

利用SELECT SERIES Cyclic IMS实现高通量血浆蛋白质组学分析

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

前列腺癌(PCa)是导致美国男性因癌症死亡的第二大原因，大约九分之一的男性确诊患有该疾病。目前已开展大量组学(OMIC)研究，提出了该疾病的潜在标志物。为提供一个全面并且在统计学上有效的样品组，需要对大量个体进行采样，最终带来分析挑战，尤其是在蛋白质组学研究中，此类研究通常采用纳升级色谱法。本应用纪要展示了使用在SELECT SERIES Cyclic IMS (Q-ToF系列仪器新成员)上执行分析的高通量策略对来源于前列腺癌个体的血浆进行蛋白质组学分析的潜力。

优势

- 稳定可靠的高通量分析
- 分析级色谱
- 离子淌度分辨率
- 质量分辨率

- 动态范围

简介

四极杆飞行时间(Q-ToF)质谱仪是一种成熟的工具，适用于发现蛋白质组学实验。这些仪器表现出良好的灵敏度、速度和高质量分辨率，这些特性对于成功分析难分析样品类型具有重要意义。临床蛋白质组学研究领域发展迅速，通常涉及体液（例如血浆或血清）分析。在经典蛋白质组学实验中，疾病潜在生物标志物的含量虽然与高丰度蛋白（例如白蛋白）相比可能非常低，但可用样品量却远远超过蛋白含量。因此，血浆/血清胰蛋白酶酶解物表现出非常宽的肽丰度动态范围。

本应用纪要考察了SELECT SERIES Cyclic IMS在分析血浆胰蛋白酶酶解物样品中的分析级色谱应用，这些样品之前使用替代Q-ToF质谱仪分析¹。Cyclic IMS是Q-ToF系列仪器的新成员，与之前的Q-ToF平台相比，具有更出色的灵敏度、离子淌度分辨率和质量分辨率²。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。

实验

样品描述

分析采用8个经胰蛋白酶酶解的表型库血清样品，包括7个不同的疾病状态/治疗组加一个包含所有7组样品的QC研究组。分析的不同疾病状态组包括：(i)分配至接受主动监测的确诊PCa患者；(ii)治疗前的确诊PCa患者；(iii)接受近距离放射治疗的PCa患者；(iv)接受激素疗法的PCa患者；(v)接受前列腺切除术治疗的PCa患者；(vi)接受激素和放疗联合治疗的PCa患者；以及(vii)健康对照。

液相色谱条件

液相色谱系统：ACQUITY Premier系统

分析柱：ACQUITY Premier CSH, 1.7 μm , 2.1 mm \times 100

	mm (部件号: 186009488)
柱温:	55 °C
样品温度:	10 °C
流速:	150 µL/min
流动相A:	0.1%甲酸的水溶液
流动相B:	0.1%甲酸的乙腈溶液
梯度:	流动相B在15 min内从5%增加到35%

质谱条件

质谱系统:	SELECT SERIES Cyclic IMS
电离模式:	ESI+
质量分辨率:	50,000 FWHM
离子淌度分辨率:	单圈, 65 FWHM
采集模式:	HDMS ^E
采集质量数范围:	50–2000 amu
积分时间:	0.15 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:	2.2 kV
传输CE, 功能通道2:	19-45 V
锥孔电压:	30 V

数据管理

质谱软件:	MassLynx
数据处理:	蛋白质组学数据分析软件Progenesis Q1 (PQIP)、Tibco Spotfire、Metaboanalyst
数据库:	Uniprot人蛋白质 - 仅经过审查的序列
错误发现率:	1%

结果与讨论

研究设计见图1。在一个包含500多个样品的队列中，利用元数据将各种疾病状态/治疗分为七个表型组。此外，还制备了一个包含所有七个表型组的研究组作为质控样品。胰蛋白酶过夜酶解后，测得样品浓度为约8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。将样品稀释8倍，取0.5 μL (500 ng)进样至色谱柱。每个样品重复采集三次，每组24次进样以随机方式运行。

