



【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<sup>4+</sup>，首先应先将 Ti<sup>4+</sup>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<sup>4+</sup>螯合

1. 按照 CAE-Ti-IMAC 材料 : 硫酸钛 Ti(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> = 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<sup>4+</sup>，15000 g 离心 3-5 min，弃上清。

4. 重复步骤 3，洗涤 5-6 次，目的是尽量去除未螯合的 Ti<sup>4+</sup>。
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 材料是否成功螯合 Ti<sup>4+</sup>：取 100 uL 最后一次洗涤的上清液，加入 100 uL 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>（市售双氧水原液）中，若溶液不变色，说明螯合后的 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 uL 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中，若材料呈现明显黄色，说明 Ti<sup>4+</sup> 融合的 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，主要目的是洗涤未螯合的 Ti<sup>4+</sup>，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，已螯合 Ti<sup>4+</sup> 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 ≥ 3%；因 CAE-Ti-IMAC 材料在 Ti<sup>4+</sup> 融合过程中会略有损失，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。