

# 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

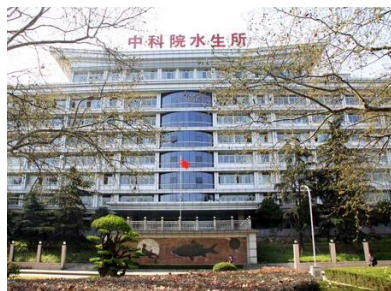
# 个人简介



**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<sup>HR</sup>/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

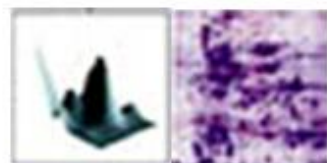
## 单个蛋白研究



## 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



荧光差异凝胶电泳(1997)



人类蛋白质组 (2014)

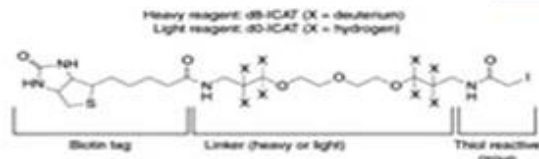
1970 1980 1990 2000 2010

双向电泳技术 (1975)



首次提出蛋白质组概念(1994)

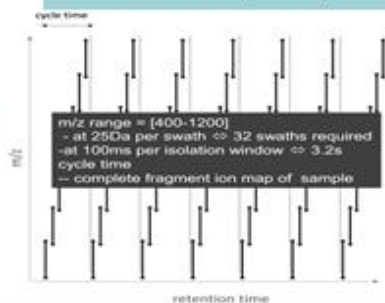
同位素亲和标签(1999)



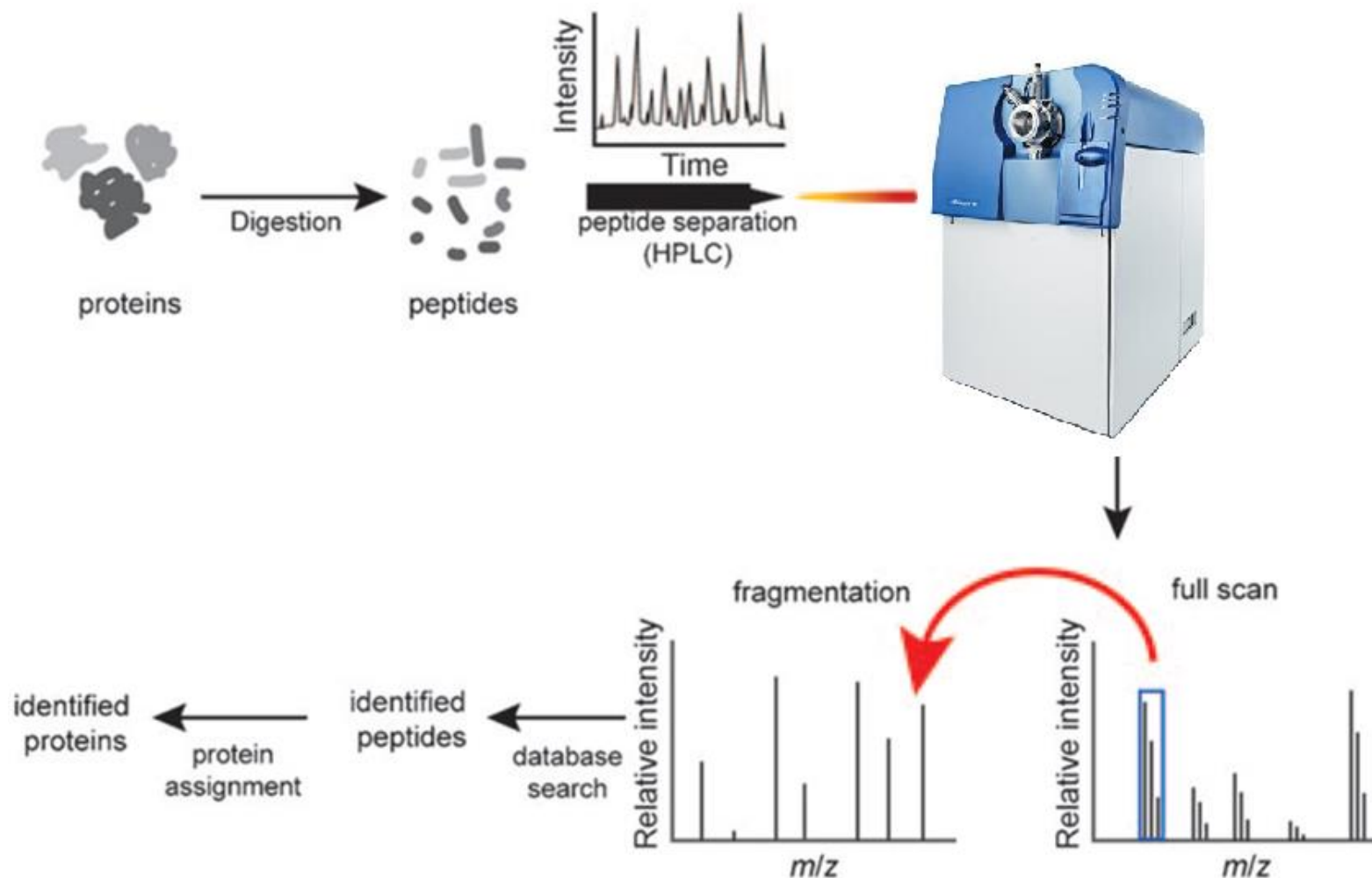
软电离质谱技术获诺奖(2002)



SWATH(2012)

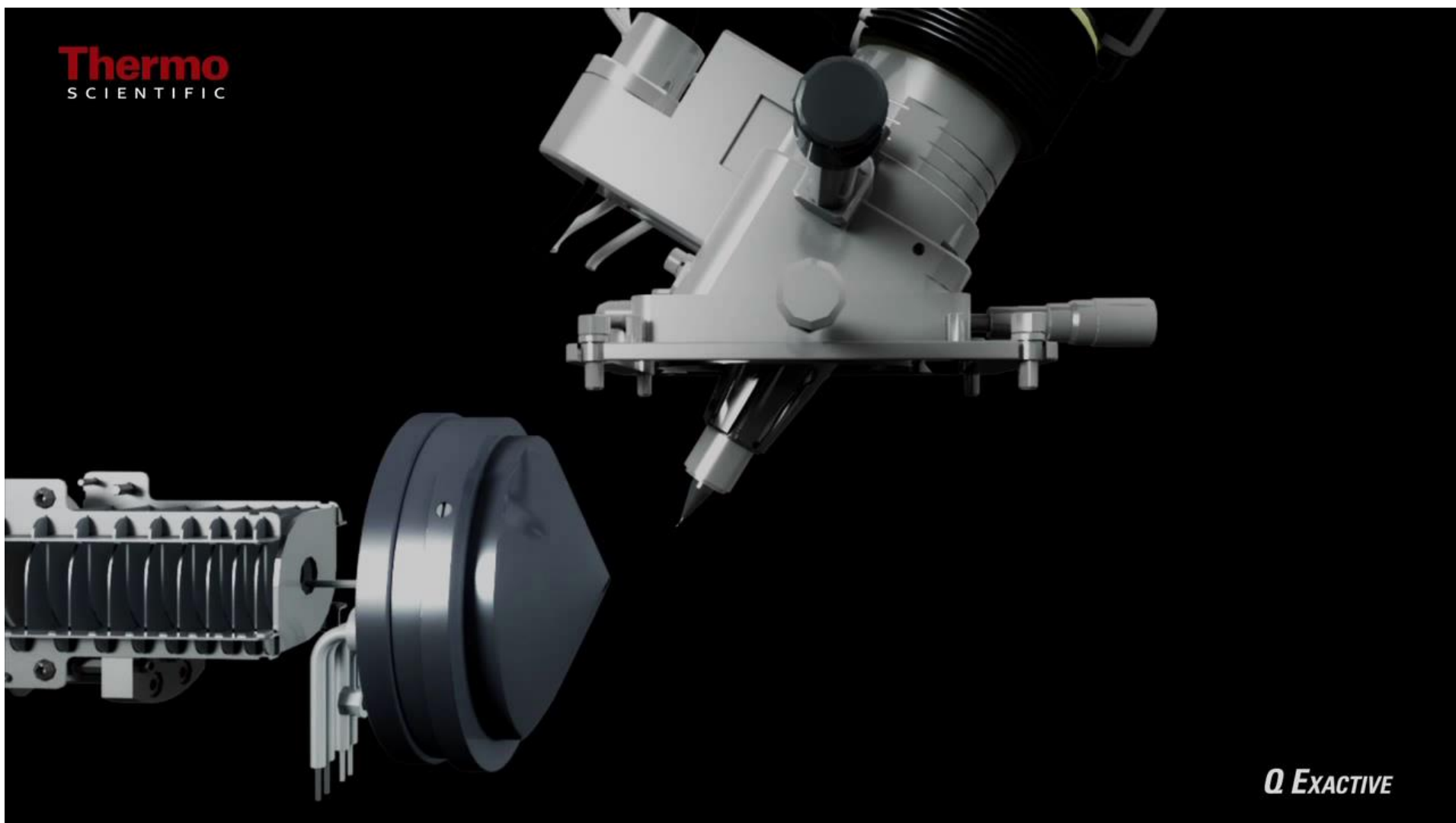


# LC-MS/MS实验经典流程



**“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<sup>HR</sup>/PRM)  
@质谱领域的WB



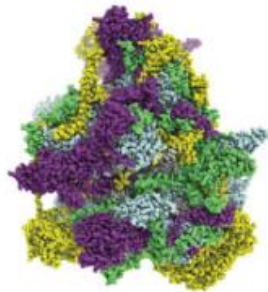
# 发现蛋白质组学 (Discovery proteomics )

