

A β 和 CRM-2102 对 PC12 细胞蛋白磷酸酶活性的影响试验

摘要

目的： 研究化合物 CRM-2102 对 A β 诱导的蛋白磷酸酶（PP2A）表达水平的影响。
方法： 体外培养 PC12 细胞，①加入含不同浓度 A β ，孵育 24h；②加含不同浓度的 CRM-2102 孵育 2h，再加入 40 μ mol/L 的 A β 孵育 24h。收集各细胞和提取蛋白。采用 Western Blot 法检测各细胞内 PP2A 表达水平。
结果： 1、5、10 μ mol/L 以下浓度 A β 对 PC12 细胞 PP2A 的表达水平分别为 45.08%、43.87%和 42.41%，而正常细胞 PP2A 的表达水平为 58.95%。20 和 40 μ mol/L A β 组 PP2A 表达的水平分别为 29.76%和 27.26%；0.1、0.5、1 和 5 μ mol/L CRM-2102 组 PP2A 的表达水平分别为 31.24%、33.18%、33.51%和 35.61%；10 μ mol/L 剂量 CRM-2102 的 PP2A 表达水平为 58.59%。而正常细胞组的 PP2A 表达水平为 58.95%。
结论： 10 μ mol/L 以下浓度 A β 对 PC12 细胞 PP2A 的表达影响不大，10 μ mol/L 以上浓度 A β 能够显著 PC12 细胞的 PP2A 表达水平，10、20 和 40 μ mol/L 三个浓度 A β 呈剂量依赖性抑制 PP2A 活性；CRM-2102 能提高由 A β 诱导抑制 PC12 细胞 PP2A 蛋白表达水平，PP2A 蛋白表达水平呈剂量依赖性的提高。

1、实验材料

1.1 受试药物

- (1) 受试药品名称：CRM-2102
- (2) 提供单位：南京中瑞生物药业有限公司
- (3) 批号：20210510
- (4) 含量：>98.5%
- (5) 溶媒：DMSO
- (6) 分子量：229.23

1.2 细胞

PC12 细胞由江苏凯基生物技术股份有限公司提供，培养条件为 90%DMDM +10%CS，于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。

1.3 抗体

Rabbit Anti- β -actin（中国 江苏凯基生物技术股份有限公司 KGAA006-1），分子量：42kDa 稀释比例：1:1000 蛋白电泳胶的浓度：10%；Rabbit Anti-PP2A（英国 Abcam ab32065）分子量：36kDa 稀释比例：1:500 蛋白电泳胶的浓度：10%；羊

抗兔 IgG-HRP (中国 江苏凯基生物技术股份有限公司 KGAA35)。

1.4 主要试剂与耗材

A β 1-42 (中国 翌圣生物 CAT: 20602ES03) Lot: A6121040; 全蛋白抽提试剂盒 (中国 江苏凯基生物技术股份有限公司 KGP250); BCA 蛋白含量检测试剂盒 (中国 江苏凯基生物技术股份有限公司 KGA902); SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (中国 江苏凯基生物技术股份有限公司 KGP113); 预染蛋白分子量 (中国 江苏凯基生物技术股份有限公司 KGP441); 5 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (中国 江苏凯基生物技术股份有限公司 KGP101); 1 \times Tris-甘氨酸蛋白电泳缓冲液 (中国 江苏凯基生物技术股份有限公司 KGP103X); Western Blotting 检测试剂盒 (中国 江苏凯基生物技术股份有限公司 KGP1201); 显影定影试剂 (中国 江苏凯基生物技术股份有限公司 KGP116)。

1.5 主要仪器与设备

电泳仪 (美国 Bio-rad Power Supplies Basic); Trans-Blot Turbo 全能型蛋白转印系统 (美国 Bio-rad 170-4150); 凝胶成像系统 (英国 SYNGENE G:BOXChemiXR5); 台式恒温振荡器 (中国 上海精宏实验设备有限公司 THZ-312); 脱色摇床 (中国 江苏金坛市正基仪器厂 HY-4); 涡旋振荡器 (中国 海门其林贝尔 XW-80A); 高速冷冻离心机 (美国 Thermo Sorvall ST 16R); 多功能酶标仪 (美国 MD Spectramac M3); PH 计 (美国 OHAUS STARTER 2C); 分析天平 (中国 精密分析天平 JA3003); 移液器 (德国 eppendorf 2.5/10/200/1000 μ L)。

