

# 药物化学生物学国家重点实验室质谱平台

## 开放共享管理办法（160520 试行）

药物化学生物学国家重点实验室质谱平台现向全校各实验室和研究中心提供质谱分析服务。开放仪器有：Thermo EASY-nLC1000 - Orbitrap Fusion、Waters UPLC I-class - SYNAPT G2-Si HDMS 液相色谱/质谱联用系统。目前平台只接收送样测试，采用送样登记的方式，待网络系统完善后将通过登陆南开大学大型仪器平台管理系统进行预约。以下测试价格为试运行价格，开放后会根据全成本核算进行调整，如需平台提供色谱柱、离心管等耗材，测试费用在此价格基础上乘以 1.5。

### 一、LTQ-Orbitrap Fusion 质谱系列药物化学生物学国家重点实验室服务项目及收费指南

检测仪器	检测项目	国家重点实验室成员价格（元/样品）	校内价格（元/样品）	校外价格(元/样品)	说明
LTQ-Orbitrap Fusion Mass Spectrometer	MS	400	800	1600	1. 提供分析条件 2. 分析时间≤60 min, 分析时间延长 1 小时，测试费国重内用户加收 100，其它用户加收 200
	MS/MS	600	1200	2400	
	多肽分离、分析	400	800	1600	
	简单蛋白鉴定（上机 1h）	500	1000	2000	3. 同一样品两个离子模式价格按 2 倍计算 4. 测试不包括样品前处理及软件分析工作 5. 方法开发价格待定
	复杂蛋白鉴定（上机 ≥2h）	600	1200	2400	不包括上机前处理
	蛋白翻译后修饰	500	1000	2000	不包括上机前处理
	N 端和 C 端序列分析	600	1200	2400	不包括上机前处理

	稳重同位素定量蛋白质组学	胶内	暂不接受组学送样			
		溶液				
	一级质谱图	200	400	800	提供发表文章所需的准确分子量的一级质谱图	
	二级质谱图	300	600	1200	按发表文章要求标注b、y离子提供二级质谱图	
	代谢组学、脂质组学	暂不接受组学送样				

## 二、SYNAPT G2-Si 质谱系列药物化学生物学国家重点实验室质谱服务项目及收费指南

### 1. 色谱质谱联用系统收费标准

仪器类型	检测项目	国重成员价格 (元/样品)	校内价格 (元/样品)	校外价格 (元/样品)	说明
UPLC-I-class-SYNAPT G2-Si	MS	300	600	1200	1. 单个离子模式 2. 提供分析条件 3. 分析时间≤60 min,分析时间延长1小时,测试费国重内用户加收100,其它用户加收200 4. 同一样品两个离子模式价格按2倍计算 5. 采集淌度数据每样加收100元 6. 测试不包括样品前处理及软件分析工作
	MS/MS	500	1000	2000	1. 单个离子模式 2. 与UPLC-MS液相分析

					条件一致，分析时间≤60 min,分析时间延长 1 小时，测试费国重内用户加收 100，其它用户加收 200 3. 同一样品两个离子模式价格按 2 倍计算 4. 采集淌度数据每样加收 100 元 5. 测试不包括样品前处理及软件分析工作
	蛋白酶解肽段样品定性分析	500	1000	2000	1. 提供色谱柱 2. 120 min 以内分析时间 3. 分析时间延长 1 小时，测试费国重内用户加收 100 元，校外用户加收 200 元 4. 测试不包括样品前处理及软件分析工作
	定量方法开发(自备标准品)	400	800	1600	按照样品数计算
	代谢组学				暂不接受组学送样

## 2、液相色谱（UPLC I-class）收费标准

仪器类型	检测项目	国家重点实验室成员价格(样品/元)	校内价格(样品/元)	校外价格(样品/元)	说明
UPLC	样品检测	200	400	800	需提供参考分析方法
	建立色谱方法	400	800	1600	1. 需提供参考方法(国标或文献) 2. 样品≤5 个峰
	建立标准曲线	75/点	500/标曲	100/标曲	1. 标准曲线至少 5 个点 2. 用户需自行配置标准溶液

