



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110317850 A

(43)申请公布日 2019.10.11

(21)申请号 201910649668.1

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2019.07.18

G01N 33/53(2006.01)

(71)申请人 上海健康医学院

G01N 21/31(2006.01)

地址 201318 上海市浦东新区周祝公路279号

G01N 21/64(2006.01)

申请人 同济大学

G01N 1/28(2006.01)

上海美湛生物科技有限公司

(72)发明人 李延飞 金月玲 李觉 王翠平
叶骏

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 陆惠中 王永伟

(51)Int.Cl.

C12Q 1/02(2006.01)

C12Q 1/6851(2018.01)

权利要求书5页 说明书8页

(54)发明名称

一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法

(57)摘要

本发明涉及心肌健康技术领域,且公开了一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法,通过H9C2心肌细胞的培养、原代心肌细胞的分离培养、细胞核蛋白的抽提、MTT法检测Iso和CGA药物毒性、细胞免疫荧光、试验分组及药物处理、细胞划痕、流式细胞术检测细胞凋亡、蛋白免疫印迹、荧光定量聚合酶链式反应、细胞内活性氧水平检测和分析的步骤来观察绿原酸对心肌肥大的保护作用与效果,同时也确保绿原酸对心肌的危害性,该一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法,通过在冰箱中使用冻存液保存细胞,冻存液采用70%DMEM培养基、20%的胎牛血清和10%的DMSO,DMSO可以有效防止细胞内冰晶形成而损伤细胞。

1. 一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法,其特征在于:包括以下步骤:

S1、H9C2心肌细胞的培养;

S2、原代心肌细胞的分离培养;

S3、细胞核蛋白的抽提;

S4、MTT法检测Iso和CGA药物毒性:

S4.1、细胞铺盘:细胞计数后向两个96孔板中分别依次加入5000个左右的H9C2细胞和原代心肌细胞;

S4.2、药物的配置:制作Iso和CGA的母液,分别用吸入含有药物的培养基经滤器过滤,将一份Iso的母液加入细胞培养基进行一千倍稀释后成为Iso的细胞培养液,将一份CGA的母液加入细胞培养基中进行100倍稀释后成为CGA的细胞培养基;

S4.3、药物处理:

S4.3.1、隔夜待细胞贴壁后分别加入稀释的Iso和CGA细胞培养基,每个药物浓度设置6个平行复孔,四周边缘用无菌PBS填充;

S4.3.2、含Iso和CGA药物的培养基细胞分别在孵育了48h和2h后更换信心的细胞培养基;

S4.3.3、每孔加入MTT溶液后继续培养一段时间,然后终止培养并吸弃孔内含MTT的细胞培养液;

S4.3.4、每孔加入二甲基亚砷,并放在微凉振荡器上低速震荡;

S4.3.5、建立柱状图,同时设置对照组进行计算;

S5、细胞免疫荧光:

操作方式与2.6的步骤类似,一抗换用索要检测的相应蛋白质抗体,二抗根据一抗宿主的来源确定带不同荧光标签的二抗;

S6、试验分组及药物处理:

经过MTT法的分析,选择一个值作为Iso的药物诱导浓度,并选择几个数值作为CGA的保护药物剂量,同时将细胞分为五个实验组进行试验;

S7、细胞划痕;

S8、流式细胞术检测细胞凋亡:

S8.1、实验准备:将10×Annexin V Binding Buffer用双蒸水十倍稀释,制成1×工作液;

S8.2、细胞收集:取出培养好的细胞,用PBS洗涤两边,然后加入不含EDTA的胰酶消化贴壁的细胞,消化完成后加入细胞培养基终止消化,将消化的细胞液转移至离心管中进行离心并弃去上清液,加入PBS反复洗涤后,每次吹打悬浮后都进行离心,然后加入1×Binding Buffer悬浮细胞;

S8.3、细胞的染色:吸取细胞悬浮液转移到流式管中,然后每个样品加入FITC Annexin V和PI并进行震荡孵育;

S8.4、细胞检测:向每个流式管中加入400μl 1×Binding Buffer,然后在一段时间内用流式细胞仪分析;

S9、蛋白免疫印迹:

S10、荧光定量聚合酶链式反应(Quantitative Real-Time PCR,qPCR):

S10.1、qPCR引物的设计和合成：引物设计选择打分高的序列，设计好的引物序列交上海生工合成，获得qPCR引物后，内参基因选用GAPDH；

S10.2、按照RNA抽提试剂盒提示进行RNA的提取：

S10.2.1、试剂、耗材的准备：将所有实验器材浸泡并杀菌后烘干，在处理适量的双蒸水；

S10.2.2、吸尽细胞培养皿的培养液后加入Trizol，吹打细胞全部裂解后转移到离心管中；

S10.2.3、向离心管中加入氯仿，然后震荡；

S10.2.4、离心一段时间后将上清液转移到另一个离心管中；

S10.2.5、向上清液中加入等体积的异丙醇后振荡30s，紧接着离心20-30min，最后吸弃上清液，可以看到RNA沉淀；

S10.2.6、向含RNA沉淀的离心管加入乙醇后振荡，紧接着离心后吸弃上清液，再重复操作一次；

S10.2.7、快速离心RNA沉淀后除去残留的乙醇，将RNA沉淀放入超净台中风吹后加入去RNase水，最后震荡溶解；

S10.3、RNA浓度和纯度检测：

S10.3.1、NanoDrop分光光度法检测：吸一些RNA溶液，用微量分光光度计NanoDrop检测RNA的浓度值以及A260/A280和A260/A230的比值，然后根据结果得出RNA的纯度；

