

蛋白鉴定（beads/溶液/胶条） 送样检测指导手册

目录

1. 蛋白质组学不同类型样品的要求及准备	1
1.1 Beads 沉淀（蛋白 A/G 磁珠或琼脂糖珠）	1
1.2 蛋白溶液（非变性或变性蛋白溶液）	1
1.3 胶条（SDS-PAGE 变性胶条或 Native 非变性胶条）	2
2. 样本准备基本原则	2
3. 样本名称、包装、运送	2

为保证后续实验结果, 我们针对样本的采集有一些建议, 希望能为您理想的实验结果锦上添花。

1. 蛋白鉴定不同类型样品的送样建议和注意事项

	beads沉淀	蛋白溶液	胶条
送样类型	•蛋白 A/G 磁珠-抗原抗体复合物 •琼脂糖珠-抗原抗体复合物	•非变性洗脱蛋白 •变性洗脱蛋白	•SDS-PAGE胶条 •Native-PAGE胶条
推荐送样量	1管/样 (有备份最好)	1管/样 (有备份最好)	至少1份/样 (有备份最好), 每个胶条的面积大小不超过20mm ² , 如2mm*10mm或4mm*5mm。
酶解方式	直接beads上酶解 (推荐方式)	溶液内酶解 (自动化, 可兼容复杂体系)	胶内酶解 (自动化)
保存及运输	•-80℃保存, 干冰运输		•长期保存建议-80℃, 1周内4℃保存, 冰袋运输

1.1 Beads 沉淀 (蛋白 A/G 磁珠或琼脂糖珠)

优点: 操作简单, 省去了洗脱、浓缩等步骤, 降低蛋白损失, 后续直接 on beads 酶解、质谱检测。缺点: 需要根据具体的 IP 实验过程确定样本是否符合直接进行 on beads 酶解, 如直接 on beads 酶解不能很好的将结合的蛋白酶解并洗脱下来则需要考虑用特殊的溶液将结合的蛋白先洗脱下来。

送样注意事项: 1) **洗涤 beads:** 孵育完成后, 使用 wash buffer (不含甘油、Triton、NP-40 和 CHAPS) 清洗样品 2-3 次, 以去除非特异性结合和干扰物质, 离心尽可能去除上清。2) **寄送样品:** 将与 beads 结合的蛋白样品送样检测即可。注意直接送 beads 沉淀, 不需要再添加裂解液或者 loading buffer。3) **备注信息:** 送样时请备注 beads 类型。

1.2 蛋白溶液 (非变性或变性蛋白溶液)

优点: 基于实验目的将样本洗脱后一部分样本用于质谱检测, 另一部分样本可以用于其它实验。可以选择酸洗脱等条件温和和洗脱或变性洗脱。缺点: 溶液 buffer 成分可能会影响样品的检测结果并对仪器有损害, 如去污剂、盐等, 因此在酶解前需去除干扰物质。比如: 如果裂解液中含有 Triton 或者 SDS, 此方法得到的蛋白溶液后期需要经过处理后才能酶解, 处理的过程中会有一定的损失; 如果是含有 loading buffer 或高浓度去垢剂的复杂溶液, 需要用 SP3 磁珠进行处理后才可以溶液酶解。

送样注意事项: 1) **告知 buffer 成分:** 如果在 IP 过程中使用了 NP-40、Triton、CHAPS 等去污剂, 请提前告知。寄送蛋白溶液样品时, 必须注明 buffer 成分, 否则无法安排后续实验。2) **洗脱建议:** 如果 wash buffer 中含有去垢剂,

在 elution 之前最好用不含去垢剂的 wash buffer 洗两遍，然后再 elution。洗脱体积不要太大，以免影响后续的实验操作从而影响后续的实验结果。

1.3 胶条 (SDS-PAGE 变性胶条或 Native 非变性胶条)

优点：通过电泳可根据分子量分离蛋白质，并直观切取目标胶条进行蛋白质谱鉴定，去除非特异性蛋白和杂质，提高鉴定准确性。缺点：胶条蛋白前处理过程繁琐，需要多次脱色、清洗、干燥，过程中还会造成角蛋白污染，影响结果。

送样注意事项： 1) **SDS-PAGE：** 洗干净的 protein A/G-beads 中加入适量 2×SDS loading buffer，沸水/100℃煮 10 分钟。电泳时两个样品之间请加一个空白泳道，避免样品交叉污染。如果需切取目标条带，建议正常跑电泳，切取目标条带到进口离心管中。如果需要切取整个泳道做鉴定，建议跑胶 1-2CM，方便后续实验操作，同时节约样品前处理费用，切取所有条带到进口离心管。2) **Native-PAGE：** 如果研究蛋白质复合物、多聚体形式，也可以寄送 Native 胶条。3) **寄送样品：** 寄送胶条样品时，样本中可以加入适量超纯水或者不加任何溶液，冰袋送样。

2. 样本准备基本原则

代表性 and 一致性原则	样本的取材部位、时间、处理过程等方面尽可能保持一致，否则可能会影响实验结果的可信度。 准确的分离病变组织和对照组织。取样部位不一致和不具有代表性会影响结果。
迅速性原则	样本质量是影响实验结果的最主要因素，用于研究的样本在采集、制备、贮存、运输过程中应尽可能地快，最大限度的缩短从样本采集到实验的时间。
低温原则	样本离体后，立即在 4℃或冰上等低温条件下进行分离，分离好的样本立即置于液氮、干冰或 -80℃冰箱中直至实验，以避免蛋白的降解。

3. 样本名称、包装、运送

样品名称	最好采用双重标记以防样品名称模糊，建议使用进口离心管。 标记 1：用高质量的油性笔在样品管上写上清晰、简单的样品名称，最好 5 个字符以内（不要写中文），用封口膜封好。 标记 2：将样品名称等信息写在标签纸上，贴在管壁上，最好用胶带粘贴牢固以防低温条件下样品标签脱落（最好采用能经受低温的粘性标签纸）。
样品包装	按送样指导的要求准备样品，采用高质量离心管盛装样品。冷冻的组织，用高质量的 2ml 的螺旋冻存管装载；离心管用封口膜密封管口。干冰运输，72 小时内到达，15kg 干冰即可。

邮寄样品

邮寄样品请附带完整的样品信息说明。建议自己存好备份样品。如样品有生物危险请提前咨询技术人员。