## 三、药物化学生物学国家重点实验室质谱平台其他收费项目

项目	国家重点实验室成	校内价格(元/样品)	校外价格(元/样品)	说明
----	----------	------------	------------	----

	员价格(元/样品)			
样品瓶	5.0/样	7.0/样	14.0/样	1. 包括样品瓶+300 $\mu$ l 玻璃内插管+盖子 2. 可自备
数据处理(自主操作)	50/样	70/样	140/样	1. 指用 MaxQunant 1.5.2.8、Proteome Discover 1.4、Pinpoint、Discoverer1.4SP1、Metablynx、PLGS、QIP、软件的高级数据处理
数据处理(工作人员辅助)	100/样	150/样	300/样	指用 MaxQunant 1.5.2.8、Proteome Discover 1.4、Pinpoint、Discoverer1.4SP1、Metablynx、PLGS、QIP、软件的高级数据处理 1. 工作人员辅助、辅导数据处理工作, 需客户自明分析目的、提供必需判断条件等必要信息 2. 数据分析不包括质谱图解析、化合物结构判断等质谱分析、统计分析及化合物鉴定等

1、以上仪器检测样品价格不包含预柱、色谱柱、样品瓶、枪头、EP管等耗材, 请自备, 但所有耗材价格必需符合质谱平台要求。如需平台提供以上耗材, 测试价格为在此基础上乘 1.5。

2、NanoACQUITY UPLC-SYNAPT G2-Si 及 I-Class-SYNAPT G2-Si 离子源及色谱柱切换过于频繁对仪器损耗较大, 故不同时开放, 暂定先开放 I-Class-SYNAPT G2-Si, 开放 NanoACQUITY UPLC-SYNAPT G2-Si 时间另行通知。

#### 四、南开大学药物化学生物学国家重点实验室质谱平台送样要求

请认真阅读以下条款, 因样品预处理不当或提供信息错误造成仪器故障, 暂停该课题组测试机时一个月, 并需承担相应维修或赔偿责任。

1. 请认真填写“质谱分析服务单”包括: 送样单位、联系人、联系电话、送样日期、样品保存条件和是否回收等测试要求。
2. 送样时请置于自封袋内, 并附纸质说明注有样品、送样人、送样时间等信息, 写清楚检测要求。如有特殊要求, 应提供相关检测标准及具体实验条件。

3. 尽可能提供样品名称、分子式、结构式、分子量、含量等信息。
4. 不稳定样品接收粉末，其它样品接收溶液。未配成溶液样品请注明溶剂，已配成溶液样品请标明浓度。
5. 样品需澄清，不得有显著杂质，对于有沉淀或不溶物存在的样品不予测试。
6. 样品溶液**严禁含有难挥发性盐类**，如磷酸盐、硫酸盐等；挥发性无机盐<20mM。
- 7 样品中**严禁含有表面活性剂**一类的物质。
8. 样品中**严禁含有无机或有机强酸、强碱**。
9. 所送样品**浓度不超过 1mg/mL，体积不超过 1mL**，在此基础上样品浓度应尽可能稀，以免浓度太大污染离子源或降低检测器灵敏度。
10. 样品粘度不能过大，一般采用水、甲醇、乙腈溶解，并预先经 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤或离心处理。**试剂必须用质谱纯试剂**。
11. 样品制备过程中所使用的耗材如手套、离心管、枪头，超滤管、离心管等均应为进口产品，防止引入聚合物干扰样品测定。
13. **易燃、易爆、毒害、腐蚀性样品必须注明**。
14. **测试完成时间**：一般为 1 周内；对于疑难样品，在 1 周内试测 2 次不能获得满意结果者，需经用户同意再继续分析；遇仪器发生故障，时间推后。
15. 由于条件有限，**质谱平台不存留样品，测试结束后请将样品自行取回**。