---

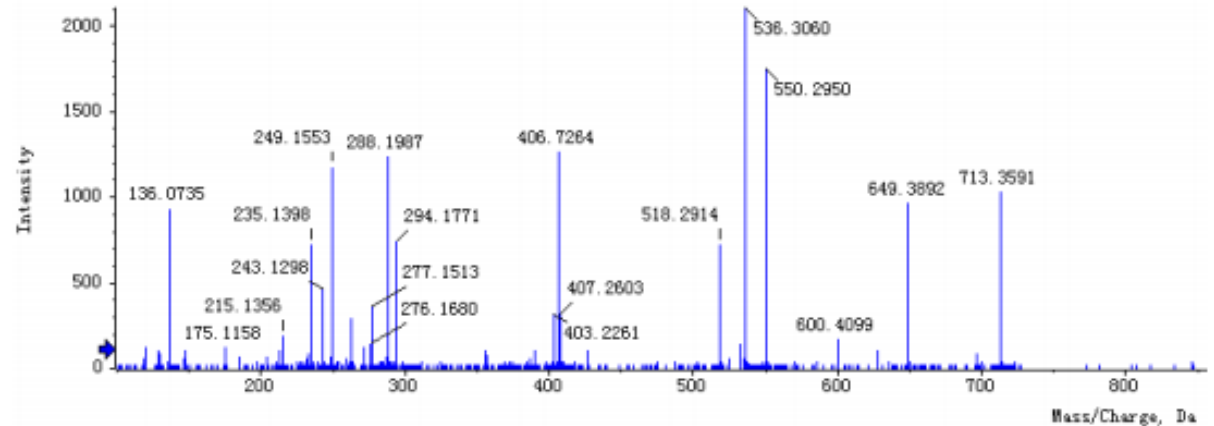
## 蛋白质组学：从定性到定量

- 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

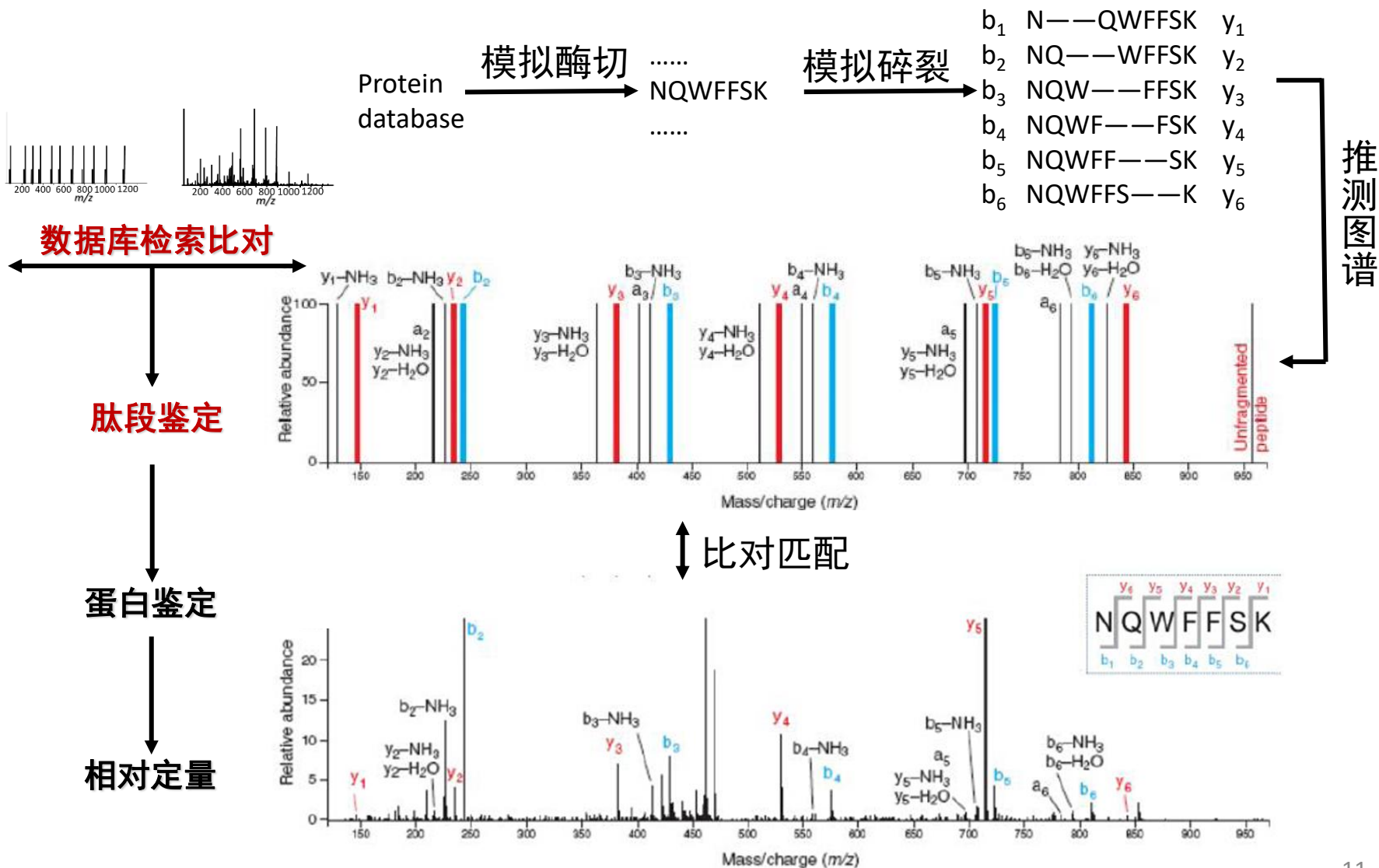


•  
•  
•



MW	ion			ion	MW
88	b <sub>1</sub>	S	GFLEEDELK	y <sub>9</sub>	1080
145	b <sub>2</sub>	SG	FLEEDELK	y <sub>8</sub>	1022
292	b <sub>3</sub>	SGF	LEEDELK	y <sub>7</sub>	875
405	b <sub>4</sub>	SGFL	EEDELK	y <sub>6</sub>	762
534	b <sub>5</sub>	SGFLE	EDELK	y <sub>5</sub>	633
663	b <sub>6</sub>	SGFLEE	DELK	y <sub>4</sub>	504
778	b <sub>7</sub>	SGFLEED	ELK	y <sub>3</sub>	389
907	b <sub>8</sub>	SGFLEEDE	LK	y <sub>2</sub>	260
1020	b <sub>9</sub>	SGFLEEDEL	K	y <sub>1</sub>	147