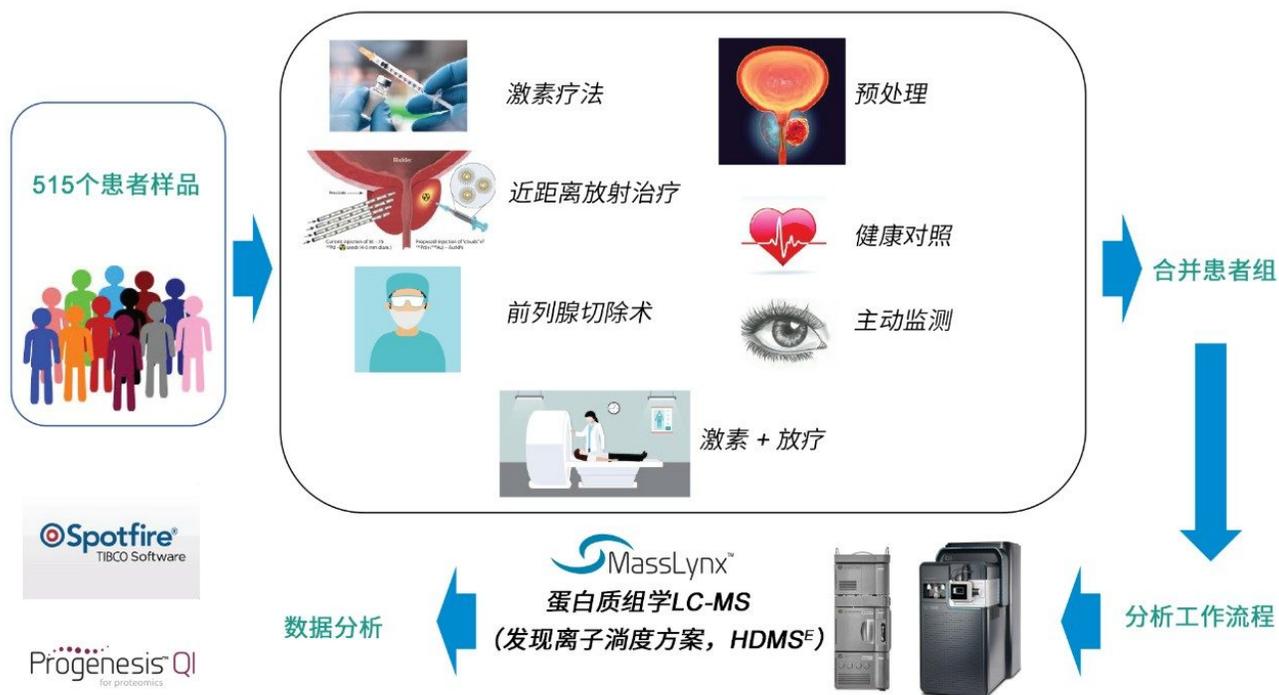


图1.大规模队列合并血浆组的分析研究设计

图2显示了血浆酶解物样品的典型色谱图，由整个分析过程中随机采集的10张色谱图叠加而成。成功分析临床蛋白质组学样品的关键在于LC-MS系统的重现性和稳定性。

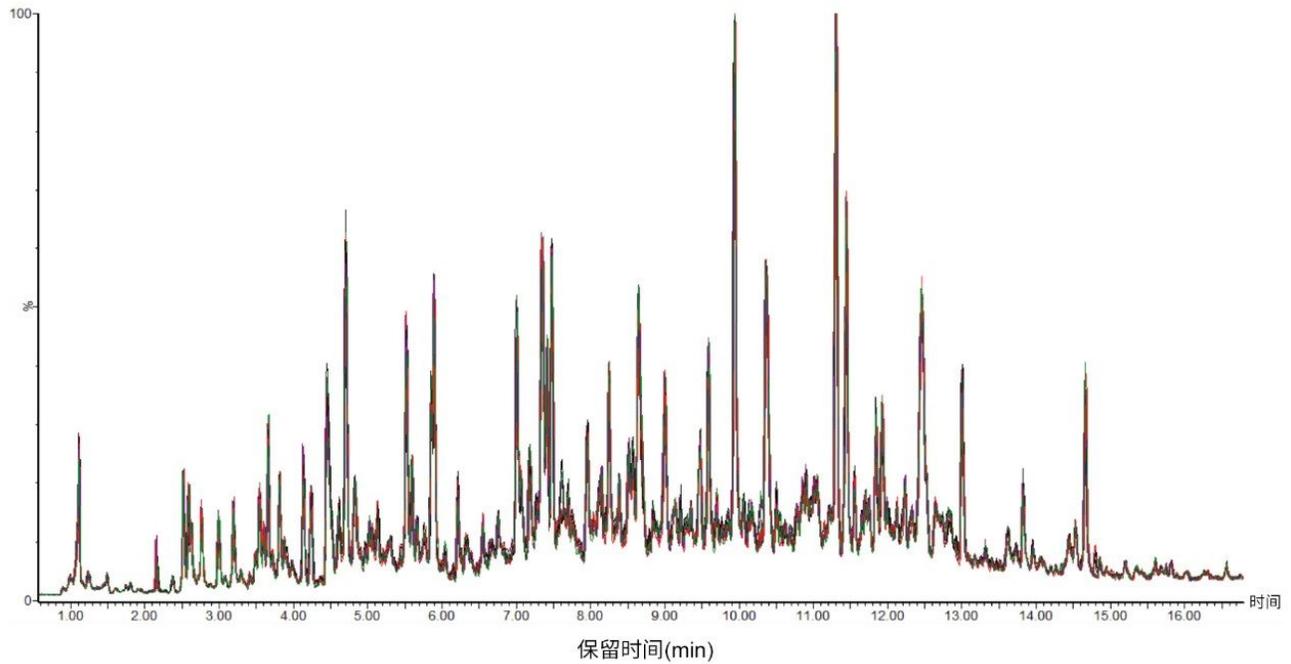


图2.血浆酶解物样品的典型分析级色谱图

使用蛋白质组学数据分析软件Progenesis Q1处理原始数据，在整段洗脱时间内从三种不同蛋白质中提取五种不同肽的处理后数据（图3），证明保留时间和信号强度具有优异的重现性。测得信号强度的变异系数(CV)上限为13%，而保留时间的CV上限为0.18%。分析的8个样品在PQIP实验设置中指定，发现369种蛋白质得到可重现地定量，如图4所示。此外，至少在一次进样中鉴定出551种蛋白质，且匹配的肽强度涵盖近5个数量级的动态范围，如图5所示。将这些数据导出至Metabonanalyst进行额外的统计分析。无监督主成分分析(PCA)显示实验中的不同样品组得到清晰分离，如图6所示。

