



质谱系统蛋白样本预处理试剂盒

说明书

SISPROT SE

深圳市贝普奥生物科技有限公司

仅供科研使用

质谱系统蛋白样本预处理试剂盒说明书

型号：SISPROT SE

包装规格：96 测试/盒、24 测试/盒、6 测试/盒

预期用途：SISPROT SE 试剂盒能对各种类型的样本进行蛋白质提取、酶解和多肽脱盐；处理后的样本可用于基于质谱的蛋白组学检测。

原理：本试剂盒基于 SISPROT 微量蛋白组学样品前处理技术。SISPROT 技术将不同性质的填料串联填充至色谱小柱中。蛋白质在上层离子交换填料中实现预富集，去除污染物及快速酶解为多肽；多肽经高浓度盐溶液转移至下层反相色谱填料中进行除盐及洗脱。预富集促进快速酶解，集成化设计可有效减少样品损失，多种溶剂清洗可保证获得干净的多肽。

本产品可实现少量细胞或组织样品中 1-10 µg 蛋白质的预处理，处理后的样品用于基于质谱的蛋白质组学检测。

主要组分与成分：

组分	组分代码	组分名称	成分	规格 96T	规格 24T	规格 6T	储存
Reagent	①	Activate	有机溶剂	1.6 mL × 6	1.6 mL × 2	1.6 mL × 1	2-8℃可储存 12 个月
	②	Wash	酸性溶液	1.7 mL × 6	1.7 mL × 2	1.7 mL × 1	
	③	Reduce	酸性溶液 含还原剂	0.6 mL × 6	0.6 mL × 1	0.6 mL × 1	
	④	Dissolve A	弱碱性溶液 含烷基化试剂	0.8 mL × 6	0.8 mL × 1	0.8 mL × 1	
	⑤	Transfer	碱性溶液	1.2 mL × 6	1.2 mL × 1	1.2 mL × 1	
	⑥	Desalt	酸性溶液	1.5 mL × 9	1.5 mL × 2	1.5 mL × 1	
	⑦	Elute	酸性溶液	1.2 mL × 6	1.2 mL × 1	1.2 mL × 1	
	⑧	Dissolve B	酸性溶液	0.6mL × 2	0.6mL × 1	0.6mL × 1	
	Dil	Dilute	酸性溶液	1.2 mL × 3	1.2 mL × 1	1.2 mL × 1	
	Aci	Acidize	酸性溶液	0.4 mL × 1	0.4 mL × 1	0.4 mL × 1	
	Ext	Extract	弱碱性溶液 含表面活性剂	1.5 mL × 9	1.5 mL × 2	1.5 mL × 1	
	Dig	Digest	干粉 含酶	6 T × 16	6 T × 4	6 T × 1	-20℃可储存 12 个月
Tips & Consumables	/	SISPROT Tip	固相萃取小柱	8 支 × 12	8 支 × 3	8 支 × 1	室温干燥环境 下可储存 36 个月
	/	Adaptor	适配器	24 个/袋	12 个/袋	6 个/袋	
	/	Waste tube	废液收集管	96 个/袋	24 个/袋	6 个/袋	
	/	Collection tube	样本收集管	96 个/袋	24 个/袋	6 个/袋	

运输与储存说明: **Reagent** 可进行常温运输, **Digest** 请放置于-20℃环境中储存, 其他组分请放置于 2-8℃环境中储存。

自备设备与耗材:

设备	离心机	接触式超声粉碎机	非接触式超声水槽
	真空浓缩仪	微孔板分光光度计	恒温电烘箱
耗材	移液吸头	离心管架	0.2 mL 离心管
	锡/铝箔纸	泡沫浮力板	酶标板

样本要求: 含有 1-10 µg 蛋白质的组织、细胞、血浆、血清等样本。

操作流程:

Prep. 准备样本

用 **Extract** 提取样本中的蛋白 (提取方法详见附件一), 取 1-10 µg 提取后的蛋白至 0.2 mL 离心管中, 加 **Dilute** 稀释至 30 µL, 并加入 3 µL **Acidize** 至少吹打 5 次混匀, 短暂离心 3-5 sec, 置于冰上备用;

