

TMT 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 TEAB/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 TEAB(无需调 pH)
- e) Trypsin 酶 (0.4ug/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
- d) 3% ACN/0.1% TFA

二、操作步骤：

A. 蛋白提取和胰酶消化

1. 向每一百万细胞 pellet 中加入 100 微升细胞裂解液 (50 mM TEAB/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. 分别取等量细胞裂解液，加入到新的 EP 管中。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 160 微克 (6 PLEX TMT) 或者 120 微克 (10 PLEX TMT)。
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 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。
7. 向蛋白溶液中加入 50mMTEAB，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 (选用 50mg 的 Sep-Pak 小柱子)

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。

C. TMT 标记

1. 将 B 步骤中脱盐的肽段分别溶解在 100 微升 50mM TEAB 中。
2. 使用前，将 TMT 试剂瓶离心 30s，使 TMT 试剂到达试剂瓶底部。将 TMT 标记试剂在室温放置 5 分钟。向 0.8mg TMT 试剂瓶中加入 43ul 无水乙腈(如果是 5mg 的 TMT 试剂瓶的话，则加入 260 微升无水乙腈)。使 TMT 试剂在间歇振荡下溶解 5 分钟。注意：溶解在无水乙腈中的 TMT 试剂在-20°C 可以保存 1 个星期。
3. 小心地将 43 微升 TMT 试剂分别转移到需要标记的肽段中。使之在室温下反应 1 小时。
4. 想每个样品管中加入 8 ul 5% (不是 50%) 的 hydroxylamine，室温温育 15 分钟，终止反应。
5. 将同一组的 TMT 样品合并，然后放置在 SpeedVac 中抽干。

D. TMT 标记肽段的脱盐（如果肽段总量超过 1mg，使用 100mg 的 Sep-Pak 小柱子）

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. 使用 1 ml 3% ACN/0.1% TFA 溶解 TMT 标记的肽段。备注：振荡混匀，使肽段充分溶解。
4. 将 TMT 标记的肽段溶液分别加入到 C18 小柱子中，使用设备迫使其通过小柱子。
5. 使用 3ml 0.1% TFA 冲洗 C18 小柱子。
6. 使用 1ml 70% ACN/0.1%TFA 将肽段洗脱到 EP 管中。
7. 将 EP 管在 Speedvac 中抽干。
8. 将 EP 管保存在-80 或者-20 冰箱。

E. TMT 标记肽段的离线分级

拿去细胞所曾老师那边做。

TMT 标记效率的测试：

1. 消化 400ug 蛋白 (样品为 161220 的 HET1，样品浓度为 2.68mg/mL，物种为 mouse);
2. 将 133ug 肽段分别使用厂家规定剂量(129 TMT)、1/2 剂量(130 TMT)以及 1/3 剂量(130 TMT)的 TMT 试剂进行标记 (备注：当使用 1/2 和 1/3 剂量标记的时候，用无水 ACN 将 TMT 试剂的体积补充到 41ul; TMT 试剂为之前实验剩余的 6 plex 的 2 个试剂);
3. LC-MS/MS 及数据分析。