



**中国科学院水生生物研究所**

INSTITUTE OF HYDROBIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES



# 蛋白质组学优质数据的基石

## ——样本前处理

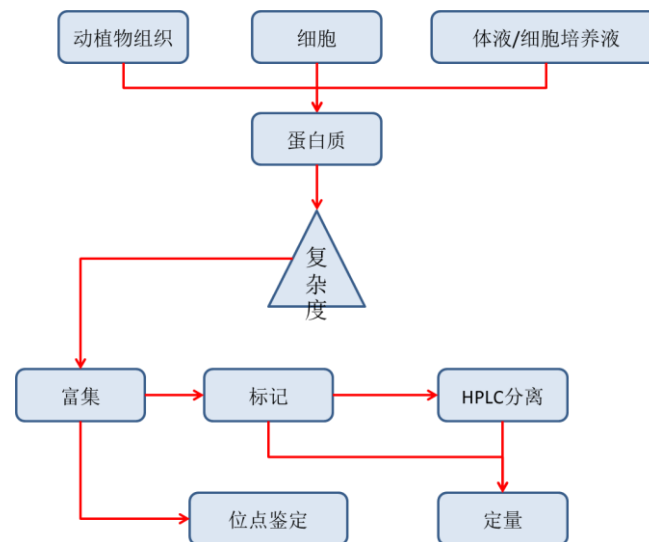
水生所分析测试中心蛋白质组学平台

贾书召

2020.06.24

# 主要内容

## 1. 取样/送样要求、样本量要求



## 2. 不同类型样本的前处理流程

# 1. 取样/送样要求、样本量要求

---

样本类型

---

胶条

蛋白液

动植物组织

细胞

细菌/真菌

血浆/血清

...

---



---

实验类型

---

蛋白鉴定

修饰位点鉴定

LFQ定量

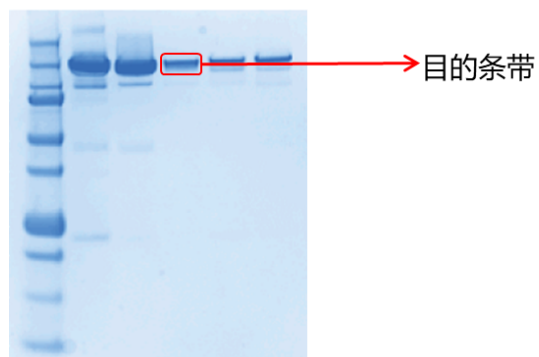
标记定量

磷酸化定量

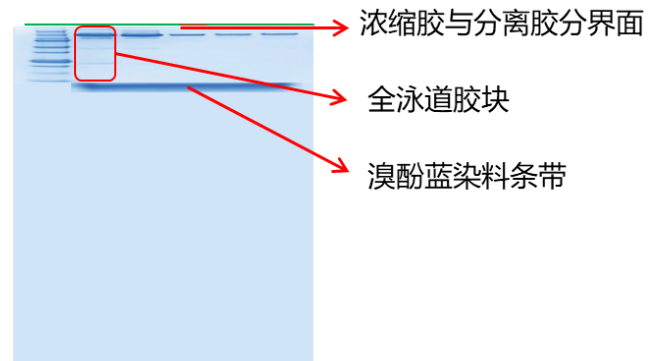
---

# 简单样品制备要求

单一条带	沿 <b>目的条带边缘</b> 切下，4℃保存。
混合条带	溴酚蓝跑入分离胶1 cm，将分离胶至溴酚蓝下沿全部切下，4℃保存。
要求	<b>条带清晰可见</b>
送样方式	用ddH <sub>2</sub> O清洗三遍，吸去液体，装入 <b>进口EP管</b> 。4℃保存；冰盒寄送。
注意事项	使用干净手套、刀具，在洁净玻璃板上切胶，确保无角蛋白污染。



图一



图二

# 简单样品制备要求

简单样本	目的蛋白质溶液样本
复杂样本	经IP、Pull down等富集纯化的蛋白质混合溶液
要求	详细说明样本制备来源、溶剂组成、浓度、pH及体积，特别注明溶液内是否含有SDS、NP40、Triton X-100等去污剂。
送样方式	液氮速冻，干冰环境送样。或测定蛋白浓度后，将蛋白通过TCA法或丙酮法沉淀，晾干后，干冰或冰袋寄送
注意事项	确保运送环境能一直保持低温、做减震保护。

# 复杂样品制备要求

样本类型	取样和运输指南
动物组织	性别、年龄、体重等指标相近的动物，精确取样，剥离血管、脂肪等， <b>灌注法除血</b> ，剪成小块，吸水纸吸干、液氮速冻后-80°C保存。足量干冰寄送
植物组织	<b>新鲜采集</b> ，预冷PBS洗净、吸水纸吸干、液氮速冻后-80°C保存。足量干冰寄送
细胞样本	细胞培养好之后，用胰酶消化，预冷PBS洗涤3-5次， <b>低速离心</b> （1000 g，4°C，5 min），弃上清。液氮速冻，-80°C保存。足量干冰寄送
细菌/真菌	收集细菌/真菌，预冷PBS洗3次左右，离心收沉淀，液氮速冻后-80°C保存。足量干冰寄送
血浆	采集血液样本，加入 <b>抗凝剂</b> ，轻轻上下颠倒混匀；4°C 1300 g离心10 min；取上清，混匀，瞬时离心，-80°C保存【灭活后干冰送样】
血清	收集全血至真空采血管，轻轻上下颠倒混匀； <b>4°C放置30-45 min</b> ，4°C 1300 g离心10 min；取上清，混匀，瞬时离心。-80°C保存【灭活后干冰送样】