S10.3.2、电泳法检测：配置琼脂糖后提取RNA溶液，加入适量的核酸上样缓冲液，在100V条件下水平电泳15min左右，查看电泳图；

S10.4、cDNA文库的构建(reverse transiption-PCR, RT-PCR)：按照First-Strand cDNA Synthesis SuperMix进行操作后，配制第一条链cDNA合成的反应体系，然后放入常规PCR仪中孵育两次后加热失活；

S10.5、实时定量PCR(real-time PCR, qPCR)：以各组样品的cDNA文库为模板，配制反应体系，然后使用荧光燃料法进行反应；

S10.6、数据分析：使用 $\Delta \Delta CT$ 法计算得出的数据；

S11、细胞内活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)水平检测：利用荧光探针穿过细胞膜进入细胞内后会被水解生成DCFH，而DCFH不能通透细胞膜，从而使探针很容易被装载到细胞内，细胞内的活性氧可以氧化无荧光的DCFH生成有荧光的DCF。从而通过检测DCF的荧光估算细胞内活性氧的水平；

S12、数据分析。

2. 根据权利要求1所述的一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法，其特征在于：所述S1包含以下步骤：

S1.1、培养基和冻存液的配置：首先将培养基装入小瓶后，将小瓶通过超声仪清洗后再使用双蒸水进行清洗，紧接着进行高温消毒，待温度降低后放置12-24小时，最后将放入冰箱保存；

S1.2、细胞的复苏：从冰箱中取出培养基，放入水浴锅中加热，然后取出装有H9C2细胞的冻存管并将冻存管放入水浴锅中搅拌，将H9C2细胞搅拌溶解后放入离心机中进行离心，离心完成后将培养基放入冻存管中摇匀，并放入细胞培养箱中培养；

S1.3、H9C2细胞的传代:把细胞培养液和PBS溶液加热,并把消化液拿出放置,将要传代的细胞去除细胞培养液后放入细胞培养箱,然后使用PBS溶液清洗之后加入胰酶,细胞消化完成后加入细胞培养基终止消化,紧接着将细胞液放入管内进行离心,最后将细胞悬液放入细胞培养箱中培养;

S1.4、H9C2细胞的冻存:将培养好的细胞放入安全柜中,然后放入降温盒中保存;

S1.5、细胞的计数:用含有EDTA的胰酶将细胞消化下来并用细胞培养基终止消化,然后吸取5 μ l细胞悬液滴入血球计数板内,盖上盖玻片,在4倍物镜下测算方格中的细胞数目;

S1.6、细胞的铺盘:按照经验在细胞计数后以一定的细胞密度铺入相应的培养板中。

3. 根据权利要求1所述的一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法,其特征在于:所述S2原代心肌细胞的分离培养包括以下步骤:

S2.1、器材和试剂准备:取出需要的试剂进行调配,并将手术工具进行消毒杀菌处理;

S2.2、取乳鼠心室组织:取出刚出生24h的乳鼠,将乳鼠解剖部位消毒后下刀,取出乳鼠心脏并迅速放入盛有PBS的培养皿中,将心脏洗净后处理掉含有血液的PBS溶液,重新倒入PBS溶液并对心脏进行修剪,留下心室组织后使用PBS溶液进行清洗;

S2.3、分离原代心肌细胞:将心室组织剪成肉泥后加入胰酶溶液,搅拌后吸出胰酶溶液并加入胰酶溶液,继续进行搅拌且在搅拌一段时间后将上清溶液吸入含血清的PBS溶液中,直至组织被完全消化;

S2.4、过滤和培养心室组织细胞:将盛有组织细胞消化液的离心管进行离心后,弃去上清液并加入DMEM细胞培养基,反复吹打使细胞悬浮于培养基中后放到培养皿上,并放入细胞培养箱中培养;

S2.5差速贴壁法分离心肌细胞:将培养一段时间的培养皿取出,吸取上层细胞悬液,并将细胞悬液平均分装于六孔板中;

S2.6、原代心肌细胞的鉴定:

S2.6.1、细胞的准备和固定:取出培养好的心肌细胞,弃去培养基,用PBS洗涤后加入PFA溶液,最后在室温下孵化;

S2.6.2、细胞的通透:弃去培养孔中的PFA,加入PBS,摇晃清洗后弃去PBS溶液,最后加入Triton X-100通透溶液进行孵化;

S2.6.3、细胞封闭:吸弃通透液,洗涤固定的细胞后加入BSA溶液进行孵化;

S2.6.4、一抗、二抗杂合:出去封闭液用一抗稀释液稀释好的cTnT一抗孵育,过夜后洗涤两遍,并加入二抗稀释液稀释好的带有FITC标签的荧光二抗,最后避光孵化;

S2.6.5、核染色:镜检前,在盖玻片上添加DAPI染色液并添加抗荧光淬灭封片液,避光孵育后反盖在载玻片上;

S2.6.6、镜检:在倒置荧光显微镜下分别采用绿色激发光和蓝色激发光观察细胞核和细胞质。

4. 根据权利要求1所述的一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法,其特征在于:所述S3细胞核蛋白的抽提包括以下步骤:

S3.1、细胞的准备:用PBS洗一遍后使用细胞刮子刮下细胞,将细胞转移到EP管中离心后,弃去上清液并收集沉淀的细胞;

