

蛋白质组学原理及应用案例

陈希

水生所分测中心蛋白质组学平台

2020.6.12

个人简介



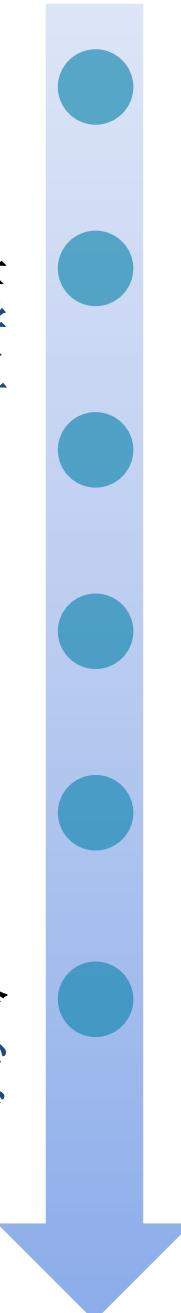
2004-2006 硕士
武汉大学
孙慧教授课题组



2011-2013
香港大学
高级研究助理



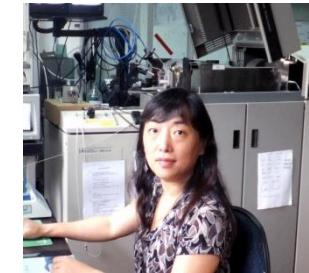
2019-至今
水生所分测中心
蛋白质组学平台



2000-2004 本科
武汉大学
生命科学学院



2006-2010 博士
武汉大学
郭林教授课题组



2013-2018
武汉生物技术研究院
生物质谱平台负责人



主持：**国家自然科学基金青年基金**
湖北省博士后创新岗位基金
武汉市博士后科研启动基金

主要内容

- 蛋白质组学基本概念
- 蛋白质组学研究策略
 - 蛋白质鉴定
 - 定量蛋白质组学
- 靶向蛋白质组学
 - 质谱领域的WB：MRM^{HR}/PRM

蛋白质组学基本概念

蛋白质研究方法



传统方法 VS 蛋白质组学方法

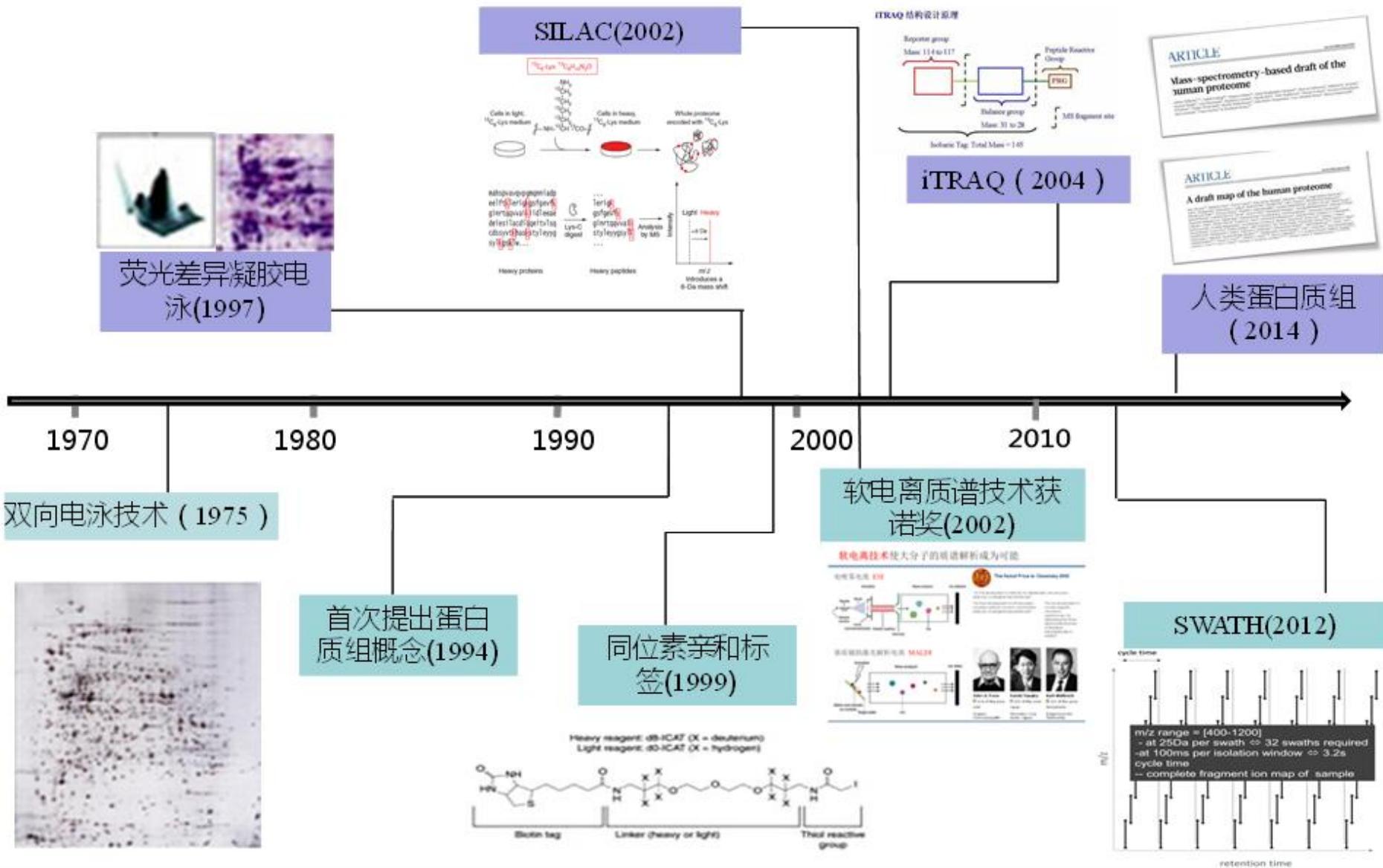
单个蛋白研究



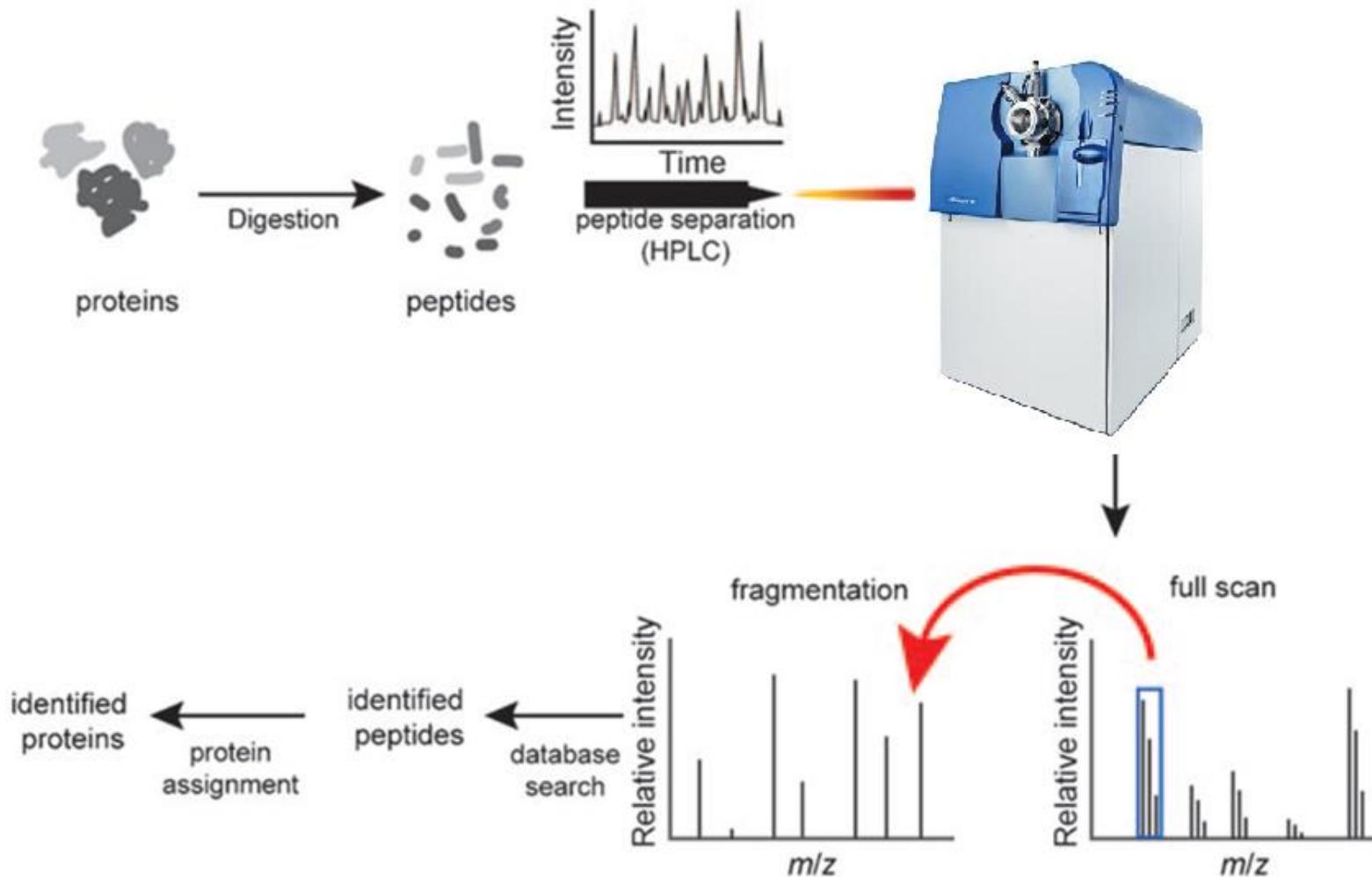
大规模、高通量

蛋白质组学：大规模地研究一个组织或物种中所有蛋白质的科学

蛋白质组学技术发展历程

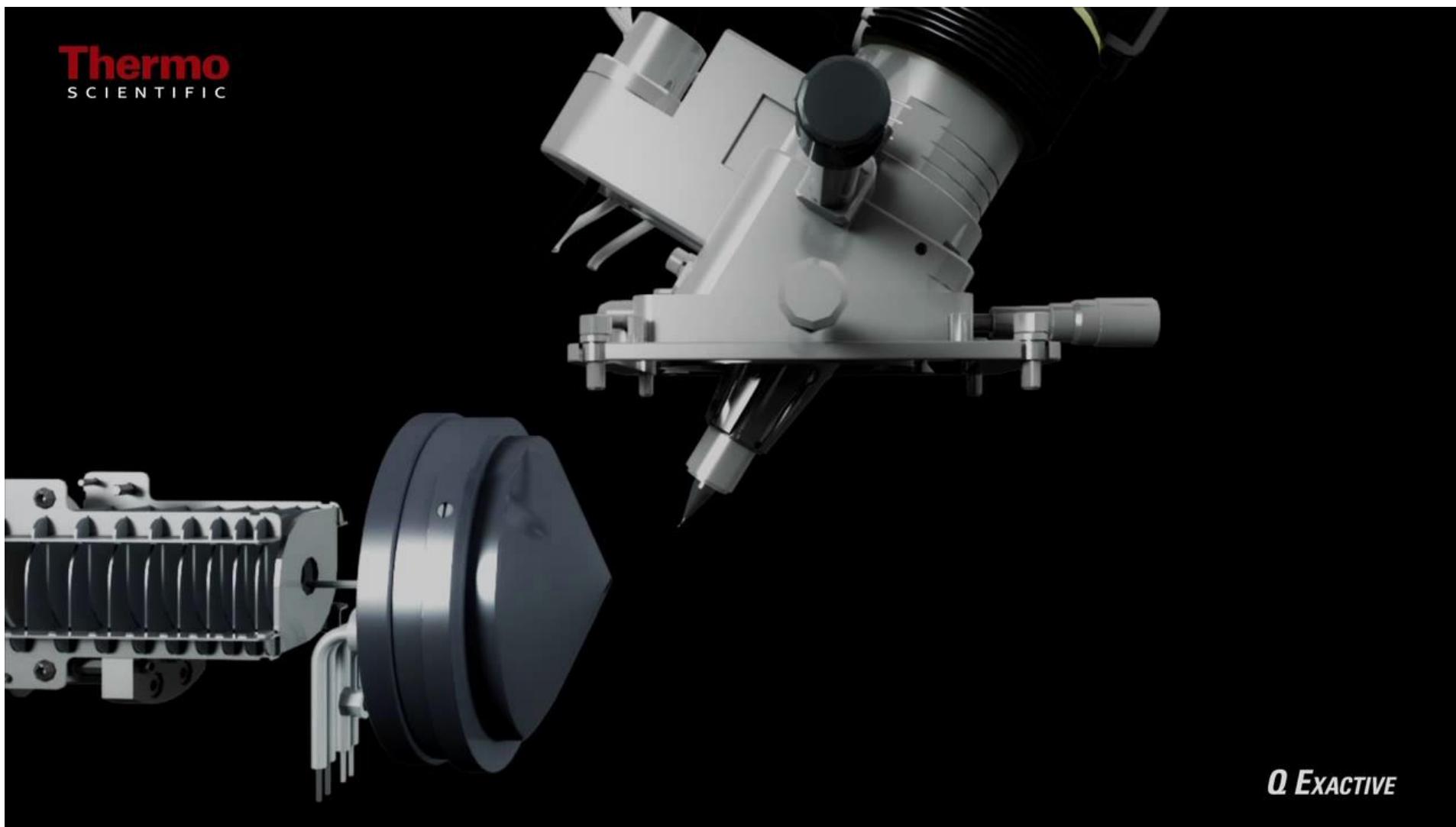


LC-MS/MS实验经典流程



“Bottom-up” proteomics or “Shotgun” proteomics

质谱扫描过程



蛋白质组学研究策略

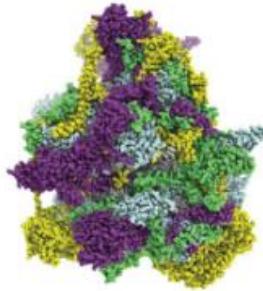
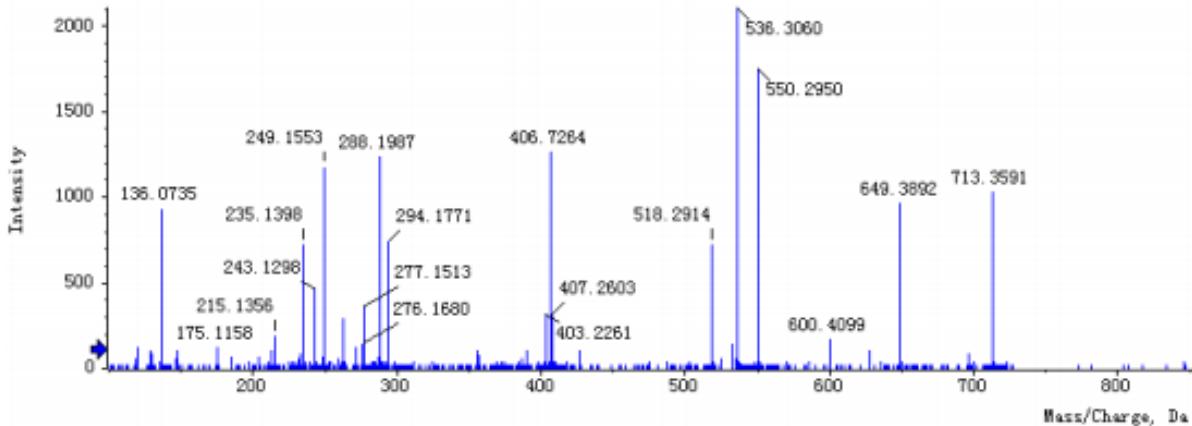
- 蛋白质组学定性研究 (MS2 → 肽段 → 蛋白)
 @胶条鉴定、蛋白表达谱、修饰位点鉴定 ...
