

溶液内酶切方法 (in solution digestion)

该方法用于蛋白质组学样品的酶切，然后进行质谱分析。

试剂及溶液：

样品裂解液：8 M Urea in 10 mM Tris (pH8.0) 或 8M guanidine HCL

还原溶液（还原二硫键）：10 mM dithiothreitol in water

烷基化试剂溶液（将游离二硫键封闭）：50 mM iodoacetamide in 50 mM NH₄CO₃

测序级 LysC 酶（可用测序级胰蛋白酶代替）

测序级胰蛋白酶（一般 Roche 公司，4x25 μg, Cat No. 11418025001）： Trypsin, modified sequencing grade

具体方法：

1. 将样品溶于 8M Ures in 10 mM Tris (pH8.0), 至少 10, 000rpm 离心 30min, 除去不溶物。测试溶液 pH,最好在 pH8.0, 利于胰蛋白酶消化。
2. 加入适量体积还原液 (1ul/50ug 蛋白), 在室温 30min (含尿素, 一定不要加热, 防止变性剂修饰蛋白)。
3. 加入适量烷基化试剂 (1ul/50ug 蛋白), 在室温暗处 30min。
4. 加入适量的 LysC(1ug/50ug 蛋白), 在室温保温 3h 或过夜。
5. 用 4 倍体积 50mM NH₄HCO₃ 稀释样品。
6. 加入适量的胰蛋白酶(1ug/50ug 蛋白), 在室温酶切过夜。
7. 酶切过夜到第二天的样品可直接冻于-80℃冰箱备用。

注意：在整个过程中采用了室温，而不是加热，防止变性剂对蛋白的修饰。

该方法参考文献如下（稍修改）：

Lundell N, Schreitmuller T. Sample preparation for peptide mapping--A pharmaceutical quality-control perspective. Anal Biochem, 1999, 266: 31-47.