

PROTEOMICS TECHNICAL MANUAL

蛋白质组学技术手册



400-621-0302

www.genechem.com.cn

Version GA120.3

本手册为吉凯基因版权所有，未经许可禁止全部及部分复制。

上海吉凯基因医学科技股份有限公司
SHANGHAI GENECHM CO.,LTD.



吉凯科服 您的专属科研管家
最懂临床样本的科研服务平台



目录 CONTENTS

蛋白质组学概述	01
蛋白质组学是什么	01
为什么要做蛋白质组的研究	01
哪些情况下会用到蛋白组学研究	03
蛋白质组学技术介绍	04
蛋白质组学技术体系	04
定性技术-分析蛋白质种类	06
定量技术-分析蛋白质表达种类及其相对表达量	07
修饰技术-分析修饰发生的位点及其相对表达量	17
样本收集注意事项	26
吉凯基因蛋白质组学分析优势	28

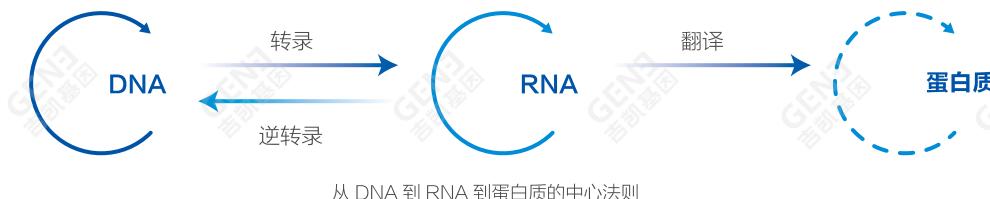


蛋白质组学是什么

蛋白质组学是一种通过大规模分离、鉴定并定量研究蛋白质的技术 (Proteomics)。是对蛋白质序列及其结构和功能的大规模研究方法。

为什么要做蛋白质组的研究

- 蛋白质是生物学功能最直接的行使者



- 01** 基因表达水平与蛋白质表达水平不是一对对应的关系。
- 02** 蛋白质组是基因组的直接功能注释。
- 03** 蛋白质组的研究可以规避基因组，转录组层面的很多无效信息。
- 04** 蛋白质研究可以直接体现蛋白质的定位以及修饰等状态。

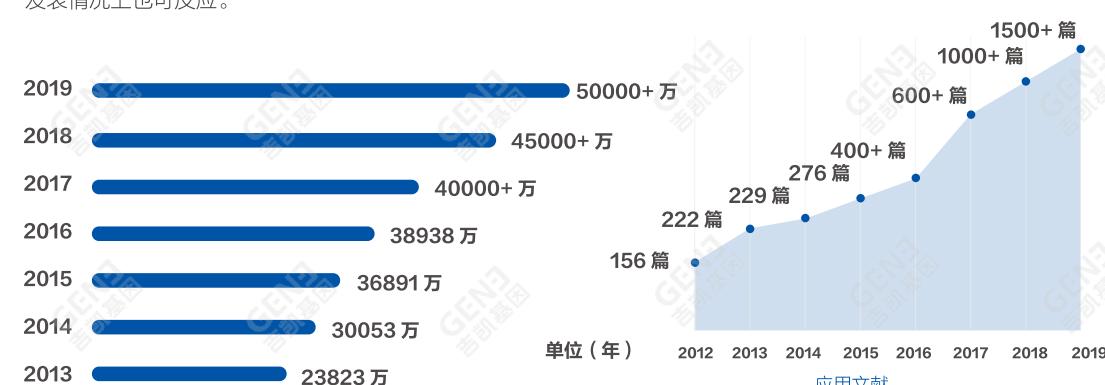
- 蛋白质数量和种类比核酸更多，研究更复杂



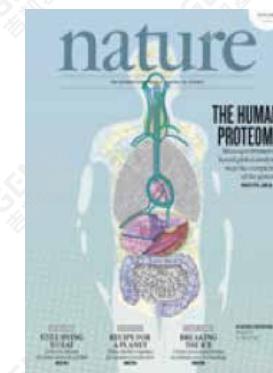
因为含有各类翻译后修饰，蛋白质的种类和数量远高于基因数量。

- 蛋白组是目前的研究热点

研究者们日益发现蛋白组研究在生命科学和医学领域的重要研究价值，从历年国自然课题资助数量和 SCI 文献发表情况上也可反应。



国自然基金 (蛋白质组学)
蛋白质组学国自然基金资助情况及文献报道情况



2014 年 NATURE 杂志上刊载报道了人类蛋白质组计划，开启了从基因组时代到蛋白质组时代的序幕。

NATURE 封面文章：被引用 : 465

M. WILHELM ET. AL. MASS-SPECTROMETRY-BASED DRAFT OF THE HUMAN PROTEOME, NATURE, 2014, 509 (7502):582.

哪些情况下会用到蛋白质组学研究



IP 实验后确定目标蛋白质的相互作用蛋白。



定性或定量分析不同样本(如癌与癌旁、疾病与非疾病样本)中蛋白的差异表达，以确定造成某种疾病发生发展的潜在机制，为后期的研究开启新思路。



通过前期研究有证据显示课题方向与蛋白质修饰有关(如信号通路与磷酸化有关)，则大规模分析比较不同样本中修饰状态的差异，为后续研究提供更多的线索。



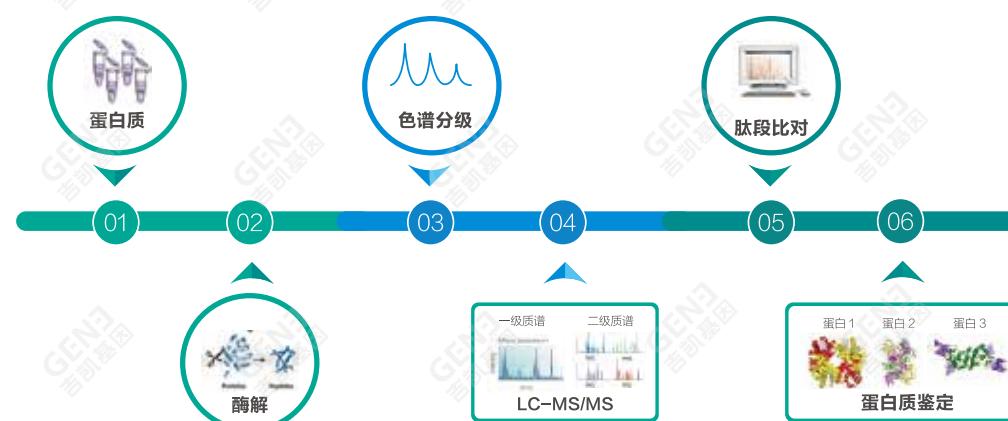
临幊上罕见病的诊断是一个难题，由于其发病率低，确切病因不明。蛋白组学成为筛选罕见病及其他疑难杂症 biomarker 或者识别异常致病蛋白的重要技术方法。



