进行多色成像；

4.2、使用 488 激光器或者近似波长激发，495 波长发射光收集信号。

5. 流式细胞术方案

5.1、细胞重悬于无血清培养基，细胞浓度：1×10^6 cells/mL；

5.2、加入 DQ-OVA 至终浓度 10–20 μg/mL，37 ℃避光孵育 30–45 min；

5.3、预冷 PBS 洗涤 2 次，重悬于流式染色缓冲液，冰上避光，上机检测 FITC 通道荧光强度；设置不加 DQ-OVA 的空白对照扣除细胞自发荧光。

6. 固定方案（可选）

6.1、多聚甲醛固定：4% PFA 室温固定 10–15 min；固定不会淬灭已经水解产生的 BODIPY FL 荧光，但固定后无法继续观测动态降解；固定后可进行免疫荧光共染 MHC-II、LAMP1 等标记。

【注意】：不建议提前透膜处理，会造成多肽产物泄漏、信号丢失。

7. 体外无细胞蛋白酶检测（可选）

7.1、在蛋白酶反应缓冲液中加入 DQ-OVA 至终浓度 10 μg/mL，加入纯化组织蛋白酶，37 ℃反应，酶标仪连续监测 Ex505/Em515 荧光上升速率。

8、对照组设置（强烈建议）

8.1、空白对照组：不加 DQ-OVA，仅培养基处理（自发荧光）；

8.2、阴性抑制对照：提前加入广谱蛋白酶抑制剂（如 E64d、leupeptin）预处理细胞，抑制溶酶体蛋白酶，理论上荧光信号显著降低，证明荧光来自蛋白酶水解，而非 pH 变化或非特异解离；

8.3、游离 OVA 对照（无标记 OVA）：排除抗原本身对细胞激活的干扰

9、参考文献

9.1 、 Delamarre L, et al. DQ-ovalbumin, a self-quenched fluorogenic substrate to track antigen processing in antigen-presenting cells. Molecular Probes Handbook

9.2、Roberts L M, et al. Pulse-chase analysis of DQ-OVA for endolysosomal proteolysis. PMC, 2023PMC

9.3、Vida T A, et al. Intracellular proteolysis monitored by microinjection of DQ-ovalbumin. PMC, 2011

常见问题 Q&A

Q1:怎么区分信号来源？

回复：DQ-OVA 荧光 = 蛋白酶水解产物；BODIPY FL pH 不敏感，荧光上升≠pH 酸化，必须用蛋白酶抑制剂对照区分；

Q2：对于细胞有没有毒性？

回复：常规 5–50 μg/mL 浓度短期孵育几乎无明显毒性；长时间（>6 h）高浓度处理建议做活死细胞染色验证；

Q3：对于细胞有没有毒性？

回复：不建议用于活体动物静脉注射，因为蛋白大分子，容易非特异富集。

注意事项

1) 冻干粉-20℃避光干燥保存，长期保存请避光保存于-80℃。溶解后不适于长期保存，可于-20℃避光保存一个月，或分装后于-80℃避光保存半年；

2) 冻干粉为粉末状态，可由于静电等因素粘附于管壁、管盖等位置，溶解前请先离心收集，降低粉末样品的损失；

3）染色的工作浓度和时间可根据细胞内吞过程的活跃程度适当调整，提高工作浓度可以提高细胞对探针的内吞数量，适当延长孵育时间也可增加信号累计，可根据具体细胞情况进行优化；

4）所有溶液无菌操作，探针进入细胞实验前过滤除菌；

5）BODIPY 虽光稳优于 FITC，但长时间强光照射仍会光漂白，母液、工作液、孵育、样品保存避光；

6）为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

相关产品

产品货号	产品名称	规格
FS1430	DQ-BSA-Red 溶酶体活性检测探针	1mg
FS1431	DQ-BSA-Green 溶酶体活性检测探针	1mg
FS1486	DQ-OVA-Green 溶酶体活性检测绿色荧光探针	1mg
FS1496	DQ-OVA-Red 溶酶体活性检测红色荧光探针	1mg
FS1339	LysoTracker Green DND-26 溶酶体绿色荧光探针	50ul
FS1340	LysoTracker Blue DND-22 溶酶体蓝色荧光探针	50ul
FS1341	LysoTracker™ Red DND-99 溶酶体红色荧光探针	50ul
FS1371	LysoTracker Deep Red 深红色溶酶体荧光探针	50ul
FS1412	LysoSensor Green DND-189 溶酶体绿色荧光探针	50ul