1. 加载样本及酶解 (约 30 min, 不含酶解)

- 1.1 装配样本处理器: 参考图 1 进行装配, 放置于离心机内;
- 1.2 活化 **SISPROT Tip**: 加入 60 µL ① **Activate**, 400 g, 室温离心 1 min;
- 1.3 平衡 **SISPROT Tip**: 加入 60 µL ② **Wash**, 400 g, 室温离心 2 min;
- 1.4 加载样本: 向 **SISPROT Tip** 中加入 30 µL 样本 (**Prep.**), 100 g, 室温离心 5 min;
- 1.5 清洗样本: 加入 30 µL ② **Wash**, 400 g, 室温离心 2 min; 加入 30 µL ① **Activate**, 300 g, 室温离心 1 min;
- 1.6 还原样本: 加入 30 µL ③ **Reduce**, 100 g, 室温离心 30 sec, 室温避光孵育 15 min, 400 g, 室温离心 1 min;
- 1.7 清洗 **SISPROT Tip**: 加入 30 µL ④ **Dissolve A**, 400 g, 室温离心 1 min;
- 1.8 准备 **Digest 溶液**: 向 **Digest** (1 管 **Digest** 可用于 6 个测试) 中加入 55 µL ④ **Dissolve A**, 反复吹打, 充分溶解;
- 1.9 酶解样本: 加入 4 µL **Digest 溶液**, 100 g, 室温离心 20 sec, 再加入 4 µL **Digest 溶液**, 100 g, 室温离心 5 sec, 使用锡箔纸整体包裹样本处理器, 置于 37 °C 烘箱孵育 1 hr;

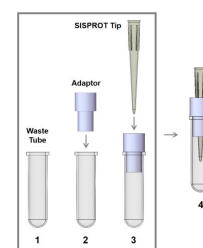


图1
样本处理器装配示意图

2. 多肽转移及除盐 (约 10 min)

- 2.1 转移酶解后的样本: 孵育结束后取出样本处理器, 放置于离心机内, 向 **SISPROT Tip** 中加入 60 µL ⑤ **Transfer**, 150 g, 室温离心 5 min;

2.2 清洗样本：加入 60 μL ⑥ **Desalt**, 400 g, 室温离心 2 min, 重复本步骤 1 次;

3. 收集多肽及质谱分析 (约 10 min, 不含质谱分析)

3.1 收集多肽：将样本处理器中的 **Waste Tube** 替换为 **Collection Tube**, 向 **SISPROT Tip** 中加入 60 μL ⑦ **Elute**, 150 g, 室温离心 5 min;

3.2 质谱分析：将 **Collection Tube** 置于真空离心浓缩仪中干燥 (耗时约 2 hrs), 结束后加入 5~10 μL ⑧ **Dissolve B**, 进行质谱分析。(干燥后多肽需储存于 -20°C)

注: $1 \text{ rcf} = 1 \times g = (\text{rpm})^2 \times 1.118 \times 10^{-5} \times r$, 其中 g 和 rcf 为离心力, rpm 为转速, r 为离心机转轴中心到离心管中心的距离。

注意事项:

1. 使用前应详细阅读产品说明书, 并在有效期内使用本品;
2. **SISPROT Tip** 必须存储于干燥环境, 以防止水汽进入影响使用; 环境中的颗粒物可能导致 **SISPROT Tip** 堵塞, 在进行活化步骤时需检查液体在离心后能否完全通过, 若有大量液体残余, 则需要更换 **SISPROT Tip**;
3. 试剂储存时, **Digest** 试剂需存储于 -20°C 及以下环境中, 其余试剂存储条件为 $2-8^{\circ}\text{C}$, 需严格防止高温对产品的影响;
4. 本产品含有化学试剂, 操作时需佩戴口罩、手套及实验服, 避免触及手、眼镜、脸及皮肤暴露部位, 如不慎触及, 请及时用大量清水冲洗;
5. 实验操作前建议使用 75% 酒精将离心机擦拭干净, 尤其顶盖, 避免引入污染物;
6. 实验开始后方可在样品中加入 **Acidize**, 不得提前酸化样本;
7. **Digest** 溶解后需立即使用, 不可储存;
8. 样本酶解后操作步骤所使用的溶液需保持洁净;
9. 使用后的 **Adaptor** 须使用无水乙醇清洗干净, 干燥后方可再次使用;
10. 本产品仅供专业人士进行科研使用。

