

蛋白质组送样标准和样本预处理

一、送样标准

(一)定性蛋白质组

1.胶点胶条

送考马斯亮蓝染色或银染后的胶点/胶条，要求条带清晰，无降解。

注：考马斯亮蓝染色的条带鉴定到目标蛋白的概率高于银染。4℃保存，放入 EP 管中，加入去离子水浸泡，冰袋寄送。

2. 互相作用谱（IP / Co-IP / Pull-down）

方案一：IP / Co-IP / Pull-down 的蛋白洗脱液，跑 SDS-PAGE 胶。将整个泳道按照轻重链切成五份，轻链重链合并为一个样本，剩下的三个样本作为独立样本此方案鉴定到目标蛋白的概率最高。

注：此方案相当于 4 个独立的样本。费用相当于 4 份。

方案二：IP / Co-IP / Pull-down 的蛋白洗脱液，跑 SDS-PAGE 胶。不要跑完整个泳道，在样本跑出分离胶 1-1.5cm 后停止电泳，切胶送样。此方案鉴定到目标蛋白的概率降低，因为 shot-gun 优先检测高丰度蛋白。

方案三：送蛋白溶液，必须提供溶液成分或详细样本处理过程及试剂，蛋白总量为 50μg 以上。此方案需要沟通评估。

3.FFPE

每片厚度 10μm，面积 1.5×2 cm，10 片。

注：参考细胞量

2、定量蛋白质组

样本类型		label free	iTRAQ/TMT/DIA/PRM	高深度
动物组织	常规组织（脑、心、肝、脾、肺、肾、肌肉等）	100mg	150mg	300mg
	坚硬组织（软骨、毛发）	400mg	500mg	1.2g
植物组织	柔软组织（木本植物的叶、花等，草本植物，藻类，蕨类植物）	200mg	300mg	500mg
	坚硬组织（树根、树皮、树枝，果实种子等）	2g	3g	9g
	花粉	100 μ l	200 μ l	600 μ l
微生物	常见细菌、真菌菌体	50 mg 50 μ l 沉淀	100 mg 100 μ l 沉淀	200 mg 200 μ l 沉淀
细胞	悬浮/贴壁培养细胞（因为细胞大小不一，重点是必须达到要求的体积）	50 mg 50 μ l 沉淀	100 mg 100 μ l 沉淀	200 mg 200 μ l 沉淀
液体类	血浆/血清	150 μ l（不去高丰度）；300 μ l（去除高丰度）	300 μ l（不去高丰度）；500 μ l（去除高丰度）	600 μ l（不去高丰度）；1ml（不去高丰度）
	唾液/泪液	400 μ l	600 μ l	1.8ml
	培养基上清（需评估）	10ml	10ml	30ml
其他	纯蛋白（溶解缓冲液不能包含CHAPS，NP40，Triton X-100等去垢剂，最佳）	100 μ g	200 μ g	500 μ g
FFPE	每片厚度 10 μ m，面积 1.5 $\times$ 2 cm	10 片	15-20 片	30-40 片

3. 修饰蛋白质组

样本类型		磷酸化 (label free) /N-糖基化标	标记磷酸化 (TMT)	乙酰化/琥珀酰化/丙酰化/泛素化
动物组织	常规组织 (脑、心、肝、脾、肺、肾、肌肉等)	500mg	150mg	2g
	坚硬组织 (软骨、毛发)	5g	500mg	10g
植物组织	柔软组织 (木本植物的叶、花等, 草本植物, 藻类, 蕨类植物)	2.5g	300mg	10g
	坚硬组织 (树根、树皮、树枝, 果实种子等)	10g	3g	20g
	花粉	800 μ l	200 μ l	2ml
微生物	常见细菌、真菌菌体	200 mg 200 μ l 沉淀	100 mg 100 μ l 沉淀	1 g 1 ml 沉淀
细胞	悬浮/贴壁培养细胞 (因为细胞大小不一, 重点是必须达到要求的体积)	2×10^7 100 μ l 细胞沉淀	5×10^6 30 μ l 细胞沉淀	10^8 500 μ l 细胞沉淀
液体类	血浆/血清 (不去高峰度)	1ml	500 μ l	1.5ml
	唾液/泪液	2ml	600 μ l	3ml
其他	纯蛋白 (溶解缓冲液不能包含 CHAPS, NP40, Triton X-100 等去垢剂, 最佳 buffer 是 8M Urea)	2mg	400 μ g	10mg

二、样本预处理及保存

1. 动物组织样本

(1) 常规动物组织(脑、心、肝、脾、肺、肾、肌肉等)

根据研究目的取特定部位组织, 如果组织上有血液残留, 用预冷的生理盐水/PBS 将其清洗掉, 然后将组织剪切成边长 0.5 cm 小块或 100 mg 左右小块装入管中。注明组织具体部位, 做好标记, 液氮速冻 5min 以上, 保存至-80℃, 避免反复冻融。

(2) 软体动物 (血吸虫、旋毛虫等)

用预冷的 PBS 去除污染物, 液氮速冻 5 min 以上, 做好标记, -80℃保存, 避免

反复冻融。

(3) 动物坚韧组织（软骨、毛发等）

根据研究目的取特定部位组织，去除非目标组织。用预冷的 PBS 洗去附着物，注明组织具体部位，做好标记，液氮速冻 5min 以上， -80°C 保存，避免反复冻融。

2. 植物组织样本

(1) 植物的叶、花、果实、种子、树根、树皮等及藻类、蕨类等

根据研究目的取特定部位组织，去除非目标组织，取样后用预冷的 PBS 清洗 2-3 遍，去除杂质。注明组织具体部位，做好标记后液氮速冻 5min 以上， -80°C 保存，避免反复冻融。

