	國立成功大學 生物科技中心 質譜多體學核 心設施平台	蛋白質分析方 法	文件編號	PSOP
			版次	01版
		IP與膠內消化送 樣前操作指引	制定日期	115/04/07
			制定者	馬鵬芳


# 蛋白質分析方法

## IP 與膠內消化送樣前操作指引

文件編號：PSOP-01

實驗室負責人：\_\_\_\_\_ 審核日期：\_\_\_\_\_

品保負責人：\_\_\_\_\_ 審核日期：\_\_\_\_\_

	國立成功大學 生物科技中心 質譜多體學核 心設施平台	蛋白體分析方 法	文件編號	PSOP
			版次	01版
		IP 與膠內消化送 樣前操作指引	制定日期	115/04/07
			制定者	馬鵬芳

## 1. 目的


針對含有高濃度非揮發性鹽類或高破壞性界面活性劑（如 NP-40, Triton X-100, SDS）之免疫沉澱樣品，利用聚丙烯醯胺膠體（Polyacrylamide gel）作為實體物理過濾屏障進行除鹽與除劑，以製備符合高階 LC-MS 分析標準之無污染肽樣品，確保質譜儀器之妥善率。

## 2. 適用對象

使用傳統西方墨點法（Western Blot）SOP 進行 IP 實驗，且樣品中明確含有 SDS、NP-40 或高濃度 PBS 緩衝液之案件。此外尚有委託方無法自行將蛋白質純化至揮發性緩衝液中，僅能提供未經質譜合規化處理之原始沖提液。**嚴禁使用含有戊二醛（Glutaraldehyde）、甲醛**之固定液或增敏液，否則將導致蛋白質不可逆交聯，質譜絕對無法測出。

若有使用下表該物質則請確保該物質完全去除，若造成機器損壞則必須由委託方負擔維護費用。

NP-40、Triton X-100、Tween-20、SDS、CHAPS
PBS 緩衝液內的所有成分、 $\geq 20$ mM 的 NaCl、KCl
甘油、疊氮化鈉

	國立成功大學 生物科技中心 質譜多體學核 心設施平台	蛋白質分析方 法	文件編號	PSOP
			版次	01版
		IP 與膠內消化送 樣前操作指引	制定日期	115/04/07
			制定者	馬鵬芳

### 3. 試劑準備

所有試劑必須使用質譜級 (HPLC or MS Grade) 溶劑與超純水。配製步驟呈現於附錄。

#### 3.1 共通處理試劑

3.1.1 Ammonium Bicarbonate, ABC : 配製 50 mM ABC 於 LC-MS 級水中。

#### 3.2 Coomassie-Destained solution

3.2.1 Destained with 50 mM ABC : ACN = 1:1 (v/v)。


#### 3.3 Silver-stained

銀離子會嚴重抑制 Trypsin 活性，消化前必須利用化學氧化還原法將銀離子徹底溶出。

3.3.1 銀染脫色液 A : 30 mM 鐵氰化鉀 (Potassium ferricyanide)。

3.3.2 銀染脫色液 B : 100 mM 硫代硫酸鈉 (Sodium thiosulfate)。

3.3.3 銀染工作脫色液 : 將脫色液 A 與脫色液 B 以 1:1 比例等體積均勻混合 (必須使用前配製，混合後呈現黃綠色)。

	國立成功大學 生物科技中心 質譜多體學核 心設施平台	蛋白體分析方 法	文件編號	PSOP
			版次	01版
		IP 與膠內消化送 樣前操作指引	制定日期	115/04/07
			制定者	馬鵬芳

## 4. 標準操作程序

膠塊切下後（約 1 mm<sup>3</sup> 碎片），請根據樣品染色方式，選擇 **4.2** 或 **4.3** 步驟進行脫色

### 4.1 Coomassie-stained

4.1.1 將膠塊置於 1.5 mL 低蛋白質吸附離心管中。

4.1.2 加入適量（約 100-200  $\mu$ L，需蓋過膠塊）之 Coomassie Destained solution，於 37°C 劇烈震盪 30 分鐘，直至膠塊變為完全透明無色。吸除並丟棄上清液。

4.1.3 加入 100% ACN 覆蓋膠塊進行脫水，靜置 5-10 分鐘待膠塊收縮並變為白色不透明，後將 ACN 完全吸除。

4.1.4 放在無塵操作檯風乾，確認膠塊呈現乾燥、不透明的白色碎塊狀後，將 Eppendorf 蓋緊，並用 Parafilm 將瓶口纏繞密封並保存於 -20°C 兩個月或送樣至本平臺做後續檢測。

