

蛋白质组学

# 血浆蛋白质组学的新标准—平衡大队列样本分析中的通量和生物标志物发现深度

## 作者

Amirmansoor Hakimi<sup>1</sup>、Eugen Damoc<sup>2</sup>、  
Tabiwang N. Arrey<sup>2</sup>、Philip L. Loziuk<sup>1</sup>、David  
Horn<sup>1</sup>、Amarjeet Flora<sup>3</sup> 和 Sally Webb<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Thermo Fisher Scientific, 美国加利福尼亚州,  
圣何塞

<sup>2</sup>Thermo Fisher Scientific, 德国不莱梅

<sup>3</sup>Thermo Fisher Scientific, 美国伊利诺伊州,  
罗克福德

## 关键词

Orbitrap Astral 质谱仪、血浆蛋白质组学、  
富集、分级、蛋白质组覆盖、通量

## 目标

在新型 Thermo Scientific™ Orbitrap™ Astral™ 质谱仪上使用非标记的数据非依赖性采集 (DIA) 方法, 开发出一种能够在不影响分析深度的同时, 实现高通量的血浆蛋白质组学分析工作流程。

## 简介

血浆是蛋白质生物标志物的重要来源, 可用于揭示疾病生物学、分析对治疗的反应或用于诊断和预后。血浆蛋白质组学的主要优势在于可以很方便地从常规抽血中获取样本, 并且待分析的大队列样品可储存在生物库等位置。然而, 由于血浆中的蛋白质动态范围很宽, 因此使用自下而上的蛋白质组学方法分析这些生物标志物面临着很大的挑战。低丰度蛋白质的分析尤其具有挑战性, 因为 99% 的血浆由高丰度蛋白质, 如白蛋白、球蛋白和凝血因子等组成。在基于质谱的分析中, 这些高丰度蛋白质会严重影响低丰度蛋白质的检测, 并且可能用作生物标志物。<sup>1,2</sup>

制备血浆蛋白质组学的样本可以使用很多种方法，并没有标准。下文围绕其中一些方法展开讨论，突出这些方法的优点和缺点。

1. 未去除高丰度蛋白血浆—最简单的样本制备方法，通量最高。这种方法无需去除非特异性蛋白质，并最大限度地减少技术性差异。然而，可能无法检测到低丰度蛋白质。
2. 免疫方法去除高丰度蛋白—这种方法可以去除 99% 的高丰度蛋白质，并减轻动态范围的问题。缺点是无法去除非特异性蛋白质。为了匹配样本分析通量，需要自动化制备样本，每个样本会额外增加试剂成本。
3. 分级—采用离线方法将蛋白质分成不同的组分，复杂度降低。这种方法会增加制备和分析的时间，但是能够分析更多的血浆蛋白。
4. 选择性富集，例如使用 Seer Proteograph™ 纳米粒子 (www.seerbio.com)，其中，使用一组不同的纳米粒子能够广泛深度覆盖血浆蛋白质组。为了匹配分析通量，有必要自动化制备样本，每个样本会额外增加试剂成本。

无论采用哪种方法制备样本，都需要针对血浆蛋白质组学制定标准化的液相色谱 - 质谱 (LC-MS) 工作流程，以平衡覆盖深度与定量的准确性和精确度，并可扩展至分析大队列样本量。

凭借在速度和高灵敏度方面的优势，Orbitrap Astral 质谱仪为血浆蛋白质组学提供了一套新的高灵敏度性能标准，可以实现深度蛋白质组覆盖，快速高通量检测，同时确保定量准确性和精确度。

在本应用报告中，我们使用四种最常用的血浆样本制备方法，对新型 Orbitrap Astral 质谱仪用于血浆蛋白质组学研究的性能进行了评估。相比目前其他的商用质谱仪，相同梯度下，Orbitrap Astral 质谱仪能够实现两倍的蛋白质组覆盖。此外，由于其可实现两倍通量，因此该仪器可提供更高的蛋白质组覆盖。

