

## 动物组织样品制备操作流程

### 一、 试剂：

#### A. 蛋白提取和胰酶消化

- a) 动物组织裂解液: 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 iodoacetamide (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. 将动物组织切成小片, 在研钵中加入液氮, 将其磨成细粉。取 100 mg 用于蛋白质提取, 剩余的保存在-80 冰箱。备注: 最低可使用 30-40mg 的组织细粉进行蛋白提取。
2. 向 100 mg 组织细粉中加入 500 微升组织裂解液 (50 mM 碳酸氢铵/8 M 尿素/蛋白酶抑制剂 (05892791001, 罗氏) /1mM DTT)。
3. 在冰上超声破碎组织 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, 溶液均匀透明。
4. 在 4℃下 20,000g 下, 离心 20 分钟。将上清取出, 加入到新的 EP 管中。备注: 不要取出漂浮在表面的脂肪和管底的 pellet。
5. 使用 Pierce BCA 试剂盒对组织提取液进行蛋白定量。备注: 通常使用稀释 20-40 倍的组织裂解液进行定量。BCA 定量, 每个浓度的标准品和样品都至少进行 2 个测试。
6. 分别取适量的组织提取液加入到新的 EP 管中, 并且使用动物组织提取液 (50 mM 碳酸氢铵/8 M 尿素/蛋白酶抑制剂 (05892791001, 罗氏) /1mM DTT) 将其浓度

稀释到 4mg/mL。备注：如果是做一维 LC-MS/MS，取 60 微克；如果做二维 LC-MS/MS，则取 1000 微克。

7. 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。
8. 向蛋白溶液中加入终浓度为 20mM 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。
9. 向蛋白溶液中加入 50mM 碳酸氢铵，将尿素浓度稀释到 1M。
10. 按 1:50 的比率向蛋白溶液中加入 trypsin，37 度过夜消化。
11. 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。
12. 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。