

CRM-2102 对冈田酸诱导的 PC12 细胞蛋白磷酸酶表达的影响

摘要

目的： 研究化合物 CRM-2102 对冈田酸 (OA) 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,用不同浓度的含 CRM-2102 孵育 2h,再加入 40nmol/L OA 孵育 24h, 收集细胞和提取蛋白。采用 Western Blot 法检测各细胞内 PP2A 表达水平。**结果：** 1、5 和 10 $\mu\text{mol/L}$ CRM-2102 组 PP2A 表达水平分别为 14%、18%和 29%。阴性对照为 8%，正常对照为 37%。**结论：** CRM-2102 能提高由 OA 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℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。

1.3 抗体

rabbit anti- β -actin (英国 abcam ab6276), 分子量 42kd, 稀释比例 1:5000, 蛋白电泳胶的浓度 10%; rabbit anti-PP2A (英国 abcam ab32065), 分子量 36kd, 稀释比例 1:500, 蛋白电泳胶的浓度 10%; 羊抗小鼠 IgG-HRP (中国 江苏凯基生物技术股份有限公司 KGAA37); 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

冈田酸 (上海源叶生物科技有限公司, 批号: L1100001); 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×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×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); NC 膜 (USA PALL 66485)。

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 细胞处理

细胞消化、计数、配制成浓度为 5×10^4 个/mL 的细胞悬液, 接种到 T25 培养中, 次日, 待细胞贴壁后, 加入含 CRM-2102 ($1 \mu\text{mol/L}$ 、 $5 \mu\text{mol/L}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$) 孵育细胞 2h, 加入 40nmol/L 冈田酸孵育 24h 后, 提取蛋白样本。同时设立阴性对照组。

2.2 细胞样本全蛋白提取

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; 加入适量胰蛋白酶消化液, 37°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。

细胞洗涤后, 转至新的预冷的离心管中, 加入配制好的冷 Lysis Buffer (每 1mL 冷 Lysis Buffer 加入 $10 \mu\text{L}$ 磷酸酶抑制剂, $1 \mu\text{L}$ 蛋白酶抑制剂和 $5 \mu\text{L}$ 100mM PMSF, 混匀。冰上保存数分钟待用)。

加入量为细胞数量 Lysis Buffer 加入量 10^7 个 $0.5 \text{ mL} \sim 1 \text{ mL}$; 5×10^6 个 $0.2 \text{ mL} \sim 0.5 \text{ mL}$ 。

置于 4°C 摇床平台上, 温和振荡 15 min; 14,000rpm, 4°C 离心 15min, 取上清为全蛋白提取物, 蛋白定量 (Bradford 法)。分装保存于 -70°C , 避免反复冻融。

2.3 蛋白定量

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

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；各孔加入 200 μL BCA 工作液；把酶标板放在振荡器上振荡 30sec，37℃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；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℃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；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： $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）。

组别	control	CRM-2102			
OA (nmol/L)	0	40	40	40	40
CRM-2102 ($\mu\text{mol/L}$)	0	0	1	5	10
蛋白浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	1.99	1.92	1.95	1.85	1.83

2.4 SDS-PAGE 电泳与转膜

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, pH8.8	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

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 (mL)					
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

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。吸取适量样品加入样品孔中，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。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 Marker 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。

预先将转膜液 4℃ 预冷。打开转移槽，在内面铺上已经用转膜缓冲液浸湿的海绵垫，其上放三层浸有转膜缓冲液的 Whatman3MM 滤纸，注意排净气泡。在滤纸上铺上经甲醇和转膜液浸湿的 NC 膜。膜、滤纸和凝胶的大小，大致相同。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 NC 膜上。

3.10 在分离胶上再放三层浸过转膜液的 Whatman 滤纸，注意排净气泡。放上第二块海绵垫，使整个转印夹层依次形成“纤维垫—滤纸—NC 膜—凝胶—滤纸—纤维垫”层次，

