

翻译后修饰蛋白质组学送样检测指导手册

前 言

蛋白质组学是以蛋白质组为研究对象，研究细胞、组织或生物体蛋白质组成及其变化规律的科学。所有的样本都需要先进行蛋白质的提取然后才能继续进行后续蛋白质组的实验，实验成功的关键在蛋白质的前处理，但前处理的结果与原始样本的取材及预处理有很大的关系，样本的收集及预处理稍有不慎都可能影响实验结果，为了能得到更好的实验结果，我们从蛋白质的提取方面与 RNA 进行比较，蛋白质提取和 RNA 有较大不同，希望在比较中能给您提供一些指导建议：

- (1) RNA 控制蛋白表达但并不代表真正的表达成功，检测蛋白表达谱才能说明其真实情况；
- (2) RNA 对温度敏感，较不稳定，易降解且无法快速判断，而蛋白降解速度较慢，较容易通过 SDS-PAGE 电泳结果观察条带进行判断；
- (3) 不同组织体系的 RNA 组成相对一致，而蛋白质由于是构造生物体主体的成分，需要具体行使功能，因此不同物种、组织部位、体液体系的蛋白组成和提取方式千差万别；
- (4) 如果样品受到污染，则可能影响结果数量及准确性，蛋白污染可以通过 SDS-PAGE 电泳粗判断（污染程度不严重或者所有样品都被同类蛋白污染则无法判断），而非蛋白类型的分子污染无法通过前期质控发现，只有质谱采集后方能知晓；
- (5) 蛋白质受到取样技巧影响较大，如器官取样时黏连结缔组织、血液清洗不彻底、细胞上清洗涤不彻底、无血清培养体系血清去除不彻底、取样分离不同器官、器官的不同区域不精确甚至于采用生物样品整个躯体进行检测均会导致结果与理想情况差异极大，需非常注意！

多肽组学是生物体组织或者体液中的全部内源性多肽，是研究多肽组的结构、功能、变化规律及其相关关系的学科。多肽和蛋白质没有明显的界限，通常认为分子量小于 10kDa 的蛋白质称为多肽。研究样本体内本身的内源性多肽要防止样本的降解，所以在一开始收集样本的时候就要严格把控操作流程，避免样本降解引入非实验目标的干扰，同时需要明确自己的实验目标分子量，以期能根据实验目的分离富集目标多肽，提供更满意的实验结果。

为保证后续实验结果，我们针对样本的采集有一些建议，希望能为您理想的实验结果锦上添花。

目录

前 言	0
1. 样本准备基本原则	1
2. 样本名称、包装、运送	1
3. 修饰组送样量建议	2
4. 样本准备注意事项	3
4.1 动物组织样本	3
4.2 植物组织样本	4
4.3 微生物样本	4
4.4 细胞	5
4.5 体液	6
4.6 蛋白溶液	6

1. 样本准备基本原则

代表性和一致性原则	样本的取材部位、时间、处理过程等方面尽可能保持一致，否则可能会影响实验结果的可信度。 准确的分离病变组织和对照组织。取样部位不一致和不具有代表性会影响结果。
迅速性原则	样本质量是影响实验结果的最主要因素，用于研究的样本在采集、制备、贮存、运输过程中应尽可能地快，最大限度的缩短从样本采集到实验的时间。
低温原则	样本离体后，立即在 4℃或冰上等低温条件下进行分离，分离好的样本立即置于液氮、干冰或 -80℃冰箱中直至实验，以避免蛋白的降解。

2. 样本名称、包装、运送

样品名称	最好采用双重标记以防样品名称模糊，建议使用进口离心管。 标记 1：用高质量的油性笔在样品管上写上清晰、简单的样品名称，最好 5 个字符以内（不要写中文），用封口膜封好。 标记 2：将样品名称等信息写在标签纸上，贴在管壁上，最好用胶带粘贴牢固以防低温条件下样品标签脱落（最好采用能经受低温的粘性标签纸）。
样品包装	按送样指导的要求准备样品，采用高质量离心管盛装样品。冷冻的组织，用高质量的 2ml 的螺旋冻存管装载；离心管用封口膜密封管口。干冰运输，72 小时内到达，15kg 干冰即可。
邮寄样品	邮寄样品请附带完整的样品信息说明。建议自己存好备份样品。如样品有生物危险请提前咨询技术人员。

3. 修饰组送样量建议

样本大类	样本类型	常规磷酸化	微量磷酸化	FFPE 磷酸化	N/O-完整糖肽	抗体富集修饰组学(乙酰化/泛素化/乳酸化/琥珀酰化)
动物组织	心、肝、脾、肾、肺等	30-100 mg	10 mg	/	50-100mg	50-100 mg
	坚硬组织 (软骨、毛发)	5g			5g	5g
植物组织	茎、叶、花、草本植物, 藻类、蕨类	1-3 g	300 mg-1g	/	1-3 g	5 g
	根、皮、树枝、果实种子等	3-5g	1-2g		3-5g	10g
细胞	悬浮或贴壁培养细胞	5×10 ⁶ 个或10 μL 细胞沉淀	磷酸化组: 1×10 ⁶ 个	/	1-2×10 ⁷ 个或10 μL 细胞沉淀	3×10 ⁷ 个
微生物	菌体沉淀	100-300μL	50-100μL	/	500 μL	500 μL
切片	新鲜冷冻切片	/	1 片, 面积≥5 mm × 5 mm		/	/