这些实验中使用的工作流程如图 1 所示。

## 实验部分

### 推荐使用的耗材

- Fisher Scientific™ LC-MS 级水，含 0.1% 甲酸 (FA) (部件号 LS118-500)
- Fisher Scientific™ LC-MS 级 80% 乙腈 (ACN)，含 0.1% 甲酸 (部件号 LS122500)
- Fisher Scientific™ LC-MS 级甲酸 (部件号 A117-50)
- Thermo Scientific™ EasyPep™ MS 样本制备试剂盒 (部件号 A40006)
- Thermo Scientific™ High Select™ 高丰度蛋白去除离心柱 (部件号 A36370)



图 1. 作为血浆蛋白质组学工作流程的核心，Orbitrap Astral 质谱仪可进行灵活的分析，帮助您精确地达到实验目标。本款质谱仪可实现大队列样本的更快速的高通量检测，更深入的生物标志物覆盖，以及准确且精确的定量，提高统计学性能。

## LC 色谱柱

- Thermo Scientific™ EASY-Spray™ PepMap™ 色谱柱, 2 μm C18 150 μm x 15 cm ( 部件号 ES906 )
- Thermo Scientific™ PepMap™ Neo 捕获柱芯, 5 μm C18 300 μm x 5 mm ( 部件号 174500 )
- Thermo Scientific™ EASY-Spray™ PepMap™ Neo 色谱柱, 2 μm C18 75 μm x 75 cm ( 部件号 ES75750PN )
- Thermo Scientific™ μPAC™ Neo HPLC 色谱柱, 2.5 μm x 16 μm, 110 cm ( 部件号 COL-NANO110NEOB )

## HPLC 系统

Thermo Scientific™ Vanquish™ Neo UHPLC 系统, 包括:

- 二元泵 F ( 部件号 VF-P10-A )
- 柱温箱 H ( 部件号 VH-C10-A )
- 分流进样器 FT ( 部件号 VF-A10-A )
- 系统基座 Vanquish Horizon ( 部件号 VH-S01-A )

## 质谱仪

- Thermo Scientific Orbitrap Astral 质谱仪
- 喷针, 熔融石英, 内径 10 μm, 部件号 EV1111
- EasySpray 适配器, 部件号 EV-1072

## 数据分析软件

- Thermo Scientific™ Proteome Discoverer™ 3.1 软件由 Ardia™ 提供支持, 采用 MSAID™ 的 CHIMERYS™ 智能搜索算法

## 未去除高丰度蛋白血浆样品未去除高丰度蛋白血浆样品分析

采用两种 LC-MS 方法进行未去除高丰度蛋白血浆分析。采用每天运行 180 个样本 (180 SPD) 的方法可实现通量最大化, 而采用 36 SPD 方法可以确保蛋白质组的覆盖深度最大 ( 如图 2 所示 )。

这些实验中使用的未去除高丰度蛋白血浆样本均来自从多个供体采集的混合样本。根据制造商的方案, 采用 EasyPep MS 样本制备试剂盒制备样本。制备完成以后, 使用含 0.1%FA 的水重新溶解冻干肽段, 终浓度为 200 ng/μL。根据实验不同, 取 200 ng - 2000 ng 的酶解肽段上样到色谱柱, 进行 LC-MS 分析, 每个样品重复采集三次。对于本文所述的所有 LC-MS 分析 ( 去高丰度蛋白血浆和富集血浆 ), 流动相 A 均为含 0.1% FA 的水, 流动相 B 均为含 0.1% FA 的 80% ACN, 色谱柱温度为 50°C, 自动进样器温度为 7°C。

除了最大离子注入时间外, 所有实验 ( 包括去高丰度蛋白血浆和富集血浆 ) 均采用相同的 MS 方法参数 ( 如表 1 所示 ), 最大离子注入时间根据 SPD 方法进行调整 ( 如表 2 所示 )。根据实验和梯度时长设置此参数。



