

Orbitrap Astral 质谱仪在蛋白质组学检测中的原理与应用

石文昊¹, 齐英姿²

(1.清华大学分析中心, 北京 100084; 2.赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 北京 100102)

摘要: Orbitrap Astral 质谱仪是赛默飞公司于 2023 年推出的高分辨质谱仪, 该质谱仪在蛋白质组学检测领域的应用, 显著提升了蛋白覆盖度、灵敏度和检测通量。案例基于 Orbitrap Astral 质谱仪的结构和工作原理, 探讨其在蛋白质组学中的应用; 并以 HeLa 细胞酶解肽段为实验样本, 比较该仪器在三种短色谱梯度(有效梯度时间约 5 分钟、10 分钟、和 20 分钟)条件下, 对蛋白质定性与定量能力的差异。Orbitrap Astral 质谱仪的 5 分钟梯度方法可鉴定超过 9,000 种蛋白质, 20 分钟梯度方法可鉴定超过 10,000 种蛋白质; 三种梯度方法的定量结果相关性良好, 相关系数均高于 0.9。案例为使用 Orbitrap Astral 质谱仪进行蛋白质组样品分析提供了方法参考, 并展示了该仪器在蛋白质定性与定量分析中的性能。

关键词: Orbitrap Astral 质谱仪; 数据非依赖方法; 蛋白质组学; 短色谱梯度

近年来, 蛋白质组学在生物学和生物医学研究中扮演着日益重要的角色。从技术角度来看, 蛋白质组学的发展依赖于多种分析技术的成熟, 特别是高分辨质谱技术。2002 年, 诺贝尔化学奖授予质谱分析中的两项关键电离技术: 电喷雾电离 (ESI) 和基质辅助激光解吸电离 (MALDI), 标志着质谱技术在蛋白质组学领域广泛应用的开启。质谱仪器的研发持续在定性定量能力、灵敏度和稳定性方面等取得突破, 各类新型质谱仪不断涌现, 如赛默飞推出的 Orbitrap 超高分辨率质谱仪, 以及布鲁克公司推出的捕集离子淌度飞行时间质谱仪 (tims-TOF) 等。2023 年, 赛默飞推出了新一代质谱仪 Orbitrap Astral, 以进一步提升蛋白质组研究的覆盖深度、灵敏度和分析通量, 旨在帮助研究者更好地揭示生物系统的时空动态复杂性。

1 Orbitrap Astral 质谱仪的结构、原理与应用

1.1 Orbitrap Astral 质谱仪的组成

Orbitrap Astral 质谱仪, 主要由离子源、质量分析器、检测器和数据分析系统组成[1]。质谱仪内部包含三个真空区域: 前级真空、高真空和超高真空区域。前级真空区域从离子传输管的出口延伸至离子漏斗, 离子在该区域通过离子漏斗和 Orbitrap 间的电势差被引导传

输。高真空区域包括预四极杆、弯曲四极杆、四极杆、DPR trap、多级离子通道、离子处理器和 Astral 质量分析器。超高真空区域则包括 Orbitrap 质量分析器。

在运行过程中，小分子化合物或肽段首先通过离子源离子化，经离子传输管进入质谱仪的前级真空区域。离子在电动离子漏斗中聚焦，通过弯曲四极杆时去除中性干扰，随后进入质谱仪的第一个质量分析器——四极杆。四极杆不仅传输离子，还可通过电压变化对母离子进行筛选。筛选后的母离子进入 DPR trap 暂时存储。在一级全扫描（MS1）模式下，母离子无需碎裂，便可经由 DPR trap 直接进入第二个质量分析器——Orbitrap 质量分析器进行检测，离子的质荷比与信号强度信息被传送至数据分析系统并存储。

当母离子需要碎裂时，四极杆筛选出目标母离子，将其经 DPR trap 传送至离子处理器。离子处理器分为高压与低压区域，在高压区域内，离子完成聚集与碎裂；碎片离子在低压区域内趋于稳定后，经由离子注入光学元件聚焦进入 Astral 质量分析器中飞行。作为质谱仪的第三个质量分析器，Astral 将离子无差别地注入开放式静电阱中，离子在两个不对称反射电场之间振荡，沿约 30 米的飞行路径进行分离。这种配置可同时提供高扫描速率（每秒高达 200 张二级质谱谱图）、高质量精度（肽段通常为 1 ppm）以及高分辨率（高达 80,000）的检测性能，从而实现离子的快速精确扫描[2]。

