

碧云天蛋白质组学服务

Proteomics Services by Beyotime



碧云天
Beyotime



碧云天网站



微信公众号

碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology

订购热线：400-168-3301或800-8283301

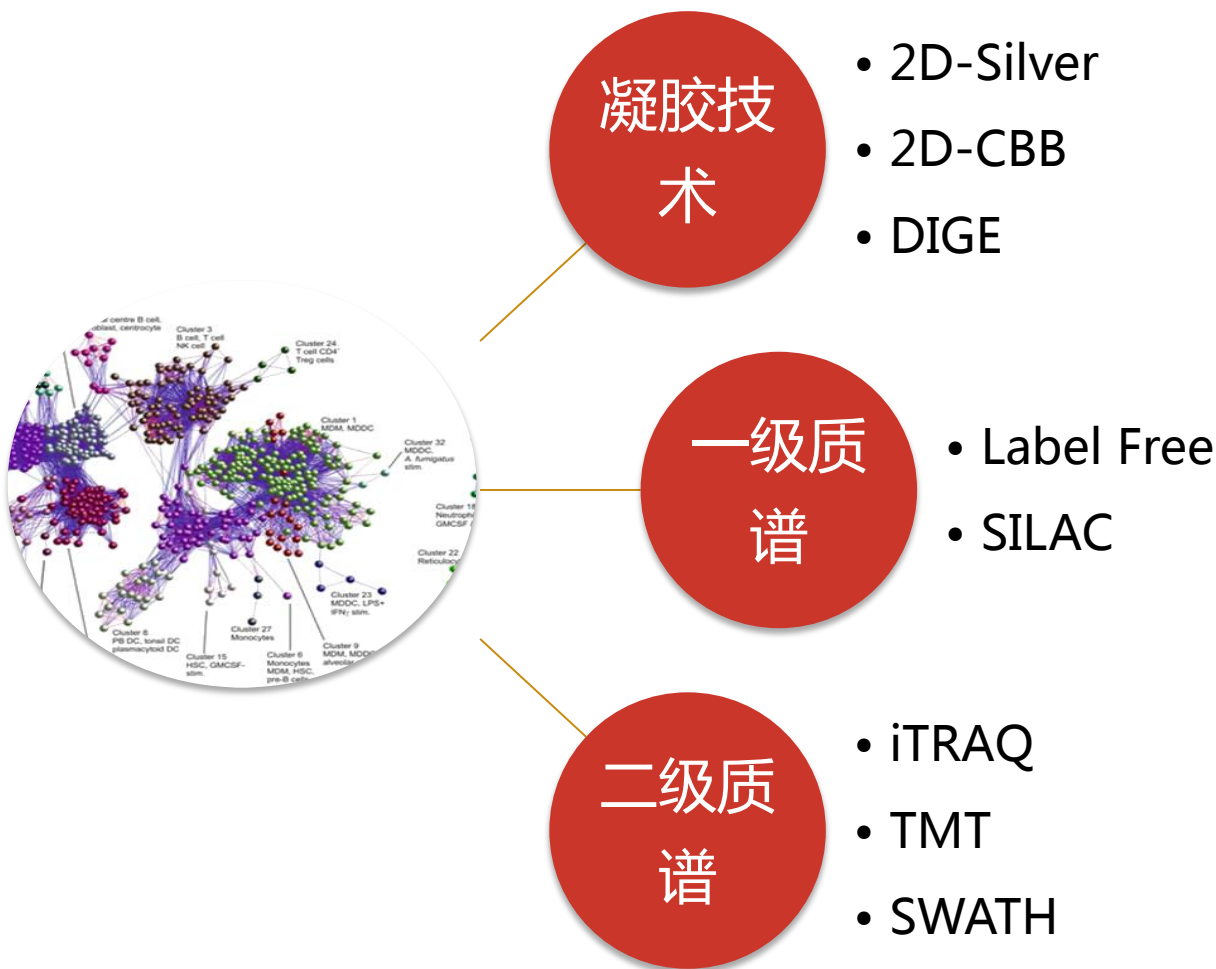
技术咨询：info@beyotime.com

技术服务：service@beyotime.com

网址：<http://www.beyotime.com>

碧云天蛋白质组学技术服务

常用蛋白质组定量技术



碧云天蛋白质组学技术服务

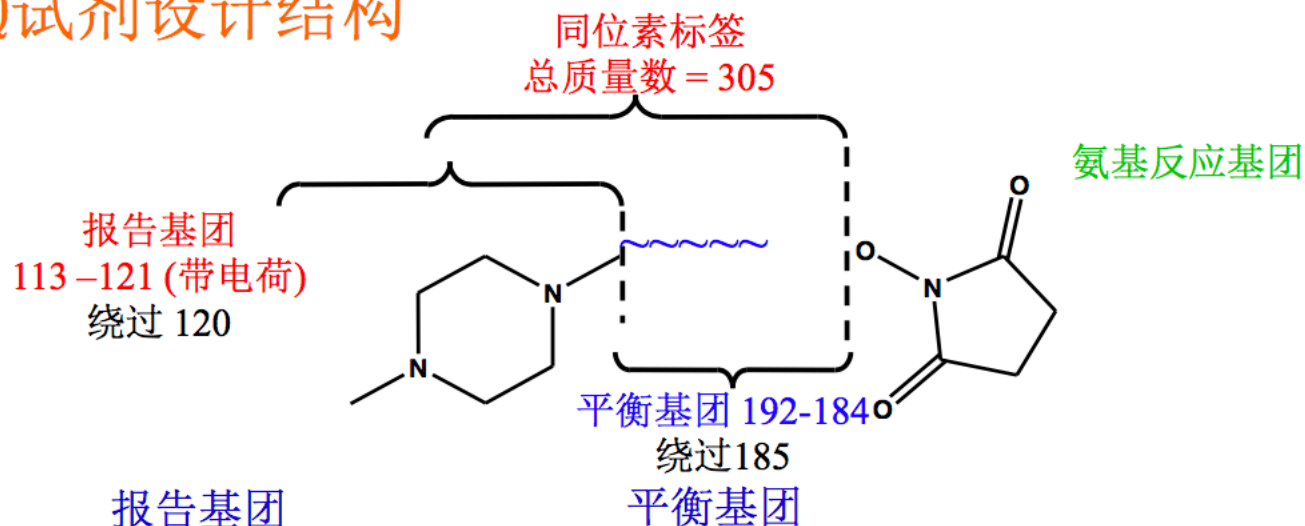
iTRAQ标记定量原理

- iTRAQ(isobaric tags for relative and absolute quantitation , 同位素标记相对与绝对定量)技术是由ABI公司开发, 其标签试剂可与氨基 (包括氨基酸N端及赖氨酸侧链氨基)反应实现连接, 标记通量分为4标和8标。
- 在一级质谱中, 不同来源的相同肽段被连接上总质量相同的完整 iTRAQ标签试剂, 具有相同质荷比, 表现为一个峰。
- 在二级质谱中, iTRAQ标签试剂在不同基团连接处发生断裂, 试剂中报告基团表现信号(平衡基团发生中性丢失), 根据不同报告基团信号峰强弱进行肽段定量并根据肽段二级质谱信息实现肽段定性, 并最终回溯到蛋白水平。