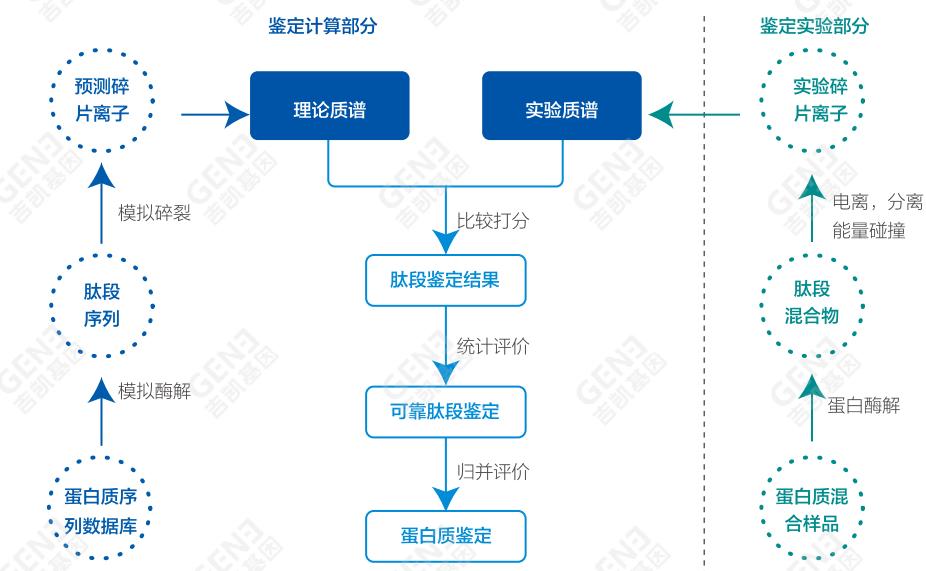
蛋白质组学技术体系

- 蛋白质组学技术骨架是液质联用分析系统

目前，蛋白质组学技术都是依赖于液质联用系统(LC-MS/MS)来完成的。在液质联用系统中可以将肽段通过液相色谱进行分离。进入质谱系统后记录其信号(一级质谱)，然后针对分离出来的肽段信号再外加能量进行进一步的碎裂同时记录其信号(二级质谱)。根据这些记录下来的信号分析样本中蛋白质组的信息。



- 液质联用系统分析蛋白质组的核心是理论图谱与实验图谱的比对和识别



- 目前，依托于液质联用系统（LC-MS/MS），蛋白质组学技术已经发展出了完善的技术体系：



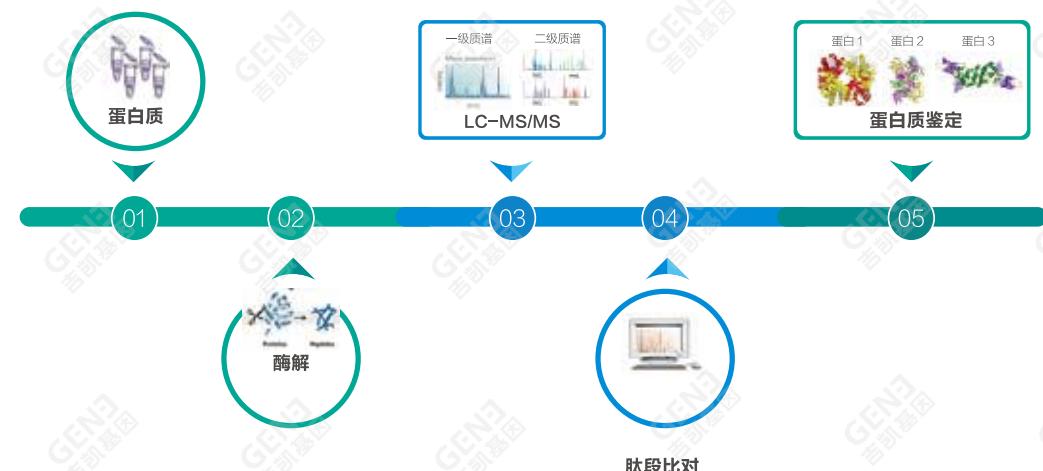
定性技术——分析蛋白质种类

蛋白质组定性技术主要用来分析中样本有哪些种类的蛋白质。最常规的技术就是 Shotgun。

Shotgun

- 技术介绍

Shotgun (鸟枪法) 是定性鉴定蛋白质混合物中蛋白质组成最常见也最方便有效的方法。其原理为将样本中的蛋白质酶解成肽段后, 经液相色谱分离进入质谱仪后先记录其一级信号, 随后外加能量将其碎裂后再记录其二级信号。采用相应的软件还原样本中的蛋白质组信息。



- 应用领域

某一生理状态下组织、细胞或者细胞器中表达蛋白质的鉴定。

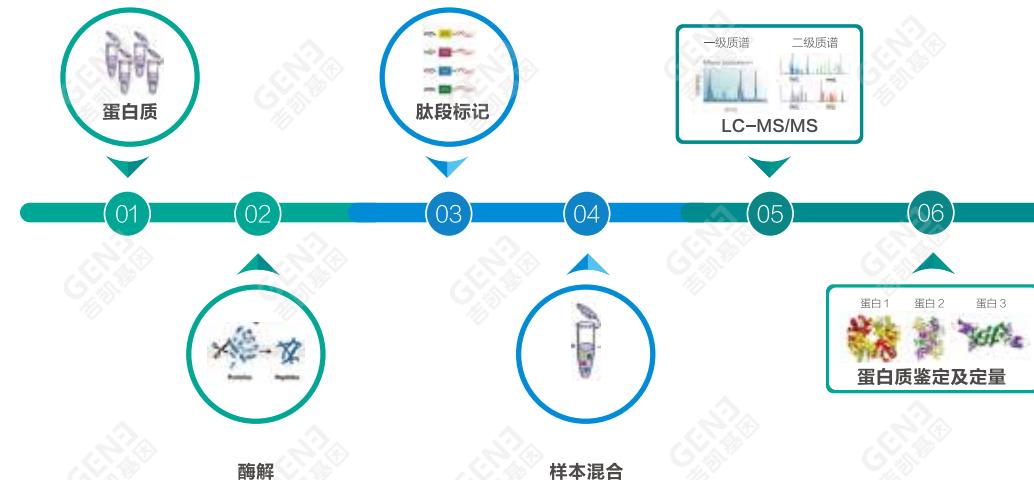
- 技术优势

可全面鉴定整个细胞、组织或复杂混合样品的大量蛋白质。

定量技术-分析蛋白质表达种类及其相对表达量

蛋白质组的定量技术通常情况下是用来分析不同样本中同一个蛋白质的表达量变化。通常来说有两大类技术路线。一类是分析前并没有明确的分析目标，希望通过大规模筛选的方式筛选出差异蛋白质为后续的分析提供基础，TMT, Label Free, DIA 就是这一类型的技术，这一类的技术其效果相当于芯片或者转录测序，无非结果是针对蛋白质的。另外一种类型是针对某些目标蛋白质开展分析，PRM 是这一类型的技术，类似于多重 Western Blot，所有的定量技术都是在定性技术 Shotgun 的基础上增加了定量模块，不同定量技术采用的定量方式不同。