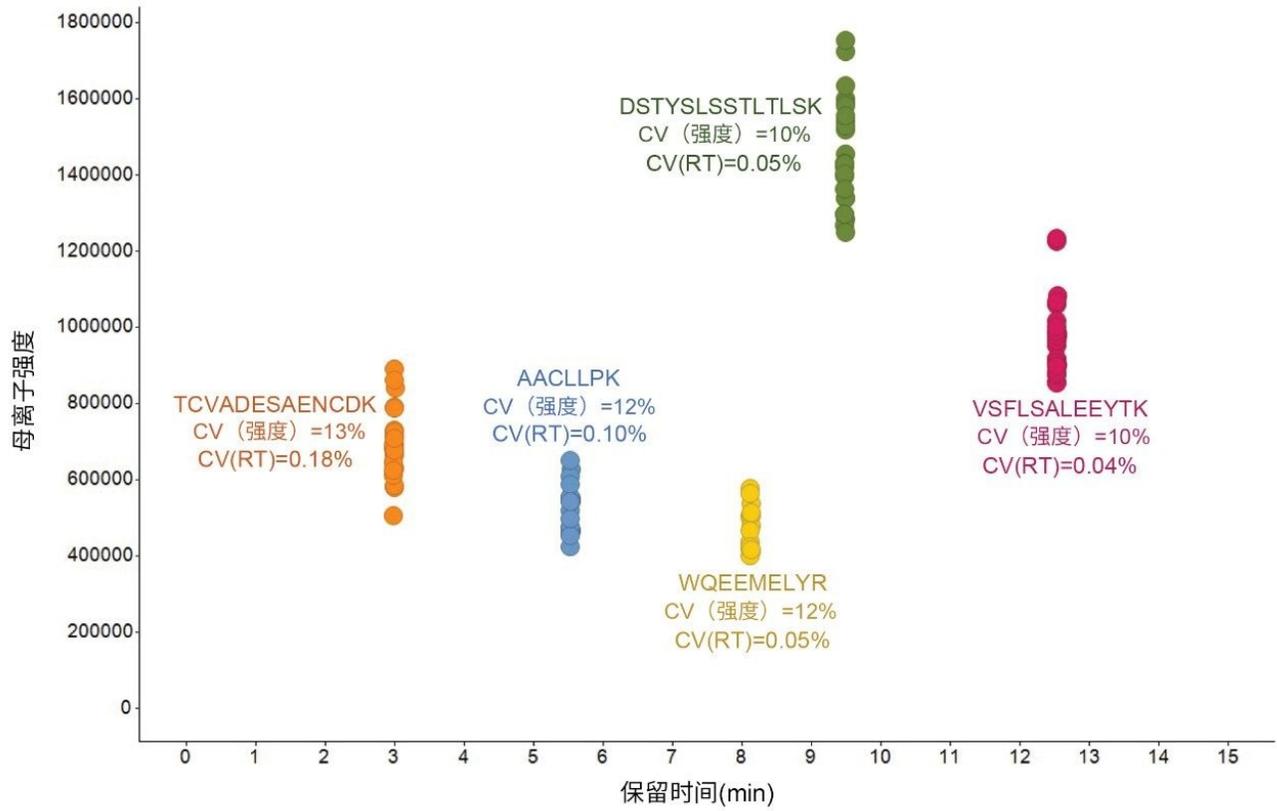
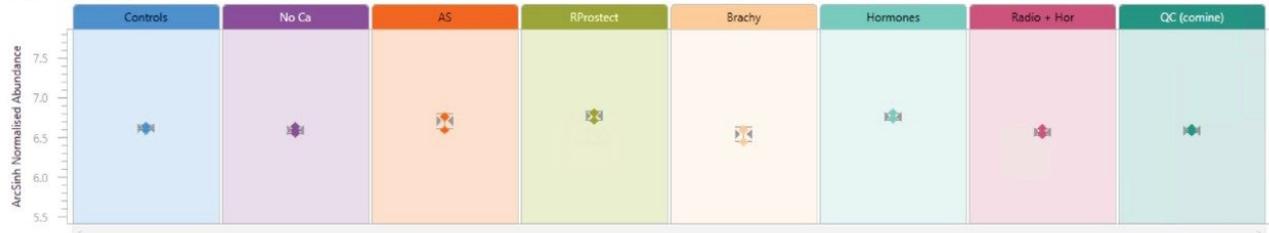


