

标准操作规范 (SOP)

Step I: 试剂准备及样品前处理流程

序号 试剂准备:				样品准备: 10 ug/ul * 10ul			
A-1	BT57试剂: 52ul超纯水溶解			订货号: HLS BT57001			
A-2	rPNGase F 糖苷酶: 10 unit/ul			订货号: HLS PNG001C			
A-3	HEPES Buffer: 12ml 超纯水溶解			订货号: H3375			
A-4	rTrypsin 3.0蛋白酶: 40ul 50mmol醋酸溶解 (option)			订货号: HLS rTRY001C			
A-5	O-糖蛋白酶: 1ug/ul			订货号: HLS IMPA001			
A-6	ZIC-HILIC Tip: 25ug ZIC-HILIC Resin/ pkg, 5µm,200Å			订货号: ZIC HILIC Tip			
A-7	HILIC平衡液: 12ml ACN加入3ml超纯水中, 加15ul FA混			自备			
A-8	匀HILIC洗脱液: 5ml 超纯水中加入5ul TFA,混匀			自备			
A-9	20%ACN/0.1%FA: 400ul ACN加入1600ul超纯水中, 加2ul FA混匀			自备			
A-10	2%ACN/0.1%FA: 10ul ACN加入490ul超纯水中, 加0.5ul FA混匀			自备			
A-11	超纯水: 质谱级			自备			
序号	操作流程	添加体积	试剂	设备	时间	温度	说明
B-1	取 10ul 10ug/ul 糖蛋白 样品加入1.5ml低蛋白吸附离心管	10ul	10ug/ul 糖蛋白	1.5ml离心管			低吸附蛋白离心管
B-2	加10ul BT57 试剂 混匀	10ul	BT 57试剂				
B-3	干浴95°C 加热15min; 然后冷却至室温			干浴仪	15min	95°C	
B-4	加 5µl rPNGase F糖苷酶 混匀, 干浴50°C 孵育30min	5ul		干浴仪	30min	50°C	
B-5	10K 超滤管中加入100ul HEPES Buffer, 静置10min	100ul	HEPES Buffer	10K UFD			Sarlortus 10K平底超滤管
B-6	取烷基化样品予10K 超滤管, 然后加入200ul HEPES Buffer, 离心, 10min	200ul		离心机	10min		
B-7	再加入 200ul HEPES Buffer, 14000RPM 离心10min,更换收集管	200ul	Digest Buffer	离心机	10min		
B-8	加入5ul 1ug/ul O-糖蛋白酶,加入100ul Digest Buffer 混匀, 37°C孵育2h	100ul	O-糖蛋白酶	干浴仪	120min	37°C	
B-9	加入4ul 0.5ug/ul Trypsin3.0蛋白酶, 42°C孵育40min后离心收集滤液	2ul	Trypsin3.0蛋白酶	干浴仪	40min	42°C	
B-10	加入100ul 20%ACN/0.1%FA离心收集, 合并收集液加入800ul 乙腈, 4ul TFA	400ul+4ul	800ul 乙腈 和 4ul 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, 10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% ACN/0.1%FA 复溶, 用于质谱分析						

LC-MS分析方法

序号 试剂的准备: (推荐使用LC-MS级水, ACN和FA)	样品准备: 20ul						
C-1	流动相A: 99%水: 1%ACN (含0.1%FA)						
C-2	流动相B: 99%ACN:1%水 (含0.1%FA)						
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	