# 肽段鉴定原理



# 蛋白质组定量的类型

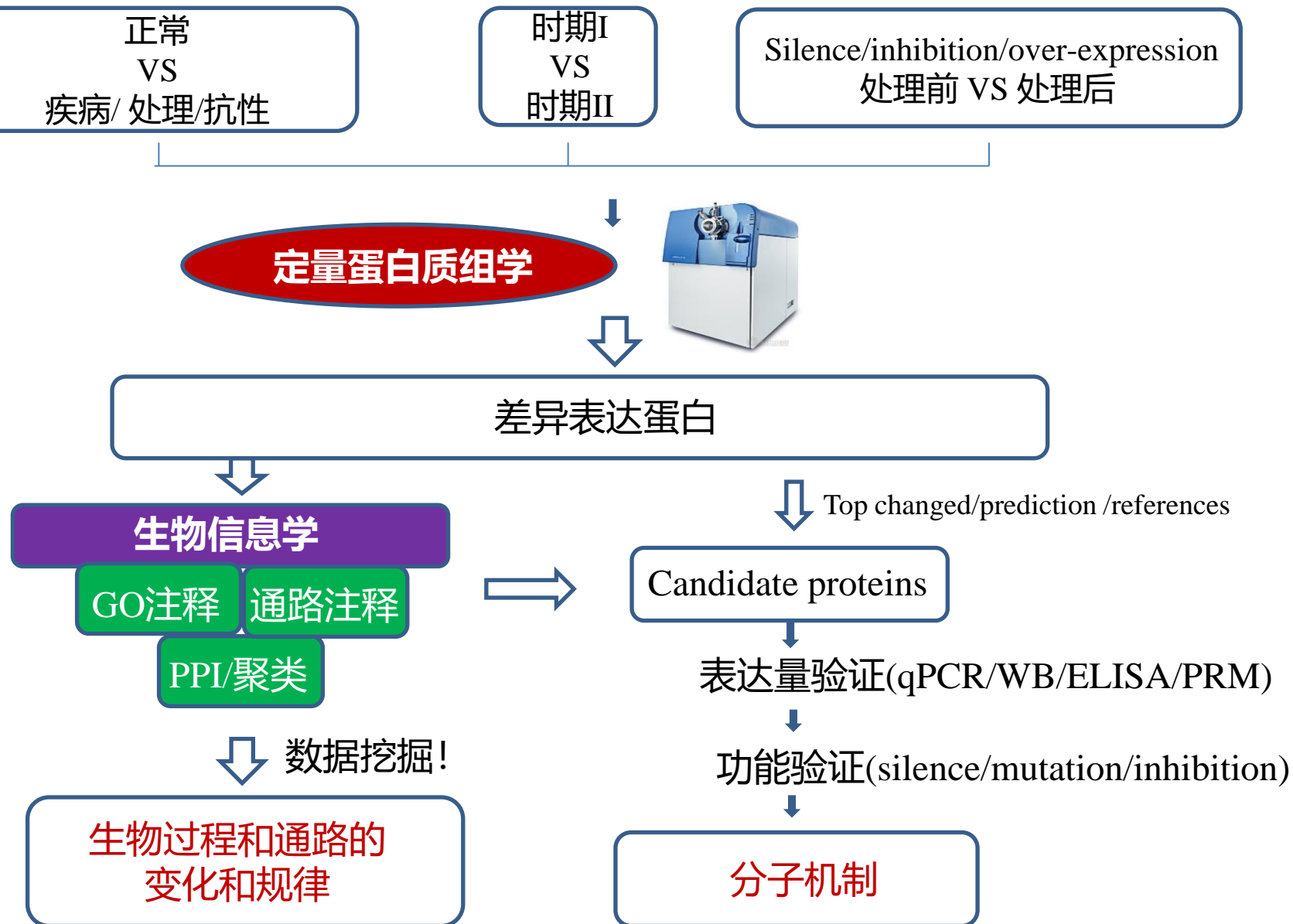
## ➤ 两类定量形式

- **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）。

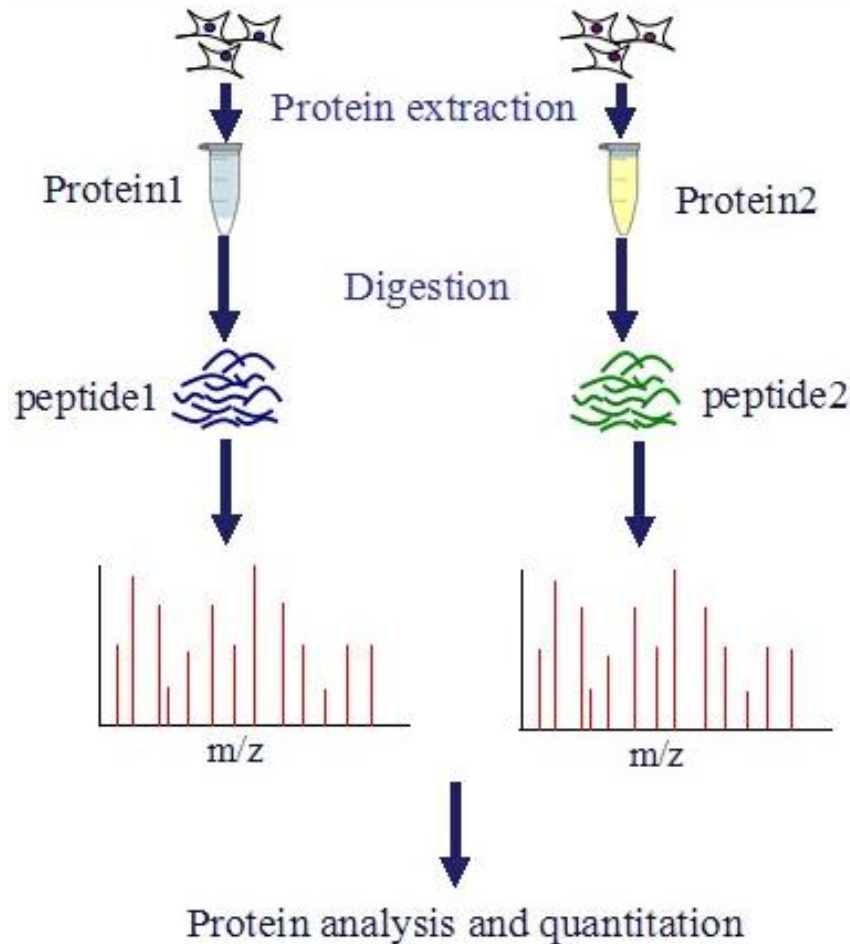
## ➤ 蛋白质组学定量技术

- **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

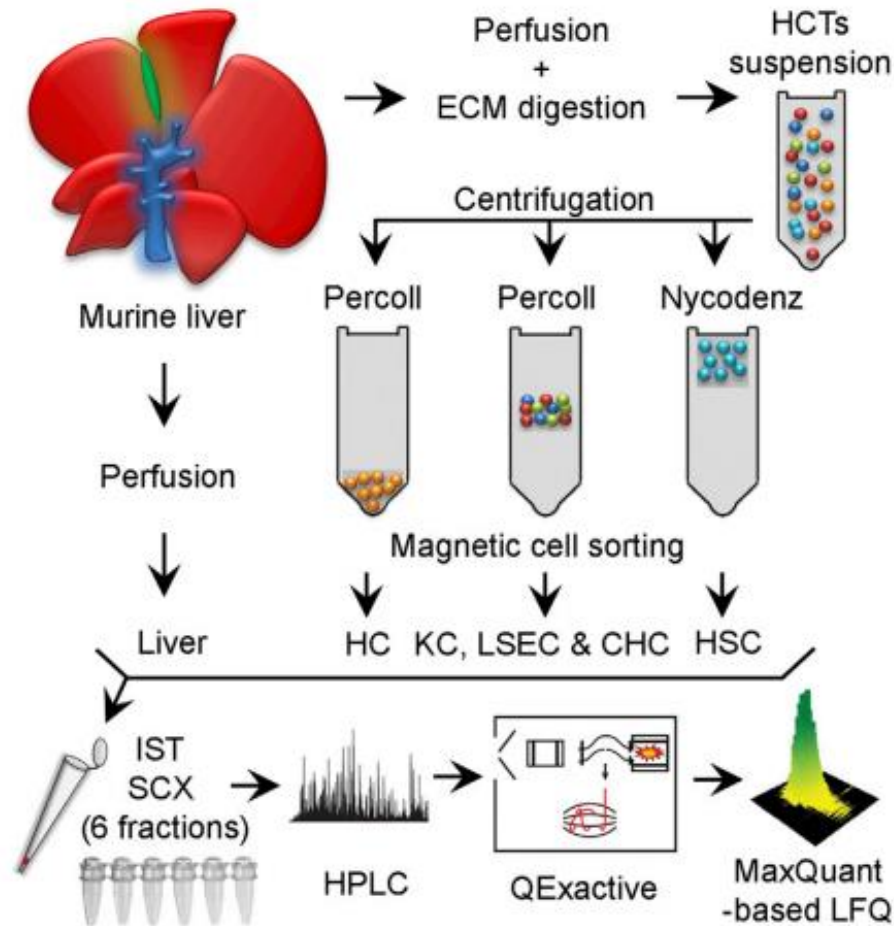


# 非标定量 (Label-free quantification)



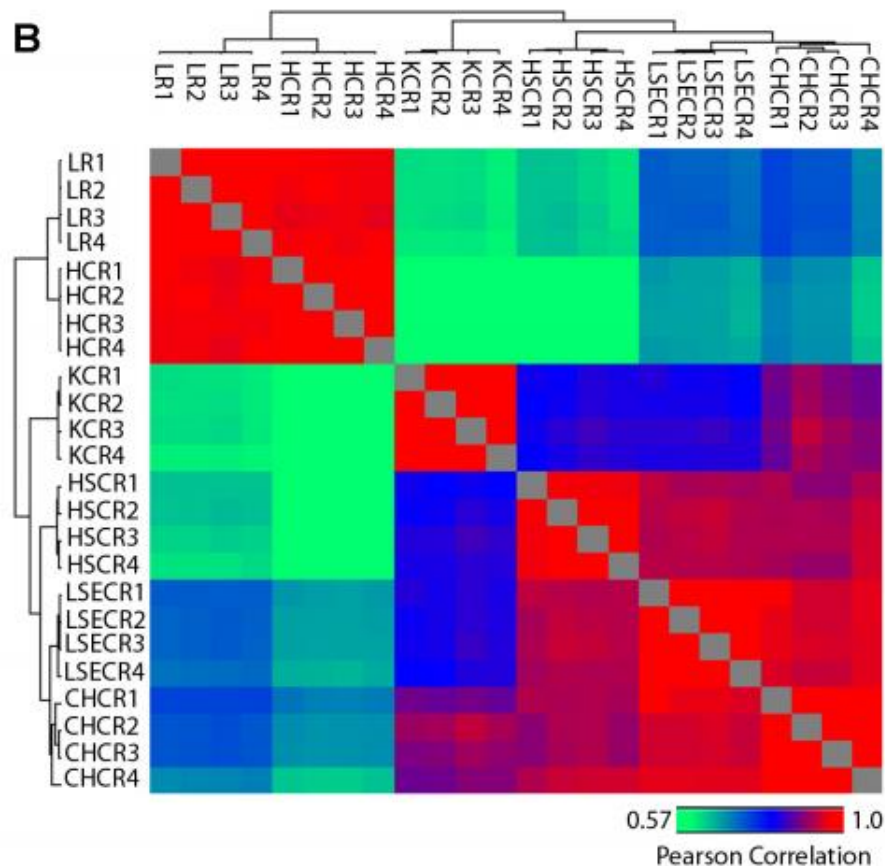
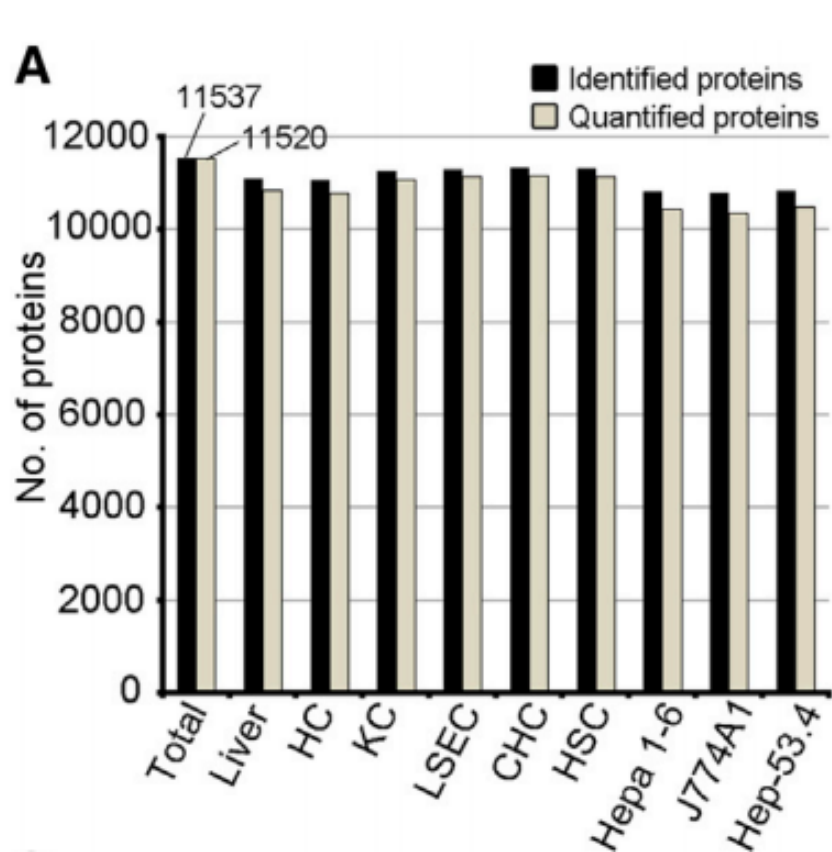
- 不同样品单独处理、分别检测
- 处理步骤越多，引入的差异越大，影响定量准确性
- 对仪器的状态和稳定性要求较高
- 简单、不需标记、通量高

# 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

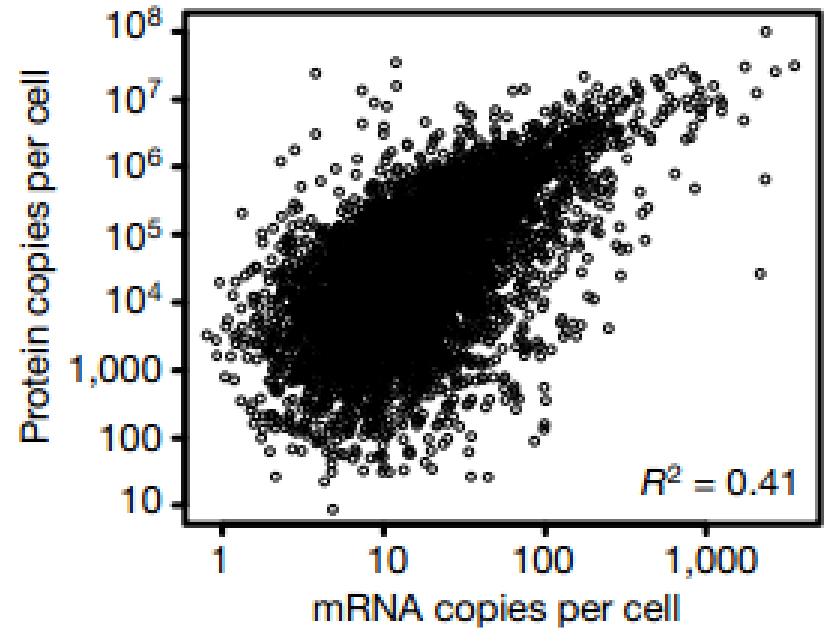
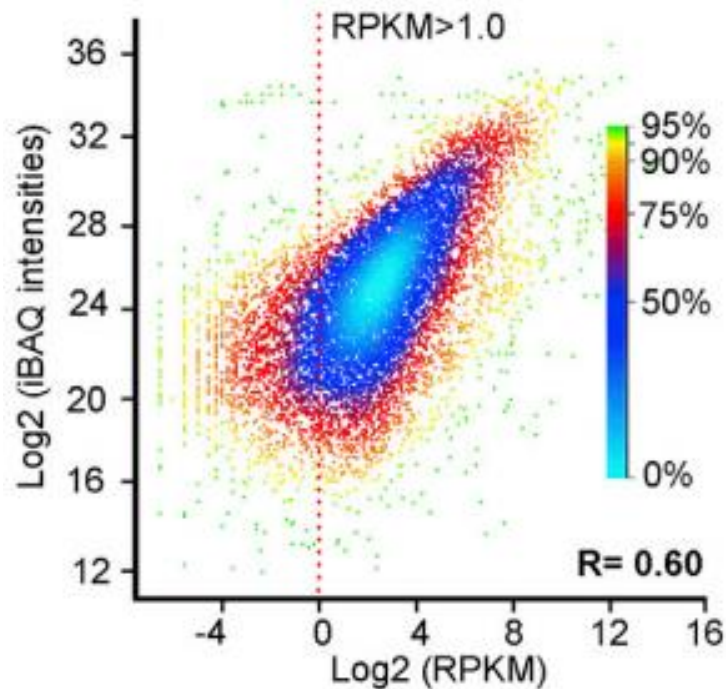
# 定量到11520个蛋白



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

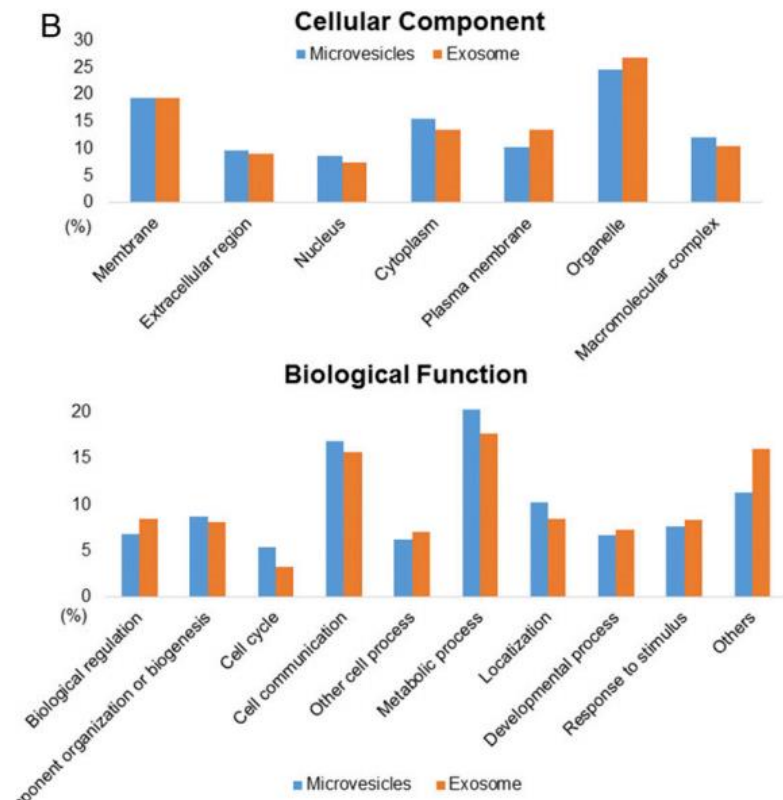
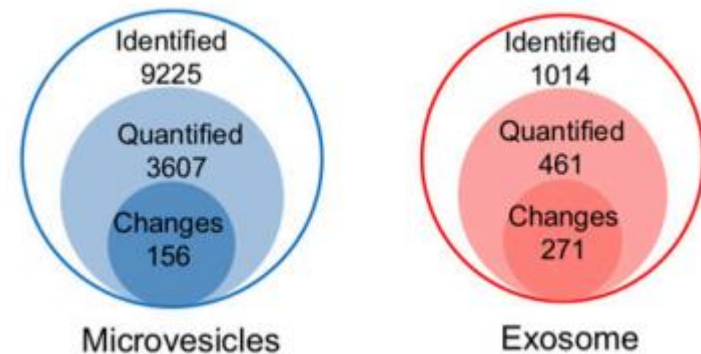
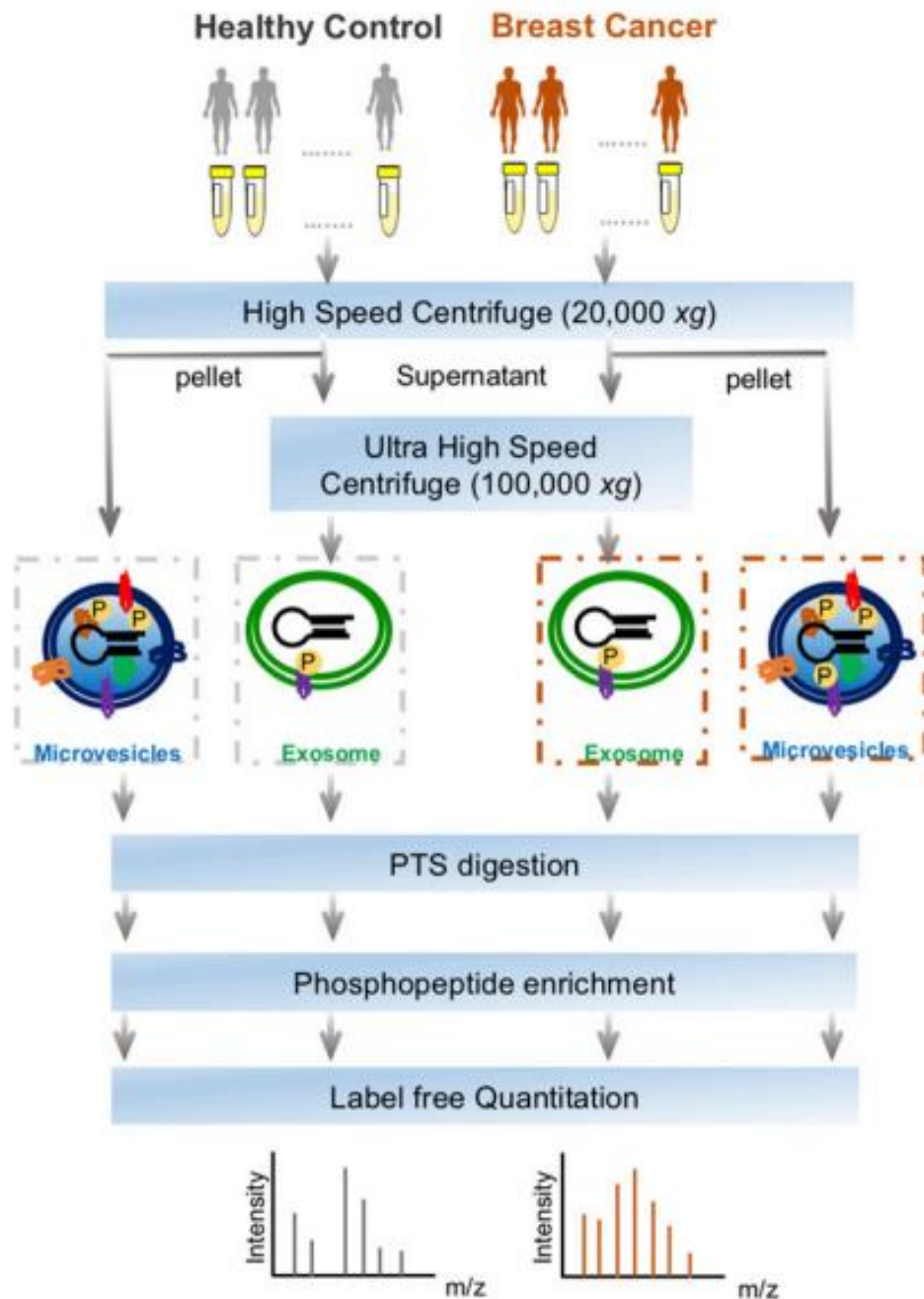
# Phosphoproteins in extracellular vesicles as candidate markers for breast cancer

