

Ensayo SomaScan®: Recomendaciones para la manipulación y procesamiento de las muestras NO CORE

Los siguientes procedimientos son recomendaciones para la recolección y la preparación de muestras para ensayos con la Plataforma SomaScan® de SomaLogic. Otros métodos que previenen la desnaturalización de la proteína pueden ser utilizados, pero consulte con nuestros especialistas para discutir los detalles antes de la implementación de un protocolo de recolección alternativo.

REQUISITOS GENERALES DE LAS MUESTRAS

La manipulación de la muestra después de la recepción se minimizará enviando alícuotas en tubos que sean compatibles con la automatización de SomaLogic. Los tubos recomendados son **Tubos Thermo Scientific Matrix™**, con código de barras 2D, que serán previamente proporcionados por Citogen. Es necesario que se proporcionen **dos réplicas** de cada muestra, cada una de ellas con el volumen requerido para cada tipo de muestra.

Cuando se espera que los estudios abarquen múltiples ensayos SomaScan, es útil incluir controles replicados específicos de la muestra para evaluar los datos a través de los distintos ensayos. A partir de un pool control de muestras, recomendamos que el cliente proporcione de tres a cinco réplicas para cada uno de los estudios que permita estimar los efectos entre lotes.

LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)

Nota: Es importante recolectar en solución acuosa en condiciones no desnaturizantes.

- Cuantificar la cantidad total de proteína mediante Micro BCA™ (Thermo Scientific™) o un método similar de cuantificación de proteínas.
- Normalizar todas las muestras a 75 µl, a una concentración de 200 µg/mL, utilizando un tampón como PBS. Dos alícuotas de 30 µL en Tubos Matrix.
- Almacenar las muestras a -80 °C.

MEDIO DE CULTIVO (SOBRENADANTES DE CULTIVO CELULAR)

Nota: La presencia de suero (suero fetal bovino, suero bovino, suero equino, etc.) en el medio de cultivo (es decir, sobrenadantes de cultivos celulares) puede impactar en la detección de pequeños cambios en las proteínas que son homólogas. Si es posible, se aconseja la presencia baja o nula de suero. Si no está seguro del efecto del suero en la biología de interés y quiere

explorar los cambios biológicos más pequeños dentro de su sistema, prepare muestras ± suero o reduzca el suero del 10% al para el experimento.

SomaLogic ha probado el rendimiento del ensayo con medios RPMI 1640 (Gibco™) y DMEM (glucosa alta) (Gibco™) con phenol red, penicilina y estreptomycin.

- El suero puede tener proteínas que causan señales en el ensayo. Para estudios con células cultivadas en 1-10% de suero fetal bovino, considere incluir muestras de control (controles de medios, células no tratadas y/o células tratadas con vehículo) en función de la cuestión científica que debe abordarse.
- Mantenga el volumen del medio al mínimo para aumentar la concentración de proteínas y tener una densidad celular $\geq 75\%$ del área de la superficie. Normalmente, se suele obtener suficiente material de 1 ml de medio recogido de células con una confluencia del 80-100% de un pocillo de una placa de 6.
- En periodos inferiores a 24 horas es posible que no se observe una señal diferencial; se sugiere disminuir el volumen de media utilizado para este tipo de experimentos.
- Centrifugar a 14.000 x g durante 5 minutos, antes de congelar, y recoger el sobrenadante.
- El volumen mínimo requerido de sobrenadante es de 100 μL : dos alícuotas de 40 μL en Tubos Matrix.
- Almacenar muestras a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

LISADO CELULAR

Nota: Es importante que las células se recojan en una solución acuosa en condiciones no desnaturizantes. Siempre que sea posible, se prefieren los lisados celulares en lugar de los sobrenadantes celulares que contienen suero. El suero se puede lavar antes de la lisis; los lisados se pueden normalizar a la concentración total de proteínas antes del ensayo SomaScan. El siguiente protocolo ha sido probado por SomaLogic y se puede utilizar para células adherentes y suspensiones celulares, incluyendo linfocitos.

- Recoja las muestras utilizando el Reactivo de Extracción de Proteínas Mamíferas M-PER™ (Thermo Scientific™) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Por lo general, se puede obtener suficiente material de un monocapa celular con un 80-100% de confluencia en un pozo de una placa de seis pocillos, recolectado con 300 μL de buffer de lisis (una guía aproximada es ~133,000 células, dependiendo del tipo celular).
- Para recolectar el lisado celular:
 - Lave las células tres (3) veces con Solución Salina Tamponada DPBS antes de la lisis.
 - Agregue el cóctel de inhibidores de proteasas Halt™ (Thermo Scientific™) al buffer de lisis para inhibir la actividad de las proteasas, según las instrucciones del kit.
 - Agregue el buffer de lisis a las células y realice el procedimiento de lisis apropiado.
 - Centrifugue las células lisadas a 14,000 x g durante 5 minutos y recoja el sobrenadante.
- Cuantifique la cantidad total de proteínas utilizando Micro BCA™ (Thermo Scientific™) o un método de cuantificación de proteínas similar.
- Normalice todas las muestras a 75 μL a una concentración total de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ utilizando un buffer como PBS. Prepare dos alícuotas de 30 μL en Tubos Matrix.
- Almacene las muestras a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR)