2、实验方法

2.1、蛋白提取

细胞样本全蛋白提取

2.1.1 贴壁培养的细胞, 吸去培养基后, 加入 10mL/150mm 培养板的冷 PBS 洗两次, 每次振摇数次以尽量去除培养液;

2.1.2 加入适量胰蛋白酶消化液, 37 $^{\circ}$ C 消化, 消化完成后将细胞及培养液移至离心管中, 1000 转/分离心 10 min, 再用 10mL/150mm 培养板的冷 PBS, 1000 转/分离心 5 min 洗两次;

2.1.3 在每 1mL 冷 Lysis Buffer 加入 10 μ L 磷酸酶抑制剂, 1 μ L 蛋白酶抑制剂和 5 μ L 100mM PMSF, 混匀。冰上保存数分钟待用。

2.1.4 细胞洗涤后, 转至新的预冷的离心管中, 加入上述配制好的冷 Lysis Buffer, 加入量如下表所示:

细胞数量 Lysis Buffer 加入量

10^7 个 0.5 mL~1 mL

5×10^6 个 0.2 mL~0.5 mL

2.1.5 置于 4°C 摇床平台上, 温和振荡 15 min;

2.1.6 14,000rpm, 4°C 离心 15min, 取上清为全蛋白提取物, 蛋白定量 (Bradford 法)

2.1.7 分装保存于 -70°C, 避免反复冻融

蛋白定量

2.2.1 标准曲线的绘制: 取一块酶标板, 按照下表加入试剂

孔号	0	1	2	3	4	5	6	7
蛋白标准溶液 (μL)	0	1	2	4	8	12	16	20
去离子水 (μL)	20	19	18	16	12	8	4	0
对应蛋白含量 (μg)	0	0.5	1	2	4	6	8	10

2.2.2 根据样品数量, 按 50 体积 BCA 试剂 A 加 1 体积 BCA 试剂 B (50:1) 配制适量 BCA 工作液, 充分混匀;

2.2.3 各孔加入 200 μL BCA 工作液;

2.2.4 把酶标板放在振荡器上振荡 30 sec, 37°C 放置 30 分钟, 然后在 562nm 下比色测定。以蛋白含量 (μg) 为横坐标, 吸光值为纵坐标, 绘出标准曲线;

2.2.5 稀释待测样品至合适浓度, 使样品稀释液总体积为 20 μL , 加入 BCA 工作液 200 μL , 充分混匀, 37°C 放置 30 分钟后, 以标准曲线 0 号管做参比, 在 562nm 波长下比色, 记录吸光值;

2.2.6 根据所测样品的吸光值, 在标准曲线上即可查得相应的蛋白含量 (μg), 除以样品稀释液总体积 (20 μL), 乘以样品稀释倍数即为样品实际浓度 (单位: $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。

样本			蛋白浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
序号	A β 1-42($\mu\text{mol/L}$)	CRM-2102($\mu\text{mol/L}$)	
1	0	0	3.15
2	1	0	2.89
3	5	0	2.67
4	10	0	2.91
5	20	0	2.78
6	40	0	2.80

7	40	0.1	3.06
8	40	0.5	2.60
9	40	1	2.84
10	40	5	2.62
11	40	10	2.73

2.3 SDS-PAGE 电泳与转膜

2.3.1 根据目的蛋白的分子量大小选择合适的凝胶浓度，再按照下面的表格配制 SDS-PAGE 的分离胶(即下层胶)；小心用枪头将分离胶注入玻璃板间隙中，大约在占三分之二玻璃板高度处停止，尔后在上面加入几毫升双蒸水，目的是阻止空气对凝胶聚合的抑制作用。分离胶聚合完成后，倒掉胶上面覆盖的双蒸水，用滤纸尽量吸净残存的液体，小心不要碰到分离胶。

SDS-PAGE 分离胶浓度 最佳分离范围：

5%胶	250kD 以上
8%胶	120-250kD
10%胶	40-120kD
12%胶	15- 40kD
15%胶	20kD 以下

聚丙烯酰胺分离胶配方：

贮液	分离胶中丙烯酰胺的终浓度 (%)							
	5	6	7.5	8	9	10	12	15
29.1% Acr/0.9%Bis	2.55	3.06	3.825	4.08	4.59	5.1	6.12	7.65
1×Tris-HCL/SDS, H8.8	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9
H2O	8.25	7.74	6.975	6.72	6.21	5.7	4.68	3.15
10% SDS	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
10%过硫酸铵	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
TEMED	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006

