

生物质谱分析新方法开发和多组学实验室建设

高妍, 张向阳

(天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

摘要: 临床样本的蛋白质组检测面临被测物动态范围大、分析物浓度低、基质效应影响大等多方面的巨大挑战, 因此对蛋白质谱分析的灵敏度、动态范围、定量准确性和精密度都提出较高要求。团队建立了基于数据非依赖性采集 (Data Independent Acquisition, DIA) 质谱技术的高通量蛋白定量分析流程, 并不断优化生物质谱分析相应的样品处理方法和质谱检测参数, 针对不同科研需求设计实验流程。同时, 建立针对代谢组学、脂质组学、质谱成像和质谱流式的测试方法, 这些方法的开发和标准操作规程的确立为生命科学研究及临床医学研究提供了强有力的工具。

关键词: 生物质谱精准医学多组学研究 DIA 技术方法开发

中图分类号: Q26

文献标识码: A

在精准医学和临床研究中, 需要精确寻找到疾病的原因和治疗的靶点, 对患者分子生物学特征做出精准判断, 以最终实现对于疾病和特定患者个体化精准治疗的目的^[1-3]。目前被广泛接受的临床质谱应用领域主要是针对小分子化合物, 而蛋白质谱的临床应用还处于探索阶段^[4-6]。临床样本的复杂性, 使得蛋白质定性定量分析充满了挑战, 生物质谱由于其高分辨率和高准确度, 在靶点发现、精准分子分型、药物作用机制和药效方面都有着巨大的潜力。因此, 急需开发深度覆盖、定量结果准确、快速高通量的分析方法^[7]。团队以蛋白质谱分析技术为核心, 结合多种前沿质谱技术, 包括 DIA 技术、平行反应监测 (Parallel Reaction Monitoring, PRM) 靶向质谱分析、质谱流式 (Mass Cytometry) 单细胞蛋白质检测技术、以及基于离子淌度的 4D 蛋白质组学等, 并整合代谢组学、脂质组学和质谱成像等其它高通量组学技术, 建立了多组学临床质谱分析技术平台。

与数据依赖性采集 (Data Dependent Acquisition, DDA) 不同, DIA 分析技术因其覆盖度高、信号无损失、定量能力强的特点, 在临床蛋白质谱上有很好的应用前景。经典的 DIA 分析流程, 需要采用分馏样品的 DDA 检测数据建立谱图库以实现蛋白鉴定, 但这对临床微量蛋白样品来说难以实现^[8]。本文探讨了基于谱图库预测策略的 DIA 蛋白质组学分析流程, 如图 1 所示, 实现了微量蛋白质组学的深度覆盖和准确定量检测。该方法为临床微量样本检测和精准医疗开展提供了方法支撑。



图 1 基于谱图库预测策略的 DIA 的生物质谱分析方法流程图

1 样本收集

样本可为细胞、组织、体液等，本工作中以 HEK293T 细胞为研究对象。

2 样品前处理

本方法采用基于超滤管的制备方法（filter-aided sample preparation, FASP）^[9]。

2.1 裂解

取少量 293T 细胞，加入含 8M 尿素、cocktail 和 50mM 碳酸氢铵的裂解液，非接触式超声 8-10 个循环。

2.2 测蛋白浓度

离心，取上清，用 BCA 法测定蛋白浓度。

还原：取一定量蛋白，加入二硫苏糖醇 DTT，使其终浓度为 10mM，室温反应 45 分钟。

2.3 烷基化

加入碘乙酰胺 IAA，使其终浓度为 40mM，避光反应 45 分钟。

2.4 终止

加入二硫苏糖醇 DTT，使其终浓度为 40mM，室温反应 30 分钟。

2.5 转移

将蛋白转移到 10KD 超滤管中，14000g，离心 30 分钟，并用 50mM 碳酸氢铵洗两次，以除去所有盐类。

2.6 酶解

按照蛋白和酶的比例 25:1 加入胰蛋白酶，37°C 过夜反应 12-16 小时。

2.7 收集

换上新的接收管，14000g，离心 30 分钟，再用 50uL 去离子水冲洗两次，14000g，离心 20 分钟。

2.8 蒸干

将收集到的肽段用离心浓缩仪蒸干，并用 0.1% 甲酸水溶液重悬肽段，用于上机分析。

3 仪器条件

3.1 色谱条件

色谱系统为 Thermo Fisher Easy nLC 1200，流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液，B 向为 80% 乙腈 +20% 水+0.1% 甲酸。预柱和分析柱均为实验室自制，外径 360 μ m，内径 150 μ m，预柱长度 2cm，填料粒径为 3 μ m，分析柱长度 30cm，填料粒径为 1.9 μ m。流速为 600nL/min。所用梯度见表 1:

表 1 色谱梯度

时间 min	%B
0	8
10	12
79	27
107	45
110	95
120	95

3.2 质谱参数

质谱系统为 Thermo Fisher Orbitrap Fusion Lumos 三合一质谱仪。经系统考察不同参数的影响，确定质谱参数和 DIA 窗口设置如下，见表 2-4。

表 2 一级质谱参数

名称	参数
Detector Type	Orbitrap
Orbitrap Resolution	60K
Mass Range	Normal
Use Quadrupole Isolation	Yes
Scan Range(m/z)	350-1000
Normalized AGC Target (%)	250