- Realice una punción lumbar (PL) por la mañana después de ayunar desde la medianoche para limitar las posibles fluctuaciones circadianas en las concentraciones de proteínas en el LCR.
- Infiltre el espacio intervertebral L3-4 o L4-5 con lidocaína al 1% utilizando agujas de 25g para anestesia local superficial y profunda.
- Realice la PL con una aguja espinal Sprotte® de punta de bala atraumática de 24g utilizando un introductor espinal de 20g.
- La PL debe realizarse con el paciente en posición decúbito lateral o sentado, según la preferencia personal del médico.
- Se debe retirar el LCR utilizando jeringas estériles de polipropileno de 5 mL.
- Retenga el LCR recolectado entre los mililitros 15 y 25 para el análisis de muestras.
- La muestra debe tener un volumen mínimo de 100 µL: dos alícuotas de 40 µL en Tubos Matrix y los tubos deben etiquetarse adecuadamente.
- Almacene las muestras a -80°C.

EXOSOMAS

Nota: Es importante que los exosomas se recojan en una solución acuosa en condiciones no desnaturalizantes.

- Aísle los exosomas de la matriz de interés.
- Agregue un volumen suficiente de buffer de lisis al pellet de exosomas (por ejemplo, 120 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 40 mM de HEPES a pH 7.5, 0.05% de Tween20, 1% de NP40 (v/v), 0.5% de desoxicolato de sodio (p/v)).
- Incube las muestras durante 15 minutos a 37 °C con agitación suave (rotación).
- Centrifugue durante 5 minutos a 14,000 x g.
- Cuantifique la cantidad total de proteínas utilizando Micro BCA™ (Thermo Scientific™) o un método de cuantificación de proteínas similar.
- Normalice todas las muestras a 75 µl a una concentración total de 200 µg/mL utilizando un buffer como PBS. Prepare dos alícuotas de 30 µL en Tubos Matrix.
- Almacene las muestras a -80°C.

LAVADO NASAL

Nota: Es importante que el lavado nasal se procese en una solución acuosa en condiciones no desnaturalizantes. El siguiente es un protocolo comúnmente utilizado para el lavado nasal:

- Recoja muestras de lavado nasal en solución salina normal no tamponada al 0.85% de NaCl.
- El procedimiento se repite dos veces en cada fosa nasal para un volumen total de solución salina instilada de 3 mL.
- Centrifugue a 450 x g durante 10 minutos a 4 °C para eliminar las células.
- Recupere el sobrenadante.
- El volumen mínimo requerido es de dos alícuotas de 40 µL en Tubos Matrix.
- Almacene las muestras a -80°C.

ESPUTO

Nota: Es importante que el esputo se procese en una solución acuosa en condiciones no desnaturizantes.

- Las muestras recogidas mediante el método de Hargreave se han analizado en la plataforma SomaScan. Djukanovic R., et al. European Respiratory Journal 2002, 20: Suplemento 37.
- El volumen mínimo requerido es de dos alícuotas de 40 µL en Tubos Matrix.
- Almacene las muestras a -80°C.

HECES

Nota: Las muestras de heces deben ser extraídas y prealícuotadas en tubos Matrix. Citogen devolverá las muestras directamente al remitente si llegan sin procesar.

Es importante que las heces se extraigan en solución acuosa en condiciones no desnaturizantes.

Los protocolos para muestras de heces que han analizados en la plataforma SomaScan se pueden encontrar en las siguientes publicaciones:

- Li, H., Vanarsa, K., Zhang, T. et al. Comprehensive aptamer-based screen of 1317 proteins uncovers improved stool protein markers of colorectal cancer. J Gastroenterol 56, 659–672 (2021).
- Soomro, S., Venkateswaran, S., Vanarsa, K. et al. Predicting disease course in ulcerative colitis using stool proteins identified through an aptamer-based screen. Nat Commun 12, 3989 (2021).
 - Cuantificar la cantidad total de proteína utilizando Micro BCA™ (Thermo Scientific™) o un método de cuantificación de proteína similar.
 - Normalice todas las muestras a una concentración total de 200 µg/mL utilizando un tampón como PBS.
 - Las muestras deben ser divididas en dos alícuotas de 30 µL cada una utilizando los tubos Matrix mencionados anteriormente.
 - Almacene las muestras a -80°C.