(2) 花粉

开花期收集花粉，在显微镜下检查花粉并去除杂质，转入 EP 管内， -80°C 保存。

(3) 藻类组织

根据不同的藻类采取合适的离心力，分离藻类同时保证细胞完整，PBS 洗涤 2-3 次，液氮速冻， -80°C 保存。

3. 微生物样本

采用离心法收集菌体，用预冷的 PBS 快速冲洗 2-3 次，避免培养基蛋白对菌的污染。每次清洗后 4°C ，5000rpm，离心 5min；将上清完全弃去，菌体收集在 1.5mL 进口离心管（冻存管）中，记录菌体积，液氮速冻后， -80°C 冰箱保存。

4. 细胞样本

1) 悬浮细胞

1) 400-1000 g 离心 5-10 min 收集悬浮细胞，弃上清。

2) 用预冷的 PBS 溶液洗 2-3 遍，离心弃上清，收集细胞于 1.5ml 离心管中。

3) 建议每个样品至少 2-3 管，每管细胞体积大于 $50\ \mu\text{l}$ ，记录细胞体积，液氮速冻后， $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

(2) 贴壁细胞

1) 培养好的细胞去除培养基，用预冷的 PBS 溶液清洗细胞表面 2-3 遍。

2) 将含细胞的培养皿置于冰上，加入 0.5ml 裂解液（6M 尿素，0.1M 碳酸氢铵，0.2%SDS），轻轻摇晃培养皿，用细胞刮将细胞刮下，吸取细胞和裂解液到 1.5mL 离心管。

3) 建议每个样品至少 2-3 管，每管细胞体积大于 $50\ \mu\text{l}$ 。记录细胞体积，液氮速冻后， $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

注：

1) 裂解液使用前加入蛋白酶抑制剂(如有条件)；如果进行磷酸化检测，裂解液中需加入磷酸酶抑制剂（Roche，货号：5892791001）。

2) 若无此裂解液，也可按照贴壁细胞传代流程，采用胰酶酶解使贴壁细胞脱落，用预冷的 PBS 溶液清洗细胞 2-3 遍，再送样。

5. 液体样本

(1) 血浆

使用 EDTA 抗凝管（紫色头盖）采集血液样本，轻轻地上下颠倒混匀 8-10 次，立即 $4\ ^\circ\text{C}$, 1600g 离心 10min。用移液器将上层血浆转移至进口 1.5ml 离心管中，如有条件可立即添加蛋白酶抑制剂混匀(推荐 roche，货号 11873580001)， $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

(2) 血清

收集全血至不含抗凝剂的离心管或真空采血管（红色头盖）中。 $4\ ^\circ\text{C}$ 静置 15-30min 进行凝固分层， $4\ ^\circ\text{C}$ ，1600g 离心 10min(为保证血清质量可再离心一次)。

用移液器将血清转移至进口 1.5ml 离心管中，如有条件可立即添加蛋白酶抑制剂混匀(推荐 roche，货号 11873580001)，-80℃冰箱保存。

注：制备过程中不能溶血

(3) 唾液

取样前禁食 2h 以上，上午 9 -12 点取样最佳，1000g-2000g 离心 5min，取上清于 1.5ml 离心管(或使用 0.22μm 滤膜过滤)，-80℃保存。

(4) 泪液

使用毛细管微量移液管收集样品于进口离心管，8000-14000g 4℃离心 5min，取上清于 1.5ml 离心管内，-80℃保存。

(5) 细胞培养上清液

培养细胞去除旧培养基，用 PBS 清洗 2-3 遍，然后加入无血清培养基继续培养一段时间。根据实验设计或细胞培养状态选择合适时间收集细胞上清。4℃，1000g，离心 10 min 去除细胞，取上清，10000g 离心去掉细胞，取上清分装到离心管中，-80℃冻存。

6. 其它

(1) 蛋白溶液

请提供蛋白提取方法及溶解缓冲液信息，裂解液可以用 6M 尿素含 0.1-1%SDS；其他溶解缓冲液可以使用纯水或 PBS，如使用其他 buffer 请提前咨询是否兼容，并填写到送样单上。强烈建议以蛋白干粉形式送样。

三、注意事项

1. 胶点胶条样品，4℃保存，放入 EP 管中，加入去离子水浸泡，冰袋寄送。
2. 动植物组织、菌体、细胞沉淀、体液样本、培养基上清和蛋白溶液，样品收

集后立即置于液氮中冷冻 5min，磷酸化蛋白质组推荐加入磷酸酶抑制剂

(Roche, 货号: 5892791001), -80°C 保存, 干冰寄送。

3、若送样为提取好的蛋白, 需提供 SDS-PAGE 电泳图, 检测蛋白提取效果。

4、若送样为蛋白溶液, 需提供提取过程使用的试剂成分。样品如有特殊处理, 请注明处理的过程及使用的试剂配方。

5、样品中有毒性或腐蚀性的物质, 必须事先声明; 病原性微生物或具有传染性的病变组织, 需灭活后送样。

6、若样品材料具有特殊性请备注说明, 如具有很厚的荚膜、容易氧化等。

7、若客户需要特殊的处理方法, 请备注说明。

8、建议选用进口离心管、冻存管或干净的锡箔纸保存样本, 离心管使用 Parafilm 封口膜密封管口。

9、样品标记需清晰明确。建议进行双重标记, 使用高质量的油性笔在每个样品盛放管上清晰、简明地标记样品名称, 样品管请用封口膜封口, 将样品名称等各种信息写在标签纸上, 贴在管壁, 外面再用透明胶带缠绕一圈, 与样品信息单中保持一致。

10、样品信息单中务必准确填写样品物种拉丁名、组织来源、蛋白数据库、样品标记名称、管数、样本差异分析组合信息等。