	FFPE 切片	/	/	1-3 片, 每片面 积≥ 5 mm× 5 mm	/	/
体 液 类 其 他	血清/血浆	/	/	/	200 μL	/
	唾液	/	/	/	2 mL	/
	泪液	/	/	/	1 mL	/
	蛋白溶液	300μg	100μg	50μg	300μg	3-5mg

4. 样本准备注意事项

4.1 动物组织样本

样品类型	预处理及保存
动物组织	1) 最好使用进口品牌离心管或冻存管。 2) 样品选取的部位要一致，去除非目标组织。 3) 取材新鲜组织，用 PBS 清洗组织表面，去除血渍；迅速除去组织表面的筋皮及脂肪组织，剪切成边长 0.5cm 小块或 30mg 左右小块，将组织块在盛有液氮的锡纸槽中速冻后，再装入液氮预冷的螺口冻存管中，将螺口盖子旋紧。 4) 样品采集完成后，迅速进行液氮速冻 5min 以上，之后可转移至 -80℃ 冰箱冻存，避免反复冻融。

动物坚韧组织 -毛发	依次用适量 PBS 或生理盐水去除污染物，干燥，保存在-80℃。
---------------	----------------------------------

4.2 植物组织样本

样品类型	预处理及保存
嫩叶	1) 建议使用进口品牌离心管或冻存管或者采用干净的锡箔纸。 2) 选取的部位要一致，去除非目标组织。
树根、树皮、 树枝等	3) 取材新鲜组织，尽可能的去掉状态不好的部分，保持样品的一致性。（样品离体前用 PBS 或生理盐水洗掉杂质吹干后，再采集样品。根等地下部分在样品离体后，预冷的 PBS 清洗污染物。）将样品剪切成小块，装入液氮预冷的离心管或冻存管中，盖紧盖子，液氮速冻 5min 以上。如用锡箔纸保存，锡箔纸的内、外壁均要明确标示样品名称，在液氮速冻 5min 以上。-80℃冰箱保存。
果实、种子	
花粉	收集开花期花粉，显微镜用解剖针去除杂质，转入 EP 管内，-80℃保存。
藻类组织	采取合适的离心力分离藻类并保证细胞完整，如 1000g 离心 15min，收集沉淀，并用 PBS 洗涤沉淀三次，分装样品，立即液氮速冻，-80℃保存。

4.3 微生物样本

样品类型	预处理及保存
菌类	1) 采用离心等方法分离菌和培养基，避免培养基蛋白对菌的污染。 2) 收集菌体并用 PBS（或其他符合要求的缓冲液）溶液洗三遍。 3) PBS 重悬菌体并转移至 1.5ml 离心管中，离心去上清，如果样品量比较多，最好分装，每管 50μl 左右，液氮速冻后，-80℃保存。

4.4 细胞

样品类型	预处理及保存
细胞	1) 悬浮细胞培养至细胞浓度为 $2-5 \times 10^5/\text{ml}$; 贴壁细胞在合适的培养基中培养至覆盖培养皿 70-90% 面积, 去掉培养基并用 PBS 溶液清洗后用胰蛋白酶消化细胞收集。 2) 400-1000g 离心 5-10min 收集细胞并用 PBS 溶液洗三遍。 3) 用 PBS 重悬细胞, 转移至 1.5ml 离心管中, 400-1000g 离心弃上清, 不要残留过多的液体, 每管细胞体积保持在 50μl 左右, 送样 2-3 管。细胞液氮速冻后, -80°C 保存。

4.5 体液

样品类型	预处理及保存
血浆	1) 采集血液样本，建议使用 BD EDTA 血常规管（含抗凝剂），有条件的话首选 BD Vacutainer® 蛋白质组学产品 BDTM P100 组件或 BDTM P800 采血管（含抗凝剂和蛋白酶抑制剂）。 2) 轻轻地 180 度上下颠倒混匀，持续 8-10 次，以混匀血液和添加剂。 3) 4°C，3000rpm（根据物种稍微进行调整）离心 10min。 4) 将血浆转移至离心管中，立即添加蛋白酶抑制剂（如有条件），混匀，瞬时离心。分装样品，每管 100 µl。 -80°C 保存。如没有潜在性危险，可以寄送样品；如有潜在性危险，请联系技术人员，根据实验目的，选择合适的灭活方法，自行灭活。
血清	1) 收集全血至真空采血管（如 BD vacutainer 公司的红头真空采血管）。轻轻地 180 度上下颠倒混匀，持续 5-6 次。 2) 室温放置 30- 45min，4 度，3000rpm（根据物种稍微进行调整）离心 10min。 3) 将血清转移至离心管中，立即添加蛋白酶抑制剂（如有条件），混匀，瞬时离心。分装样品，每管 100 µl。 -80°C 保存。如没有潜在性危险，可以寄送样品；如有潜在性危险，请联系技术人员，根据实验目的，选择合适的灭活方法，自行灭活。
唾液	禁食两小时以上，9-12am 取样，1000g-2000g 离心或使用 0.22um 滤膜过滤收集唾液，分装 0.2~1ml*3 管， -80°C 保存。
泪液	收集样品（可利用 capillary micropipette 或 Schirmer strip），4°C，8000-14000g 离心取上清， -80°C 保存。

4.6 蛋白溶液

样品类型	预处理及保存
------	--------

蛋白溶液/蛋白干粉

蛋白干粉低温冻干。提供蛋白提取方法及溶解缓冲液信息，如有定量请提供定量信息。可以用 8M 尿素含 0.1-1%SDS 裂解；其他溶解缓冲液可以使用纯水或 PBS，如有其他 buffer 请提前咨询是否兼容，并填写到送样单上。如有需要可以直接联系我们，我们可以提供裂解液。



