

Cyclic IMS在纳升级蛋白质组学实验中的定性和定量性能

Chris Hughes, Lee A. Gethings, Robert S. Plumb

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

介绍了Cyclic IMS在定性发现和定量蛋白质组学实验中的性能特点。所有实验都由单圈环形离子淌度装置组成，并将电喷雾离子源与纳升级LC入口联用。

所示发现实验的结果基于对标准细胞裂解物样品（包括大肠杆菌和人K562）的分析，而对于动态范围/定量实验，我们使用定性鉴定得到的处理后数据以及包含和不含复杂背景基质的肽混标。与之前的QToF质谱仪(MS)相比，结果凸显出性能提升。

优势

- 离子淌度分辨率
- 质量分辨率提高
- 比之前的QToF质谱仪相比，定性/定量性能有所提升

简介

四极杆飞行时间(QToF)质谱仪是一种成熟的工具，同时适用于发现和定量蛋白质组学实验。这些仪器表现出良好的灵敏度、速度和高质量分辨率，它们都是成功分析棘手样品所需的重要特性。SELECT SERIES Cyclic IMS是QToF系列仪器的新成员，与之前的QToF平台相比，提供了更高的灵敏度、离子淌度分辨率和质量分辨率¹。此外，Cyclic IMS仪器采用了双增益检测系统，由于具有不同的检测器特性而表现出更宽动态范围。

在经典的蛋白质组学实验中，样品量往往有限，并且需要将MS离子源与纳升级色谱入口联用。这种做法提供了一个强大组合，能够生成高质量、信息量丰富的数据集，然后处理这些数据集以同时提供有关定性和定量性能的指标。我们通过蛋白质组学分析评估Cyclic IMS的性能，纳入标准胰蛋白酶酶解物样品，复杂性从相对简单的肽混合物到更复杂的人细胞系不等。

实验

样品描述

定性：将沃特世MPDS大肠杆菌（[部件号186003196 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186003196-massprep-e-coli-digest-standard.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186003196-massprep-e-coli-digest-standard.html)）和人细胞裂解物K562 (Promega, V6951)酶解物复溶于0.1%甲酸水溶液中，得到浓度为100 ng/ μ L的样品。将10~100 ng样品上样至色谱柱，在每个上样水平多次进样。

定量：用大肠杆菌背景基质制备6x5同位素体(Promega, V7495)混合物。

液相色谱条件

| | |
|---------|---|
| 液相色谱系统： | ACQUITY UPLC M-Class |
| 捕集柱： | Symmetry, 180 μ m \times 20 mm (部件号186008821) |
| 分析柱： | HSS T3, 75 μ m \times 250 mm (部件号186008818) |
| 柱温： | 35 $^{\circ}$ C |
| 样品温度： | 10 $^{\circ}$ C |

| | |
|-------|--|
| 流速: | 300 nL/min |
| 流动相A: | 0.1%甲酸的水溶液 |
| 流动相B: | 乙腈 + 0.1 %甲酸 |
| 捕集条件: | 2 min, 5 μ L/min, 99%溶剂A |
| 梯度: | 在90 min至最长240 min的梯度时间下, 流动相B从5%增加至35% |

质谱条件

| | |
|--------------|------------------------------|
| 质谱系统: | SELECT SERIES Cyclic IMS |
| 电离模式: | ESI+ |
| 质量分辨率: | 50000 FWHM |
| 离子淌度分辨率: | 单圈, 65 FWHM |
| 采集模式: | HDMS ^E – 数据非依赖型采集 |
| 采集质量数范围: | 50–2000 Da |
| 积分时间: | 0.5 s |
| 参比物质: | 每120 s采样一次Glu-血纤维蛋白肽B |
| 毛细管电压: | 3.2 kV |
| 传输CE, 功能通道2: | 19~45 V (线性梯度) |
| 锥孔电压: | 30 V |

数据管理

| | |
|--------|--|
| 质谱软件： | MassLynx |
| 数据处理： | ProteinLynx Global Server，蛋白质组学数据分析软件Progenesis Q1 |
| 数据库： | Uniprot大肠杆菌和人细胞系 - 仅经过审查的序列 |
| 错误发现率： | 1%和4% |