180 SPD 方法 ( 捕获 / 洗脱 ), 200 ng 上样  
EASY-Spray PepMap 15 cm 色谱柱

时间 分钟	持续时间 分钟	%B	流速 μL/min
0.0	0.0	4.0	2.5
0.2	0.2	8.0	2.5
4.0	3.8	20.0	2.5
5.8	1.8	35.0	2.5
色谱柱清洗			
6.2	0.4	99.0	2.5
6.7	0.5	99.0	2.5
停止运行			
色谱柱平衡			

24 SPD 方法 ( 直接进样 ), 1 μg 上样  
EASY-Spray PepMap Neo 75 cm 色谱柱

时间 分钟	持续时间 分钟	%B	流速 μL/min
0.0	0.0	4.0	0.3
20.0	20.0	25.0	0.3
25.0	5.0	35.0	0.3
色谱柱清洗			
30.0	5.0	99.0	0.3
40.0	10.0	99.0	0.3
停止运行			
色谱柱平衡			

图 2. 实现最大通量的 180 SPD 方法和实现最深覆盖的 24 SPD 方法。这些 SPD 方法包括上样、梯度、清洗和平衡时间, 因此 180 SPD 方法的总运行时间为 8 分钟。

表 1. 所有实验采用的 MS 方法参数

类别	属性	设置
方法设置	应用模式	肽
离子源	正离子 (V)	1,900
	离子传输管温度 (°C)	275
MS 整体设置	先进峰检测	是
	默认电荷价态	2
Orbitrap 分析器 全扫描	扫描范围 (m/z)	380–980
	Orbitrap 分辨率	240000
	最大离子注入时间 (ms)	5
	RF lens (%)	40
	AGC target (%)	500
	扫描范围 (m/z)	380–980
Astral 分析器 DIA MS2 扫描	隔离窗口 (m/z)	2
	窗口重叠 (m/z)	0
	窗口分布优化	开启
	扫描事件数量	299
	HCD 碰撞能量 (%)	25
	检测器类型	Astral
	最大离子注入时间 (ms)	根据实验要求设置
	AGC target (%)	500
	Loop control	时间
	Loop time (s)	0.6

表 2. 每种 SPD 方法的最大离子注入时间

SPD 方法	最大离子注入时间
180 SPD	3.5 ms
60 SPD	5 ms
48 SPD	10 ms
24 SPD	7 ms
18 SPD	10 ms
14 SPD	10 ms
4 SPD	10 ms

### 去高丰度蛋白血浆去高丰度蛋白血浆分析

采用 High Select 高丰度蛋白去除离心柱去除人血浆样本中的前 14 种高丰度蛋白质。用 Thermo Scientific™ Savant™ SpeedVac™ 浓缩仪干燥样品，然后用 EasyPep 裂解缓冲液重溶，并根据制造商的方案用 EasyPep MS 样本制备试剂盒进行处理。

采用 18 SPD 方法（共 80 分钟）评估去高丰度蛋白血浆蛋白质组覆盖的深度。每个样品重复采集三次（如图 3 所示）。



18 SPD 方法（直接进样），1 µg 上样 µPAC Neo 110 cm 色谱柱

时间 分钟	持续时间 分钟	%B	流速 µL/min
0.0	0.0	4.0	0.75
0.4	0.4	4.0	0.75
47.4	47.0	22.5	0.75
60.4	13.0	45.0	0.75
色谱柱清洗			
64.9	4.5	99.0	0.75
66.5	1.6	99.0	0.75
停止运行 色谱柱平衡			

图 3. 18 SPD 方法详情，包括上样、梯度、清洗和平衡时间，总运行时间为 80 分钟。

## 富集和分级血浆样本富集和分级血浆样本分析

Seer Proteograph 产品套件旨在采用一组具有不同物理化学性质的五种专利纳米粒子 (NP) 解决血浆中的动态范围限制问题。Proteograph 可以在宽动态范围的蛋白质组内对血浆蛋白质进行采样，产生的五个血浆组分可用于 LC-MS 分析。

