

O-糖蛋白样品分析流程

标准操作规范SOP

试剂的准备:		样品准备: 1 ug/ul * 20ul
A1	3% BT Surfatant w/ 10mM TCEP: 取5mg BT Surfactant试剂加150ul 超纯水, 加8ul 200mM TCEP 混匀	
A2	200mM TCEP: 称取57.3 mg TCEP 溶解在1mL 超纯水中	
A3	Digest Buffer: 238.3mg HEPES溶解在50ml 超纯水中, 用1M NaOH 调节pH=8.0 (或121.1mg Tris-HCl 溶解在50ml超纯水, pH=8.0)	
A3	0.11M IAA: 称取20.5mg IAA 溶解在1ml 超纯水中 (现用现配, 避光)	
A4	O-糖蛋白酶: 1ug/ul	
A5	ZIC-HILIC Tip: 25ug ZIC-HILIC Resin/ pkg, 5µm,200Å	
A6	HILIC平衡液: 80%乙腈水溶液 (含0.1%TFA)	
A7	HILIC洗脱液: 1%甲酸水溶液	
A8	rPNGase F糖苷酶: 1ug/ul	
A9	2%乙腈/0.1%甲酸: 20ul乙腈加入980ul超纯水中, 加1ul 甲酸混匀	

序号	操作流程	添加体积	试剂	设备	时间	温度	说明
B-1	取 20ul 1ug/ul 糖蛋白 样品加入1.5ml低蛋白吸附离心管	20ul	1ug/ul 糖蛋白	1.5ml离心管			低吸附蛋白离心管
B-2	加 20ul 3% BT Surfactant w/10mM TCEP 变性还原缓冲液混匀	20ul	3%BT Surfactant w/10mM TCEP				
B-3	干浴95°C 加热10min; 然后冷却至室温			干浴仪	10min	95°C	
B-4	加 4µl 0.11M IAA 混匀, 室温避光 30min	4ul	0.11M IAA		30min	RT	
B-5	加 6µl 1ug/ul rPNGase F糖苷酶 混匀, 干浴50°C 孵育30min	6ul	1ug/ul rPNGase	干浴仪	30min	50°C	
B-6	10K Pall UFD超滤管中加入200ul Digest Buffer, 静置10min	200ul	Digest Buffer	10K Pall UFD			平底超滤管
B-7	加入50ul还原烷基化样品于预处理UFD超滤管中, 然后加入200ul Digest Buffer, 14000rpm离心, 10min	50ul		离心机	10min		
B-8	再加入 200ul Digest Buffer, 14000RPM 离心10min, 重复洗2次	200ul	Digest Buffer	离心机	10min		
B-9	加入1ul 1ug/ul O-糖蛋白酶,加入100ul Digest Buffer 混匀, 37°C孵育2h	100ul	Digest Buffer	干浴仪	120min	37°C	
B-10	14000RPM 离心10min, 收集液加入400ul 乙腈, 5ul TFA	400ul+5ul	400ul 乙腈 和 5ul TFA				
B-11	每次上样100ul加入预平衡好的ZIC_HILIC TIP, 用2.5ml空注射器推出, 5次	100ul	收集的样品				流速: 200ul/min
B-12	再加入平衡液100ul洗2次ZIC-HILIC TIP	100ul	平衡液				
B-13	加入100ul HILIC洗脱液洗2次	100ul	洗脱液				
B-14	合并洗脱液, 总体积200ul, 冻干或离心浓缩			冻干机			
B-15	冻干糖肽加20ul 2% 乙腈/0.1%甲酸 复溶, 用于质谱分析						

LC-MS分析方法

试剂的准备: (推荐使用LC-MS级水, ACN和甲酸)		样品准备: 20ul					
C-1	流动相A: 98%水: 2%乙腈 (含0.1%甲酸)						
C-2	流动相B: 100%乙腈 (含0.1%甲酸)						
C-3	色谱柱	柱温	流速(uL/min)	进样量	雾化气	内衬管	进样器清洗液
C-4	毛细管一体柱 C18, 130 Å, 3 µm, 0.15 x 250 mm, Tip: 10um	RT	1.5	3ul	40	100ul	97%水/3%ACN/0.1%FA
C-5	色谱梯度:	Time(min)	流速(uL/min)	%A	%B	曲线	
		0.00	1.5	100	0	6	
		50.00	1.5	65	35	6	
		50.10	1.5	0	100	6	
		60.00	1.5	0	100	6	

DDA 采集数据

