

班级：整合科学综合实验课程 3

Group Member: 侯书洋 胡鸣镝

实验名称：探究 THP-1、iBMDM 细胞中炎症小体的激活模式

实验日期：2024 年 5 月 17 日、5 月 24 日、5 月 31 日(理论)、6 月 7 日

一. 实验基本流程:

1. 共聚焦显微镜下观察 HeLa 对不同条件刺激表现出的响应模式;
2. 分别对 THP-1、iBMDM 施加不同的条件刺激后(LPS + Nig), Western Blot 分析 THP-1、iBMDM 上清蛋白样品和细胞蛋白样品;

二. 实验基本原理:

NLRP3 是一种在固有免疫(innate immune)过程中发挥重要作用的分子(Fig. 1), 会在外界损伤相关分子模式(Damage Associated Molecular Patterns, DAMPs)和病原相关分子模式(Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs)的刺激下低聚并与衔接体蛋白 ASC、效应蛋白前体 Caspase1 结合, 形成相应的炎性小体(Inflammasome), 并介导后续的细胞焦亡通路以及 IL-1 β 、IL-18 表达等一系列免疫反应。尽管发挥功能时涉及多种不同的具体通路, 但许多过程中都会产生诸如细胞焦亡、细胞因子释放等现象。因此也可以用这些现象对应的指标刻画通路激活强度。

在本实验中, 我们首先利用 LPS 和 Nigericin 激活相关信号通路; 同时通过观察显微镜染色照片(PI 染色)、细胞蛋白样品(WCL)中残余的 NLRP3 含量以了解细胞焦亡程度, 观察上清蛋白中 p20(Caspase1 成熟过程中产生的关键分子)含量描述通路激活情况, 对不同实验条件和生物中的激活情况和模式进行探究。

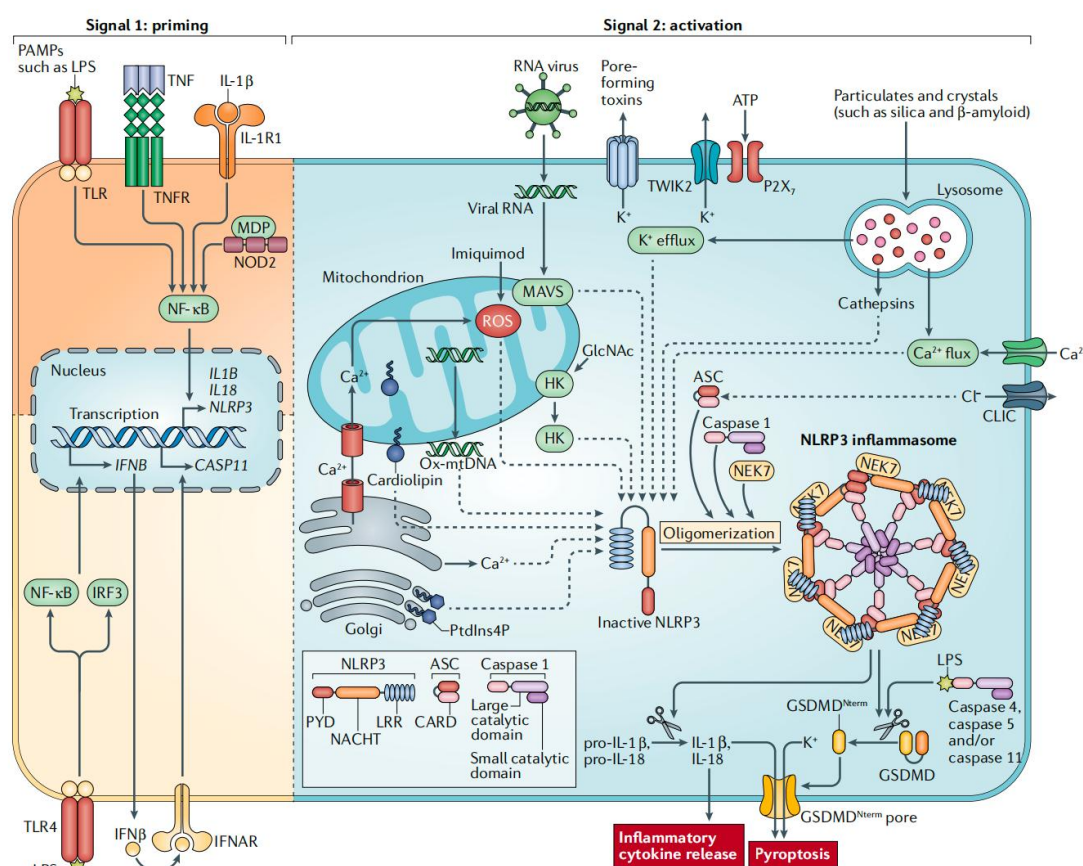


Fig. 1: NLRP3 inflammasome priming and activation¹

三. 实验基础仪器需求:

共聚焦显微平台; 电泳配套相关设备; 水平摇床; 金属浴板; 恒温冷藏冰箱

¹ Swanson, K. V., Deng, M., & Ting, J. P. Y. (2019). The NLRP3 inflammasome: Molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature Reviews. Immunology*, 19(8), 477-489. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>

四. 实验基本流程 (Protocol):

(一) 观察细胞形态:

在台式显微镜下分别观察培养皿中 THP-1、iBMDM 的细胞形态
Noted: 避免显微镜汞灯在 30 min 内连续开关两次

(二) 细胞收取与炎症小体的激活:

A. THP-1(人源, 悬浮生长):

1. 水平摇晃培养皿使得细胞均匀混散在培养基中(1640 培养基), 用移液枪将细胞连带培养基一同加入离心管中。

B. iBMDM(鼠源, 贴壁生长):

1. 先倒去培养皿中的液体培养基, 用移液枪向培养皿中贴壁加入 2-3 mL Hanks 润洗培养皿(以除去培养皿中残余的培养基和悬浮的失活细胞)。
2. 倒去 Hanks 后用移液枪吸取适量 DMEM 培养基冲刷皿底, 使贴壁细胞重新悬浮后, 将细胞连带培养基一同加入离心管中。

C. THP-1 细胞与 iBMDM 细胞 NLRP3 inflammasome 的激活:

1. 将收取到离心管中的 THP-1 与 iBMDM 细胞在 800 rpm 下离心 3 min;
2. 用台吸枪(为防止污染细胞, 可以在枪口处嵌套合适的移液枪枪头)分别吸取 THP-1、iBMDM 细胞离心后的上清液(尽量除尽上清液);
3. 再分别向 THP-1、iBMDM 离心管中加入 7 mL Opti-MEM 培养基, 并适当吹吸使得细胞重悬;
4. 分别取 2 μ L THP-1、iBMDM 细胞悬液进行细胞计数板点板, 利用进行细胞计数。实验中, 实际测得:
THP-1 细胞密度: 2.44×10^6 个 / mL; iBMDM 细胞密度为 5.43×10^6 个 / mL
5. 按如下规格分别将 THP-1、iBMDM 细胞点入 12 孔板中:
a. 每孔 2×10^6 个细胞, 总培养基体系为 1 mL;
 实验中, 实际每孔加入 820 μ L THP-1 / 368 μ L iBMDM, 然后用 Opti-MEM 培养基定容到 1 mL
b. 共点 12 孔板中的 7 个孔;
6. 12 孔板中 7 组细胞的处理条件如下(Fig. 2);

Noted: 以 THP-1 为例, 注意 iBMDM 只需将 Nigericin 处理浓度改为 6 μ M 即可

Control	
Group 1	1 μ g / mL LPS, 1 h
Group 2	1 μ g / mL LPS, 2 h
Group 3	1 μ g / mL LPS, 3 h
Group 4	1 μ g / mL LPS, 1 h + 4 μ M Nigericin, 1 h
Group 5	1 μ g / mL LPS, 2 h + 4 μ M Nigericin, 1 h
Group 6	1 μ g / mL LPS, 3 h + 4 μ M Nigericin, 1 h

Fig. 2: The cell-culture conditions (for THP-1; the iBMDM changes with 6 μ M Nig)

7. 在对 12 孔板中 Group 4 - Group 6 进行 Nigericin 处理前, 向每孔中分别加入 2 μ g / mL PI 进行染色;
8. 在台式荧光显微镜下观察 PI 染色情况; 记录并分析图片结果;

(三) Western 蛋白样品的制备:

0. 取出-30℃保藏的上清储液和细胞储液;

A. 上清蛋白样品:

1. 将上清储液置于 4℃离心机中 14000 rpm 离心 15 min。

Noted: 上清液中有甲醇和氯仿, -30℃下不会凝结。

2. 离心完毕后离心管中会分为三层: 上层为水相, 下层为有机相, 中间白色不透明絮状物层为蛋白样品相。先用移液枪吸去上层 1 mL 水相, 向体系中加入 1 mL 甲醇后, 上下颠转离心管。此时由于体系液体密度的改变, 蛋白样品会沉降到离心管靠近底部的位置。