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

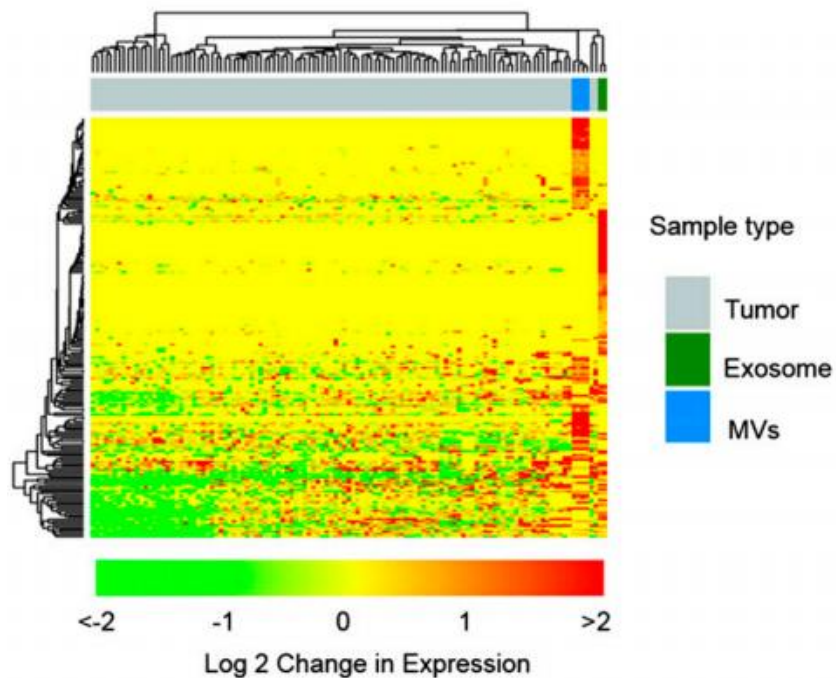
<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Purdue University, West Lafayette, IN 47907; <sup>b</sup>Department of Medicinal Chemistry & Molecular Pharmacology, Purdue University, West Lafayette, IN 47907; <sup>c</sup>Department of Chemistry, Purdue University, West Lafayette, IN 47907; <sup>d</sup>Department of Innovations, Tymora Analytical Operations, West Lafayette, IN 47906; <sup>e</sup>Department of Horticulture and Landscape Architecture, Purdue University, West Lafayette, IN 47907; <sup>f</sup>Shanghai Center for Plant Stress Biology and Center for Excellence in Molecular Plant Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201602, China; and <sup>g</sup>Purdue 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)

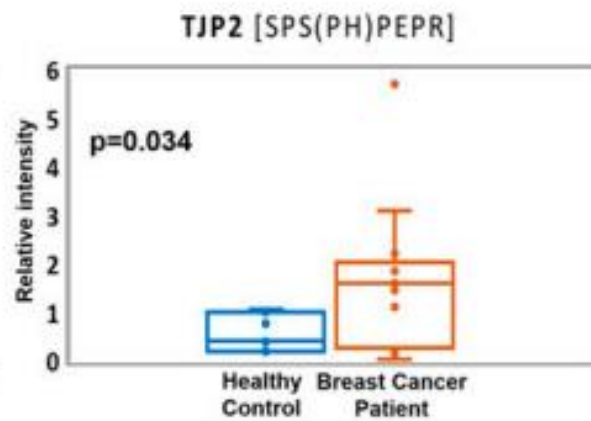
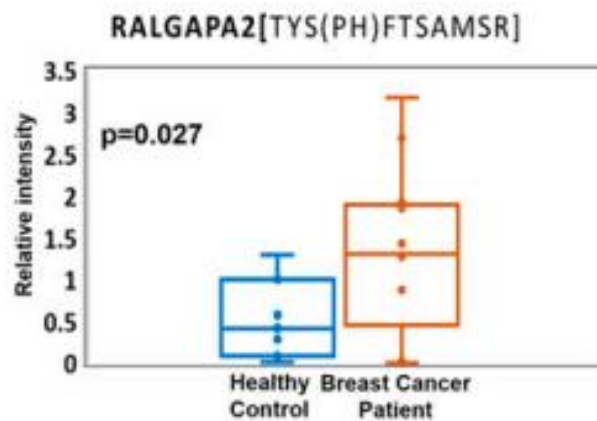
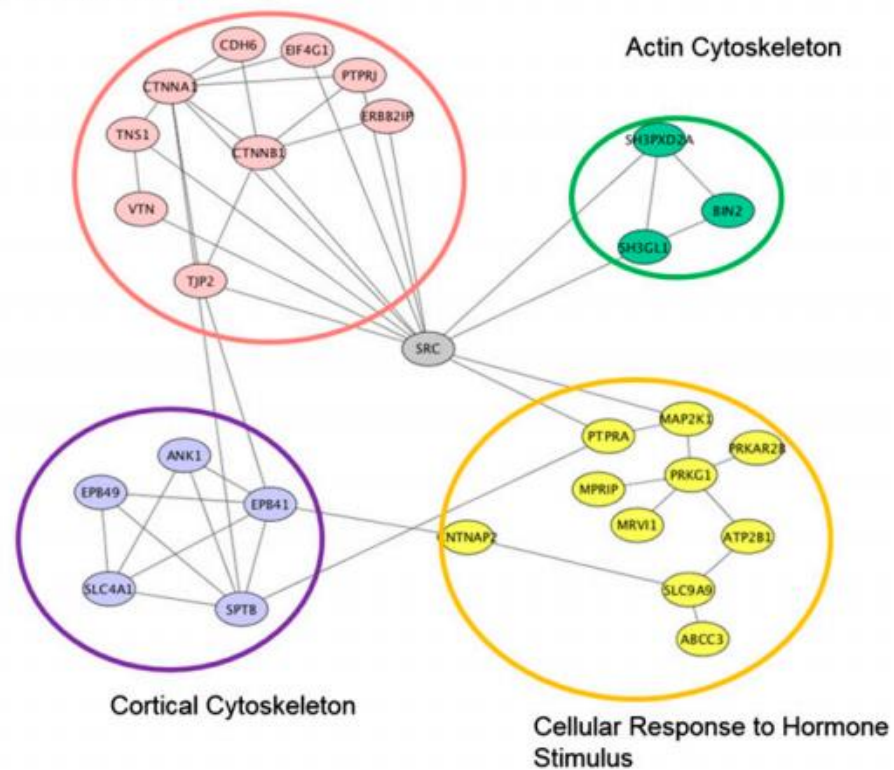
- 研究思路、手段：
  - + 生物学问题/实验材料
  - + 定量蛋白质组学方法
  - + 生物信息学分析
  - + PRM验证