- 定量蛋白质组学 (LFQ、TMT/iTRAQ、SWATH ...)
 @发现差异蛋白、相互作用组、PTM ...
- 靶向蛋白质组学 (MRM^{HR}/PRM)
 @质谱领域的WB

发现蛋白质组学 (Discovery proteomics)

蛋白质组学：从定性到定量

- 定性：蛋白质鉴定、复合体鉴定、细胞内蛋白质组成、PTM...
- 定量：比较不同状态下蛋白水平的变化、互作组学
 - 非标记定量：LFQ/SWATH
 - 标记定量：SILAC/双甲基化/TMT/iTRAQ...

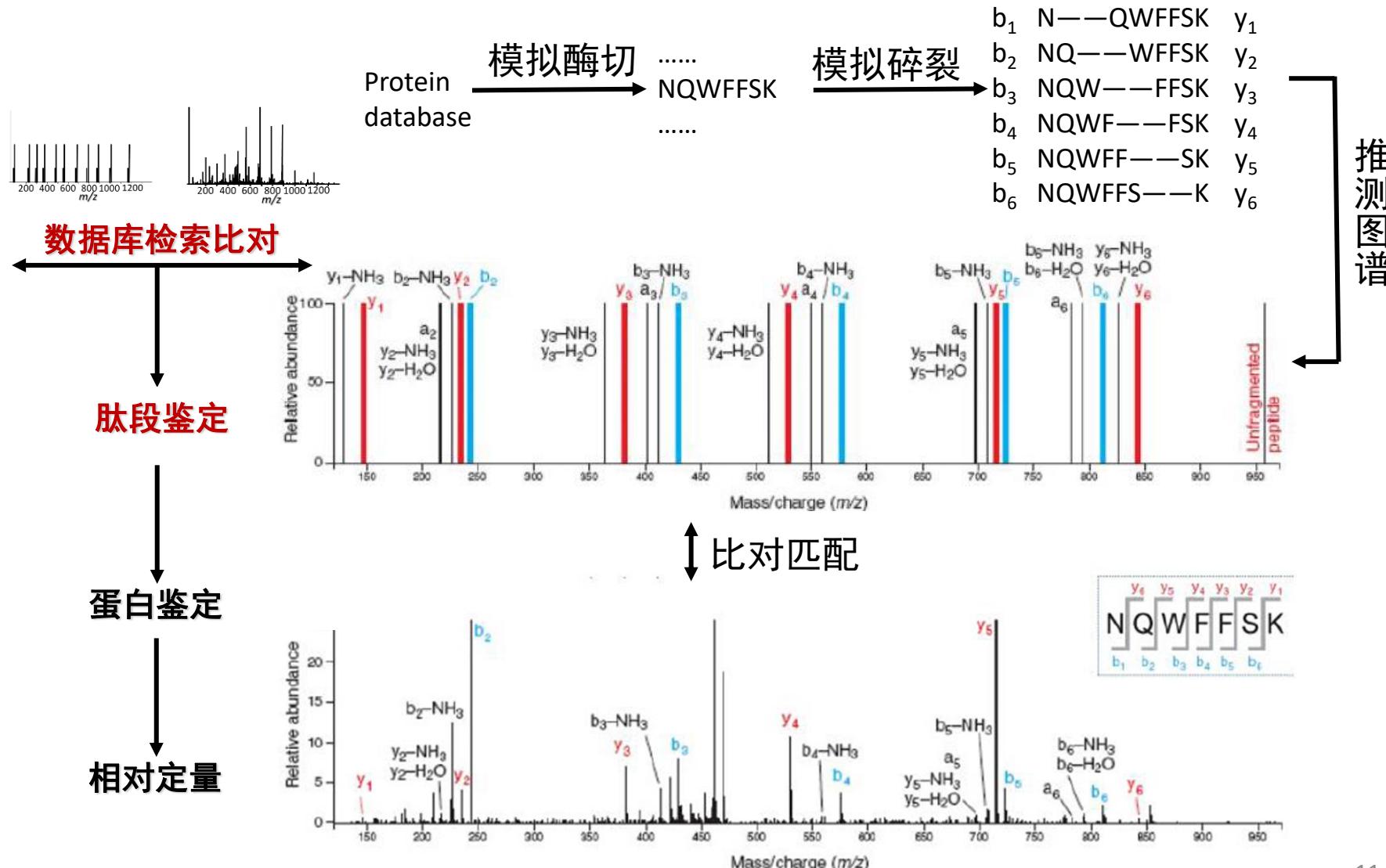
蛋白质鉴定举例



•
•
•

MW	ion		ion	MW
88	b_1	S	GFLEEDELK	y_9 1080
145	b_2	SG	FLEEDELK	y_8 1022
292	b_3	SGF	LEEDELK	y_7 875
405	b_4	SGFL	EEDELK	y_6 762
534	b_5	SGFLE	EDELK	y_5 633
663	b_6	SGFLEE	DELK	y_4 504
778	b_7	SGFLEED	ELK	y_3 389
907	b_8	SGFLEEDE	LK	y_2 260
1020	b_9	SGFLEEDEL	K	y_1 147

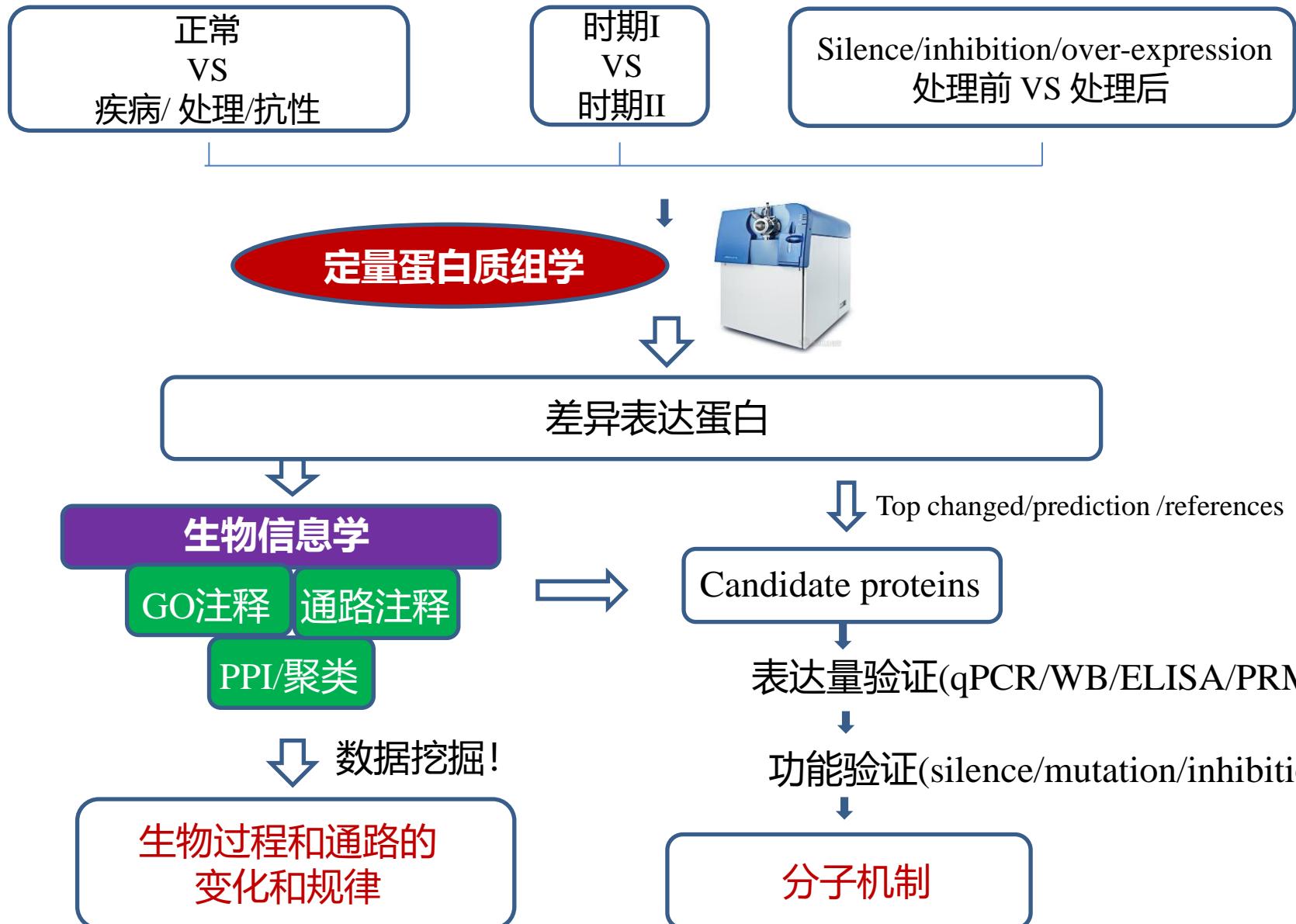
肽段鉴定原理



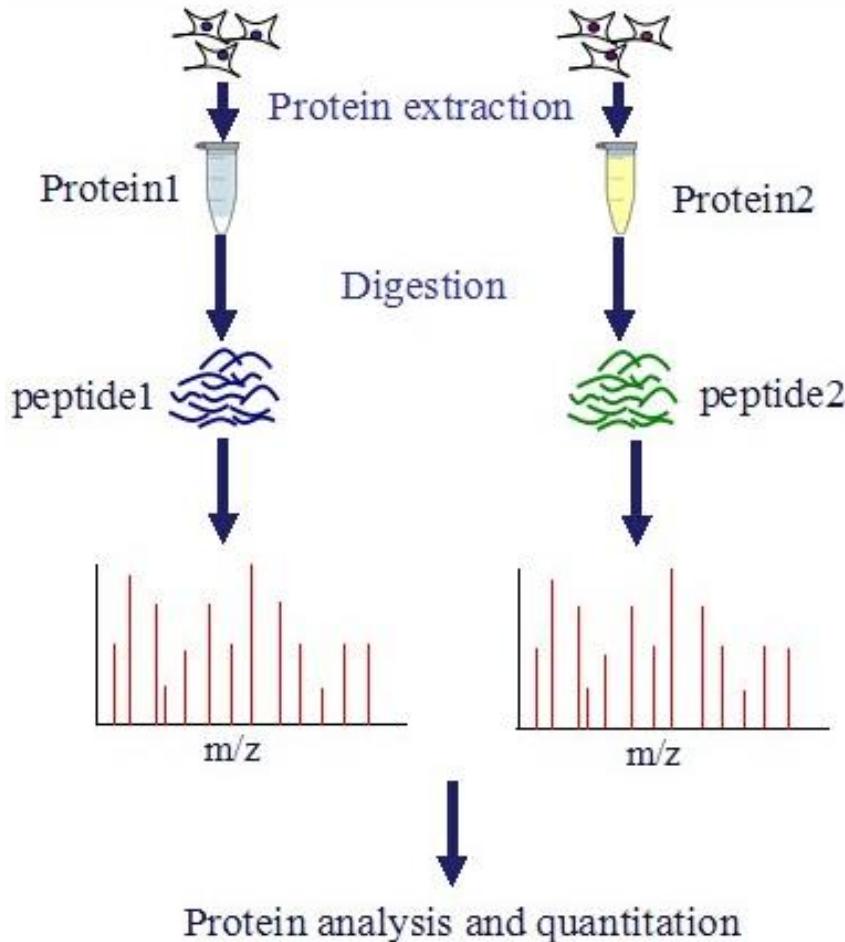
蛋白质组定量的类型

- 两类定量形式
 - **绝对定量**: 【理想方式】蛋白的绝对含量, 常在临床检测中 (比如: ng/mL血液) 。
 - **相对定量**: 【更易达成】蛋白在不同条件下的相对含量比较, 常在基础研究 (比如: 药物刺激/对照) 。
-
- 蛋白质组学定量技术
 - **非标记定量**
 - **标记定量** (SILAC/双甲基化/TMT/iTRAQ)
 - **SWATH**