3. 处理完毕后, 在 4℃离心机中 14000 rpm 离心 10 min。

4. 离心结束后, 先用吸泵吸去离心管中的液体, 再置于 55℃金属浴板加热 10 min。

Noted: 吸泵吸取液体时, 可将枪头紧贴于蛋白样品沉淀对侧离心管壁处, 以防不慎吸入蛋白样品; 允许离心管底部有少量液体残余, 参与液体可通过金属浴加热而被晾干。

5. 向离心管中加入 40 μL SDS Loading Buffer 后, 置于 100℃金属浴板上加热 10 min。

Noted: 加入 SDS Loading Buffer 时, 注意液体需要没过蛋白样品。

6. 从 100℃金属浴板上取下离心管, 冰上静置数分钟至样品充分冷却。

7. 室温下 14000 rpm 离心 3 min, 将上清液转移至新的离心管中, 弃置体系不可溶组分。

Noted: 注意转移上清液时标号的对应。至此, 上清蛋白样品制备完成。

8. 如果此时不立刻进行 Western Blot 实验, 可先将制备好的上清蛋白样品在-30℃条件下保存。

B. 细胞蛋白样品:

1. 取出细胞储液离心管中分别加入 20 μL IP 裂解液后, 在刮板上刮数次以重悬细胞。

Noted: 也可以利用漩涡混合器 Vortex 重悬细胞。

2. 冰浴裂解处理细胞 30 min。

3. 处理完毕后, 在 4℃离心机中 14000 rpm 离心 15 min。

4. 取 20 μL 离心后上清液转移至新的离心管中, 再加入 20 μL SDS Loading Buffer 混匀。

Noted: 注意转移时上清液与细胞样间标号的对应。

5. 将离心管置于 100℃金属浴板上加热 10 min。

6. 从 100℃金属浴板上取下离心管, 冰上静置数分钟至样品充分冷却。

7. 待样品冷却后, 常温下 8000 rpm 瞬时离心一次。

Noted: 瞬时离心是指待离心机转速上升至 8000 rpm 后就停止离心; 此操作目的是为了将附着于离心管管盖上的液体离心而下。至此, 细胞蛋白样品制备完成。

8. 如果此时不立刻进行 Western Blot 实验, 可先将制备好的细胞蛋白样品在-30℃条件下保存。

(四) 共聚焦显微镜(Confocal)细胞成像:

0. 细胞材料: HeLa 稳转 mNeonGreen-NLRP3。

1. 在成像实验的前一天将 HeLa 细胞铺至共聚焦四分皿中, 每组实验使用四分皿 3 孔。

2. 细胞贴壁生长后, 分别对 3 孔(Control, Nigericin 处理, Imiquimod 处理)进行实验条件处理(Fig. 3)。

3. 利用共聚焦显微镜进行细胞成像。

Noted:

a. 实验过程中如果发现无法找到焦面, 可以检查 Z 轴调节方向、显微成像模式、荧光通道状态以及镜头状态(例如滴加镜油)等情况。

b. 每组细胞每孔成像两张: ×1.0 Zoom 以及 ×4.0 Zoom。

4. 利用图像处理软件(如 ImageJ 等)简单处理并分析实验数据。

每孔液体体系总体积: 500 μ L	
Control Group	None
Nigericin Group	4 μ M Nigericin 处理 1 h
Imiquimod Group	120 μ g / mL Imiquimod 处理 1h

Fig. 3: The condition of each cell line for the confocus

(五) Western Blot 转染与干法扫膜:

0. 配制胶片: 配置 6-8 块浓度为 12 % 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳胶片

Noted: 实验中实际使用 4 块: 分别用于 THP-1、IBMDM 的上清蛋白样和细胞蛋白样;

1. 将配置好的胶片在电泳板上夹紧, 注意检查内槽液有无外漏现象;

2. 点样: 每个电泳孔道加入 10 μ L 蛋白样品 / Marker;

Noted: 蛋白样品需要 7 道(6 实验组 + 1 对照组); 在蛋白样品的两翼分别加入一道 Marker 便于后续裁膜操作(即共需 9 道); 注意记录孔道的蛋白样品信息

3. 设定电泳参数如下:

浓缩胶: 80 V, 15 min; 分离胶: 120 V 1.5 h

Noted: 可以在合适范围内适当增大分配电压以提高电泳的效率, 但注意控制电泳过程中电流大小: 电流过大时显著热效应容易使蛋白分解; 此外注意观察溴酚蓝与凝胶边缘的距离

4. 凝胶电泳(PAGE)完毕后进行转膜操作(槽式湿转):

