

分析非标样品

泪液制备指南

用 Olink 平台分析眼泪样品

请注意，有两种类型的眼泪：基础性和反射性眼泪。这两种泪液类型具有不同的蛋白组成。

泪液中蛋白的浓度会受到各种因素的影响，包括反射性流泪、收集方法和收集后的样品处理。从同一个人的两只眼睛收集的样品，其总蛋白质含量的异质性较小。

人类眼泪的总蛋白浓度在 6-11 mg/ml (=μg/μl) 之间，其中约1 mg/ml 由溶菌酶蛋白组成。

收集眼泪的最常见方法是用泪液试纸 (Schirmer strip) 或毛细管 (microcapillary tubes). 用Schirmer试纸或毛细管收集的样品应直接处理或储存在-80 °C直至进一步处理。

毛细管

注意

基础泪液以0.5-2.2 μl/min的速度持续产生。使用容量为10 μl的毛细管，在10分钟内收集样品。对于一个项目中的所有样品，分别从每只眼睛收集相同体积的泪液。

Protocol

将毛细管转移到刺破的0.5 ml管中，并将其离心1分钟 (13,000 rpm/min) 到1.5 ml管中，收集泪液。

测量样品中的蛋白浓度。将项目中的所有样品归一化为0.5-1 mg/ml之间的浓度，以得到适用Olink分析的结果。请注意，所有的样品应具有相同的起始浓度。

任何标准的蛋白质测量方法（如BCA，Bradford，Nanodrop或Qubit）都可用于样品中蛋白的定量（检查方法兼容性）。对项目中的所有样品使用相同的蛋白测量方法。

在分析之前，将样品储存在-80 °C。

泪液试纸 Schirmer strip

注意事项

- 收集在一个项目中所有样品时，使用相同类型的Schirmer试纸和mm容量。
- 泪液试纸测试通常是在闭上眼睛的情况下将试纸条的下部与下眼睑接触5分钟。
- 泪液试纸与眼睛接触的部分可能含有脱落的细胞，或接触到从损伤细胞中渗出的胞内蛋白。如果在蛋白组图谱中不希望出现这种情况，可以将与患者眼睛接触的部分剪掉。即位于试纸条上 0 mm标记之前的部分。
- 目前还没有关于蛋白在泪液试纸内迁移的充分数据，因此建议从整个试纸条中提取蛋白，以免引入与试纸条上的蛋白迁移相关的蛋白组图谱的任何偏差。

Protocol

- 在 Eppendorf 管（或类似的管子）中放置 Schirmer 试纸，样品部位朝下。
- 用相同的命名法给每个试管作标记。
- 储存在-80 °C，直到送至分析地点。洗脱或继续储存在-80 °C 直到分析。

注意! 由于荧光素(fluorescein)会干扰Olink技术，请不要收集在过去24小时内接受过荧光素治疗的患者
的眼泪。

Olink实验室此前的protocol (Target 96)

- 将从泪液试纸上打出的直径 1.2 mm 的样品与 1 μ L 样品稀释液一起直接加至孵育反应中。
- 延伸和检测反应步骤按照正常实验程序进行。
- 每个泪液试纸条可以用于检测一个Olink panel.

建议实验方案（可用于Target 96和Explore）

将Schirmer试纸切成小块（2mm 或5mm 段；如0-5mm，5-10mm，15-20mm等），并置于一个干净的管子中。

加入洗脱缓冲液（1X PBS + 0.05% TWEEN20 + 蛋白酶抑制剂），使其覆盖条带的所有部分（50-300 μ L）（所需体积需要测试，并与提取到的蛋白量交叉检查）

注意：在使用前准备好工作溶液并加入蛋白酶抑制剂。蛋白酶抑制剂的工作溶液是1 tablet/10mL的缓冲液，因此建议准备10mL的缓冲液库存。将准备好的缓冲液加上蛋白酶抑制剂后，不能将之储存并在之后重复使用。

将样品在冷水浴中（0-4 °C）超声处理15分钟；或放在振荡器上（600rpm；足以看到条带移动），在室温下1小时。使用这两种方法中的任何一种。

将试管高速离心（15,000 x g, 5 min, 4 °C），收集洗脱液到一个新的管内。测量蛋白浓度，并在分析前将其归一为0.5-1 mg/ml，或储存于-80 °C。请注意，所有样品应归一化为相同的起始浓度。

任何标准的蛋白质测量方法（如BCA, Bradford, Nanodrop或Qubit）都可用于样品中蛋白的定量（检查方法兼容性）。对项目中的所有样品需使用相同的蛋白测量方法。

References

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33980989/>

Bachhuber F, et al. **Diagnostic biomarkers in tear fluid: from sampling to preanalytical processing.** Sci Rep. 2021. 11:10064.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7351636/>

Nättinen J, et al. **Comparison of Capillary and Schirmer Strip Tear Fluid Sampling Methods Using SWATH-MS Proteomics Approach.** Transl Vis Sci Technol. 2020. 9:16.

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