碧云天蛋白质组学技术服务

iTRAQ试剂结构

8重iTRAQ试剂设计结构



R（精氨酸）的亚胺
离子-112

报告基团



113
114
115
116
117
118
119
121

+

平衡基团



192
191
190
189
188
187
186
184

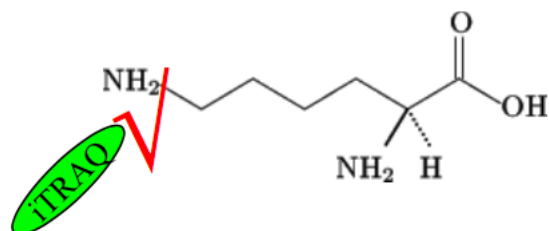
= 305

F（苯丙氨酸）的亚
胺离子-120

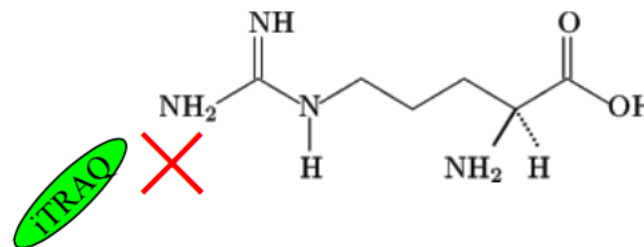
碧云天蛋白质组学技术服务

iTRAQ标记定量原理

- iTRAQ标记肽段质量数的改变
- 只要有氨基端，肽段至少都会加上一个iTRAQ标签
- 另外赖氨酸等侧链氨基也会被iTRAQ标签标记



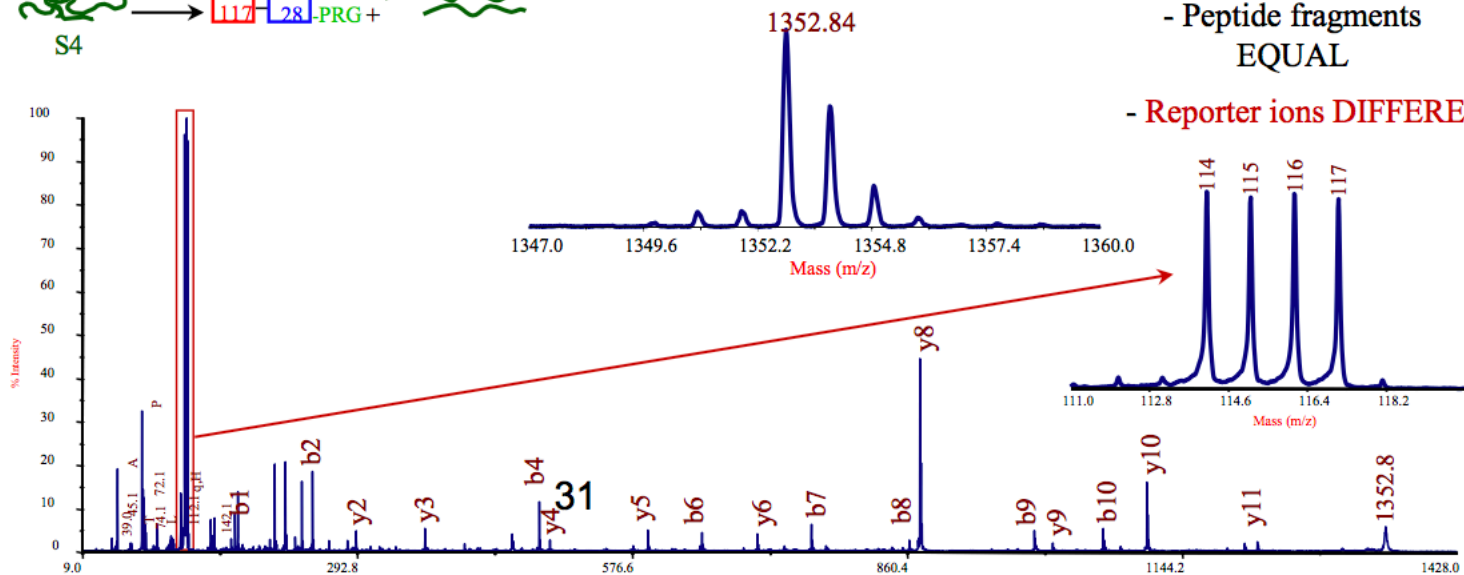
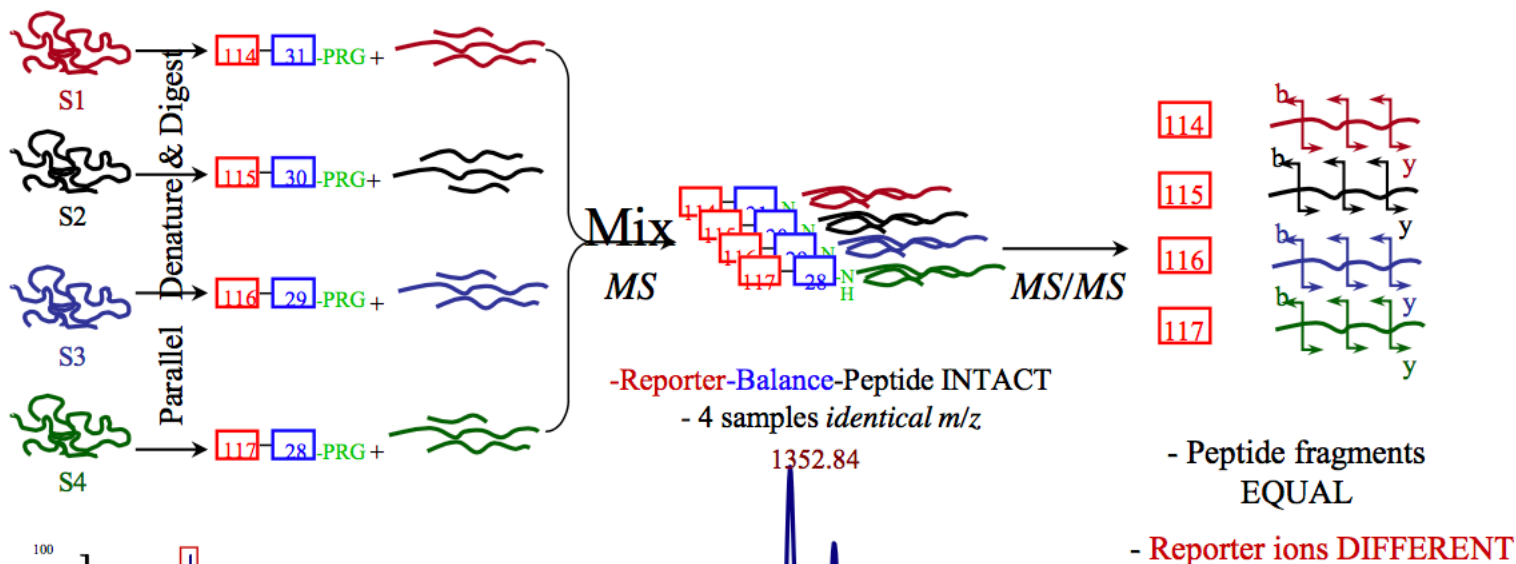
赖氨酸 (K)



精氨酸 (R)