蛋白质组学经典研究思路

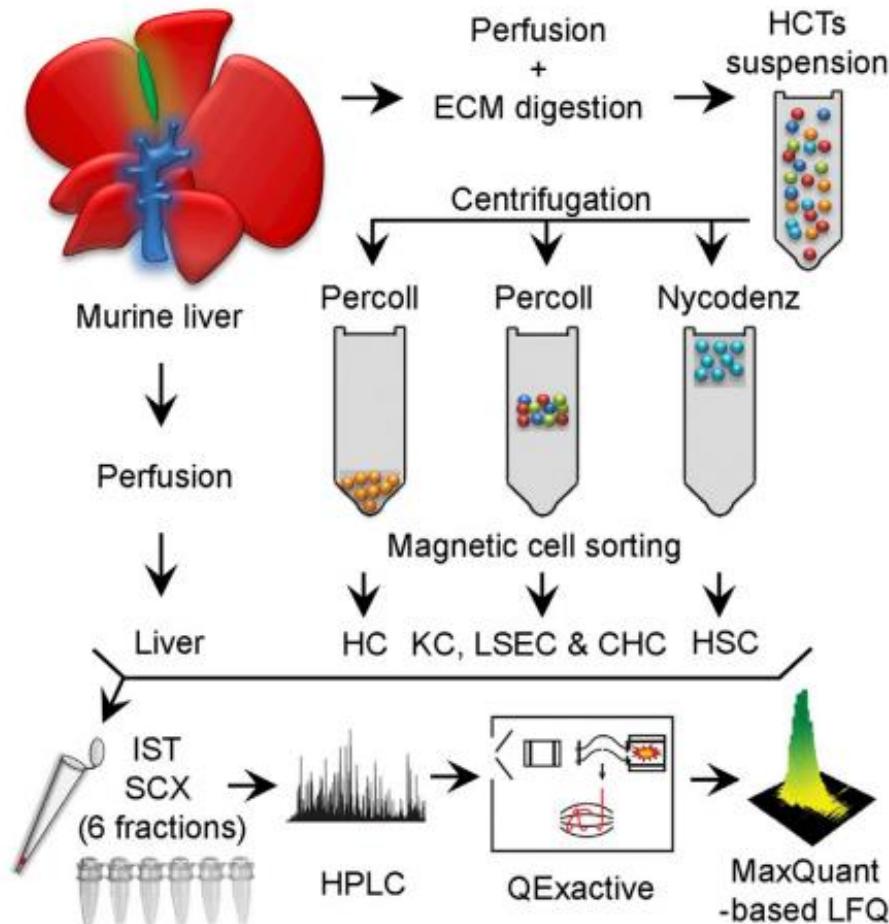


非标定量 (Label-free quantification)



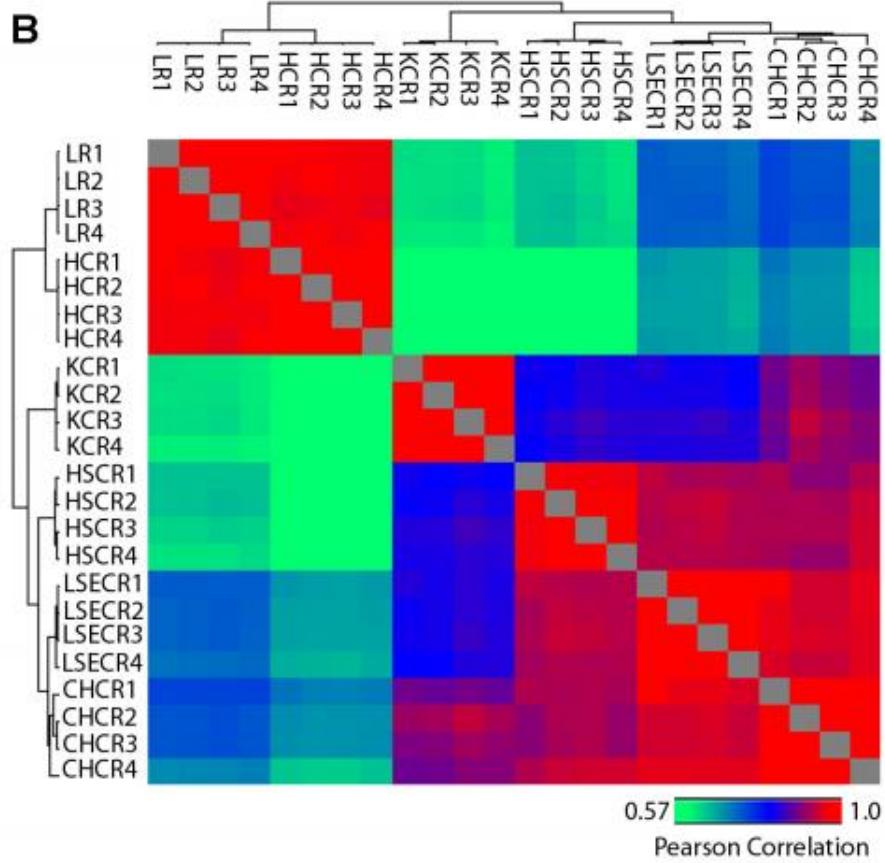
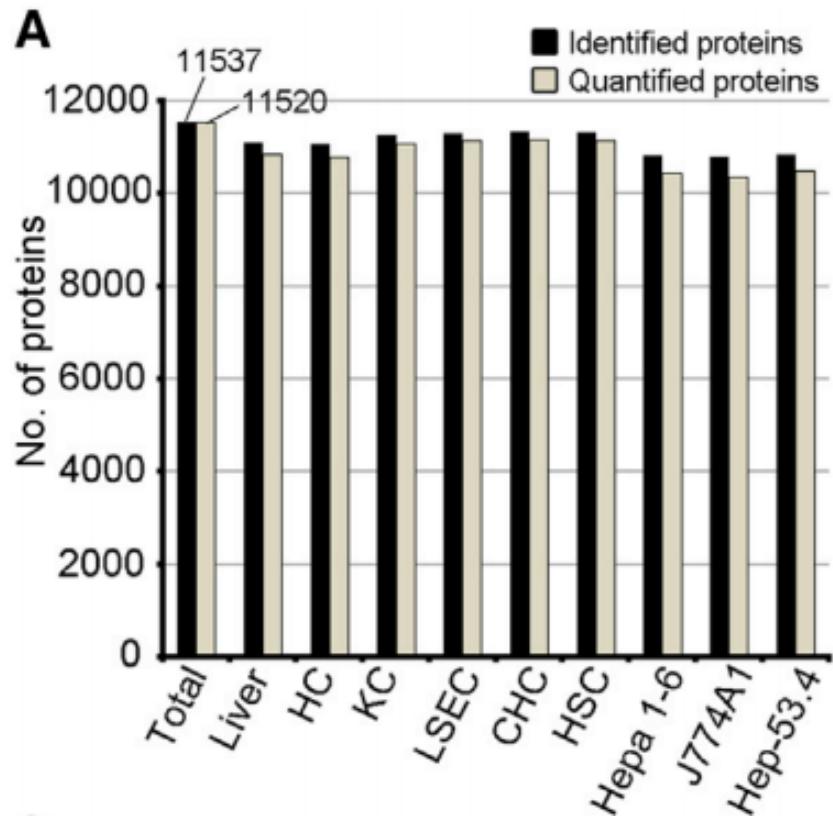
- 不同样品单独处理、分别检测
- 处理步骤越多，引入的差异越大，影响定量准确性
- 对仪器的状态和稳定性要求较高
- 简单、不需标记、通量高

Label-free quantification example: Murine Liver



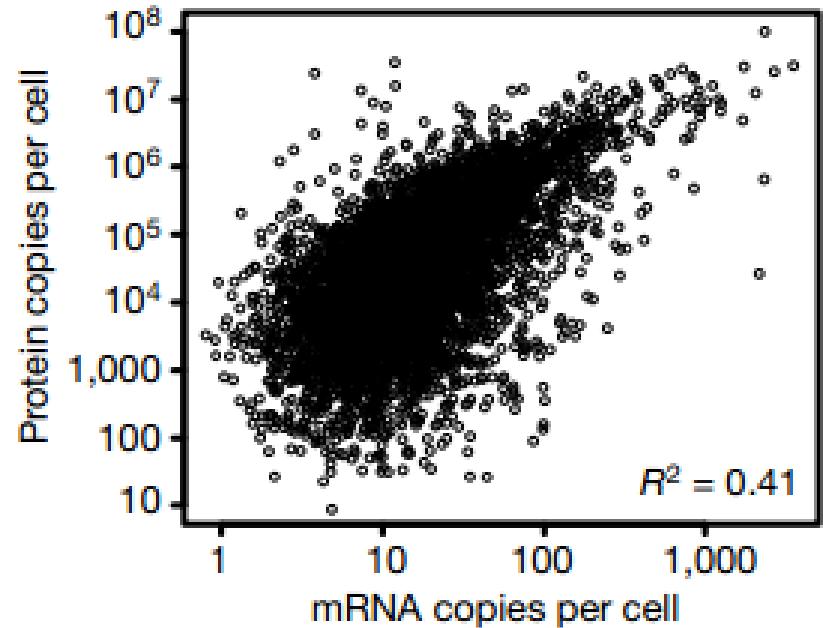
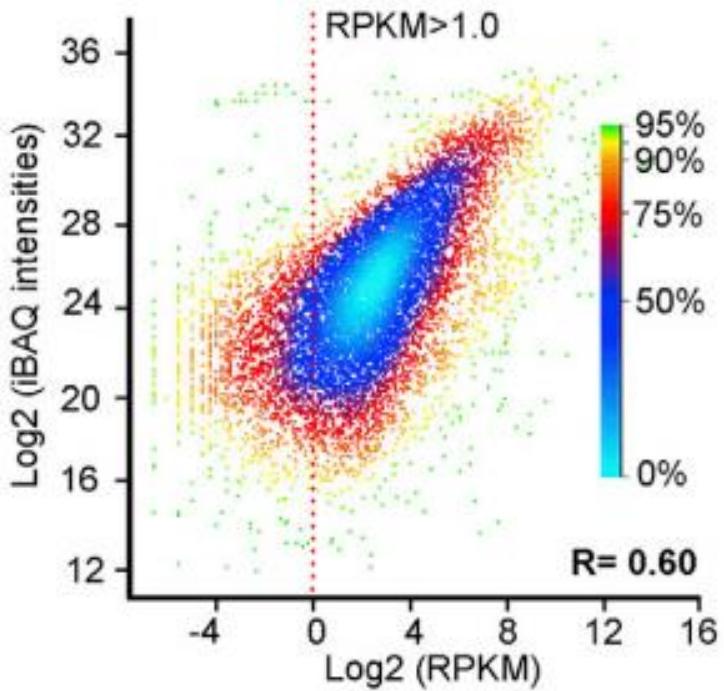
- 分离五种类型的肝细胞
HC/KC/LSEC/CHC/HSC
- 非标记定量算法
MaxLFQ
- 统计分析
Perseus, R语言