参考文献:

1. Chen, W. et al. Simple and Integrated Spintip-Based Technology Applied for Deep Proteome Profiling. *Anal. Chem.* 88, 4864–4871 (2016).
2. Ye, X. et al. Combinatory strategy using nanoscale proteomics and machine learning for T cell subtyping in peripheral blood of single multiple myeloma patients. *Anal. Chim. Acta* 1173, (2021).
3. Xue, L. et al. Mixed-mode ion exchange-based integrated proteomics technology for fast and deep plasma proteome profiling. *J. Chromatogr. A* 1564, 76–84 (2018).



企业信息：

企业名称：深圳市贝普奥生物科技有限公司

住所/生产地址：广东省深圳市南山区桃源街道长源社区学苑大道 1001 号南山智园 C2 栋

邮编：518055

联系电话：0755-26907483

售后服务单位名称：深圳市贝普奥生物科技有限公司

附件 1：不同类型样本的蛋白提取建议

样本类型	操作建议	超声条件建议
哺乳动物贴壁细胞	用冷藏的 PBS 溶液快速连续洗涤细胞 3 次，确保每次 PBS 洗涤液倾倒彻底，最后一次洗涤完成后加入试剂盒中提供的 Extract 溶液，用细胞刮铲混匀细胞后用将其转移至 1.5 mL 离心管中，使用超声波细胞粉碎机在 4℃ 的条件下进行裂解。1 mg 细胞（约 1×10^6 个哺乳动物细胞）需使用至少 100 μ L Extract 进行裂解。	大量细胞使用接触式（变幅杆）超声，条件：150 W，超声 3 sec，停止 3 sec，总时长 30 sec。需调整至适当高度，防止产生大量泡沫。 少量细胞使用非接触式（水槽）超声，条件：540 W，超声 10 sec，停止 10 sec，共 30 次循环，超声 5 min 后取出，放入掌上离心机离心 3-5 sec，重复超声一次。
冰冻切片	将不小于 70 mm ² 的组织切片（厚度 4-12 μ m），置于 0.5 mL 离心管中，加入 200 μ L 的 4% SDS 溶液，使用接触式超声波细胞粉碎机在冰上破碎 4 min 后离心取上清，再取 80% 丙酮溶液进行蛋白沉淀（丙酮用量为 4 倍上清体积），沉淀至少 16 小时，使用 80% 的丙酮清洗过量的 SDS。将蛋白中的丙酮溶液自然干燥。向蛋白沉淀加入试剂盒中提供的 Extract 溶液复溶蛋白，使用非接触式超声波细胞粉碎机低温超声 20 min，使用 BCA assay 检测蛋白质浓度。获得蛋白液后参照本说明书操作规程进行处理，HE 染色切片需取蛋白复溶液上清液进行样本加载，并且清洗样本时需增加“加入 60 μ L 80% Activate，400 rcf 离心 1 min”步骤。	接触式超声，条件：80 W，超声 1 sec，停止 1 sec，超声 2 min 后取出，放入掌上离心机离心 3-5 sec，再次超声 2 min。 非接触式超声复溶蛋白，条件：540 W，超声 10 s，停止 10 sec，共 30 次循环，超声 5 min 后取出，放入掌上离心机离心 3-5 sec，重复超声一次。
福尔马林固定石蜡包埋（FFPE）组织切片	所需组织面积及操作条件同冰冻切片。FFPE 样本在蛋白提取过程中需额外进行加热步骤，条件为：90℃，90min。	同上
激光微切割组织切片	将不少于 1 mm ² 激光微切割组织（大约含 1 μ g 蛋白）收集至 0.2 mL 离心管中，加入 30 μ L Extract 溶液，使用非接触式超声在 4℃ 条件下超声处理 10 min，短暂离心，90℃ 加热 90 min 后，短暂离心，再次使用非接触式超声在 4℃ 条件下进行 10 min 的超声操作，短暂离心。	非接触式超声，条件：540 W，10 s on，10 s off，30 cycles。
血清或血浆	用纯水将血清/血浆稀释 50-100 倍，取含 1-10 μ g 蛋白的血清，按照本说明书操作规程进行操作。正常人类血清总蛋白浓度约 60-83 μ g/ μ L。	/
尿液	浓缩尿液，取含 1-10 μ g 蛋白的样本，参照本说明书操作规程进行操作。	/

