

# 超高灵敏液质联用仪分析蛋白及磷酸化蛋白

赵欢欢

(复旦大学生物医学研究院, 上海 200032)

**摘要:** 使用超高灵敏液相质谱联用仪分析人体组织蛋白组与磷酸化蛋白组的差异表达, 利用同位素标记法一次性分析比较了 18 例某部位组织 (3 例正常和 15 例疾病), 鉴定并定量到蛋白 8700 多个, 磷酸化蛋白约 3000 个, 磷酸化位点 8100 以上。结果表明, 该仪器分辨率高, 稳定性好, 该方法通量高, 能用于生物标志物的初筛。

**关键词:** 蛋白质组; 差异表达; 超高灵敏; 超高分辨; 质谱仪

中图分类号: Q516

文献标识码:

## Based ultra-sensitive liquid mass spectrometry analysis of proteomics and phosphoproteomics of certain human tissue

Zhao Huanhuan

(Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)

**Abstract:** The differential expression of proteomics and phosphoproteomics of human tissue was analyzed by ultra-sensitive liquid phase mass spectrometry (UHMS) and isotope label reages. A total of 18 cases of certain tissues (normal tissue\*3 and disease tissue\*15) were analyzed synchronously in an experiment. More than 8700 proteins, about 3000 phosphorylated proteins and more than 8100 phosphorylated sites were identified and quantified. The results show that the UHMS has high resolution, good stability and high throughput, and can be used for the preliminary screening of biomarkers.

**Key words:** proteome; Differential expression; Ultra-high sensitivity; Ultra-high resolution; Mass spectrometer

蛋白质磷酸化是生物体内广泛存在的最重要的共价修饰方式之一。参与各种生理和病理过程, 包括细胞增殖、发育分化、细胞凋亡、信号转导, 及肿瘤发生等生命活动<sup>[1]</sup>。因而, 基于质谱的磷酸化研究在蛋白质组学研究中的作用尤为重要<sup>[2-5]</sup>。在大规模研究中, 通常采用非标记定量的方法分析差异表达的蛋白组和磷酸化组, 这种方法需要对每个样品进行一次

处理,然而由于整个前处理流程繁琐又漫长,样品分别多次处理本身会引入一些差异,从而干扰实验结果。本实验采用等重标记技术结合超高灵敏质谱联用系统来定量蛋白组及磷酸化蛋白质组<sup>[6]</sup>,即采用等重同位素标记不同组的肽段,将其混合后再进行磷酸化富集,使得不同组的样品得以同步完成。避免多次处理可能引入的差异,不仅提高了检测的准确性,也提高了检测的通量。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Orbitrap Eclipse Tribrid 质谱仪, Easy nLC1200 液相色谱, 离心机, 金属浴, 涡旋混匀仪, 真空浓缩冻干仪等

### 1.2 试剂及耗材

测序级胰蛋白酶, 质谱级甲酸、水, 等重同位素标记试剂, C18 除盐柱等

### 1.3 软件

ProteinDiscovery 软件

## 2 实验方法

### 2.1 样品前处理

取 0.1mg 样品加入 2 $\mu$ l 500mM TCEP 溶液 37 度恒温反应 1h, 再加入 4 $\mu$ l 1M IAA 溶液室温静置 30min, 按照蛋白和胰酶质量比 50:1 加入胰酶过夜酶解, 酶解结束后用 TMT-18Pro 同位素标记肽段, 标记的肽段等量混合后采用 C18 小柱除盐后冻干, 得到可进行质谱分析的全蛋白肽段, 再经历磷酸化肽段富集及 C18 小柱除盐冻干, 获得磷酸化肽段。

### 2.2 样品测试

冻干的全蛋白肽段及磷酸化肽段用上样缓冲液 0.1%FA 进行复溶, 高速离心后取到进样瓶, 放到液相色谱里的进样盘里, 设置分析方法及分析队列, 检查流动相、洗针液, 确认高纯氮气、氦气充足, 质谱仪无异常且电喷雾稳定连续后, 提交队列开始质谱分析。质谱分析后使用分析软件 ProteinDiscovery 进行检索, 得到蛋白组及磷酸化组列表。