S3.2、试剂准备:将细胞浆蛋白抽提试剂A和B液以及细胞核蛋白抽提试剂取出后溶解,

溶解后摇匀放置于冰上；

S3.3、分离细胞浆蛋白：每40mg细胞沉淀加入200 μ l添加了PMSF的细胞浆蛋白抽提试剂A，进行震荡后冰浴，在加入10 μ l细胞浆蛋白抽提试剂B，多次重复进行操作后将上清液转移到EP管中；

S3.4、提取细胞核蛋白：向弃去上清的细胞沉淀中加入细胞核蛋白抽提试剂，重复震荡和冰浴后进行离心，最后将上清液转移到EP管中。

5. 根据权利要求1所述的一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法，其特征在于：所述S7细胞划痕包括以下步骤：

S7.1、先用马克笔在6孔板背后，沿直尺均匀的划横线，大约每隔0.5~1cm画一道，横穿过孔，每个孔至少穿过5条线；

S7.2、向六孔板的孔中加入一定量的H9C2细胞，待过培养后细胞恰好铺满皿底，用枪头沿着直尺，尽量垂至于背后的横线划痕；

S7.3、用PBS洗涤细胞3次，洗掉划痕时划下的细胞，加入无血清培养基，并在不同的时间点取出六孔板进行观察、拍照、比较。

6. 根据权利要求1所述的一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法，其特征在于：所述S9蛋白免疫印迹包括以下步骤：

S9.1、细胞的裂解：将收集的细胞加入适量的细胞裂解液，用移液器将细胞裂解液均匀的涂在细胞的表面，然后用细胞刮将细胞充分刮下，用移液器将刮下的细胞悬液转移到EP管中，插在冰上使细胞裂解完全；

S9.2、测定样品细胞总蛋白量：将裂解完全的细胞液进行离心，然后将各组上清液转移到新的EP管中并置于冰上，取标准蛋白，用细胞裂解液将标准蛋白稀释，将标准品分为多个分组后加到96孔板中，向标准品孔和样品孔加入BCA，然后将96孔板震荡并移入恒温培养箱孵育，最后用酶标仪检测OD值；

S9.3、调平蛋白样品上样量：根据标准品的OD值画出标准曲线，对比OD值换算出样品蛋白的浓度，用细胞裂解液调平上样液中的总蛋白量，一次添加适量的上样缓冲液然后加热；

S9.4、SDS-PAGE电泳分离蛋白质：根据样品数量选择数量一致的梳子，然后根据蛋白质分子量大小配置分离胶，将分离胶加到接近玻璃夹层上沿，并用双蒸水加满上层，分离胶凝固后倒掉双蒸水，并用吸水纸吸干水分同时加入浓缩胶，在玻璃胶板凝结后将其放入电泳槽通电；

S9.5、蛋白质转膜：终止电泳后，取合适大小的PVDF膜放进塑料盒中并加入甲醇后放入1 \times 电转液，同时将滤纸和海绵放入电转液中，将玻璃夹板中的胶放到PVDF膜上然后用滤纸和海绵夹紧，装进冰袋后放进装满冰的冰盒中通电；

S9.6、封闭：电转完成后取出PVDF膜，讲膜放入盒中加入TBST溶液清洗膜，弃去TBST溶液后加入牛奶孵育膜，重复多次；

S9.7、孵一抗：将TBST清洗好的PVDF膜按蛋白分子量大小剪开并做好标记，加入一抗稀释液稀释好的相应蛋白质抗体溶液后孵育过夜；

S9.8、孵育二抗：孵育一抗完成后，回收一抗溶液用TBST洗涤后，加入相应的二抗溶液，孵育后回收二抗溶液并使用TBST洗涤；

S9.9、曝光显色：将两种发光液混合后覆盖于PVDF膜上；

S9.10、条带分析:比较照片上蛋白条带的明亮和大小,评估蛋白质的多少,根据比值数量和实验设计时的药物浓度或者时间梯度,绘制柱状图并计算相关的显著性。

7.根据权利要求1所述的一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法,其特征在于:所述S1使用蓝盖瓶为50ml,超声仪超声清洗时间为30min以上,双蒸水清洗次数为18到20遍,冰箱的温度为4℃,S1中的水浴锅温度为37℃,离心条件为1000rpm常温离心5min,细胞培养箱条件为37℃、5%CO₂,S1中的胰蛋白酶为0.25%胰蛋白酶。

8.根据权利要求1所述的一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法,其特征在于:所述S2中的乙醇为75%乙醇,S2中溶液为4%多聚甲醛(PFA)溶液,S3中共震荡3次,且后两次震荡时间相同,S6中的五组分别为对照组、Iso组、低剂量CGA保护组、中剂量CGA保护组和高剂量CGA保护组,S7中取出六孔板时间为每隔6h取出一次,S9中检测位置为562nm波长处。

