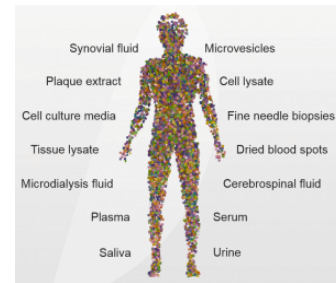


非标样本制备指南

对血清和血浆样本，Olink 进行了充分的优化与验证，这意味着各个指标的动态范围已经调整到血清和血浆中预期的蛋白浓度。虽然大量的非标样品类型与 PEA 技术相兼容(见右图)，但为了获得准确可靠的结果，确定每个特定基质的性能是很重要的。



非标样本预实验建议

由于不同样本类型的蛋白质组成不同，进行预实验可以确保您在最佳条件下分析样本，指导样品稀释，以确保数据在分析的动态线性范围内，以及是否存在任何有过饱和的风险。

Olink 建议的预实验包括：

- 至少要选择6-12个样本
 - 样本的选择应涵盖新基质的整个范围(例如：病例和对照组，不同的处理条件)。
 - 如果您预期样品间的差异很大(例如，组织培养反应的高可变性、扩展的样品处理条件或样品浓度)，则应增加预实验中分析的样品数量，并应包括额外的样品，以确定方法学中的变异性。这将帮助指导后续实验。
- 每个样品应至少用3个稀释梯度进行测试
 - 我们的panel开发充分考虑到血浆和血清中的蛋白组成和浓度跨度。应该使用什么稀释度取决于客户感兴趣的靶点蛋白以及浓度，这应该根据验证数据中的分析测量范围进行确认。
 - 我们的支持团队可以根据您对基质中蛋白质浓度的预期和所选择的panel，帮助您选择最合适的稀释度。
- 如果您正在分析组织培养样本，并怀疑不同样品之间存在高可变性(即细胞分化)，那么您应该测试重复样本，以确定方法中的可变性。
- 应该包含一个空白缓冲液进行测试，以检查缓冲液会不会干扰测定性能。

一旦您对预实验数据满意，您可以使用最优稀释运行所有样品。

非标样本需要考虑点

1. 标准化样品:测定蛋白质浓度或细胞密度

Olink 检测方法与人源细胞裂解液和组织裂解液兼容。不同组织(如心脏、大脑、肌肉)和不同细胞系(如稳定细胞系、原代培养、不同培养条件)的蛋白浓度预期会有所不同。Olink 建议将样品标准化至总蛋白浓度 0.5-1 mg/mL。由于培养基中少量蛋白质的高丰度，Olink 建议将细胞上清标本归一化到相同的起始细胞密度。

大多数标准的总蛋白测量方法(例如:Lowry, Bradford, BCA, Nanodrop 等)都可以用来测量蛋白质浓度。确保蛋白质测量方法与选择的裂解缓冲液兼容(见下文)。

2. 细胞和组织裂解物

以下细胞裂解液已经过测试, 并与 Olink 试剂盒兼容(均来自 Abnova)。

- 人骨髓基质细胞裂解液 Human bone marrow: bmMSCs (Art. no. L047V2)
- 人伯基特淋巴瘤细胞裂解液 Human Burkitt's lymphoma: Daudi (Art. no. L1001V2)
- 人结肠癌细胞裂解液 Human colorectal carcinoma: HCT116 (Art. no. L052V2)
- 人前列腺癌细胞裂解液 Human prostatic carcinoma: LNCaP (Art. no. L004V2)
- 人肝癌细胞裂解液 Human hepatoma: PLC/PRF/5 (Art. no. L011V2)
- 人乳腺导管癌细胞裂解液 Human breast duct carcinoma: T-47D (Art. no. L006V2)

以下组织裂解物已被测试(但不限于)

- 肿瘤穿刺组织 Tumour biopsies
- 肺组织 Lung tissue
- 肌肉组织 Muscle tissue
- 子宫内膜组织 Endometrial tissue
- 脑组织 Brain tissue
- 肠组织 Gut tissue
- 异种移植组织 Xenograft tissue

注意:我们还没有找到一种去除福尔马林并保持蛋白质结构的方法, 所以所有组织样本都应该是新鲜冷冻的。

3. 裂解缓冲液

在样品缓冲液中应避免以下成分:

- 普通洗涤剂浓度过高(最大量1%的triton, NP-40或tween)
- 离子去污剂(最高浓度~0.1%SDS或脱氧胆酸盐)
- 大量高或低pH值的缓冲溶液(pH值应在生理水平附近)
- 高水平EDTA(保持<~25mM)
- 变性组分
- 还原成分含量过高(例如:保持DTT < 1mM)
- 高盐浓度, 保证以下浓度:
 - <~250 mM NaCl
 - <25 mM KCl
 - <10 mM MgCl