根据制造商的方案，使用 Seer SP100 自动化仪器，用 Proteograph 检测试剂盒制备人血浆样本。使用多种不同的 LC-MS 方法进行通量（从高到中等）和最大分析深度的评估。

通过分析 Seer Proteograph 产品套件生成的五个单独组分，可以对血浆进行最有深度的分析。针对以此方式生成的样本，我们还对通量和蛋白质组覆盖的深度进行了评估（如图 4 所示）。

除了单独分析五个组分之外，还将组分进行混合，用于单次进样 LC-MS 分析，从而进一步评估通量和蛋白质组覆盖深度（如图 5 所示）。



图 4. 采用多种方法评估 Seer 单个血浆组分的高通量分析和覆盖深度间的平衡。



图 5. 采用两种方法评估 Seer 混合血浆组分的中等通量和覆盖深度间的平衡。

## 数据处理参数

使用 Proteome Discoverer 软件 3.1 版进行数据处理（如图 6 所示）。CHIMERYs 节点中，使用人类蛋白质数据库 FASTA 文件（从 uniprot 下载，Tx ID 9606），并且使用 Inferys 预测模型 3.0 版进行 CHIMERYs 搜索。甲硫氨酸氧化和半胱氨酸烷基化分别设置为动态和固定修饰。设置胰蛋白酶，每条肽段最多有 2 个漏切位点。

## 结果和讨论

### 未除高丰度蛋白血浆

由于样本制备过程中不包括高丰度去除或富集步骤，因此未除高丰度蛋白血浆能够实现最高的通量。相较于其他样本制备方法，高丰度蛋白质的存在限制了蛋白组覆盖的深度。

然而，由于 Orbitrap Astral 质谱仪的高灵敏度扫描速度，短 LC 梯度和长 LC 梯度的未去除高丰度蛋白血浆的蛋白质组覆盖深度均超过了目前为止公布的数据 3-5 为上标（如图 7 所示）。

### 去高丰度蛋白血浆

考虑到高丰度去除步骤，去高丰度蛋白血浆样本制备方法可实现中等通量。对于以此方式制备的血浆样本，我们采用长梯度方法（24 SPD 方法）评估蛋白组覆盖的深度。

当使用深度蛋白组覆盖方法时，该方法的蛋白质组覆盖深度比未除高丰度蛋白血浆增加约 2 倍。Orbitrap Astral 质谱仪的高灵敏度扫描速度，使得去高丰度蛋白血浆蛋白质组的覆盖深度超过了目前为止公布的数据 6 为上标（如图 8 所示）。