一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法

技术领域

[0001] 本发明涉及心肌健康技术领域,具体为一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法。

背景技术

[0002] 心肌肥大是心血管疾病的独立危险因素,缓解和预防心肌肥大是治疗心力衰竭等恶性心脏疾病最有效的阶段,因此寻找有效的保护药物和研究心肌肥大产生、发展的分子机制具有极其重要的意义。课题组经过查阅文献、归纳分析,筛选出数种在病理学和心血管疾病保护中研究比较活跃中草药成分。对候选药物预实验的结果分析,确定CGA作为Iso诱导心肌肥厚的保护性药物,CGA是中草药组分中具有广泛生物活性的小分子酚类物质。在课题的研究中发现CGA能够有效地抑制Iso诱导的心肌肥厚,CGA预处理组的心肌细胞在经过同浓度Iso药物等时间的诱导后,其心肌细胞在体积和选择的标记物分子表达水平上都显著小于或低于Iso药物直接诱导心肌细胞组,都更接近于正常培养的心肌细胞,CGA对心肌细胞的预处理能够有效地抵抗Iso刺激的变化。在对这一现象分子机制的初步研究中发现,CGA在保护心肌肥大发生的过程中,显著地抑制了Iso诱导的心肌细胞内氧自由基水平,能够在一定的时间内使细胞内氧自由基水平维持在正常细胞的水平。检测到CGA的预处理能够抑制Iso诱导的NF- κ B向细胞核内的转运,从而阻断Iso诱导导致的NF- κ B激活。这一研究结果表明CGA可能是预防心肌肥大的保护性药物,在得到CGA对Iso诱导的心肌细胞肥大有保护作用后,课题开始研究CGA对活体心脏的作用效应。经过设计实验分组、摸索Iso和CGA浓度,活体心脏超声结果显示,所采用的Iso浓度和注射诱导时间能够显著提高小鼠心脏的射血分数和心脏左室缩短分数,表明该条件下使得正常的心脏走向了心肌肥厚代偿性早期。而经过提前注射一定剂量的CGA能够遏制左室壁的增厚、射血分数和缩短分数的增大,维持正常的状态。这一结果预示着日常服用CGA很可能具有保护心肌细胞的功能,已知CGA能够预防心肌肥大的发生,课题转向心肌肥大分子机理方面的探索。由于蛋白质合成的增加是心肌肥大的一个重要特征,于是课题集中围绕心肌细胞蛋白质降解方面开展,旨在挖掘使得蛋白质降解受阻的新基因。通过生物信息学策略筛选出与心肌肥大相关的基因Ube3a,经过实验验证发现:在大鼠心肌细胞肥大过程中,Ube3a基因在转录和翻译水平均表达上调。于是采取将Ube3a敲除和过表达,然后检测心肌细胞的变化以及再次通过Iso诱导再检测心肌肥大的发生情况。结果表明Ube3a的敲除能够促进Iso诱导的心肌肥大发生程度,而Ube3a过表达能够阻止心肌肥大的发生。同时,也检测到随着心肌细胞内Ube3a的敲除和过表达,MMP-9也会发生与心肌肥大标记物分子表达相似的趋势。这些结果表明Ube3a基因表达的变化可能是引发心肌肥大的原因,Ube3a能够保护Iso诱导的心肌细胞肥大,而且MMP-9可能参与了心肌肥大发生的过程,这一研究为心肌肥大分子机理的进一步阐明提供了更多的数据支撑,也为治疗心肌肥大提供了新的基因靶向。

发明内容

[0003] (一)解决的技术问题

[0004] 针对现有技术的不足,本发明提供了一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法,具备找到了心肌肥大的治疗方向等优点,解决了心肌肥大不易治疗的问题。

[0005] (二)技术方案

[0006] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法,其特征在于:包括以下步骤:

[0007] S1、H9C2心肌细胞的培养;

[0008] S2、原代心肌细胞的分离培养;

[0009] S3、细胞核蛋白的抽提;

[0010] S4、MTT法检测Iso和CGA药物毒性;

[0011] S4.1、细胞铺盘:细胞计数后向两个96孔板中分别依次加入5000个左右的H9C2细胞和原代心肌细胞;

[0012] S4.2、药物的配置:制作Iso和CGA的母液,分别用吸入含有药物的培养基经滤器过滤,将一份Iso的母液加入细胞培养基进行一千倍稀释后成为Iso的细胞培养液,将一份CGA的母液加入细胞培养基中进行100倍稀释后成为CGA的细胞培养基;

[0013] S4.3、药物处理:

[0014] S4.3.1、隔夜待细胞贴壁后分别加入稀释的Iso和CGA细胞培养基,每个药物浓度设置6个平行复孔,四周边缘用无菌PBS填充;

[0015] S4.3.2、含Iso和CGA药物的培养基细胞分别在孵育了48h和2h后更换信心的细胞培养基;

[0016] S4.3.3、每孔加入MTT溶液后继续培养一段时间,然后终止培养并吸弃孔内含MTT的细胞培养液;

[0017] S4.3.4、每孔加入二甲基亚砷,并放在微凉振荡器上低速震荡;

[0018] S4.3.5、建立柱状图,同时设置对照组进行计算;

[0019] S5、细胞免疫荧光:

[0020] 操作方式与2.6的步骤类似,一抗换用索要检测的相应蛋白质抗体,二抗根据一抗宿主的来源确定带不同荧光标签的二抗;

[0021] S6、试验分组及药物处理:

[0022] 经过MTT法的分析,选择一个值作为Iso的药物诱导浓度,并选择几个数值作为CGA的保护药物剂量,同时将细胞分为五个实验组进行试验;

[0023] S7、细胞划痕;

[0024] S8、流式细胞术检测细胞凋亡:

[0025] S8.1、实验准备:将10×Annexin V Binding Buffer用双蒸水十倍稀释,制成1×工作液;

