

蛋白组学样品制备常规流程及注意事项

一、 细胞, 组织裂解

- Lysis buffer (SDT, RIPA...): ThermoFisher 提供了针对于各种样品的解缓冲液
- Detergent: SDS, CHAPS, NP40... (破坏细胞膜, 蛋白质变性)
- Reducing agent: DTT... (打开二硫键, 使得蛋白质结构更为开放, 更易酶解)
- Urea: 增加蛋白质的可溶性, 适用于提取全蛋白

二、 蛋白质抽提

三、 样品蛋白质含量测定、还原烷基化

还原烷基化原理: 蛋白质不能从 PAGE 胶里被抽提出, 而肽段则可以被抽提出, 打断蛋白质的二硫键, 破坏蛋白质二级结构, 是蛋白质结构 松散, 增加蛋白质酶切效率。

四、 蛋白水平的预分级或蛋白质免疫沉淀

五、 蛋白质酶解

i. 胶内酶解 (In-gel digestion)

- 将考染后的 SDS-PAGE 切成小块
- 用 100mM NH_4HCO_3 /30%ACN 脱色
- 在胶内进行 DTT, IAA
- 在 NH_4HCO_3 溶液体系中加入酶, 在胶内进行酶解
- 用 60% ACN/0.1% TFA 从胶中抽提生成的肽段

ii. FASP: Filter aided sample preparation

- 采用滤膜装置进行溶液置换 (10K, 20K, 30K)
- 使用尿素可以更有效的除去溶液体系中的去垢剂 (如 SDS)
- 最后置换至 NH_4HCO_3 or TEAB 溶液体系进行蛋白质酶切 (pH 在 8.0 左右)
- 酶解完成后收集滤膜的流穿组分得到肽段

原理: 蛋白质不能通过滤膜, 而酶解生成的肽段则可以通过。丙酮沉淀是另一种去除去垢剂的方法, 从而可进行溶液内酶解。

iii. 蛋白酶的选择 :

- 最为常用的蛋白酶: Trypsin (保持胰酶处于低温, 并且保存在酸性环境中, 以防止胰酶自身酶解)
 - 特异的切断 C 端为 Arg, Lys 的肽键 (若 Arg, Lys 后紧跟 Proline, 酶切效率降低)
 - 生成的肽段平均长度为 9 个氨基酸
 - 胰酶酶解生成的肽段至少为 2+ 价, 易于离子化
- 其他一些蛋白酶, 酶切位点的特异性可在搜库软件中查找。

六、 肽段水平的预分级或翻译后修饰的富集

七、 肽段除盐 (非常重要)

蛋白质谱分析对样品的要求 :

- ✧ 无盐 : 少量挥发性盐不影响 (如 100mM 以下碳酸氢铵) (充分脱盐)
- ✧ 无聚合物 : 如 PEG (避免使用国产耗材、避免手套等接触样品)
- ✧ 无表面活性剂 : 如 SDS (前处理过程中避免使用)
- ✧ 无沉淀或颗粒 : (充分离心、过滤)

推荐使用脱盐试剂盒：

- Waters 50mg 容量脱盐柱型号：WAT054955
- Thermo 80ug 肽段脱盐型号：87784 Pierce C18 Tips, 100 μ l bed

八、 纳升级液相分离和质谱分析