结果与讨论

在HDMS^E模式下使用交替采集得到低能量和高能量色谱图以及实时校正参比通道。图1显示了复杂K562人细胞系酶解物的低能量和高能量代表性色谱图。

高能量碎裂发生在离子淌度分离之后的传输碰撞池中，因此母离子和碎片离子具有相同的漂移时间信息。因此，在数据处理过程中，基于保留时间和漂移时间信息，将来自功能通道2（高能量）的碎片离子与母离子信息（功能通道1）匹配。然后将匹配后的数据制作成二进制文件，就能轻松用于数据库搜索。

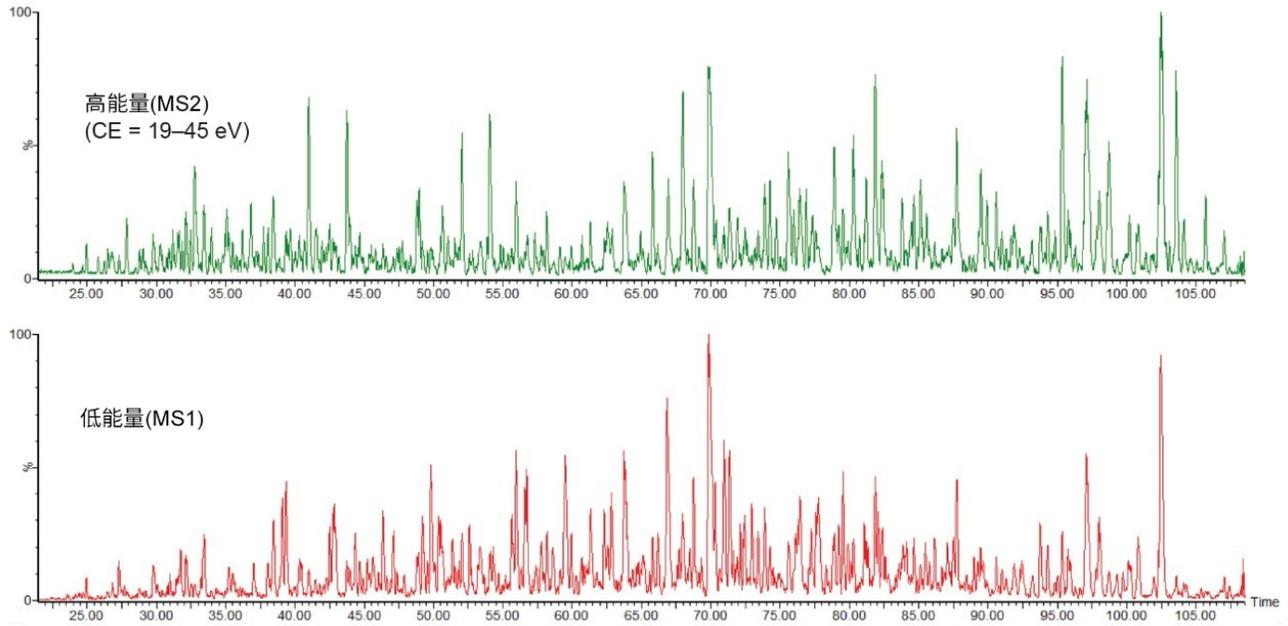


图1.复杂的K562人细胞系酶解物低能量和高能量色谱图。柱上上样量75 ng，在90 min的梯度内完成分离。

图2显示了与人K562裂解物对应的数据库搜索结果。展示了表示蛋白质组的蛋白质鉴定结果（将同源性蛋白质合并）以及蛋白质总数（同源性蛋白质被包括在内）。相应的肽鉴定结果与蛋白质鉴定数量遵循类似模式，最多约60000种肽（数据未显示）。图2提供的鉴定结果代表由1%和4%的FDR所组成的数据库搜索结果，载样量25~100 ng。梯度为90 min，数据表明50~75 ng的载样量为最佳选择。在大肠杆菌样品中也观察到蛋白质和肽鉴定结果达到平稳状态的类似模式，最佳柱上上样量为50 ng，对应1250个蛋白质/20000个肽鉴定结果。通过延长梯度时间，肽离子在保留时间方面的分离性能增加，因此数据处理算法更容易区分各种离子。使用不同的梯度时间进样分析K562样品，图3显示了在1% FDR时返回的蛋白质鉴定结果：蛋白质鉴定数量从3700个（分离时间90 min）增加至4500个（分离时间240 min）。通过处理所获得的鉴定率的主要影响因素是系统优异的质量精度以及鉴定物质的动态范围。通常，在K562（图4）和大肠杆菌分析中，均有90%以上的肽离子质量数测量结果在 ± 5 ppm以内，鉴定动态范围涵盖5个数量级（见图5）。

