

## 蛋白质组学入门问题 FAQ

常见问题——

### HPLC 篇

#### 1 . HPLC 灵敏度不够的主要原因及解决办法

样品量不足：解决办法为增加样品量

样品未从柱子中流出：可根据样品的化学性质改变流动相或柱子

样品与检测器不匹配：根据样品化学性质调整波长或改换检测器

检测器衰减太多：调整衰减即可。

检测器时间常数太大：解决办法为降低时间参数

检测器池窗污染：解决办法为清洗池窗。

检测池中有气泡：解决办法为排气。

记录仪测压范围不当：调整电压范围即可。

流动相流量不合适：调整流速即可。

检测器与记录仪超出校正曲线：解决办法为检查记录仪与检测器，重作校正曲线。

#### 2 . 做 HPLC 分析时，柱压不稳定，原因何在？如何解决？

原因可能有：

泵内有空气，解决的办法是清除泵内空气，对溶剂进行脱气处理；

比例阀失效，更换比例阀即可。

泵密封垫损坏，更换密封垫即可。

溶剂中的气泡，解决的办法是对溶剂脱气，必要时改变脱气方法；

系统检漏，找出漏点，密封即可。

梯度洗脱，这时压力波动是正常的。

#### 3 . 我购买的 HPLC 柱验收测试时柱压过高，请问为什么？

柱压过高是 HPLC 柱用户最常碰到的问题。其原因有多方面，而且常常并不是柱子本身的问题，您可按下面步骤检查问题的起因。

拆去保护柱，看柱压是否还高，否则是保护柱的问题，若柱压仍高，再检查；

把色谱柱从仪器上取下，看压力是否下降，否则是管路堵塞，需清洗，若压力下降，再检查。

将柱子的进出口反过来接在仪器上，用 10 倍柱体积的流动相冲洗柱子，（此时不要连接检测器，以防固体颗粒进入流动性）。这时，如果柱压仍不下降，再检查；

更换柱子入口筛板，若柱压下降，说明你的溶剂或样品含有颗粒杂质，正是这些杂质将筛板堵塞引起压力上升。若柱压还高，请与厂商联系。一般情况下，在进样器与保护柱之间接一个在线过滤器便可避免柱压过高的问题，SGE 提供的 Rheodyne 7315 型过滤器就是解决这一问题的最佳选择。

#### 4. 液相色谱中峰出现拖尾或出现双峰的原因是什么？

筛板堵塞或柱失效，解决办法是反向冲洗柱子，替换筛板或更换柱子。

存在干扰峰，解决办法为使用较长柱子，改换流动相或更换选择性好的柱子。

#### 双向电泳篇

##### 1. 重泡胀后的胶可以不用转移到另一个电泳槽，直接跑 2D 的一向吗？

一般情况下是可以的。但当上样量特别大时，可能会有一部分蛋白质没有被胶条吸收，这样跑完 1D 和 2D 胶后，会有很多横向条纹。所以在这种情况下，最好在重泡胀后，将胶条转移到另外一个电泳槽中进行电泳。

##### 2. 为什么我在等电聚焦前加的矿物油在聚焦后会减少，暴露出了胶条的背面？

这是因为 BioRad 的电泳槽有个盖子。为了固定电泳槽中的胶条，这个盖子上设计了对应的突起，以便压住胶条。由于虹吸作用，这个突起会导引矿物油到相邻的空电泳槽，从而降低有胶条的电泳槽中的矿物油液面。如果由此把胶条暴露在空气中，那对等电聚焦的影响将是毁灭性的。为了防止这个现象的发生，可以在相邻的空电泳槽里，也加入适量（80 %满）的矿物油。

##### 3. 跑第一向时，为什么要设定一个电流的最大值电压(50 $\mu$ A/ 胶)？

电流的平方和功率成正比。电流增大，功率增大，放出的热量也随之增大，就会导致胶条的温度增加。当温度超过 30 摄氏度时，缓冲液里的尿素就容易解离，产生一些极性分子，从而对等电聚焦产生影响。