位点	举例	标签数	增加质量数
R	YLYEIAR	1	144
K	GACLLPK	2	288
2K	ECCDKPLLEK	3	432

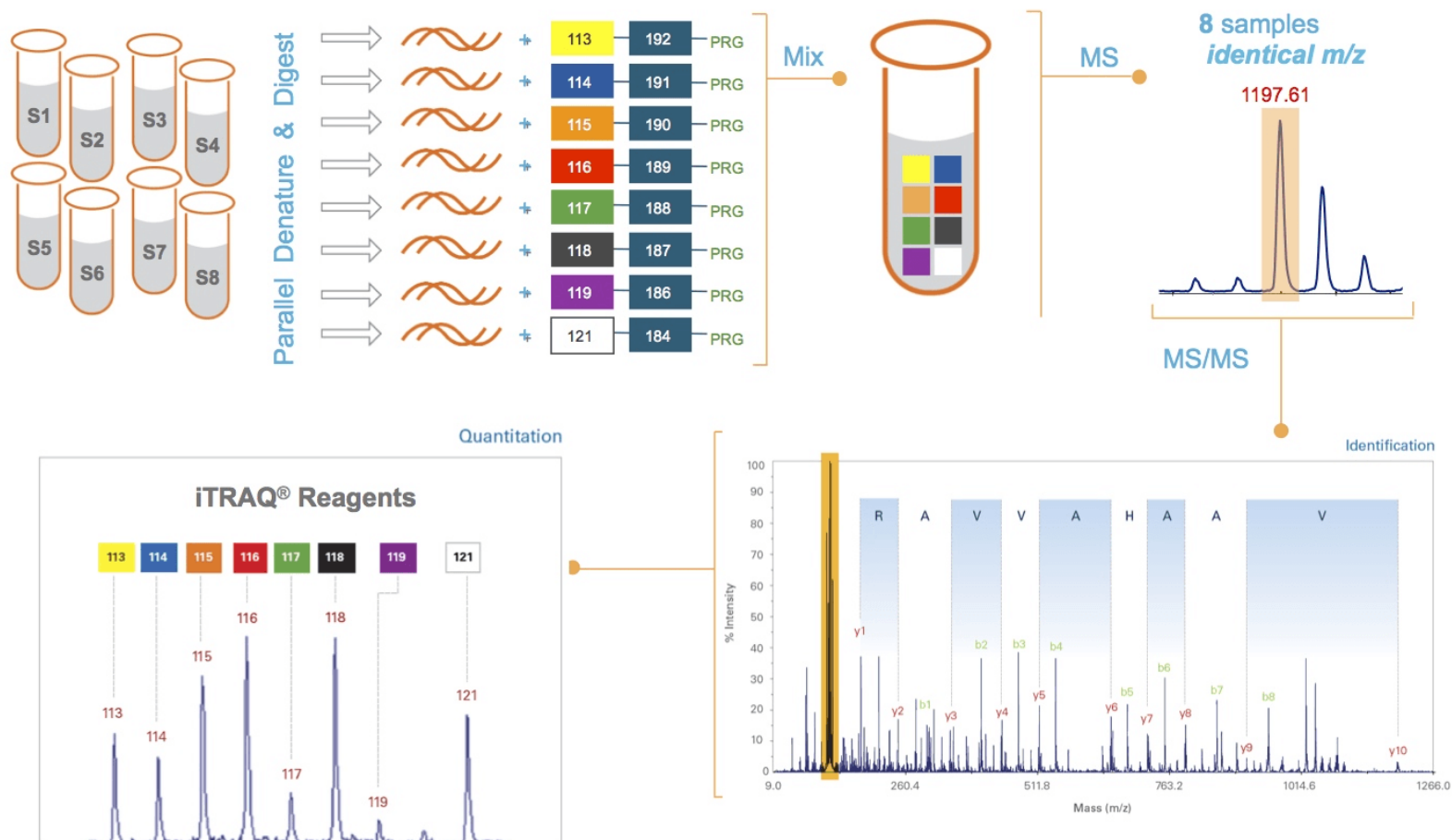
iTRAQ标记定量原理



碧云天蛋白质组学技术服务

iTRAQ工作流程

iTRAQ® Reagents Workflow



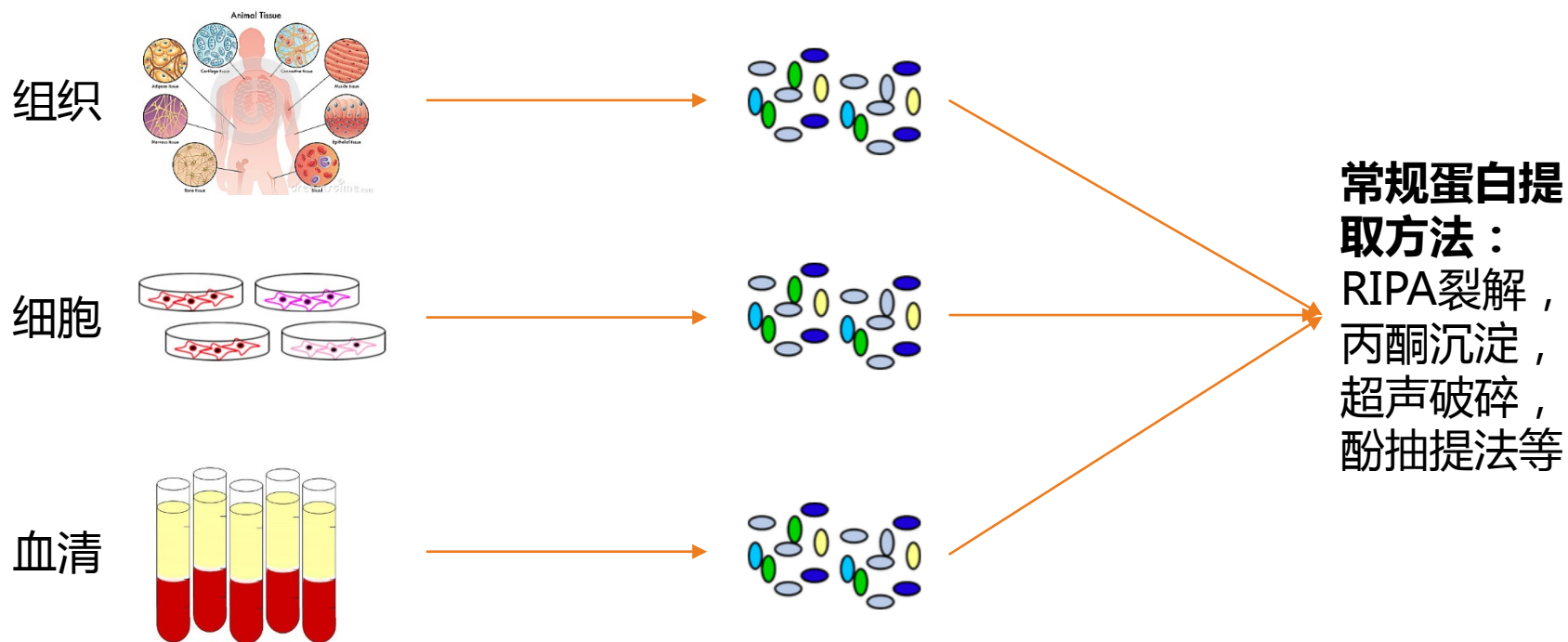
碧云天蛋白质组学技术服务

iTRAQ实验流程



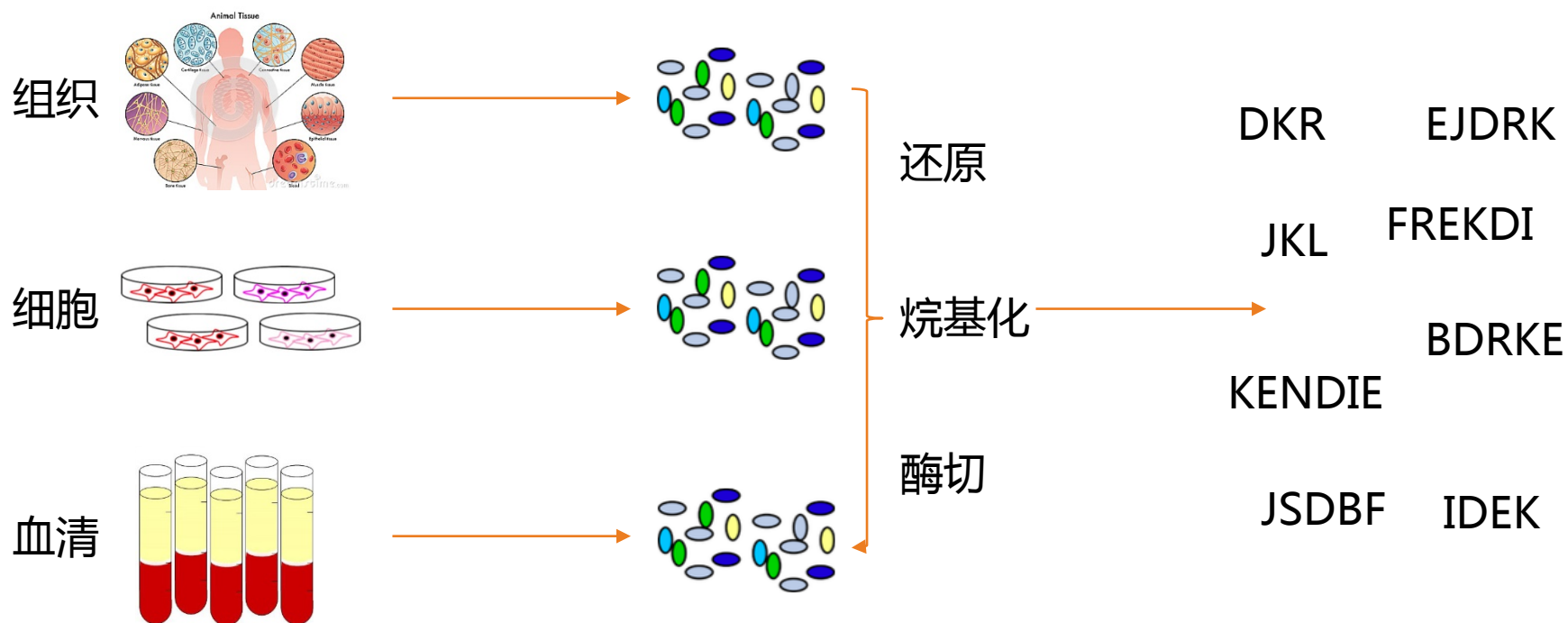
