**美吉生物结题报告**

**蛋白溶液混合鉴定分析**

客户姓名：王 琛

项目编号：MJ20161201030

时 间：2016年12月

目 录

[1、项目信息 2](#_Toc470787642)

[2、工作流程 3](#_Toc470787643)

[2.1蛋白质提取 3](#_Toc470787644)

[2.2 SDS-PAGE 3](#_Toc470787645)

[2.3还原烷基化和酶解 3](#_Toc470787646)

[2.4液相串联质谱 3](#_Toc470787647)

[2.5 数据库搜索 4](#_Toc470787648)

[3、基本鉴定信息 5](#_Toc470787649)

[4、试剂和仪器 6](#_Toc470787650)

[5、联系方式 7](#_Toc470787651)

# 1、项目信息

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **项目名称** | | | |
| 蛋白鉴定分析 | | | |
| **合同编号** | | | |
| MJ20161201030 | | | |
| **项目样本信息** | | | |
| **物种信息** | 小鼠 | | |
| **实验目的** | / | | |
| **客户信息** | | | |
| **单位名称** | 上海市第六人民医院 | | |
| **单位地址** | 上海市宜山路600号 | | |
| **实验室导师** | / | 电话 | / |
| 邮箱 | / |
| **项目联系人** | 王 琛 | 电话 | 18930177004 |
| 邮箱 | / |
| **美吉联系人信息** | | | |
| **销售员** | 谷 雨 | 电话 | 18521332283 |
| 邮箱 | / |
| **技术支持** | 沈娇娇 | 电话 | 021-51875086-8075 |
| 邮箱 | jiaojiao.shen@majorbio.com |

# 2、工作流程

2.1蛋白质提取

已提供蛋白溶液。

样品名称如下：

**表2.1样品信息表**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 序号 | 样品名称 | 类型 |
| 1 | Co-IP-1 | 小鼠-蛋白溶液 |
| 2 | Co-IP-2 | 小鼠-蛋白溶液 |

取一半样品进行电泳，即各样品上样10ul，电泳图谱如下。

2.2 SDS-PAGE

聚丙烯酰胺凝胶为网状结构，具有分子筛效应。在[SDS](http://baike.baidu.com/view/42238.htm" \t "http://baike.baidu.com/_blank)-聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE）中,蛋白质亚基的[电泳迁移率](http://baike.baidu.com/view/2911682.htm" \t "http://baike.baidu.com/_blank)主要取决于亚基分子量的大小。

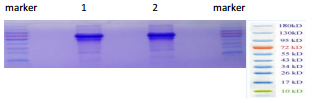


图2.3 SDS-PAGE图

注：上样量均为10μl；上样顺序从左到右依次为： Marker、 Co-IP-1、Co-IP-2。

2.3还原烷基化和酶解

1. 根据跑胶胶图，切取下步实验所需条带；
2. 切取胶条体积至0.5mm3-1mm3，装于1.5ml EP管做好标记，进行酶解；
3. 每管胶条水洗两次；
4. 用脱色液（25mM 碳酸氢铵，50%ACN），37℃温浴脱色；
5. 加入50mM DTT ，56℃还原1 h；
6. 加入100mM IAM，室温避光45min；
7. 加入Trypsin 37℃，酶解过夜；
8. 将每个样品酶解后的胶粒溶液，真空浓缩抽干。

2.4液相串联质谱

数据采集软件：Thermo Xcalibur 4.0 (Thermo, USA)

反相柱信息：C18 column(75μm x 25cm , Thermo ,USA)

色谱仪器：EASY-nLC 1200

质谱仪器：Q-Exactive（Thermo, USA）

色谱分离时间：90min

A : 2% ACN with 0.1% formic acid

B：80% ACN with 0.1% formic acid

流速：300nL/min

梯度：

|  |  |
| --- | --- |
| **Time (min)** | **B (%)** |
| 0 | 2 |
| 70 | 40 |
| 70.1 | 90 |
| 75 | 90 |
| 75.1 | 2 |
| 90 | 2 |

MS扫描范围(m/z) 350-1300，采集模式DDA ；

一级质谱分辨率70000，碎裂方式HCD；

二级分辨率17500，动态排除时间20s。

2.5 数据库搜索

1. **数据库的选择**

目前使用到的数据库主要可以分为两类，一类是NCBI来维护的，另外一类是由EBI负责维护。数据库建立的方法主要有以下几种：

* NCBInr全库；
* NCBInr分类库，包括动物全库、植物全库、微生物全库、细菌全库等；
* SwissProt/UniProt分类库，包括动物全库、植物全库、微生物全库、细菌库等；
* NCBInr对应物种库，包括人、小麦、酵母、大肠杆菌等；
* 其他物种库，如自测基因组、转录组数据库。