4. 跑第一向时，为什么刚开始的电压比较低，而后逐渐增高？

刚开始时，体系内的带电小分子比较多（比如无机盐和双极性分子）。所以在这个阶段，电流主要是由这些小分子的移动所产生的。由于这些分子质量小，移动他们不需要很高的电压。当这些小分子移动到他们的目的地时（无机盐移动到极性相反的电极；两性分子移动到对应的 pH 条带），体系内的蛋白质才开始肩负起运载电流的任务，逐渐向所对应的 pH 区域移动。

5. 跑第一向时，为什么会产生一条蓝色的条带，并逐渐向酸性端移动？

蓝色条带是缓冲液中痕量的溴酚蓝被聚焦所产生的。溴酚蓝也是 pH 指示剂，当它移动到酸性区时（pH4），颜色会变成黄色。溴酚蓝的这个移动过程大体上发生在极性小分子的聚焦之后，蛋白质大分子聚焦之前。

6. 跑第一向时，为什么电压总达不到预定值？

当上样量比较大时或体系内盐分比较多时，聚焦的电压有可能达不到所设定的数值。

7. 跑第一向时，在电压达到预定值后，电流为什么会降低？

当上样量比较少时，所有蛋白在较短的时间内就移动到所对应的 pH 值区域值，从而变成中性分子。这样，体系的电阻越来越大，在恒定的电压下，电流就会越来越小。

8. 跑第一向时，为什么在两个电极丝附近有气泡产生？

等电聚焦完成后，所有的蛋白质都移动到了相应的 pI 值区域，而成为中心分子。这是加在体系上的电压就开始电解水分子，在阳极产生氧气，在阴极产生氢气。

9. 重泡胀缓冲液(rehydration buffer)中的硫脲的作用是什么，双极性分子的作用是什么？

硫脲的作用是增加蛋白质的溶解性，特别是碱性蛋白的溶解性。双极性分子的作用也是增加蛋白质的溶解性。当蛋白移动到相应的 pH 值后，就变成了中性分

子。而不带电荷的蛋白质分子容易聚集，从而降低其在随后的二向胶时的迁移效率，可能会造成竖的脱尾。而硫脲和双极性小分子则会鉴定中性蛋白质之间的相互作用，防止它们的聚集。

#### 10. 怎样估计 2D 胶上蛋白质点的分子量和 pI 值？

可以用 BioRad 生产的 2D 胶标准蛋白来校准。也可以用体系内已知蛋白来做比对。

#### 11. 为什么 2D 胶上的蛋白点有横的和竖的脱尾？

横的脱尾可能是：1 ) 一向等电聚焦不完全；2 ) 某些蛋白质本身的原因（糖蛋白）；3 ) 蛋白的丰度太高。竖的脱尾是因为跑二向时，蛋白的溶解度不好。

#### 12. 什么成分会影响 2D 胶的效果？

核酸，盐，去垢剂等等。

#### 13. 2D 胶的上样量应该在什么范围？

上样量和样品有关。样品内蛋白种类多的上样量要大些，这样每个点才有足够的量被检测到。一般的全细胞裂解体系，上样量大概在 100 微克（银染）到 500 微克（考染）之间。

#### 14. 我的蛋白质浓度很低，应该用什么方法来浓缩？

蛋白质的浓缩有很多方法。大致有超滤法，沉淀法和透析法。超滤比较温和，对蛋白质不会有修饰和改变，蛋白的种类一般不会有丢失。它的缺点是总样品的量可能会减少（被膜所吸附）。另外超滤对样品的要求比较高。甘油，去垢剂都会堵塞滤膜，影响超滤的效果。沉淀法比较快速，容易操作，对盐，甘油，去垢剂的耐受性好。缺点是可能会有部分种类的蛋白没有被沉淀下来（丢失）。沉淀法中，又以 TCA 法最为普遍使用。使用 TCA 法时，一定要用冷的纯丙酮清洗蛋白沉淀两次，去处残留的 TCA 和其他沉淀下来的杂质。透析法只使用于量比较大的样品，量小时，操作困难。透析法可以和超滤法联用。先把样品透析到一

个比较干净的环境（不含盐，甘油，去垢剂或其它杂质，比如碳酸氢氨溶液），然后再进行超滤。

### 酶解篇

#### 1. 用 Trypsin 酶解蛋白质时，碳酸氢氨的浓度应该是多少？

酶解时碳酸氢氨的浓度一般在 10 ~ 50 mM 之间。碳酸氢氨的作用主要是提供一个碱性的水解环境，因为 Trypsin 的活力在 pH8 ~ 9 之间最高。最常用的碳酸氢氨浓度有 20 mM ， 40 mM 。盐浓度过大时，后续的冻干过程中会有较多的盐析出；盐浓度过小时，则不能有效的提供碱性 pH 的水解环境（尤其是在样品的 pH 值低，而且体积大时）。为了确定酶解体系的 pH 值，可以用