定量到11520个蛋白



目前最大的器官蛋白质组数据

转录组和蛋白质组间的相关性



➤ 有一定的相关性，但差异仍然明显

Phosphoproteins in extracellular vesicles as candidate markers for breast cancer

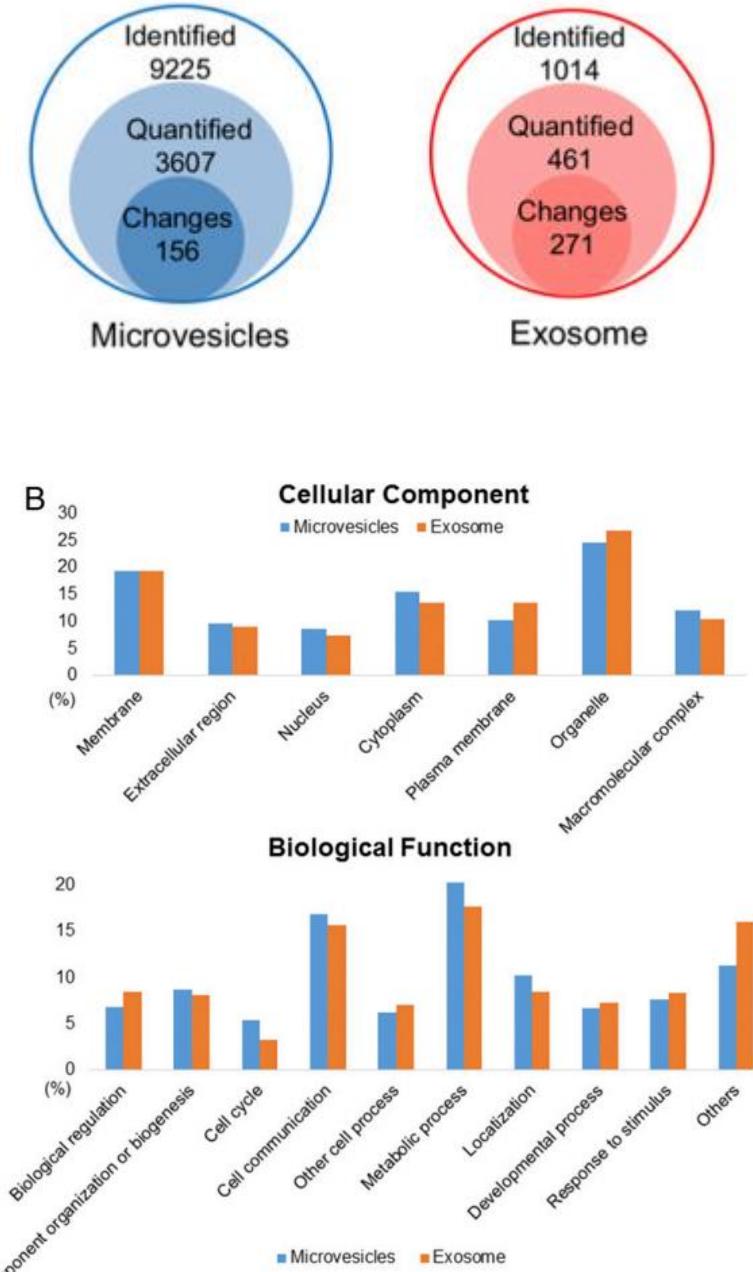
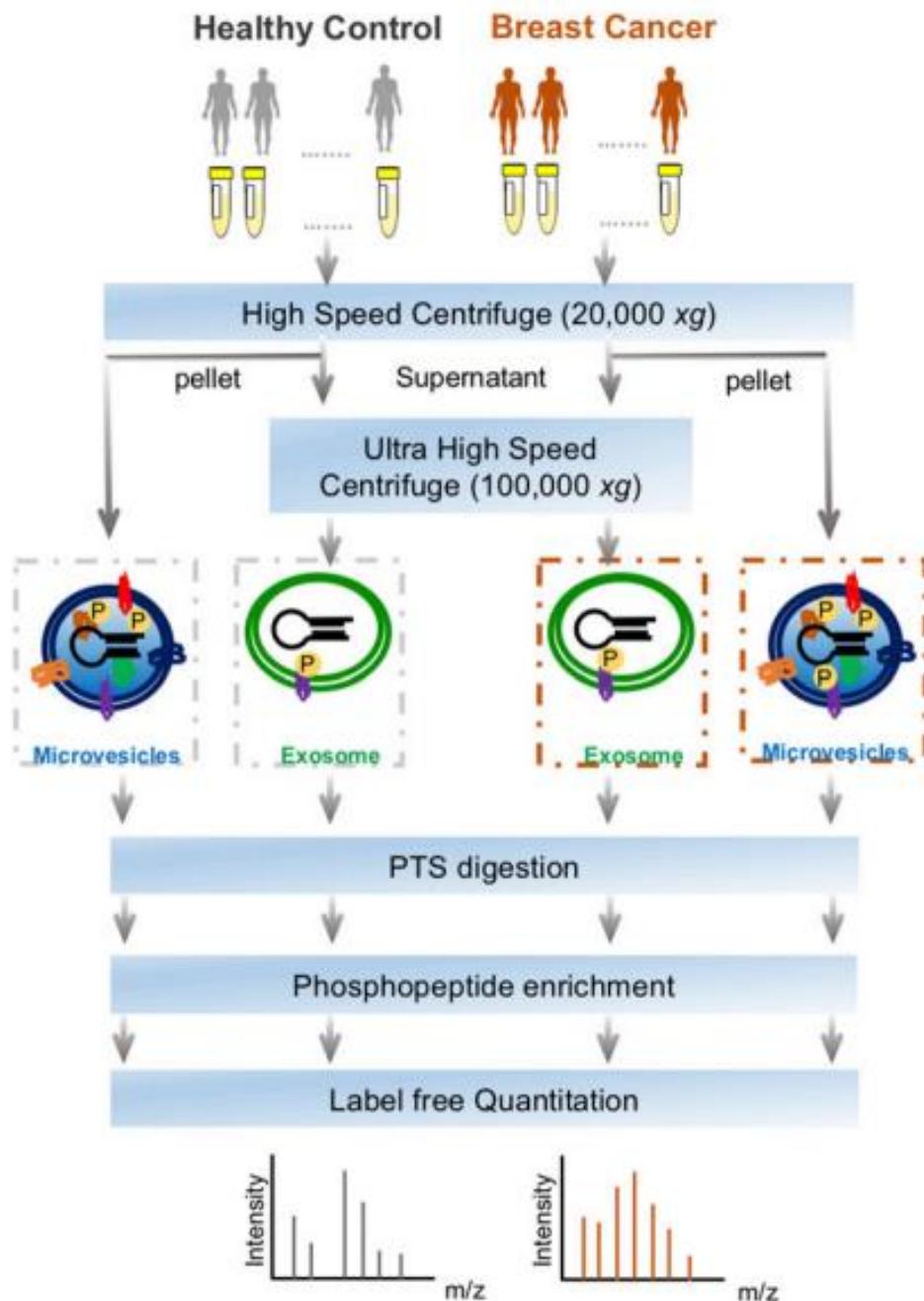
I-Hsuan Chen^a, Liang Xue^a, Chuan-Chih Hsu^a, Juan Sebastian Paez Paez^a, Li Pan^b, Hillary Andaluz^c, Michael K. Wendt^b, Anton B. Iliuk^d, Jian-Kang Zhu^{a,e,f,1}, and W. Andy Tao^{a,b,c,g,1}

^aDepartment of Biochemistry, Purdue University, West Lafayette, IN 47907; ^bDepartment of Medicinal Chemistry & Molecular Pharmacology, Purdue University, West Lafayette, IN 47907; ^cDepartment of Chemistry, Purdue University, West Lafayette, IN 47907; ^dDepartment of Innovations, Tymora Analytical Operations, West Lafayette, IN 47906; ^eDepartment of Horticulture and Landscape Architecture, Purdue University, West Lafayette, IN 47907; ^fShanghai Center for Plant Stress Biology and Center for Excellence in Molecular Plant Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201602, China; and ^gPurdue Center for Cancer Research, Purdue University, West Lafayette, IN 47907

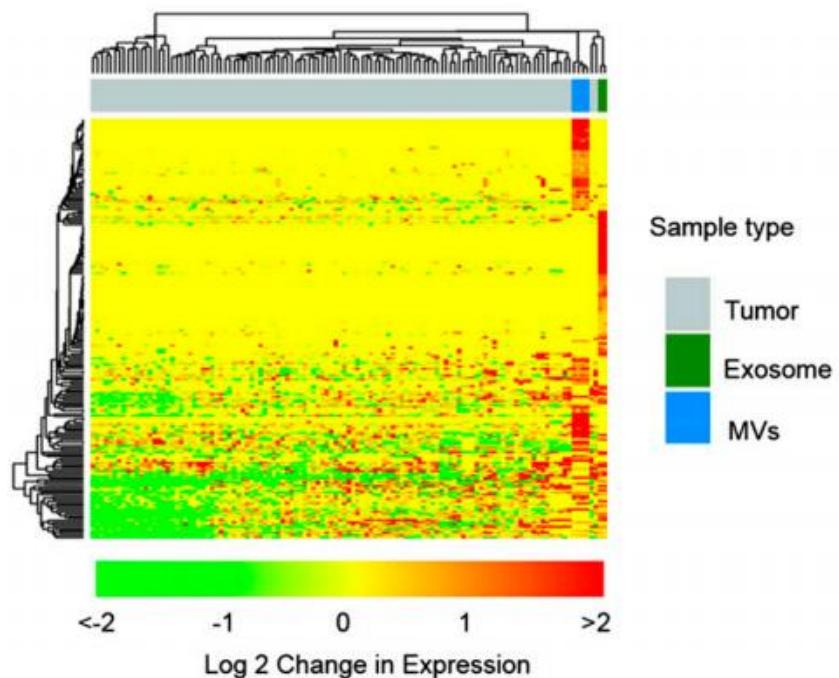
Contributed by Jian-Kang Zhu, February 1, 2017 (sent for review November 1, 2016; reviewed by Natalie G. Ahn, Bernd Bodenmiller, and Jim Bruce)

➤ 研究思路、手段：

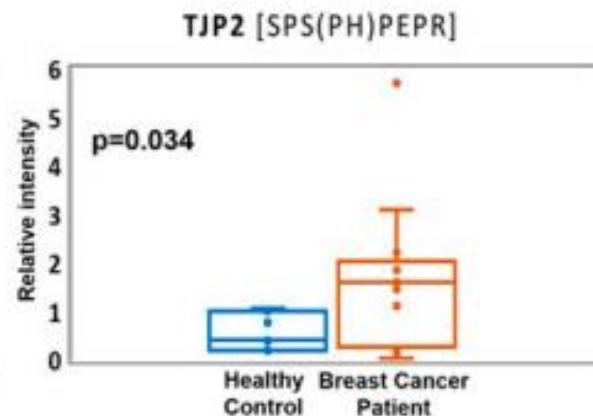
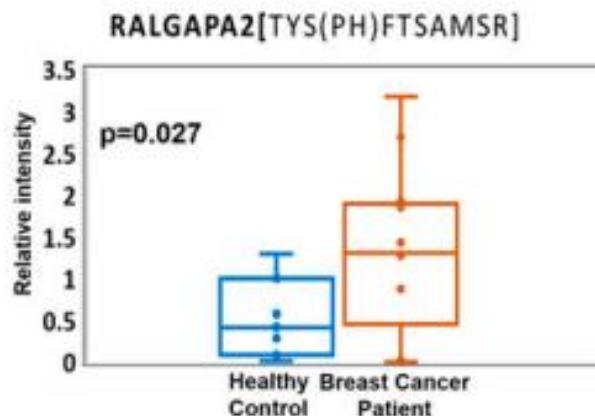
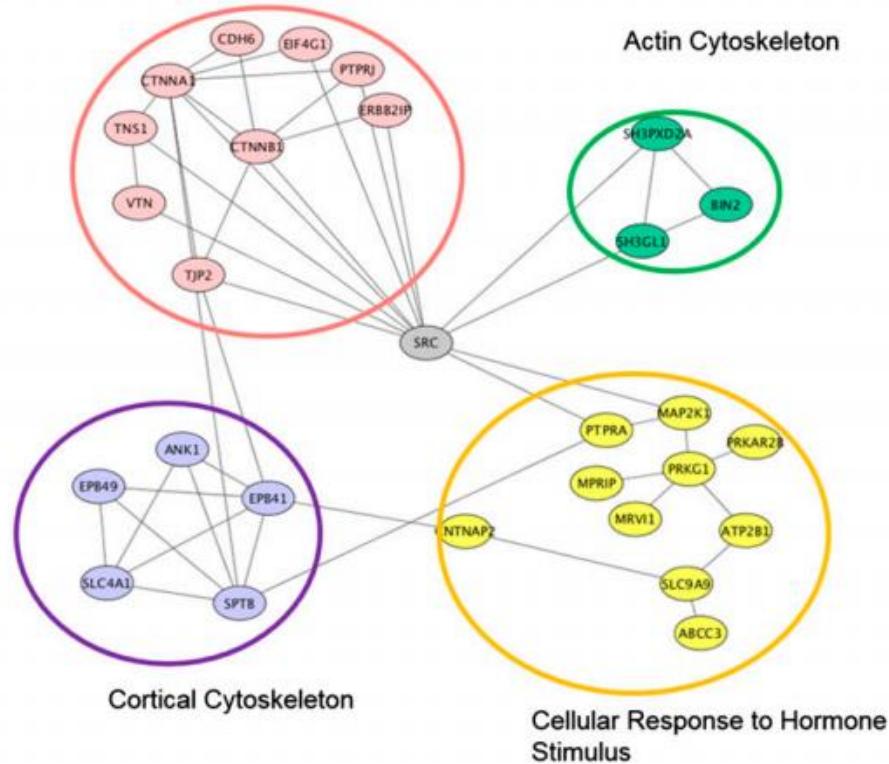
- + 生物学问题/实验材料
- + 定量蛋白质组学方法
- + 生物信息学分析
- + PRM验证