2.3.2 按照如下表格配制 SDS-PAGE 的浓缩胶并注入分离胶的上端，小心插入与玻璃板厚度相适应的样品梳子，避免产生气泡

成分	配制不同体积 SDS-PAGE 浓缩胶所需各成分的体积(毫升)					
5%胶	3	4	5	6	8	10
蒸馏水	2.04	2.72	3.4	4.08	5.44	6.8
29.1% Acr/0.9%Bis	0.498	0.664	0.83	0.996	1.328	1.66
1×Tris-HCl/SDS, pH6.8	0.378	0.504	0.63	0.756	1.008	1.26
10% SDS	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
10%过硫酸铵	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

2.3.3 成层胶聚合后，小心拔去样品梳子，然后加入 1×Tris-Gly 的电泳缓冲液。

2.3.4 吸取适量样品上清加入样品孔中，在样品旁的孔中加入预染的蛋白 Marker，未添加样品上清的孔中，加入 1×SDS 上样缓冲液保持胶面平衡。

2.3.5 打开电源，电压开始设置为 60V，当蛋白样品进入分离胶后，电压可提高到 90V。参照预染 Marke:的位置，待目的条带进入凝胶最佳分离区(大约凝胶的 2/3)时，停止电泳。

2.3.6 预先将转膜液 4℃预冷。

2.3.7 在托盘上打开转移盒，靠近阴极侧的内面铺上已经用转膜缓冲液浸湿的有孔维垫，其上放三层浸有转膜缓冲液的 Whatman3MM 滤纸，注意排净气泡。

2.3.8 小心撬开玻璃板，将胶放置含有转膜液的托盘内，将含有目的条带的分离胶切下，用转膜液浸泡后置于滤纸上。

2.3.9 在凝胶上铺上经甲醇和转膜液浸湿的 NC 膜，胶和膜之间不能存有气泡，膜、滤纸和凝胶的大小，大致相同。

2.3.10 在 NC 膜上再放两层浸过转膜液的 Whatman 滤纸，注意排净气泡。

2.3.11 放上第二块海绵垫，使整个转印夹层依次形成“纤维垫-滤纸-凝胶-NC 膜-滤纸-纤维垫”层次，关闭转印夹，放入转移槽中，槽中灌满转膜液。

2.3.12 打开电源，稳流 200mA，120min。

2.3.13 转膜结束后，取出 NC 膜并作好标记，用 TBST 洗膜 10min×3 次。

2.4 免疫印迹

2.4.1 封闭、抗原抗体反应

2.4.1.1 将 NC 膜放入平皿中，加入含 5%脱脂奶粉的封闭液，摇床振荡 1.5-2h。

2.4.1.2 封闭结束后，用 TBST 洗膜 10min×3 次。

2.4.1.3 将膜放入含一抗(用 western 一抗稀释液稀释)的平皿中，4℃摇床振荡孵育过夜。

2.4.1.4 第二天取出，室温振荡 30min，吸弃一抗，TBST 洗 10min×3 次。

2.4.1.5 用 5%脱脂奶粉封闭液稀释二抗，室温摇床振荡反应 1-2 h。

2.4.1.6 二抗反应结束后，回收二抗。然后用 TBST 洗膜 5-10min×3。

2.4.2 显色

2.4.2.1 将 ECL 化学发光试剂盒中的 A、B 两种液体按 1:1 等体积混合，配置成工作液备用。

2.4.2.2 将 NC 膜从 TBST 中取出，甩掉多余的液体，将含有蛋白质的膜正面朝上，放在保鲜膜，滴加适量工作液，用保鲜膜覆盖。

2.4.2.3 使用 G:BOX chemiXR5 成像

2.5 图像分析

使用 Gel-Pro32 软件对结果进行灰度分析。

3、实验结果

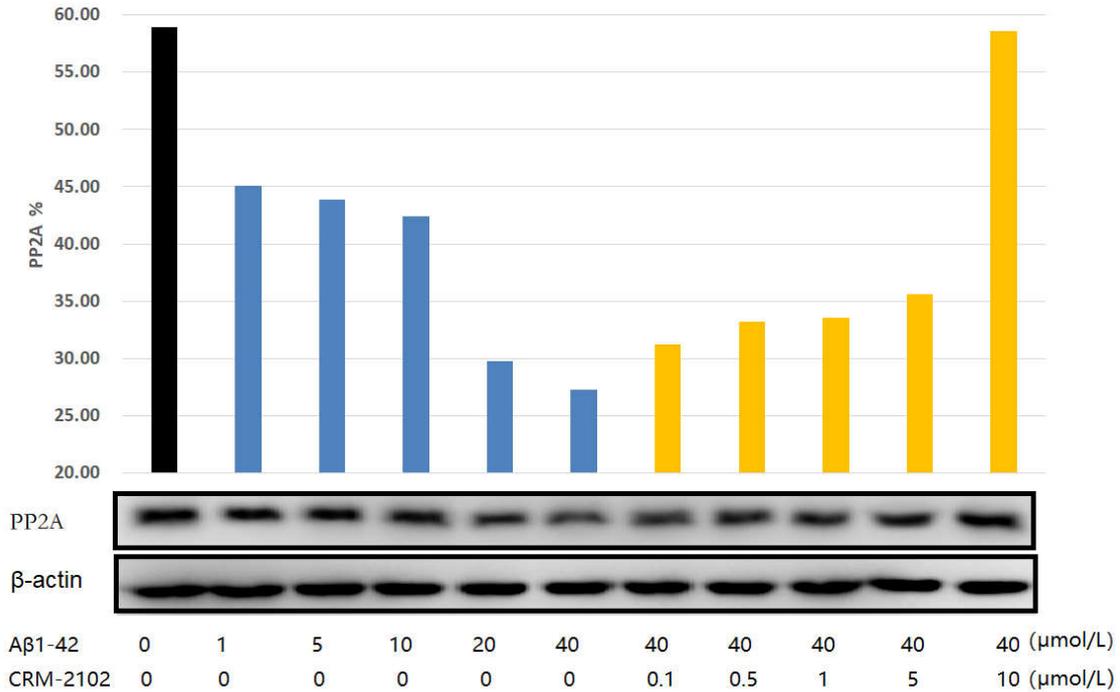