#### 2. Trypsin 储存液的作用是什么？

Trypsin 在 pH8 ~ 9 活力最高，所以为了防止酶的自水解，Trypsin 母液要处于一个酸性的环境里以便长期保存。Trypsin 储存液的 pH 大约是 5.3 ，是用来稀释母液用的。如果所需的酶量较大，可以直接用碳酸氢氨溶液来稀释母液。如果酶解的样品少，可以用储存液来稀释，这样剩余的酶液可以在 -800C 保存到下次使用。

#### 3. Roche 的酶和 Promega 的酶，那个更好？

Roche 的酶有自降解，而 Promega 的酶基本上没有自降解。由于酶的自降解峰可以用来做很好的内标，所以一定限度的酶自降解对 MALDI 数据的校准很有帮助。

#### 4. 什么情况下需要用 Ziptip 来处理样品？

当样品含有大量的盐时，需要用 Ziptip 来除盐；当样品量很少，但体积比较大时（20 微升以上）时，需要用 Ziptip 来浓缩。如果样品中有甘油， SDS ，或其他杂质时，Ziptip 的使用要格外当心，在这种情况下，Ziptip 的填料容易被杂质堵塞；另外 Ziptip 使用不当时，样品会有损失。所以当样品比较珍贵（的来不易）时，最好先用其他样品做预实验，摸顺条件后，再作真正的样品。

### MALDI 篇

### 1. 怎样邮寄我的样品？

冻干的胶或干粉可以直接邮寄。切胶后的湿胶（不用做任何处理），放在 EP 管中（不加任何缓冲液）；用干冰速冻；邮寄时，置样品于足够的干冰中。液体样品的邮寄方式同湿胶一样。

### 2. 为什么要使用内标？

用内标做校准可以大大减少 MALDI-MS 的误差（ $<70\text{ppm}$ ），从而提高查库结果和可靠性。好的内标肽段需要有以下的要求：最好有两个肽（两点一线）；质量不要在大多数的肽段范围内（ $1200 \sim 2500 \text{ Da}$ ）；内标的量要与样品的量成比例；内标对其他肽段离子化的抑止要小。我们实验室使用的内标是  $25\text{fmol}$  的——和——。不过，一般情况下，使用外标做校准也可以达到比较满意的数据（ $<150\text{ppm}$ ）。所以，顾客可以根据自己的需要来选择是否使用内标。

### 3. 我为什么还要提供正负空白胶正对照提供 (exact) 对照两块胶？

正负对照的两块胶是用来对整个鉴定过程做质量控制的。负对照（空白胶）主要是看样品是否有污染（比如角蛋白的污染）；正对照（已知胶，如同一块胶上的标准蛋白）主要是检测酶解和质谱的效果是否正常。如果客户不能提供正负对照，我们可以使用自己预先准备的胶条。如果顾客的样品量大（ $>10$  个 2D 胶上的点），则顾客必须提供正负对照。

### 4. 对于胶上蛋白质的鉴定，我应该提供多少蛋白质？

一般情况下，考染能看得见的点都有机会鉴定出来。分子量在 2 — 5 万之间的蛋白质，鉴定成功率一般比较大。分子量小的蛋白酶切位点少，合适的肽段（ $1000 \sim 3000 \text{ Da}$ ）就少，所以鉴定的成功率相对较低。而分子量太大的蛋白质，在同等质量的情况下，蛋白的摩尔数（ $\text{pmol}$ ）较少；而且查库时匹配肽段的覆盖率会比较低（因为整个蛋白质较大），从而影响鉴定的成功率。