二级质谱中 TMT 试剂的平衡基团丢失，报告基团从肽段上碎裂下来，肽段自身序列也被碎裂。肽段自身的碎片可用来定性分析肽段的序列组成。报告基团的信号强度比值则能代表来源于不同样本的该肽段的含量比值，通过肽段定量关系可以计算出蛋白质表达量比值。



TMT (Tandem Mass Tag) 标记定量

• 技术介绍

TMT (Tandem Mass Tag) 是 Thermo Fisher Scientific 开发的一种多肽体外标记技术。通过对不同样品中的肽段采用不同通道的 TMT 试剂进行标记，然后进行 LC-MS/MS 分析，通过 TMT 标记信号的强度值实现样本蛋白组之间的相对定量。

• 实验原理与流程

TMT 试剂盒每个通道的报告基团和平衡基团分子量总和是一致的，当肽段用 TMT 试剂标记后，来源于不同样本的同一序列的肽段的分子结构和分子量仍保持一致，它们在一级质谱中呈现为同一个信号，一起进入二级质谱分析阶段。

• 应用领域

- 疾病标志物筛选
- 分子机制研究
- 植物抗逆研究
- 药物作用靶点研究
- 特殊功能蛋白质筛选

• 技术介绍

所有样本来源的标记肽段都一起进行分析，能够减少人为操作和实验系统不稳定造成的偏差。在经费可承受范围内，该技术是鉴定数量最多的蛋白质组分析技术。

• 经典文献研究思路



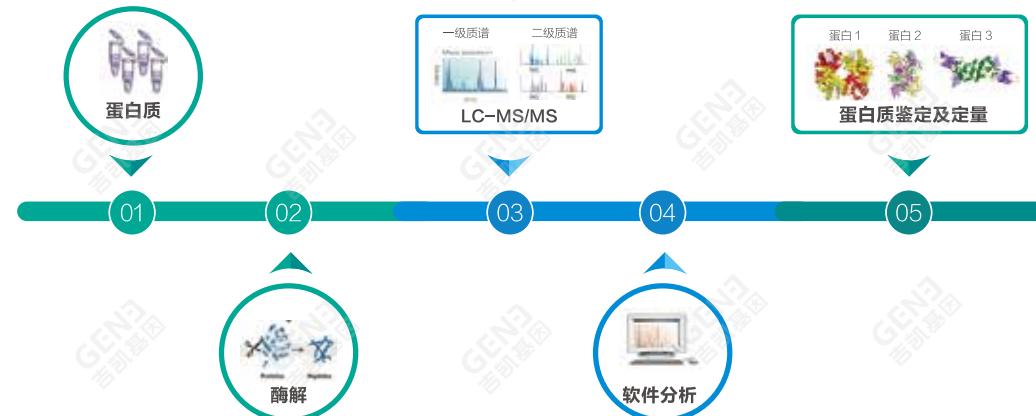
Label Free

• 技术介绍

非标记定量蛋白质组学 (Label Free) 是近年来比较常见的一种对样本中蛋白质进行大规模相对定量分析的分析方法。

• 实验原理与流程

以液质联用系统中质谱一级信号为基础, 计算每个肽段离子的色谱峰面积, 作为肽段强度的依据, 从而实现样品间的相对定量。



• 应用领域

- ✓ 疾病标志物筛选
- ✓ 作用机制研究
- ✓ 植物抗逆研究
- ✓ 药物作用靶点研究
- ✓ 特殊功能蛋白质筛选

• 技术优势

无需标记, 操作简单;

• 经典文献研究思路

IF=43.07

Proteomics reveals NNMT as a master metabolic regulator of cancer-associated fibroblasts.

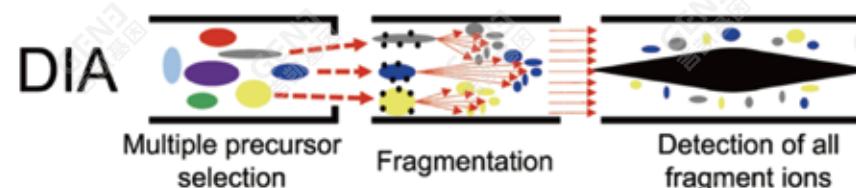
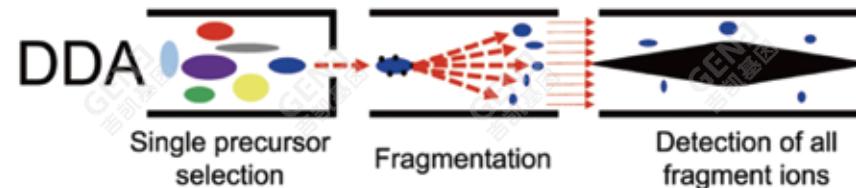


DIA

• 技术介绍

DIA (Data independent acquisition) 技术是新一代蛋白质组学分析技术, 被 Nature Methods 杂志评为 2015 年最值得关注的技术。

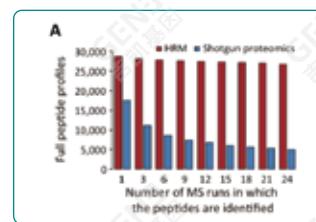
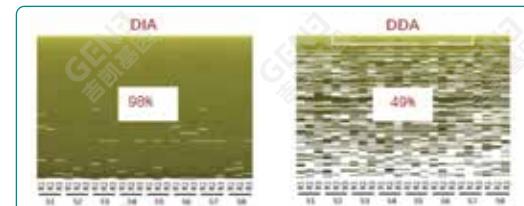
与传统的 DDA 数据采集需要记录具体的一级信号再将其碎裂成二级信号加以记录不同, DIA 数据采集过程中将质谱整个全扫描范围分为若干个窗口, 高速、循环地对每个窗口中的所有离子进行选择、碎裂、检测, 从而无遗漏、无差别地获得样本中所有离子的全部碎片信息。这样的技术流程融合了传统蛋白质组学“鸟枪法”(shotgun)和质谱绝对定量“金标准”选择反应监测 / 多反应监测 (SRM/MMR) 技术的优势和特点。