图3.通过提取五种不同肽的保留时间和强度信息显示的实验稳定性

Accession	Peptides	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	q Value	Tag	Max fold change	Highest Mean	Lowest Mean	Description
P7837	1	1	4.93	0.000527	0.000166	●	1.26	RProsect	Brachy	Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BLOC1S1 PE=1 SV=2
C95486	4	1	17	0.000534	0.000167	●	1.36	QC (comine)	AS	Protein transport protein Sec24A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEC24A PE=1 SV=2
Q9UK73	4	2	16	0.000545	0.000169	●	1.22	Hormones	No Ca	Protein fem-1 homolog B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FEM1B PE=1 SV=1
P01714	1	1	6.47	0.000582	0.000179	●	1.6	AS	QC (comine)	Immunoglobulin lambda variable 3-19 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGLV3-19 PE=1 SV=2
P05090	7	5	58	0.000606	0.000185	●	1.24	RProsect	Hormones	Apolipoprotein D OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOD PE=1 SV=1
P03952	11	8	66.1	0.000642	0.000195	●	1.28	Controls	AS	Plasma kallikrein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KLK81 PE=1 SV=1
C00451	2	2	8.47	0.000771	0.000231	●	3.08	Radio + Hor	No Ca	GDNF family receptor alpha-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GFRA2 PE=1 SV=2
Q3SV00	3	3	12.5	0.000771	0.000231	●	1.4	Hormones	Controls	Testis-specific protein 10-interacting protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TSGA10IP PE=1 SV=1
P05156	23	15	114	0.000788	0.000234	●	1.29	Radio + Hor	Controls	Complement factor I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFI PE=1 SV=2
P01019	11	10	95.8	0.000815	0.000241	●	1.24	Hormones	AS	Angiotensinogen OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AGT PE=1 SV=1
P61925	3	2	16.8	0.000889	0.00026	●	1.17	QC (comine)	AS	cAMP-dependent protein kinase inhibitor alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PKIA PE=1 SV=1
Q86VF7	3	2	15.9	0.000892	0.00026	●	1.24	No Ca	AS	Nebulin-related-anchoring protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NRAP PE=1 SV=2
P43652	25	19	180	0.000901	0.000261	●	1.24	Controls	QC (comine)	Afamin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AFM PE=1 SV=1
P35858	8	6	42	0.000916	0.000264	●	1.25	RProsect	Radio + Hor	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGFBP3 PE=1 SV=2
O15068	8	2	33.9	0.00108	0.00031	●	1.39	Hormones	Brachy	Guanine nucleotide exchange factor DBS OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MCF2L PE=1 SV=2
Q8TBV8	9	3	49.3	0.00111	0.000314	●	1.26	Hormones	Controls	Polyamine-modulated factor 1-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PMFBP1 PE=1 SV=1
P02768 (+7)	555	449	1.5E+03	0.00116	0.000327	●	1.1	Controls	AS	Albumin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALB PE=1 SV=2
P01619	4	3	17.7	0.00124	0.000348	●	1.14	AS	Radio + Hor	Immunoglobulin kappa variable 3-20 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGKV3-20 PE=1 SV=2

Selected protein: Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BLOC1S1 PE=1 SV=2

[View peptide measurements](#)