碧云天蛋白质组学技术服务

样品处理与蛋白提取



碧云天蛋白质组学技术服务

蛋白还原、烷基化和酶切



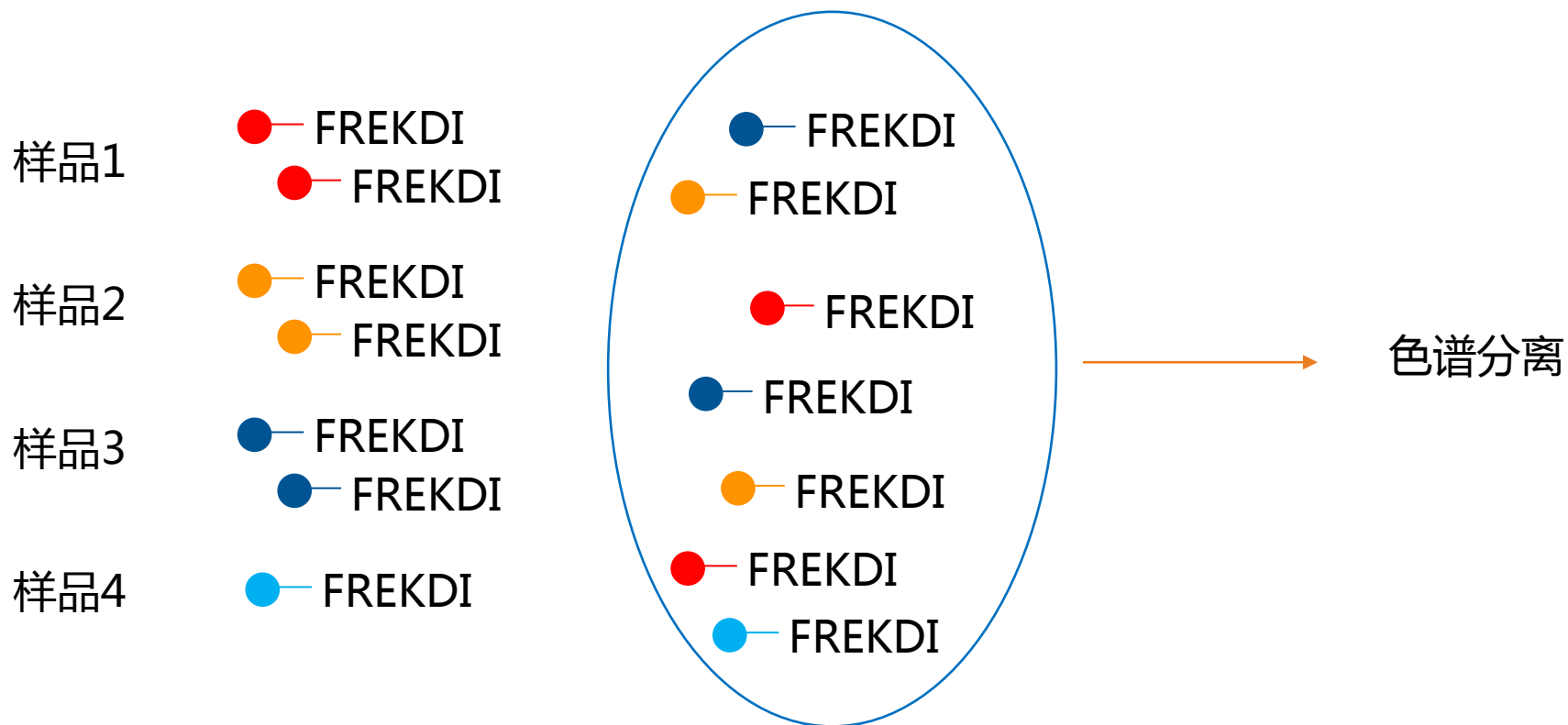
碧云天蛋白质组学技术服务

标记肽段

样品1	FREKDI FREKDI	Label 114 →	● FREKDI ● FREKDI
样品2	FREKDI FREKDI	Label 115 →	● FREKDI ● FREKDI
样品3	FREKDI FREKDI	Label 116 →	● FREKDI ● FREKDI
样品4	FREKDI	Label 117 →	● FREKDI