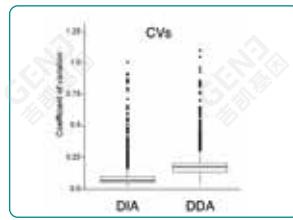
DIA 与 DDA 数据采集模式的区别

与传统的 DDA 采集模式相比, DIA 技术在检测结果上具有以下优势:

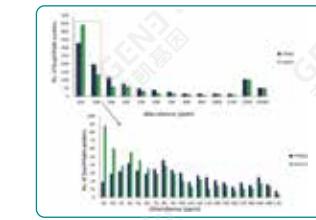
○ 数据采集更完整



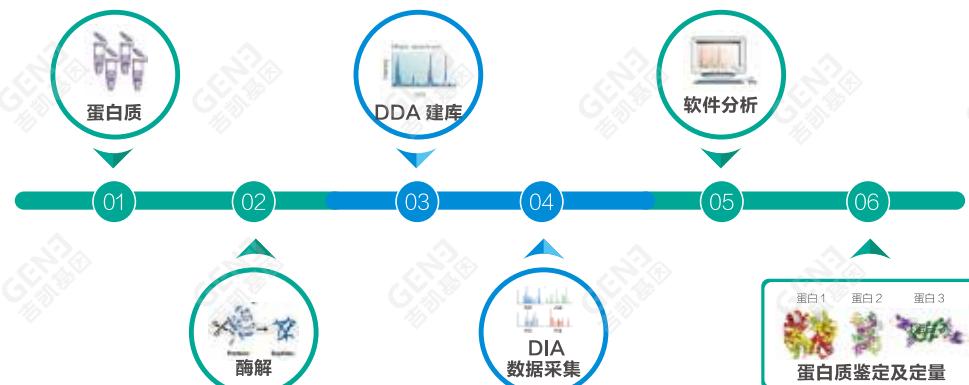
○ DIA 定量更稳定



○ DIA 更能检测到低丰度信号



• 实验原理与流程



• 经典文献研究思路

IF=23.054

Proteomic Architecture of Human Coronary and Aortic Atherosclerosis.

蛋白组学分析

冠脉组织样本分别进行label free蛋白组学和DIA蛋白组学方法检测。



生信分析

GO注释及pathway富集分析、蛋白互作网络分析。



结果

该研究发现并证实了主动脉粥样硬化的诊断biomarker，并在血液中进行验证。

• TMT、Label Free、DIA怎么选

	TMT	Label Free	DIA
样本类型	不限	不限	不限
样本需求量	较少 (蛋白质150 μg以上)	很少 (蛋白质80 μg以上)	很少 (蛋白质80 μg以上)
鉴定数量	最多	TMT的6-70%	TMT的80%
“有”和“无”的显示	不能	能	能
实验群体较大	混样	可以分析，但是不推荐	最优选择
珍贵样本 抢救性数据发掘	不建议	不建议	最优选择

PRM

• 技术介绍

PRM 是针对特定的蛋白质或者代谢小分子进行定量分析的技术，可以实现相对定量（作用类似于 Western Blot）也可以实现绝对定量（需要添加标准品，作用类似于 Elisa）。

在 biomarker 的筛选过程中，当筛选到大量的差异蛋白质的时候，通常首先需要确定这些蛋白质的表达量在群体中的差异确实是存在的，然后，在进一步扩大的群体中也需要通过分析这些差异蛋白质表达量，从而进一步确定 biomarker panel 的组成及其指征的准确率。

这两个过程中的针对这些已经鉴定出来的差异蛋白质的表达量分析通常都是采用 Western Blot, Elisa 等方法，但是这两个方法需要依赖抗体，存在以下局限性：

1. 通常情况下鉴定到的差异蛋白质很多都不具备商业化的抗体，如果需要定制则价格非常高昂。

2. 抗体批次间有一定的差异，因此对于大规模或者时间跨度非常长的项目来说结果的可靠性有一定挑战。

3. Western Blot 和 Elisa 都是低通量实验，一次只能分析一个样本中的一个蛋白质的表达量，因此面对大规模群体分析的时候工作量非常庞大。

PRM 技术能够实现 Western Blot, Elisa 的检测功效，同时针对以上 Western Blot, Elisa 的限制因素，PRM 还具有自己的优势：

1.PRM 依赖液质联用系统开展分析，适用范围比 Western Blot, Elisa 广的多。

2.PRM 依赖液质联用系统开展分析，只要维护到位性能非常稳定，因此在大规模群体的实验中 PRM 结果更稳定更准确。

PRM 一次能检测多个甚至几十个蛋白质的表达量，通量较高，在大规模群体分析中相比 Western Blot, Elisa 能节省更多的经费成本和时间成本。

• 经典文献研究思路

IF=28.245

Highly Accurate Identification of Cystic Precursor Lesions of Pancreatic Cancer Through Targeted Mass Spectrometry: A Phase IIc Diagnostic Study.

蛋白组学分析

来自仅有标志物阳性的初次诊断未确诊胰腺囊肿患者、已确诊患者及假性囊肿患者的囊液进行Label Free蛋白组学检测，用PRM蛋白组学方法进行验证。

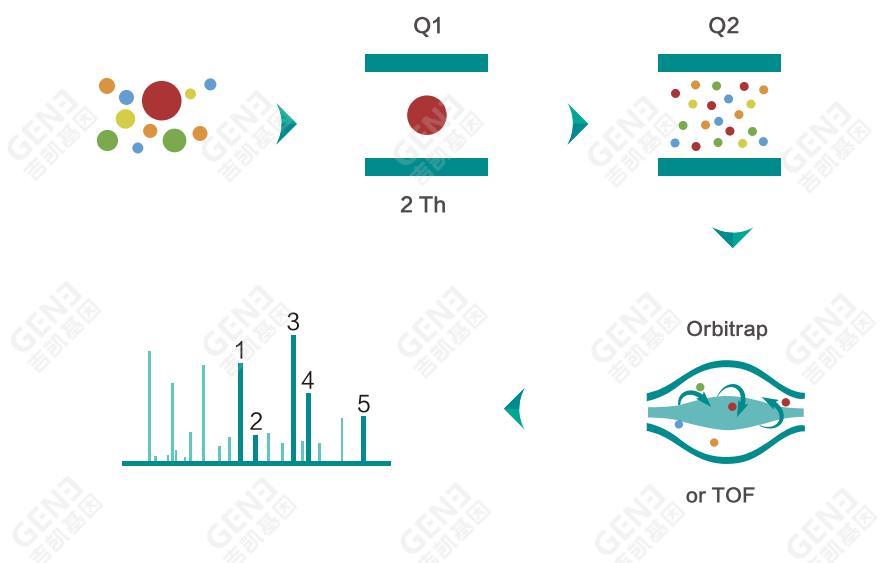
结果

该研究采用Label Free以及PRM技术发现了区分囊性前体病变和胰腺癌的biomarker。

• 实验原理与流程

在 PRM 分析过程中，因为针对特定关注的蛋白质进行分析能够明确该蛋白质进行定量的肽段，从而特异的监控这些肽段与其所属的二级信号，通过这定量信息来反应蛋白质的表达量信息。如果只是当做 Wetern Blot

