

有还原烷基化蛋白质胶内消化操作流程

一、 试剂:

- a) 200 ml Milli-Q water
- b) 200 mL 50mM NH_4HCO_3 (pH7.8)
- c) 200 ml 50 mM NH_4HCO_3 /乙腈 (1:1)
- d) 200 ml 乙腈
- e) 1 mL 1M DTT (使用前配置, 溶解在水中, -20 度保存 1 个月)
- f) 1 mL 0.5 M iodoacetamide (使用前配置, 溶解在水中, -20 度保存 1 个月)
- g) Trypsin 酶 (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 使用前配制, 多余的放-20 冰箱)
- h) 50% ACN/0.5% FA

B. 操作步骤:

1. 将所选择的胶点用 1.5mm 切胶笔或者手术刀切下, 置于 eppendorf (EP) 管或 96 孔 PCR 板中, 并记录点号及相应的位置;
2. 加 50 μL Milli-Q H_2O 洗两次, 10min/次; 如果在同一个样品管中放置多个胶点的话, 适度增加 Milli-Q H_2O 用量, 保证所有胶点都被浸泡在水中。(对于多个胶点, 以下步骤做出类似调整)
3. 加 50 mM NH_4HCO_3 /乙腈=1: 1 溶液(考染脱色液)50 μL , 超声脱色 5min 或 37 $^{\circ}\text{C}$ 脱色 20min, 吸干; (若为银染, 一般不需要脱色; 若必须脱色, 使用 15mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ /50mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 轻摇直到变为淡黄色透明, 再用水反复洗至无色)
4. 重复步骤 3, 直至蓝色褪去;
5. 加乙腈 50 μL 脱水至胶粒完全变白, 将乙腈吸出, 将胶点真空抽干 10min 至胶粒变干;
6. 加 10 mM DTT (10 μL 1M DTT, 990 μL 25mM NH_4HCO_3 配制) 20 μL , 在 Thermomixer 中 56 $^{\circ}\text{C}$ 下 500 rpm 下温浴 1hr;
7. 冷却到室温后, 吸干, 快速加 55 mM IAM (55 μL 1M IAM, 945 μL 25mM NH_4HCO_3 配制) 20 μL , 置于暗室 45min;

8. 依次用 25 mM NH_4HCO_3 (2X10 分钟)、25 mM NH_4HCO_3 +50% 乙腈溶液(2X10 分钟)和乙腈洗(10 分钟), 乙腈脱水到胶粒完全变白为止, 真空抽干 10min 至胶粒变干;
9. 将 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的酶储液以 25 mM NH_4HCO_3 稀释 10~20 倍, 每 EP 管加 2~3 μL (根据胶粒数量, 适当调整, 使所有胶粒充分吸收酶液), 稍微离心一下, 让酶液充分与胶粒接触, 4℃或冰上放置 30min, 待溶液被胶块完全吸收, 加 25mM NH_4HCO_3 至总体积 10-15 μL (根据胶粒数量, 适当调整, 使溶液充分浸泡所有胶粒) 置 37℃, 消化过夜;
10. 次日, 使用 Thermomixer 在 1000 RPM 下将 EP 管中的胶粒和液体充分混匀 10 分钟, 3000g 离心 3 分钟。从每个 EP 管中取出全部上清分别加入新的 EP 管中。
11. 向胶粒中加入 250 μL 50% ACN/0.5% FA, 使用 Thermomixer 在 1000 RPM 下将 EP 管中的胶粒和液体充分混匀 10 分钟, 3000g 离心 3 分钟。从每个 EP 管中取出全部上清分别加入之前的新 EP 管中。本步骤重复 1 次。
12. 将新 EP 管放置在 Speedvac 中真空抽干。
13. 在每个 EP 管中加入适量的 0.1% FA 溶解肽段, 上 LC-MS/MS。注意: 如果 EP 管中有 particle 的话, 10000g 高速离心后, 取上清上 LC-MS/MS。

说明:

1. 每加一次溶液都要漩涡振荡, 胶粒要完全浸没在溶液中, 进行下一步操作前要把溶液吸走。
2. 如果胶粒超过 1.5mm³, 把胶粒分成约为 1.5mm³ 大小再进行脱色, 使用的各种溶液的量也相应增加。
3. 实验过程中一定要注意使用的溶液和器具的洁净, 防止角蛋白污染, 并戴口罩和帽子。
4. 银染蛋白质点胶内消化不要脱色, 步骤 3、4 省略。
5. 所有在洁净台外的操作必须用封口膜密封好 96 孔板, 尽量避免蛋白质点和相关溶液与外界空气接触, 避免可能造成的污染。