

分析非标样品

细胞培养上清制备指南

细胞培养上清 (cell culture supernatants) 或条件培养基 (conditioned medium) 是指含有实验室培养的细胞所分泌的蛋白质的培养基。培养的细胞可以是同质的 (即包含一种类型的细胞, 无论是原代的还是永生化的) 或异质的 (如来自体外活检或类器官)。

使用 Olink 技术分析的一般准则

Olink 的一般建议是采用细胞浓度/密度而不是蛋白浓度。这是因为细胞培养基通常含有高浓度的添加蛋白, 因此蛋白浓度高低不一定对应所关注的蛋白。

一个参考例子是以下文献: Villani et al., Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. (2017) Science. 其中经纯化的细胞亚群在 96 孔圆底平板中以 5×10^3 个细胞/孔的密度进行培养。文章链接 ([article link](#))

在收集培养上清之前, 建议在细胞培养基中培养细胞, 在 PBS 中清洗 3 次, 并在无血清培养基中再培养 24 小时, 然后再离心并收集上清液。

细胞培养上清样品通常与一个空白培养基样品一起以原液方式进行分析。如果预期有任何蛋白是高诱导表达的, 建议至少分析几个不同条件的样品, 作两个浓度的梯度稀释, 以检测可能的浓度过饱和。

详细指南

培养基

在实验室中有不同类型的培养基用于培养细胞, 其中一些是通用培养基, 用于不同类型的细胞 (如 DMEM、RPMI-1640), 而另一些则是为特定类型的培养物配制的 (如细胞分化培养基、干细胞培养基或类器官培养基)。除了培养基外, 细胞培养的生长和维持需要在培养基中补充血清、白蛋白成分 (即高级培养基) 以及生长因子。所用培养基的类型、血清和生长因子都是分析细胞培养上清时需要考虑的重要因素。

在培养基中含有良好的分泌蛋白浓度是很重要的, 否则生物标志物的检出率就会下降。然而有一些技术可以优化培养基中的蛋白质产量。

优化蛋白产量

分泌到培养基中的蛋白量通常较低，因此可能需要进行优化以提高蛋白产量。要做到这一点：

- 减少同等细胞数/组织培养瓶或培养孔数量下的培养基体积。在这种情况下，每个体积内会有更多的分泌蛋白（在所有实验中使用相同的体积）。
- 包括更多的技术性重复（即从多个组织培养瓶中收集上清）、使用更大的组织培养瓶、并浓缩收集的样品中的蛋白。
- 使用限值较小的离心柱（如只有 3K 道尔顿或 10K 道尔顿）将样品浓缩到较小的体积，以避免浓缩过程中的蛋白损失。

注意：如果在蛋白浓缩中使用离心柱，在离心前将蛋白酶抑制剂加入到条件培养基中。在 4°C 下离心，并一直保持样品低温。

注意：检查所使用的蛋白测量方法与培养基的兼容性，以及所选择的方法是否能检测到非常低的蛋白浓度（见下一节）。

培养基

建议使用不含 pH 指示剂的培养基（例如：苯酚）。彩色指示剂的存在会干扰大多数用于蛋白质浓度估计的方法。

不同测量蛋白浓度的方法都可以使用（如 BCA、Nanodrop、Qubit 等）。检查该方法与培养基的兼容性。如果怀疑蛋白浓度较低，可使用 BCA 或 Qubit 代替，因为这两种方法的检测限可低至 5 ng/μl。

血清、白蛋白或生长因子

血清、白蛋白或生长因子都是蛋白质，它们在培养基中的存在会干扰对分泌到培养基中的蛋白的准确测量。如果可能的话，在收集分泌蛋白进行 Olink 分析时从培养基中去除这些成分。

关于（添加）血清的进一步说明

尽量减少血清或蛋白的残余

- 在实验前让细胞饥饿 24 小时。如果不能在这段时间内进行细胞饥饿，可以在实验开始前让细胞在规定的短时间内饥饿处理以脱离血清（例如，1 小时或 2 小时；所有处理中的时间需相同）。
- 使用温热的缓冲液彻底清洗细胞培养瓶/烧瓶/培养孔，以去除先前孵育时的血清和蛋白。