以下缓冲液已经过测试, 可以用于 Olink 试剂检测细胞裂解液:

- NP40裂解缓冲液
 - 最终浓度:(Nonidet P40 1%, Triton X-100 0.1%, 磺基甜菜碱0.1%, NaCl 150 mM, 1X罗氏蛋白酶抑制剂(cat 11836153001), 1X Tris-EDTA缓冲液pH 8.0)。
- Bio-Plex细胞裂解缓冲液(cat 171-304011, Bio-Rad), 使用前加入以下缓冲液: +因子1

和2(来自试剂盒)+罗氏蛋白酶抑制剂鸡尾酒(cat 11 836153001)

- M-PER哺乳动物蛋白提取试剂
 - 客户使用TPER(组织样本)进行Olink实验没有任何问题。我们在其他样本类型中使用MPER尚未见到有任何问题

以下缓冲液已验证可用于 Olink 方法检测**组织裂解液**:

- RIPA裂解液
 - 1倍裂解缓冲液:50 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate。
- 市售RIPA缓冲液
 - (10X) Millipore; cat # 20-188(0.25%脱氧胆酸盐, 相兼容)
- T-PER组织裂解液
- 添加蛋白酶抑制剂到新鲜的1x缓冲液
 - 1 mM PMSF和
 - 蛋白酶抑制剂鸡尾酒(最终浓度 10.4 mM AEBSF, 8 μ M Aprotinin, 0.2 mM Leupeptin, 0.4 mM Bestatin, 0.15 mM Pepstatin, 0.14 mM E-64)

其他缓冲液或溶液

- 110 mM碳酸氢铵pH 8.0

不兼容的裂解缓冲

- 商业可用的RIPA缓冲 (10X) Sigma; cat # R0278(1%脱氧胆酸盐)

4. 样品浓度要求

在准备所有的样品之前测试制备方法, 以确保得到满意的蛋白含量的样品。可以对样本进行后续的浓缩, 但这样有使蛋白质变性的风险, 会损失一定的分子量以下蛋白质, 这也取决于选择的方法。

样本制备建议

外泌体

外泌体样品所推荐的总蛋白浓度与细胞和组织裂解液相同:0.5-1 mg/ml。建议添加一个由纯缓冲液组成的空白样品。如果预期有高水平表达量的蛋白质:应添加一些浓度梯度稀释的样品,包括用于确定过饱和(hook effect)问题等。

以下是一位客户外泌体使用裂解缓冲液的例子,可以在文章中找到 Larssen *et al.*

<http://www.mcponline.org/content/early/2017/01/22/mcp.M116.064725.full.pdf+html>

外泌体用裂解缓冲液(50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8), 1% Triton X-100 和 0.1%去氧胆酸钠)裂解,使用前加入 Complete Mini 蛋白酶抑制剂,样品涡旋混合。

Olink 已经测试并发表了一些不同外泌体的制备方法的工作,以下是我们的发表文献:

- 血浆SEC和细胞系超离心
<https://clincancerres.aacrjournals.org/content/clincanres/early/2019/01/24/1078-0432.CCR-18-2946.full.pdf>
- 超离心
<https://www.mcponline.org/content/mcprot/early/2017/01/22/mcp.M116.064725.full.pdf>
- 超离心<https://www.nature.com/articles/s41388-018-0136-0>
- 试剂盒提取ExoQuick, Systems Biosciences:
https://journals.lww.com/aidsonline/Fulltext/2019/09010/Profile_of_neuronal_exosomes_in_HIV_cognitive.2.aspx

Qiagen exoEasy Maxi Kit 研究

我们也做了一项研究,使用 Qiagen exoEasy Maxi Kit。首先用 0.8um 过滤器过滤所有患者的血浆和细胞培养上清(细胞系培养衍生的外泌体)。然后使用市售的 Qiagen exoEasy Maxi Kit 通过柱状分离分离外泌体。外泌体在 Buffer XE 中洗脱(随试剂盒提供)。Buffer XE 洗脱后, Bio-Rad DC 蛋白测定法定量。根据蛋白量的不同,外泌体用含 1-3% NP40 清洗剂的裂解缓冲液裂解(数量取决于起始浓度)。使用 Bio-Rad DC 蛋白测定再次定量最终蛋白浓度。

注意:

- 我们不能确定哪些类型的外泌体被捕获,以及它们有多均质化。
- Buffer XE的组成是有专利的,我们不知道它的确切组成,除了它的高渗性(显然它有非常高的盐浓度)。
- 当我们使用Olink进行测试时,由于样品含盐量高,我们需要稀释样品以获得良好的可检测性,从而降低了蛋白的含量。我们不能检测到所有的蛋白,但仍然可以获得初步数据。
- Olink建议在不同的缓冲液中洗脱,例如NP40裂解缓冲液。