

上海易算生物科技有限公司

靶向靶向蛋白质组介绍

marketing@omicsolution.com

OMICSOLUTION

目录

1. 靶向蛋白质组学介绍.....	2
2. 靶向蛋白质组学技术流程.....	2
3. IRT.....	3
4. PRM.....	3
4.1 PRM 实验流程.....	3
4.2 PRM 实验应用.....	4
4.3 PRM 实验报价.....	4

1. 靶向蛋白质组学介绍

基于高效液相色谱的鸟枪法蛋白质组学(LC-MS/MS)具有强大的蛋白定性能力,但是在蛋白定量上,其灵敏度仍待提高。而近来兴起的靶向蛋白质组学技术,在蛋白定量上灵敏度更佳,重现性更好。如果鸟枪法蛋白质组学是对样品进行大规模的盲筛,那么靶向蛋白质组学就是有针对性的对一组已知的感兴趣蛋白,进行高质量的靶向定量。

我们的靶向蛋白质组学流程预先设计了一套可以在海量样品中对 150 个已知蛋白质进行绝对定量的方案。HRM 技术(Hyper Reaction Monitoring, 超反应监控)需要对所有肽段和碎片离子进行采集,靶向蛋白质组只对需要进行检测和关注的多肽进行质谱采集并分析定量,这样可以对成百上千个样品实现更高灵敏度和精确度的定量。在将稳定同位素标准品添加到样品后,靶向蛋白质组允许对感兴趣的蛋白质进行绝对定量。

靶向蛋白质组学目前主要有两类技术:多反应监测和平行反应监测(MRM 和 PRM)。MRM 是一项经典的靶向蛋白质组检测技术,主要依赖三重四级杆质谱。而更加新的 PRM 技术则依赖于新一代高分辨 Orbitrap 质谱仪。

SRM(选择反应监测,也称为 MRM)是靶向蛋白质组学的金标准,而它的衍生技术,PRM(平行反应监测)则在最近刚刚兴起。PRM 技术依赖于高质量精度/高分辨率的质谱仪,因此其靶向定量的结果与 SRM 相比而言,选择性更高,灵敏度更佳,重现性更好,在复杂背景中的抗干扰能力更强。在实际操作方面,PRM 比 SRM 更简单,成本更低,主要表现在:1)不需要预先设计靶向蛋白的母离子/子离子配对信息,节约实验设计和操作时间;2)可根据需要选择是否加入合成的标准肽段,可在很大程度上节约实验成本。在应用方面,PRM 可替代传统的 Western blot 技术,一方面,使蛋白验证不再受制于商业化抗体,可以应用于多种非模式生物,另一方面,是抗体验证能够高通量的在大规模生物样本上进行,提高实验效率。

2. 靶向蛋白质组学技术流程

靶向蛋白质组学技术流程分为三个步骤:

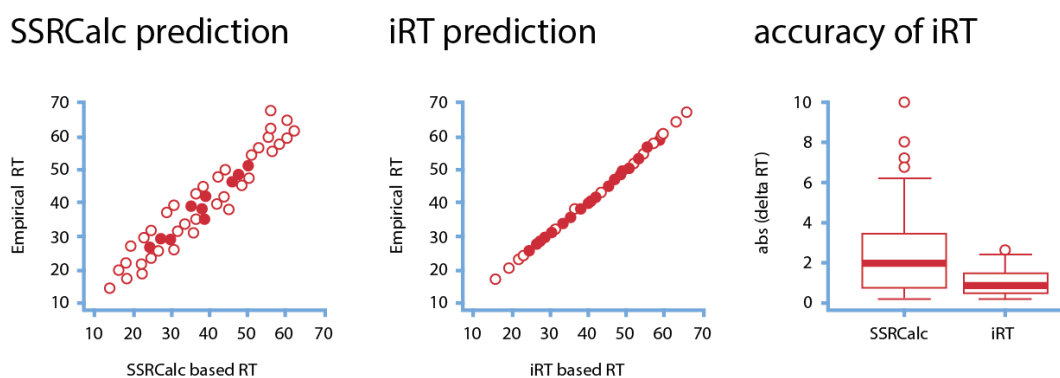
- **方法开发建立:** 靶向蛋白质组学分析的第一步就是针对目标样品开发合适的分析流程并用 HRM 方式构建相应的谱图数据库。针对感兴趣的蛋白质,需要建立并优化一系列检测方式(也称为 transition 或 exclusion lists)。预先分析需要获得肽段谱峰的特征信息,如碎片离子强度和保留时间(iRT),这些结果是正式实验数据采集的参考。
- **采集数据:** 采集数据会用到三重四级杆质谱(MRM)或高分辨 Orbitrap 质谱(PRM)。这两种方法都需要用前置的四级杆挑选来自于预实验的目标离子,紧接着将离子引入碰撞室。MRM 方法仅在第三个四级杆中检测预先选择好的离子,而 PRM 则会用其高分辨检测器检测所有碎片离子,从而在单次分析中定量到更多的蛋白质。
- **数据分析:** 大规模样品的数据分析一直是 MRM 和 PRM 的短板,需要研究者输入大量的参数进行优化分析。Biognosys 开发的 SpectroDive 克服了这些挑战,其拥有目前最智能化的谱峰提取算法,并能够实现大规模样品的自动化分析。