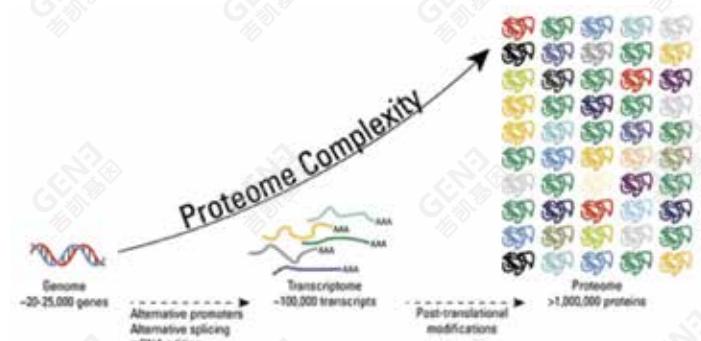
来用，则不需要额外添加标准品；如果当做是绝对定量的分析手段，则在实验过程中加入标准肽（有外标法和内标法两种，内标法的标准肽应该为同位素标记的）。



修饰技术-分析修饰发生 的位点及其相对表达量

蛋白质被翻译出来之后就像刚出浴站在衣柜前犹豫不决的美女，她想去什么场合就得穿什么衣服，翻译后修饰就是蛋白质的各色行头，很大程度上能决定蛋白质定位在哪里发挥什么样的功能。翻译后修饰的存在让蛋白组的信息更加复杂。也为研究提供了更多的维度。

针对蛋白质翻译后修饰，最常见的研究方向是磷酸化，泛素化，乙酰化和 N- 糖基化。



磷酸化 TMT (Tandem Mass Tag) 标记定量

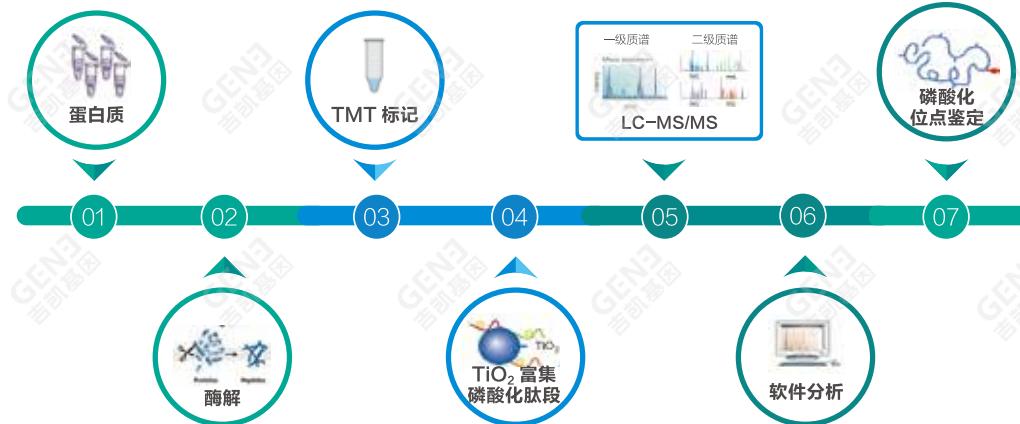
• 技术介绍

磷酸化是生物体内重要的蛋白质修饰种类，与酶活性、信号传导等多种极为重要的生物过程相关。因为含量很低，磷酸化信号大规模分析前一般需要先将其富集出来。目前磷酸化肽段的富集方式有很多种， TiO_2 是其中最成熟的一种。磷酸化 TMT 是将 TMT 技术以及 TiO_2 对磷酸化肽段的强亲和力联合起来，对磷酸化肽段进行定量分析。

• 实验原理与流程

TiO_2 在酸性条件下与磷酸化肽段具有强亲和力，碱性条件下又可将磷酸化肽段洗脱，从而通过调节 PH 而将磷酸化肽段富集并洗脱下来。

磷酸化分析和 TMT 偶联有非常明显的好处，该流程中是把所有样本标记好混合在一起后进行后续的富集以及其他操作，因此整个实验过程中因为操作引起的不平行因素会大大减少，定量可靠程度会大大增加。



• 应用领域

- 疾病机理研究
- 个性化医疗
- 农业品种改良

• 技术介绍

采用主流的 TiO_2 富集方法，特异性高，富集效率好；通过高分辨率、高扫描速度的质谱，对富集的磷酸化肽段进行大规模鉴定；结合常用的技术可对不同样品间的磷酸化水平的差异进行定量比较。

• 经典文献研究思路

IF=36.216

Proteogenomics analysis of human colon cancer reveals new therapeutic opportunities.

蛋白组学分析

Label Free 蛋白组学方法、TMT 磷酸化蛋白组学分析结直肠癌组织与癌旁组织总蛋白、磷酸化蛋白组特征。

生信分析

GO分析、KEGG pathway分析。

结果

该研究通过TMT, Label Free, 磷酸化TMT数据与其他组学数据结合，发现了新的结肠癌治疗可能。

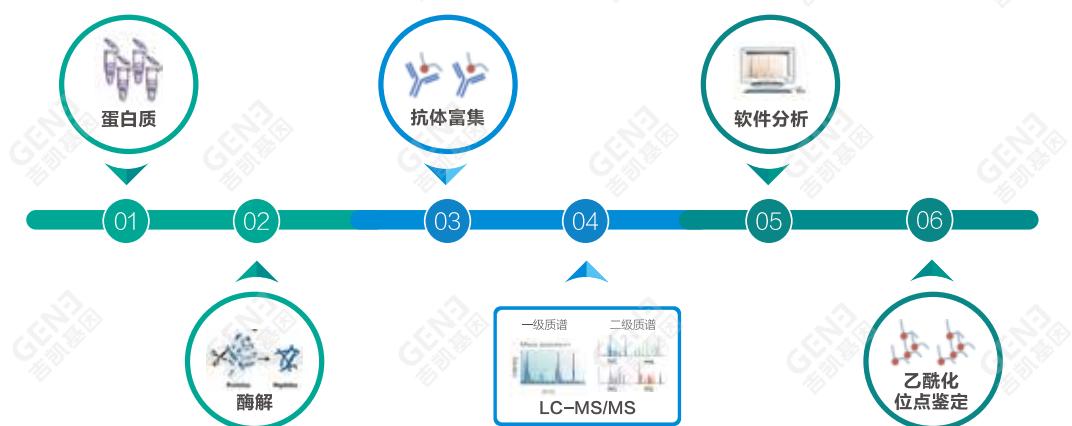
乙酰化 Label Free

• 技术介绍

乙酰化是一种发生在赖氨酸侧链的可逆修饰。乙酰化修饰存在的广泛性和重要性体现在对控制细胞循环、代谢、寿命、肌动蛋白多聚化的蛋白的影响上。蛋白乙酰化状态的调控是研究癌症和多聚谷氨酰胺疾病的关键之一，且组蛋白脱乙酰酶（HADCs）是抗癌药发展的目标之一。