A

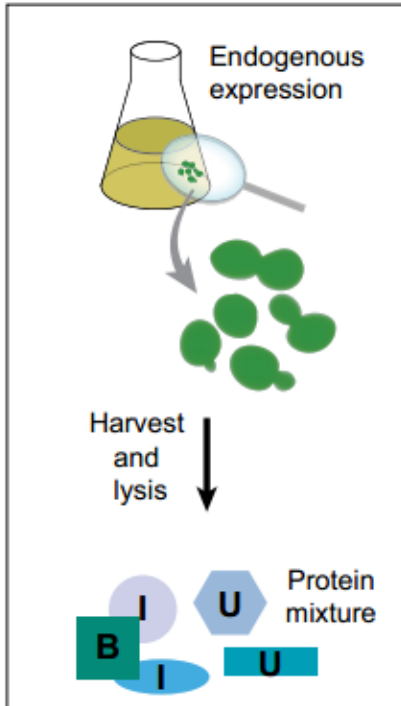


B Cytoskeleton Remodeling

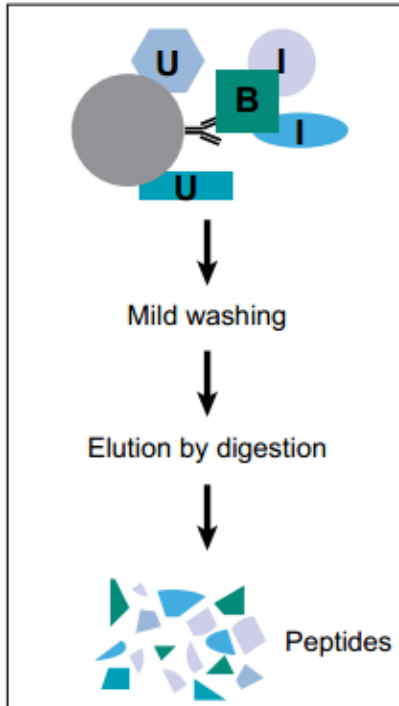


# AE-MS (Affinity-**Enrichment** MS)

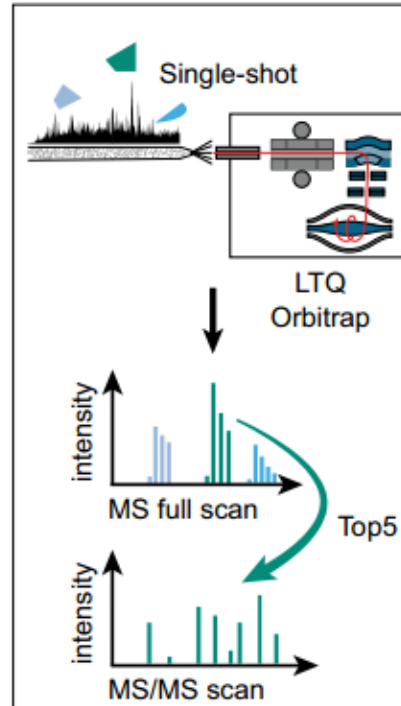
## A Protein extraction



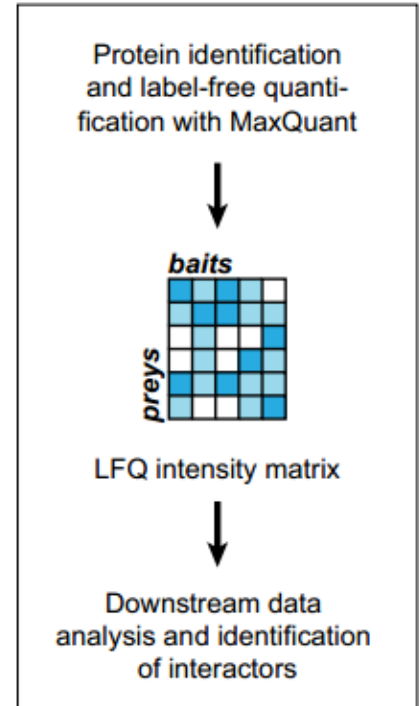
## B Single-step AE



## C LC-MS/MS analysis



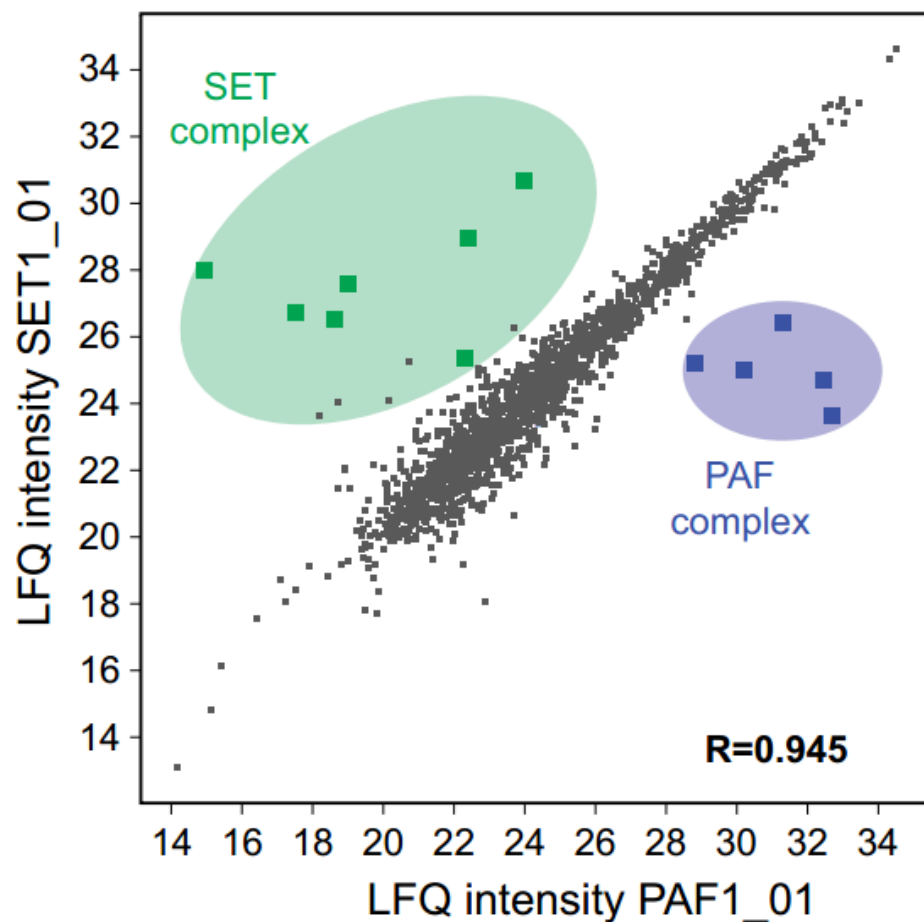
## D Data analysis



不再拼命去除非特异，而是善加利用。



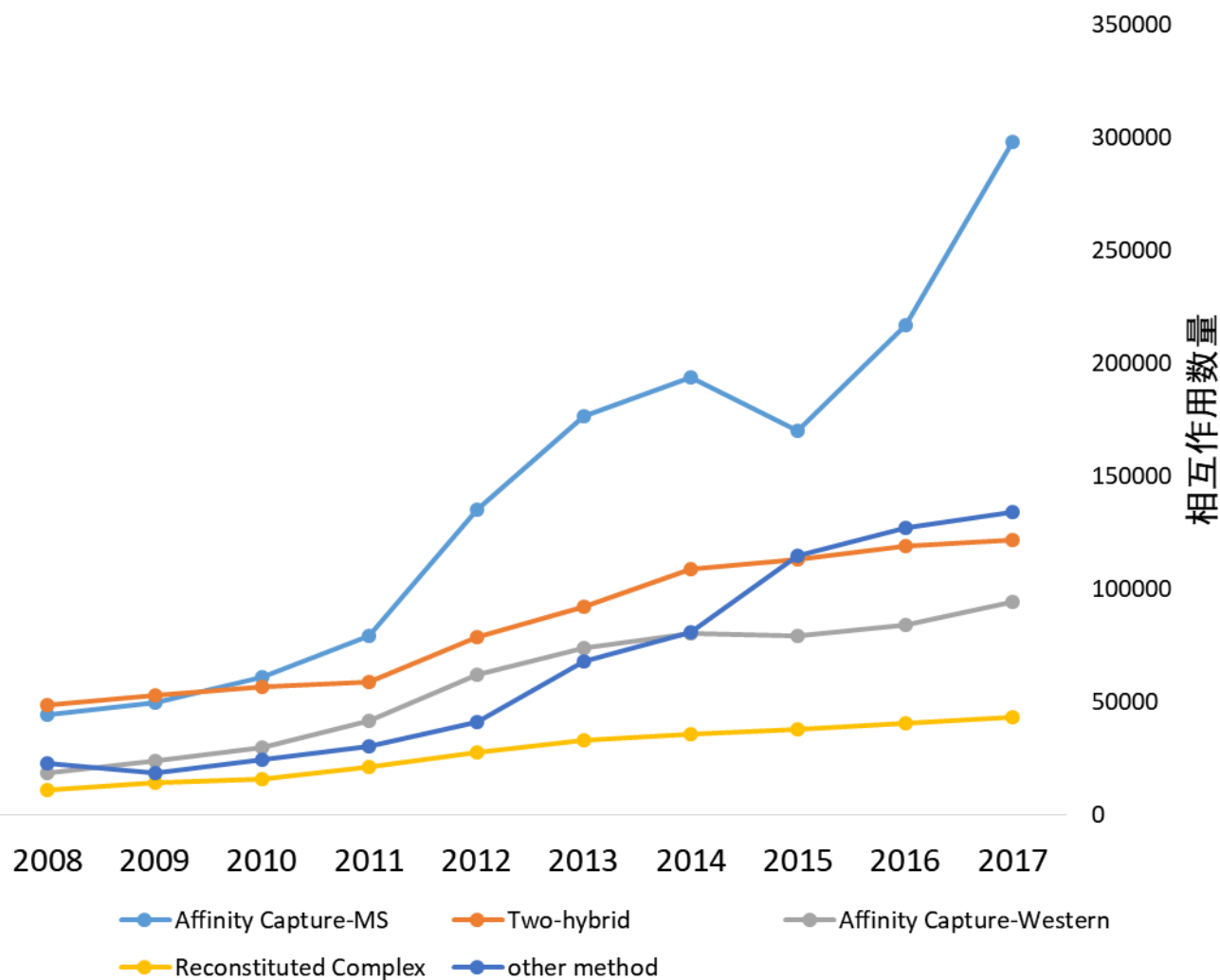
# AE-MS的优势



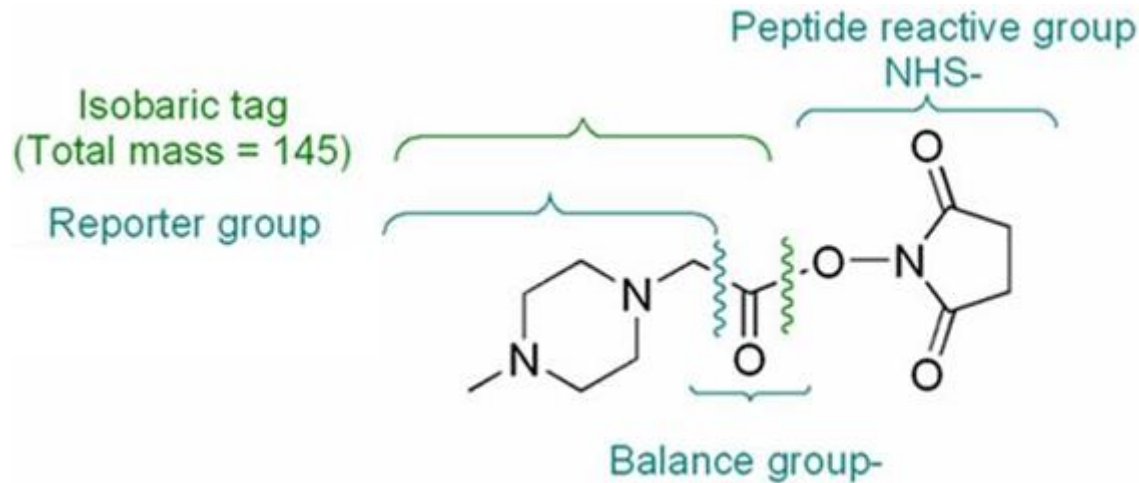
- 温和冲洗，保留了较弱的相互作用蛋白。
- 充分利用了现代质谱仪的强大。
- 样品间可以相互做对照。

