

【产品编号】 2749381

【英文名称】 SPE-Ti-IMAC, 100%

【中文名称】 固相萃取固定化亲和色谱微球

【产品内容】 250mg, 2g

【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

•耗材：200 μ L 枪头、600 μ L 离心管、1.5 ml 离心管、直径为 1 mm 的筛板

•Tip 柱准备：

1) 将 1 mm 的筛板填入 200 μ L 枪头中，如图 1a-b 所示，尽可能填的靠近枪头的底端。

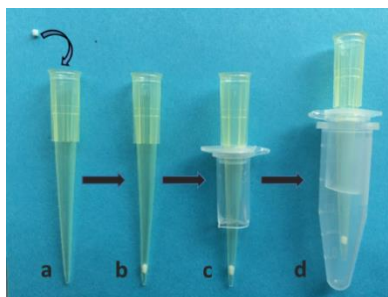


图 1

2) 如图 2 所示，将 600 μ L 离心管剪开，在离心管盖中间打孔，使 200 μ L 枪头可以卡在图 1c 所示位置；



图 2

3) 如图 1d 所示, 1 mL 离心管剪掉盖子作为套管, 然后在 200 μ L 的枪头中加入适量已螯合 Ti^{4+} 的 SPE-Ti-IMAC 材料, Tip 柱制作完成, 如图 3 所示。



图 3

【注意事项】

本产品 SPE-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。

200 μ L 枪头一般建议最多装 10 mg SPE-Ti-IMAC 材料, 如果样品起始量较大, 请按比例增加 SPE-Ti-IMAC 材料使用量。当材料使用量为 100 mg 以下, 可以使用柱管体积为 1 mL 的 SPE 柱管及其对应筛板; 当材料用量为 100-200 mg 时, 可使用柱管体积为 3 mL 左右的 SPE 柱管及其对应筛板。

【实验步骤】

一、SPE-Ti-IMAC 材料的 Ti^{4+} 螯合

1. 按照 SPE-Ti-IMAC 材料:硫酸钛 $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2 = 1:50$ (m/m), 称取材料和硫酸钛。以称取 500 mg 材料为例, 将 25 g 硫酸钛固体加入 50 mL 平底离心管中, 加入纯净水至 40 mL, 超声溶解 (注意: 硫酸钛在溶解过程中会放热, 请缓慢加入)。向硫酸钛溶液中加入 SPE-Ti-IMAC 材料, 混匀, 置于 Rolling Incubator 上摇匀, 室温过夜, 请勿磁力搅拌。

注意: 可按照实际制备情况酌情称取材料和硫酸钛, 建议 SPE-Ti-IMAC 材料不要低于 500

mg。

2. 次日，将步骤 1 中的 SPE-Ti-IMAC 材料静置至其完全沉到离心管底部，弃上清。
3. 加入适量 0.1% TFA 水溶液将 SPE-Ti-IMAC 材料分散，混匀，静置至其完全沉到离心管底部，弃上清。
4. 重复步骤 3，洗 5-6 次左右，目的是尽量去除未螯合的 Ti^{4+} 。
5. 加入 200 mM NaCl/0.1% TFA 水溶液洗涤 SPE-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 SPE-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 SPE-Ti-IMAC 材料是否成功螯合 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，说明螯合后的 SPE-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 SPE-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+} 螯合的 SPE-Ti-IMAC 材料制备成功，可用于后续磷酸肽富集。

注意：上述 3-6 步骤为 SPE-Ti-IMAC 材料的洗涤，主要目的是洗涤未螯合的 Ti^{4+} ，请勿省略。

二. Tip (SPE)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，SPE-Ti-IMAC：蛋白酶解液=20:1-30:1 (m/m) 均匀混合。以下以 250 μg 蛋白酶解液，SPE-Ti-IMAC 材料：蛋白酶解液=20:1 为例。

注意：Loading buffer 一定要足量，保证 TFA 终浓度 $\geq 3\%$ ；因 SPE-Ti-IMAC 材料在 Ti^{4+} 螯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. 向 5 mg Ti^{4+} 螯合的 SPE-Ti-IMAC Tip 柱中加入 200 μL 0.1% TFA，清洗材料。
3. 250 μL 蛋白酶解液（1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）与 Loading buffer 按体积比 1:1 充分混合，加入到 Tip 柱中进行富集，总时间控制在 20 min 左右。
4. 加入 200 μL Wash buffer 1 洗涤，除去非特异性吸附，重复 1 次，总时间控制在 10 min 左右。
5. 加入 200 μL Wash buffer 2 洗涤 1 次，除去上述步骤中残留的盐，时间控制在 5 min 左右。
6. 加入 200 μL Elution buffer 洗脱 2 次，合并洗脱液，即富集好的磷酸肽，总时间控制在 15 min 左右。

7. 洗脱的样品在冻干机中冻干，于-20℃保存，质谱分析时需用 1% FA 复溶。

注意：Tip 法富集磷酸化肽一般通过离心的方式进行，一是为了更好的控制液体从 Tip 中的流出速度(以上述 5 mgSPE-Ti-IMAC Tip 柱为例，上样和洗脱的过程离心力一般控制在 80-100 g，洗涤过程控制在 200 g)，二是可以保证条件的一致，从而保证结果的重现性。上述 2-5 步骤中的时间为离心时间。