

极性代谢物提取方案

哺乳动物细胞和细菌细胞 (5X10⁶个细胞/样)

- 1、向样品中加入1mL MeOH: ACN: H₂O (2: 2: 1, v/v) 混合溶剂;
 - 2、涡旋30 s, 超声处理10分钟 (4°C 水浴);
 - 3、在液氮中淬灭1分钟, 室温融化, 超声处理10分钟 (可选: 在4°C 水浴中超声), 重复3次;
 - 4、在-20°C 孵育2-4小时 (提高蛋白质沉淀效率);
 - 5、4°C, 13000rpm, 离心15分钟;
 - 6、取上清液, 旋转蒸发干燥或氮吹干燥;
 - 7、100μL ACN: H₂O (1: 1, v/v) 复溶干燥的沉淀;
 - 8、涡旋30秒, 超声处理10分钟 (可选: 在4°C 水浴中超声);
 - 9、4°C, 13000rpm 离心15分钟, 转移上清到新的EP管中;
 - 10、LCMS上机分析, 如果不能及时上机, 可在步骤7停止, 冻存在-20°C 或-80°C。
-

血浆或血清 (100ul/样)

- 1、将400 uL的MeOH / ACN (1: 1, v/v) 溶剂混合物添加到100uL血浆或血清样品中 (保持2: 2: 1的比例, 不添加H₂O);
- 2、涡旋30 s;
- 3、超声处理10分钟 (可选: 在4°C 水浴中超声);
- 4、在-20°C 孵育2-4小时 (提高蛋白质沉淀效率);
- 5、4°C, 13000rpm, 离心15分钟;
- 6、取上清液, 旋转蒸发干燥或氮吹干燥;
- 7、400μL ACN: H₂O (1: 1, v/v) 复溶干燥的沉淀;
- 8、涡旋30秒, 超声处理10分钟 (可选: 在4°C 水浴中超声);
- 9、4°C, 13000rpm 离心15分钟, 转移上清到新的EP管中。

10、LCMS上机分析，如果不能及时上机，可在步骤7停止，冻存在-20℃或-80℃。

提示：

- 冻存的血浆/血清样品，在提取之前建议放置在4℃或冰水浴中缓慢解冻。
- 80%的有机溶剂可以沉降血浆或血清中大部分蛋白，但仍然有一些肽或小蛋白质将被提取。

尿样

一般来说，没有必要提取；离心或MWCO过滤器去除颗粒（或蛋白质）；然后用水稀释至1: 1或1: 3 (v / v) 。

提示：

- 如果来自肾脏疾病患者的尿液样本，尿液中可能含有较多的蛋白质；需要提取。提取方法类似于血浆样品。
- 尿液样品（例如肌酐）的标准化。

动物组织

- 1、20 mg组织中加入200 ul H₂O，匀浆；添加800 uL MeOH / ACN (1: 1, v / v) 溶剂混合物；
- 2、涡旋30 s，
- 3、超声处理10分钟（可选：在4° C水浴中超声）；
- 4、液氮淬灭1分钟；室温下融化；超声处理10分钟（可选：在4℃水浴中超声），重复3次；
- 5、在-20℃孵育2-4小时（提高蛋白质沉淀效率）；
- 6、4℃，13000rpm，离心15分钟；
- 7、取上清液，旋转蒸发干燥或氮吹干燥；
- 8、400μL ACN: H₂O (1: 1, v / v) 复溶干燥沉淀；
- 9、涡旋30秒，超声处理10分钟（可选：在4℃水浴中超声）；
- 10、0.22um的有机滤膜过滤复溶液；
- 11、4℃，13000rpm离心15分钟，转移上清到新的EP管中。
- 12、LCMS上机分析，如果不能及时上机，可在步骤7停止，冻存在-20℃或-80℃。

提示：

- 在干冰上切下组织以保持组织冷冻;
- 如果没有匀浆器,将组织切成尽可能小的碎片;
- 使用手持匀浆器时避免交叉污染;
- 大多数塑料均匀浆器都可被有机溶剂污染,因此用H₂O作为匀浆溶剂。

致谢:提取方法,参考来源于中科院上海有机化学研究所朱正江实验室