[0026] S8.2、细胞收集:取出培养好的细胞,用PBS洗涤两边,然后加入不含EDTA的胰酶消化贴壁的细胞,消化完成后加入细胞培养基终止消化,将消化的细胞液转移至离心管中进行离心并弃去上清液,加入PBS反复洗涤后,每次吹打悬浮后都进行离心,然后加入1×Binding Buffer悬浮细胞;

[0027] S8.3、细胞的染色:吸取细胞悬浮液转移到流式管中,然后每个样品加入FITC Annexin V和PI并进行震荡孵育;

[0028] S8.4、细胞检测:向每个流式管中加入400 μ l 1 \times Binding Buffer,然后在一段时间内用流式细胞仪分析;

[0029] S9、蛋白免疫印迹:

[0030] S10、荧光定量聚合酶链式反应(Quantitative Real-Time PCR,qPCR):

[0031] S10.1、qPCR引物的设计和合成:引物设计选择打分高的序列,设计好的引物序列交上海生工合成,获得 qPCR引物后,内参基因选用GAPDH;

[0032] S10.2、按照RNA抽提试剂盒提示进行RNA的提取:

[0033] S10.2.1、试剂、耗材的准备:将所有实验器材浸泡并杀菌后烘干,在处理适量的双蒸水;

[0034] S10.2.2、吸尽细胞培养皿的培养液后加入Trizol,吹打细胞全部裂解后转移到离心管中;

[0035] S10.2.3、向离心管中加入氯仿,然后震荡;

[0036] S10.2.4、离心一段时间后将上清液转移到另一个离心管中;

[0037] S10.2.5、向上清液中加入等体积的异丙醇后振荡30s,紧接着离心20-30min,最后吸弃上清液,可以看到RNA沉淀;

[0038] S10.2.6、向含RNA沉淀的离心管加入乙醇后振荡,紧接着离心后吸弃上清液,再重复操作一次;

[0039] S10.2.7、快速离心RNA沉淀后除去残留的乙醇,将RNA沉淀放入超净台中风吹后加入去RNase水,最后震荡溶解;

[0040] S10.3、RNA浓度和纯度检测:

[0041] S10.3.1、NanoDrop分光光度法检测:吸一些RNA溶液,用微量分光光度计NanoDrop检测RNA的浓度值以及A260/A280和A260/A230的比值,然后根据结果得出RNA的纯度;

[0042] S10.3.2、电泳法检测:配置琼脂糖后提取RNA溶液,加入适量的核酸上样缓冲液,在100V条件下水平电泳15min左右,查看电泳图;

[0043] S10.4、cDNA文库的构建(reverse transiption-PCR,RT-PCR):按照First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 进行操作后,配制第一条链cDNA合成的反应体系,然后放入常规PCR仪中孵育两次后加热失活;

[0044] S10.5、实时定量PCR(real-time PCR,qPCR):以各组样品的cDNA文库为模板,配制反应体系,然后使用荧光染料法进行反应;

[0045] S10.6、数据分析:使用 $\Delta\Delta CT$ 法计算得出的数据;

[0046] S11、细胞内活性氧(Reactive Oxygen Species,ROS)水平检测:利用荧光探针穿过细胞膜进入细胞内后会被水解生成DCFH,而DCFH不能通透细胞膜,从而使探针很容易被装载到细胞内,细胞内的活性氧可以氧化无荧光的DCFH生成有荧光的DCF。从而通过检测DCF的荧光估算细胞内活性氧的水平;

[0047] S12、数据分析。

[0048] 优选的,所述S1包含培养基和冻存液的配置、细胞的复苏、H9C2细胞的传代、H9C2细胞的冻存、细胞的计数和细胞的铺盘六个步骤。

[0049] 优选的,所述S2包含器材和试剂准备、取乳鼠心室组织、分离原代心肌细胞、过滤和培养心室组织细胞、差速贴壁法分离心肌细胞和原代心肌细胞的鉴定六个步骤。

[0050] 优选的,所述S3包含细胞的准备、试剂准备、分离细胞浆蛋白和提取细胞核蛋白四个步骤。

[0051] 优选的,所述S7包含三个步骤。

[0052] 优选的,所述S9包含细胞的裂解、测定样品细胞总蛋白量、调平蛋白样品上样量、SDS-PAGE电泳分离蛋白质、蛋白质转膜、封闭、孵一抗、孵育二抗、曝光显色和条带分析十个步骤。

[0053] (三)有益效果

[0054] 与现有技术相比,本发明提供了一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法,具备以下有益效果:

[0055] 1、该一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法,通过将培养好的细胞放入安全柜中,按照细胞传代的预处理方法将所有的细胞收集到15ml离心管中,弃去上清液后,加入冻存液,反复吹打细胞团,使细胞均匀地分布在冻存液中,将含有细胞的冻存液分装到冻存管中,保证每管冻存液中含有 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个细胞。在每支冻存管上标记细胞名称、冻存日期和实验者姓名,放入程序降温盒,置于 -80°C 冰箱,24h 后将细胞转移入液氮中,可长期保存。

[0056] 2、该一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法,通过在冰箱中使用冻存液保存细胞,冻存液采用70%DMEM 培养基、20%的胎牛血清和10%的DMSO,DMSO可以有效防止细胞内冰晶形成而损伤细胞。

[0057] 3、该一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法,通过用50ml 蓝盖瓶小包装配制细胞培养基,可以避免细胞培养基长期反复打开使用引起pH值的变化和减少可能造成的污染。