### 4.2 Silver-stained


4.2.1 將膠塊置於 1.5 mL 低蛋白質吸附離心管中，先用 LC-MS 級超純水清洗 2 次（每次 5 分鐘）。

4.2.2 加入適量（需蓋過膠塊）新鮮配製之銀染工作脫色液，於室溫輕微震盪。觀察膠塊，通常在 1 到 5 分鐘內，膠塊上的棕黑色/銀色會完全褪去變為透明。


4.2.3 一旦顏色消失，立刻吸除脫色液（切勿浸泡過久，以免破壞肽結構）。

4.2.4 加入超純水清洗膠塊 3 次（每次 15 分鐘），以徹底洗淨殘留的鐵氰化鉀與硫代硫酸鈉。

4.2.5 加入 100% ACN 覆蓋膠塊進行脫水，靜置待膠塊收縮變白。完全吸除 ACN。

	國立成功大學 生物科技中心 質譜多體學核 心設施平台	蛋白體分析方 法	文件編號	PSOP
			版次	01版
		IP與膠內消化送 樣前操作指引	制定日期	115/04/07
			制定者	馬鵬芳

4.2.6 放在無塵操作檯風乾，確認膠塊呈現乾燥、不透明的白色碎塊狀後，將 Eppendorf 蓋緊，並用 Parafilm 將瓶口纏繞密封並保存於 -20°C 兩個月或送樣至本平臺做後續檢測。

	國立成功大學 生物科技中心 質譜多體學核 心設施平台	蛋白體分析方 法	文件編號	PSOP
			版次	01版
		IP 與膠內消化送 樣前操作指引	制定日期	115/04/07
			制定者	馬鵬芳

## 附錄 1--溶液製備

以下所有水與溶劑，只能使用 **LC-MS Grade**。

### 1. 50 mM 碳酸氫銨 (ABC) 消化緩衝液


- 用途：脫色、洗滌。
- 配法 (配製 50 mL)：
  - 秤取 **197.6 mg** 的 Ammonium Bicarbonate ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ，分子量約 79.06)。
  - 溶於 50 mL 質譜級水中，混合均勻。
- 備註：ABC 溶於水後，pH 值會自然落在 7.8 到 8.2 之間，**絕對不要**用酸鹼去調 pH 值，會引入不必要的鹽類干擾！建議每週新鮮配製，存放於 4°C 冰箱。

### 2. Coomassie-Blue Destained Solution (50 mM ABC : ACN = 1:1)

- 配法 (配製 10 mL)：
  - 取 5 mL 的 50 mM ABC 緩衝液。
  - 加入 5 mL 的 100% 乙腈 (ACN)。混合均勻。
- 存放：隨配隨用，或室溫密封存放不超過一週。

### 3. 銀染工作脫色液 (極不穩定，嚴格現配現用)

- 配方 A (30 mM 鐵氰化鉀)：秤取 98.7 mg 鐵氰化鉀 ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ )，溶於 10 mL 質譜級水中。(可於室溫避光存放幾週)
- 配方 B (100 mM 硫代硫酸鈉)：秤取 248 mg 硫代硫酸鈉五水合物 ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )，溶於 10 mL 質譜級水中。(可於室溫存放幾週)
- 取等體積的配方 A 與配方 B (例如各 500  $\mu\text{L}$ ) 在微量離心管中混合。
  - 液體會呈現黃綠色。請立刻加到含有膠塊的管子裡進行脫色。這管混合液的效期大約只有幾十分鐘，失去活性後會變回無色。

	國立成功大學 生物科技中心 質譜多體學核 心設施平台	蛋白體分析方 法	文件編號	PSOP
			版次	01版
		IP與膠內消化送 樣前操作指引	制定日期	115/04/07
			制定者	馬鵬芳

## 附錄 2—Band 判斷基準

樣品 Band 視覺對比級距	委託方預估蛋白量
級別 1 (極微量)	< 100 ng (比 100 ng 淡，或僅銀染可見)
級別 2 (常規量)	100 ~ 500 ng (清晰可見的標準波峰)
級別 3 (高豐度)	500 ~ 1ug (粗壯且顏色極深的 Band)