

分析非标样品

(皮肤)胶带制备指南

从胶带中提取的蛋白浓度可低至 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，因此从胶带中提取蛋白总是需要优化，以获得足够的蛋白浓度用于生物标志物分析。

对样品采集和蛋白提取的建议：

- 在项目中使用相同类型和大小的胶带来收集所有的样品。
- 采集样品时行使相同的压力（如 225 gr/cm^2 ）和与皮肤接触的时间（如 5 秒或 10 秒）。
- 从胶带上提取蛋白时，使用相同的超声处理时间（在冷水浴中 10 或 15 分钟）。
- 采集 15 至 30 条胶带，以确保有足够的样品用于蛋白提取，并从同一病人的不同部位取样。
- 样品蛋白提取的选择取决于该研究对哪种类型的蛋白感兴趣。PBS 缓冲液（+0.05% Tween20）可以有效地提取可溶性蛋白质，而更强的裂解缓冲液如 RIPA 则建议用于同时提取可溶性和不溶性蛋白质。
- 我们强烈建议在开始样品准备和提取项目中的所有样品之前，先提取一到两个样品检查蛋白产量。在提取所有样品前根据需要修改流程以优化产量。
- 使用相同的蛋白质测量方法（BCA, Bradford, Qubit 或 Nanodrop）来测量样品中的蛋白浓度；检查所用缓冲液与蛋白测量方法的兼容性。
- Olink 建议样品的蛋白浓度在 0.5-1 mg/ml （= $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ）之间。蛋白浓度较低的样品也可以在 Olink 平台上进行分析，但其蛋白检出率会有所下降。

Protocol (General)

皮肤胶带通常使用温和的缓冲液（PBS + 0.05% Tween 20）或 1X RIPA缓冲液（50mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% deoxycholate钠）进行提取。通常，从提取中可以得到少量的蛋白质（0.04-0.63 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ），因此需要对流程进行优化。下面的protocol是之前的文献中所采用的。

使用强裂解缓冲液

- 将胶带切成小条块，放在缓冲液（如RIPA）中，在超声波冷水浴中超声处理（15分钟，0-4 $^{\circ}\text{C}$ ），从而从胶带中提取蛋白。
- 多个胶带条可以在最小的缓冲液体积中相混合，以最大限度地提高蛋白浓度。

制备示例（见参考文献）：

- 对于每个病人，从上部或下部的代表性病变和非病变皮肤上收集30条连续的胶带(D-Squame 3.8 cm², CuDerm) 并进行连续标记。
- 每个条带以标准化压力 (225克/平方厘米) 压在皮肤上10秒钟，然后从皮肤上剥离。
- 第3号和18号胶带被汇集在一起，用于后续蛋白提取。
- 对于每个样本，将第3号和18号带子切成四分之一，并放在8个试管中。
- 在第一个试管中加入300μL的RIPA缓冲液，然后在超声波冰水浴中 (0-4°C) 超声15分钟。
- 将提取物转移到下一个试管中，再进行15分钟的超声处理。每个样品共重复8次。

对于每个样品，在 90μL 的蛋白提取物中裂解 10 ng 的蛋白，并使用高通量蛋白质组学 Olink PEA 方法进行分析。

注意：上述 protocol 也可用于使用温和的缓冲液 (PBS+0.05% Tween-20) 提取蛋白。

参考文献： He H, et al. **Tape-Strip Proteomic Profiling of Atopic Dermatitis on Dupilumab Identifies Minimally Invasive Biomarkers.** Front Immunol. 2020. 11:1768.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32849633/>

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 lysis buffer
 - Final concentration: (Nonidet P40 1%, Triton X-100 0.1%, Sulfobetaine 0.1%, NaCl 150 mM, 1 X Proteinase Inhibitors from Roche (cat number 11836153001), 1X Tris-EDTA buffer pH 8.0).
- Bio-Plex Cell lysis buffer (cat number 171-304011, Bio-Rad), add the following to the buffer just prior to use: + Factors 1 and 2 (from the kit) + Protease inhibitor cocktail from Roche (cat number 11 836153001)
- M-PER Mammalian protein extraction reagent
 - Customers have used TPER (for tissue samples) with Olink without any problems.
- 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.
- Commercially available RIPA Buffers
 - (10X) Millipore; article #20-188 (0.25% deoxycholate, 兼容)
- T-PER tissue protein extraction reagent

不兼容的裂解缓冲液

- Commercially available RIPA Buffers
 - (10X) Sigma; article # R0278 (1% deoxycholate, 不兼容)

如果使用上述以外的缓冲液，请确保所选择的裂解缓冲液符合下文所述的 Olink 建议。

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)。

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