Biognosys 的靶向蛋白质组学分析平台是目前大规模样品、大量蛋白验证研究中最新最先进的分析工具。

3. iRT

Biognosys 引入的 indexed retention time (iRT)概念在定量研究中获得了优异的结果。通过 iRT 能够高精度的预测任何色谱系统中肽段的保留时间。和肽段的分子量相似，其色谱保留时间理论上也应该有一个稳定的特征属性。但是，实际的肽段保留时间(RT) 随着色谱系统的不同差别很大。iRT 实现了在任何液相色谱系统中将肽段保留时间特征转换成精确可预测的时间信息。从而在 MRM, PRM 和 HRM 分析中，实现更多蛋白的同时定量（可同时定量近 150 种蛋白），并改善谱峰提取和打分效果。

针对 HRM 流程的 DIA 或 SWATH 分析, Biognosys 最近新开发了一种用于高精度预测肽段保留时间的方法 称作 high-precision iRT。该方法从原来的 11 个 iRT 肽段扩展为来自实际样品的上千个肽段信息，并储存于 Spectronaut 这款专业分析 DIA/SWATH 数据的软件中。high-precision iRT 相对于最初的 iRT 方法大约能增加 15%的定量信息，而相对于传统的无保留时间预测的谱图数据库匹配方式则提高了 25%。(Bruderer et al. 2016)



4. PRM

4.1 PRM 实验流程

1. 获得已知的感兴趣蛋白序列信息，挑选合适的靶向肽段（推荐 3 个以上不同肽段）。肽段信息推荐从 shotgun 实验中获得，也可以从理论序列中挑选肽段，但需要额外预实验验证。如有 shotgun 鉴定信息，靶向肽段尽量选择得分及强度较高的。
2. 制备样品的肽段混合物，可根据靶向蛋白的丰度情况，事先对样品进行富集（具体过程与鸟枪法实验一致），但靶向监测的样品不推荐进行 fraction。
3. 根据挑选的靶向肽段信息，进行预实验，调整流出时间，或者重新挑选靶向肽段。
4. 对正式样品进行 PRM 监测。