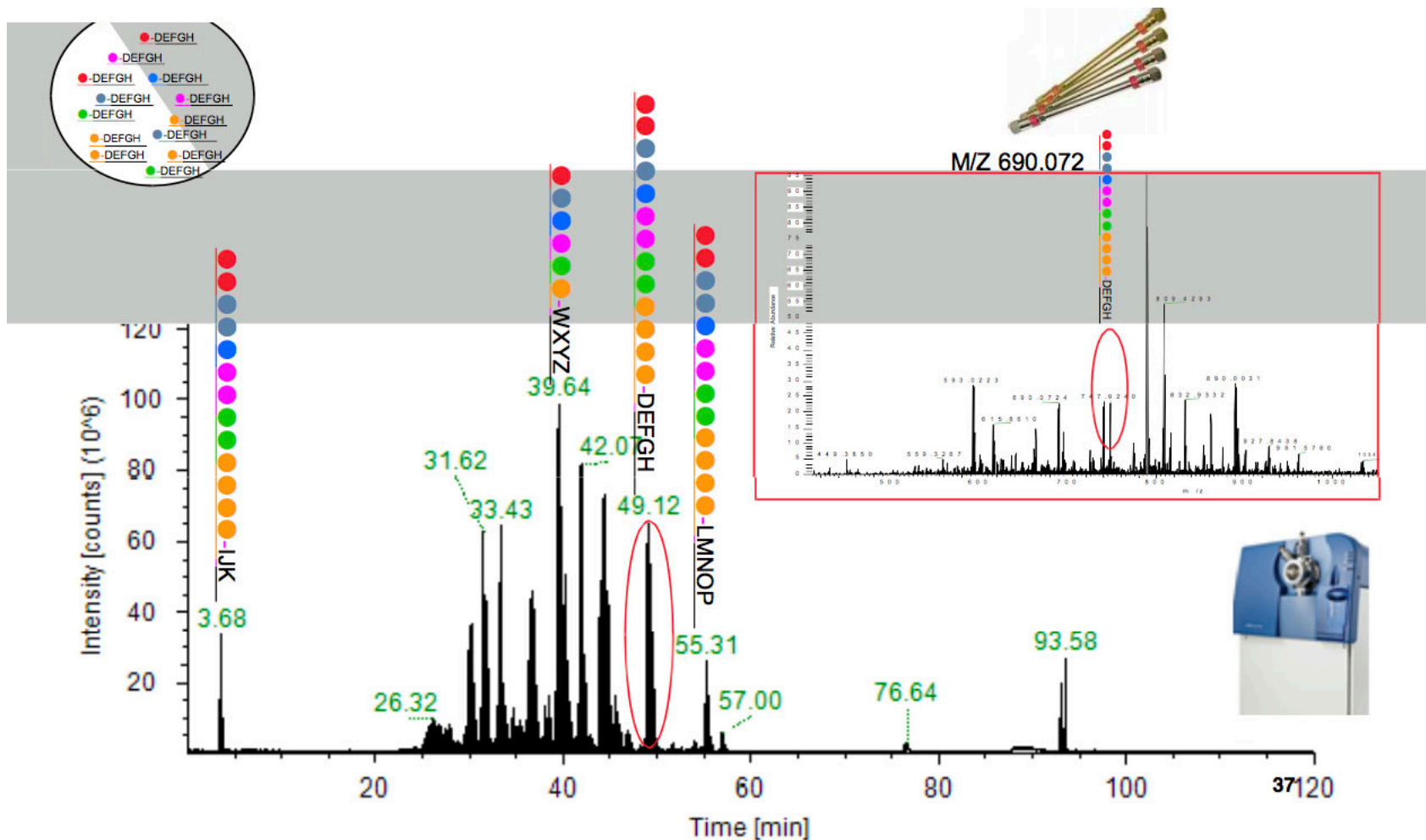
碧云天蛋白质组学技术服务

样品混合与分离



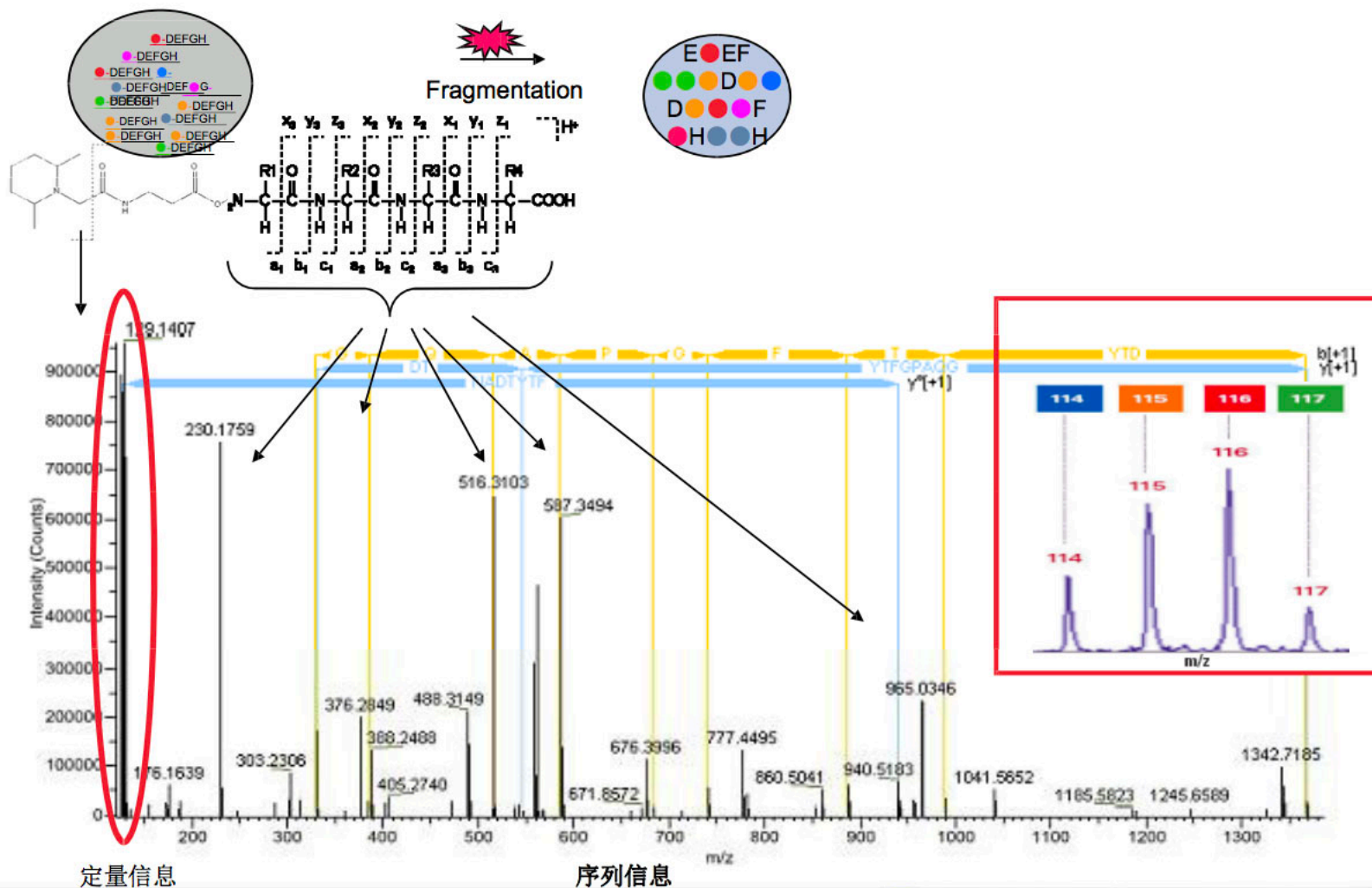
碧云天蛋白质组学技术服务

LC/MS质谱分析



碧云天蛋白质组学技术服务

LC/MS质谱分析



碧云天蛋白质组学技术服务

iTRAQ技术优势

- 通量高:可一次实现最多8-10次样品的分离分析
- 适用范围广:体外标记，可标记各种动物、植物、微生物、细胞、体液等样品
- 重复性好且定量准确:所有样品的分离鉴定条件完全一致，保证了实验重复性，同时增强定量的准确性
- 分辨率高:可与最高分辨率的LC-MS/MS技术结合，实现对低丰度蛋白的定量定性
- 自动化程度高:以高分辨率液质联用为基础，自动化操作，分析速度快