# 常规样品需求量

	蛋白鉴定	标记定量	Label-free	SWATH/DIA	磷酸化定量
胶条	条带清晰可见	N/A	N/A	N/A	N/A
蛋白溶液	≥10 μg	≥500 μg	≥100 μg	≥100 μg	≥5 mg
动物组织	≥20 mg	≥100 mg	≥100 mg	≥100 mg	≥250 mg
植物组织	≥50 mg	≥500 mg	≥500 mg	≥500 mg	≥2.5 g
真菌	≥40 mg	≥400 mg	≥400 mg	≥400 mg	≥2.5 g
细菌	≥20 mg	≥200 mg	≥200 mg	≥200 mg	≥500 mg
细胞样品	≥1 × 10 <sup>6</sup>	≥5 × 10 <sup>6</sup>	≥5 × 10 <sup>6</sup>	≥5 × 10 <sup>6</sup>	≥5 × 10 <sup>7</sup>
血清/血浆	≥100 μL 无溶血	≥500 μL 无溶血	≥500 μL 无溶血	≥500 μL 无溶血	≥1 mL

## 2. 不同类型样本的前处理流程

---

常规样品的蛋白提取

---

还原烷基化、质控

---

酶解、除盐、标记

---

肽段分级、除盐

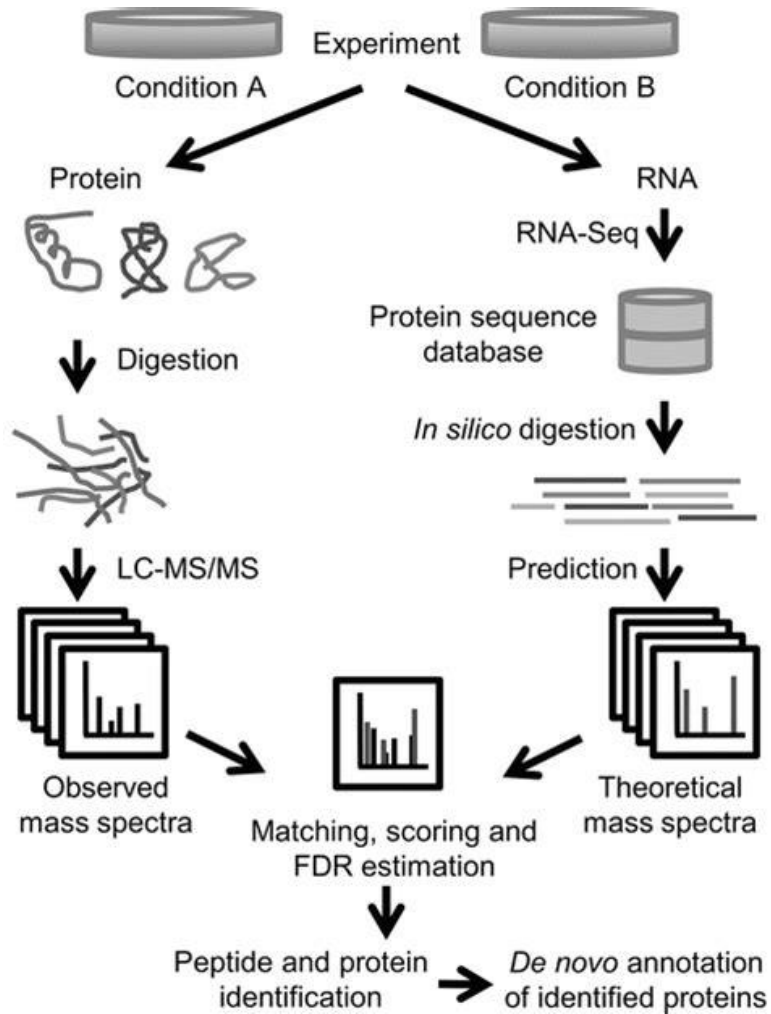
---

质谱检测

---



# 目的和基本原则



前处理的目的一——尽可能准确地对尽可能多的蛋白进行检测

前处理原则——减少在实验阶段对蛋白的人为**降解**和**修饰**，释放尽可能多的肽段，送进质谱检测

# 常规样品蛋白提取

## 常用的破碎方法

- 机械碎裂法：液氮研磨、匀浆、捣碎法
- 物理破碎法：温差法，压力差、超声破碎法
- 化学处理法：各种水解酶、1.5% SDS、8 M 尿素、6 M 盐酸胍等。



# 常规样品蛋白提取

- 常用的抽提试剂

- 变性剂：尿素 (8 M)、硫脲 (2 M)
- 还原剂：DTT (二硫苏糖醇)、 $\beta$ -巯基乙醇
- 去污剂：SDS
- 蛋白酶抑制剂：PMSF、磷酸酶抑制剂
- 有机试剂：丙酮、TCA