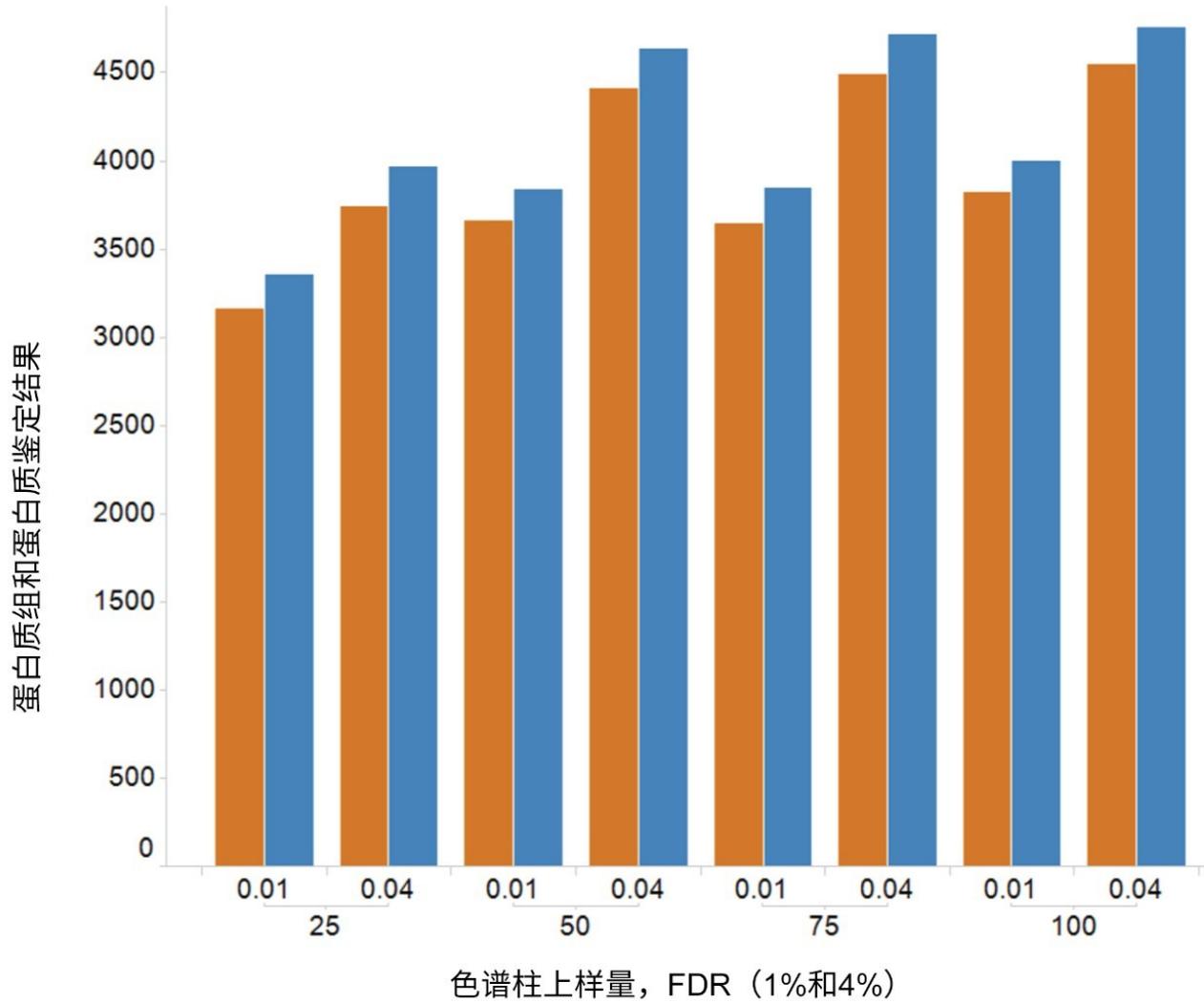


图2.使用90 min的梯度，在K562载样量为25~100 ng的条件下，FDR为1%和4%时的蛋白质鉴定结果

