

基于 TMT 标记的相对定量蛋白质组学实验步骤

1. 试剂配制

裂解缓冲液：8M 尿素，PBS 缓冲体系，pH8 左右，1 mM PMSF, 1 mM 蛋白酶抑制剂 cocktail

BCA 试剂盒用于测定蛋白浓度，平行测定三次

胰蛋白酶（1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，Promega 质谱级）

二硫苏糖醇（1M，用超纯水配制），碘乙酰胺（1M，用超纯水配制），三氟乙酸，乙腈

注意：

裂解缓冲液必须要有缓冲体系（PBS 或者 Tris-HCl），防止蛋白聚沉；

8M 尿素配制好后，避免长时间放置于室温，可存放在 -20° 或者现配先用。

2. 蛋白提取

- (1) 向细胞或者研磨好的组织中加入裂解缓冲液，PMSF 用时现加，充分混匀；
- (2) 超声裂解细胞及核酸，至溶液没有粘稠感，比较澄清；
- (3) 于 4° 条件下以 12000 rpm 离心 20-30 min，取上清；
- (4) 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度，适当稀释蛋白，使得测定的浓度在标准曲线的线性范围之内，最终原始蛋白浓度应该在 1 mg/mL 以上；
- (5) 取 100-200 μg 蛋白用于溶液内酶解。

3. 溶液内酶解

- (1) 将 100-200 μg 蛋白的体积,用含 8M 尿素的 PBS 将浓度调至 1 mg/mL,即最终体积在 100 μL -200 μL ;
- (2) 加入一定量的二硫苏糖醇,终浓度为 5 mM,室温放置 1 h;
- (3) 加入一定量的碘乙酰胺,终浓度为 12.5 mM,避光室温放置 30 min 以上;
- (4) 将样品从黑暗环境中取出,室温不避光放置 5-10 min,终止碘乙酰胺的反应;
- (5) 缓慢的向样品中注入 5 倍体积的 PBS,将尿素浓度稀释至 1.5 M 以下;
- (6) 按照蛋白 :胰蛋白酶=100:1 的比例,加入胰蛋白酶,混匀后放置于 37 $^{\circ}$, 12-16 h;
- (7) 2000 \times g 离心, 10 min,取上清;
- (8) 加入 0.4%的 TFA,将 pH 调至 2 以下;
- (9) 用 Sep-Pak 柱子 (Waters) 除盐;
- (10) 干燥除盐后的样品。

注意:

蛋白浓度不宜过大,否则后续处理中蛋白容易聚沉;

一定要用含 8M 尿素的 PBS 调节蛋白浓度,并且该缓冲液中不用加入任何蛋白酶抑制剂,否则容易影响胰蛋白酶的酶解效率;

二硫苏糖醇和碘乙酰胺的浓度不宜过大,加入的二硫苏糖醇和碘乙酰胺的体积应该不会样品的最终体积;

加入胰蛋白酶前的稀释步骤,一定要缓慢加入 PBS,否则容易沉淀,并且,在稀释时,有少许沉淀,不用离心,经过过夜的酶解,胰蛋白酶会将沉淀酶解成肽段;

如果在稀释后有沉淀并且高速离心,会导致蛋白量受损,而且胰蛋白酶无法将这

些沉淀酶解开；

在用三氟乙酸终止酶解反应前，一定要 2000×g 离心，取上清再调节 pH，否则之前的沉淀在调节 pH 时会导致更多的沉淀。

4. Sep-Pak 除盐

溶液 1: ACN

溶液 2: 0.5%乙酸, H₂O

溶液 3: 50% 乙腈, 0.5%乙酸

溶液 4: 0.1% 三氟乙酸

- (1) 平衡柱子: 9 mL 溶液 1, 3 mL 溶液 3, 9 mL 溶液 4
- (2) 缓慢注入样品, 样品过两次柱子;
- (3) 清洗: 9 mL 溶液 4, 1 mL 溶液 2;
- (4) 肽段洗脱: 5 mL 溶液 3 洗脱并收集。

注意:

除盐前样品 pH 必须在 2 以下, 否则肽段和填料结合会受影响。

5. TMT 标记

除盐样品干燥后, 用 50 μ L 的 100 mM TEAB 复溶, 加入适量的 TMT, 室温放置 1h, 加入适量的 5%的羟胺终止, 将不同标记的样品混在一起, 干燥除去里面的乙腈 (用于溶解 TMT 的乙腈), 调节 pH 至 2 以下, Sep-Pak 除盐。

注意:

200 μ g 蛋白加入 20 μ L TMT, 每 20 μ L TMT 用 4 μ L 5%的羟胺终止即可。

0.8 mg TMT 溶解于 40 μ L 的乙腈中，5 mg TMT 溶解于 256 μ L 的乙腈中。

6. HPLC 分离

柱子型号: XBridgeTM BEH300 C18 column (Waters, MA)

A 相流动相: 100% H₂O, 用氨水将 pH 调至 10

B 相流动相: 98%乙腈, 2% H₂O, 用氨水将 pH 调至 10

流动相梯度设置:

按时间收集, 90s/管, 流速 1 mL/min, 收集 72 min, 共 48 管, 真空干燥减少样品体积;

按照 1,13,25,37 合并为一管的顺序, 将 48 管样品合并至 12 管, 将体积减少至 20-30 μ L, 高速离心后装瓶。

注意:

HPLC 前样品需高速离心 5min 以上, 取上清装瓶。

%B	时间
5-8	5 min
8-18	35 min
18-32	22 min
32-95	2 min
95	4 min
95-5	4 min