碧云天蛋白质组学技术服务

iTRAQ应用领域



碧云天蛋白质组学技术服务

iTRAQ服务流程

➤ 客户提供：

- 蛋白提取液（组织，细胞，血液，尿液等，需符合《碧云天蛋白质组学生物送样要求》）
- 《碧云天蛋白质组学服务询价单》。
- 《碧云天蛋白质组学生物样本信息表》

➤ 碧云天提供：

- 完整的蛋白质组学实验报告。
- 生物信息学分析结果。
- 蛋白质谱检测原始数据。

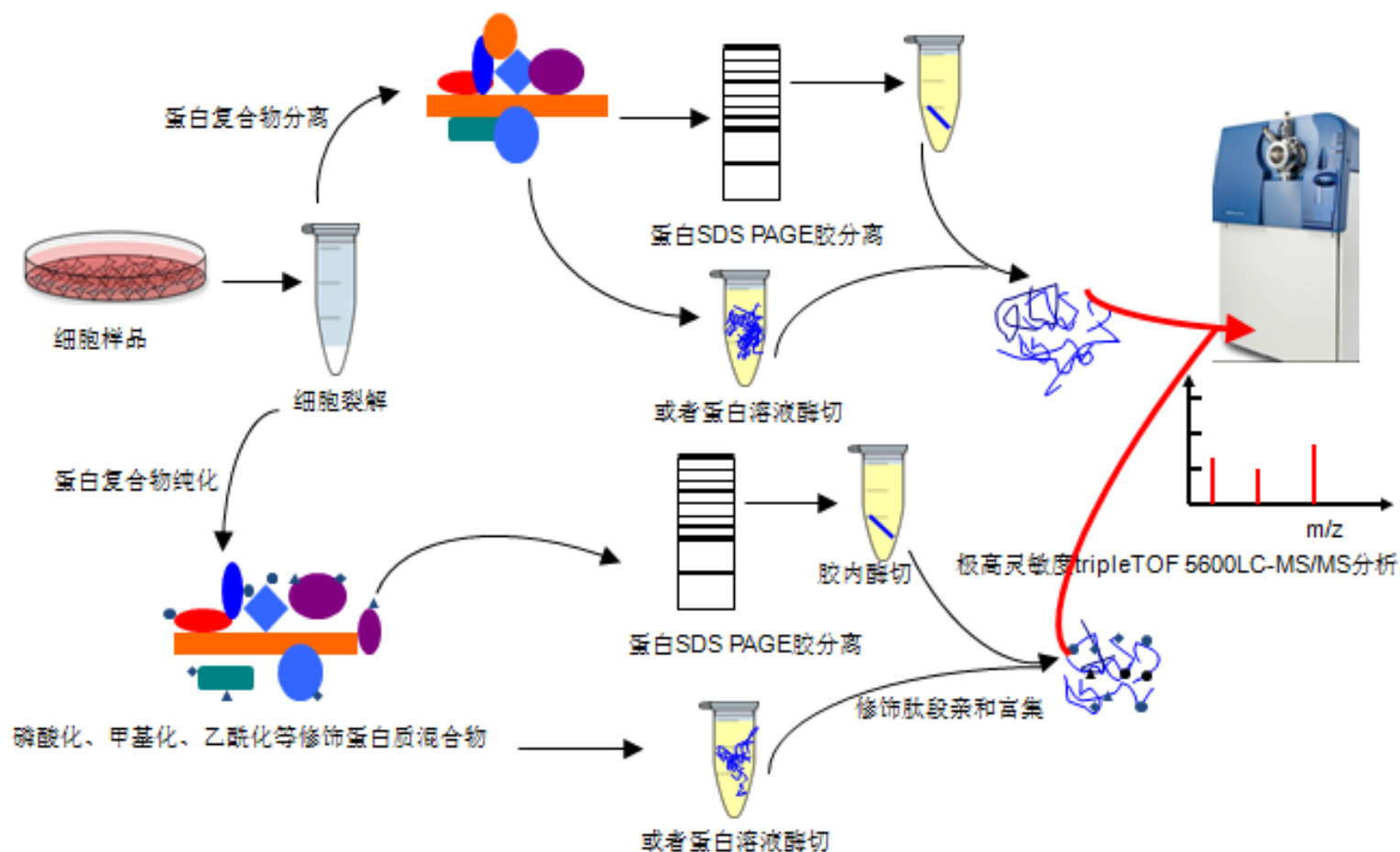
碧云天蛋白质组学技术服务

非标记蛋白组 (Label Free) 定量原理

- 随着非凝胶技术的发展，“鸟枪法”蛋白质组学(“Shotgun” proteomics) 技术，已成为研究复杂生物样本中大规模蛋白质表达和定性、定量分析的强有力工具。
- 在非标记策略的定量模型中，主要涉及两种不同的算法：
 - ✓ 以肽段的色谱峰积分面积为基础，通过比较一对生物样品中相对应到蛋白质酶解多肽的色谱积分面积而得到两者的相对丰度。
 - ✓ 以肽段被质谱检测的计数为基础，通过归一化来表征被检测蛋白质的相对丰度。非标记技术认为肽段在质谱中被捕获检测的频率 (Counts) 与其在混合物中的丰度成正相关，因此蛋白质被质谱检测的计数反映了蛋白质的丰度，通过适当的数学公式可以将质谱检测计数与蛋白质的量联系起来，从而对蛋白质进行定量。

碧云天蛋白质组学技术服务

Label Free蛋白组学定量流程



碧云天蛋白质组学技术服务

Label Free蛋白质组学实验流程

样本处理、
蛋白提取



蛋白酶解



高效液相
HPLC预分离



MS质谱
检测



原始数据
搜库分析



生物信息
学分析

碧云天蛋白质组学技术服务

*Label Free*技术优势

- 快速在大量样本中找到差异表达的蛋白集合。
- 在较短时间以较低成本得到具有提示意义的蛋白表达数据。
- 对待测样品蛋白含量要求不高。
- 可以检测含量很少的相互作用蛋白。

碧云天蛋白质组学技术服务

Label Free服务流程

➤ 客户提供：

- 蛋白提取液（组织，细胞，血液，尿液等，需符合《碧云天蛋白质组学生物送样要求》）
- 《碧云天蛋白质组学服务询价单》。
- 《碧云天蛋白质组学生物样本信息表》

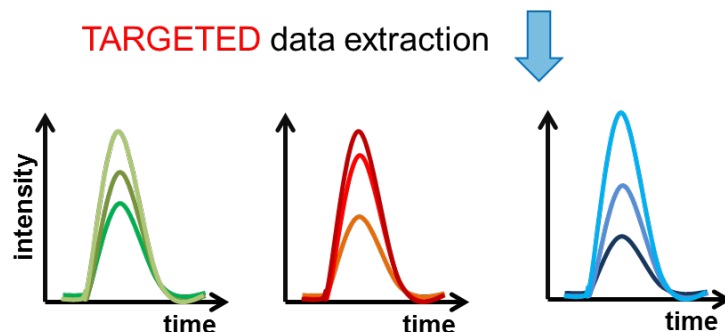
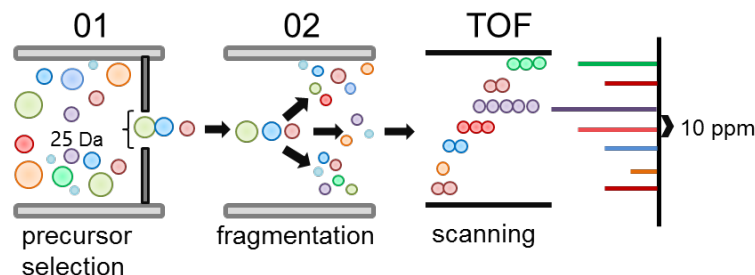
➤ 碧云天提供：

- 完整的蛋白质组学实验报告。
- 生物信息学分析结果。
- 蛋白质谱检测原始数据。

碧云天蛋白质组学技术服务

DIA/SWATH定量原理

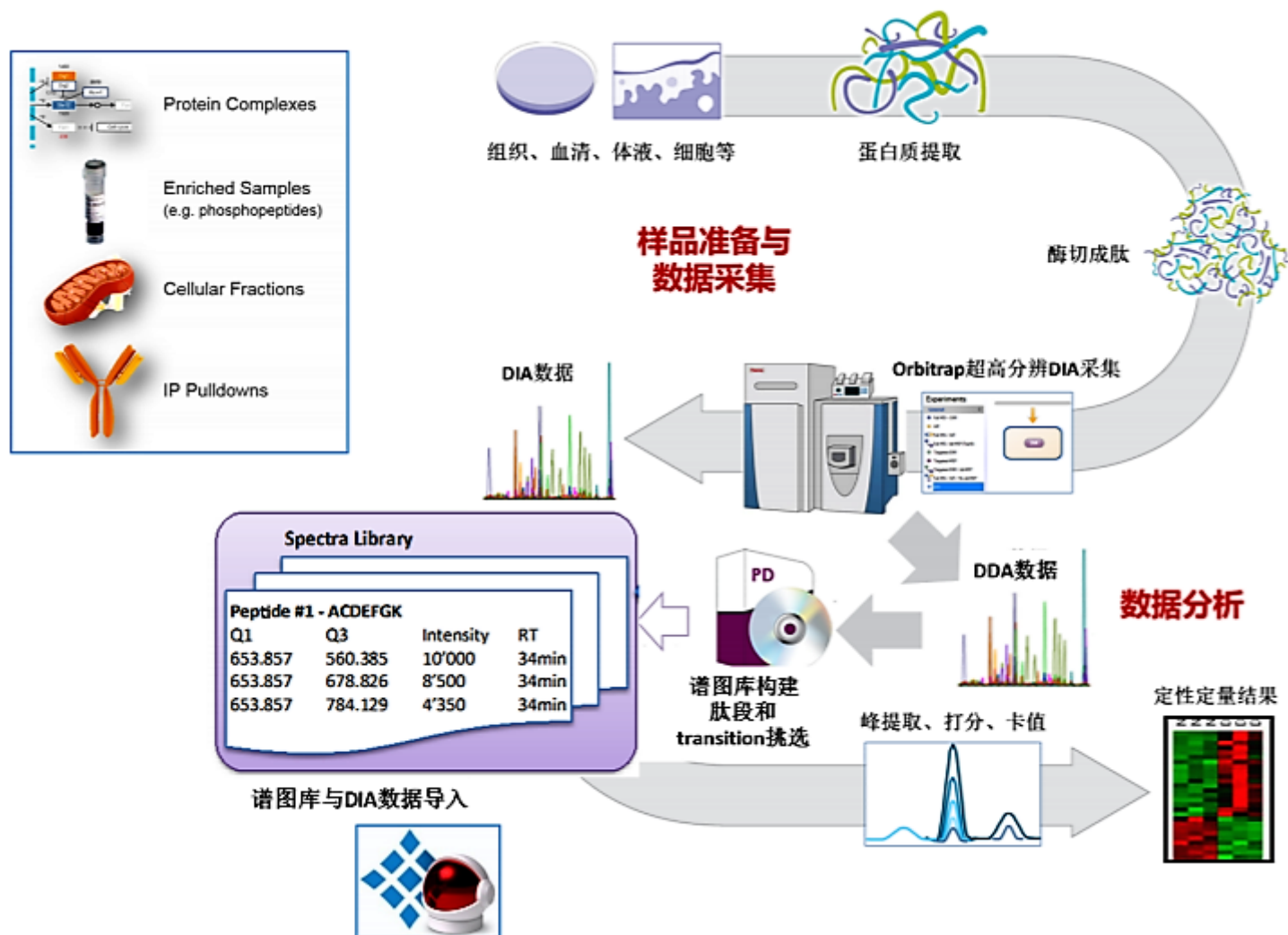
- DIA/SWATH采用数据非依赖性的扫描采集模式，将扫描区间内所有的肽段母离子经过超高速扫描并进行二级碎裂，使用二级碎片离子进行蛋白相对、绝对定量，从而获得完整的肽段信息。。