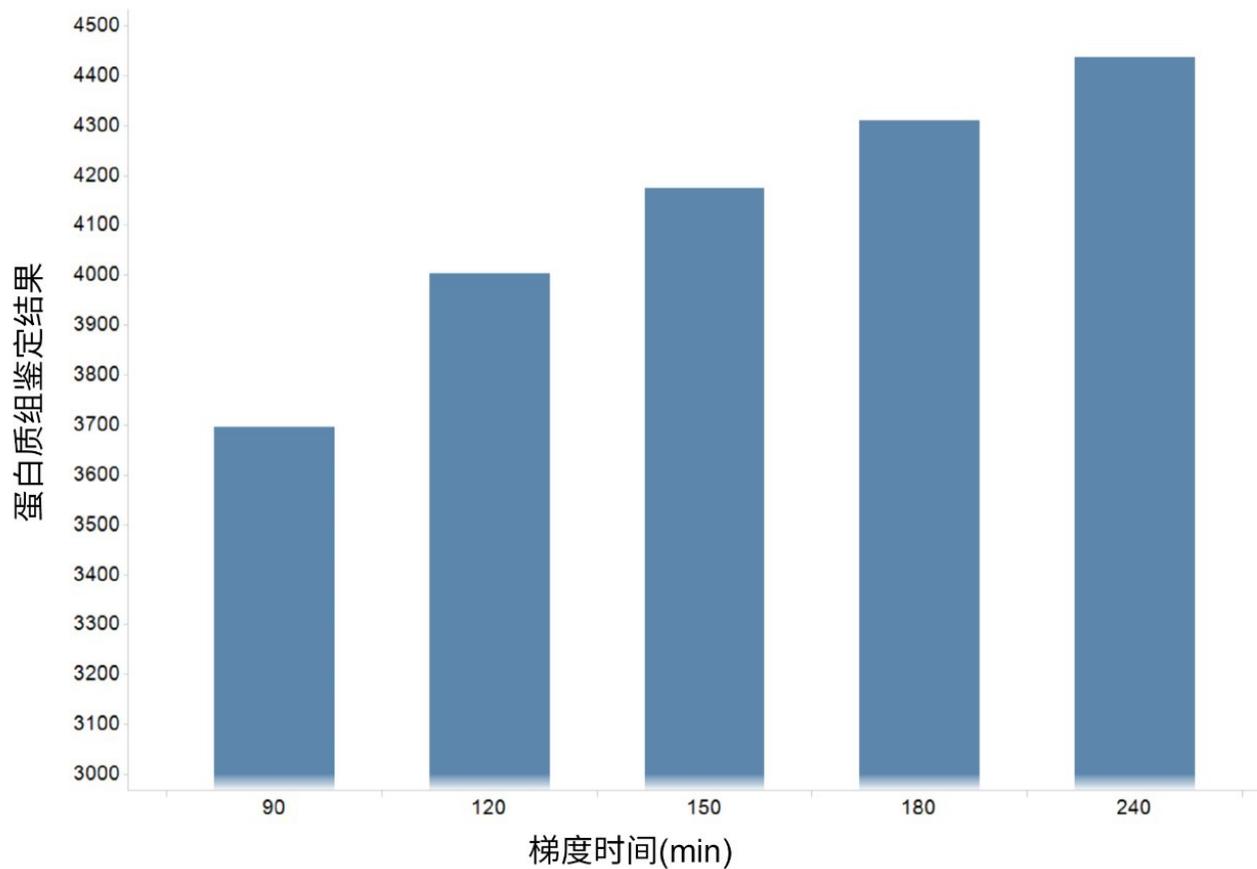


图3.采用90~240 min不同梯度时间的蛋白质鉴定结果(FDR 1%)