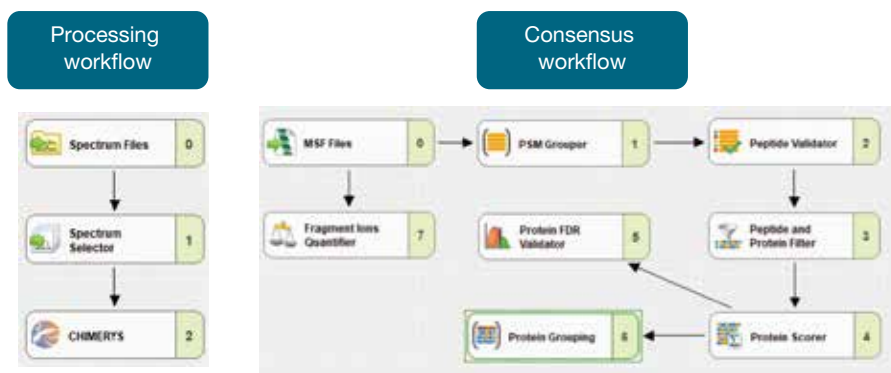


图 6. Proteome Discoverer 3.1 软件由 Ardia 提供支持，采用 MSAID 的 CHIMERYs 智能搜索算法。

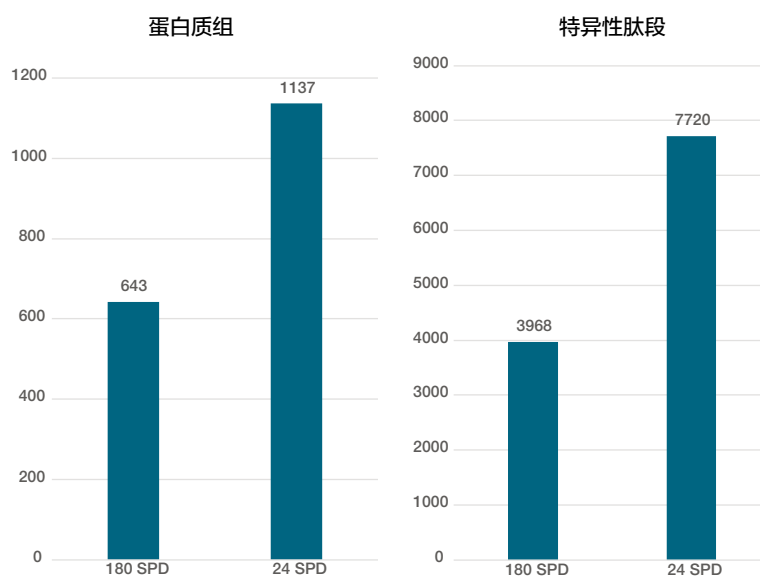


图 7. 180 SPD 高通量方法实现 643 个蛋白质组鉴定的蛋白组覆盖深度，远远高于类似条件下文献 3 中报告的覆盖深度。使用 24 SPD 方法运行更长的梯度，可以鉴定 1,137 个蛋白质组，也高于目前为止文献中报告的数据<sup>4,5</sup>。

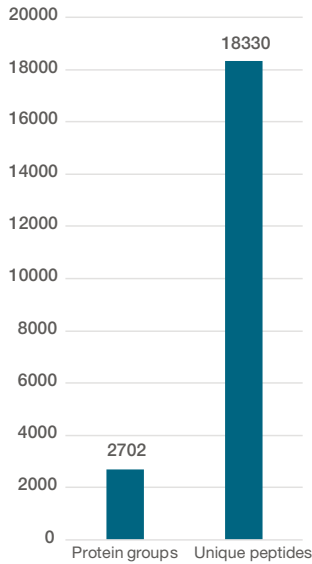


图 8. 对于去高丰度蛋白血浆，使用 18 SPD 方法运行更长的梯度，可以增加覆盖深度，鉴定的蛋白质组数量可达 2,702 个，比目前为止在类似条件下报告的数量多 1.5 倍<sup>6</sup>。

### Seer 富集血浆组分

评估 Proteograph 生成的各个组分的通量和覆盖深度。同时，混合所有组分，使通量最大化并评估覆盖深度。对于单个组分分析，SPD 方法 / 时间指的是每个组分，因此 180 SPD 方法指的是 36 份血浆样本，每份血浆样本由 5 个组分构成。

血浆分析的方法因用户而异。一些用户使用毛细管流速，可以提高分析的稳健性，而另一些用户更喜欢使用高灵敏度的纳流分析。使用毛细管流速分析时，36 SPD 通量下可以鉴定 3,104 个蛋白质组（单个组分分析），而使用纳流分析时，60 SPD 通量下可以鉴定 3,285 个蛋白质组（混合组分，单次进样）。对比单个组分和混合组分的通量和覆盖深度，所鉴定的蛋白质数量超过文献中报告的数量（如图 9 所示）。