FLUIDO SINOVIAL

Nota: Es importante que el líquido sinovial se procese en una solución acuosa en condiciones no desnaturizantes para pasar a través de un filtro de 0.45 µm bajo un vacío moderado.

- El líquido sinovial debe ser tratado por el cliente para reducir la viscosidad (con enzimas o métodos mecánicos). Se han analizado muestras procesadas mediante digestión con hialuronidasa y ruptura con beads en la plataforma SomaScan.
- El volumen mínimo requerido son dos alícuotas de 55 µL en tubos Matrix.
- Almacene las muestras a -80°C.

HOMOGENIZADOS DE TEJIDO O TUMOR XENOINJERTADO

Nota: Es importante que los tejidos se recojan en solución acuosa en condiciones no desnaturizantes. Los tejidos fijados en formalina u otros tejidos desnaturizados no se pueden utilizar en el ensayo SomaScan. Consulte con nuestros expertos en Citogen antes de preparar

las muestras para evaluar la compatibilidad del protocolo. También puede consultar: Alhamdani, M.S.S., et al. Journal of Proteome Research 2010, 9, 963-71.

PROCEDIMIENTO CRIOSTATO

- Congele rápidamente el tejido en medio de incrustación congelado en un plazo de 5-10 minutos después de la extracción.
- Manteniendo las muestras constantemente congeladas, corte cinco secciones de 10 μm de grosor, recorte el exceso de medio de incrustación alrededor del tejido y coloque las secciones de tejido en un tubo estéril congelado.
- Utilice el agente de extracción de proteínas de tejido T-PER™ (Thermo Scientific™) según las recomendaciones del fabricante. Agregue 200 μL de tampón más el cóctel de inhibidores de proteasas Halt™ (Thermo Scientific™) por cada 10 mg de tejido.
- Homogenice en el tubo sobre hielo con un pistilo rotatorio durante 30 segundos, hasta que no se vean fragmentos de tejido.
- Centrifugue a $>14,000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C .
- Filtre el sobrenadante a través de un filtro de 0.2 μm en un tubo o placa estéril mientras se mantiene sobre hielo (filtro Millipore® Multiscreen® GV, 0.22 μm , estéril, MSGV2210 o similar).
- Cuantifique la cantidad total de proteína utilizando Micro BCA™ (Thermo Scientific™) u otro método de cuantificación de proteína similar.
- Normalice todas las muestras a 75 μL con una concentración total de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ utilizando un tampón como PBS. Prepare dos alícuotas de 30 μL en Tubos Matrix.
- Almacene las muestras a -80°C .

PROCEDIMIENTO NITRÓGENO LÍQUIDO

- Congele rápidamente (al menos 5 mg) el tejido en nitrógeno líquido en un plazo de 5-10 minutos después de la extracción.
- Pulverice el tejido congelado (utilizando un molino de congelación o similar) manteniendo una baja temperatura con nitrógeno líquido o hielo seco.
- Utilice el agente de extracción de proteínas de tejido T-PER™ (Thermo Scientific™) según las recomendaciones del fabricante. Agregue 200 μL de tampón de extracción más el cóctel de inhibidores de proteasas Halt™ (Thermo Scientific™) por cada 10 mg de tejido.
- Homogenice en un tubo sobre hielo con un pistilo rotatorio durante 30 segundos, hasta que no se vean fragmentos de tejido.
- Centrifugue en frío a $14,000 \times g$ durante 10 minutos.
- Recoja el sobrenadante (manténgalo sobre hielo).
- Filtre a través de un filtro de 0.2 μm en un tubo o placa estéril.
- Cuantifique la cantidad total de proteína utilizando el Micro BCA™ (Thermo Scientific™) u otro método de cuantificación de proteína similar.
- Normalice todas las muestras a 75 μL con una concentración total de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ utilizando un tampón como PBS. Prepare dos alícuotas de 30 μL en Tubos Matrix.
- Almacene las muestras a -80°C .

FUIDO DE HERIDA

- Cuantifique la cantidad total de proteína utilizando el Micro BCA™ (Thermo Scientific™) o un método de cuantificación de proteína similar.
- Normalice todas las muestras a 75 μL con una concentración total de proteína de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ utilizando un tampón como PBS. Prepare dos alícuotas de 30 μL en Tubos Matrix.

- Almacene las muestras a -80°C.

VOLÚMENES DE MUESTRAS REQUERIDOS

Muestra	Volumen
Aspirado de médula ósea humana	2 alícuotas de 55ul
Líquido sinovial humano (pretratado)	
Lisado celular	2 alícuotas de 30ul
Homogenizados de Tejido	
Lavado broncoalveolar	
Fluido amniótico	
Extracto nuclear	
Exosomas	
Fluido de herida	
Heces	
Humor acuoso humano	2 alícuotas de 400ul
Medio de cultivo celular	
LCR	
Espuito	
Lavado nasal	
Humo vitreo	