# 常规样品蛋白提取

动物组织

剪碎

SDS裂解

组织破碎

超声破碎

煮沸

离心

丙酮沉淀

植物组织

研磨

SDS裂解

组织破碎

超声破碎

煮沸

离心

丙酮沉淀

细胞/微生物

尿素裂解

超声破碎

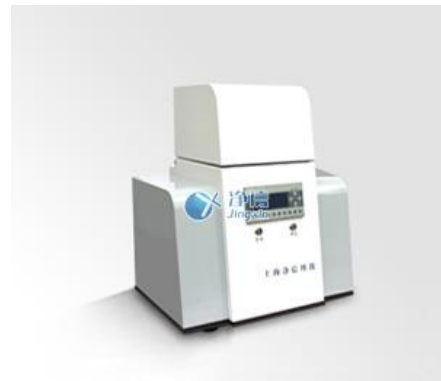
离心

培养液/发酵液

离心

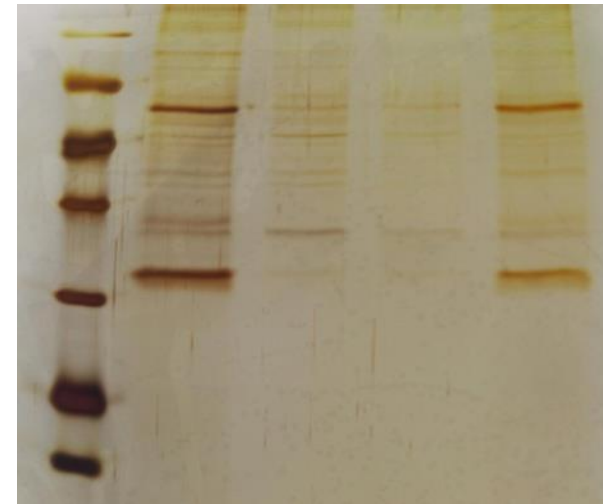
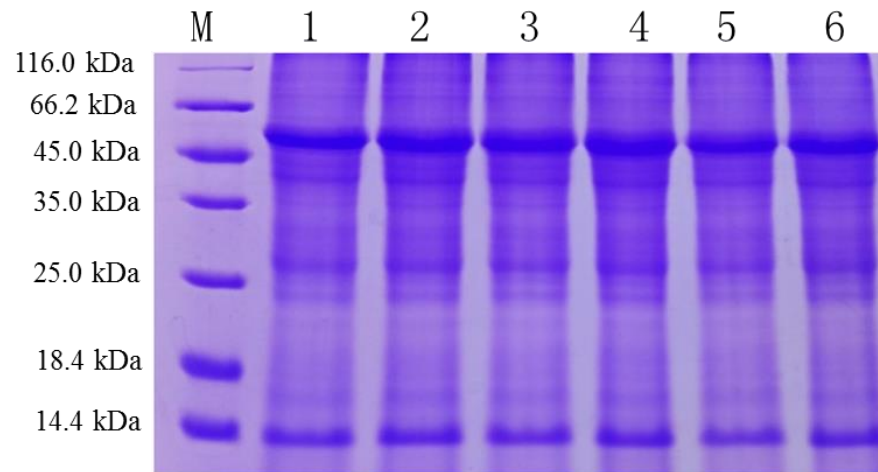
超滤

TCA沉淀



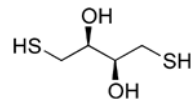
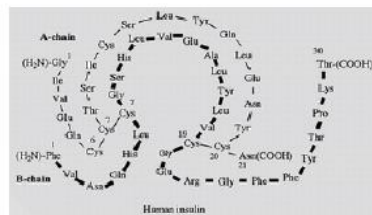
# 蛋白质控

- ✓ 蛋白浓度测定：Bradford：与SDS 不兼容  
BCA：与还原试剂不兼容
- ✓ SDS-PAGE：考染、银染



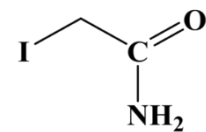
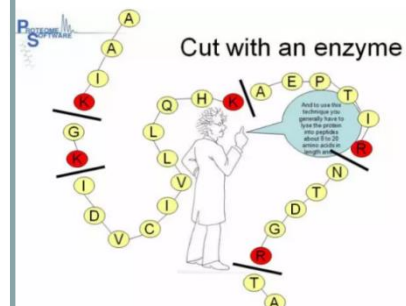
# 还原烷基化

打开二硫键



DTT

封闭巯基



IAA

目的是使球状蛋白变成链状结构，暴露更多的酶切位点，便于酶切

# 酶解

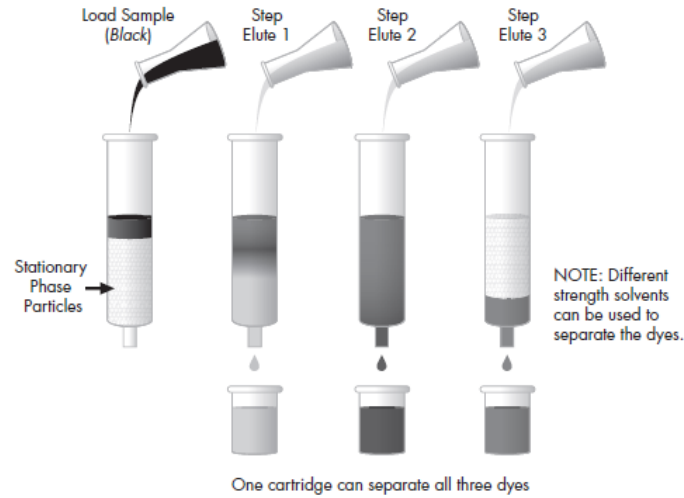
酶解是整个样品制备过程的**核心**所在

酶解的关键在于**缓冲体系**、**酶量**及**酶切时间**：

- 胰蛋白酶：切断**赖氨酸 (Lys/K)** 和**精氨酸 (Arg/R)** C端肽键。
- 缓冲体系：碳酸氢铵体系，TEAB

# 除盐

Sep-pak	>500 $\mu\text{g}$
StageTip	30 $\mu\text{g}$
Sep-pak	多肽
500 mg	10 mg
100 mg	1 mg
50 mg	500 $\mu\text{g}$