在选择数据库时，遵循如下原则，若为已经测序生物，直接选用该物种数据库，若为非测序生物，则选择与被测样品最为相关的大类蛋白质组数据库。

本次实验采用数据库：

网址：http://www.uniprot.org/taxonomy/?query=mouse&sort=score

序列数目：79954

下载日期：2016年9月9日

1. **数据库的搜索**

查库使用软件版本为Proteome DiscovererTM Software 2.1。查库时将raw文件提交至ProteomeDiscoverer服务器，选择已经建立好的数据库，然后进行数据库搜索。相关参数如下表：

表2.5 **Proteome** Discoverer搜索参数

|  |  |
| --- | --- |
| Item | Value |
| ProteinDiscverer version | 2.1 |
| Protein Database | uniprot-mouse-79954s-20160909 |
| Cys alkylation | Carbamidomethyl |
| Enzyme Name | Trypsin (Full) |
| Max. Missed Cleavage Sites | 2 |
| Precursor Mass Tolorance | 10 ppm |
| Fragment Mass Tolorance | 0.05Da |

注：结果过滤参数为Peptide FDR ≤0.01。

# 3、基本鉴定信息

表3.1 样本CO-IP-1搜库结果列表

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Total Spectrum** | **Identified Spectrum** | **Peptide number** | **Protein number** | **Protein group number** |
| 18660 | 477 | 339 | 867 | 138 |

表3.2 样本CO-IP-2搜库结果列表

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Total Spectrum** | **Identified Spectrum** | **Peptide number** | **Protein number** | **Protein group number** |
| 16703 | 443 | 324 | 751 | 134 |

搜索Unirpot数据库，下面以部分Uniprot搜索结果为例将蛋白信息部分表头列出，如下所示（详细信息见搜库列表）。

表3.3 Protein表头信息表

|  |  |
| --- | --- |
| **表头** | **描述** |
| # Protein Groups | 蛋白名称 |
| # AAs | 该蛋白包含的氨基酸数目 |
| MW [kDa] | 理论分子量 |
| calc. pI | 等电点 |
| Score Sequest HT | 该蛋白的打分值 |

表3.4 Peptide Groups表头信息表

|  |  |
| --- | --- |
| **表头** | 描述 |
| Annotated Sequence | 肽段序列 |
| Modifications | 修饰信息 |
| # Protein Groups | 该肽段归属的protein group数 |
| # Proteins | 该protein group内蛋白数 |
| # PSMs | 匹配到该肽段的谱图数 |
| Master Protein Accessions | 该肽段归属的主要蛋白名称 |
| # Missed Cleavages | 漏切位点 |
| Theo. MH+ [Da] | 理论分子量 |
| XCorr Sequest HT | 该肽段Xcorr打分值 |
| Percolator q-Value Sequest HT | 该肽段q值，越小越好 |

# 4、试剂和仪器

**表4.1 本项目仪器信息**

|  |  |
| --- | --- |
| **仪器名称** | **供货商** |
| 4度冷冻离心机 | Eppendorff |
| 垂直电泳槽 | 上海天能科技有限公司 |
| 纯水仪 | 密理博 |
| 恒温混匀仪 | ABSON |
| 冷冻离心浓缩干燥器 | 太仓市华美生化仪器厂 |
| 酶标仪softmax pro | Molecular Devices |
| 全自动数码凝胶图像分析系统 | 上海天能科技有限公司 |
| 数显式稳压稳流电泳仪 | 上海天能科技有限公司 |
| 台式快速离心浓缩干燥器 | 太仓市华美生化仪器厂 |
| 串联质谱仪Thermo Scientific Q-Exactive | Thermofishier Scientific |

**表4.2 本项目试剂信息**

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂名称** | **供货商** |
| DTT二硫苏糖醇 | Sigma |
| IAM碘乙酰胺 | Sigma |
| modified Trypsin蛋白酶,质谱级 | 华世利科技 |
| Protease Inhibitor Cocktail | Thermo Halt™ |
| 丙酮 | 上海国药 |
| BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型) | Beyotime |
| SDS-PAGE凝胶配制试剂盒 | Beyotime |
| 考马斯亮蓝染色液(常规法) | Beyotime |
| 蛋白质分子量标准 | Beyotime |
| Protein Ladder(非预染) | Beyotime |
| 乙腈LC/MS | ThermoFisher Scientific |
| Water-LC/MS | ThermoFisher Scientific |
| 甲醇LC/MS | ThermoFisher Scientific |
| 甲酸LC/MS | ThermoFisher Scientific |
| 三乙基碳酸氢铵缓冲液 Triethylammonium bicarbonate buffer | Sigma |

## 5、联系方式

|  |  |
| --- | --- |
|  | **上海总部** |
| 地址： | 上海市浦东新区康新公路3399号时代医创园3号楼 |
| 电话： | 400-624-3721 |
| E-mail： | protein@majorbio.com |
|  | **广州分公司** |
| 地址： | 广州市海珠区荔福路68号广州市微生物所六楼西 |
| 电话： | 020-61130189 |
| E-mail： | seqgz@majorbio.com |
|  | **北京子公司** |
| 地址： | 北京市海淀区安宁庄东路18号光华创新园新科研楼6楼 |
| 电话： | 010-51293026,010-51293126 |
| E-mail： | seqbj@majorbio.com |