- a. 准备洁净的 NC 膜(硝酸纤维素膜)和适量的湿转液(1 \times Transfer Buffer);

Noted: 1 \times Transfer Buffer 配置: 100mL 10 \times Transfer buffer + 800mL 蒸馏水+ 100mL 甲醇

- b. 用撬片将电泳板上的薄玻璃板撬去; 小心切除浓缩胶部分, 保留目标蛋白样部分的分离胶(注意不要将分离胶刮破);

- c. 依次按照: 海绵-滤纸-NC 膜-分离胶-滤纸-海绵 的顺序夹入转膜夹, 注意操作时应避免转膜夹内气泡的产生;

- d. 将转膜夹放入转膜槽中(特别注意阴阳极位置要相对应);

- e. 转膜槽加入冰浴降温处理, 加电压进行转膜操作;

5. 将转染后的 NC 膜适当剪裁后用 5 %脱脂牛奶(TBST 溶解)封闭处理 1 h;

6. 敷一抗, 检测的目标蛋白有:

hCaspase1、hGAPDH、hNLRP3; mCaspase1、mGAPDH、mNLRP3

(h: human; m: mouse)

敷完一抗后 4 $^{\circ}$ C 环境下过夜孵育;

7. 一抗孵育完毕后, 进行一抗清洗:

向表面皿中加入适量 1 \times TBST 后加入孵育完一抗的 NC 膜;

水平摇床上 180 rpm 15 min。重复清洗操作三次

Noted: 1 \times TBST 配置: 900 mL 蒸馏水 + 100 mL 10 \times TBST + 1 mL 土温

8. 清洗完毕后, 在水平摇床上 70 rpm、1 h 避光孵育二抗;

Noted: 二抗上有荧光基团, 注意避光以防淬灭

9. 二抗孵育完毕后, 同步骤 7. 进行二抗清洗:

向表面皿中加入适量 1 \times TBST 后加入孵育完二抗的 NC 膜;

水平摇床上 180 rpm 15 min。重复清洗操作三次

10. 干法扫膜(参数 800 + intensity 5); 获得 Western Blot 图像进行后续分析处理。

五. 实验数据分析:

(一) 共聚焦显微观察 HeLa 对 Imi 和 Nig 的响应模式:

Fig. 4 与 Fig. 5 是两组 HeLa 接受 Imi、Nig 处理(Fig. 3)后对 NLRP3 荧光成像的结果图:

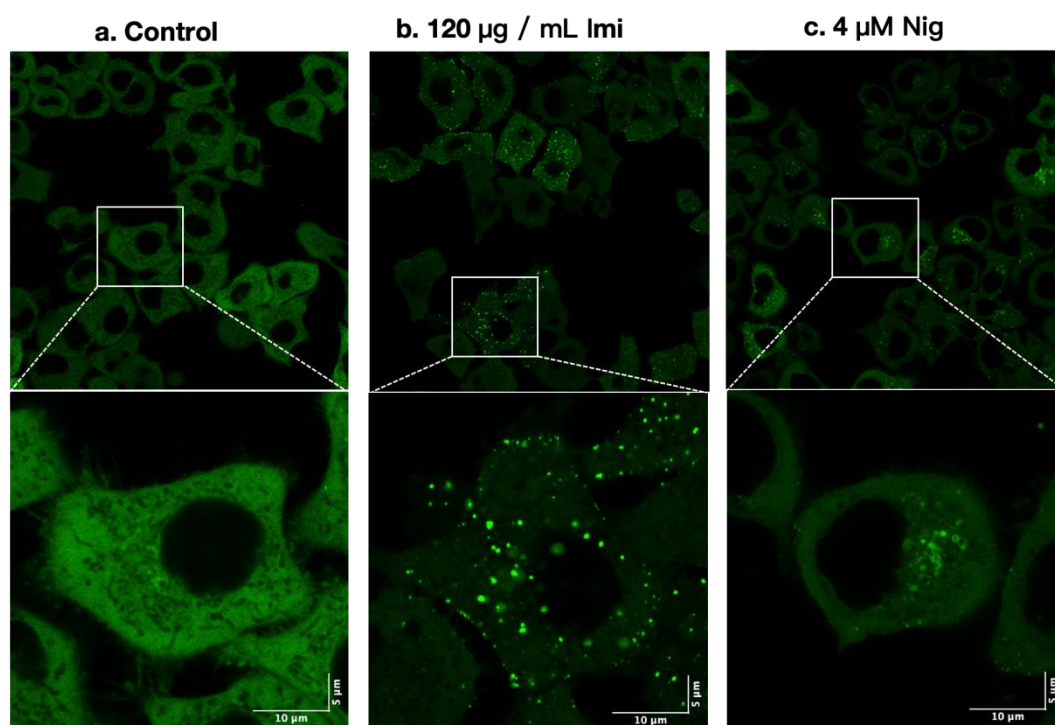


Fig. 4: Group 1 HeLa cell under the confocus to show the NLRP3

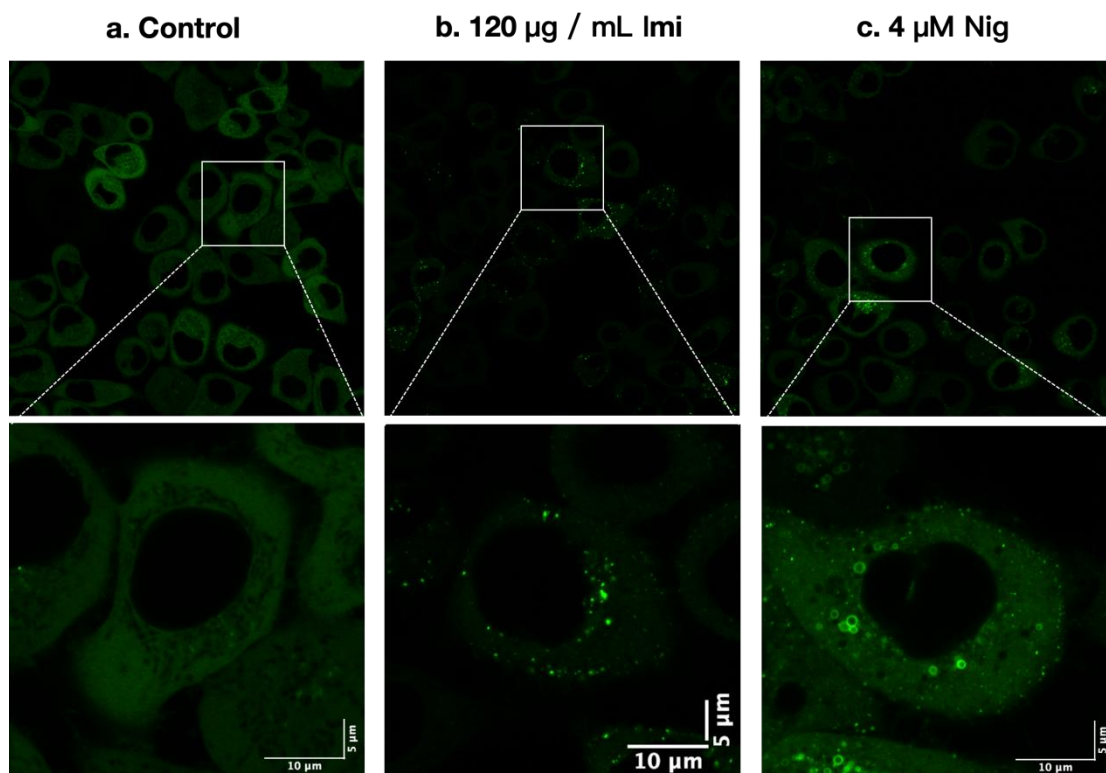


Fig. 5: Group 2 HeLa cell under the confocus to show the NLRP3

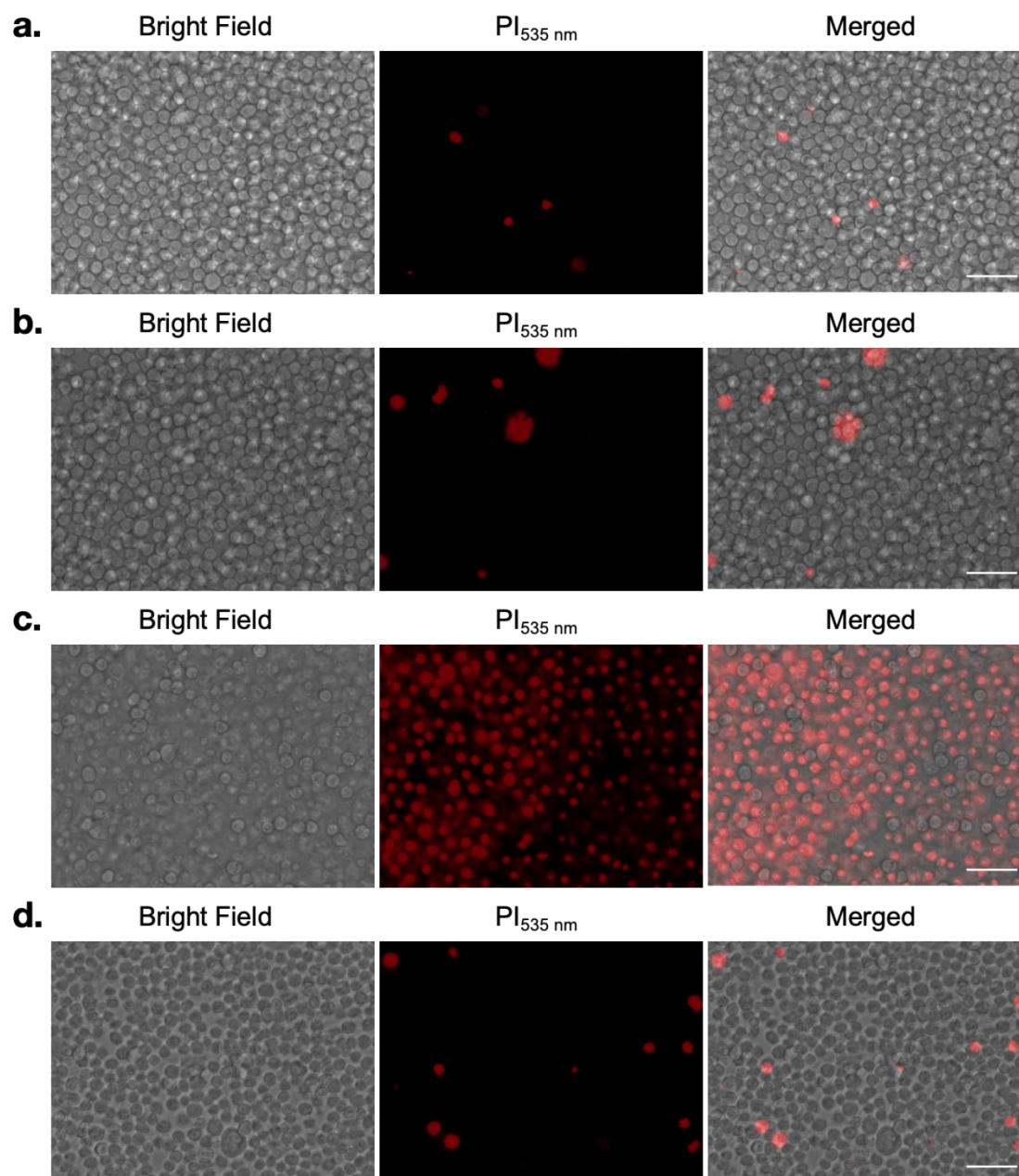
对比对照组，两组 HeLa 在接受 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Imiquimod 或者 4 μM Nigericin 处理后，细胞内 NLRP3 均出现明显的相分离现象。但是有所不同的是：120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Imi 处理后 NLRP3 的相分离液滴呈实心状；4 μM Nig 处理后 NLRP3 相分离液滴呈空心球壳状。

(二) THP-1 的 PI 染色结果分析：

PI(碘化丙啶)是一种可对细胞核中 DNA 染色的试剂，其在嵌入 DNA 之后会发出红色荧光。PI 不能穿过活细胞膜，但能透过破损的细胞膜，常用于细胞凋亡的检测。

