

分析非标样品

# 组织裂解物制备指南

本文旨在作为制备组织裂解产物的一般指南。本指南是针对收集后立即处理以制备裂解物，或快速冷冻并储存在-80°C 以待进一步处理的组织而制定。如果您的组织经过防腐剂、固定剂或任何有可能使蛋白质变性的药剂/化学品处理，如 Allprotect 或 RNAlater，请联系 [support@olink.com](mailto:support@olink.com) 询问。

## 一般准则

建议组织裂解产物的总蛋白浓度为 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

### 裂解缓冲液

为了确保裂解缓冲液与 Olink PEA 技术的兼容性，我们总结了一套标准，建议客户在选择、准备或购买裂解缓冲液时能够遵循。

### 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：

- RIPA 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 Buffer
  - (10X) Millipore; cat # 20-188(0.25% deoxycholate, 可兼容)
- T-PER组织裂解液 tissue protein extraction reagent
- 添加蛋白酶抑制剂至新鲜的1x buffer
  - 1 mM PMSF and
  - 蛋白酶抑制剂鸡尾酒Protease Inhibitor cocktail (终浓度 10.4 mM AEBSF, 8 μM Aprotinin, 0.2 mM Leupeptin, 0.4 mM Bestatin, 0.15 mM Pepstatin, 0.14 mM E-64)

## 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  $\mu$ 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
- $\text{Na}_3\text{VO}_4$  at 1-2 mM concentration.

## 裂解组织样品的建议

组织裂解液的制备一般需要额外的机械方法（如均质器、弹珠、超声处理）以实现完全的裂解。

一般的经验法则是，组织与裂解液的比例应在 1:20-1:50 之间，以克为单位 (g/ml = mg/ $\mu$ l)。举例来说，一个 10 mg 的组织应在 200  $\mu$ l 至 500  $\mu$ l 的裂解缓冲液中进行裂解。请按照所购买的裂解液的产品说明书中的 protocol 了解推荐的用量。

从推荐的最小体积的裂解液开始制备组织裂解液，以避免过度稀释样品中的蛋白浓度。浓缩的样品可以用裂解缓冲液（辅以蛋白酶抑制剂）进一步稀释。在提取过程中要始终保持样品的低温，以避免蛋白的降解。

**提示:** 在收集样品前称量每个收集管。这将有助于估计所需的裂解缓冲液的用量（即通过减去管子的重量）。确保收集管密封良好，并用永久性记号笔（防酒精/褪色）标记管子。

调整蛋白浓度，立即将准备好的裂解产物等份分装并冷却，保存在-80°C直到分析。

### 样品中蛋白浓度的标准化

总蛋白浓度应被归一化为 0.5-1mg/mL。请注意，项目中的所有样品都应归一化为相同的蛋白浓度。使用相同的包含蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液调整浓度。

大多数标准的总蛋白测量方法（如 Lowry, Bradford, BCA, Nanodrop 等）都可以使用。确保该蛋白测量方法与所选择的裂解缓冲液兼容。

在准备所有的样品之前测试制备方法，以确保得到满意的蛋白含量的样品。可以对样本进行后续的浓缩，但这样有使蛋白变性的风险，会损失一定的分子量以下蛋白质，这也取决于所选择的方法。

### 以下组织裂解物已经过测试 (但不限于)

- 肿瘤穿刺组织 Tumour biopsies
- 肺组织 Lung tissue
- 肌肉组织 Muscle tissue
- 子宫内膜组织 Endometrial tissue
- 脑组织 Brain tissue
- 肠组织 Gut tissue
- 异种移植组织 Xenograft tissue

**注意:** 我们还没有找到一种去除福尔马林并保持蛋白质结构的方法，所以所有组织样本都应该是新鲜冷冻的。

## 样本制备建议 (示例)

## 脑组织裂解物

- 将组织(约20片, 15-20 $\mu$ M)置于低温恒温器中, 收集于液氮N<sub>2</sub>中
- 称取组织
- 添加T-PER缓冲液(T-PER™组织蛋白提取试剂, Thermo Scientific), 含phosphoSTOP和蛋白质抑制剂鸡尾酒(罗氏):100mg/mL, 每100mg组织 1ml缓冲液
- 将组织均质(如上下移液吹吸), 并将样本放在冰上保存15分钟
- 在4°C下离心10 000 x g, 5分钟
- 收集上清液, 测定蛋白浓度
- 标准化蛋白浓度(所有样本的总蛋白浓度相同)