### 5. 为什么我的 MALDI 图谱中都是相差 $44\text{Da}$ 的峰，肽段的峰则全被抑制了？

相差  $44\text{Da}$  的峰可能是 Triton X 峰，也可能是 polymer（ $-\text{CH}_2\text{CHOH}-$ ）峰。

这些 polymer 是从 EP 管的内壁沥滤 ( leaching ) 出来的。所以 样品中不能含有 Triton X 。 另外实验中不能使用加有可塑剂 ( plasticizer ) 或塑料软化剂的离心管 ( 比如 PCR 管 ) 来装取样品。最好是使用进口 EP 管。另外, 可以用 60 % 的乙腈 / 0.1% TFA 去清洗 EP 管的内壁以防沥滤。清洗后, 要等到残留液都挥发 ( air dry or speed vac ) 后再装样品。 此过程中要注意不让杂质灰尘落入管内。 另外, 试验操作过程中所佩戴的塑胶手套也可能有可塑剂。所以一定要佩戴无尘的手套。每次用手打开或触摸盛有样品的 EP 管时, 一定注意不要碰到 EP 管盖的内壁。开盖时, 可以使用 Eppendorf 枪上的金属拉杆 ( 动作如开啤酒瓶盖儿 )。从冻干机中取出 EP 管时, 最好拿在盖子和管子的连接部分或盖子的突出部分。胶的染色和脱色中, 尽量不要触摸胶 ( 即便是带了手套 )。可以用厨房用的铲子 ( 带镂空的那种, 超市里有卖 ) 来操作。

## 6 . 各种去垢剂对 MALDI 有何影响?

离子型去垢剂对 MALDI 的影响要比非离子型去垢剂大。去垢剂浓度越高, 影响越大。

在浓度为 1.0% (w/v) 时 : 除了一些糖类的非离子型去垢剂, 大部分去垢剂会把蛋白质的信号减低 10 倍。

At 0.01% detergent concentration (w/v): 只有 SDS 和牛磺胆酸影响信号。但它们会使信号减低超过 20 倍。

在浓度为 0.1% (w/v) 时 : 不同的去垢剂对信号的影响差别比较大。具体效果见下表。信号指有去垢剂时的信号和无去垢剂时的信号之比。

参考文献: Vorm, Ole, Brian T. Chait and Peter Roepstorff, Mass Spectrometry of Protein Samples Containing Detergents , 41th ASMS Conference Proceedings, (1994) 621a-621b.

## 7 . 为什么我的 MALDI 图谱中都是相差 111Da 的峰?

有可能样品在超虑时接触了聚砜树脂 ( polysulfone ) 的膜。 Polysulfone 有四

个峰。各个系列的峰之间相差 111Da 。

#### 8. 怎样避免角蛋白的污染？

常见的角蛋白有四种，主要是从皮肤屑（直接接触）和头皮屑（空气传播）中来的。质谱中检测到的角蛋白峰应该是在酶解前就进入样品中来的（主要是在染胶，脱色，切胶和加酶这四步）。试验中一定要佩戴手套；一定要仔细清洗染胶的容器（先用 70 %酒精洗，再用去离子水洗）；切胶要戴口罩，并在通风橱中进行。另外，从来源于实验操作人员穿着的毛衣中的羊的角蛋白也被检测到过，所以试验中要穿试验服。

#### 9 . MALDI 检测时，有那些常见的角蛋白峰？

质谱中常见的角蛋白峰有：

1319.575, 1349.679, 1474.741, 1474.777, 1656.785, 1706.742, 1715.843, 1739.697, 1790.719, 1838.984, 1889.849, 1992.969, 2090.874, 2285.116, 2382.943, 2399.203, 2500.059, 2509.123, 2650.381, 2704.152, 2830.185, 3222.272, 3223.368, 3311.299

其中最常见，强度又高的有（按强度排列）：

1. 2382.9
2. 1706.7
3. 2704.1
4. 3311.3

这些数据是从多次实验中总结得来的，实验条件不同，可能会得到不同的结果。

#### 10. 单一同位素肽段质量（monoisotopic peptide mass）和平均同位素肽段质量（average peptide mass）有什么不同？

组成蛋白质的原子在自然界中存在着不同比例的同位素（见下表）。所以含有这些同位素原子的肽段的质量比不含任何同位素的肽段的质量要大。不含任何同位素的肽段的质量叫单一同位素肽段质量；同一种肽段所有的同位素形式（包括含