关闭转印夹，放入转移槽中。打开 Trans-Blot Turbo 全能型蛋白转印系统电源，进行转膜。转膜结束后，取出 NC 膜并作好标记，用 TBST 洗膜 5min×3 次。

2.5 免疫印迹

2.5.1 封闭、抗原抗体反应

将 NC 膜放入平皿中，加入含 5%脱脂奶粉的封闭液，摇床振荡 2h。封闭结束后，用 TBST 洗膜 5min×3 次。将膜放入含一抗(用 westem 一抗稀释液稀释)的平皿中，4℃摇床振荡孵育过夜。第二天取出，室温振荡 30min，吸弃一抗，TBST 洗 10min×3 次。用二抗稀释液稀释二抗，室温摇床振荡反应 2 h。二抗反应结束后，回收二抗。然后用 TBsT 洗膜 5min×3。

2.5.2 显色

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。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。使用 G:BOX chemiXR5 成像。

3、图像分析

使用 Gel-Pro32 软件对结果进行灰度分析。

4、实验结果

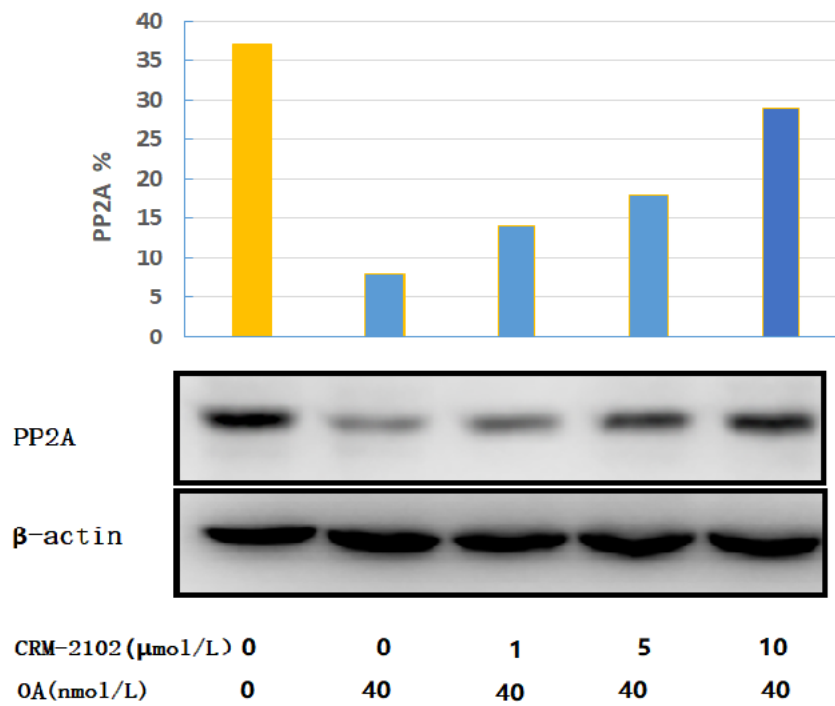
采用 Western Blot 检测 PC12 细胞 PP2A 蛋白表达水平，与阴性对照相比，1、5 和 10 μmol/L 剂量 PP2A 表达水平均显著增加。

1、5 和 10 μmol/L CRM-2102 剂量的 PP2A/β-actin 分别为 0.14、0.18 和 0.29。阴性对照为 0.08，正常对照为 0.37。结果见表 1 和图 1。

表 1：CRM-2102 对由 40nmol/L 冈田酸诱导 PC12 细胞 PP2A 蛋白表达水平的影响

组别	control	CRM-2102			
CRM-2102(μmol/L)	0	0	1	5	10
OA(nmol/L)	0	40	40	40	40
PP2A	1330.4	339.39	557.1	688.01	1130.4
β-actin	3616.5	4062.7	3933.6	3838.5	3874.6
PP2A (%)	37	8	14	18	29

图1: CRM-2102对PP2A活性的影响



5、结论

CRM-2102 可抑制由冈田酸诱导 PC12 下调 PP2A 蛋白的表达。PP2A 蛋白表达水平呈剂量依赖性的提高。