DIA/SWATH技术示意图

碧云天蛋白质组学技术服务

DIA/SWATH工作流程



碧云天蛋白质组学技术服务

*DIA/SWATH*实验流程

样本处理、
蛋白提取

蛋白烷基
化，酶解

除盐、
抽干

HPLC
分离

DDA模式
质谱检测

DIA模式
质谱检测

生物信息
学分析

碧云天蛋白质组学技术服务

*DIA/SWATH*技术优势

- 更高的覆盖率和精确度，兼具shot-gun法的高通量以及SRM法的可重复性。
- 无需同位素标记。
- 适用于研究亚细胞结构、细菌、真菌、细胞分泌物样本。
- 高水平杂志非常认可的技术。

碧云天蛋白质组学技术服务

DIA/SWATH服务流程

➤ 客户提供：

- 蛋白提取液（组织，细胞，血液，尿液等，需符合《碧云天蛋白质组学生物送样要求》）
- 《碧云天蛋白质组学服务询价单》。
- 《碧云天蛋白质组学生物样本信息表》

➤ 碧云天提供：

- 完整的蛋白质组学实验报告。
- 生物信息学分析结果。
- 蛋白质谱检测原始数据。

碧云天蛋白质组学技术服务

磷酸化蛋白质组学技术原理

- 碧云天同位素标记磷酸化蛋白质组学(Phosphoproteomics)技术通过巧妙的将iTRAQ技术与 TiO_2 磷酸化肽段富集技术相互结合实现对磷酸化肽段(蛋白质)的定性和定量研究。

➤ 技术原理

- ✓ 通过蛋白质提取(Protein Extraction)获得组织细胞中的全蛋白，将全蛋白酶解(Trypsin Digestion)成肽段，iTRAQ试剂对所获得的全部肽段进行标记，标记混合之后的肽段经过 TiO_2 富集得到磷酸化肽段。

碧云天蛋白质组学技术服务

磷酸化蛋白质组学实验流程

样本处理、
蛋白提取



蛋白酶解



肽段标记



TiO₂富集磷
酸化肽段



LC/MS质
谱分析



生物信息
学分析

碧云天蛋白质组学技术服务

磷酸化蛋白质组学技术特点

- 在磷酸化富集前进行iTRAQ标记，避免TiO₂富集的不平行对定量结果的干扰，提高定量磷酸化蛋白质组分析的精确度。
- TiO₂ 富集方法富集效率高，操作快速，不需要特殊设备，能与多种缓冲盐体系兼容。
- 采用高分辨率、高扫描速度的质谱，对富集的磷酸化肽段进行大规模鉴定。
- 结合iTRAQ标记定量技术可对不同样品间的磷酸化水平的差异进行定量比较。

碧云天蛋白质组学技术服务

磷酸化蛋白质组学服务流程

➤ 客户提供：

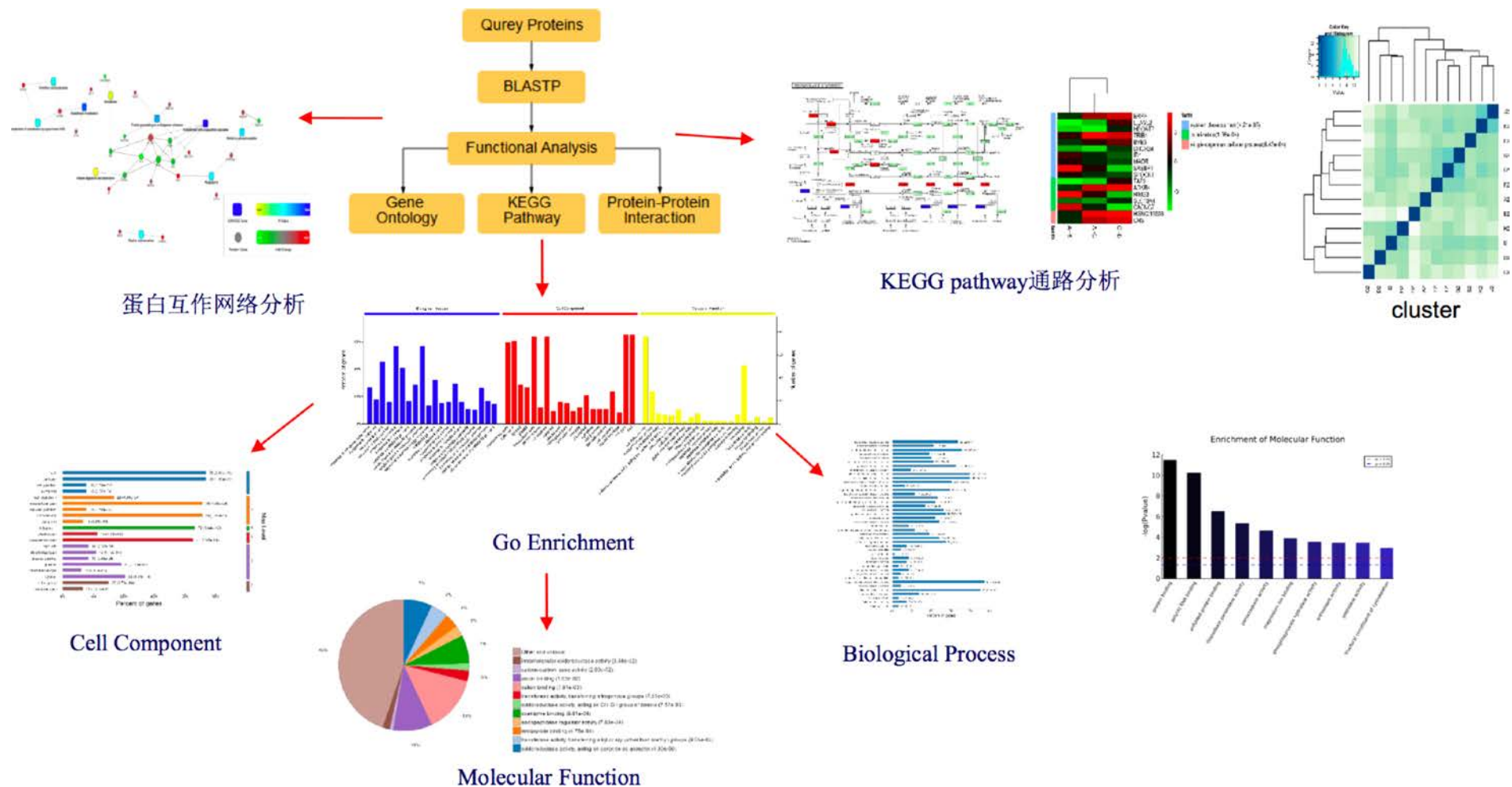
- 蛋白提取液（组织，细胞，血液，尿液等，需符合《碧云天蛋白质组学生物送样要求》）
- 《碧云天蛋白质组学服务询价单》。
- 《碧云天蛋白质组学生物样本信息表》

➤ 碧云天提供：

- 完整的蛋白质组学实验报告。
- 生物信息学分析结果。
- 蛋白质谱检测原始数据。

碧云天蛋白质组学技术服务

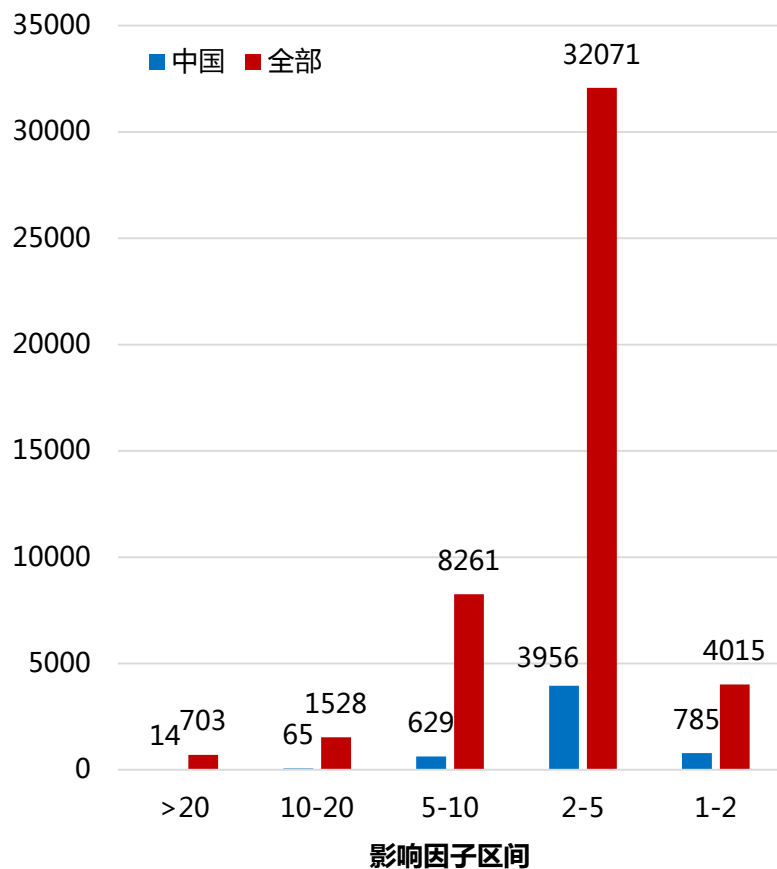
碧云天常规生物信息学分析



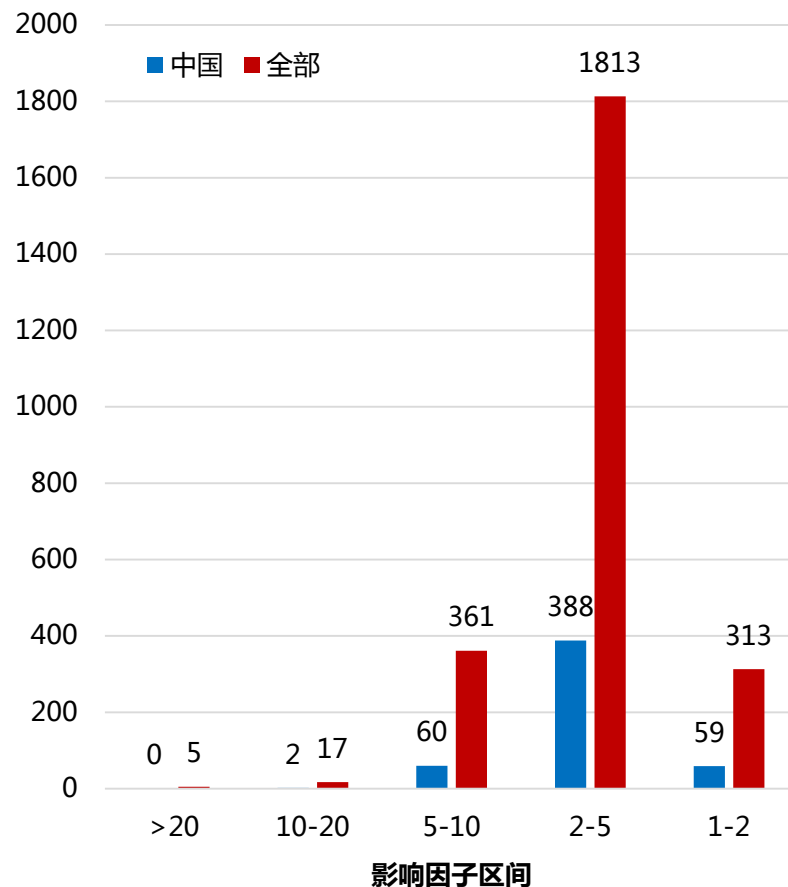
碧云天蛋白质组学技术服务

蛋白质应用现状

全蛋白组：proteome, proteomic, proteomics



标记定量蛋白组：iTRAQ、TMT



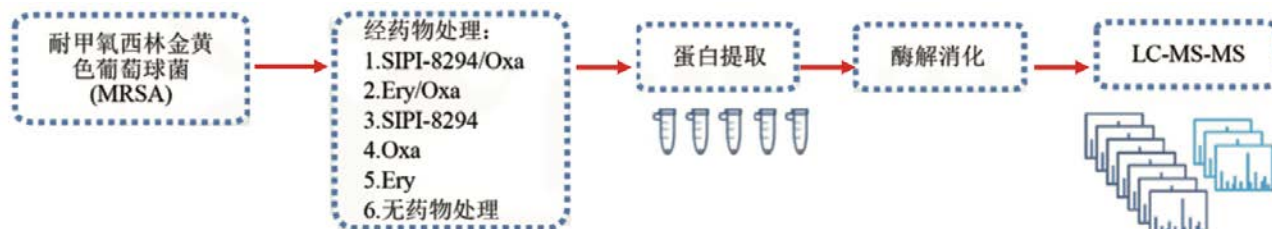
碧云天蛋白质组学技术服务

应用案例1

文章题目：

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌对新型红霉素衍生物和苯唑西林复方抗菌药物的蛋白质组学应答

实验材料：金黄色葡萄球菌

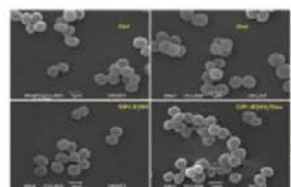
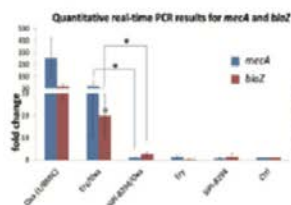


主要技术：Label Free

发表期刊：Sci. Rep.

影响因子：5.578

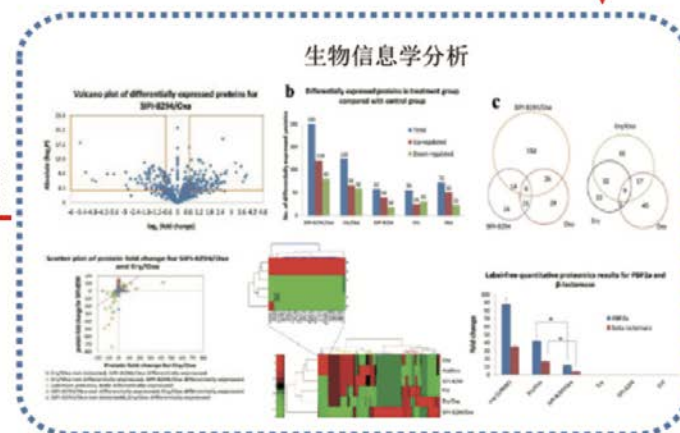
周期：18个月



RT-PCR 转录水平验证

扫描电子显微镜形态观察

验证



碧云天蛋白质组学技术服务

应用案例2

文章题目：

全蛋白质组的氧化分析发现衰老过程中有效的线粒体蛋白的动态平衡

实验材料：柄孢霉菌线粒体

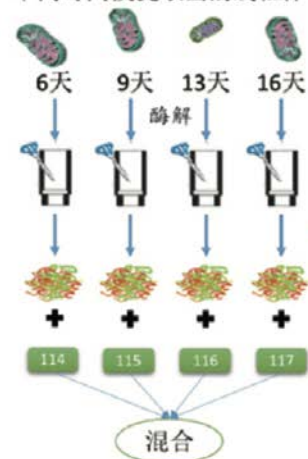
主要技术：iTRAQ

发表期刊：Mol. Cell. Proteom

影响因子：6.564

周期：20个月

不同时间段提取出的线粒体

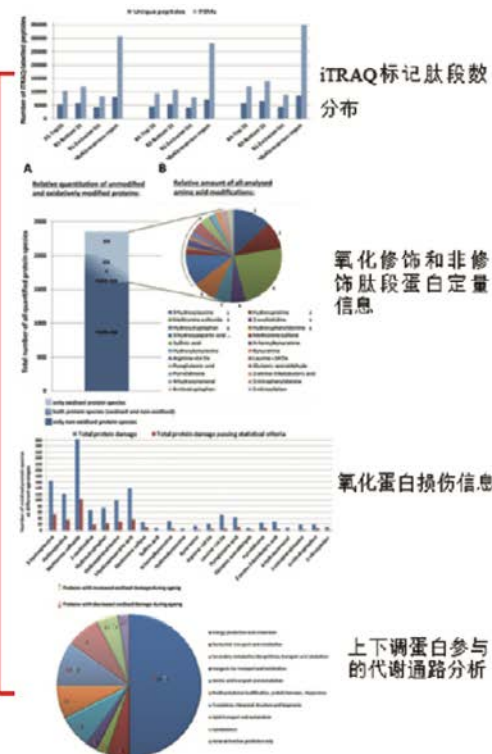


Ziptip C18 除盐

串联质谱

蛋白定量定性

数据分析



Thank You



碧云天
Beyotime



碧云天网站



微信公众号

碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订购热线：400-168-3301或800-8283301
技术咨询：info@beyotime.com
技术服务：service@beyotime.com
网址：<http://www.beyotime.com>