PI 的激发光波长在 535 nm 左右，发射光波长在 615 nm 左右。

下列图(Fig. 6a - Fig. 6g)是对 THP-1 的 PI 染色结果分析图：



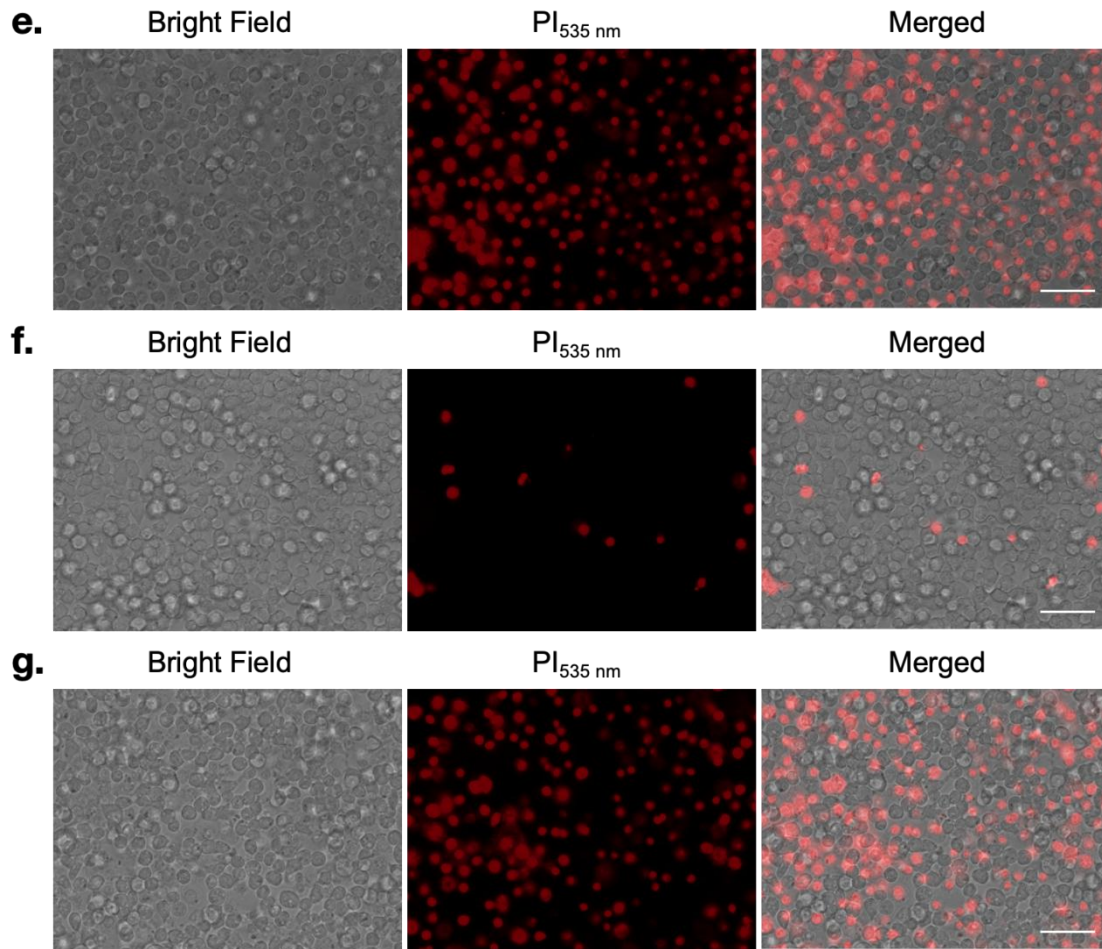


Fig. 6 Series: The PI results of the THP-1 under different conditions
(All scale bar is 50 μm)

a. Control; b. LPS 1h; c. LPS 1h + Nig 1h; d. LPS 2h
f. LPS 2h + Nig 1h; g. LPS 3h; g. LPS 3h + Nig 1h

由于处理的 THP-1 来自于同一批培养的细胞，认为每孔中 THP-1 的细胞密度是大体相当的。由此，我们可以设置 Control 组中荧光场下细胞数量为基数(Ground State)，借以对比各种不同实验条件下细胞焦亡的相对比率大小(Fig. 7)。

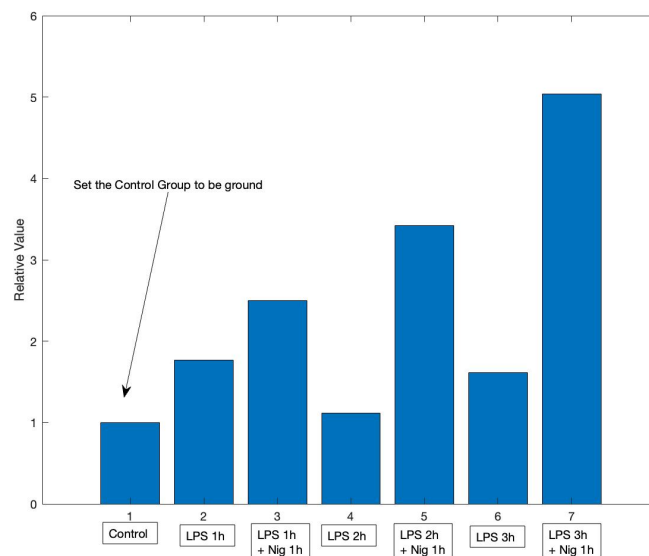


Fig. 7: the Relative Ratio against the Control Group (Powered by MatLab 2022b)

(三) THP-1、iBMDM 的 Western Blot 结果分析:

Fig. 8A 与 Fig. 8B 分别是 THP-1、iBMDM 的 Western Blot 干扫结果图。

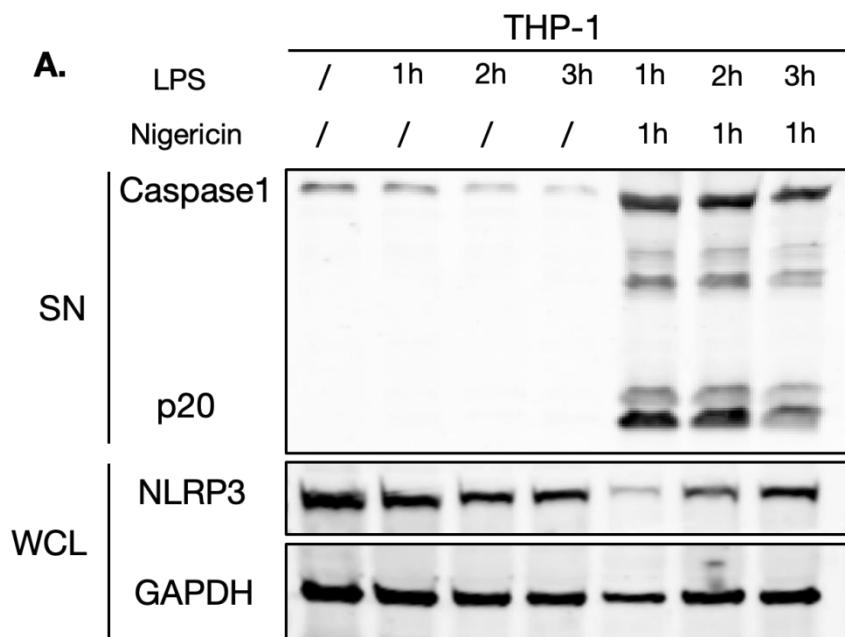


Fig. 8A: The WB result of the THP-1 (SN: 上清蛋白样; WCL: 细胞蛋白样)

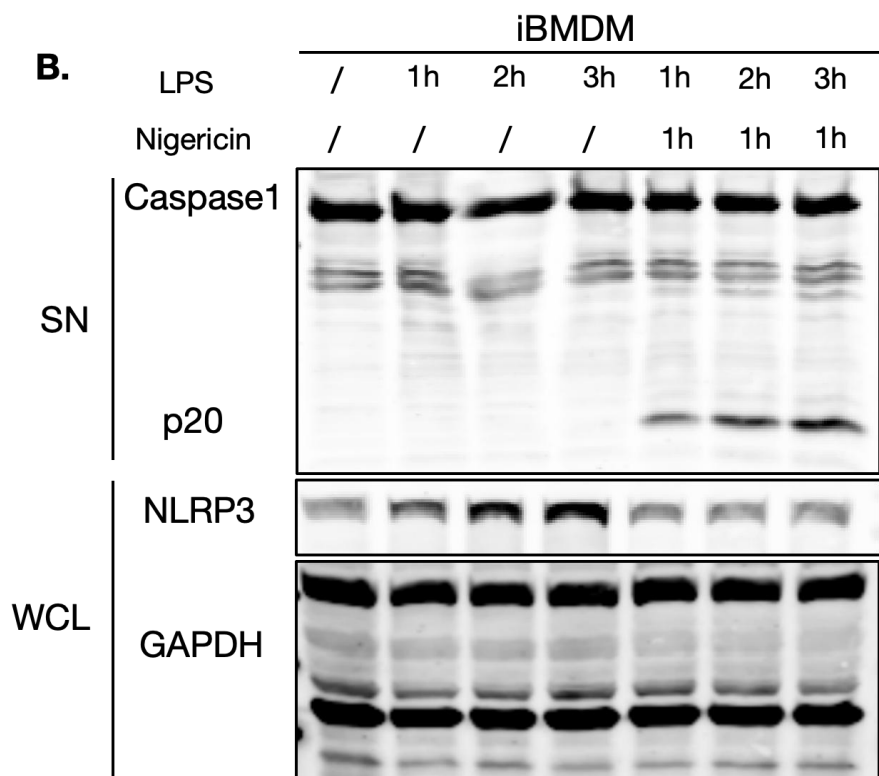


Fig. 8B: The WB result of the iBMDM (SN: 上清蛋白样; WCL: 细胞蛋白样)

直接观察 WB 结果图，可以定性地观察到：THP-1 中，Nigericin 对 NLRP3 的激活效果与 LPS 处理时长成正相关(条带由浅变深)；iBMDM 中 Nigericin 对 NLRP3 的激活强度似乎与 LPS 处理时长没有较强的关联性(条带均较浅)，可能是 NLRP3 已经开始被降解。

除此以外，THP-1 与 iBMDM 在 p20 的相对含量上也有一定的差异性。