A

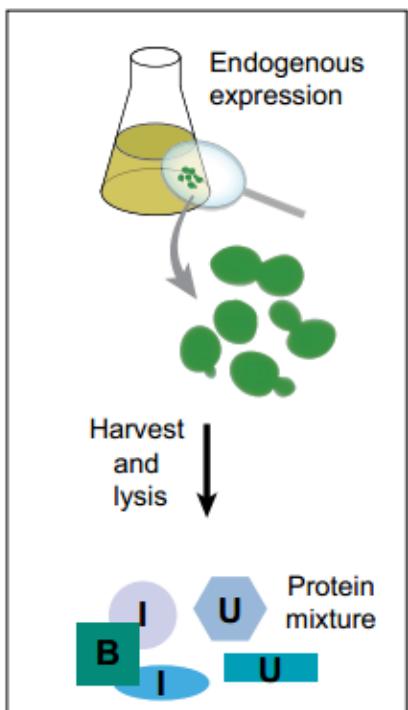


B Cytoskeleton Remodeling

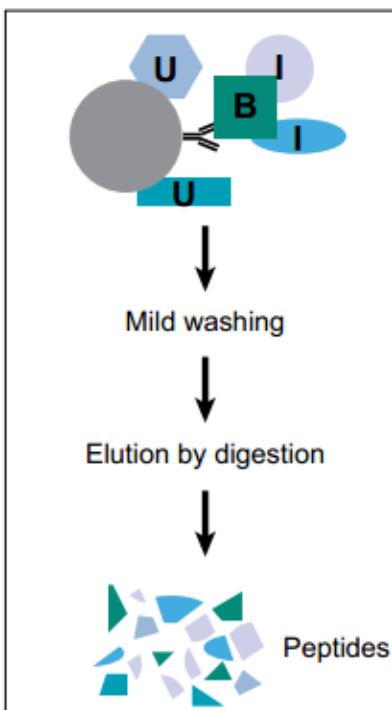


AE-MS (Affinity-Enrichment MS)

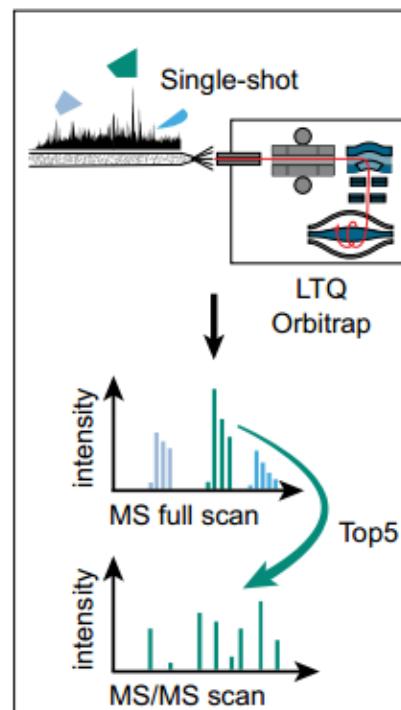
A Protein extraction



B Single-step AE

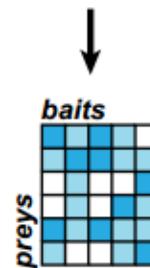


C LC-MS/MS analysis



D Data analysis

Protein identification and label-free quantification with MaxQuant

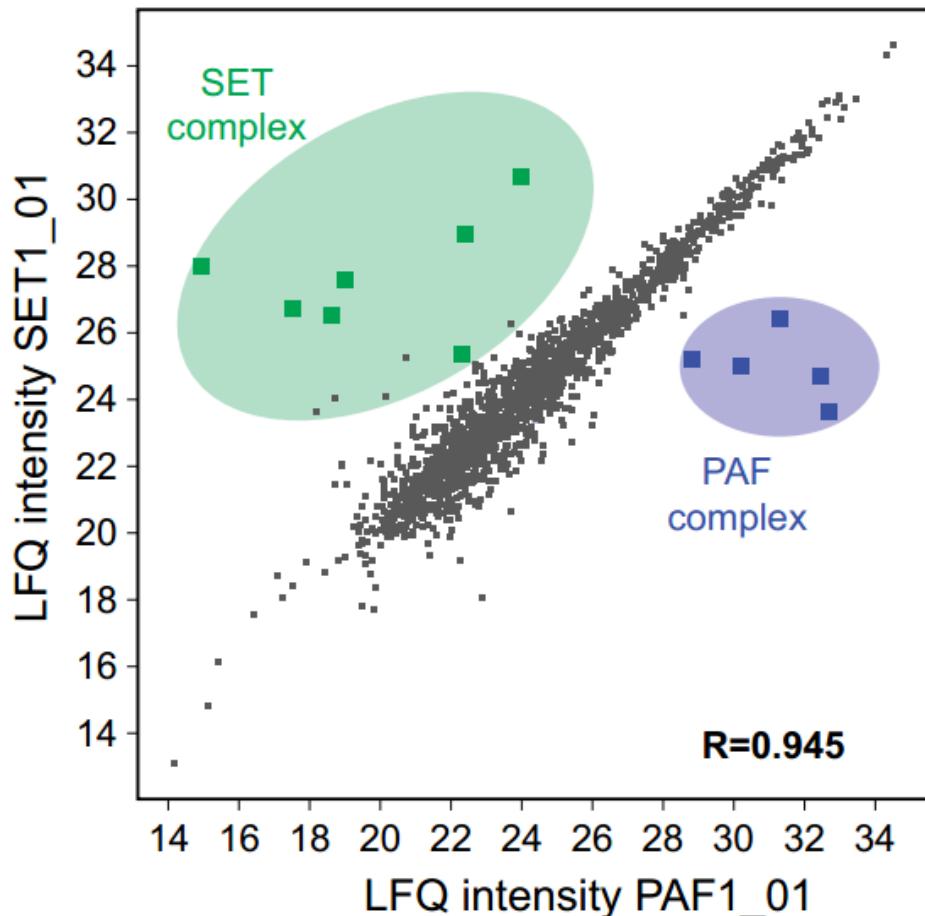


LFQ intensity matrix

Downstream data analysis and identification of interactors

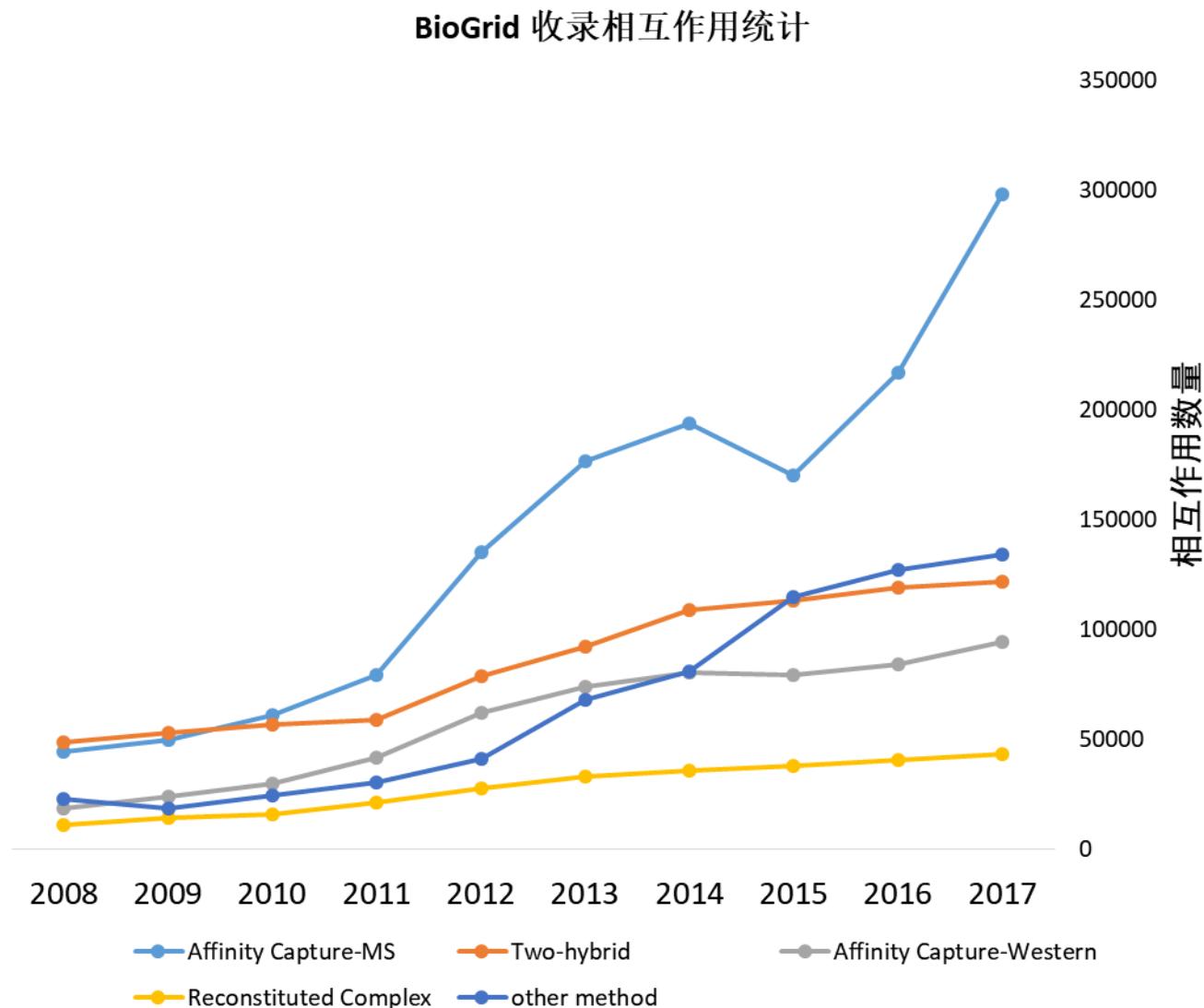
不再拼命去除非特异，而是善加利用。

AE-MS的优势

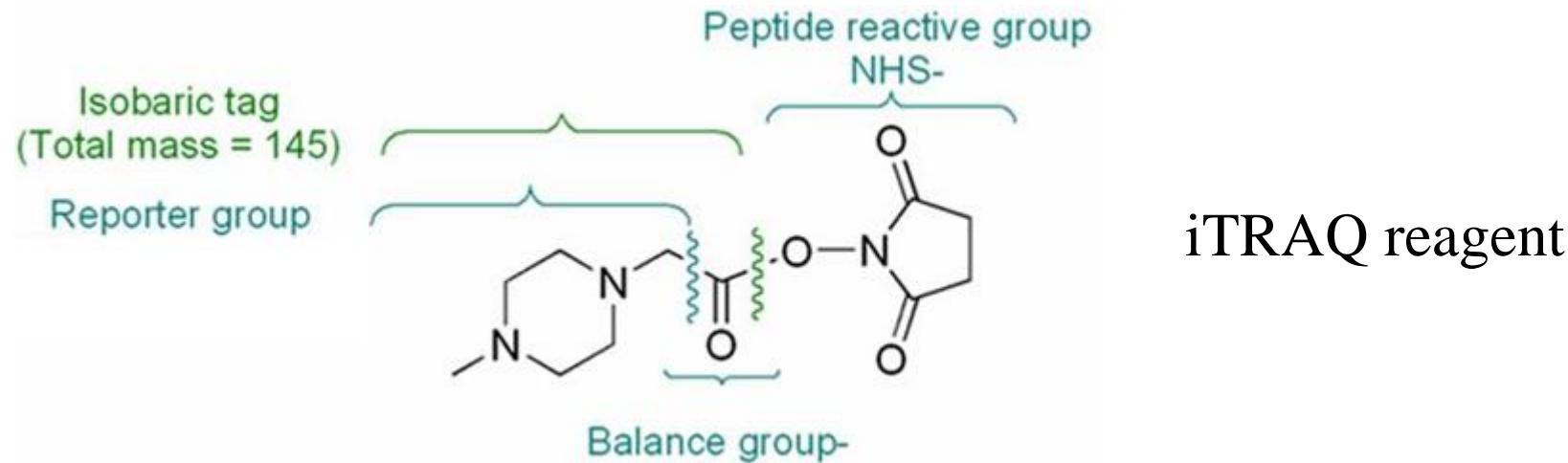


- 温和冲洗，保留了较弱的相互作用蛋白。
- 充分利用了现代质谱仪的强大。
- 样品间可以相互做对照。

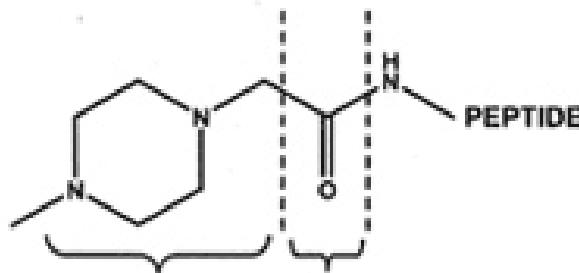
AP-MS是目前研究蛋白相互作用最主流的方法



iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantification)

