

【产品编号】 2749380

【英文名称】 CAE-Ti-IMAC, 100%

【中文名称】 单分散固定化亲和色谱微球

【产品内容】 250mg, 1g

【保存条件】 室温储存，保质期为五年。

【产品概述】 本产品适用于对磷酸肽的鉴定和富集。

【自备材料】

•样品：蛋白酶解液

注意：蛋白酶解液中不能含有干扰磷酸肽富集的物质，如 EDTA 等络合剂、含磷酸根的缓冲盐！

•Loading buffer：80%ACN/6%TFA 水溶液

作用：将酶解液酸化，高浓度的 TFA-可以抑制酸性肽段的残留

•Wash buffer 1：50%ACN/6%TFA/200 mM NaCl 水溶液

作用：洗涤非特异性吸附的肽段，盐可以抑制非磷酸肽的残留。

•Wash buffer 2：30%ACN/0.1%TFA 水溶液

作用：洗涤残留的 Wash buffer1 中的盐。

•Elution buffer：10%氨水溶液

【注意事项】

本产品 CAE-Ti-IMAC 材料未螯合 Ti^{4+} ，首先应先将 Ti^{4+} 螯合到材料上，然后再进行磷酸肽富集。

【实验步骤】

一. CAE-Ti-IMAC 材料的 Ti^{4+} 螯合

1. 按照 CAE-Ti-IMAC 材料：硫酸钛 $Ti(SO_4)_2 = 1:100$ (m/m)，称取材料和硫酸钛。以称取 300mg 材料为例，将 30g 硫酸钛固体加入 250 mL 烧瓶中，加入 150 mL 纯净水超声溶解（注意：硫酸钛在溶解过程中会放热，请缓慢加入），超声分散 5-10 min，然后磁力搅拌（磁力搅拌的速度需要控制，将材料匀浆均匀为宜，不宜过快或过慢），室温放置 12h。

注意：可按照实际制备情况酌情称取材料和硫酸钛 建议 CAE-Ti-IMAC 材料不低于 250mg。

2. 将步骤 1 中的材料转移至 50 mL 离心管中，15000 g 离心 3-5 min，弃上清。

3. 加入适量 0.1% TFA 水溶液将 CAE-Ti-IMAC 材料分散，转移至 10 mL 离心管中，振荡

洗涤未键合的 Ti^{4+} , 15000 g 离心 3-5 min , 弃上清。

4. 重复步骤 3 , 洗涤 5-6 次 , 目的是尽量去除未整合的 Ti^{4+} 。
5. 加入 200 mM NaCl/0.1% TFA 水溶液 , 洗涤 CAE-Ti-IMAC 材料 2 次。
6. 加入 0.1% TFA 水溶液 , 洗涤 2 次 , 均匀转移至离心管中 , 可根据实验需求将 CAE-Ti-IMAC 材料分散成不同的浓度 (如 100 mg/ml 或 10 mg/ml) , 于 4°C 保存。
7. 检测 CAE-Ti-IMAC 材料是否成功整合 Ti^{4+} : 取 100 μL 最后一次洗涤的上清液 , 加入 100 μL 30% H_2O_2 (市售双氧水原液) 中 , 若溶液不变色 , 说明整合后的 CAE-Ti-IMAC 材料已经洗干净。若溶液变色 , 则继续洗涤。同时 , 可取少量 CAE-Ti-IMAC 材料 , 加入 100 μL 30% H_2O_2 中 , 若材料呈现明显黄色 , 说明 Ti^{4+} 整合的 CAE-Ti-IMAC 材料制备成功 , 可用于后续磷酸肽富集。

注意 : 上述 3-6 步为 CAE-Ti-IMAC 材料的洗涤 , 主要目的是洗涤未整合的 Ti^{4+} , 请勿省略 ; 因所用离心机不同 , 离心力可根据离心效果适当调整 , 保证离心后 CAE-Ti-IMAC 材料无悬浮 , 上清液澄清。

二. 溶液法富集磷酸化肽

1. 蛋白酶解液与 Loading buffer 按体积比 1:1 均匀混合 , 已整合 Ti^{4+} 的 CAE-Ti-IMAC 材料 : 蛋白酶解液 = 20:1-30:1 (m/m) 均匀混合 , 置于振荡器上室温振荡 30 min , 然后 15000 g 离心 3-5 min , 弃上清。

注意 : Loading buffer 用量一定要足够 , 保证 TFA 终浓度 $\geq 3\%$; 因 CAE-Ti-IMAC 材料在 Ti^{4+} 整合过程中会略有所损失 , 建议根据实验具体情况 , 自行优化材料与样品的使用比例 , 以达到最优使用效果 !

2. 加入适量 Wash buffer 1 , 重悬材料 , 振荡 30min , 15000 g 离心 3-5 min , 弃上清。
3. 加入适量 Wash buffer 2 , 重悬材料 , 振荡 30min , 15000 g 离心 3-5 min , 弃上清。

注意 : 步骤 3 可重复操作 , 目的是彻底清除 NaCl , 因为钠盐禁止进质谱 !

4. 加入适量的 Elution buffer , 冰浴超声 5 min , 振荡 15 min , 20000 g 离心 3-5 min , 收集上清液 (注意 : 尽量不要吸到沉淀的材料) 。

注意 : 建议重复步骤 4 , 合并两次洗脱液。

5. 将合并洗脱液 25000 g 离心 3-5 min , 转移上清至新离心管中。离心浓缩干燥后 , -20°C 保存 , 待质谱分析。

注意 : 步骤 5 很重要 , 保证洗脱液中材料去除完全 , 以免后续分析时材料堵塞色谱柱 !

6. 将冻干后的样品复溶在一定体积的 1%FA 水溶液中 , 质谱分析。

注意 : 富集后的磷酸肽也可以用 ZipTip 或 StageTip 进行除盐后再质谱分析。