# AP-MS是目前研究蛋白相互作用最主流的方法

BioGrid 收录相互作用统计

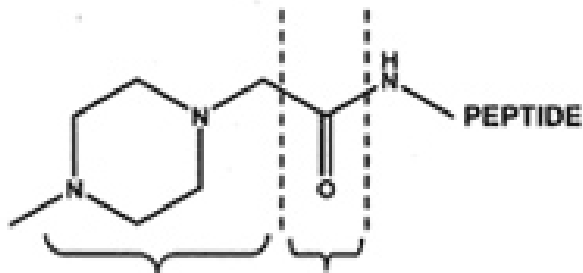


# iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantification )



iTRAQ reagent

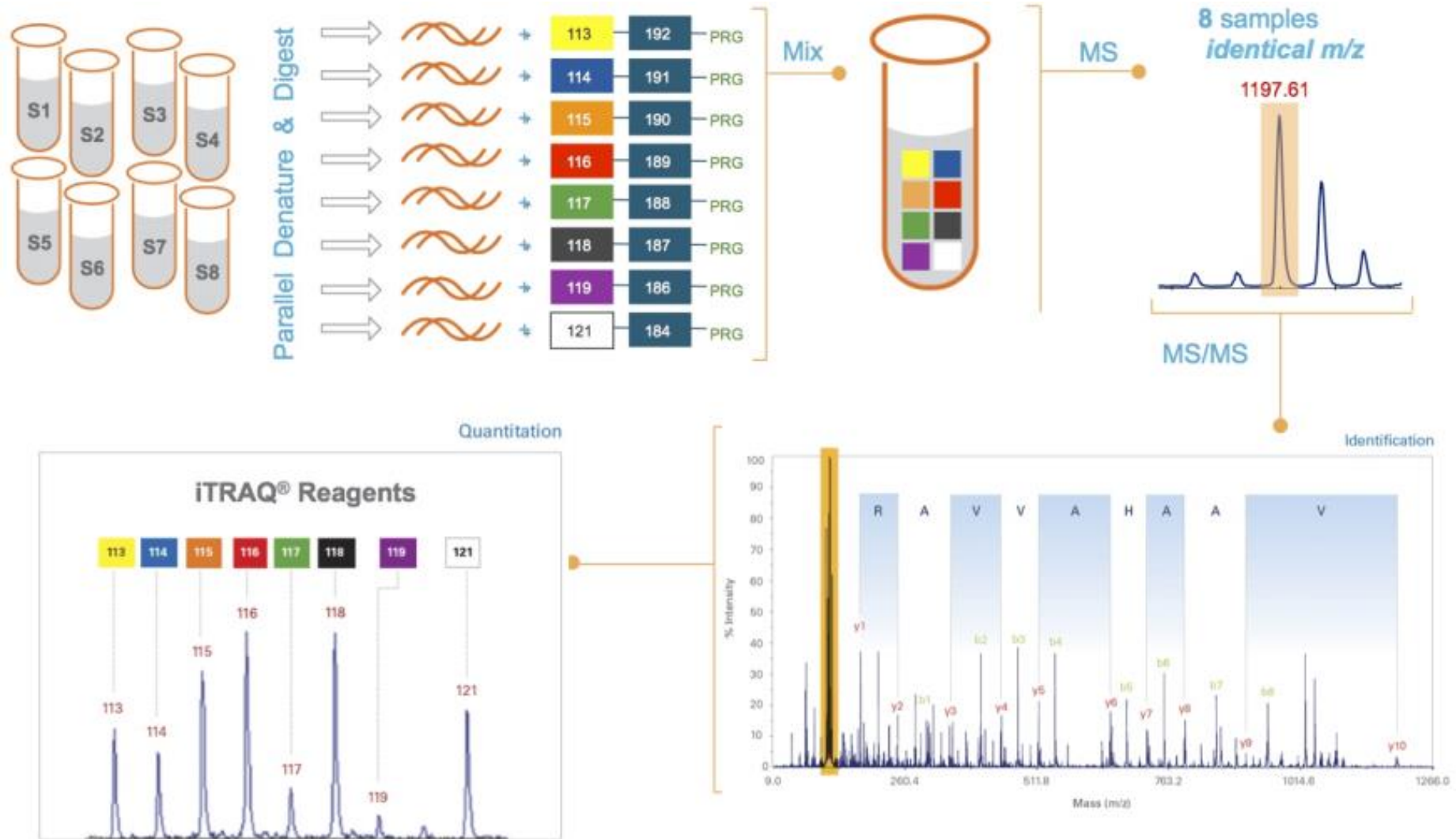
8plex: 113/114/115/116/117/118/119/121



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

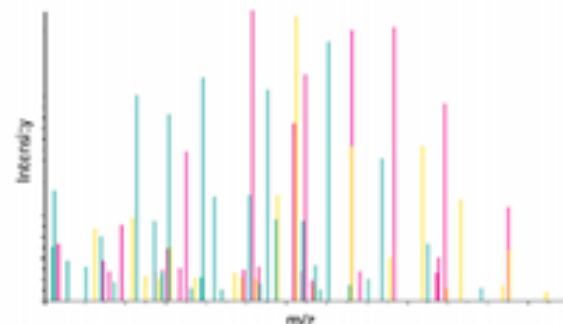
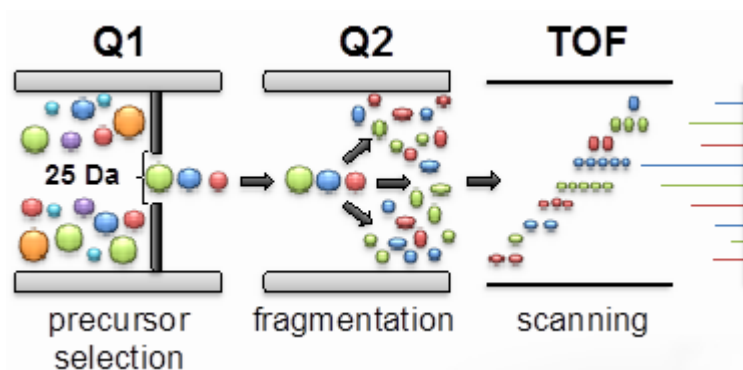
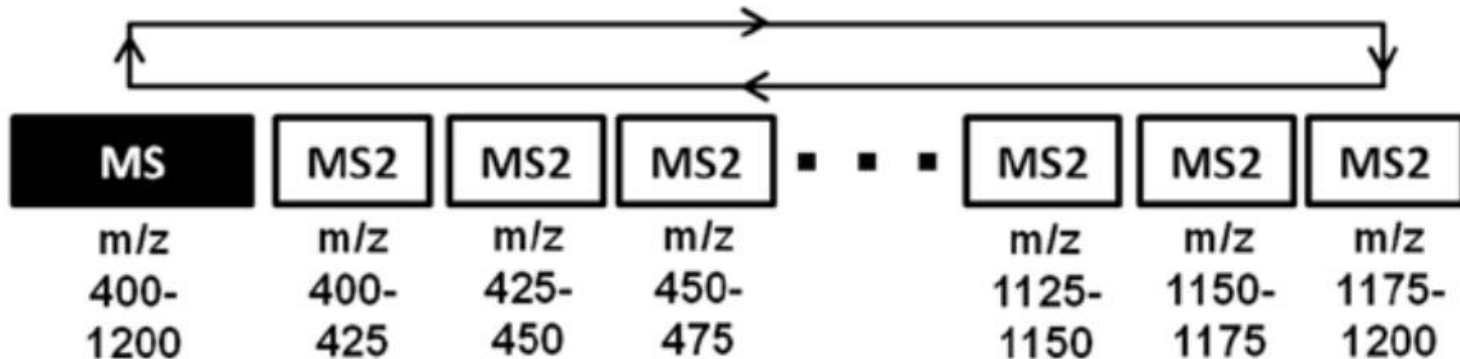
- 定量结果：5275个蛋白，202发生变化