1.2 Orbitrap Astral 质谱仪的进步之处

回顾质谱仪的发展历程，科学家为了满足不同的应用需求，研发了多种质量分析器组合的质谱仪形式，如扇形磁场、离子飞行时间、四极杆、傅里叶变换离子回旋共振（FT-ICR）和 Orbitrap 静电场轨道阱等。赛默飞的大部分质谱仪产品通常采用四极杆与 Orbitrap 质量分析器组合。众所周知，Orbitrap 质量分析器在充分离子注入时间下可实现高分辨率，但其缺点在于扫描速度受限。例如，OE480 质谱仪在分辨率 7500 时的扫描速度理论值仅为 40 Hz，而在最大分辨率 480,000 时扫描速度进一步降低。相比之下，飞行时间（TOF）质量分析器可提供极高的扫描速度，但其分辨率相对较低。在广泛的蛋白质鉴定深度和较短的时间成本上，这两种类型的质量分析器各具优缺点，难以兼得。

Orbitrap Astral 质谱仪较上一代 OE480 的最大改进之处在于引入了 Astral 质量分析器。新工作模式允许 Orbitrap 中的一级扫描与 Astral 中的二级扫描并行进行，这一设计相比于以往赛默飞 QE 和 OE 系列产品中一级母离子与二级碎片离子均需在 Orbitrap 中分析的模式，大大提升了工作效率[3]。一方面，在一个循环周期内一级扫描时间得到了充分保障，其分辨率从原来的 60,000-120,000 直接提升至 240,000-480,000；另一方面，在一级扫描的同时，Astral 作为专用的二级质量分析器，可实现高达 200 Hz 的扫描速度。

得益于 Astral 质量分析器的引入, Orbitrap Astral 质谱仪在蛋白质鉴定深度、定量准确性、灵敏度、动态范围和质量精度等方面取得了突破。这一进步在一定程度上帮助科研人员实现了以更短时间成本获得全面而可靠蛋白质组数据的目标, 比如 Guzman 等人使用 Astral 质谱仪在仅 8 分钟的测量时间内鉴定出超过 4,000 种酵母蛋白, 并在半小时内从癌细胞系样本中鉴定出 10,000 种人类蛋白质[1]。

1.3 Orbitrap Astral 质谱仪的应用场景

Orbitrap Astral 质谱仪无论在传统的无标记 (label-free) 蛋白质组分析中表现出色, 极大地提升了蛋白质鉴定深度和数据稳定性, 还是在标记定量方法 (如 TMT) 中实现了定性深度的显著突破。此外, Orbitrap Astral 质谱仪在推动单细胞蛋白质组学向更高分辨率和更广泛应用发展的过程中展现出巨大潜力。Julia A 等使用 Orbitrap Astral 质谱仪在 A549 细胞的单细胞蛋白质组中鉴定到 5200 多种蛋白[4-5]。此外, Orbitrap Astral 质谱仪的高灵敏度和广泛的定量动态范围使其非常适合于血浆等复杂生物样本分析。结合新开发的细胞外囊泡富集方案, 该仪器在 60 分钟的梯度分析中即可定量超过 5,000 种血浆蛋白质, 显著拓展了血浆蛋白质组的覆盖深度[6]。

2 实验结果与分析

2.1 实验步骤

本实验所用样本为 HeLa 细胞酶解肽段, Orbitrap Astral 质量分析仪串联 Vanquish Neo 液相系统用于 LC-MS/MS 分析。流动相分为 A 和 B 两相, A 相为 100% 水相 (0.1% 甲酸), B 相为 80% 乙腈相 (0.1% 甲酸)。使用商用 150 mm (ES906 C18, 12 μ m, 150 μ m) 分析柱分离肽段。