[0058] 4、该一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法,通过湿转转膜将蛋白质进行转模,从而使得湿转的条带比较美观、均匀,而且在转膜时可以多个进行转膜,对所撰的蛋白质分子量也没有要求,可以更加有效的进行转膜。

[0059] 5、该一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法,通过1:2分盘将H9C2细胞分盘放置,避免了H9C2在细胞密度太低时增殖和分裂的速度较慢,从而加快实验速度。

具体实施方式

[0060] 下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0061] 一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法,包括以下步骤:

[0062] S1、H9C2心肌细胞的培养:

[0063] S1.1、培养基和冻存液的配置:首先将培养基装入小瓶后,将小瓶通过超声仪清洗后再使用双蒸水进行清洗,紧接着进行高温消毒,待温度降低后放置12-24小时,最后将放入冰箱保存;

[0064] S1.2、细胞的复苏:从冰箱中取出培养基,放入水浴锅中加热,然后取出装有H9C2细胞的冻存管并将冻存管放入水浴锅中搅拌,将H9C2细胞搅拌溶解后放入离心机中进行离心,离心完成后将培养基放入冻存管中摇匀,并放入细胞培养箱中培养;

[0065] S1.3、H9C2细胞的传代:把细胞培养液和PBS溶液加热,并把消化液拿出放置,将要传代的细胞去除细胞培养液后放入细胞培养箱,然后使用PBS溶液清洗之后加入胰酶,细胞消化完成后加入细胞培养基终止消化,紧接着将细胞液放入管内进行在去进行离心,最后将细胞悬液放入细胞培养箱中培养;

[0066] S1.4、H9C2细胞的冻存:将培养好的细胞放入安全柜中,然后放入降温盒中保存;

[0067] S1.5、细胞的计数:用含有EDTA的胰酶将细胞消化下来并用细胞培养基终止消化,然后吸取5 μ l细胞悬液滴入血球计数板内,盖上盖玻片,在4倍物镜下测算方格中的细胞数目;

[0068] S1.6、细胞的铺盘:按照经验在细胞计数后以一定的细胞树木铺入相应的培养板中;

[0069] S2、原代心肌细胞的分离培养:

[0070] S2.1、器材和试剂准备:取出需要的试剂进行调配,并将手术工具进行消毒杀菌处理;

[0071] S2.2、取乳鼠心室组织:取出刚出生24h的乳鼠,将乳鼠解剖部位消毒后下刀,取出乳鼠心脏并迅速放入盛有PBS的培养皿中,将心脏洗净后处理掉含有血液的PBS溶液,重新倒入PBS溶液并对心脏进行修剪,留下心室组织后使用PBS溶液进行清洗;

[0072] S2.3、分离原代心肌细胞:将心室组织剪成肉泥后加入胰酶溶液,搅拌后吸出胰酶溶液并中心加入胰酶溶液,继续进行搅拌且在搅拌一段时间后将上清溶液吸入含血清的PBS溶液中,直至组织被完全消化;

[0073] S2.4、过滤和培养心室组织细胞:将盛有组织细胞消化液的离心管进行离心后,弃去上清液并加入DMEM 细胞培养基,反复吹打使细胞悬浮于培养基中后放到培养皿上,并放入细胞培养箱中培养;

[0074] S2.5差速贴壁法分离心肌细胞:将培养一段时间的培养皿取出,吸取上层细胞悬液,并将细胞悬液平均分装于六孔板中;

[0075] S2.6、原代心肌细胞的鉴定:

[0076] S2.6.1、细胞的准备和固定:取出培养好的心肌细胞,弃去培养基,用PBS洗涤后加入PFA溶液,最后在室温下孵化;

[0077] S2.6.2、细胞的通透:弃去培养孔中的PFA,加入PBS,摇晃清洗后弃去PBS溶液,最后加入Triton X-100 通透溶液进行孵化;

[0078] S2.6.3、细胞封闭:吸弃通透液,洗涤固定的细胞后加入BSA溶液进行孵化;

[0079] S2.6.4、一抗、二抗杂合:出去封闭液用一抗稀释液稀释好的cTnT一抗孵育,过夜后洗涤两遍,并加入二抗稀释液稀释好的带有FITC标签的荧光二抗,最后避光孵化;

[0080] S2.6.5、核染色:镜检前,在盖玻片上添加DAPI染色液并添加抗荧光淬灭封片液,避光孵育后反盖在载玻片上;

[0081] S2.6.6、镜检:在倒置荧光显微镜下分别采用绿色激发光和蓝色激发光观察细胞核和细胞质;

[0082] S3、细胞核蛋白的抽提:

[0083] S3.1、细胞的准备:用PBS洗一遍后使用细胞刮子刮下细胞,将细胞转移到EP管中离心后,弃去上清液并收集沉淀的细胞;

[0084] S3.2、试剂准备:将细胞浆蛋白抽提试剂A和B液以及细胞核蛋白抽提试剂取出后溶解,溶解后摇匀放置于冰上;

[0085] S3.3、分离细胞浆蛋白:每40mg细胞沉淀加入200 μ l添加了PMSF的细胞浆蛋白抽提试剂A,进行震荡后冰浴,在加入10 μ l细胞浆蛋白抽提试剂B,多次重复进行操作后将上清液转移到EP管中;

[0086] S3.4、提取细胞核蛋白:向弃去上清的细胞沉淀中加入细胞核蛋白抽提试剂,重复震荡和冰浴后进行离心,最后将上清液转移到EP管中;

