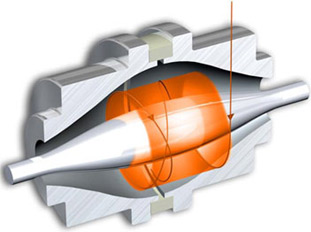
****

**杭州精准医药研究中心**

**蛋白鉴定 结题报告**



版本 2.0

更多信息请访问：

[**http://www.jingzhunyiyao.com/**](http://www.jingzhunyiyao.com/)

**杭州经济技术开发区6号大街高科技企业孵化器452号 2栋2楼C区**

**Tel：0571-8668 9277**

目录

1 项目主要结果 3

1.1 项目概述 3

2 .1主要试剂和仪器 4

2.2胶内酶解 4

2.3肽段脱盐 5

2.4仪器采集参数 5

**2.4.1质谱采集参数** 5

**2.4.2液相采集参数** 6

2.5搜索软件参数设置 6

3 鉴定质量评估 7

3.1 肽段匹配误差分布 7

3.2 肽段电荷分布 7

3.3 鉴定肽段序列长度分布 8

3.4 实验小结 9

# **1 项目主要结果**

## 1.1 项目概述

本项目使用LC-MS技术进行蛋白质鉴定，所用质谱仪器是Thermo公司Q-Exactive。

样品 W-1 通过Proteome Discoverer软件进行分析后，匹配到的肽段数量是 2538 张，共鉴定到 645 个蛋白。

样品 W-2 通过Proteome Discoverer软件进行分析后，匹配到的肽段数量是 3200 张，共鉴定到 796 个蛋白。

样品 W-3 通过Proteome Discoverer软件进行分析后，匹配到的肽段数量是 3735 张，共鉴定到 924 个蛋白。

样品 W-4 通过Proteome Discoverer软件进行分析后，匹配到的肽段数量是 3347 张，共鉴定到 816 个蛋白。

样品 W-5 通过Proteome Discoverer软件进行分析后，匹配到的肽段数量是 3915 张，共鉴定到 908 个蛋白。

样品 W-6 通过Proteome Discoverer软件进行分析后，匹配到的肽段数量是 1985 张，共鉴定到 524 个蛋白。

样品 W-7 通过Proteome Discoverer软件进行分析后，匹配到的肽段数量是 3792 张，共鉴定到 915 个蛋白。

样品 W-8 通过Proteome Discoverer软件进行分析后，匹配到的肽段数量是 3680 张，共鉴定到 881 个蛋白。

样品 W-9 通过Proteome Discoverer软件进行分析后，匹配到的肽段数量是 2197 张，共鉴定到 627 个蛋白。

**详细内容见输出xlsx文件**

**输出文件Excel文件主要表头解释：**

Unique Peptides：该蛋白群组中含有特异肽段个数

Peptides：该蛋白群组中含有肽段个数

PSMs：该蛋白群组中鉴定到的二级质谱图数量

Accession  ：Uniprot数据库中的蛋白ID

Coverage：鉴定到蛋白的氨基酸覆盖率

AAs：该蛋白中氨基酸总数量

MW [kDa]：分子量

calc.PI ：理论等电点

Score Sequest HT: PD搜库软件根据匹配到的肽段数量和质量对蛋白的综合打分

**2 工作流程**

利用LC-MS进行蛋白质鉴定，主要流程是先对蛋白进行定量后，通过还原烷基化打开蛋白三维结构，酶解后再抽提出肽段，再运用质谱技术得到这些肽段的质谱图，最后运用蛋白质鉴定软件，鉴定出样品中的蛋白质。

## 2 .1主要试剂和仪器

1. 甲酸（Fisher Scientific）；质谱纯
2. 乙腈Fisher Scientific: 质谱纯
3. 测序级胰蛋白酶(Trypsin), （Promega公司）
4. sep-Pak C18除盐柱,（Waters公司）
5. 纳升级肽段捕集柱, Acclaim PepMap C18, 100µm×20mm (Thermo Scientific公司)
6. 纳升级肽段分析柱, Acclaim PepMap C18, 75µm×250mm (Thermo Scientific公司)
7. Q-Exactive液质联用仪（Thermo公司）

## 2.2胶内酶解

1. 切胶 将保存的凝胶在水中清洗数次，在灯箱上铺好玻璃板，放好凝胶后使用干净的刀片切取目的蛋白质条带。将切下来的小块凝胶放到干净的1.5ml EP管底部，加入少许双蒸水，如果是凝胶条带则切成约lmm3小碎块，切成小块可以有效增加其表面积。
2. 考马斯亮蓝染色凝胶的脱色 向装有碎胶的离心管中加入1ml双蒸水，上下颠倒清洗2次，移液枪吸净液体。加入500μl脱色液（视凝胶体积需要加多大体积的脱色液），置于摇床上，中间可以数次更换脱色液，直至蓝色被脱去。加入500μ1乙腈，2-3次，使凝胶脱水变得不透明且坚硬，至于通风橱内风干。
3. 还原，烷基化 加入适当体积10mmol/L DTT （新鲜配制，要覆盖住整个胶块），在56℃水浴60min。冷却到室温后吸去全部液体，加入适当体积55mmol/L IAA（新鲜配制，要覆盖住整个胶块），避光，室温放置45min。
4. 依次用25mmol/L NH4HCO3、脱色液各清洗凝胶2遍，加入500μ1乙腈，2-3次，使凝胶脱水变得不透明且坚硬，至于通风橱内风干。加入与凝胶体积相等或略多一些的胰酶溶液(用25mmol/L NH4HCO3将胰蛋白酶储存液稀释成10ng/μL，加入胰蛋白酶量与蛋白样本质量比为1: 50左右)，置于4℃下30min使凝胶充分吸涨。如果溶液不够则适当补加。30min后取出补加25mmol/L NH4HCO3，使液体体积超过凝胶大约5mm左右，至于37℃水浴过夜。
5. 将酶解过夜样品从水浴锅中取出，将离心管中酶解液转移至一新1.5ml离心管中。保留凝胶。
6. 向凝胶中加入超过凝胶5mm左右体积的抽提缓冲液，在超声波清洗机中超声15min，在超声波清洗机中放入冰袋降温。
7. 将装有上步得到液体的离心管至于冷冻干燥机中干燥。