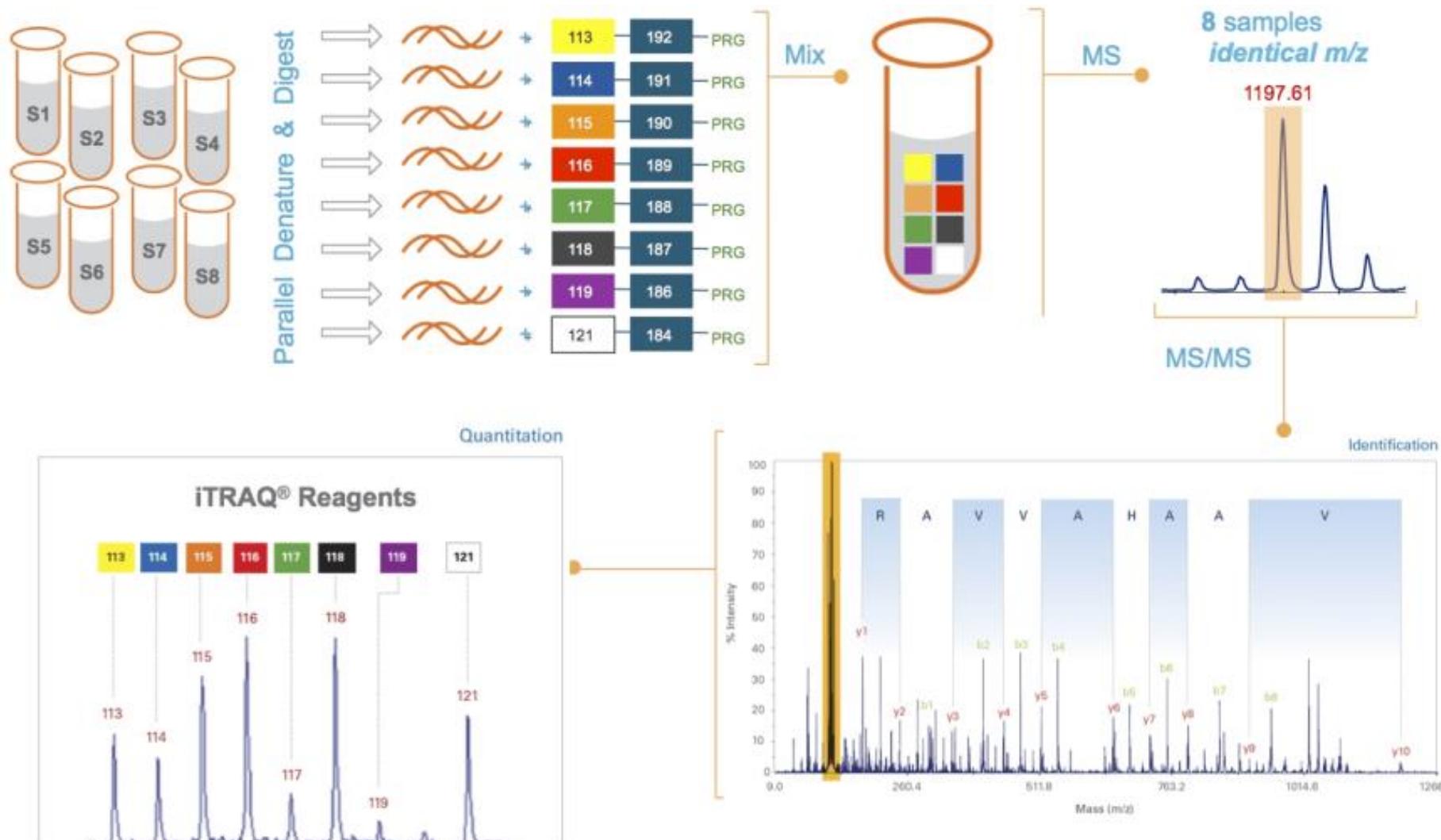


8plex: 113/114/115/116/117/118/119/121



iTRAQ labeled peptide

iTRAQ workflow



iTRAQ example: dietary protein limitation response

- 科学问题：研究PL对小肠生理的影响
- 研究对象：模式生物猪的小肠粘膜
- 研究方法：基于iTRAQ的定量蛋白质组学
- 实验设计：

样品	CON1	CON2	CON3	PL1	PL2	PL3
iTRAQ试剂	113	114	115	116	117	118

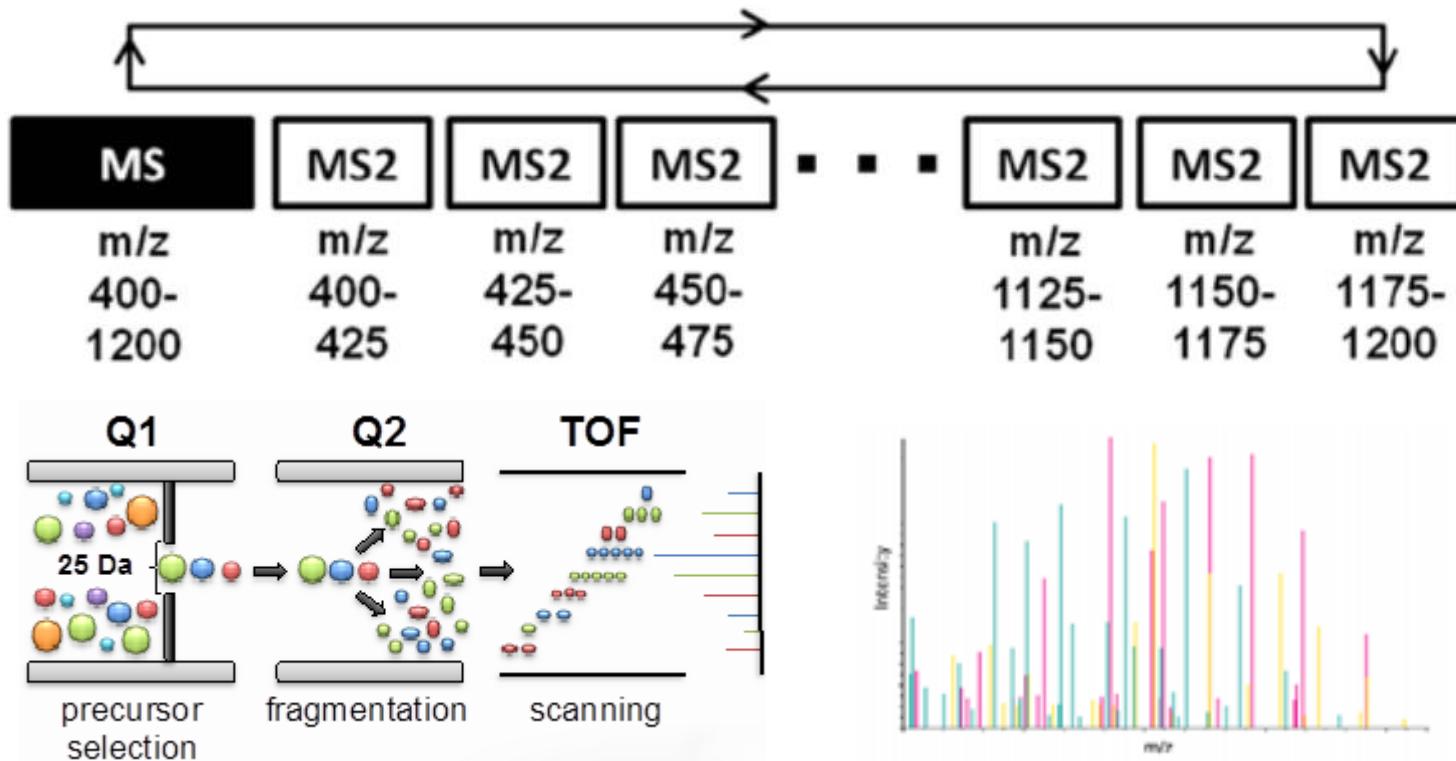
- 定量结果：5275个蛋白，202发生变化

SWATH/DIA

Sequential Window Acquisition of all Theoretical mass spectra

2012年Ruedi Aebersold和AB公司在TripleTOF 5600系统上推出

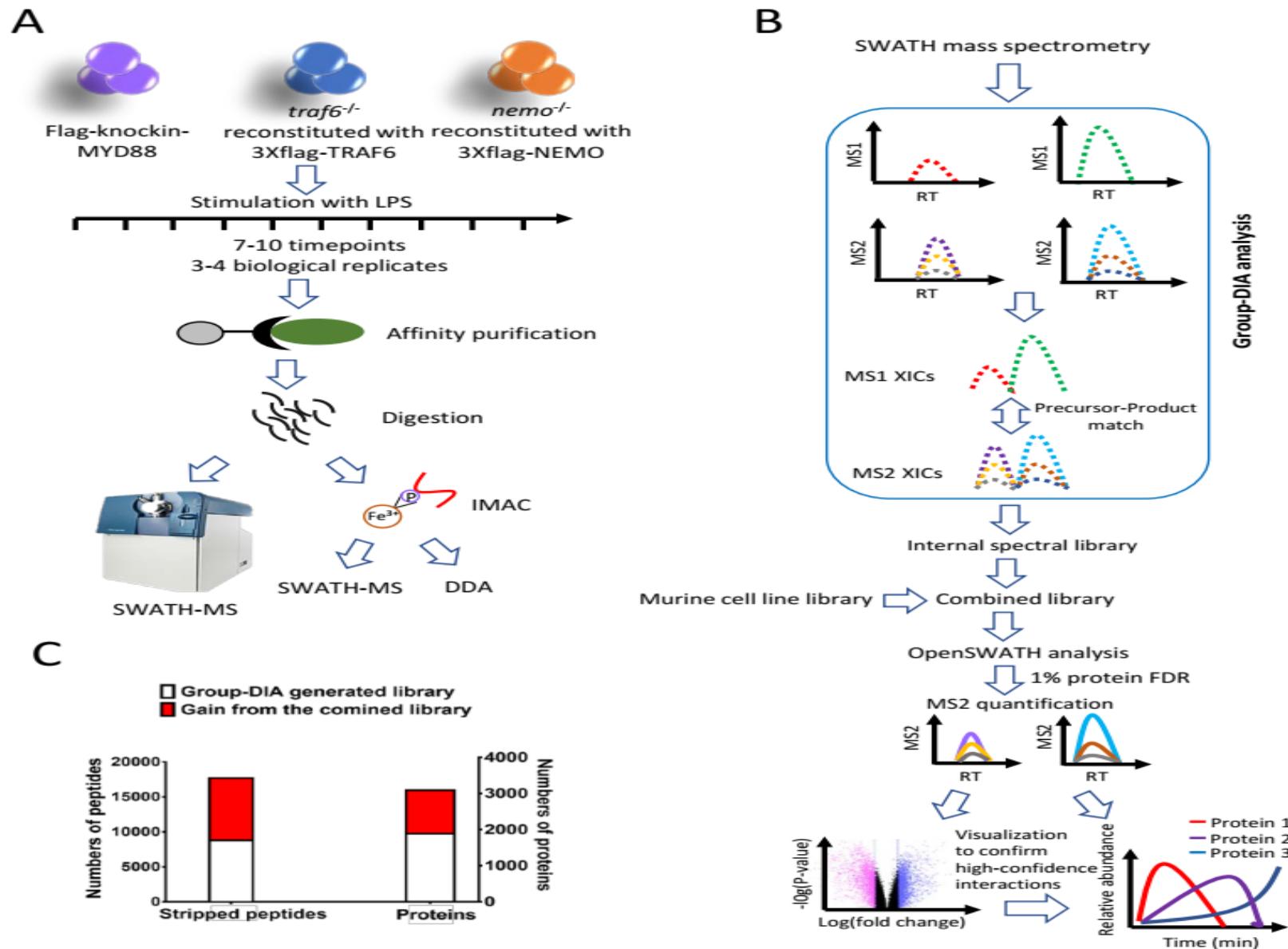
$$400-1200 \text{ m/z} = 800 \text{ m/z} = 25 \text{ m/z} \times 32 \text{ windows}$$