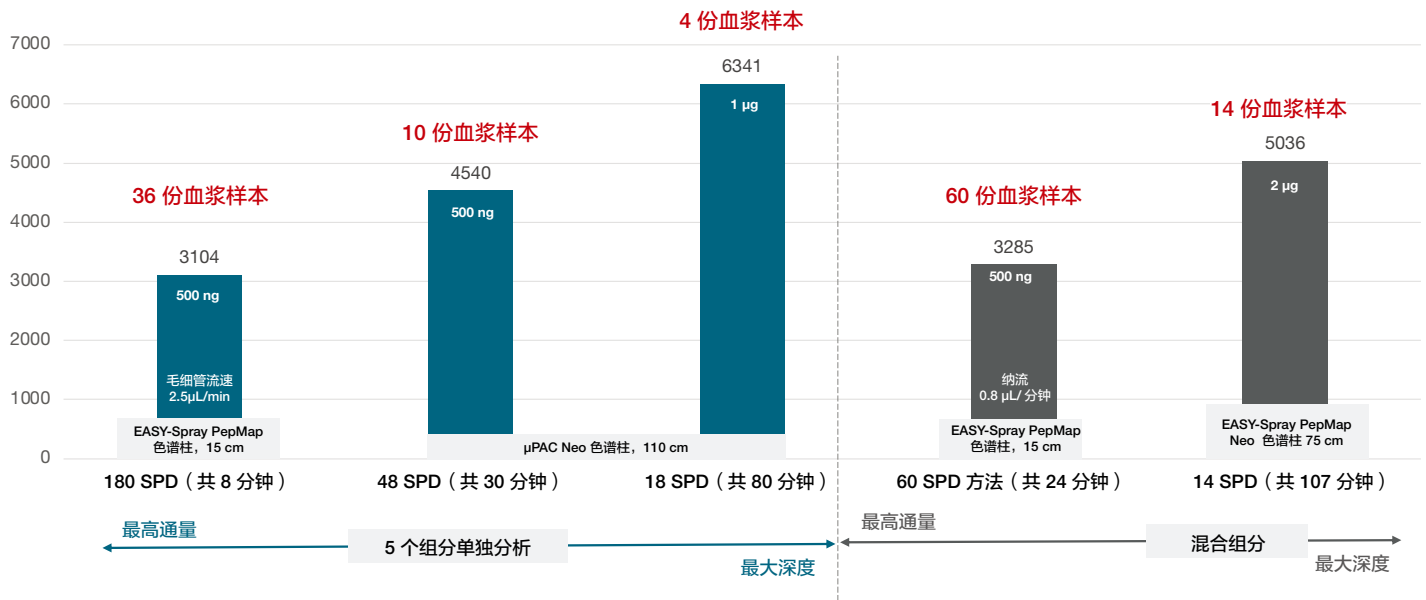


图 9. Orbitrap Astral 质谱仪获得的 Seer 富集血浆样本结果。评估单个组分和混合组分的蛋白质组覆盖度和通量。

## 综述

未去除高丰度血浆面临着动态范围的问题，蛋白组覆盖度比去除了高丰度的血浆要低。采用 Seer 方法富集 / 分级可以实现更深入的分析，同时满足对高通量的需求。

与目前的质谱仪相比，无论选择何种样本制备方法进行血浆蛋白质组学分析，Orbitrap Astral 质谱仪都能实现最高的蛋白质组覆盖度和最大的通量 3-6 为上标（如图 10 所示）。