但乙酰化修饰的浓度低，并且乙酰化水平远低于磷酸化、泛素化，不易从单一的样本中鉴定到大量的乙酰化位点，所以在鉴定前需要对乙酰化肽段进行富集，用抗乙酰化赖氨酸（Kac）的特异性抗体可以对乙酰化肽段进行免疫沉淀，结合 Label Free 蛋白质定量方法，从而实现乙酰化蛋白质的定性定量。

• 实验原理与流程



• 应用领域

- 表观遗传学研究

- 发病机制研究

• 经典文献研究思路

IF=36.216

Time-Resolved Analysis Reveals Rapid Dynamics and Broad Scope of the CBP/p300 Acetylome.

蛋白组学分析

分别采用3种不同方法（基因敲除、乙酰转移酶抑制剂、结构域抑制剂CBP112）处理，再分析其乙酰化蛋白质组变化。

生信分析

蛋白互作网络分析、CBP/p300调控蛋白与非调控蛋白的功能注释分析与比较。

结果

该研究将乙酰化蛋白质组，蛋白质组以及转录组数据结合，综合分析了CBP/p300 乙酰化体在不同时间点的变化，及其对基因表达调控的作用。

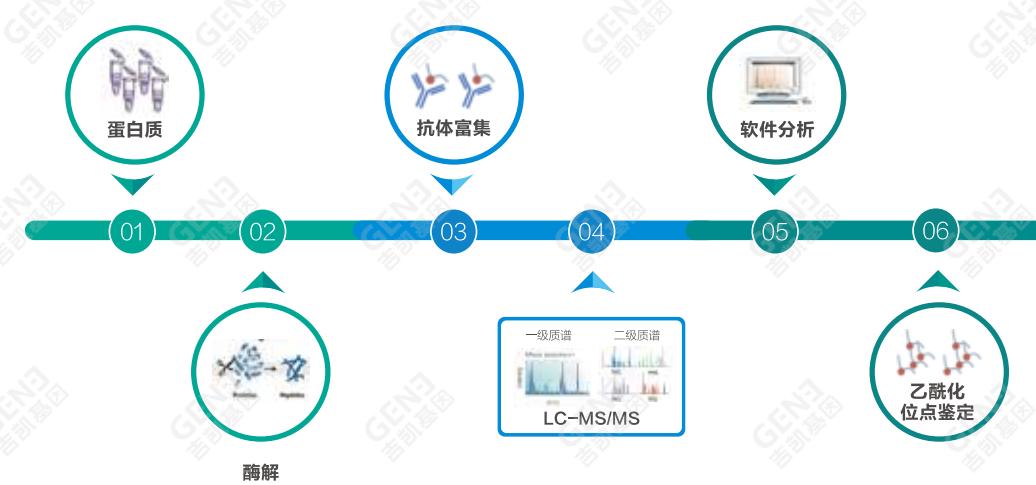
泛素化 Label Free

• 技术介绍

泛素化是指泛素（一类低分子量的蛋白质）分子在一系列特殊的酶作用下，将细胞内的蛋白质分类，从中选出靶蛋白分子，并对靶蛋白进行特异性修饰的过程，与蛋白质降解和功能调控密切相关。泛素化在蛋白质的定位、代谢、功能、调节和降解中都起着十分重要的作用，同时它也参与了细胞周期、增殖、凋亡、分化、转移、基因表达、转录调节、信号传递、损伤修复、炎症免疫等几乎一切生命活动的调控，与肿瘤、心血管等疾病的发病密切相关。

带有泛素化修饰的肽段比例很低，其他大量存在的肽段会影响泛素化肽段质谱信号的鉴定，因此在质谱检测前需要对泛素化肽段进行富集。Trypsin 酶切后的泛素化修饰是一个较小的 Motif (K-GG)，采用具有高亲和力的基序抗体，能够特异性富集复杂样本中的泛素化肽段，结合 Label Free 蛋白质定量方法，实现大规模泛素化蛋白质定性定量分析。

• 实验原理与流程



• 应用领域

● 发病机制研究

● 蛋白降解机制研究

• 经典文献研究思路

IF=41.037

Mutations in LZTR1 drive human disease by dysregulating RAS ubiquitination.

蛋白组学分析

泛素化蛋白组学检测 Lztr1+/+、Lztr1-/- 鼠胚胎成纤维细胞 (MEFs) 泛素化蛋白组定量分析。

生信分析

差异泛素化蛋白的筛选——火山图。

结果

证实 LZTR1 可调节 Hras (K170) 的泛素化。该研究采用泛素化 label free 技术 LZTR1 缺失的情况下体内蛋白质泛素化水平的整体变化，验证了体外实验的发现。

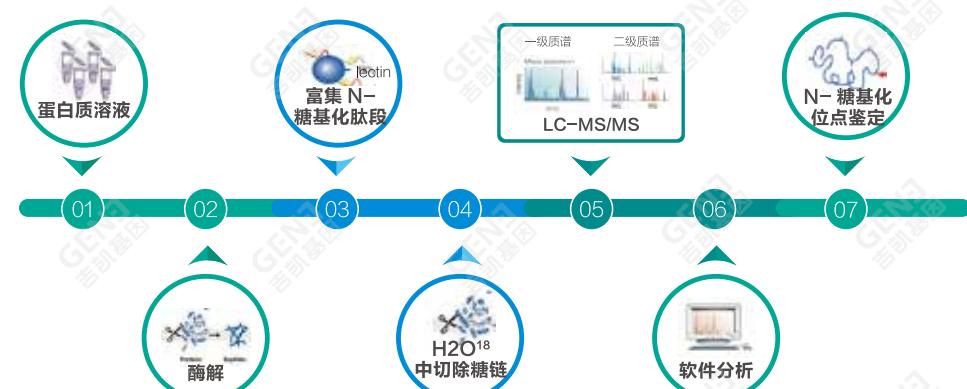
N- 糖基化 Label Free

• 技术介绍

糖基化是指蛋白质在酶的作用下被连接上糖链的修饰类型。细胞内超过 50% 的蛋白质都修饰有糖链。N- 糖基化是指糖链连接于天冬酰胺 (Asn) 残基上的糖基化形式，参与细胞识别、免疫应答、细胞分化等生命活动。N- 糖基化 Label Free 技术是利用凝集素将糖基化肽段富集出来后再切除糖链后联合 Label Free 技术进行糖肽位点以及定量分析。

• 实验原理与流程

蛋白质经酶解后利用凝集素富集 N- 糖基化肽段，再用 N- 糖酰胺酶 F (PNGase F) 在 H_2O^{18} 中切除糖链，使得糖基化修饰过的位点引入 O^{18} ，分子量的增加使得在液质联用系统中能够轻松辨别出该位点，从而确定 N- 糖基化发生的位点。



• 应用领域

● 疾病标志物筛选

● 信号转导途径分析

• 技术介绍

大规模的蛋白质组 N- 糖基化位点的鉴定与相对定量。

• 经典文献研究思路

IF=36.216

Mutations in LZTR1 drive human disease by dysregulating RAS ubiquitination.