Quantifiable proteins displayed: 369

369种可定量蛋白

Activate W Section Complete

图4.24个样品进样（8个样品组 × 3次进样）的PQIP蛋白质表

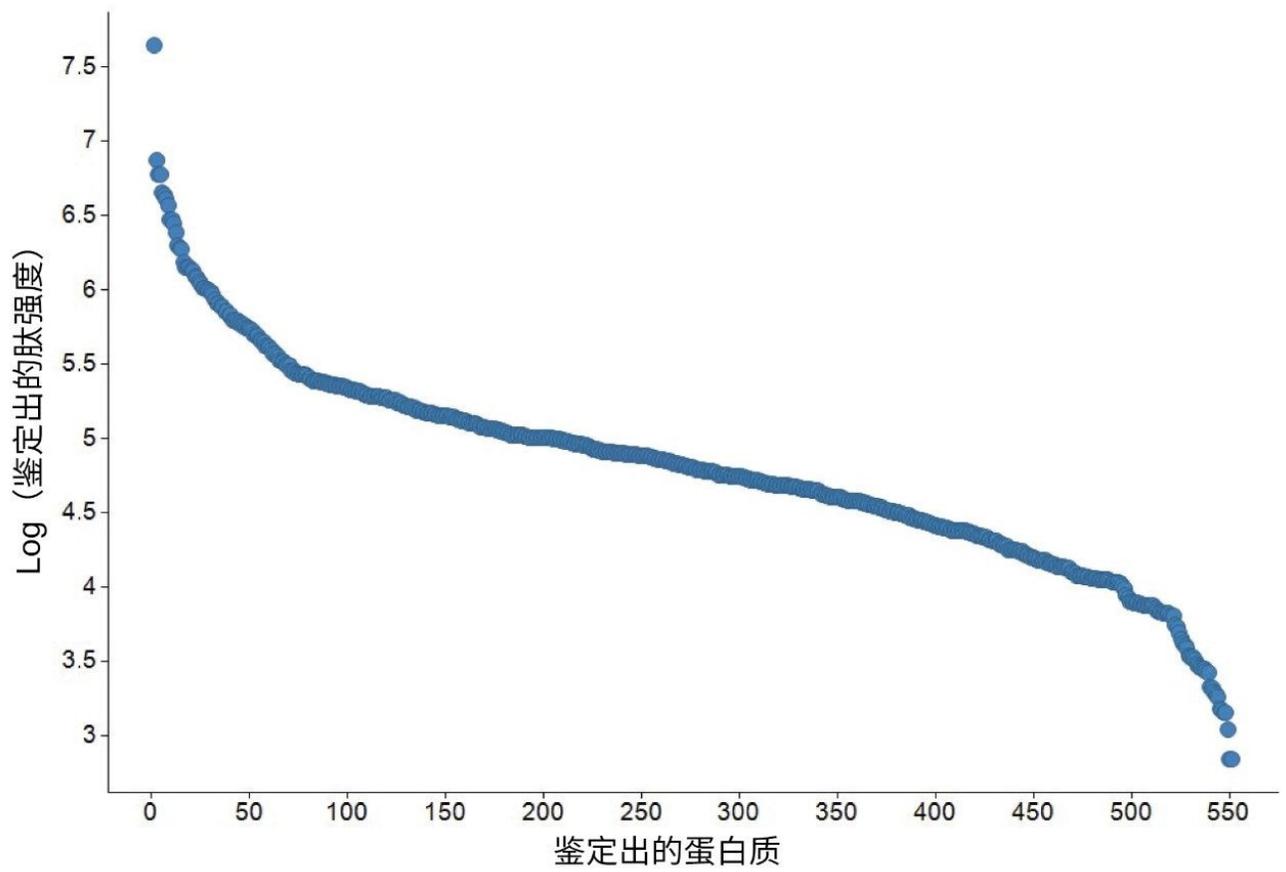
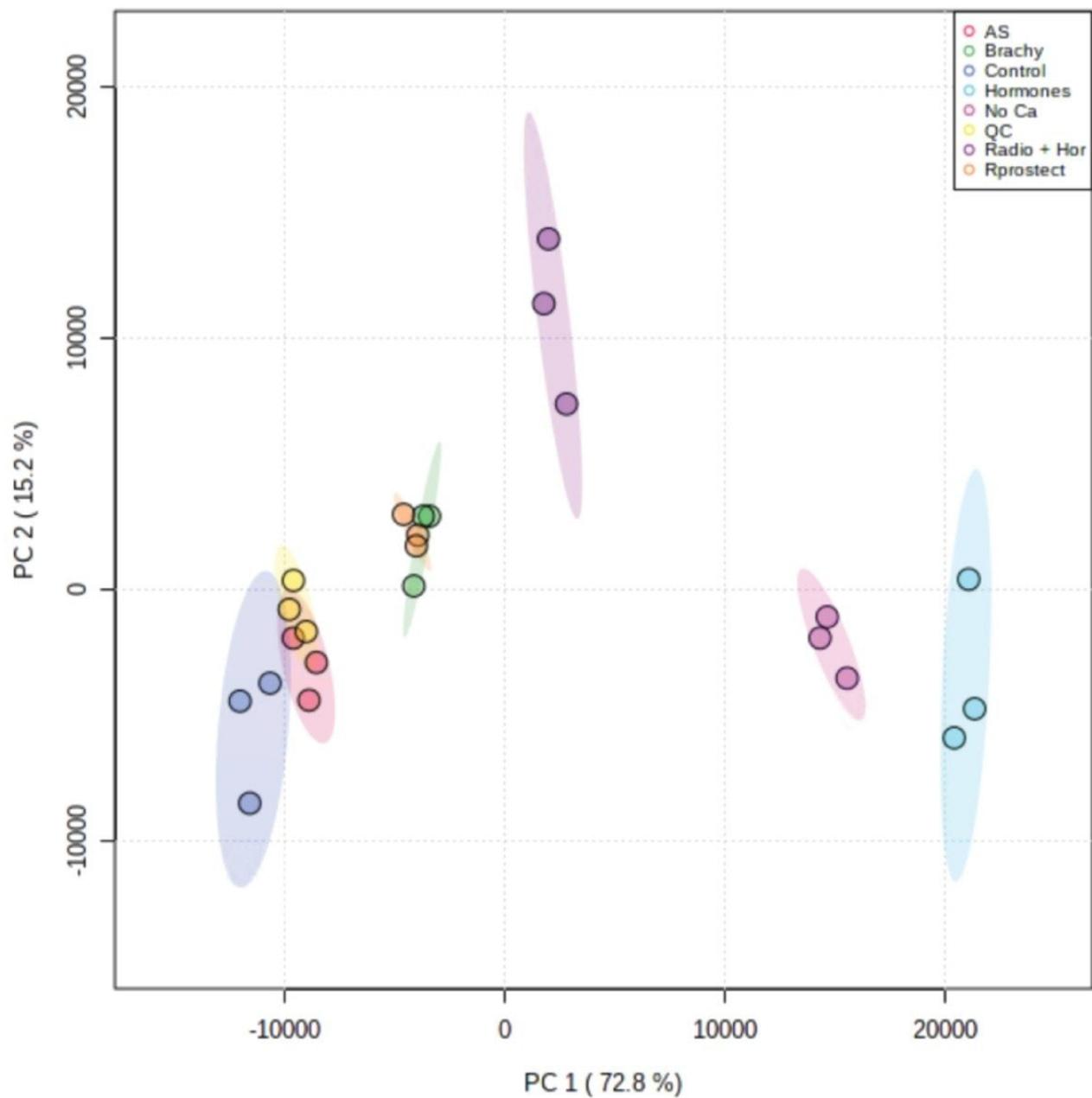


图5.各蛋白质鉴定结果中匹配肽的强度动态范围

得分图(Scores Plot)



结论

初步研究展示了在SELECT SERIES Cyclic IMS上开展分析级色谱、高通量血浆蛋白质组学实验的潜力。优异的色谱性能与高性能Q-ToF分析相结合，对这一研究领域至关重要，ACQUITY Premier系统与Cyclic IMS联用已被证明是一种可靠的组合。从PCA图可以看出，不同疾病状态或治疗组之间清晰分离，表明与之前的分析类似，有可能用于大规模样品分析。

参考资料

1. Lennon et al., High-Throughput Microbore Ultra-high Performance Liquid Chromatography-Ion Mobility-Enabled-Mass Spectrometry-Based Proteomics Methodology for the Exploratory Analysis of Serum Samples from Large Cohort Studies, *J Proteome Res*; 20 (3):1705–1715, 2021.
2. Chris Hughes, Lee A. Gethings, Robert S. Plumb. Qualitative and Quantitative Performance of Cyclic IMS in Nanoscale Proteomic Experiments, Waters Application Note, [720007381EN](#), 2021.

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

SELECT SERIES Cyclic IMS <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135021297>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

720007414ZH, 2021年10月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号