

SILAC 细胞样品制备操作流程

一、 试剂:

A. 蛋白提取和胰酶消化

- a) 细胞裂解液: 50 mM 碳酸氢铵/8 M 尿素/蛋白酶抑制剂 (05892791001, 罗氏) /1mM DTT (每次使用必须新鲜配制)
- b) 1 mL 1M DTT (溶解在水中, -20 度保存 1 个月)
- c) 1 mL 0.5 M IAM (溶解在水中, -20 度保存 1 个月)
- d) 10 mL 50mM NH4HCO3(pH7.8)
- e) Trypsin 酶 (0.5ug/ul, 使用前配制, 多余的放-20 冰箱)
- f) 10% TFA

B. 肽段脱盐

- a) 100% 甲醇
- b) 0.1% TFA
- c) 70% ACN/0.1% TFA

二、 操作步骤:

A. 蛋白提取和胰酶消化

1. 向每一百万测试或者对照细胞 pellet 中加入 100 微升细胞裂解液 (50 mM 碳酸氢铵/8 M 尿素/蛋白酶抑制剂 (05892791001, 罗氏) /1mM DTT)。备注: 根据细胞尺寸大小, 调整加入细胞裂解液的体积。
2. 在冰上超声破碎细胞 30 秒钟 (超声波细胞破碎仪), 每次 10 秒, 间隔时间为 10 秒, 能量设置在 32%。备注: 超声后, 管底应无可见 pellet。
3. 使用 Pierce BCA 试剂盒对细胞裂解液进行蛋白定量。备注: 通常使用稀释 10 倍的细胞裂解液进行定量, 即加 2.5 微升细胞裂解液和 22.5 微升 Milli-Q 水到 200 微升 BCA 工作液中。BCA 定量, 每个浓度的标准品和样品都至少进行 2 个测试。
4. 分别取等体积测试和对照细胞裂解液, 加入到新的 EP 管中, 用枪充分混匀。备

注：如果是做一维 LC-MS/MS，各取 50 微克；如果做二维 LC-MS/MS，则各取 500 微克。

5. 向蛋白溶液中加入终浓度为 4mM 的 DTT，然后将其在 37 度温育 2 小时。备注：加入 DTT 后，将溶液混匀。
6. 向蛋白溶液中加入终浓度为 10mM 的 IAM，将 EP 管在暗处在室温下放置 45 分钟。备注：加入 IAM 后，将溶液混匀。
7. 向蛋白溶液中加入 50mM 碳酸氢铵，将尿素浓度稀释到 1M。
8. 按 1:50 的比率向蛋白溶液中加入 trypsin，37 度过夜消化。
9. 次日清晨，向蛋白消化物中加入 10% TFA 至 TFA 终浓度为 0.4%，混匀。测试 pH，确保 pH 在 2-4 之间。
10. 将蛋白消化物在 10,000 g 离心 10 分钟。

B. 肽段脱盐

1. 用 1ml 甲醇冲洗 Sep-pak C18 小柱子。
2. 用 1 ml 0.1% TFA 冲洗 C18 小柱子。
3. 将蛋白消化物上清液分别加入到 C18 小柱子中，使用设备迫使其通过小柱子。
4. 使用 3ml 0.1% TFA 冲洗 C18 小柱子。
5. 使用 1ml 70% ACN/0.1%TFA 将肽段洗脱到 EP 管中。
6. 将 EP 管在 Speedvac 中抽干。
7. 将 EP 管保存在-80 或者-20 冰箱。
8. 将肽段溶解在 0.1% FA 中，LC-MS/MS 上样。