有效梯度约为 5 分钟、10 分钟和 20 分钟的三种方法, 实际梯度时长分别为 7 分钟、13 分钟和 23 分钟, 洗脱流速分别为 2.5 μ L/min, 1.8 μ L/min 和 0.8 μ L/min。洗脱梯度由 8%B 相升至 55%B 相, 并使用 99%B 相进行洗脱。质谱方法应用数据非依赖方法, 一级扫描分辨率设置 240, 000, 全扫描范围为 380-980 m/z。AGC 设置为 500%。二级碎片离子扫描使用 Astral 质量分析器, 设置 300 个 2-Th 扫描窗口, 范围为 380 至 980 m/z。二级碰撞能为 25%。

DIA 数据利用 DIA-NN1.8 软件进行搜库, 使用 library generation 功能基于 Uniprot 人源数据库生成谱图库。检索参数为: 胰蛋白酶酶切, 最多 2 个漏切位点, 固定修饰为 Carbamidomethyl(C), 可变修饰为 Oxidation(M), Acetyl (N-terminal), 最大可变修饰数为 2。选择 MBR 功能, FDR 值设置为 1.0%, 其他参数为默认。

2.2 蛋白质组鉴定深度比较

在有效梯度分别设置为约 5 分钟、10 分钟和 20 分钟条件下，各梯度的三次技术重复的总离子流图几乎重合（图 1），信号强度和峰形分布均匀，显示出良好的实验再现性。三种梯度方法的总离子流图的信号响应强度均达到 E10 级别。在定性分析结果中（图 2A-B），5 分钟梯度鉴定的肽段超过 120,000 种，蛋白质种类超过 9,000 种；20 分钟梯度下鉴定的肽段数则超过 160,000 种，蛋白质种类达到 10,000 种以上。

本实验还对三种不同梯度下的蛋白质鉴定结果重合度进行了比较（图 2C）。5 分钟梯度下与 20 分钟梯度下共同鉴定的蛋白质，覆盖了鉴定蛋白质总数的 83.3%；而 10 分钟梯度下与 20 分钟梯度下共同鉴定的蛋白质，覆盖了鉴定蛋白质总数的 87.9%。仅在 20 分钟梯度下独有的蛋白质占比为 6.3%，即 683 种蛋白质仅在 20 分钟梯度条件下被鉴定到。这些结果展示了在不同梯度条件下，Orbitrap Astral 质谱仪的高效鉴定能力和对蛋白质组的深度覆盖能力。

2.3 检测数据稳定性比较

通过比较在 5 分钟、10 分钟和 20 分钟梯度条件下的三次技术重复之间的中位变异系数（CV 值），对结果的稳定性进行评估。结果显示，各梯度方法组内重复性较为稳定，CV 值中位数保持在 4%-6%（图 3A）。半峰全宽（FWHM）统计结果显示（图 3A），不同梯度的半峰全宽均值分别为：5 分钟梯度为 0.3 分钟，10 分钟梯度为 0.4 分钟，20 分钟梯度为 0.6 分钟。为确保无标记定量的可靠性，进一步统计了各梯度条件下肽段母离子峰的扫描点数（图 3C），均值分别为：5 分钟梯度 2 个，10 分钟梯度接近 3 个，20 分钟梯度 4 个。

此外，对三种梯度方法的定量数据分布进行分析（图 4A），结果表明各梯度条件下，蛋白定量强度分布范围十分接近，数据呈现正态分布。数据热图呈现出蛋白定量值高低的一致性（图 4B）。三种梯度方法间的蛋白质定量结果相关性良好（图 5），任意两种梯度之间的定量相关系数均达到 0.92 或以上。具体而言，5 分钟梯度与 10 分钟梯度的相关系数为 0.92，与 20 分钟梯度的相关系数为 0.92，而 10 分钟梯度与 20 分钟梯度之间的定量相关系数为 0.94。

3 结论

赛默飞 Orbitrap Astral 质谱仪融合了 Orbitrap 质量分析器的 Astral 质量分析器的高采集频率，实现了在新形势下蛋白质组学对质谱仪综合效率的要求。相比以往的质谱仪，该仪器