## 五、样品前处理参考方案

### (一)、Gel-free 蛋白酶解样品制备参考

1. 向蛋白质样本中加入 8M 尿素至终体积 100ul，室温 1h
2. 加入 DTT 至终浓度为 10mM，37 度反应 2.5h
3. 样本冷却至室温后，加入 IAA 至终浓度为 50mM，室温避光反应 40min
4. 将蛋白样本转移至 10K 超滤膜（centrifugal filter units, millipore）上，20 度，10000g 离心至液体全部滤除（滤膜需事先加入 200ul 水，10000g 离心至水全部滤过）
5. 向超滤膜上加入 200ul 8M 尿素，20 度，10000g 离心至液体全部滤除，重复一次（如果样本中无 SDS，省略此步）
6. 向滤膜上加入 200ul 50mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>，20 度，10000g 离心至液体全部滤除，重复一次

7. 将滤芯转移至新的超滤管中，向滤膜上加入 150ul 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$
8. 按照 1:50 质量比加入胰蛋白酶，37 度，16h
9. 10000g, 4 度离心 30min 收集滤液，冻干，-80 度保存。
10. 进样前溶解，经除盐枪头 (ziptip, millipore) 除盐，进样

### (二)、蛋白胶内酶切操作参考

整个过程佩戴干净乳胶手套，口罩，防止角蛋白污染。

1. 切下目标条带或将条带分成若干组分 (条带宽度约为 2mm 左右)，置于 500ul EP 管中；
2. 每管加入脱色液 500ul 震荡，视情况更换脱色液至脱色完全 (如颜色较深可加热 37 度)，用台式真空泵吸去上清液；
3. 干胶：加 100%乙腈(ACN)振荡脱水至胶粒变白，吸去液体，真空干燥 5min。
4. 加 10mM DTT/25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (1M 母液以 25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  稀释) 淹没胶块，振荡混匀至胶块泡胀透明。56℃ 1h。
5. 冷却至室温，吸干，快速加 55mM 碘代乙酰胺 (IAA) /25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  淹没胶块，振荡混匀。(快速，避光) 暗处放置 45min。
6. 25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  洗两次，移去液体，100%乙腈 ACN 脱水至胶粒变白。真空干燥 5min。
7. 每管加入 50mM 碳酸氢铵溶液 20ul，再加入 1-2ul 胰酶 (或者将两者混合后再加入样品中，淹没胶条)，将凝胶挤碎，37 度温育 6 小时以上；、；
8. 每管加入 200ul (含 0.1%FA) 乙腈震荡 5 分钟，吸取上清液至干净的 EP 管中；
9. 凝胶中再加入 30ul 0.1%FA 质谱水，震荡 5 分钟，再加入 200ul 100% (含 0.1%FA) 乙腈震荡 5 分钟，吸取上清将上清合并；
10. 45 度真空旋干；
11. 1L 脱色液配制方法：质谱级甲醇 400ml，质谱级水 600ml，3.96g 碳酸氢铵混合

### (三)、试剂配制

- 1) 100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ：称取 1.581g  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ (MW 79.06)溶于 200ml 屈臣氏纯净水中

- 2) 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ : 称取 0.791g  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶于 200ml 屈臣氏纯净水中
- 3) 100mM DTT: 称取 DTT(MW 154.3)0.0154g 溶于 1ml 100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液中
- 4) 200mM IAA: 称取 IAA(MW 185.0)0.0370g 溶于 1ml 100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液中
- 5) Trypsin 为 Promega 公司提供
- 6) 30mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ : 称取  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (MW 329.25)0.0099g 溶于 1ml 屈臣氏纯净水中
- 7) 100mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ : 称取  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (MW 248.11)0.0248g 溶于 1ml 屈臣氏纯净水中

银染脱色液: 将 6)和 7)以 1:1 体积混合, 现配。

#### (四)、有效建议

为取得高质量的质谱图, 多肽和蛋白质样品应避免含氯化钠、氯化钙、磷酸氢钾、三硝基甲苯、二甲亚砷、尿素、甘油、吐温、十二烷基硫酸钠等。如果被测样品在预处理过程中不能避免使用上述试剂, 则必须用透析法和高效液相色谱法对样品进行纯化。水、碳酸氢铵、醋酸铵、甲酸铵、乙腈、三氟乙酸等都是用于纯化样品的合适试剂。蛋白质样品纯化后, 应尽可能冻干。样品中的盐可通过离子交换法去除。