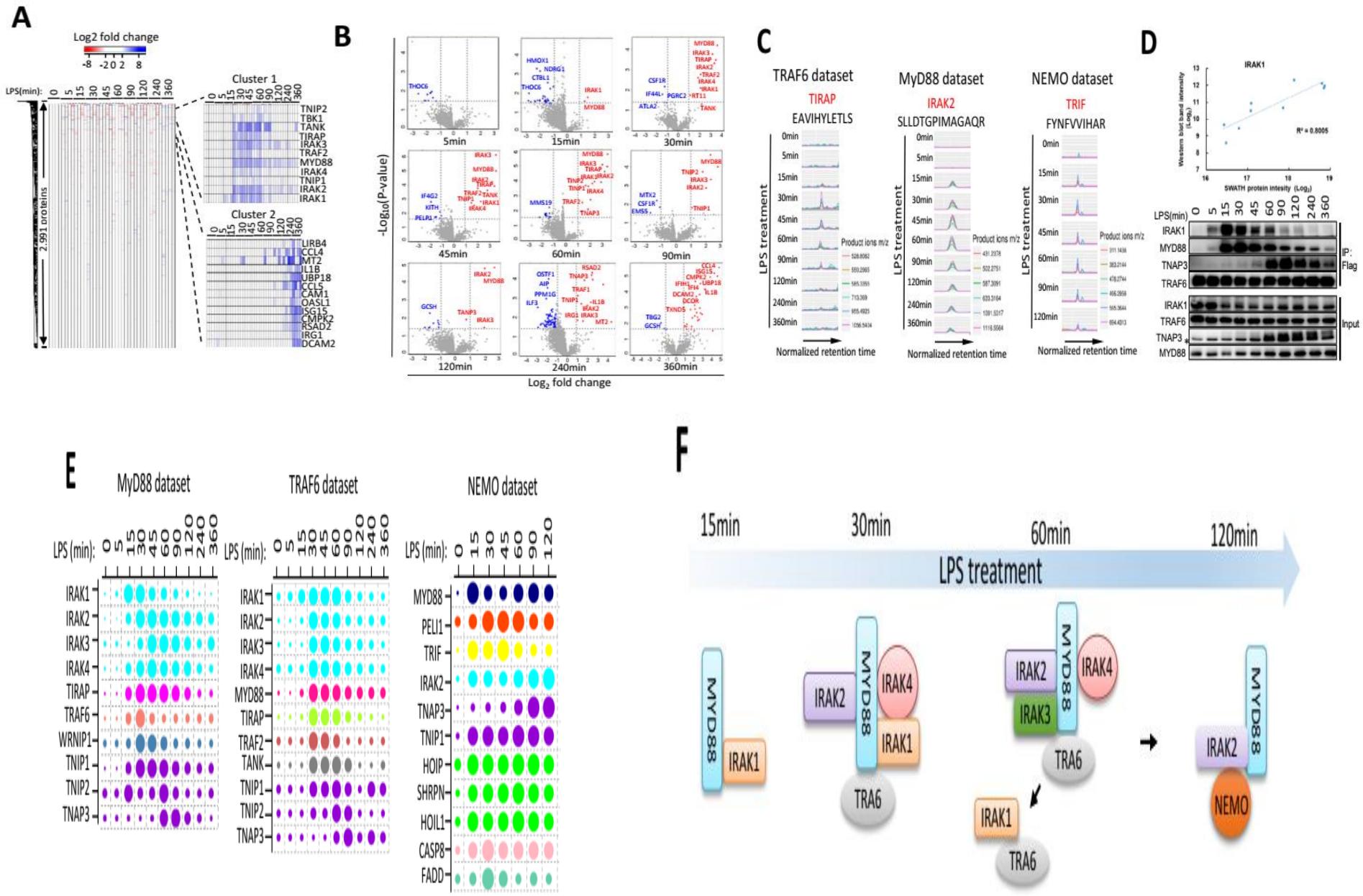


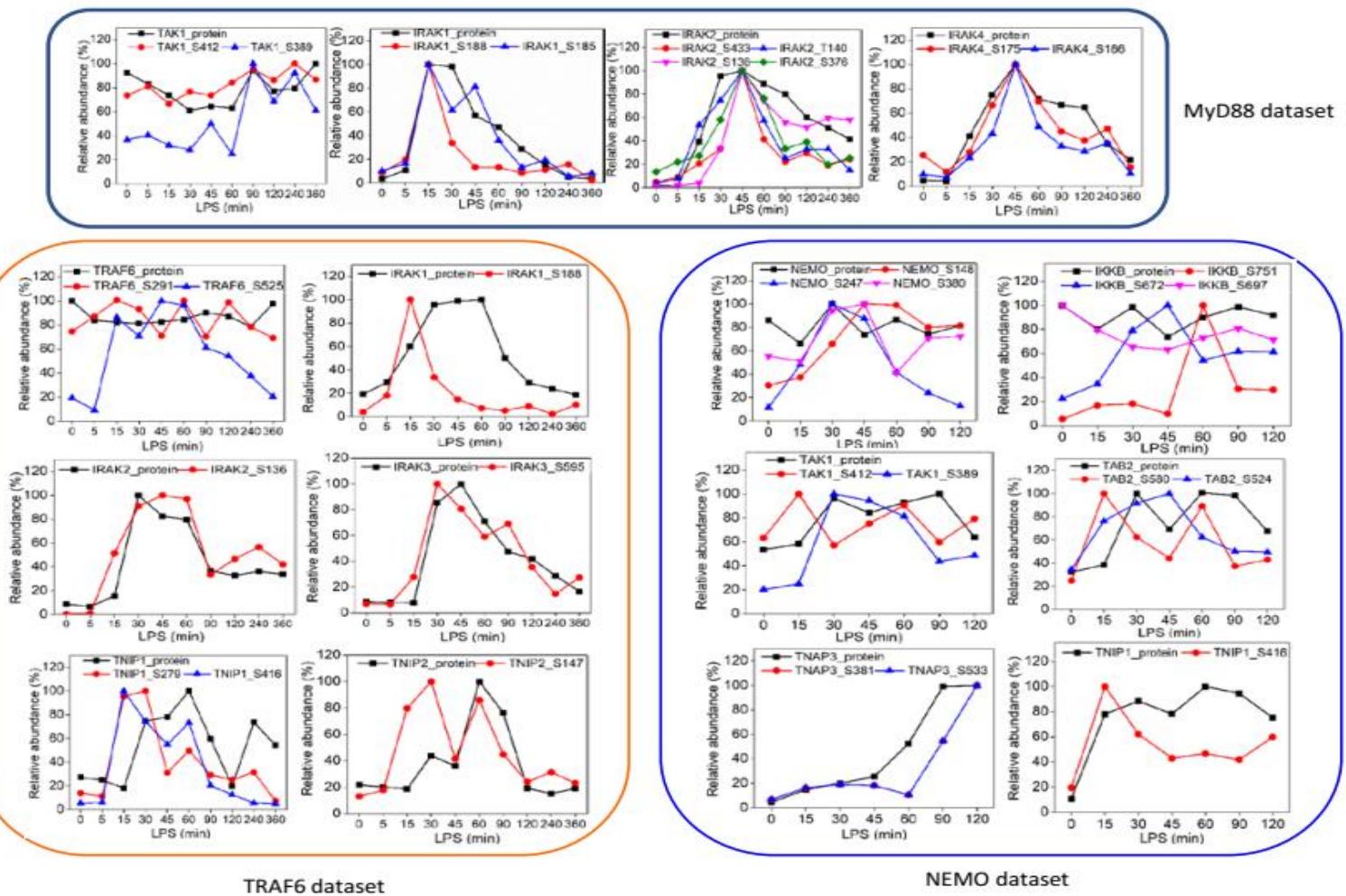
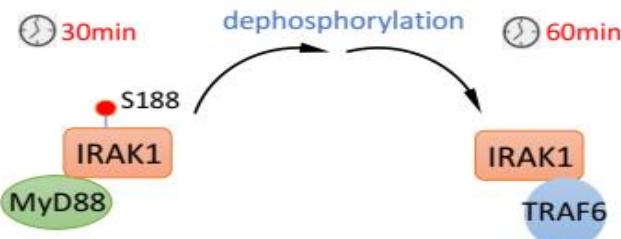
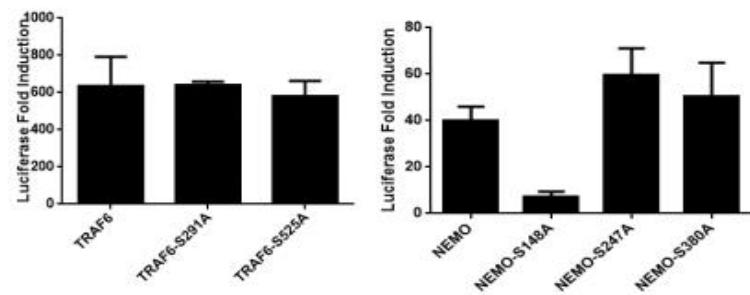
SWATH/DIA数据分析

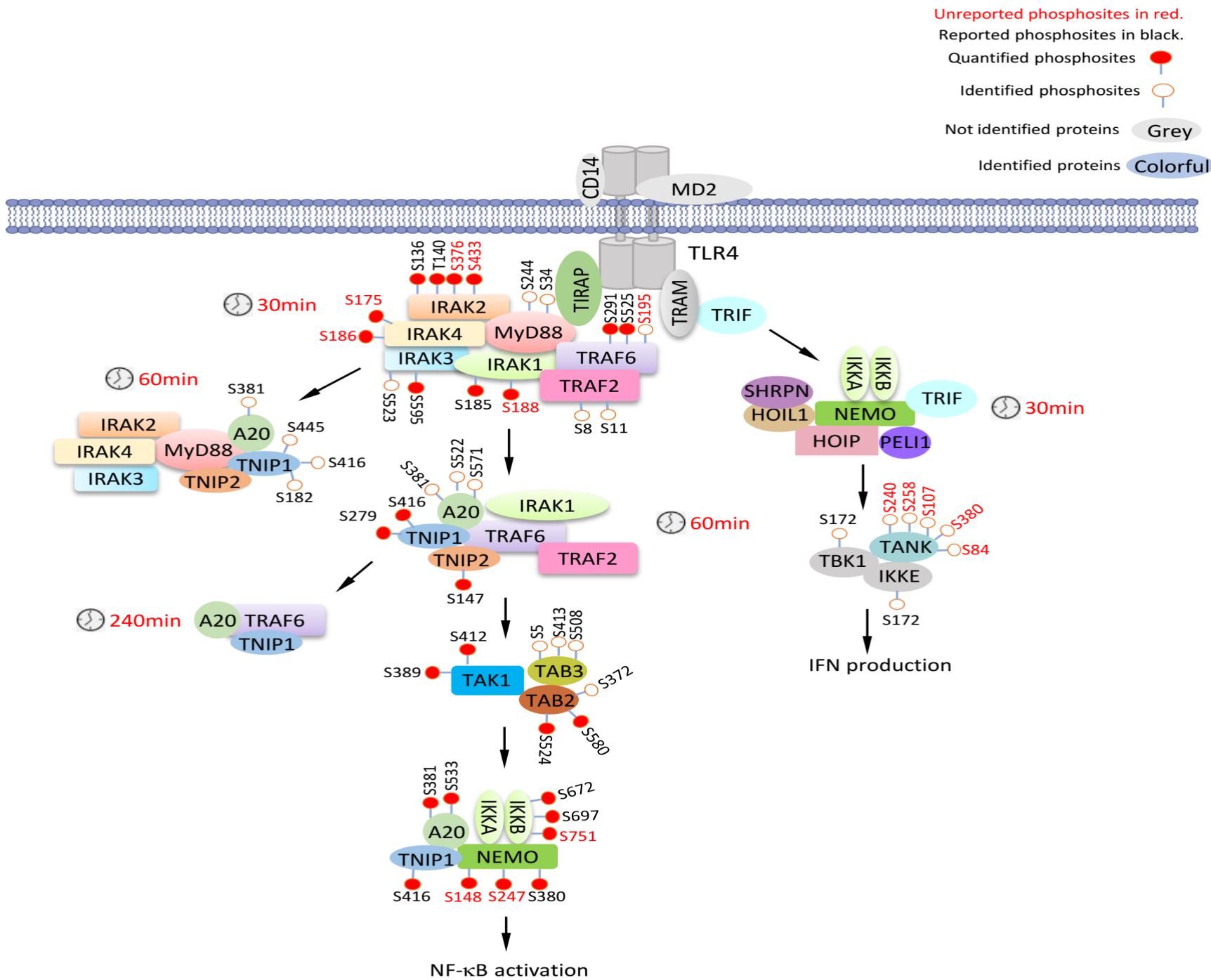
- Targeted extraction of quantitative information from the acquired DIA data with the use of libraries containing retention time and fragmentation information for the desired peptide species. **[Skyline/Spectronaut]**
- DIA data → pseudo–tandem MS spectra → (untargeted) database search → Quantification by targeted extraction **[DIA-Umpire/Group-DIA/MSPLIT-DIA]**

系统性研究LPS信号通路中蛋白质互作及磷酸化事件





A**B****C**



靶向蛋白质组学 (Targeted proteomics)