显著提升了定性定量深度，同时有效缩短了检测时间。本实验结果基于定性定量分析和数据稳定性比较，为蛋白质组学研究提供了分析方法的参考。

参考文献：

- [1] Guzman, U.H., Martinez-Val, A., Ye, Z. et al. Ultra-fast label-free quantification and comprehensive proteome coverage with narrow-window data-independent acquisition. *Nat Biotechnol*, 2024.
- [2] Kuster, B., Tüshaus, J., and Bayer, F.P. A new mass analyzer shakes up the proteomics field. *Nat Biotechnol*, 2024.
- [3] Stewart HI, Grinfeld D., and Giannakopoulos A, et al. Parallelized Acquisition of Orbitrap and Astral Analyzers Enables High-Throughput Quantitative Analysis. *Anal Chem*, 2023.
- [4] Petrosius, V., Aragon-Fernandez, and P., Arrey, T., et al. Evaluating the capabilities of the Astral mass analyzer for single-cell proteomics. *bioRxiv*, 2023.
- [5] Julia A., Tabi W., and Eugen D., et al. Challenging the Astral mass analyzer — going beyond 5200 proteins per single-cell at unseen quantitative accuracy to study cellular heterogeneity. *bioRxiv*, 2024.
- [6] Petrosius, V., Aragon-Fernandez, and P., Arrey, T., et al. Evaluating the capabilities of the Astral mass analyzer for Quantitative Proteomics Using Data-Independent Acquisition. *J Pro Res*, 2023.