# 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

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

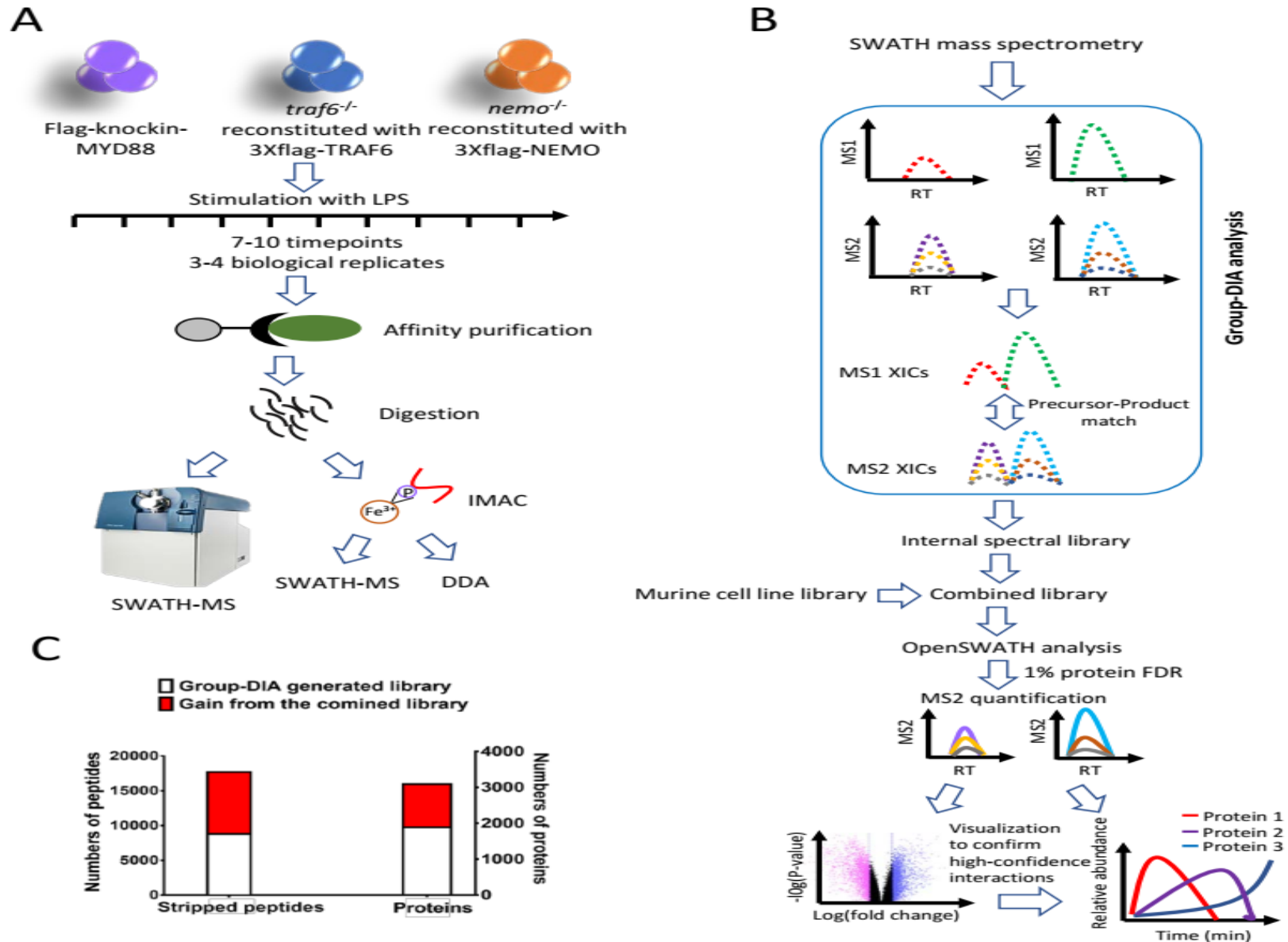


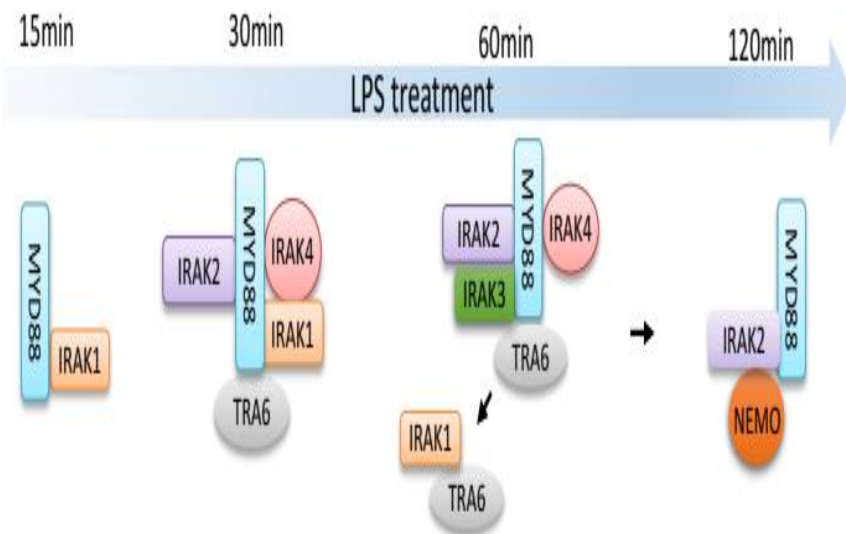
# SWATH/DIA 数据分析

---

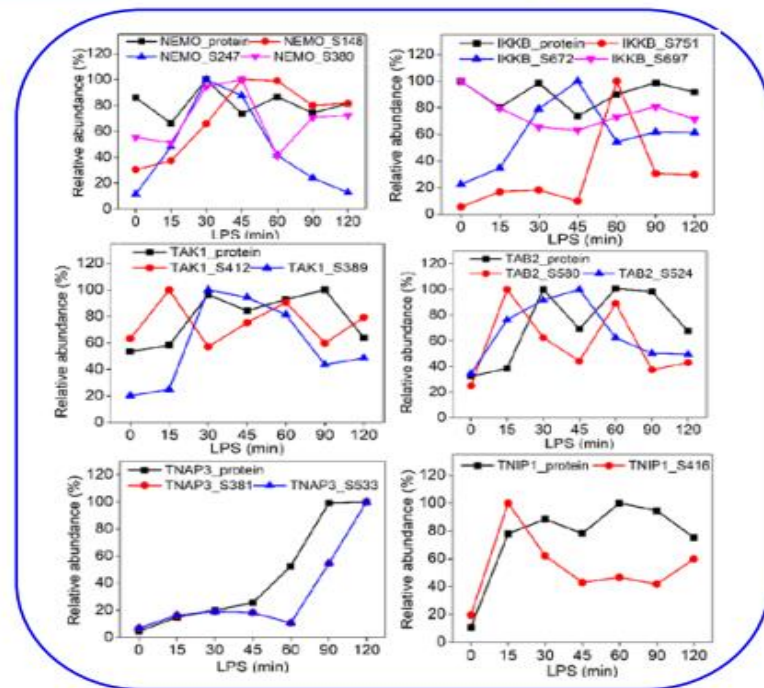
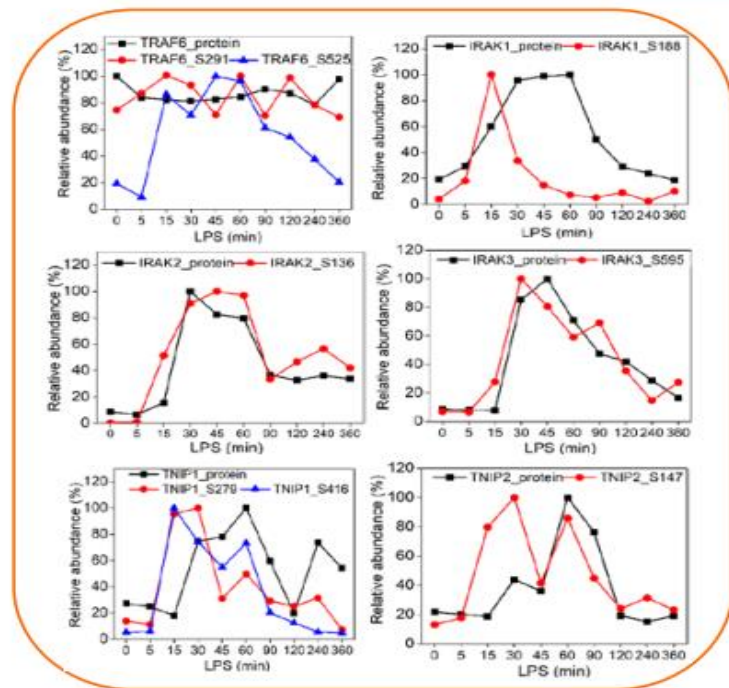
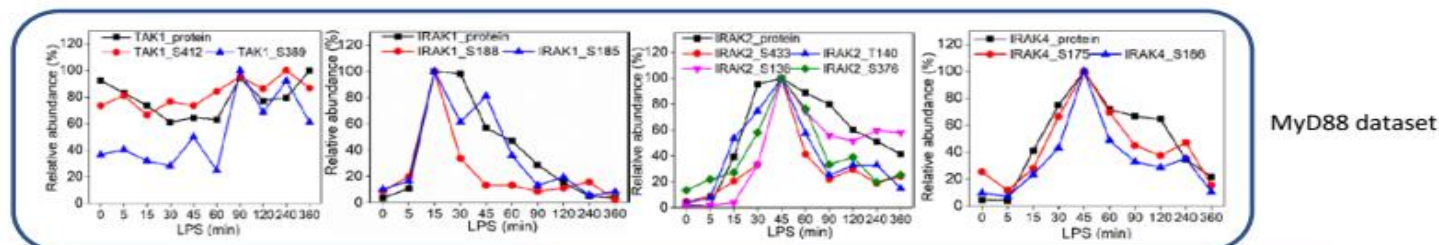
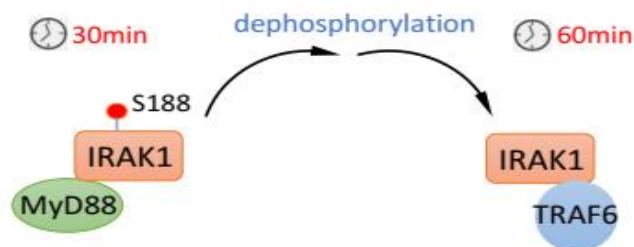
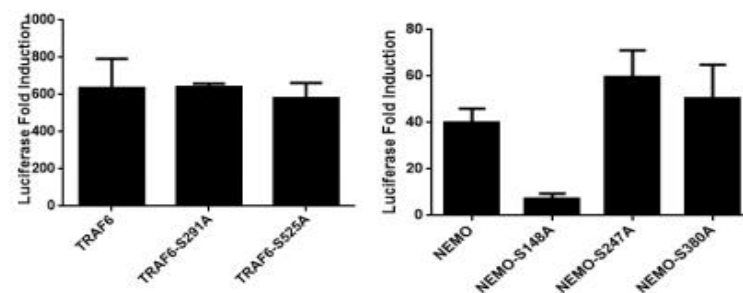
- Targeted extraction of quantitative information from the acquired DIA data with the use of libraries containing retention time and fragmentation information for the desired peptide species. [Skyline/Spectronaut]
- DIA data → pseudo–tandem MS spectra → (untargeted) database search → Quantification by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

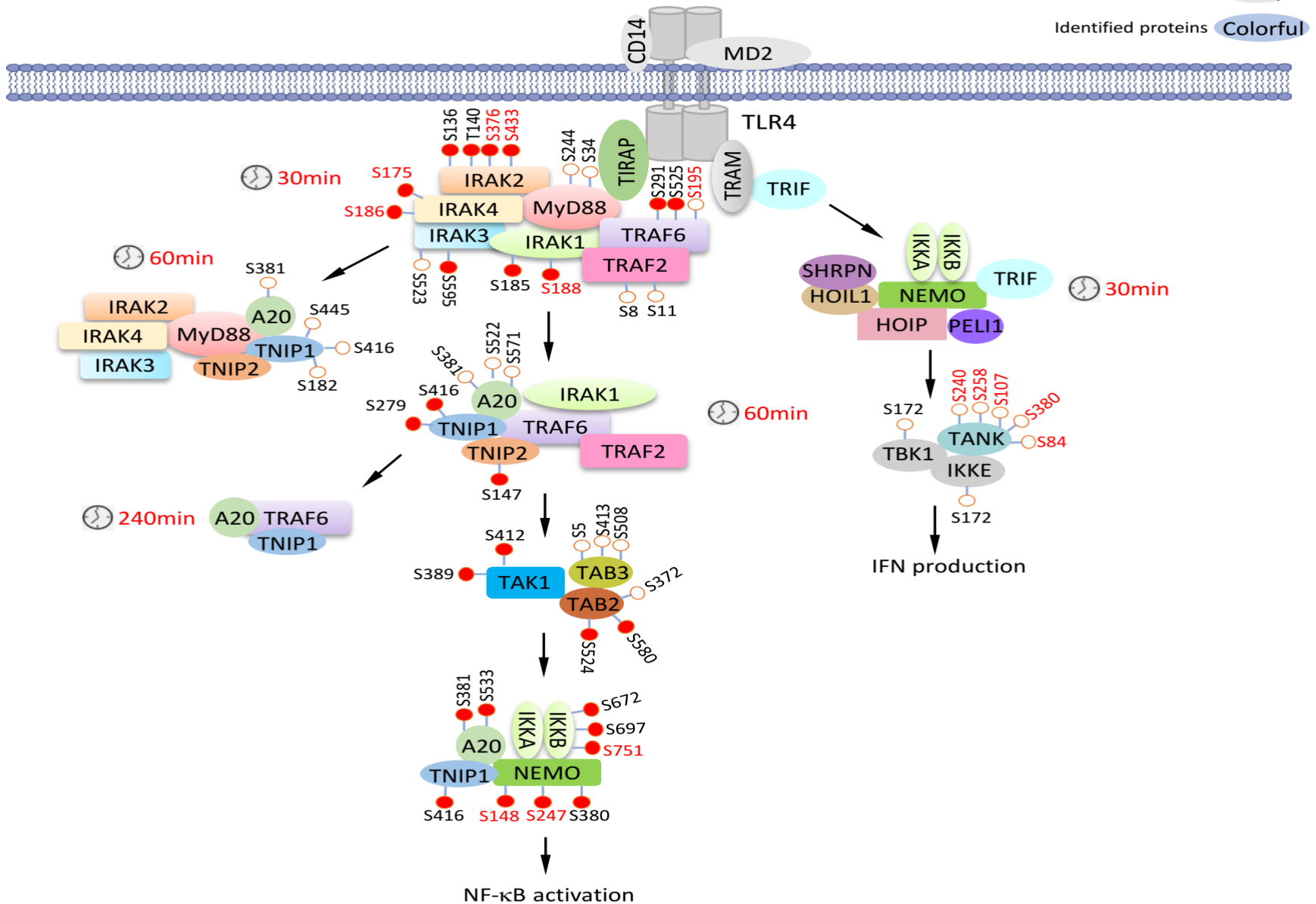






**A****B****C**

Unreported phosphosites in red.  
 Reported phosphosites in black.  
 Quantified phosphosites ●  
 Identified phosphosites ○  
 Not identified proteins Grey  
 Identified proteins Colorful





# 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

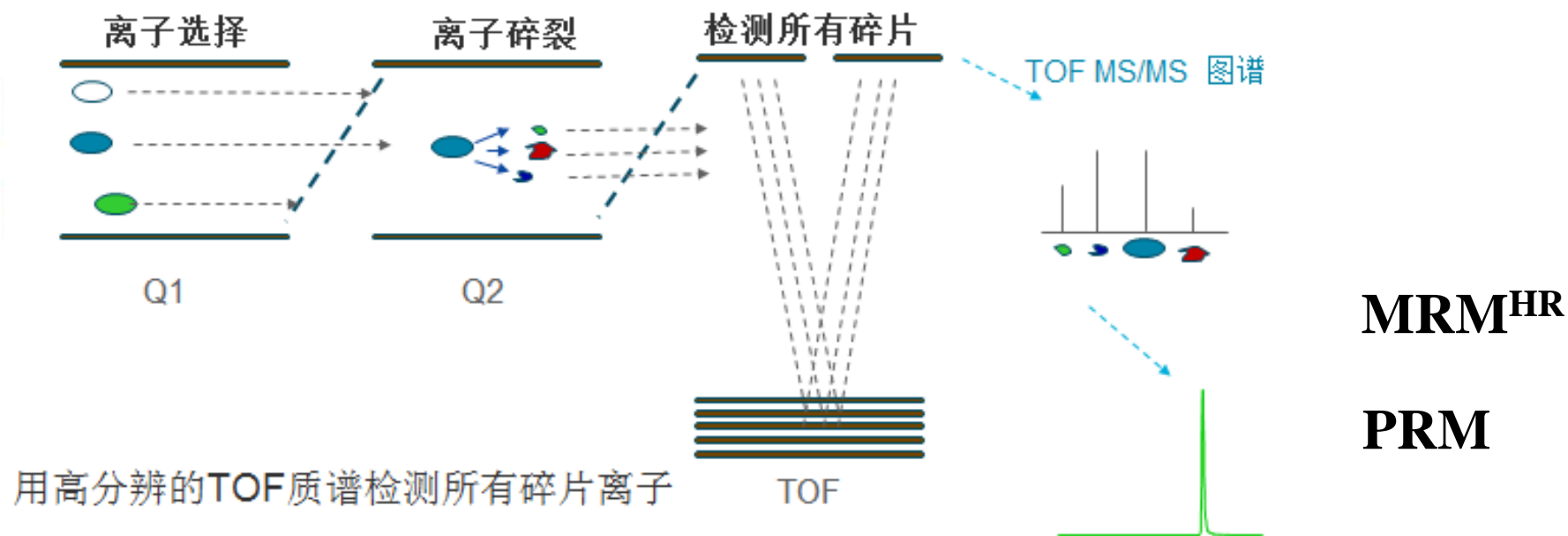
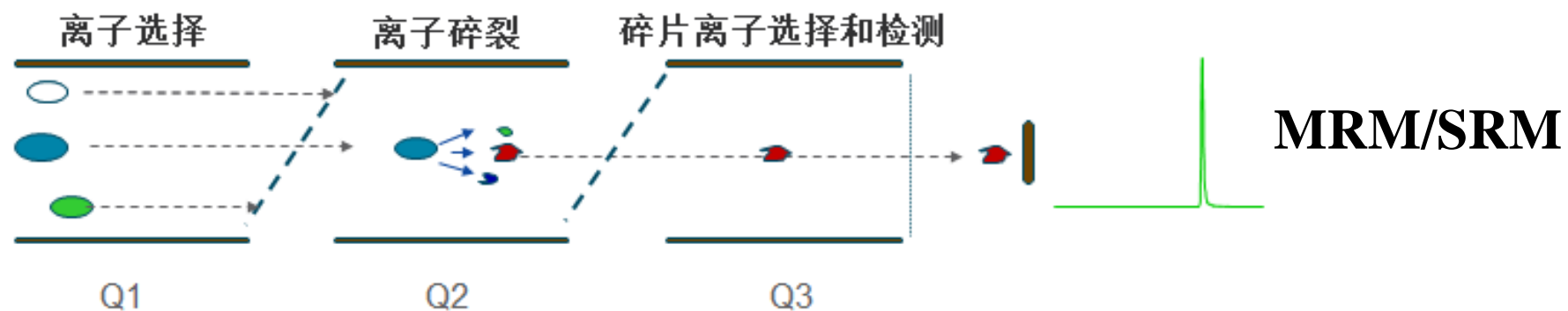
hypothesis-driven investigation