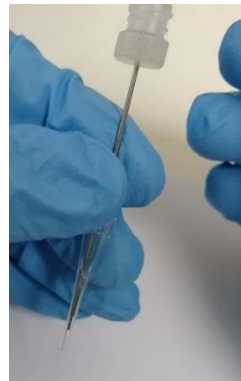
Step1: 活化

Step2: 平衡

Step3: 上样

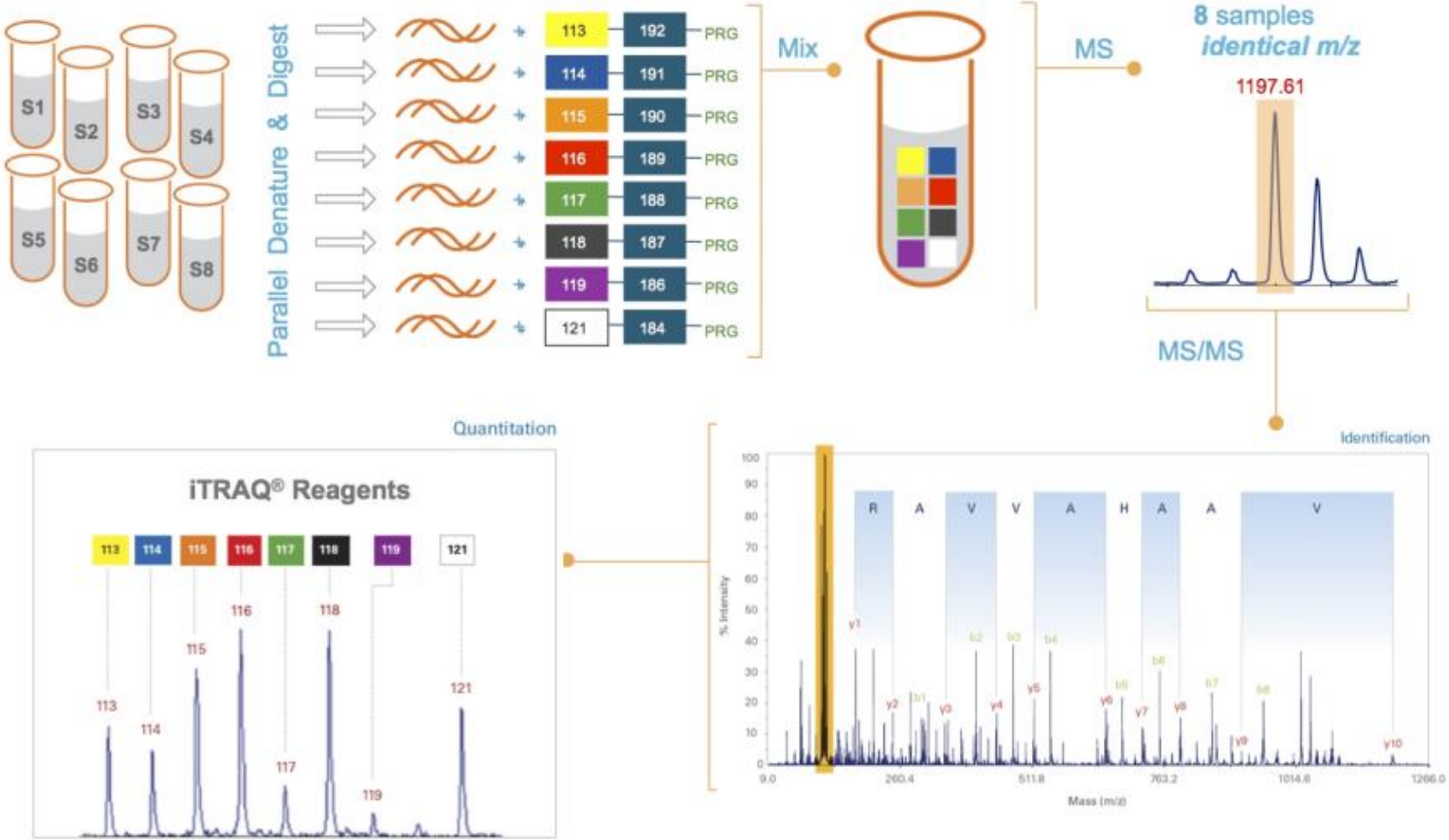
Step4: 清洗

Step5: 洗脱

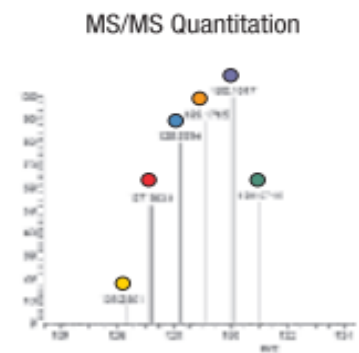
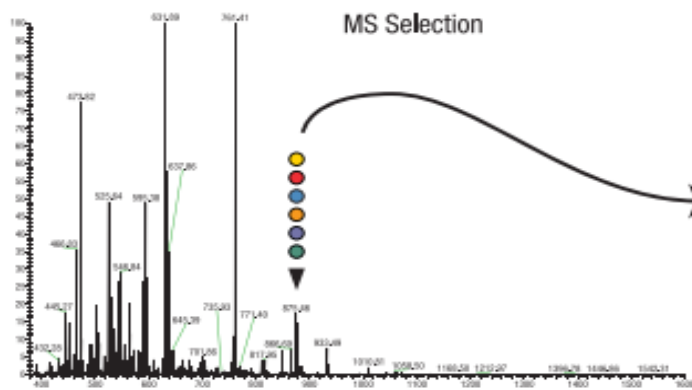
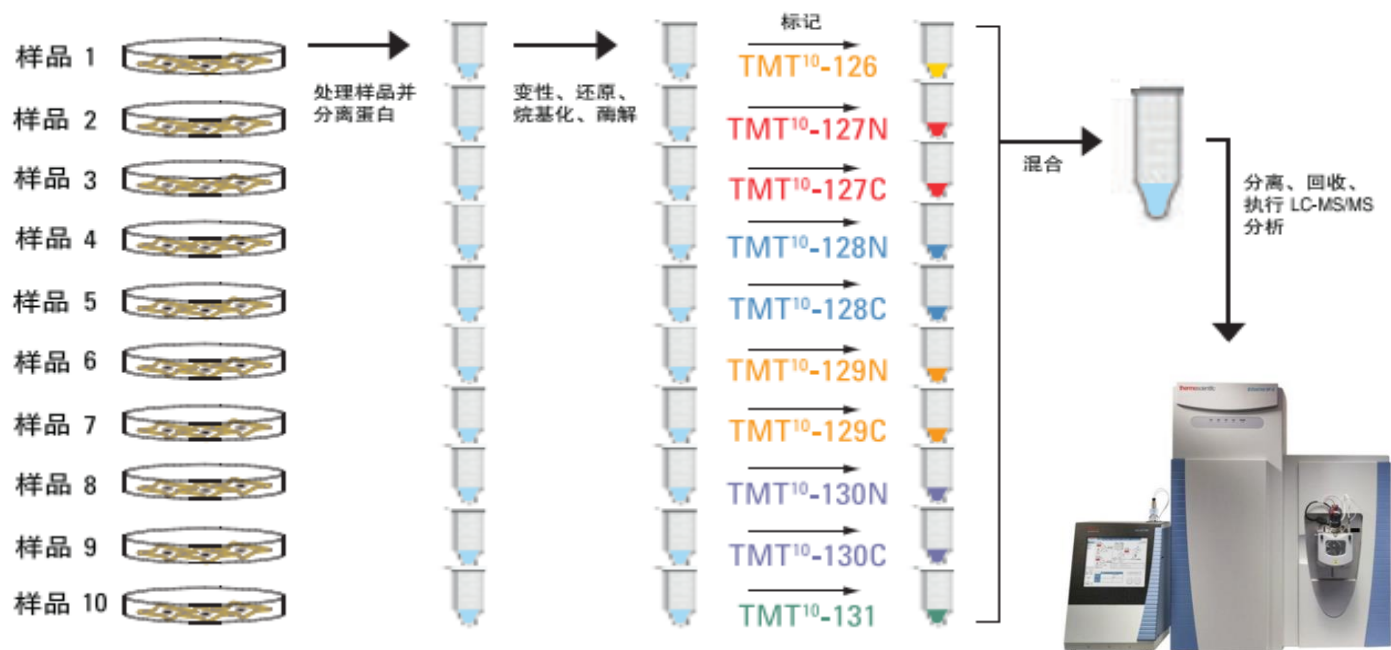




# iTRAQ标记



# TMT标记

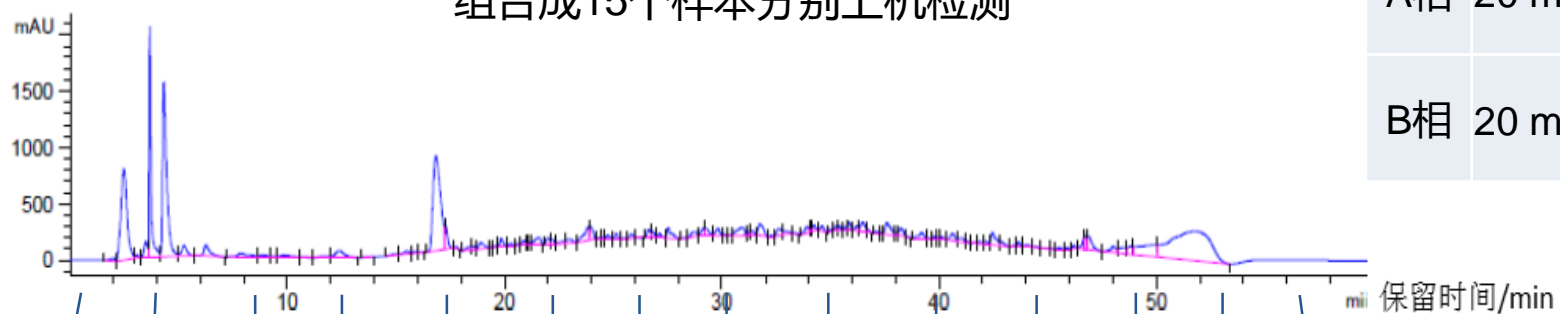


# HPLC分离

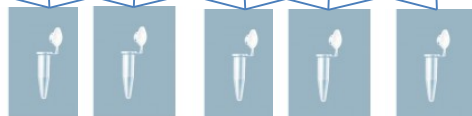
按每分钟一管收集60管

组合成15个样本分别上机检测

信号强度/mAU



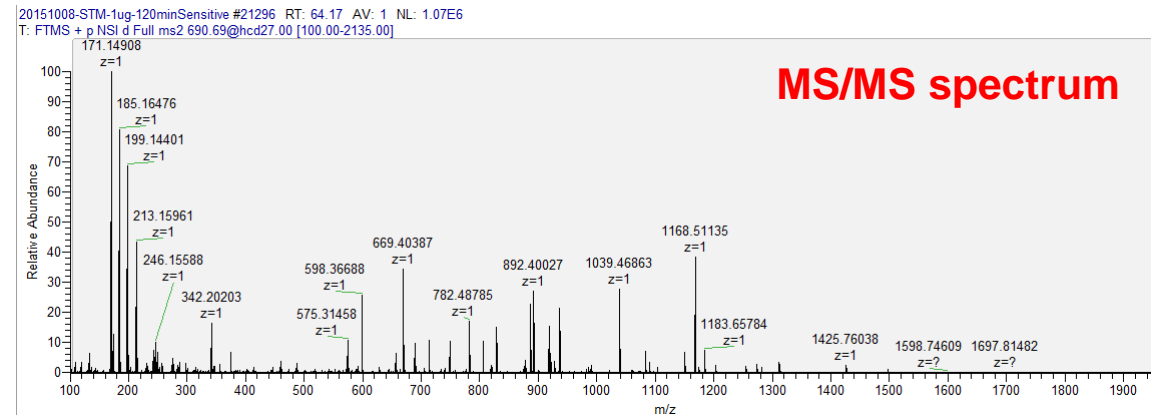
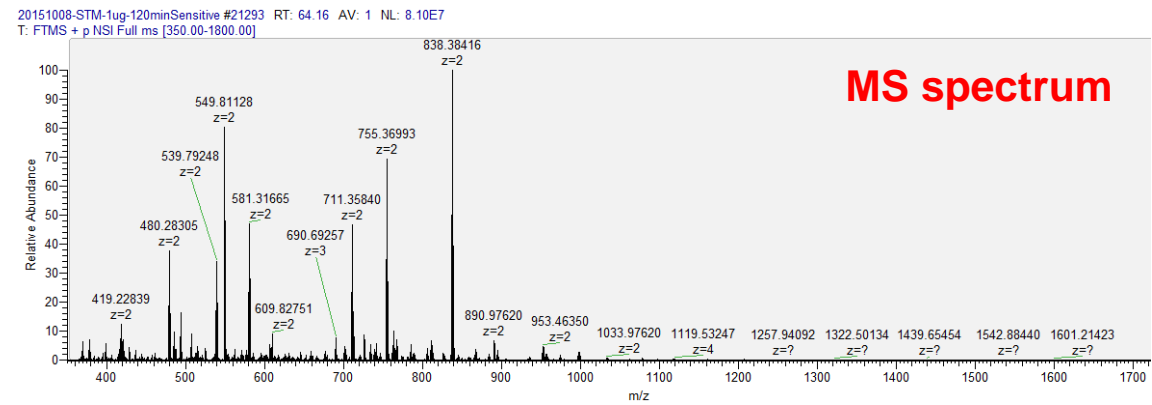
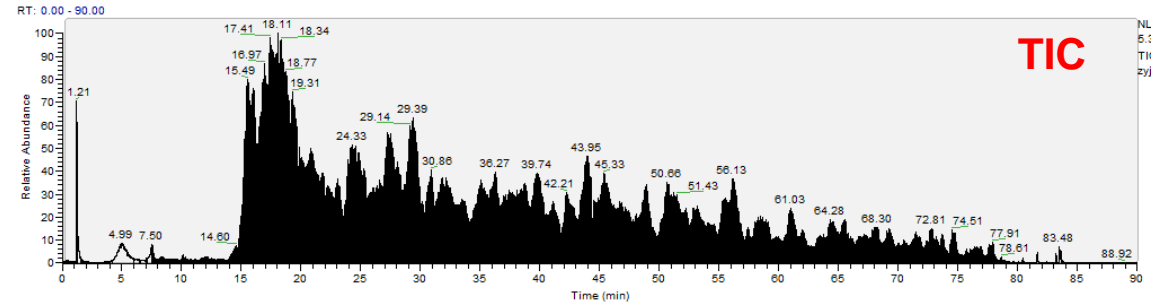
.....



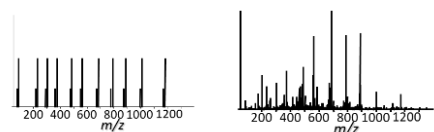
流动相	
A相	20 mM HCOONH <sub>4</sub> pH=10
B相	20 mM HCOONH <sub>4</sub> 80% ACN

注意：高pH和低pH二维液相搭配，保证具有很好正交性

# 质谱检测



# 质谱检测



数据库检索比对

肽段鉴定

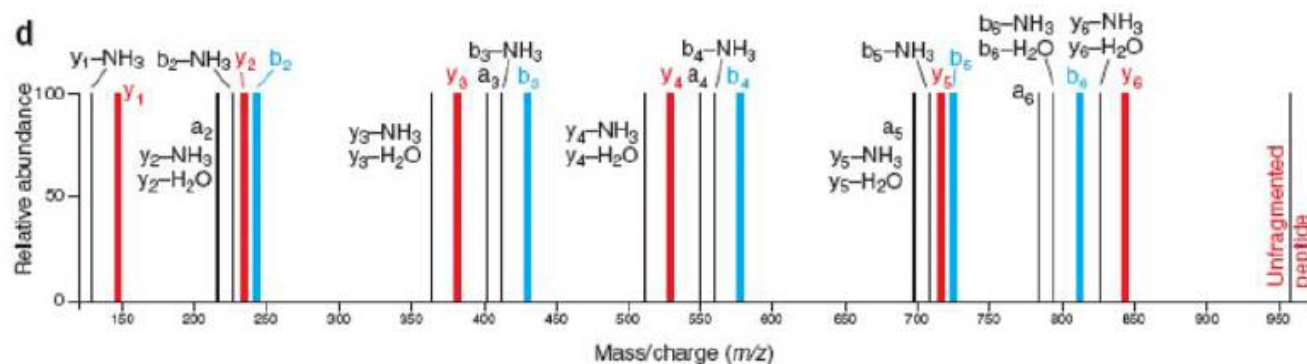
蛋白鉴定

相对定量

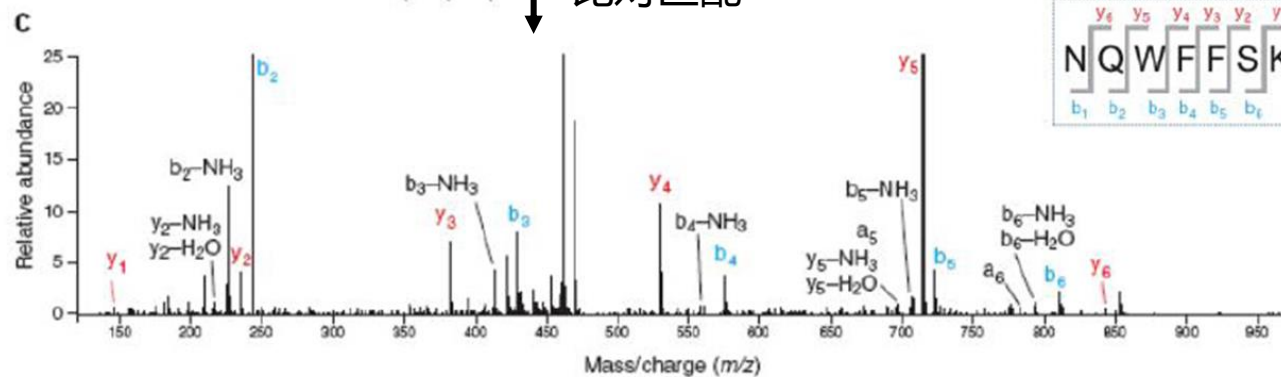
Protein database  $\xrightarrow{\text{模拟酶切}}$  NQWFFSK  $\xrightarrow{\text{模拟碎裂}}$

b <sub>1</sub>	N—QWFFSK	y <sub>1</sub>
b <sub>2</sub>	NQ—WFFSK	y <sub>2</sub>
b <sub>3</sub>	NQW—FFSK	y <sub>3</sub>
b <sub>4</sub>	NQWF—FSK	y <sub>4</sub>
b <sub>5</sub>	NQWFF—SK	y <sub>5</sub>
b <sub>6</sub>	NQWFFS—K	y <sub>6</sub>

推测图谱

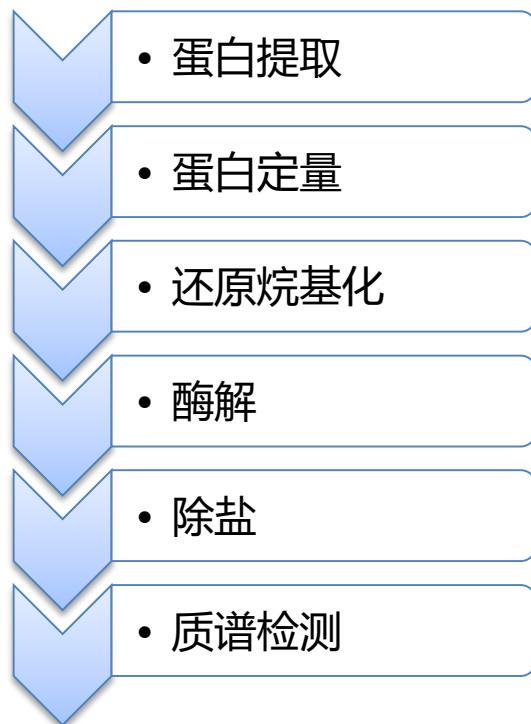


比对匹配

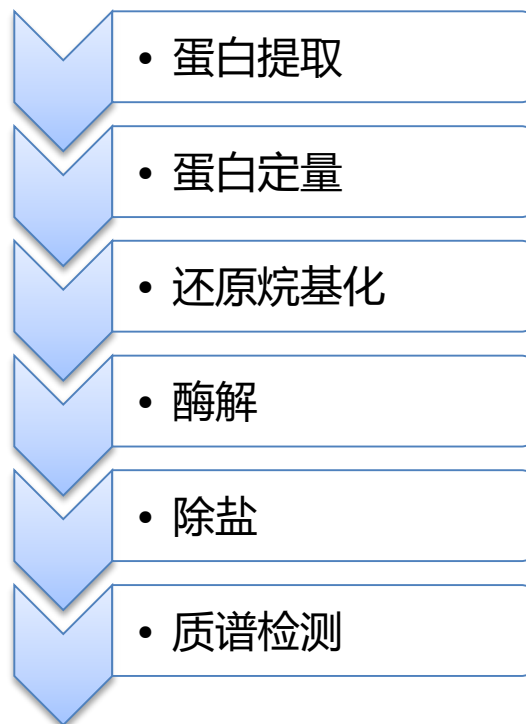


# 常用定量方法实验流程图

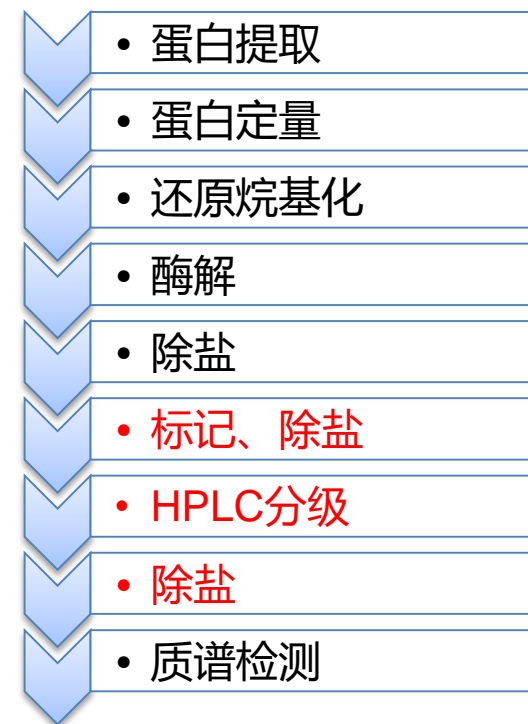
## LFQ



## SWATH/DIA

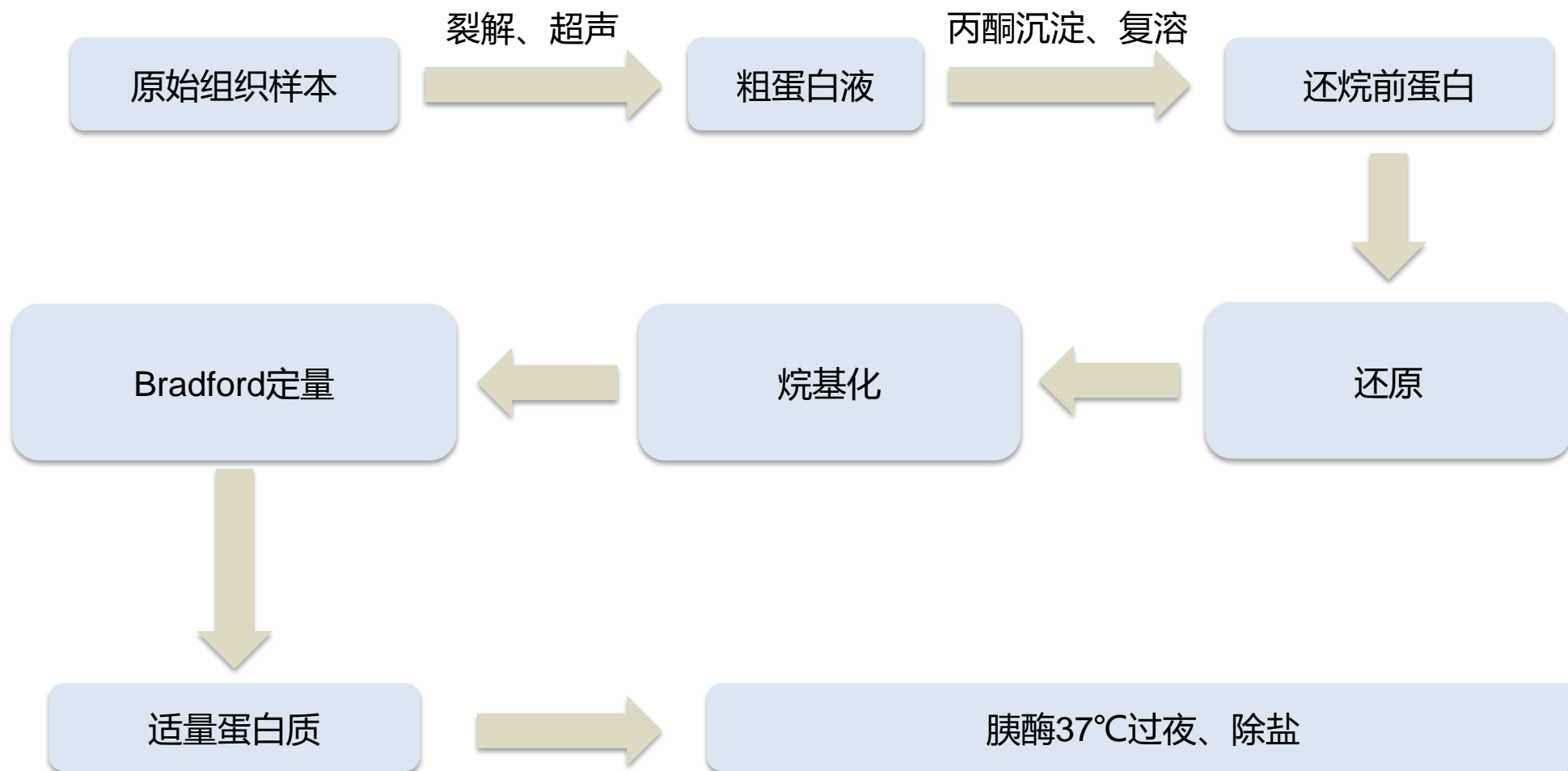


## iTRAQ/TMT



定量类型	样本复杂性	分析深度	重复性	定量准确性	实验成本	样本数目
LFQ	++	++	++	++	++	无限制
iTRAQ/TMT	+++	+++	+++	+++	+++	局限性
SWATH/DIA	++	++-	++++	++++	+++	无限制

# 案例：斑马鱼组织样本TMT定量分析



# 案例：斑马鱼组织样本TMT定量分析

TMT标记

样本	混样1	1	2	3	4	5	6
标记	126	127N	127C	128N	128C	129N	129C
样本	混样2	7	8	9	10	11	12
标记	126	127N	127C	128N	128C	129N	129C

结果

proteins	6075
Peptide groups	42665
PSMs	171858
MS/MS spectrum Info	653965
Quan spectra	653787



## 总结：样品准备注意事项

样本类型	所需最少样本量	样品准备要点
胶条样品*	染色条带肉眼可见	避免污染；去除多余胶块
蛋白溶液	≥20 μg	标明溶液成分
细胞	5*10 <sup>6</sup> 细胞数或细胞沉淀30 μL	保持冷冻，避免冻融
细菌/真菌	≥200 mg/≥400 mg	避免培养基中蛋白污染
动物组织*	鲜重≥100 mg	剥离血管、脂肪；除血
植物组织	鲜重≥200 mg	新鲜取样，避免污染
培养液	≥5 mL	避免培养基中蛋白污染
血清/血浆	≥500 μL	快速处理，避免溶血或凝血

## 附：学习资料

克里克学苑

[https://mp.weixin.qq.com/s?\\_\\_biz=MzI3MTM3OTExNQ==&mid=2247484654&idx=1&sn=a7e8375c1daf91760aec3b64cf6f27b3&scene=19#wechat\\_redirect](https://mp.weixin.qq.com/s?__biz=MzI3MTM3OTExNQ==&mid=2247484654&idx=1&sn=a7e8375c1daf91760aec3b64cf6f27b3&scene=19#wechat_redirect)



微信扫一扫  
关注该公众号

# CHEMICAL REVIEWS

Review

[pubs.acs.org/CR](https://pubs.acs.org/CR)

## Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics

Yaoyang Zhang,<sup>†,#</sup> Bryan R. Fonslow,<sup>†,#</sup> Bing Shan,<sup>†</sup> Moon-Chang Baek,<sup>†,‡</sup> and John R. Yates, III<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Department of Chemical Physiology, The Scripps Research Institute, La Jolla, California 92037, United States

<sup>‡</sup>Department of Molecular Medicine, Cell and Matrix Biology Research Institute, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu 700-422, Republic of Korea

综述

# 核心成员及服务内容



陈希，武汉大学博士，高级工程师，蛋白质组学技术专家，在蛋白质组及生物质谱领域有14年专业积淀，发表SCI论文30余篇，申请发明专利5项，实用新型专利2项，软件著作权8项，主持多项国家及省市基金。



王敏，中国药科大学硕士，实验师，具有丰富的液质管理经验，能够熟练操作使用多种液质系统及进行相关维护，熟练掌握蛋白质样品提取、胶内酶解、溶液内酶解、肽段脱盐、分离等样品前处理方法。



贾书召，华中农业大学硕士，助理工程师，主要负责蛋白质组样本前处理、质谱上机、数据分析等，在鉴定蛋白质组学、定量蛋白质组学、蛋白质的翻译后修饰及其定量等研究领域积累了大量经验。

胶内蛋白质鉴定	SDS-PAGE电泳得到的条带，经胶内酶解后用于质谱分析以获得蛋白质信息。此外，蛋白的翻译后修饰位点（如磷酸化、泛素化、乙酰化等）也可以通过该方法进行检测。
溶液内蛋白质鉴定	复杂的全细胞裂解液、IP洗脱液、蛋白纯化产物，通过质谱检测，可以得到样品中蛋白的鉴定结果。
非标记定量蛋白质组学分析	无需标记，操作简单，不受比较样品数限制。对实验过程的操作和质谱仪的状态要求较高。
标记定量蛋白质组学分析	利用化学标记如TMT、iTRAQ、Dimethylation；代谢标记如SILAC。可同时比较多种样品之间的蛋白表达量。
磷酸化位点鉴定和定量分析	蛋白质磷酸化修饰是生物体内普遍存在的调节机制。目前，基于IMAC/TiO <sub>2</sub> 的磷酸化肽段富集技术，结合高通量液相色谱质谱联用技术，成为高通量定性和定量研究蛋白质磷酸化修饰的最有效手段。

# 谢谢聆听



蛋白质组学平台咨询：

陈 希 13517294773

王 敏 13387651430 (QQ: 854385180)

贾书召 15827113841 (QQ: 1169582749)