**On-bead-digestion质谱前处理及数据分析**

**一、溶液配置**

1. **50 mM NH4HCO3溶液**：浓度为3.548 mg/mL，使用ddH2O进行溶解。
2. **10 mM DTT溶液（二硫苏糖醇）**：浓度为1.5425 mg/mL，使用50 mM NH4HCO3溶液溶解。
3. **25 mM IAM溶液（碘乙酰胺）**：浓度为4.62mg/ml，使用50mM NH4HCO3溶解，避光，现配现用。
4. **Trypsin酶液（质谱级）：**按照说明书将酶液配置为0.2 mg/mL，储存于-80℃。
5. **0.1%FA：**0.1%甲酸水，使用ddH2O将甲酸稀释至浓度为0.1%。

**二、操作步骤**

1. SPIDER清洗完成后，室温，500 ×*g*离心5 min，去上清。向管中加入1 mL 50 mM NH4HCO3，室温旋转洗涤10 min。同条件离心去上清。
2. 加入1 mL 10 mM DTT溶液，37 ℃旋转孵育1 h。同条件离心去上清。
3. 加入1 mL 25 mM IAM溶液（现配现用），避光室温旋转孵育15 min。同条件离心去上清。
4. 加入500 μL的50 mM NH4HCO3溶液，室温旋转孵育15 min。同条件离心去上清。
5. 向EP管中加入500 μL的50 m NH4HCO3溶液，以及10 μL Trypsin酶液（质谱级），即总量为2 μg。
6. 37℃旋转孵育过夜（16 h）。
7. 预热真空旋转干燥仪。
8. 将EP管12000 ×*g*离心5 min，取上清，转入新的EP管中，暂存于4℃。
9. 向EP管中再次加入200 μL的50 mM NH4HCO3溶液，室温旋转洗涤20 min。
10. 将EP管12000 ×*g*离心5 min，取上清，与先前取出的上清混合。
11. 55℃，真空旋转干燥1 h，观察是否完全干燥，若未干燥则继续进行干燥直至完全干燥。
12. 干燥后的样品中添加100 μL的0.1%甲酸水(0.1%FA),于震荡混合仪上震荡5-10min，充分溶解沉淀。
13. 使用C18 Tips脱盐，收集肽段溶液，旋干。
14. 向管中加入11 μL的0.1%甲酸水，涡旋震荡10 min使得肽段充分溶解。瞬时离心，使得液体沉于管底。
15. 取1 μL样本溶液，使用nanodrop，对样品的蛋白浓度进行测定。通常，样品浓度在0.1 ng/μL以上。
16. 将剩余样品取5 μL加入内插管底部，注意不要留有空气或气泡。将内插管插入进样瓶中，盖上盖子。
17. 放置于4℃或直接放进仪器上样。

**三、质谱检测**

1、质谱检测方法：首先使用A溶液（含有0.1%甲酸与2%乙腈）将肽段溶解，并使用C18反相色谱柱将肽段分离，使用梯度洗脱，梯度为5%-80%溶液B（含有0.1%甲酸与90%乙腈）。使用高碰撞解离技术将强度为5,000以上离子分离并连续破碎，并检测完整肽段（荷质比为300-1400）。

2、质谱结果筛选：根据 Ratio、Unique peptide、污染蛋白三个指标进行初步筛

选，一般认为 Ratio ≥ 1.5（也可提高）、Unique peptide > 1、污染蛋白（数 据库：CRAPOME）去除排名前20%的质谱常见污染蛋白为显著差异的蛋白。