[0087] S4、MTT法检测Iso和CGA药物毒性:

[0088] S4.1、细胞铺盘:细胞计数后向两个96孔板中分别依次加入5000个左右的H9C2细胞和原代心肌细胞;

[0089] S4.2、药物的配置:制作Iso和CGA的母液,分别用吸入含有药物的培养基经滤器过滤,将一份Iso的母液加入细胞培养基进行一千倍稀释后成为Iso的细胞培养液,将一份CGA的母液加入细胞培养基中进行100倍稀释后成为CGA的细胞培养基;

[0090] S4.3、药物处理:

[0091] S4.3.1、隔夜待细胞贴壁后分别加入稀释的Iso和CGA细胞培养基,每个药物浓度设置6个平行复孔,四周边缘用无菌PBS填充;

[0092] S4.3.2、含Iso和CGA药物的培养基细胞分别在孵育了48h和2h后更换信心的细胞培养基;

[0093] S4.3.3、每孔加入MTT溶液后继续培养一段时间,然后终止培养并吸弃孔内含MTT的细胞培养液;

[0094] S4.3.4、每孔加入二甲基亚砷,并放在微凉振荡器上低速震荡;

[0095] S4.3.5、建立柱状图,同时设置对照组进行计算;

[0096] S5、细胞免疫荧光:

[0097] 操作方式与2.6的步骤类似,一抗换用索要检测的相应蛋白质抗体,二抗根据一抗宿主的来源确定带不同荧光标签的二抗;

[0098] S6、试验分组及药物处理:

[0099] 经过MTT法的分析,选择一个值作为Iso的药物诱导浓度,并选择几个数值作为CGA的保护药物剂量,同时将细胞分为五个实验组进行试验;

[0100] S7、细胞划痕:

[0101] S7.1、先用马克笔在6孔板背后,沿直尺均匀的划横线,大约每隔0.5~1cm画一道,横穿过孔,每个孔至少穿过5条线;

[0102] S7.2、向六孔板的孔中加入一定量的H9C2细胞,待过培养后细胞恰好铺满皿底,用枪头沿着直尺,尽量垂至于背后的横线划痕;

[0103] S7.3、用PBS洗涤细胞3次,洗掉划痕时划下的细胞,加入无血清培养基,并在不同的时间点取出六孔板进行观察、拍照、比较;

[0104] S8、流式细胞术检测细胞凋亡:

[0105] S8.1、实验准备:将 $10\times$ Annexin V Binding Buffer用双蒸水十倍稀释,制成 $1\times$ 工作液;

[0106] S8.2、细胞收集:取出培养好的细胞,用PBS洗涤两边,然后加入不含EDTA的胰酶消化贴壁的细胞,消化完成后加入细胞培养基终止消化,将消化的细胞液转移至离心管中进行离心并弃去上清液,加入PBS反复洗涤后,每次吹打悬浮后都进行离心,然后加入 $1\times$ Binding Buffer悬浮细胞;

[0107] S8.3、细胞的染色:吸取细胞悬浮液转移到流式管中,然后每个样品加入FITC Annexin V和PI并进行震荡孵育;

[0108] S8.4、细胞检测:向每个流式管中加入 $400\mu\text{l}$ $1\times$ Binding Buffer,然后在一段时间内用流式细胞仪分析;

[0109] S9、蛋白免疫印迹:

[0110] 9.S9.1、细胞的裂解:将收集的细胞加入适量的细胞裂解液,用移液器将细胞裂解液均匀的涂在细胞的表面,然后用细胞刮将细胞充分刮下,用移液器将刮下的细胞悬液转移到EP管中,插在冰上使细胞裂解完全;

[0111] S9.2、测定样品细胞总蛋白量:将裂解完全的细胞液进行离心,然后将各组上清液转移到新的EP管中并置于冰上,取标准蛋白,用细胞裂解液将标准蛋白稀释,将标准品分为多个分组后加到96孔板中,向标准品孔和样品孔加入BCA,然后将96孔板震荡并移入恒温培养箱孵育,最后用酶标仪检测OD值;

[0112] S9.3、调平蛋白样品上样量:根据标准品的OD值画出标准曲线,对比OD值换算出样品蛋白的浓度,用细胞裂解液调平上样液中的总蛋白量,一次添加适量的上样缓冲液然后加热;

[0113] S9.4、SDS-PAGE电泳分离蛋白质:根据样品数量选择数量一致的梳子,然后根据蛋白质分子量大小配置分离胶,将分离胶加到接近玻璃夹层上沿,并用双蒸水加满上层,分离胶凝固后倒掉双蒸水,并用吸水纸吸干水分同时加入浓缩胶,在玻璃胶板凝结后将其放入电泳槽通电;

[0114] S9.5、蛋白质转膜:终止电泳后,取合适大小的PVDF膜放进塑料盒中并加入甲醇后放入 $1\times$ 电转液,同时将滤纸和海绵放入电转液中,将玻璃夹板中的胶放到PVDF膜上然后用滤纸和海绵夹紧,装进冰袋后放进装满冰的冰盒中通电;

[0115] S9.6、封闭:电转完成后取出PVDF膜,讲膜放入盒中加入TBST溶液清洗膜,弃去TBST溶液后加入牛奶孵育膜,重复多次;

[0116] S9.7、孵一抗:将TBST清洗好的PVDF膜按蛋白分子量大小剪开并做好标记,加入一抗稀释液稀释好的相应蛋白质抗体溶液后孵育过夜;

