

α syn-PFF 诱导 PD 细胞模型及相关检测

1、optiMEM 预处理细胞：

细胞接种 12-24h 后用 optiMEM 处理细胞：弃掉原培养基，每孔加 800 μ l optiMEM (12-well) 或 80 μ l optiMEM (96well) 处理 1-2h。

2、转染 PFF：

- asyn-PFF: 已超声过的 (30 s (1 s on, 1 s off)) 且灭过菌 (紫外照 30 min) 的纤维
- lipo2000
- optiMEM

(1) 配转染体系：

- 12-well 一孔体系：

1)lipo2000 3 μ l+100 μ l optiMEM;

2)PFF 2 μ l +100 μ l optiMEM (对照组：4 μ l PBS+100 μ l optiMEM)

- 96-well 一孔体系：

1)lipo2000 0.2 μ l+100 μ l optiMEM;

2)PFF 0.2 μ l +100 μ l optiMEM (对照组：0.2 μ l PBS+100 μ l optiMEM)

各自静置 5min 后两者混合均匀，室温静置 15min 后将混合液滴加到细胞中， α syn-PFF 终浓度为 400nM。

3、转染 4-5h 后换液：含 1%FBS 培养基。

4、一般处理 3 天（处理时间可根据实际实验情况而定）后收样作 HTRF 或 WB 检测。

5、HTRF:

- HTRF buffer: 50 mM NaH₂PO₄, 400 mM NaF, 0.1% BSA, 0.05% (vol/vol) Tween-20, 1% (vol/vol) Triton X-100, pH 7.4
- 抗体对: total (Cisbio, cat. no. 6FNSYPEG), Ser129 phosphorylated (Cisbio, cat. no. 6FSYNPEG): Tb or D2 各自用 HTRF buffer 稀释 20 倍后等体积混合; aggregated α syn (Cisbio, cat. no. 6FASYPEG): Tb or D2 各自用 HTRF buffer 稀释 50 倍后等体积混合

以 96-well 为例：

(1) 用 Cisbio, cat. no. 6FASYPEG 试剂盒提供的裂解液将细胞裂解：弃掉原孔中培养基，用 PBS 洗一遍，每孔加 40 μ l 裂解液，室温 shaker 中 shaking 45-50min

(2) 利用 BCA 检测试剂盒检测蛋白浓度。

(3) HTRF 测定蛋白线性：

取一孔 PFF 诱导组的样品，从原浓度开始以 2 倍或 3 倍梯度稀释，共 8 个浓度点（含 0 浓度点）；

384 孔板一孔的体系：2 μ l 抗体对+8 μ l 蛋白样；

1200rpm 离心 2min 后置于 18℃ 恒温箱中孵育 5h（检测 p- α syn 可只孵育 1h）；

1200rpm 离心 2min 后用 Envision 读数。

(4) HTRF 测定实验样品：

根据 (3) 测定的蛋白线性范围决定实验样品的上样量。操作同 (3)。
若读数偏小, 可延长孵育时间 (孵育过夜) 或缩短 Envision 程序的 delay time (50 μ s)。

6、WB: (细胞、原代培养神经元或组织样中聚集体的检测方法)

- lysis buffer: NP-40 裂解液(Beyotime, cat. no. P0013F) containing 1 $\times$ phosphatase inhibitor (Beyotime, cat. no. P10082) and 1 $\times$ complete protease inhibitor (Roche, cat.no. 4693159001)
- sarkosyl: sigma, cat. no. 61739
- 超离管: Beckman, cat. no. 343775

以 12-well 为例:

(1) 弃掉原孔中培养基, 用 PBS 洗一遍, 每孔加 100 μ l lysis buffer, 室温 shaker 中 shaking 30min, 将裂解液收集至 EP 管中;

(2) 非接触式超声: 60% pulse, 10s on, 10s off, total time:1-2min

(3) 超离: 120000 xg 4 $^{\circ}$ C 30min, 取上清至八连管中

(4) 用 2% sarkosyl 裂解沉淀, 每管 50 μ l (上清体积的一半), 非接触式超声: 60% pulse, 10s on, 10s off, total time:3min 左右

(5) 用 BCA 测定所有上清和个别沉淀的浓度, 判断沉淀和上清的上样比: 例如上清浓度: 沉淀浓度=3:2, 则沉淀上样体积: 上清上样体积=3:2

(6) 用 4xLDS+10xDTT 配制样品: 将上清样品根据 bca 浓度调平, 沉淀各组的上样比例和上样保持一致; 75 $^{\circ}$ C 10min 煮样

(7) 4%~20%金斯瑞梯度胶将 Loading 跑到底, 干转: 20v 7min

(8) 雅酶快速封闭液室温封闭 20min, 孵育一抗: asyn aggregates:Abcam, cat. no. ab209538 或 BD asyn: Bioscience, cat. no. 610787

注: 若不分离上清和沉淀, 也可直接裂解完不超离跑胶, 也可看到多条“ladder”形式, 该法可能不严谨, 但也可用来判断 PFF 是否诱导成功。