蛋白组学分析

糖基化label free检测FN3K敲减后细胞内蛋白糖基化修饰水平的变化。



生信分析

GO分析。



结果

NRF2诱导的肿瘤细胞增殖和转移受到上游FN3K基因对其的糖基化调控。

参考文献

- Exploring the Mitochondrial Degradome by the TAILS Proteomics Approach in a Cellular Model of Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2019 Jul 31;11:195. doi: 10.3389/fnagi.2019.00195.
- Exosomal transfer of p-STAT3 promotes acquired 5-FU resistance in colorectal cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 Jul 19;38(1):320. doi: 10.1186/s13046-019-1314-9.
- Identification of proteomic markers for ram spermatozoa motility using a tandem mass tag (TMT) approach. *J Proteomics.* 2019 Jul 1:103438. doi: 10.1016/j.jprot.2019.103438.
- XAB2 depletion induces intron retention in POLR2A to impair global transcription and promote cellular senescence. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jun 19. pii: gkz532. doi: 10.1093/nar/gkz532.
- Quantitative phosphoproteomic analysis of the molecular substrates of sleep need. *Nature.* 2018 Jun;558 (7710):435-439. doi: 10.1038/s41586-018-0218-8.
- Global extracellular vesicle proteomic signature defines U87-MG glioma cell hypoxic status with potential implications for non-invasive diagnostics. *J Neurooncol.* 2019 Aug 14. doi: 10.1007/s11060-019-03262-4.
- Proteomics reveals NNMT as a master metabolic regulator of cancer-associated fibroblasts. *Nature.* 2019 May;569 (7758):723-728. doi: 10.1038/s41586-019-1173-8.
- In-Depth, Proteomic Analysis of Nasal Secretions from Patients With Chronic Rhinosinusitis and Nasal Polyps. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2019 Sep;11(5):691-708. doi: 10.4168/aaair.2019.11.5.691.
- In-depth serum proteomics reveals biomarkers of psoriasis severity and response to traditional Chinese medicine. *Theranostics.* 2019 Apr 13;9(9):2475-2488. doi: 10.7150/thno.31144.
- Proteomic Architecture of Human Coronary and Aortic Atherosclerosis. *Circulation.* 2018 Jun 19;137(25):2741-2756. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034365.
- Alpha-1-acid glycoprotein 1 is upregulated in pancreatic ductal adenocarcinoma and confers a poor prognosis. *Transl Res.* 2019 Jun 29. pii: S1931-5244(19)30132-X. doi: 10.1016/j.trsl.2019.06.003.
- WDR45 contributes to neurodegeneration through regulation of ER homeostasis and neuronal death. *Autophagy.* 2019 Jun 23;1-17. doi: 10.1080/15548627.2019.1630224.
- Highly Accurate Identification of Cystic Precursor Lesions of Pancreatic Cancer Through Targeted Mass Spectrometry: A Phase II Diagnostic Study. *J Clin Oncol.* 2018 Feb 1;36(4):367-375. doi: 10.1200/JCO.2017.73.7288.
- Proteomic Analysis and Biochemical Correlates of Mitochondrial Dysfunction following Low - Intensity Primary Blast Exposure. *J Neurotrauma.* 2019 May 15;36(10):1591-1605. doi: 10.1089/neu.2018.6114.
- Phosphoproteomic and Functional Analyses Reveal Sperm-specific Protein Changes Downstream of Kappa Opioid Receptor in Human Spermatozoa. *Mol Cell Proteomics.* 2019 Mar 15;18(Suppl 1):S118-S131. doi:10.1074/mcp.RA118.001133.
- Proteogenomics analysis of human colon cancer reveals new therapeutic opportunities. *Cell.* 2019 May 2;177 (4):1035-1049.e19. doi: 10.1016/j.cell.2019.03.030.
- The pivotal role of protein acetylation in linking glucose and fatty acid metabolism to β -cell function. *Cell Death Dis.* 2019 Jan 25;10(2):66. doi: 10.1038/s41419-019-1349-z.
- Disruption of microglia histone acetylation and protein pathways in mice exhibiting inflammation-associated depression-like symptoms. *Psychoneuroendocrinology.* 2018 Nov;97:47-58. doi: 10.1016/j.psyneuen.2018.06.024.
- Time-Resolved Analysis Reveals Rapid Dynamics and Broad Scope of the CBP/p300 Acetylome. *Cell.* 2018 Jun 28;174(1):231-244.e12. doi: 10.1016/j.cell.2018.04.033.
- Global Proteome and Ubiquitinome Changes in the Soluble and Insoluble Fractions of Q175 Huntington Mice Brains. *Mol Cell Proteomics.* 2019 May 28. pii: mcp.RA119.001486. doi: 10.1074/mcp.RA119.001486.
- Quantitative Analysis of Ubiquitinated Proteins in Human Pituitary and Pituitary Adenoma Tissues. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019 May 22;10:328. doi: 10.3389/fendo.2019.00328.
- Mutations in LZTR1 drive human disease by dysregulating RAS ubiquitination. *Science.* 2018 Dec 7;362 (6419):1177-1182. doi: 10.1126/science.aap7607. Epub 2018 Nov 15.
- Serum N-Glycosylation in Parkinson's Disease: A Novel Approach for Potential Alterations. *Molecules.* 2019 Jun 13;24(12). pii: E2220. doi: 10.3390/molecules2412220.
- A Fully Integrated SpinTip-Based Approach for Sensitive and Quantitative Profiling of Region-Resolved in Vivo Brain Glycoproteome. *Anal Chem.* 2019 Jul 16;91(14):9181-9189. doi: 10.1021/acs.analchem.9b01930.