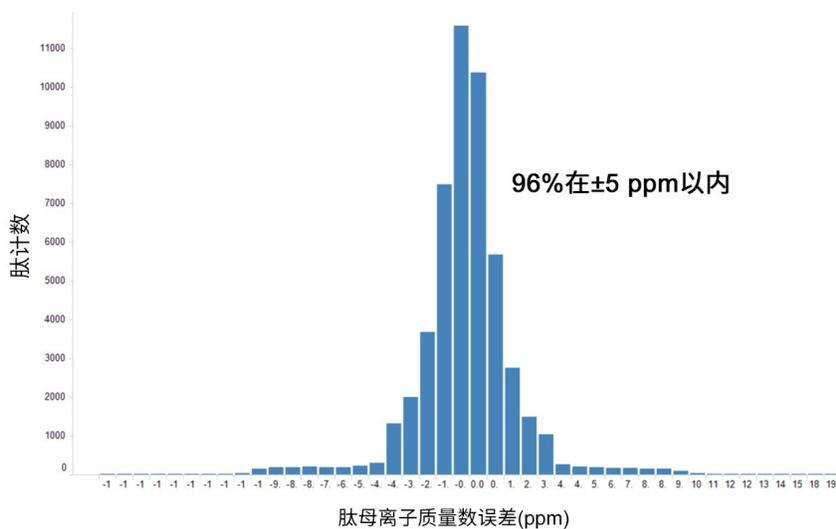


图4.K562所有相关鉴定肽的质量精度(ppm)分布

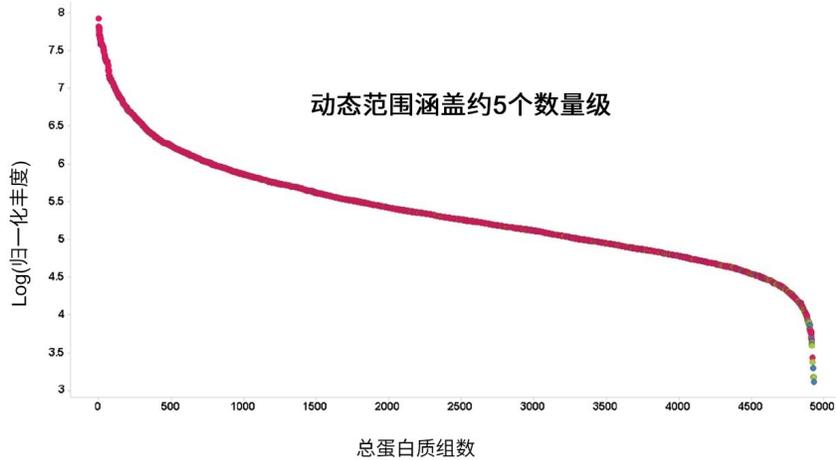


图5.3次重复进样的所有已鉴定K562蛋白质强度动态范围

发现实验的一个重要方面是定量信号强度以及鉴定率谱图质量的进样间重现性。这些指标也指示LC-MS系统能够实现的测量稳定性：使用数十或数百个样品持续数周采集样品数据。图6显示了两次重复进样的蛋白质信号强度比较，具体而言，就是使用搜索结果中每种蛋白质匹配度最高信号最强的3种肽进行比较。图7显示了三种技术分析的鉴定率，确定了三次进样其中两次的鉴定结果数量。基于此标准，以1% FDR鉴定出3602种蛋白质，相当于全部鉴定结果的78%。在大肠杆菌结果的类似发现中， r^2 值为0.999，在进样间获得了1216个蛋白质鉴定结果。