同位素的，也包括不含同位素的) 的质量的平均数叫平均同位素肽段质量。

#### 11. 怎样在质谱的图谱上确定单一同位素峰和平均同位素峰?

在分辨率低的质谱图谱上，所显示的峰一般是平均同位素峰。但目前常用的质谱方法（比如 MALDI-TOF）分辨率一般都很高，一般的小分子（比如肽段）常含有 4 到 5 个同位素峰，其中分子量最小的那个就是单一同位素峰。但是，当用质谱检测大分子（比如完整蛋白质）时，同位素峰的数目很多，难以在图谱上区分。在这种情况下，使用平均同位素质量会比较更有意义。

#### 12. 同位素峰之间一定是相差 1 Da 吗?

同位素肽段的质量 ( $m$ ) 一般是相差 1 Da，但因为质谱检测到的峰是肽段的质荷比 ( $m/z$ )，而不是质量本身，所以在肽段带有多个电荷的情况下，其质荷比相差要小于 1。如果检测到的肽段带一个电荷，那同位素峰之间是相差 1；如果检测到的肽段带两个电荷，那同位素峰之间便相差 0.5；如果检测到的肽段带三个电荷，那同位素峰之间便差 0.33；以此类推。所以从同位素峰之间的间距，可以推断出肽段的带电情况 ( $z$ )，从而推断出肽段的单一同位素质量  $[(m/z)*z]$ 。

#### 13. 哪种离子化方式产生的肽段易带多个电荷?

在蛋白质组学所涉及的质谱技术中，常见的离子化方式有 MALDI 和 ESI。目前，对这两种方法的原理和离子化的具体细节还没有一个公认的阐述。但经验表明，MALDI 所产生的离子化肽段只带一个电荷（正离子方式）。而 ESI 所产生的离子化肽段往往带有多个电荷。

#### 14. 单一同位素峰一定是最高的峰吗?

单一同位素峰一定是一组峰里面质荷比最低的，但不一定是最高的。当肽段的分子量较小时，其所含的原子总数也少，所以整个肽段含有同位素原子的几率也比较小。这时，单一同位素峰往往是最高峰。当肽段的分子量增大时，其带有同位素原子的几率也随之增大。在这种情况下，+ 1 Da，甚至 + 2 Da 的同位素

峰有可能成为最高峰。统计表明，当肽段的分子量超过 2500 Da 时，最高峰往往不是单一同位素峰。

#### 15. 单一同位素峰的鉴定有什么意义？

单一同位素峰的鉴定对后续的查库工作有重要意义。质谱法鉴定蛋白质一般是把得到的质核比数据和数据库里的数据比对。所以，如果所采集的数据里混有不是单一同位素峰的质量，那么就有可能在查库时找不到目标蛋白质，或是找到其他的蛋白质，从而严重影响比对的效率和真实性。

#### 16 . 氨基酸有那些常见的修饰？各种修饰对分子量的改变是多少？

氨基酸常见的修饰。氨基酸所有的修饰.

蛋白质组相关设备及试剂:

##### [色谱系统](#)

[液相 HPLC 系统](#) | [毛细管 LC 系统](#) | [气相色谱系统](#) |

[自动固相萃取系统](#) | [联用色谱系统](#) | [更多...](#)

##### [质谱系统](#)

[飞行质谱](#) | [四极杆质谱](#) | [离子阱质谱](#) | [等离子质谱](#) |

[磁质谱](#) | [液质联用系统](#) | [气质联用系统](#) | [更多...](#)

##### [基因组/蛋白组设备](#)

[DNA 测序仪](#) | [基因分型系统](#) | [双向电泳系统](#) |

[蛋白质分析系统](#) | [蛋白质斑点切取系统](#) | [更多](#)

##### [蛋白纯化](#)

[蛋白提取](#) | [蛋白透析](#) | [蛋白定量](#) | [蛋白稳定](#) | [蛋白纯化](#) | [蛋白浓缩](#) | [蛋白体分离](#) | [亲和标记纯化](#) | [融合标记移除](#) | [病毒移除](#) | [脂移除](#) | [分馏试剂盒](#) | [更多...](#)

##### [蛋白分析](#)

[PAGE 凝胶制备](#) | [蛋白电泳试剂](#) | [预制蛋白凝胶](#) |

[蛋白标准品](#) | [蛋白凝胶染色](#) | [蛋白检测试剂盒](#) | [更多...](#)