

## 胶内酶切 (in gel digestion)

1. 从胶上切下考马斯亮蓝染色的蛋白条带，水洗三遍，加入 10mM DTT(用 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  配制)溶液， $56^\circ\text{C}$ , 45 min 进行还原处理。去掉 DTT 溶液，加入 55mM 碘乙酰胺(用 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  配制)溶液,室温避光 30 min 进行烷基化处理。
2. 用 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  in 50% ACN 将考马斯亮蓝的蓝色脱去,可换 1-2 次脱色液 (基本上无色)。-加无水 ACN 脱水。
3. 用真空离心浓缩仪(*Speed Vac*)将胶颗粒彻底抽干。
4. 加入 25ng/ $\mu\text{l}$  的测序级胰蛋白酶 (Roche 或 Promega 公司产品,按说明书配制)3-10  $\mu\text{l}$ (酶量的多少视蛋白多少而改变或直接用 12.5ng/ $\mu\text{l}$  的 trypsin 没过胶颗粒),在  $4^\circ\text{C}$  放置 45min,让胶颗粒充分溶胀。
5. 加入适量 20mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液覆盖胶颗粒(刚好没过),放入  $37^\circ\text{C}$  水浴酶解过夜(12-16h)。
6. 将覆盖液取出放入干净的 EP 管(可能含有超过 70%的肽片段),向原来含胶颗粒的 EP 管中加入 5%TFA/50%ACN 10-100  $\mu\text{l}$  (不宜太多,刚好没过胶颗粒最好), $37^\circ\text{C}$ , 1h (将胶颗粒中剩余的肽片段萃取出来),将提取液放入装有含肽覆盖液的 EP 管中,并重复提取一次 (一般提取一次即可)。
7. 将肽提取液用 *Speed Vac* 测地抽干 (到此为止,其余步骤由质谱分异人员负责)。
8. 将抽干后的肽片段脱盐 (请参考 ZiptipC18 脱盐方法)。
9. 用 0.1%甲酸水溶液溶解,用于液质联用质谱分析 (或者用 0.1%TFA 溶解,和基质混合,进行 MALDI-TOF 类质谱分析)。

10. 对于银染胶内蛋白的胶内酶切，除了脱色采用 1:1 混合的 30mM 铁氰化钾 (potassium ferricyanide) 和 100mM 硫代硫酸钠溶液外，其余步骤和 CBB 染色完全一样。

参考文献:

CBB staining and silver staining (Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. *Anal Chem*, 1996, 68: 850-858)