假说 → 质谱数据 → 验证



MS strategy: Targeted VS. Large-scale

# 靶向扫描 MRM & PRM

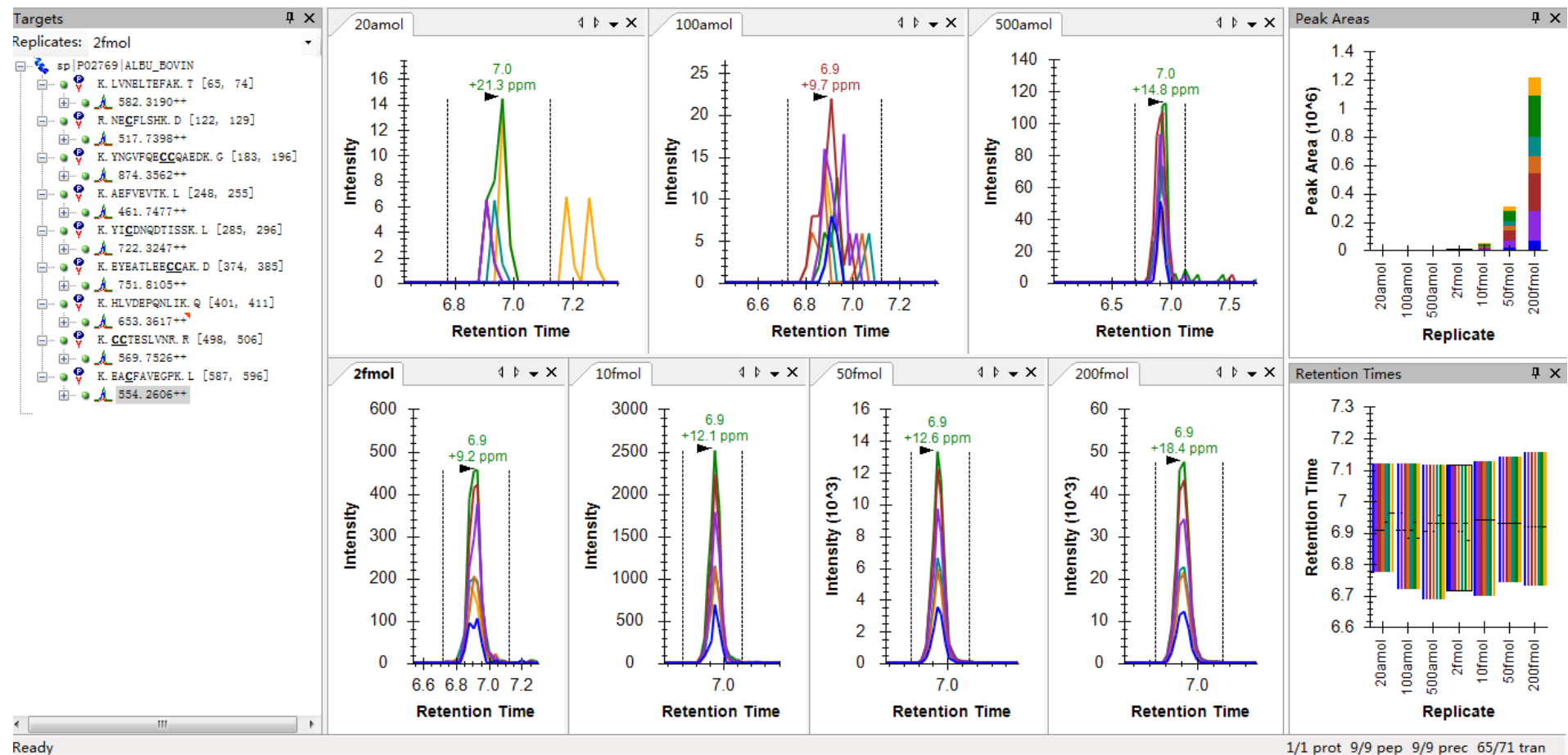


# **Western Blots *versus* Selected Reaction Monitoring Assays: Time to Turn the Tables?**

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

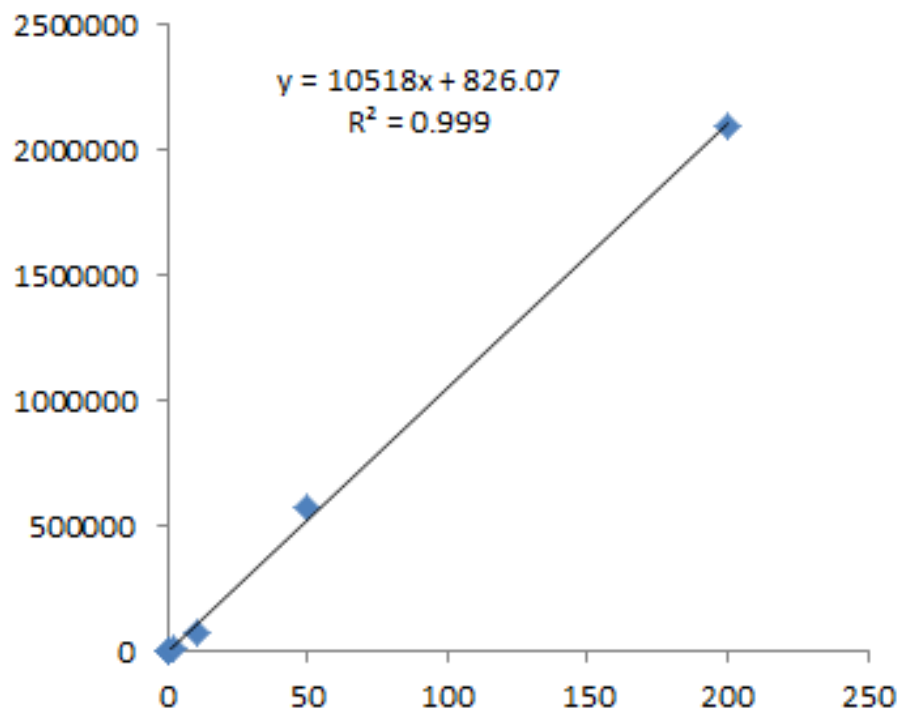
- Authors who submit papers containing quantitative protein data generated via MS are frequently asked by reviewers to validate some of the values with Western blotting.
- Unfortunately, the quality of quantitative data obtained via Western blotting is not comparable to that obtained with SRM.
- We posit 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:  $1 \text{ mol} = 10^3 \text{ mmol} = 10^6 \text{ }\mu\text{mol} = 10^9 \text{ nmol} = 10^{12} \text{ pmol} = 10^{15} \text{ fmol} = 10^{18} \text{ amol}$

# 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<sup>HR</sup>)



机关枪扫射



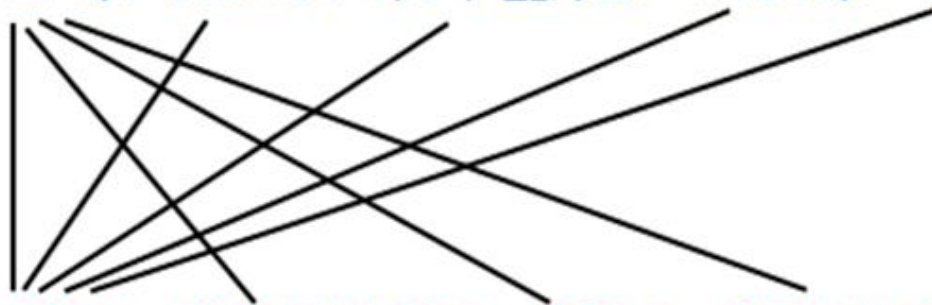
地毯式轰炸



精准狙击

# 总结：蛋白质组学解决方案

Sample: LFQ、SILAC、双甲基化、iTRAQ、TMT

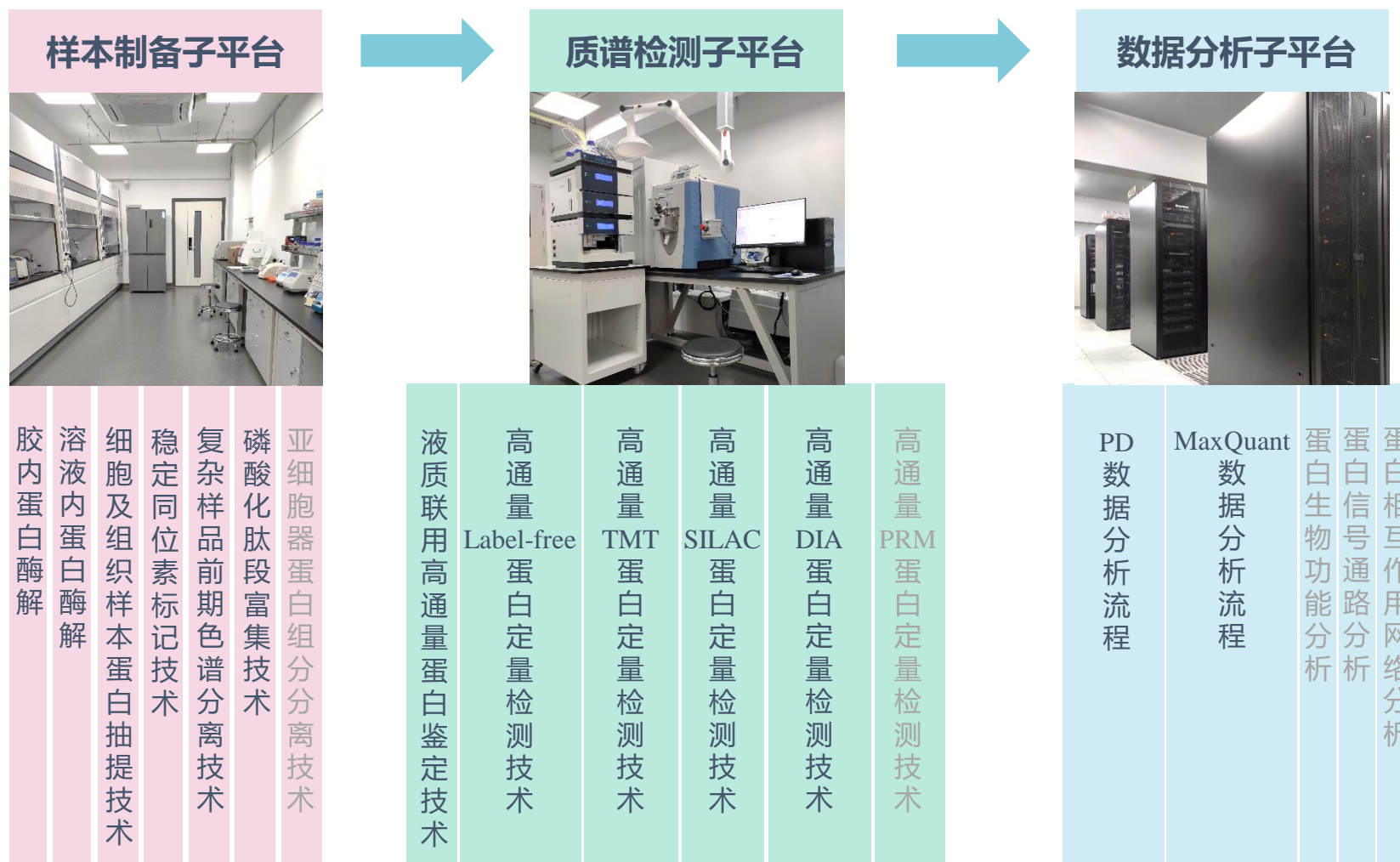


Mass spec: DDA、SWATH/DIA、SRM、PRM/MRM<sup>HR</sup>

- 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）



- 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。



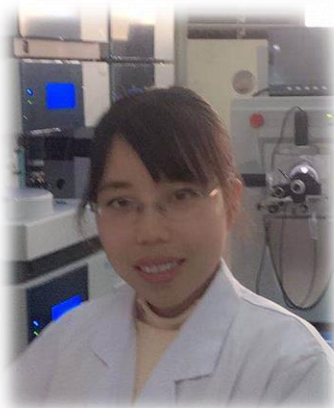
**Thermo公司的LTQ Orbitrap Elite**

- 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<sub>2</sub>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。

謝謝