

## 胶内酶解操作步骤

1. 切胶：将 SDS-PAGE 电泳后的胶置于玻璃皿中，切下条带，然后将胶条带切成小块，加入蒸馏水润洗 2 遍。
2. 加入适量的脱色液，置于 37℃ 恒温培养箱中，脱色至无色或颜色很淡即可，时间视情况而定。
3. 吸去脱色液，加入适量的乙腈润洗，吸去乙腈，再加入乙腈，放置 10 min，吸出乙腈，用真空离心浓缩仪脱水使胶块干燥。乙腈可以使胶粒内部的水分脱出来，干燥胶粒。
4. 向干燥的胶块中加入 25 mM 二硫苏糖醇溶液，放置于 55℃，孵育 45 min。二硫苏糖醇打开二硫键，使得胰蛋白酶酶解充分。这一步做完后必须立即进行下一步碘乙酰胺操作，否则二硫键有可能再次形成。
5. 加适量乙腈润洗，后吸干，再加入乙腈，10 min，吸去乙腈，用真空离心浓缩仪脱水使胶块干燥。
6. 加入适量的 55 mM 碘乙酰胺溶液，避光反应 30 min。碘乙酰胺封闭住自由巯基，防止二硫键再次形成。
7. 乙腈润洗，后用乙腈浸泡 10 min，用真空离心浓缩仪脱水使胶块干燥。
8. 加适量胰蛋白酶，没过胶粒，倒置于 37℃ 恒温箱中，孵育 12-16 h。
9. 用 1  $\mu\text{L}$  的 10% 三氟乙酸溶液终止酶解反应，低速离心，使胶粒和溶液分开，吸出溶液，收集至一个新的离心管中。
10. 向胶粒中加入适量的萃取液（50%乙腈，0.1% 甲酸），放置于 37℃，孵育 30 min，取上清液与之前的上清液合并。萃取步骤重复两次。
11. 将上清液放在真空离心浓缩仪中浓缩，剩余约 10  $\mu\text{L}$  的时候取出离心

管，加入 20  $\mu\text{L}$  的 0.1%甲酸溶液复溶。振荡混匀后离心，重复两次。

将肽段溶液加入质谱上样瓶中，注意瓶底部不能有气泡，保存于 4° C 以备质谱上机分析。

溶液配制：

脱色液：25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ，50% CAN

二硫苏糖醇（DTT）溶液：25 mM 于 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液中

碘代乙酰胺（IAA）溶液：55 mM 于 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液中

胰蛋白酶溶液：100  $\mu\text{g}$  胰蛋白酶用 100  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  溶解，分装成 10 管，10  $\mu\text{g}$ /管；每管加 790  $\mu\text{l}$  胰蛋白酶缓冲液（1 mL 胰蛋白酶缓冲液由 200  $\mu\text{l}$  200 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 100  $\mu\text{l}$  ACN, 700  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  组成）

萃取液：50% 乙腈，0.1% 甲酸