## 结肠活检溶解产物

注意: 以下为 Olink 的客户分享的实验操作。我们不推荐使用 Qiagen 的 Allprotect Tissue Reagent, 因为它会使样品中的蛋白变性。我们不能保证 Olink 能正确地检测出变性蛋白。

### 样本制备

结肠活检约 1x2x3 mm<sup>3</sup> 用于 Olink Proseek Multiplex 分析, 建议组织样本采集后立即浸泡在 Allprotect tissue Reagent 中, 以保护 DNA、RNA 和蛋白质。

- 将组织在2-8°C的试剂中孵育过夜
- 置于-80°C长期保存

### 实验材料

- 子弹式搅拌机(BBx24B)
- 冷冻模块
- 移液器
- 带安全锁盖管 Safe-Lock (Eppendorf, 1.5 mL)
- 0.9-2.00 mm 不锈钢珠

### 裂解液

- 1x RIPA缓冲液(50 mM Tris-bas pH 7.4, 50mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1%去氧胆酸钠) 将新鲜 PMSF加入1 mM的RIPA缓冲液和蛋白酶抑制剂鸡尾酒 (Roche)
- BCA总蛋白测定 BCA蛋白检测试剂A (Thermo Scientific 23228), BCA蛋白检测试剂B (Thermo Scientific 1859078), 白蛋白标准品(Thermo Scientific 23209)
- 蛋白稳定剂 Allprotect Tissue Reagent (76405, Qiagen)

### 组织裂解方案:

1. 将活检样本保存在Allprotect Tissue试剂中
2. 加入1勺(0.21 g)不锈钢珠和1.5毫升安全锁Eppendorf管, 并放在-20°C
3. 出一小瓶25倍的蛋白酶混合原液, 将150  $\mu$ L加入3.6 mL 1xRIPA缓冲液中
4. 每1.5 mL含有不锈钢珠的安全锁管中加入120  $\mu$ L含蛋白酶的RIPA, 放入冰箱
5. 将Allprotect从活组织检查中去掉, 用纸巾吸一下, 将活组织切片放入含有蛋白酶RIPA缓冲液的安全锁盖管Safe-Lock管中, 室温下放置
6. 将样品放入子弹搅拌器中, 在室温下以10的速度搅拌2分钟
7. 4°C, 15700 g离心5分钟。
8. 吸20  $\mu$ L上清到8联排中, 用BCA法测定蛋白质浓度
9. 将剩余体积分装, 在- 80°C冷冻, 以便进一步分析。保存一瓶20  $\mu$ L用于Olink分析
10. 当用BCA进行总蛋白测定时, 请确保使用1倍的RIPA缓冲液, 以1:20 (RIPA + PBS)的比例用于标准品的蛋白酶。用5  $\mu$ L样品裂解液和95  $\mu$ L PBS测定样品

组织样品裂解液经 Olink 标准处理为 0.5-1 mg/mL, 结果良好, 但通常产生的总蛋白浓度为 0.75 - 6 mg/mL (=  $\mu$ g/ $\mu$ L), 这意味着可能需要进一步稀释。

如果使用 Nanodrop 测定总蛋白, 则不建议在裂解缓冲液中使用 Triton x100, 建议使用 BCA 方法。

## 皮肤活检裂解物

Olink 大约使用 10 $\mu$ g 组织

### 裂解溶液

- 1x RIPA缓冲液(50 mM Tris-bas pH 7.4, 50mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1%去氧胆酸钠)
- 将新鲜 PMSF加入1 mM的RIPA缓冲液和蛋白酶抑制剂鸡尾酒(Roche)
- 进行BCA总蛋白测定
- BCA蛋白检测试剂A (Thermo Scientific 23228), BCA蛋白检测试剂B (Thermo Scientific 1859078), 白蛋白标准品(Thermo Scientific 23209)

如果使用 Nanodrop 测定总蛋白, 则不建议在裂解缓冲液中使用 Triton x100, 建议使用 BCA 方法。

组织样品裂解液标准化为 0.5-1 mg/mL, Olink 显示了良好的结果, 然而, 上述方案的总蛋白浓度为 0.1-0.3 mg/mL

### OCT 固定介质

- 当OCT介质被移除(切掉)时, 样品被裂解, 结果良好。
- OCT介质是可溶的, 因此它也可以被水或PBS去除。不要使用酒精, 因为其会使蛋白变性。

## 联系方式

Olink 中国区电话: +86 21 5077 8771

Olink 中国区邮箱: [china@olink.com](mailto:china@olink.com)

如有任何技术问题请联系: [support@olink.com](mailto:support@olink.com)

Olink China 公众号