采用 Western Blot 方法检测 1、5、10、20 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 A β 对 PC12 细胞内蛋白磷酸酶 (PP2A) 表达水平。1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 以下浓度 A β 对 PC12 细胞的 PP2A 表达水平分别为 45.08%、43.87%和 42.41%，而正常细胞 PP2A 的表达水平为 58.95%。20 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 A β 的 PC12 细胞 PP2A 表达水平分别为 29.76%和 27.26%。

通过加入 0.1、0.5、1、5 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 剂量 CRM-2102 贴壁培养孵育 2h，再加入 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 A β 孵育 24h,收集细胞和提取蛋白。实验结果显示,0.1、0.5、1 和 5 $\mu\text{mol/L}$ 剂量 CRM-2102 能提高由 A β 诱导抑制 PC12 细胞 PP2A 蛋白表达水平，分别为 31.24%、33.18%、33.51%和 35.61%。10 $\mu\text{mol/L}$ 剂量 CRM-2102 的 PP2A 表达水平为 58.59%，而正常细胞组的 PP2A 表达水平为 58.95%。实验结果见表 1 和图 1。

表 1: A β 和 CRM-2102 对 PC12 细胞 PP2A 蛋白表达水平的影响

样本	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A β 1-42 (μM)	0	1	5	10	20	40	40	40	40	40	40
CRM-2102 (μM)	0	0	0	0	0	0	0.1	0.5	1	5	10
PP2A	2069	1606.5	1628.1	1498.8	1018.9	914.16	1025.7	1129.7	1180.1	1284.7	2192.1
β -actin	3509.5	3563.5	3711.3	3533.8	3423.5	3354.1	3283.7	3404.8	3521.7	3607.8	3741.2
β -actin (%)	58.95	45.08	43.87	42.41	29.76	27.26	31.24	33.18	33.51	35.61	58.59

图1: A β 和CRM-2102对PP2A活性的影响



4、结论

采用 Western Blot 法检测 1、5、10、20 和 40 μ mol/L 的 A β 对 PC12 细胞内蛋白磷酸酶 (PP2A) 表达水平。低浓度 A β 对 PC12 细胞 PP2A 的表达影响不大, 10 μ mol/L 以上浓度 A β 能够显著抑制 PC12 细胞 PP2A 表达水平, 10、20 和 40 μ mol/L 三个浓度 A β 呈剂量依赖性抑制 PP2A 活性。

0.1、0.5、1 和 5 μ mol/L 四个剂量 CRM-2102 能提高由 A β 诱导抑制 PC12 细胞 PP2A 蛋白表达水平, 并呈一定量效关系。10 μ mol/L 剂量 CRM-2102 能够极显著提高 PP2A 蛋白表达水平 (58.59%), 和正常细胞的 PP2A 表达水平 (58.95%) 几乎没有差别。