进行炎症研究时

- 如果您的研究旨在检查培养细胞的炎症，请使用经过认证的、低内毒素水平的血清和缓冲液。

分泌蛋白 vs 胞内泄漏蛋白

在检查某些细胞的分泌组蛋白时，有可能由于实验过程中的细胞死亡或坏死事件，一些细胞内的蛋白会泄漏到培养基中。如果发生这种情况，泄漏的蛋白就不能代表所研究的细胞分泌组。如果对细胞内蛋白污染有任何担心，可以对收集到的细胞培养上清样品进行 Western blot 检测，对具有细胞核或细胞质定位且无分泌信号的蛋白进行抗体检测。

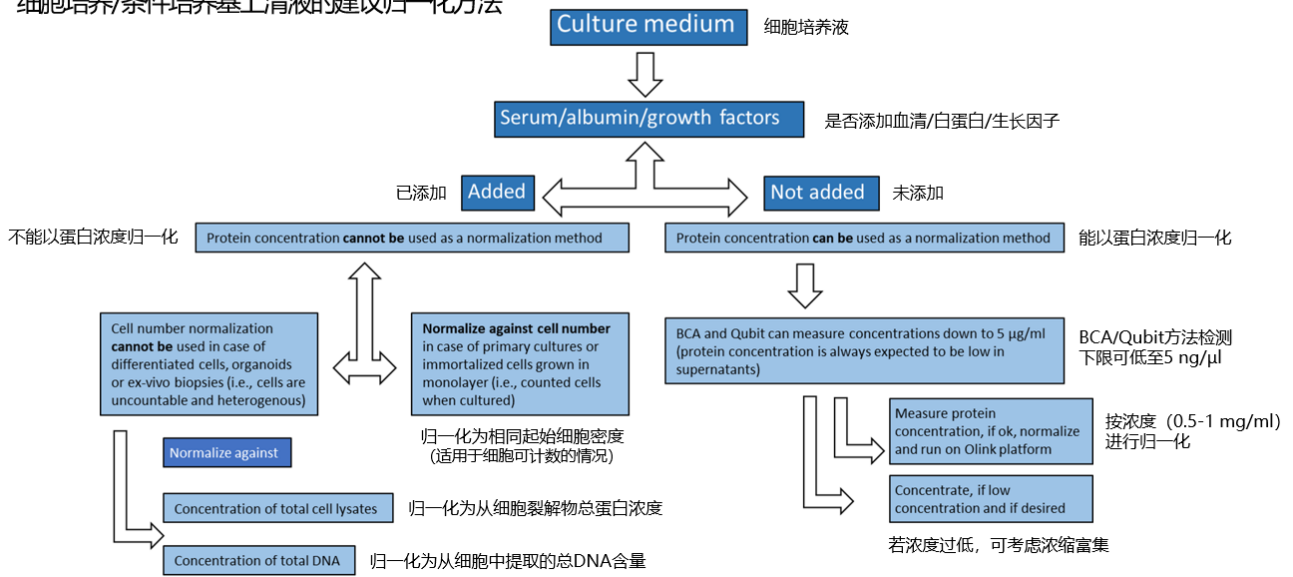
样品归一化

细胞培养上清的归一化一般取决于培养基中是否已经含有添加蛋白（如血清/白蛋白/生长因子）或细胞是否可被计数。如果培养基中没有添加血清/白蛋白/生长因子，样品可按蛋白浓度（0.5-1 mg/ml）进行归一化处理。如果蛋白浓度低于 Olink 的建议，样品同样可以在 Olink 平台上分析，但预计生物标志物的检出率会下降。下面列出了已发表文献中的其他归一化方法（见链接）。

- 当蛋白质浓度归一化不是可选项时（即培养基已经含有添加蛋白或蛋白浓度很低），可以将样品归一化为起始细胞密度。这只适用于细胞可计数的情况，如细胞单层或单细胞悬浮液。（[Link 1](#)）。
- 如果细胞无法计数（如类器官、体外活检或分化的细胞），可将样品归一化为从各细胞中提取的总蛋白。样品也可以通过在相应的细胞裂解液中进行 Western blot 检测并加载对照（ β -肌动蛋白（ β -actin）、 β -微管蛋白（ β -tubulin）、甘油醛磷酸脱氢酶（GAPDH）、脱脂酶（DJ-1 或 PARK7）作为归一化的内源性蛋白。（[Link 2](#)）。
- 作为另一种选择，样品可以被归一化为从各自细胞中制备的总 DNA 含量（[Link 3](#) & [Link 4](#)）。

图一展示了所建议的样品归一化方法的摘要，客户可选择其中一种最适合所开展项目的方法（见下页）。

细胞培养/条件培养基上清液的建议归一化方法



图一

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