➤ 发现蛋白质组学

discovery-based investigation

样品 → 质谱数据 → 解释/发现

➤ 靶向蛋白质组学

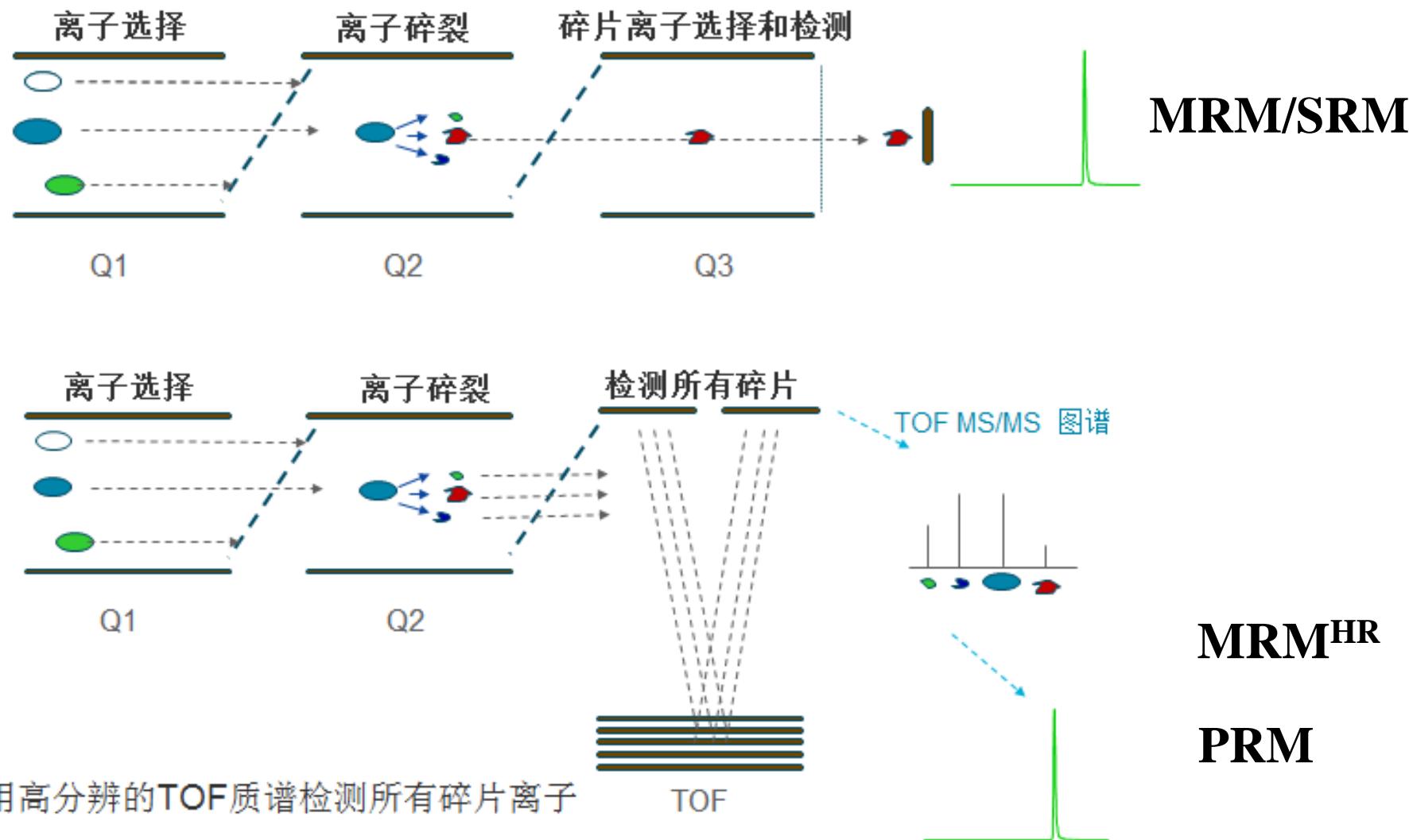
hypothesis-driven investigation

假说 → 质谱数据 → 验证



MS strategy: Targeted VS. Large-scale

靶向扫描 MRM & PRM

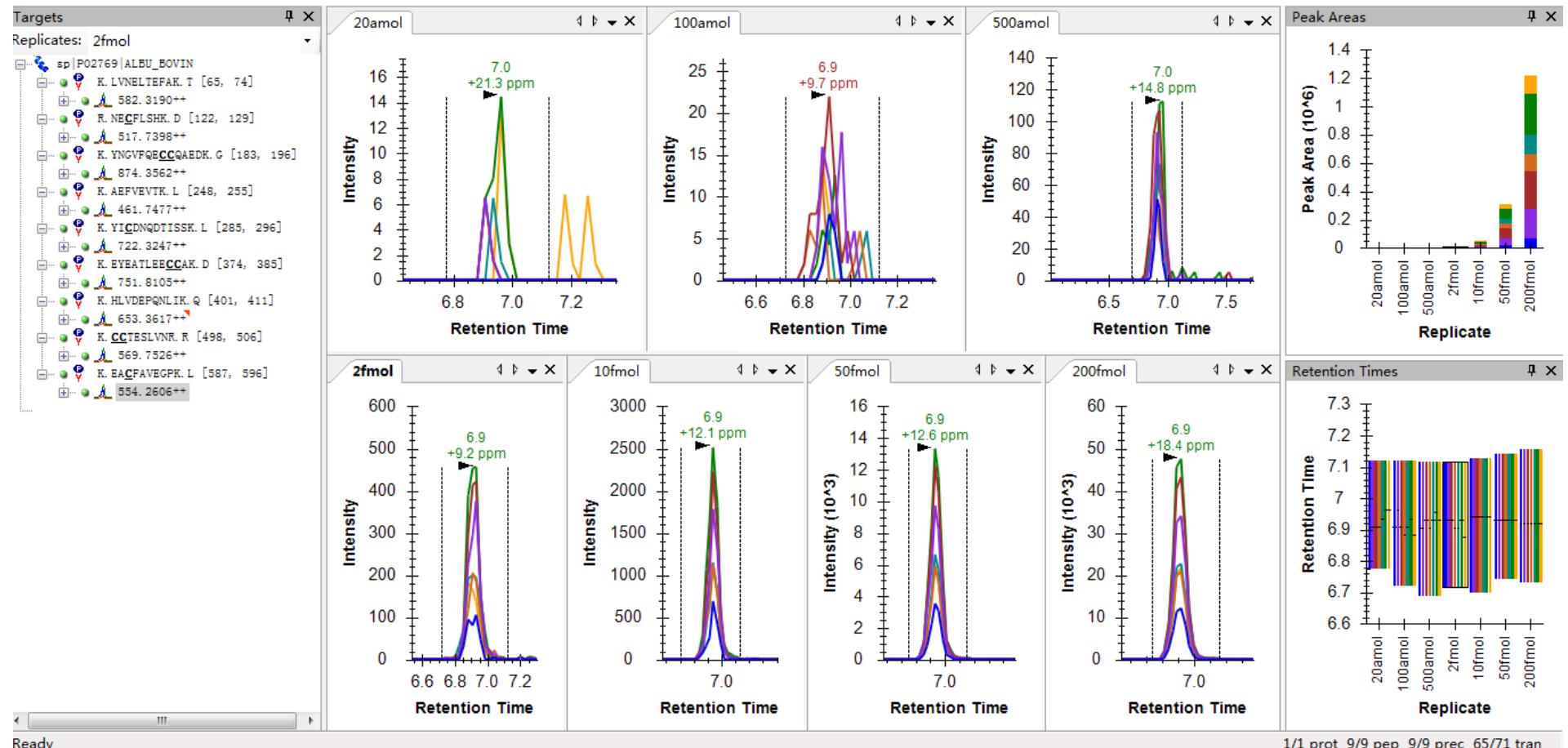


Western Blots *versus* Selected Reaction Monitoring Assays: Time to Turn the Tables?

Ruedi Aebersold, Alma L. Burlingame, and Ralph A. Bradshaw

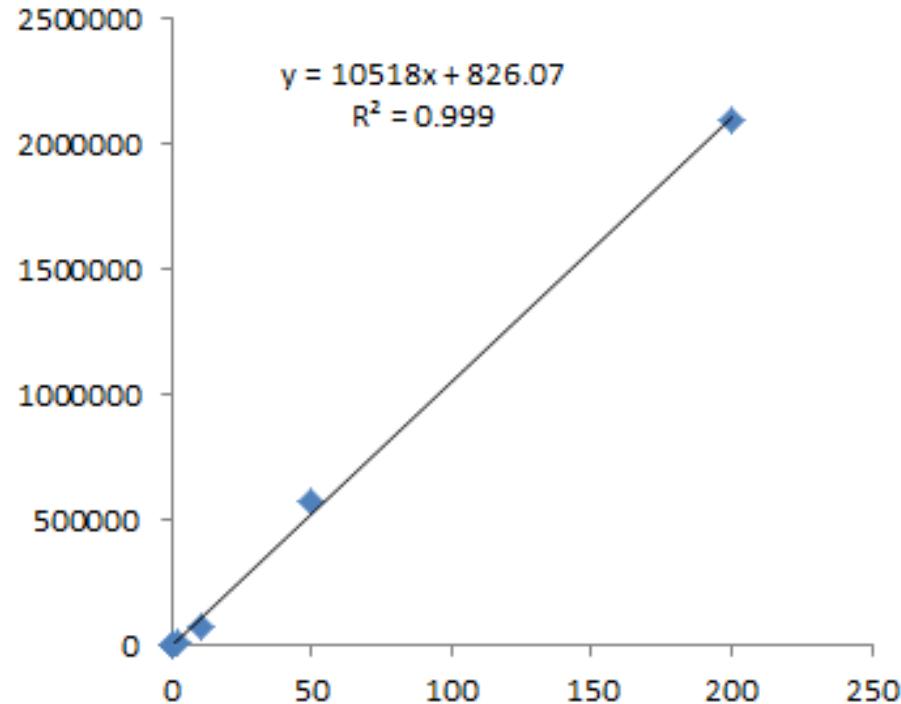
- Authors who submit papers containing quantitative protein data generated via MS are frequently asked by reviewers to validate some of the values with Western blotting.
- Unfortunately, the quality of quantitative data obtained via Western blotting is not comparable to that obtained with SRM.
- We posit that the request to validate quantitative MS data by Western blotting is no longer justified.
- In fact, it may be time to “turn the tables” and request that Western blotting results be validated by MS.

PRM定量测试



定量范围可达4个数量级

Con. (fmol)	Total Area
0.02	545
0.1	840
0.5	4206
2	13443
10	78509
50	579807
200	2106256



单位换算: $1 \text{ mol} = 10^3 \text{ mmol} = 10^6 \mu\text{mol} = 10^9 \text{ nmol} = 10^{12} \text{ pmol} = 10^{15} \text{ fmol} = 10^{18} \text{ amol}$

PRM应用范围

- 靶向蛋白质组学技术：“质谱领域Western Blot”
- 蛋白/肽段的相对/绝对定量：
 - 验证定量蛋白质组学数据
 - 要做WB，没有抗体的 (e.g. 蛋白磷酸化定量)
 - 功能研究中涉及到蛋白质定量的
- PRM注意事项：
 - 明确实验目的，确定目标蛋白/肽段
 - 需要选定内参蛋白，用于定量归一化
 - 通过标准肽段可以实现绝对定量

质谱数据采集方式

- DDA (Shotgun, IDA, topN)
- SWATH/DIA
- Targeted method (MRM, SRM; PRM, MRM^{HR})



机关枪扫射



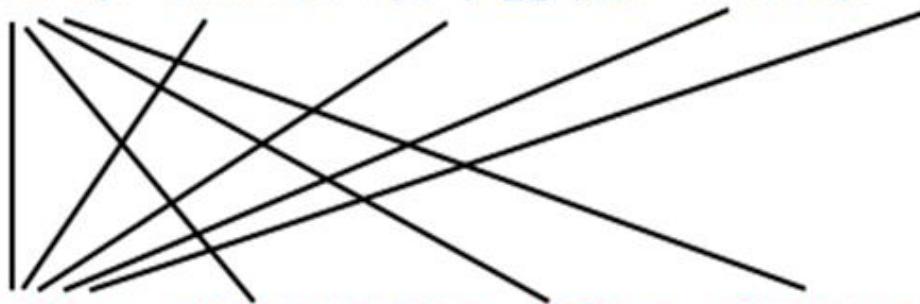
地毯式轰炸



精准狙击

总结：蛋白质组学解决方案

Sample: LFQ、SILAC、双甲基化、iTRAQ、TMT



Mass spec: DDA、SWATH/DIA、SRM、PRM/MRM^{HR}

- 定性蛋白质组学
- 定量蛋白质组学
- 靶向蛋白质组学

蛋白质学组平台整体架构 (实景图)



胶内蛋白酶解	溶液内蛋白酶解	稳定同位素标记技术	复杂样品前处理技术	磷酸化肽段富集技术	亚细胞器蛋白组分离技术



液质联用高通量蛋白鉴定技术	高通量 Label-free 蛋白定量检测技术	高通量 TMT 蛋白定量检测技术	高通量 SILAC 蛋白定量检测技术	高通量 DIA 蛋白定量检测技术	高通量 PRM 蛋白定量检测技术
---------------	-------------------------	------------------	--------------------	------------------	------------------



PD 数据分析流程	MaxQuant 数据分析流程	蛋白相互作用网络分析
		蛋白信号通路分析

- 蓝色文字代表已经建成并大力开展的工作
- 灰色文字代表正在建立并准备开展的工作

质谱仪及主要性能



Thermo公司的Q Exactive HF-X

- 目前最顶尖的质谱仪之一，具备超高灵敏度、分辨率、检测精度、扫描速度。
- 可以满足蛋白质组学领域几乎所有的研究及应用需求。



Thermo公司的LTQ Orbitrap Elite

- Orbitrap系列中最经典的一款质谱仪，具备极强的稳定性、耐用性、精准度。
- 可以满足蛋白质组学领域绝大部分的研究及应用需求。

核心成员及服务内容



陈希, 武汉大学博士, 高级工程师, 蛋白质组学技术专家, 在蛋白质组及生物质谱领域有14年专业积淀, 发表SCI论文30余篇, 申请发明专利5项, 实用新型专利2项, 软件著作权8项, 主持多项国家及省市基金。



王敏, 中国药科大学硕士, 实验师, 具有丰富的液质管理经验, 能够熟练操作使用多种液质系统及进行相关维护, 熟练掌握蛋白质样品提取、胶内酶解、溶液内酶解、肽段脱盐、分离等样品前处理方法。



贾书召, 华中农业大学硕士, 助理工程师, 主要负责蛋白质组样本前处理、质谱上机、数据分析等, 在鉴定蛋白质组学、定量蛋白质组学、蛋白质的翻译后修饰及其定量等研究领域积累了大量经验。

胶内蛋白质鉴定	SDS-PAGE电泳得到的条带, 经胶内酶解后用于质谱分析以获得蛋白质信息。此外, 蛋白的翻译后修饰位点(如磷酸化、泛素化、乙酰化等)也可以通过该方法进行检测。
溶液内蛋白质鉴定	复杂的全细胞裂解液、IP洗脱液、蛋白纯化产物, 通过质谱检测, 可以得到样品中蛋白的鉴定结果。
非标记定量蛋白质组学分析	无需标记, 操作简单, 不受比较样品数限制。对实验过程的操作和质谱仪的状态要求较高。
标记定量蛋白质组学分析	目前基于标记的定量蛋白质组学方法可分为化学标记和代谢标记。常用的化学标记如TMT、iTRAQ、Dimethylation; 代谢标记通常指SILAC。可同时比较多组样品之间的蛋白表达量。
磷酸化位点鉴定和定量分析	蛋白质磷酸化修饰是生物体内普遍存在的调节机制。目前, 基于IMAC/TiO ₂ 的磷酸化肽段富集技术, 结合高通量液相色谱质谱联用技术, 成为高通量定性和定量研究蛋白质磷酸化修饰的最有效手段。

討討