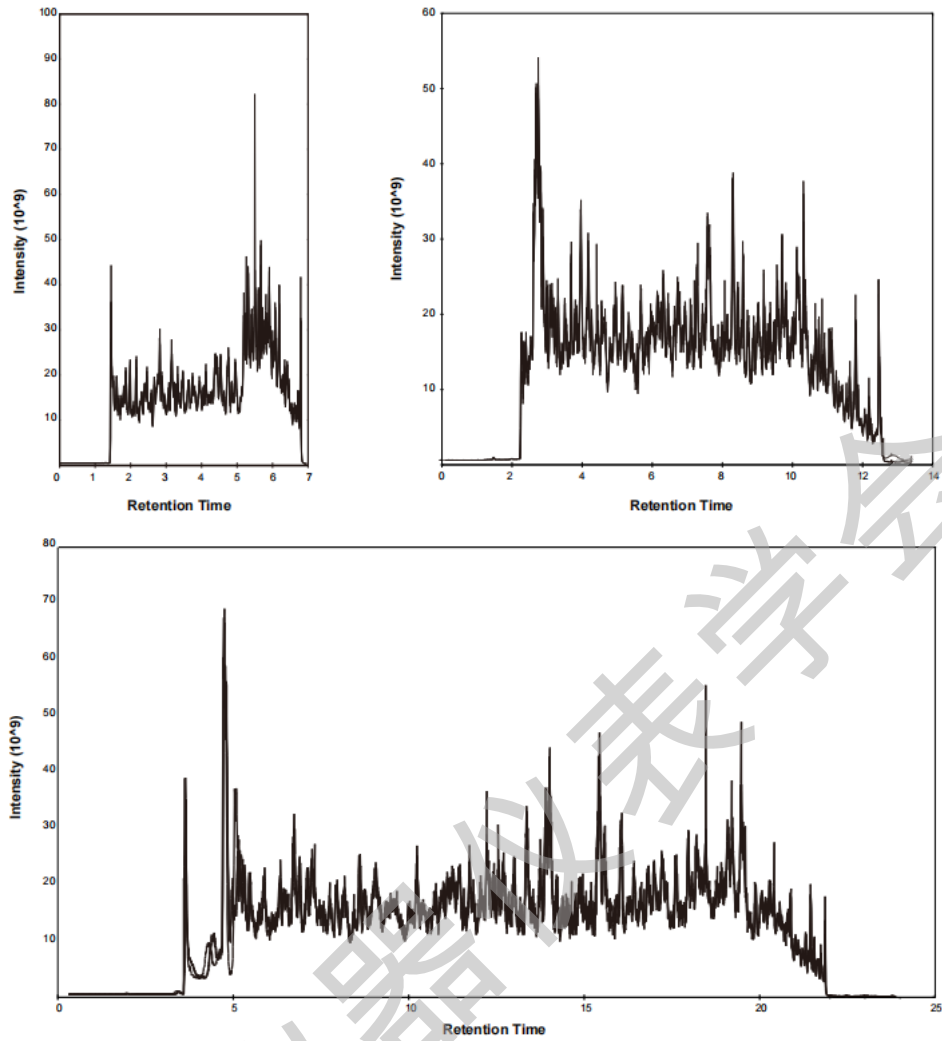


图 1 不同时间梯度条件下总离子流图

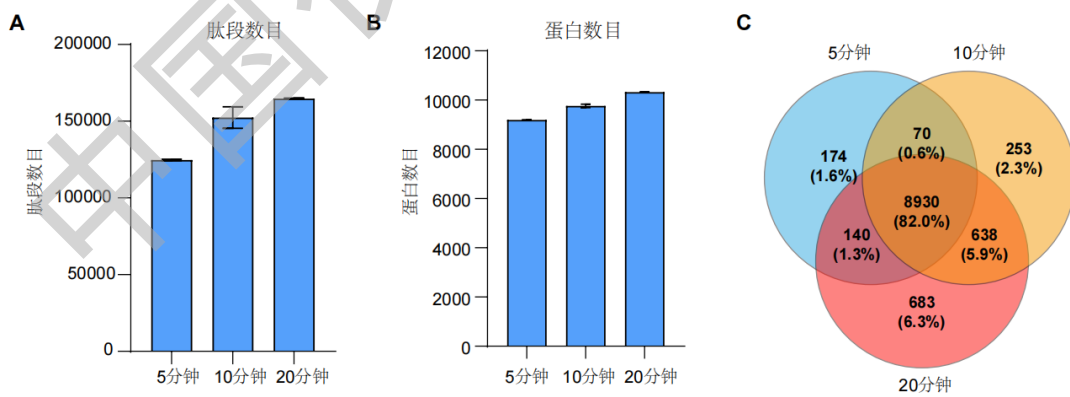


图 2 蛋白质组检测深度

A, 不同时间梯度条件下蛋白质组数据肽段鉴定数目。B, 不同时间梯度条件下蛋白质组数据蛋白质鉴定数目。C, 不同时间梯度条件下蛋白质组数据蛋白质鉴定重合度。

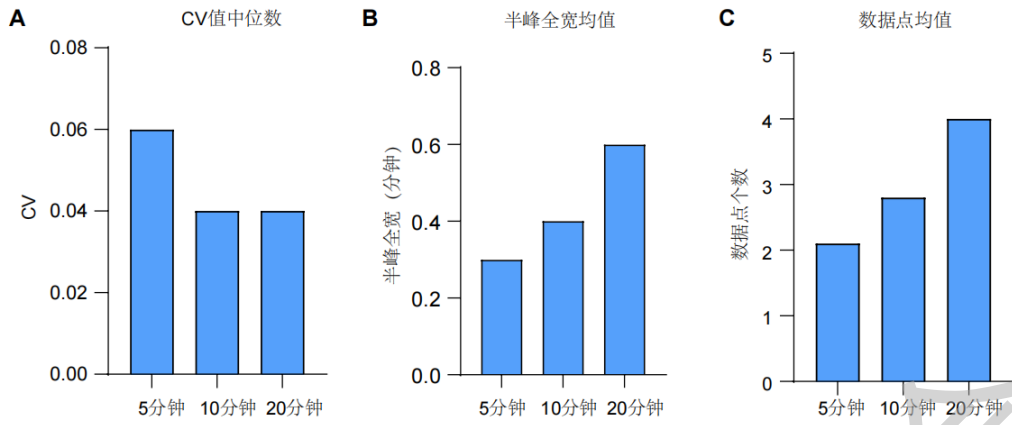


图3 蛋白质组数据稳定性

A, 不同时间梯度条件下蛋白质组数据 CV 值比较。B, 不同时间梯度条件下蛋白质组数据半峰全宽 FWHM 值比较。C, 不同时间梯度条件下蛋白质组数据信号峰对应数据采集点个数比较。

