

分析非标样品

外泌体制备指南

外泌体/细胞外囊泡 (EVs) 是存在于不同尺寸 (纳米到微米) 的膜质囊泡。细胞外囊泡的大小决定了其类型与每种囊泡的名称 (如外泌体、微囊泡、巨囊泡、大囊泡、中间囊泡等)。细胞外囊泡是中空的, 含有蛋白质 (即货物 Cargo), 代表了健康和疾病的重要标志物。

一般准则

外泌体必须以液体形式制备, 以便与 Olink 平台的分析兼容。建议样品的总蛋白浓度为 0.5-1 mg/mL。组内的所有样品应标准化为相同的浓度。

一个由纯的裂解液组成的空白样应与样品一起分析以评估潜在的干扰 (关于裂解缓冲液的建议见下文)。

为了评估潜在的过饱和蛋白 (hook effect), 建议每个不同处理条件下的样品组再添加分析几个包含两个浓度梯度稀释的样品。

详细指南

采样

所有的外泌体都可以用类似的方法 (如超速离心、差速离心、聚乙二醇、试剂盒或磁珠等) 进行分离。

裂解缓冲液

常用于裂解细胞的裂解缓冲液也可用于裂解外泌体, 并应始终补充蛋白酶抑制剂。

注意: 细胞和组织裂解的 protocol 可能会稀释外泌体样品, 导致其蛋白浓度非常低。请参阅外泌体裂解液的准备注意事项, 遵循 Olink 公司的建议。

与 Olink 技术相兼容的裂解缓冲液

以下缓冲液已经过测试, 可以用于 Olink 检测:

- NP40裂解缓冲液
 - 终浓度: (Nonidet P40 1%, Triton X-100 0.1%, Sulfobetaine 0.1%, NaCl 150 mM, 1X Proteinase Inhibitors from Roche (cat number 11836153001), 1X Tris-EDTA buffer pH 8.0).

- Bio-Plex细胞裂解缓冲液 (cat number 171-304011, Bio-Rad), 在使用前加入以下缓冲液: + Factors 1 and 2 (from the kit) + 蛋白酶鸡尾酒抑制剂 Protease inhibitor cocktail from Roche (cat number 11 836153001)
- M-PER 哺乳动物蛋白提取试剂 Mammalian protein extraction reagent
- RIPA 裂解液 RIPA Lysis Buffer
1x lysis buffer: 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 Commercially available RIPA Buffers
— (10X) Millipore; article #20-188 (0.25% deoxycholate, 可兼容)
- T-PER 组织样本蛋白提取试剂 Tissue protein extraction reagent

不兼容的裂解缓冲液

- 市售RIPA缓冲液
— (10X) Sigma; article # R0278 (1% deoxycholate, 不兼容)

避免在裂解缓冲液中出现以下情况:

- 浓度过高的普通洗涤剂 (~1% max of Triton, NP-40 or Tween)
- 离子洗涤剂 (~0.1% max of SDS or deoxycholate)
- 过高或过低pH值的重度缓冲溶液(pH 应在生理水平左右)
- 高浓度的EDTA (< ~25 mM)
- (导致蛋白)变性成分
- 过高的还原剂成分(e.g., <1 mM DTT)
- 高浓度的盐, 保持浓度低于:
 - <~250 mM NaCl
 - <25 mM KCl
 - <10 mM MgCl

蛋白酶抑制剂

蛋白酶抑制剂可以作为某一类蛋白酶 (如丝氨酸蛋白酶 serine proteases) 的单独蛋白酶抑制剂来补充, 也可以作为包含所有不同类型蛋白酶抑制剂的鸡尾酒来补充, 如 Roche (cat number 11836153001)。

裂解缓冲液中蛋白酶抑制剂常用的浓度

- 1 mM PMSF
- 蛋白酶鸡尾酒抑制剂 Protease Inhibitor cocktail (final concentration 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)
- NaF concentrations range from 5-10 mM
- Na_3VO_4 at 1-2 mM concentration.

制备外泌体裂解样品 protocol 示例

始终在 4°C 的缓冲液 (如 PBS) 中保存或收集外泌体, 并尽快进行处理/裂解。在制备外泌体裂解物之前, 冷冻会导致外泌体破裂和蛋白货物的丢失。仅在通过 (超) 离心法 (即以颗粒形式) 富集得到外泌体时可在 -80°C 下冷冻保存。

- 用 25 μ l 的裂解缓冲液开始裂解外泌体 (使用新鲜加入的蛋白酶抑制剂; 将裂解液放在冰上)。
- 在冰上进行 5 分钟裂解; 在孵育过程中涡旋震荡一到两次。
- 裂解完成后, 样品应该看起来很清晰, 没有残留碎片。
- 检查裂解后的蛋白浓度。如有需要, 可向裂解液中加入更多的缓冲液 (含有蛋白酶抑制剂), 以调整到 Olink 的建议浓度。
- 如果提取蛋白的数量/质量不理想, 可以通过延长裂解的孵育时间来优化。增加裂解物在冰上的孵育时间 (如 10 min), 或增加裂解缓冲液的体积至 30 μ l; 进行逐步调整以达到最佳结果。
- 进行蛋白浓度测定和归一化后, 如果可能, 将裂解产物等份分装并保存在 -80 °C 直至分析使用。

归一化外泌体样品中的蛋白浓度

有许多方法被建议用于外泌体样品的标准化。选择一种最适合你的外泌体类型和裂解液制备方法的方法。以下是不同方法的列表:

1. 总蛋白浓度: (0.5-1 mg/ml)
2. 外泌体颗粒数目: 如果已进行 Nanosight 颗粒分析, 不同的样品可以根据总的外泌体颗粒数目归一化 ([Link 1](#))
3. 细胞数目: 归一化为生成外泌体的细胞数 ([Link 2](#))
4. 根据外泌体一般标记物 (e.g., CD63, CD81, or CD9) 来归一化 ([Link 3](#))
5. 如果研究某一特定类型的外泌体, 可采用其特定的标志物进行归一化 ([Link 4](#))

使用 Olink 技术的研究

- 用于血浆样品的Sepharose的CL-2B SEC柱, 以及细胞系的超速离心法 ([Link 1](#))
- 超速离心法 Ultracentrifugation. ([Link 2](#))
- 使用ExoQuick, Systems Biosciences. ([Link 3](#))
- 使用Qiagen exoEasy Maxi Kit (外泌体Exosomes)
 - 在使用该试剂盒之前, 用0.8 μ m过滤器对样品进行预过滤
 - 建议使用试剂盒提供的洗脱液XE之外的另一种缓冲液进行最终洗脱, 例如NP40裂解缓冲液

联系方式

云生物电话 : +86 21 60523158

云生物邮箱 : yunbios@163.com

如有任何技术问题请联系 : yunbios@163.com

云生物公众号

