

分析非标样品

干血斑制备指南

干血斑 (DBS) 样品已成功使用Olink Target 96和Olink Explore平台进行分析。样品的制备因Panel是否需要稀释、所使用的平台以及样品被送往瑞典或美国的分析实验室而有所不同。本协议以瑞典乌普萨拉分析实验室为例。

FTA 样品采集卡

Olink 评估并优化了在数种 FTA 卡上进行干血斑采集的方案。推荐以下三种类型的 FTA 卡用于 Olink 的检测，在 Target 96 和 Explore 平台的检出率均很好：

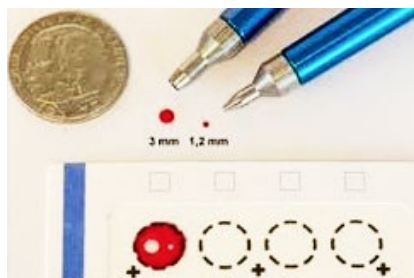
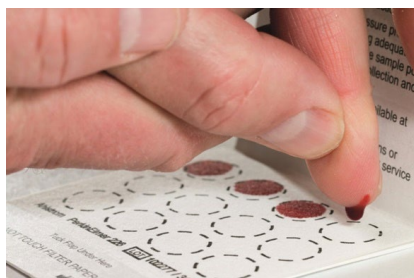
- Whatman' s 903 filter
- Whatman' s DMPK-C filter
- Ahlstrom Munksjö-TFN

而下面两种FTA卡用于Olink的检测效果不佳：

- Noviplex
- Perken Elmer 226 Spot Saver

这两种FTA卡的洗脱效果不好，既残留了大量的提取缓冲液，同时液不能很好地溶解样品。这将导致在运行Olink分析时检出率降低。

对于之前没有在Olink测试过的FTA卡，或者显示出上述洗脱效果不佳的FTA卡，Olink建议客户在寄送样品前在内部进行洗脱尝试，以检查回收的样品量和样品是否正常洗脱（即稀释液体积损失最小，洗脱液变成深粉色/橙色）。洗脱的实验流程详见本文件中的章节--**样品制备：预稀释面板（3毫米Ø打样孔）和Explore平台**。如果洗脱出现问题，可检测性可能比预期的要低。在这种情况下，客户需自行承担样品的运行风险。



样品采集

根据制造商的说明进行受试者血样的收集。确保血样已经通过滤纸到另一侧。

样品制备

干血斑样品的制备根据所选择的 Olink 分析平台而有所不同

Olink Target 96

无需预稀释的 Target 96 panels

1. 血液（如指尖或静脉）被收集在 FTA-卡上，确保出血已经通过滤纸到另一侧。
 2. 从卡上收集一个 1.2mm 直径的打孔样品，直接放入 96 孔板内。
 3. 将 1µl 的样品稀释液和 3µl 孵育反应液一起加入到免疫反应中。在整个孵育和 PCR 步骤中，该血斑将留在培养板的孔中。
- **注 1:** 采集卡的制备工作由分析服务实验室完成
 - **注 2:** 如果按照说明将卡片填满并一直填到边缘，每个点大约可以打 4 个采集样品（即每个干血斑提供足够的材料来运行 4 个 panel)

样品需要预稀释的 96 panels (CAM, CVDIII, MET, DEV)

从 FTA 中取出一个 3 mm \varnothing 的打孔样品，用 20 μ l 样品稀释液洗脱。Olink 公司建议送从两个打孔样中提取的 40 μ l 样品在预稀释的 panel 上进行分析。Protocol 细节请见下文。

Olink Explore

从 FTA 中取出一个 3 mm \varnothing 的打孔样品，用 20 μ l 样品稀释液洗脱。Olink 公司建议送从两个打孔样中提取的 40 μ l 样品在预稀释的 panel 上进行分析。Protocol 细节请见下文。

样品制备：预稀释面板（3 毫米 \varnothing 打样孔）和 Explore 平台

所需材料与试剂:

- 1.5mL LoBind 微离心管（用于蛋白质实验）
- 96-孔 全裙边 PCR 板 (e.g. Sarstedt #72.1980.202) (可选)
- 96-孔板封膜: Life Technologies #4306311 (可选)
- FTA 血样采集卡打孔器, 3mm
- 1X PBS
- TWEEN20
- 离心管 (1.5 ml EP管) 振荡器/摇床
- Roche (罗氏) 蛋白酶抑制剂 (cat. number 11 836153001)

制备流程:

1. 收集所有干血斑样品。确保血样已经通过滤纸到另一侧。
2. 小心地从卡上收集一个3 mm 直径的打孔样品，放入LoBind微型离心管中。确保不要向样品引入任何污染。
 - **注意：**在病人之间使用空白打孔以清洁打孔器
 - **注意：**如果使用镊子，请确保在每个样品之间清洁镊子，以避免交叉污染
3. 根据以下配方准备10 mL洗脱缓冲液：
 - 1X PBS + 0.05% TWEEN20 + 蛋白酶抑制剂
 - **注意：**准备好溶液并**在使用前新鲜加入蛋白酶抑制剂**。蛋白酶抑制剂的工作溶液是1片/10mL缓冲液，因此建议准备10mL的库存溶液。加入蛋白酶抑制剂的洗脱缓冲液不能储藏后再次使用。
4. 对每个3 mm的打孔样品，在微离心管中加入20 μ L的洗脱缓冲液。
 - **注意：**一个3 mm的样品应该包含大约3 μ L的干血，大约一半（1.5 μ L）为血浆（另一半为细胞）
 - **注意：**如果为每个样品准备一个以上的3 mm打孔样品，建议在不同的试管中准备，在洗脱步骤后将洗脱液合并
5. 确保液体容量覆盖整个打孔样品，并且样品可以在试管中轻松移动。
6. 盖上盖子，将试管放在摇床上，以 528 rpm 在室温下震荡1小时（或 600 rcf；可以看到缓冲液的移动）。
7. 完成后，从摇床中取出样品，将洗脱液转移到新的试管或96孔板中。在这一步记得检测洗脱液的体积。一个好的洗脱样通常可以得到大于17 μ L/打孔样品。
8. 立即将分装好的样品转移到-80 $^{\circ}$ C的冰箱中，直到将样品运送至Olink公司。

注意： Olink 需要 40 μ L 的样品量，这意味着需要准备两个 3mm 的打孔器。每个打孔样品都是单独准备的，然后合并在一个管子里。

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