5. 数据分析。

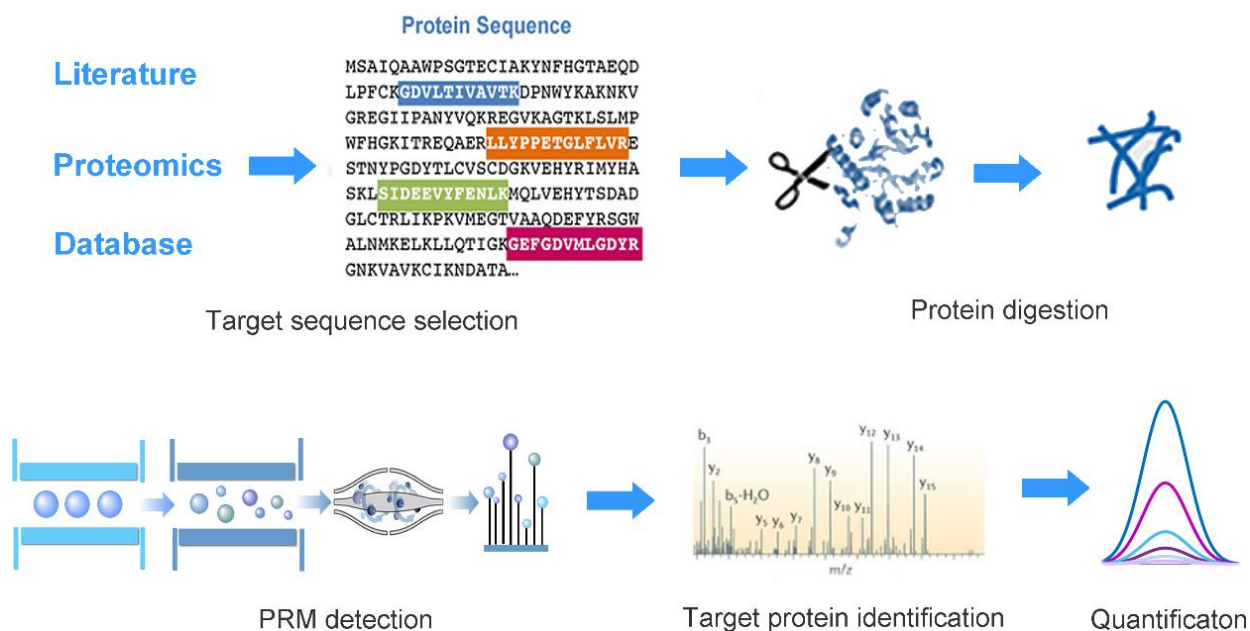


Figure 1 PRM 实验流程

4.2 PRM 实验应用

复杂样品定量约 2 小时梯度，可最多同时鉴定 100 多种蛋白，一般推荐验证 50 种蛋白以内。

4.3 PRM 实验报价

PRM 实验报价由方法建立、正式样品检测、数据分析等部分组成，我们的技术及销售团队会根据您的需求和样品给出详细报价。

参考文献：

- Gallien S, Bourmaud A, Kim SY, et al. Technical considerations for large-scale parallel reaction monitoring analysis. *J Proteomics*. 2014; 100: 147-59.
- Gallien S, Kim SY, Domon B. Large-Scale Targeted Proteomics Using Internal Standard Triggered-Parallel Reaction Monitoring. *Mol Cell Proteomics*.
- Tsuchiya H, Tanaka K, Saeki Y. The parallel reaction monitoring method contributes to a highly sensitive polyubiquitin chain quantification. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 436: 223-9.
- Ronsein GE, Pamir N, von Haller PD, et al. Parallel reaction monitoring (PRM) and selected reaction monitoring (SRM) exhibit comparable linearity, dynamic range and precision for targeted quantitative HDL proteomics. *J Proteomics*. 2015; 113: 388-99.
- Peterson AC, Russell JD, Bailey DJ, et al. Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2012; 11: 1475-88.

技术服务

- 差异定量蛋白质组服务
ITRAQ/TMT
DDA/DIA LFQ
- 靶向定量蛋白质组
基于 MRM/PRM 技术的
相对/绝对定量
- 其他蛋白质组实验
多肽组学定量、De Novo
翻译后修饰组学
未知蛋白表征
蛋白相互作用
- 数据分析
蛋白质组数据质控及挖掘
IPA 生物信息学分析

OmicSolution 成员来自于复旦大学、上海交大、中科院、二军大的蛋白质组、代谢组专业实验室，配备本领域广受好评及最新型号质谱、最权威且版本最新的分析软件，为您提供蛋白质组学、代谢组学的实验、软件销售、数据分析和应用培训等服务。

更多蛋白质组学技术信息请参阅：

www.omicsolution.com

若有任何疑问，欢迎来电或邮件咨询：

Phone: 18516591405

Email: support@omicsolution.com

marketing@omicsolution.com