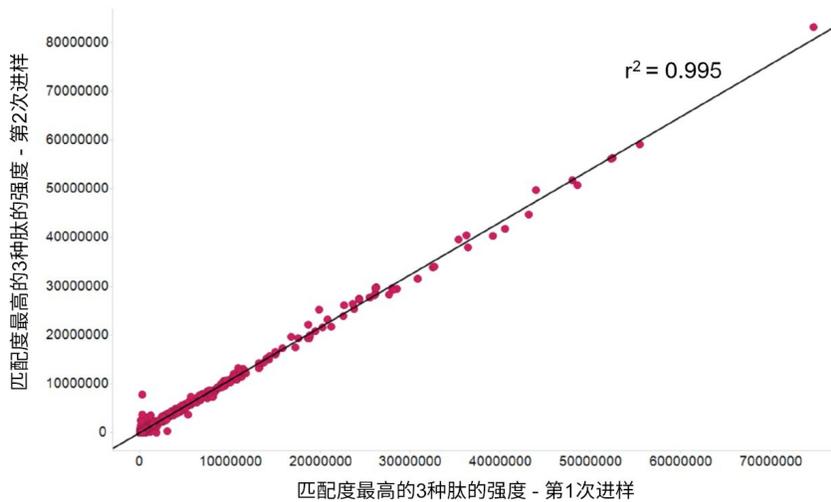


图6.K562两次重复进样的进样间重现性，比较了每种蛋白质中匹配度最高的3种肽

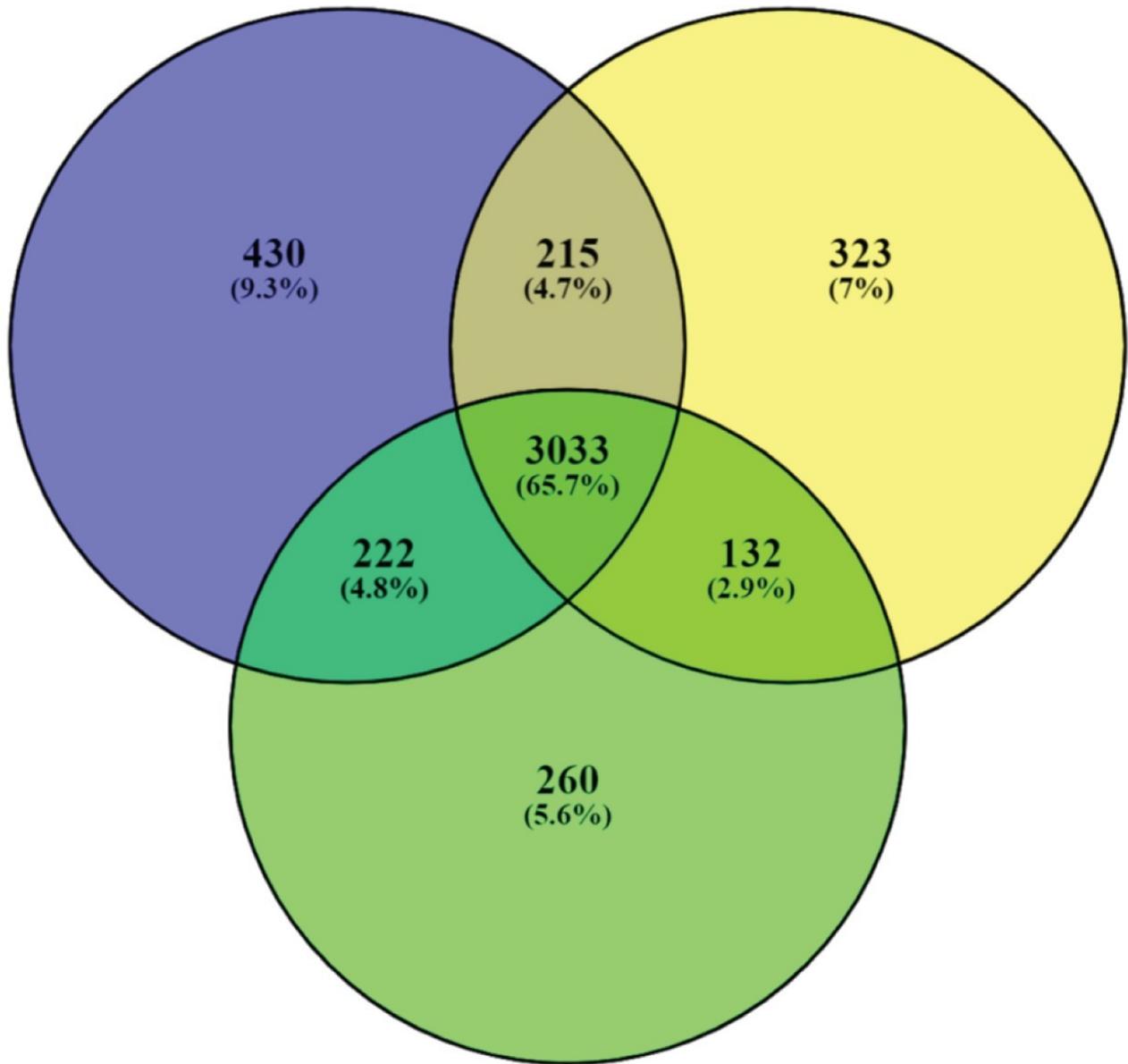


图7.三个技术重复样的蛋白质鉴定结果叠加与重现性文氏图。基于三个重复样其中两个的结果，在1% FDR和4% FDR下分别得到3602个蛋白质鉴定结果和4355个鉴定结果。

使用大肠杆菌背景基质中的Promega 6x5肽显示定量性能。6x5混合物包含浓度各异且带不同稳定同位素标记的肽，它们均从液相色谱柱中共流出。其中一种肽LASVSVSR不同标记系列的响应如图8所示。数据代表的柱上进样量范围为10 amol（最低浓度）至最高100 fmol，在整个浓度范围内获得良好的线性。基于本例，清楚展示了涵盖5个数量级的动态范围。

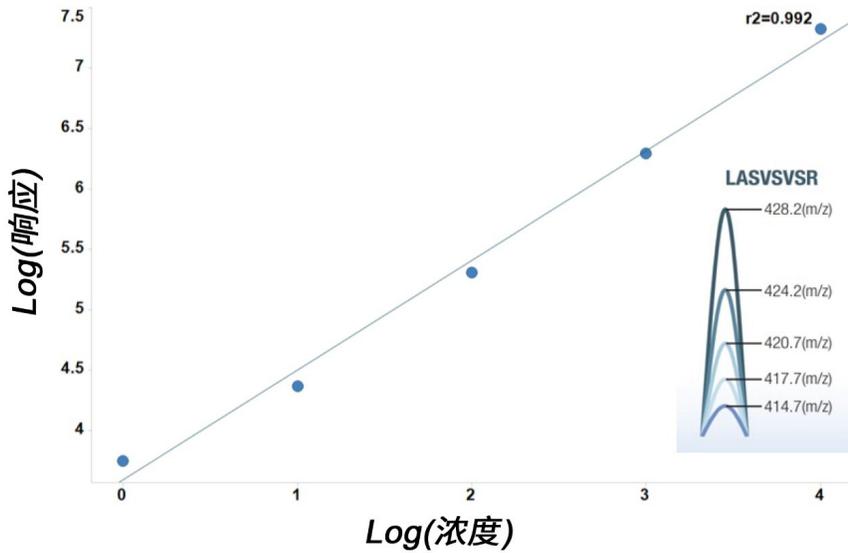


图8.大肠杆菌背景基质中加标LASVSVSR的肽系列线性。数据代表的柱上进样量范围为10 amol至100 fmol。

结论

SELECT SERIES Cyclic IMS是新版QToF质谱仪，与纳升级流速的ACQUITY UPLC M-Class联用时，在中等至复杂肽酶解物混合物的蛋白质组学分析中表现出优异的性能。提供的数据不仅突出了由单个实验得到的蛋白质鉴定率，还表现出优异的分析间重现性，这对于成功分析大规模样品至关重要。通过分析重复三次蛋白质鉴定得到的人K562肽强度，和使用带有不同稳定同位素标记的肽混合物，证明该系统具有涵盖5个数量级的更宽动态范围。

参考资料

1. Christopher J. Hughes, Lee A. Gethings.Characteristics of Proteomics Experiments Performed on the SYNAPT XS QToF Mass Spectrometer.Waters Application Note.[720006670EN](https://www.waters.com/720006670EN), 2019.

特色产品

- [ACQUITY UPLC M-Class系统 <https://www.waters.com/134776759>](https://www.waters.com/134776759)

- [Select Series Cyclic IMS <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135021297>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135021297)
- [MassLynx MS软件 <https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)

720007381ZH, 2021年9月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.