

磷酸化蛋白组学操作步骤

1. 蛋白提取，蛋白沉淀和溶液内酶解

- (1) 向细胞中加入含蛋白酶抑制剂，PMSF 和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液，冰上孵育 20-30 min，超声破碎核酸。
- (2) 于 4 度，7600 rpm 条件下离心 25 分钟。
- (3) 向蛋白中加入 4 倍的冰丙酮，置于 -20° C，过夜沉淀。
- (4) 7600 rpm 离心 10 分钟，弃去上清，晾干丙酮后，蛋白沉淀用 5ml 的 8M 尿素，10 mM HEPES，pH 8.0 复溶，然后离心，取上清。
- (5) 用 BCA 法测蛋白浓度，取 5 mg 蛋白用于后续实验。
- (6) 二硫苏糖醇终浓度 1 mM，室温孵育 1 小时；碘乙酰胺终浓度 5 mM，室温避光孵育 1 小时。
- (7) 用 50 mM 碳酸氢铵将尿素的浓度稀释至 2 M 以下，然后按照质量比 1:100 的比例加入胰蛋白酶，37° C 孵育过夜。
- (8) 肽段样品以 2000×g 离心 10 min，上清用三氟乙酸将 pH 调至 2 以下，三氟乙酸浓度为 0.4%-2%。
- (9) 肽段用 Sep-Pak 柱子除盐，最终肽段用 5 mL 的 50%乙腈（含 0.5%乙酸）和 1 mL 100%乙腈分别洗脱。
- (10) 肽段洗脱液在真空干燥仪中挥干，用碱性 HPLC 将其分成 12 个组分。

2. 二氧化钛填料富集磷酸化肽段

- (1) 用含 20mg/ml 二羟基苯甲酸的 80% 乙腈和 1% 三氟乙酸（填料浓度为

5ul/mg), 平衡填料 20 分钟。

- (2) 所有的肽段组分都用 1 mL 的 80% 乙腈和 5% 三氟乙酸复溶。
- (3) 每个肽段组分加入 2 mg 的填料 (在 10 微升的二羟基苯甲酸溶液中), 旋转混匀 30 分钟。
- (4) 每个组分 4000×g 离心 5 分钟, 收集上清合并成两份, 再各加入 2 mg TiO₂ 填料孵育 30 min。
- (5) 填料用 30% 乙腈和 1% 三氟乙酸洗两次, 然后将填料填充到 C₈ STAGE-TIP 中, 500×g 离心, 使得填料沉积到 C₈ 填料上。
- (6) 填料用 50% 乙腈和 1% 三氟乙酸洗一次, 然后用 80%乙腈和 1%三氟乙酸洗一次。
- (7) 磷酸化肽段依次用 20 微升 5%氨水和 20 微升 10%氨水洗脱至 C₈ 填料上, 然后用 20 微升的 10%氨水加 25%乙腈从 C₈ 洗脱。
- (8) 洗脱后的肽段用真空干燥挥干, 复溶后以备质谱上机。