## 2.3肽段脱盐

1. 使用400µL 0.1%TFA，0.5%乙腈溶液溶解干燥后的肽段。
2. 使用200µL 0.1%TFA，60%乙腈活化除盐柱。
3. 使用400-600µL 0.1%TFA，1%乙腈溶液平衡除盐柱
4. 将重溶样品加入除盐柱内，使样品缓慢流过除盐柱，标记肽段被除盐柱捕集，盐等其它非疏水性小分子流出舍弃。
5. 再添加200µL 0.1%TFA，0.5%乙腈溶液清洗除盐柱，洗去残留盐类。
6. 添加300µL 0.1%TFA，60%乙腈溶液，使液体缓慢流过除盐柱，将肽段洗脱下来，使用新EP管收集洗脱溶液。
7. 将洗脱溶液冷冻干燥，去除乙腈。

## 2.4仪器采集参数

### **2.4.1质谱采集参数**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **检测仪器型号 ：** | QE |  | **离子源 ：** | ESI |
| **毛细管电压 ：** | 1.8 KV |  | **离子传输管温度 ：** | 320 ℃ |
| **Time Method duration ：** | 20.00 min |  | **Full MS Resolution ：** | 70,000 |
| **AGC target ：** | 3e6 |  | **Full MS Scan range ：** | 350 to 1800 m/z |
| **dd-MS²Resolution ：** | 17,500 |  | **dd-MS²Scan range ：** | 350 to 1800 m/z |
| **Loop count ：** | 20 |  | **Charge exclusion ：** | 1, 6 - 8, >8 |

### **2.4.2液相采集参数**

HPLC流动相: A液 ：水(质谱级)，0.1%FA

B液 ：乙腈（质谱级）0.1%FA

表. 液相色谱梯度：

|  |  |
| --- | --- |
| Time（min） | B液比例 |
| 0.01 | Start（0%） |
| 10.0 | 45% |
| 25.0 | 80% |
| 30.0 | 80% |

## 2.5搜索软件参数设置

Proteome Discoverer是一个蛋白质鉴定软件，内嵌Sequest HT搜索引擎，是生物质谱软件的黄金标准。该项目中使用的软件版本为Proteome Discoverer 2.1。操作时以RAW文件为原始文件，选择物种对应的数据库，然后进行数据库搜索PD提取后谱图进行搜索匹配。

表. 定性参数设置

|  |  |
| --- | --- |
| Fixed modification（固定修饰） | Carbamidomethyl(C) |
| Variable modification （可变修饰） | Oxidation（M）（蛋氨酸的氧化）； |
| peptide tol（一级质谱精度） | 10 ppm |
| MS/MS tol（二级质谱精度） | 0.02 Da |
| Max missed cleavages （酶解时最大允许漏切的数目） | 2 |
| Enzyme | Trypsin |

# **3 鉴定质量评估**

## 3.1 肽段匹配误差分布



图3-1 样品匹配到的肽段的相对分子量的真实值与理论值之间的误差分布

数据库搜索匹配主要是根据谱图中离子峰的质荷比换算成分子质量后，与数据库中模拟的肽段离子或者碎片离子进行质量比较，从而确定是否能够匹配，所以肽段的匹配误差和质谱仪的精度有关。又为了防止遗漏鉴定结果，因此基于数据库搜索策略的肽段匹配误差参数会放大一些。上图显示了所有匹配到的肽段的相对分子量的真实值与理论值之间的误差分布，可以看到大部分的误差分布在3ppm以内。

## 3.2 肽段电荷分布

肽段电荷分布情况，可以反映选择的候选离子电荷状态的参数是否合理。



图3-2样品肽段电荷分布

肽段电荷分布肽段电荷分布图主要体现带不同电荷的肽段的数量分布情况，图中电荷2、3的肽段占了绝大多数，所以选择电荷状态时应该选择包含+2、+3的选项。

## 3.3 鉴定肽段序列长度分布

下图表示不同长度肽段占所有肽段的百分比。横坐标为肽段氨基酸残基数，纵坐标为该长度肽段占所有肽段的百分比。平均肽段长度在12个氨基酸，符合胰蛋白酶酶解产物长度规律。



图 3-3样品鉴定肽段序列长度分布

## 3.4 实验小结

根据质谱总离子流图判断样品至上机环节无异常：1. 没有PEG(聚乙二醇类、环氧乙烷类、Triton、NP40类)污染。2. 酶解肽段峰分布均匀，种类大体重合。3. 没有大m/z的未酶解完全的蛋白峰。