NOTICES FOR SAMPLE COLLECTION 样本收集注意事项



PROTEOMICS
TECHNICAL MANUAL

样品类型	样品量	预处理及保存
细胞类	悬浮细胞 1-10 × 10 ⁷	<p>① 400g-1000g 离心10 分钟收获细胞，弃上清。 ② 用预冷的PBS 小心洗涤片状沉淀物2 次，置于冰上，去上清。 ③ 液氮速冻，-80℃保存。</p> <p>强烈建议客户本地裂解细胞，具体方法：参见上述步骤将细胞用PBS洗涤之后，弃净PBS，根据后续不同的实验方法要求加入相应裂解液重悬片状沉淀物，使得每ml内含有5 × 10⁷ 细胞，-80℃保存。</p>
	贴壁细胞 1-10 × 10 ⁷	<p>① 弃掉培养液，并将培养皿倒置于吸水纸上吸干培养液 ② 加入4℃预冷的PBS，平放轻轻摇动1分钟洗涤细胞，然后弃去PBS。重复以上操作两次以洗去培养液。 ③ 将培养皿置于冰上。向培养皿内加入4℃预冷的PBS。 用干净的细胞刮棒将细胞刮于培养皿的一侧（动作要快），冰上斜置培养皿，使得缓冲液流向一侧。移液管吸取溶解产物至预冷的离心管内。离心去上清。 ④ 液氮速冻，-80℃保存。</p> <p>强烈建议客户本地裂解细胞，具体方法：参见上述步骤将细胞用PBS洗涤之后，弃净PBS，根据后续不同的实验方法要求加入相应裂解液重悬片状沉淀物，使得每ml内含有5 × 10⁷ 细胞，-80℃保存。</p>
动物组织样本	心，肝，脾，肾，肺叶，血管，皮肤等 30mg及以上	<p>① 首先准备好用于包装样本冷冻保存管，并且用油性记号笔在冻存管外表多处写明样本编号。 ② 准确切除所需组织后，立即剔除非研究所需的组织，并将组织分割成小块。 ③ 用镊子夹住样本，放入液氮中冷却样本。 ④ 放入准备好的冷冻保存管中，迅速投入液氮冷却，然后转入-80℃冰箱中保存。 ⑤ 填写样本登记单，写明临床病因及所处阶段，样本名称、组织类型、编号、取样日期、样本处理过程等情况。</p>
	软骨等坚硬组织 200mg及以上	PBS 洗涤，用手术刀将软骨切成1cm ³ 左右的小块。液氮速冻，保存在-80℃。
	毛发等坚韧组织 20mg及以上	用适量2%SDS, 50mM 磷酸钠 (pH7.8) 缓冲液漂洗样品，去除污染物，干燥，保存在-80℃。
软体动物	血吸虫等虫体 25mg及以上	PBS 洗涤去除来自宿主的污染。液氮速冻，保存在-80℃。

样品类型	样品量	预处理及保存
液体类	血清	0.1ml及以上 收集好的全血室温静置两小时，3000g离心10min，取上清，液氮速冻，-80℃保存。
	血浆	0.1ml及以上 收集好的全血加入抗凝剂，室温静止30 分钟，1300g-2000g 离心10min，取上清，液氮速冻，-80℃保存。
	动物乳汁或人乳汁	2ml-50ml 收集乳汁，-80℃保存。若要去除样品中的高丰度酪蛋白，需要超速离心除去。
	乳脂肪球膜蛋白 (MFGM) 即脂质层	2ml-50ml 收集乳汁，4度高速离心15min，取脂质层，用预冷的5倍体积的PBS洗涤3次，纯水洗涤一次，-80℃保存。
	脑脊液、关节液、淋巴液、附睾腔液	0.05ml-5ml 1000g-2000g 离心5min，（或使用0.22 μm 滤膜过滤），取上清，-80℃保存。
	唾液	0.1ml-5ml 禁食两小时以上，9-12am 取样，1000g-2000g 离心5min，（或使用0.22um 滤膜过滤），取上清，-80℃保存。
	泪液	30ul-200ul 收集样品（可利用capillary micropipette 或Schirmer strip），8000-14000g 4度离心5min，取上清，-80℃保存。
	尿液	15ml-50ml 5000 × g 4℃离心30-60min，取上清，-80℃保存。
微生物	常见细菌真菌等 50ul-100ul菌体	3000-5000rpm离心，收集菌体，然后PBS清洗两次，去除剩余培养基，去除PBS后液氮速冻，-80℃保存。
植物组织类	柔软组织（木本植物的叶、花等，草本科植物，藻类，蕨类植物，大型真菌等） 100mg-2g	收集样品，液氮速冻（如果样品表面有泥土或明显污染物，则液氮速冻前用PBS清洗，吸水纸吸去表面液体），保存在-80℃。
	木本科植物的树根、树皮、树枝等 5g-50g	收集样品，液氮速冻（如果样品表面有泥土或明显污染物，则液氮速冻前用PBS清洗，吸水纸吸去表面液体），保存在-80℃。
	果实、种子 0.5g-5g	
	花粉 15mg-200mg	植物开花期收集花粉，解剖显微镜下检查花粉，用解剖针去除花药碎片等杂质，转入EP管中，光学显微镜下检查花粉的形态和纯度。保存于-80℃。
其余特殊类型样本	分泌蛋白 5ml-50ml	10000g-20000g离心30-60min，（或使用0.22um 滤膜过滤），取上清，-80℃保存。
	FFPE 15张（建议采用Label Free技术）	以石腊块形式保存的样本进行常规切片操作。

备注：

- 以上表格中为 TMT 推荐送样量
- Shotgun/Label Free/PRM/DIA 建议送样量：**TMT 的 1/2**
- 磷酸化 TMT 建议送样量：**TMT 的 2 倍**
- N- 糖基化 Label Free 建议送样量：**TMT 的 2 倍**
- 其他修饰蛋白质组学（乙酰化、泛素化）建议送样量：**TMT 的 10 倍**

ADVANTAGES OF PROTEOMIC ANALYSIS 吉凯基因蛋白质组学 分析优势



软硬件先进

配备Q EXACTIVE, Q EXACTIVE PLUS, Q EXACTIVE HF, Q EXACTIVE HF-X, LUMOS等高精度质谱仪，同时还具有性能最强劲的EXPLORIS 480以及TIMSTOF PRO等最新型的高端质谱仪，仪器型号丰富程度，先进程度和维护程度都优于一般单位。同时还配备了PD2.2, MASCOT 2.6, MAXQUANT, SPECTRONAUT PULSAR, PEAKS 等最专业最领先的分析软件。齐全的硬件和软件配套能够满足各种实验需求，提供最可靠的数据。

质控严格

每项技术质量控制点不同，但是都会在相应的报告中标出，并明确给出每次实验质量控制数据的结果。

质控我们是认真的！

专业的实验团队

团队成员经验丰富，能处理几乎所有类型的样本分析。

强大的生信分析团队

除GO,KEGG等常规的分析外，还能进行IPA，趋势聚类，蛋白质相互作用，BIOMARKER筛选等高阶分析；如有更个性化的生信分析需求，也能一对一服务！