附件 2：常见问题分析及解决

问题	原因	解决方法
无法检测到多肽信号	样本未正确洗脱 (Elute)	将样品瓶按照操作说明要求提前按序排列，并于洗脱 (Elute) 步骤注意核对标签。
谱图中检测到污染物	样本管破损导致样品污染	实验前检查样本管状态。
	实验过程污染	实验时需保持洁净，并保证手套、桌面及吸头洁净无污染。
多肽零漏切率低于 70%	酶活性降低	复溶后的 Digest 须一次性使用完毕，不可储存。
	孵育温度或时间不恰当	1、推荐酶解温度为 37℃，建议使用温控设备对温度进行监控； 2、推荐酶解时间为 1 小时，最长不超过 3 小时。
蛋白鉴定量低	样本未充分酸化	使用 pH 试纸检测剩余样本酸化后的 pH 值是否在 3.5 以下，若高于，则可加入适量体积的 Acidize 进行酸化直至样本 pH 值低于 3.5。
	酶解孵育时间过长致 SISPROT tip 内填料干燥	推荐酶解时间为 1 小时，最长不超过 3 小时。
	上样体积不足	避免混匀、吹打时产生泡沫。

附件 3：常见问题

1. 问：是否可使用 Extract 以外的裂解液提取蛋白？

答：可以使用不含 SDS、Triton-X 100 等带电荷表面活性剂进行蛋白提取；不可使用高盐浓度的溶液进行蛋白提取，如 6 M 盐酸胍、8M Urea（处理完的样本需将 Urea 的浓度稀释至 2M 以下）。

2. 问：酶解时，第二次需离心 5 sec，该如何控制？

答：设置离心机最短的时间，在离心启动 5 sec 后，手动点击停止即可。

3. 问：适配器 Adaptor 是否可以重复使用？

答：可以，需在每次实验结束后将适配器 Adaptor 浸没于无水乙醇中进行超声清洗（专用玻璃烧杯），自然干燥后储存于专用玻璃烧杯并使用锡纸密封，待下次使用。

4. 问：使用 Reduce 试剂进行样本还原超过 15 min，应如何处理？

答：使用 Reduce 试剂时，推荐最佳还原时长为 15 min，还原时间最长不得超过 60 min。

5. 问：使用多少体积 Dissolve B 溶解干燥后的多肽进行 LC-MS 测试？

答：对于 timsTOF 型仪器（Bruker），溶解多肽至 200 ng/μL，进样 1 μL。若初始样本处理量小于 500 ng 则建议用 5 μL Dissolve B 溶解样本，进样 4 μL；

对于 Orbitrap 型仪器（Thermo）按照样品初始处理量溶解多肽至 1 μg/μL，例如初始处理 10 μg 样本则使用 10 μL Dissolve B 溶解多肽，进样 1~3 μL。若初始样本处理量小于 2 μg 则建议用 5 μL Dissolve B 溶解样本，进样 4 μL。

6. 问：植物样本中的某些物质会影响 BCA 定量（例如还原剂），对此类样品该如何处理？

答：植物样本建议提取蛋白后使用丙酮沉淀，清洗后再进行蛋白定量测试。

7. 问：上样体积一定需要 30 μL 吗？

答：不需要，总体积在 20-50 μL 之间即可。

8. 问：酸化后样本能否于 -20℃ 过夜储存或过周末？

答：溶液 pH 变化可引起某些蛋白质沉淀，不建议将样本酸化后储存。

9. 问：Dissolve B 中是否含有 iRT？

答：否。可依据说明书中的相关内容自行加入 iRT。