[0117] S9.8、孵育二抗:孵育一抗完成后,回收一抗溶液用TBST洗涤后,加入相应的二抗溶液,孵育后回收二抗溶液并使用TBST洗涤;

[0118] S9.9、曝光显色:将两种发光液混合后覆盖于PVDF膜上;

[0119] S9.10、条带分析:比较照片上蛋白条带的明亮和大小,评估蛋白质的多少,根据比值数量和实验设计时的药物浓度或者时间梯度,绘制柱状图并计算相关的显著性;

[0120] S10、荧光定量聚合酶链式反应(Quantitative Real-Time PCR,qPCR):

[0121] S10.1、qPCR引物的设计和合成:引物设计选择打分高的序列,设计好的引物序列

交上海生工合成,获得 qPCR引物后,内参基因选用GAPDH;

[0122] S10.2、按照RNA抽提试剂盒提示进行RNA的提取:

[0123] S10.2.1、试剂、耗材的准备:将所有实验器材浸泡并杀菌后烘干,在处理适量的双蒸水;

[0124] S10.2.2、吸尽细胞培养皿的培养液后加入Trizol,吹打细胞全部裂解后转移到离心管中;

[0125] S10.2.3、向离心管中加入氯仿,然后震荡;

[0126] S10.2.4、离心一段时间后将上清液转移到另一个离心管中;

[0127] S10.2.5、向上清液中加入等体积的异丙醇后振荡30s,紧接着离心20-30min,最后吸弃上清液,可以看到RNA沉淀;

[0128] S10.2.6、向含RNA沉淀的离心管加入乙醇后振荡,紧接着离心后吸弃上清液,再重复操作一次;

[0129] S10.2.7、快速离心RNA沉淀后除去残留的乙醇,将RNA沉淀放入超净台中风吹后加入去RNase水,最后震荡溶解;

[0130] S10.3、RNA浓度和纯度检测:

[0131] S10.3.1、NanoDrop分光光度法检测:吸一些RNA溶液,用微量分光光度计NanoDrop检测RNA的浓度值以及A260/A280和A260/A230的比值,然后根据结果得出RNA的纯度;

[0132] S10.3.2、电泳法检测:配置琼脂糖后提取RNA溶液,加入适量的核酸上样缓冲液,在100V条件下水平电泳15min左右,查看电泳图;

[0133] S10.4、cDNA文库的构建(reverse transiption-PCR,RT-PCR):按照First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 进行操作后,配制第一条链cDNA合成的反应体系,然后放入常规PCR仪中孵育两次后加热失活;

[0134] S10.5、实时定量PCR(real-time PCR,qPCR):以各组样品的cDNA文库为模板,配制反应体系,然后使用荧光燃料法进行反应;

[0135] S10.6、数据分析:使用 $\Delta\Delta CT$ 法计算得出的数据;

[0136] S11、细胞内活性氧(Reactive Oxygen Species,ROS)水平检测:利用荧光探针穿过细胞膜进入细胞内后会被水解生成DCFH,而DCFH不能通透细胞膜,从而使探针很容易被装载到细胞内,细胞内的活性氧可以氧化无荧光的DCFH生成有荧光的DCF。从而通过检测DCF的荧光估算细胞内活性氧的水平;

[0137] S12、数据分析。

[0138] 综合以上实验结果,我们可以得出CGA的预处理能够有效地保护Iso诱导的心肌细胞,其分子机制可能是 CGA的预处理能够阻断NF- κ B向细胞核内转运,维持NF- κ B激活和失活的稳态,抑制Iso诱导引起的炎症反应,降低细胞内的ROS水平,从而抑制了Iso诱导的心肌肥大。

[0139] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,对于本领域的普通技术人员而言,可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

专利名称(译)	一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法		
公开(公告)号	CN110317850A	公开(公告)日	2019-10-11
申请号	CN201910649668.1	申请日	2019-07-18
[标]申请(专利权)人(译)	上海健康医学院 同济大学		
申请(专利权)人(译)	上海健康医学院 同济大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海健康医学院 同济大学		
[标]发明人	李延飞 金月玲 李觉 王翠平 叶骏		
发明人	李延飞 金月玲 李觉 王翠平 叶骏		
IPC分类号	C12Q1/02 C12Q1/6851 G01N33/533 G01N33/53 G01N21/31 G01N21/64 G01N1/28		
CPC分类号	C12N2503/02 C12Q1/6851 G01N1/28 G01N21/31 G01N21/64 G01N33/5061 G01N33/53 G01N33/533 G01N2500/10 C12Q2531/113 C12Q2563/107 C12Q2545/101		
代理人(译)	陆惠中 王永伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及心肌健康技术领域，且公开了一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法，通过H9C2心肌细胞的培养、原代心肌细胞的分离培养、细胞核蛋白的抽提、MTT法检测Iso和CGA药物毒性、细胞免疫荧光、试验分组及药物处理、细胞划痕、流式细胞术检测细胞凋亡、蛋白免疫印迹、荧光定量聚合酶链式反应、细胞内活性氧水平检测和分析的步骤来观察绿原酸对心肌肥大的保护作用与效果，同时也确保绿原酸对心肌的危害性，该一种绿原酸对心肌肥大的保护作用研究方法，通过在冰箱中使用冻存液保存细胞，冻存液采用70%DMEM培养基、20%的胎牛血清和10%的DMSO，DMSO可以有效防止细胞内冰晶形成而损伤细胞。