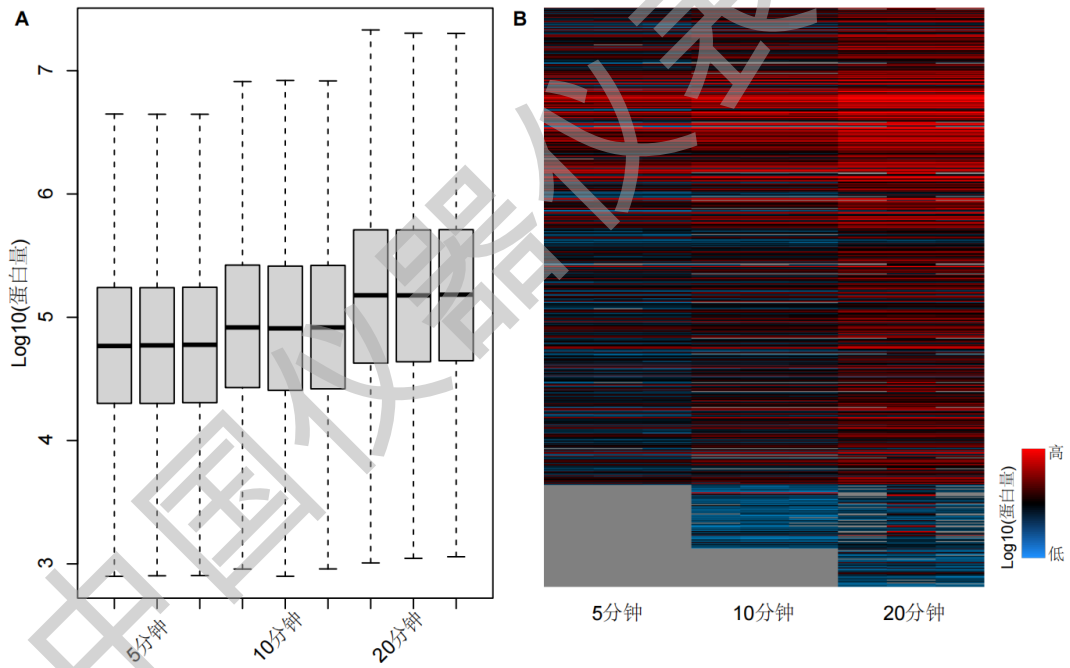


图4 蛋白质组数据分布

A, 不同时间梯度条件下蛋白质组数据分布比较。B, 不同时间梯度条件下蛋白质组数据热图。

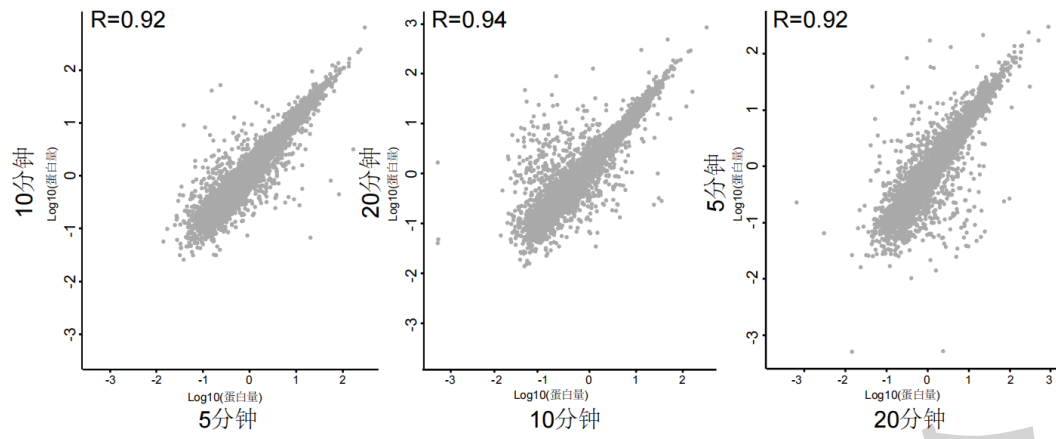


图5 不同时间梯度条件下蛋白质组数据的相关性

中国仪器仪表学会