

胶内酶解操作流程

1. 切下目标条带或将条带分成若干组分 (条带宽度约为 2mm 左右), 置于 500ul EP 管中。
2. 每管加入脱色液 500ul 震荡, 视情况更换脱色液至脱色完全 (如颜色较深可加热 37 度), 用台式真空泵吸去上清液。
3. 干胶: 加 100%乙腈(ACN)震荡脱水至胶粒变白, 吸去液体, 真空干燥 5min。
4. 加 10mM DTT/25mM NH₄HCO₃ (1M 母液以 25mM NH₄HCO₃ 稀释) 淹没胶块, 震荡混匀至胶块泡胀透明, 56°C 1h。
5. 冷却至室温, 吸干, 快速加 55mM 碘代乙酰胺 (IAA) /25mM NH₄HCO₃ 淹没胶块, 震荡混匀。(快速, 避光) 暗处放置 45min。
6. 25mM NH₄HCO₃ 洗两次, 移去液体, 100%乙腈 ACN 脱水至胶粒变白。真空干燥 5min。
7. 每管加入 50mM 碳酸氢铵溶液 20ul, 再加入 1-2ul 胰酶 (或者将两者混合后再加入样品中, 淹没胶条, 胰酶浓度为 100ng/ul), 将凝胶挤碎, 37 度温育 6 小时以上。
8. 每管加入 200ul (含 0.1%FA) 乙腈震荡 5 分钟, 吸取上清液至干净的 EP 管中。
9. 凝胶中再加入 30ul 0.1%FA 质谱水, 震荡 5 分钟, 再加入 200ul 100% (含 0.1%FA) 乙腈震荡 5 分钟, 吸取上清将上清合并。
10. 45 度真空旋干。(如果您要送样请提供此步完成后样品)
11. 用 0.1%甲酸水溶解蛋白样品, 蛋白浓度约 100ng/ul, 样品高速离心 15min 后, 取上清进样。

注: 1L 脱色液配制方法: 质谱级甲醇 400ml, 质谱级水 600ml, 3.96g 碳酸氢铵混合