### 2.3 仪器参数

检测系统为赛默飞公司的 Easy-nLC 1200 与 Orbitrap Eclipse (资产号: F2201859) 联用系统。样品使用 5 $\mu$ l 流动相 A (0.1%甲酸水溶液) 溶解上样 3 $\mu$ l, 肽段在纳升级分析柱(PepMap C18, 75  $\mu$ m $\times$ 50cm)上进行梯度洗脱色谱分离。分离梯度为 30min 内流动相 B (0.1%甲酸的乙腈溶液)从 5%上升至 35%。色谱流速为 300nl, 色谱柱柱温为 60 $^{\circ}$ C。离子源喷雾电压为 2.2kV,

质谱仪加热毛细管设定为 320℃，采用数据依赖模式自动在 MS 和 MS/MS 间切换采集。一级质谱：扫描范围 (m/z) 是 350-1800，分辨率为 60000，自动获取控制 (AGC) 目标为 100%，最大注入时间为 50 ms，电荷为 2-6，在检测到 1 次后动态排除，动态排除时间为 20 s；每一个被选择的母离子继续进行二级质谱分析。参数包括：分离窗口为 1.6，检测器类型为轨道阱，分辨率为 30000，TMT Tubur ,自动获取控制目标为 200%，最大注入时间为 120ms，碰撞能量为 34%。

## 2.4 软件参数

软件参数	设置
Enzyme	Trypsin
Digestion specificity	Full specific
Max Missed Cleavages	2
Fixed modifications	Carbamidomethyl(C),TMTpro(K),TMTpro(N-Term)
Variable modifications	Oxidation (M),phosphorylation(S/T/Y)
Peptide Tolerance	10ppm
MS/MS Tolerance	0.02Da
Fragmentation	HCD
Site Probabilitie	>75

## 3 结果与结论

### 3.1 实验结果

	Proteomics	Phosphoproteomics
Proteins	8786	3185
Peptide Groups	77960	10256
Modification Sites	/	8122
PSMs	194059	12885
MS/MS Spectrum Info	479730	116006

### 3.2 实验结论

等重同位素标记法通量高，能一次完成 18 个样品检测，而超高灵敏高分辨液质联用仪分辨率高，稳定性好，能够高效率完成标记的蛋白组及磷酸化组的检测。因此，超高灵敏高

分辨质谱仪结合同位素标记的方法能够灵敏、高效、高通量地完成差异表达蛋白的分析及生物标志物的初步筛选。

**参考文献:**

- [1] Hubbard, MJ, Cohen P. On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation[J]. Trends Biochem. Sci. 1993,18 (5):172-177.
- [2] Graves JD, Krebs EG. Protein phosphorylation and signal transduction[J]. Pharmacol. Ther. 1999,82 (2-3): 111-121.
- [3] Zhai B, Villen J, Beausoleil SA, et al. Phosphoproteome analysis of *Drosophila melanogaster* embryos[J]. J Proteome Res. 2008,7(4):1675-1682.
- [4] Wilson J T, Villen J, Gygi S P. Phosphoproteome analysis of fission yeast[J]. J Proteome Res. 2008,7 (3):1088-1097.
- [5] Tao WA, Wollscheid B, O'Brien R, et al. Quantitative phosphoproteome analysis using a dendrimer conjugation chemistry and tandem mass spectrometry[J]. Nat Methods. 2005,2 (8):591-598.
- [6] Zhao H H, Li C Y, Jin H. Evaluation of Quantitative Phosphoproteomic Performance of Sequential Enrichment of Metal Oxide Affinity Chromatography for Phosphopeptides Using TMT 10-plex Isobaric Labeling.Chem. J. Chinese Universities, 2021, 42(12): 3624-3631.