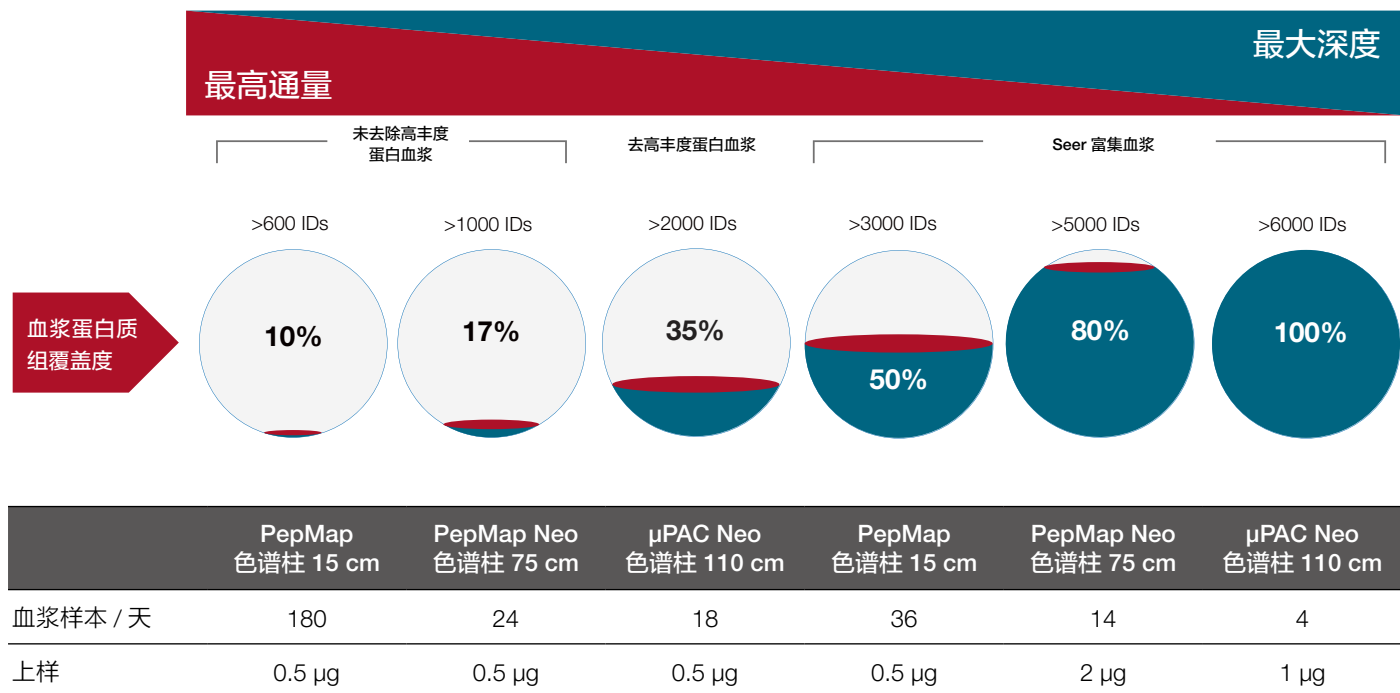


图 10. Orbitrap Astral 质谱仪获取的血浆蛋白组结果汇总

## 参考文献

1. Schiess, R. et al. Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery, *Molecular Oncology*, 2009, 3(1).
2. Shammel Baker, E. et al. Mass spectrometry for translational proteomics: progress and clinical implications, *Genome Medicine*, 2012, 4(63).
3. Mc Ardle A. et al. Standardized workflow for precise mid- and high-throughput proteomics of blood biofluids, *Clinical Chemistry* 2022, 68(3), 450–460.
4. Geyer, E. P. et al. High-resolution serum proteome trajectories in COVID-19 reveal patient-specific seroconversion, *EMBO Mol Med*, 2021, 13:e14167.
5. Viode, A. et al. A simple, time- and cost-effective, high-throughput depletion strategy for deep plasma proteomics, *Science Advances*, 2023, 9(13), eadf9717.
6. Cao, X. et al. Evaluation of spin columns for human plasma depletion to facilitate MS-based proteomics analysis of plasma, *J. Proteome Res.* 2021, 20(9), 4610–4620.
7. Ferdosi, S. et al. Engineered nanoparticles enable deep proteomics studies at scale by leveraging tunable nano-bio interactions, *PNAS*, 2022, 119 (11).



赛默飞  
官方微信



赛默飞色谱  
与质谱中国

热线 800 810 5118  
电话 400 650 5118  
[www.thermofisher.cn](http://www.thermofisher.cn)

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC