

超快速蛋白样品前处理实验方案

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:	蛋白样品: 5 μg/μL 蛋白 * 50 μL
----	-------	--------------------------

A1	BT57试剂：200ul超纯水溶解	订货号：HLS BT57ABC
----	-------------------	-----------------

A2	Digest Buffer试剂: 12ml质谱级水溶解	订货号: HLS DIG001B
----	-----------------------------	------------------

A4	rTrypsin 3.0蛋白酶: 40ul 50mmol醋酸溶解 (option)	订货号: HLS rTRY001C
----	---	-------------------

A-6 超纯水：质谱级

序号	操作流程	添加体积	试剂	设备	时间	温度	说明
B-1	分取10ul 5ug/ul蛋白样品加入1.5ml低吸附离心管	10 μL	蛋白样品	1.5 mL离心管			
B-2	加10ul BT57试剂 混匀	10 μL	BT57试剂				
B-3	干浴60 °C 加热20min			干浴仪	20min	60 °C	
B-4	20ul变性还原烷基化样品转入10K复性平底超滤管	20 μL	变性还原烷基化样品	pall 10K超滤管			
B-5	加400ul Digest Buffer, 14000rpm 离心 5min	400 ul	Digest Buffer	离心机	5min		
B-6	再加入100ul Digest Buffer	100 μL	Digest Buffer				
B-7	加入2ul 0.5ug/ul 蛋白酶混匀, 45 °C孵育30min	2 μL	蛋白酶	干浴仪	30min	45°C	
B-8	加入12ul 甲酸, 45 °C孵育20min	12 μL	甲酸	干浴仪	20min	45°C	
B-9	14000rpm离心5min, 收集滤液用于质谱分析			离心机	5min		必要时更换收集管

试剂准备: (建议使用质谱级试剂) 多肽样品: 100ul

C1 流动相A: 98%水 : 2%乙腈(含0.1%甲酸)

C-2 流动相B: 1%水 : 99%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	RT	1.5	3 µL	30	100 µL	98% Water / 2% ACN

C-6	色谱梯度	时间 (min)	流速 (uL/min)	%A	%B	Curve
-----	------	----------	-------------	----	----	-------

	0.00	1.5	100	0	6
	50.0	1.5	65	35	6
	50.1	1.5	0	100	6
	60	1.5	0	100	6