

# Proteonano™ 平台在不同质谱仪血浆蛋白组的表现

珞米生命科技  
2024年8月

## 关键词：

Proteonano™ 超多重蛋白组分析系统、血浆蛋白组、不同质谱仪、流程标准化

## 目标：

以低丰度血浆蛋白组学为例，评估Proteonano™蛋白组学前处理分析系统，在不同厂家的高分辨质谱仪上性能表现，从而为高通量血浆蛋白组学制定标准。

## 简介

长久以来，基于质谱的高通量超多重血浆蛋白组学存在蛋白定量稳定性有限的问题，导致血浆大队列实验无法开展，对蛋白标志物发现和转化造成瓶颈，从而延缓了蛋白组学在临床和药物开发的应用。尽管近年来高分辨质谱仪本身的性能得到了极大的提升，尤其是赛默飞推出的最新款的 Orbitrap Astral 型号和布鲁克推出的 Tims TOF 型号，但仍然存在整个蛋白组流程缺乏标准化、前处理流程不统一、数据分析不一致等问题，导致不同质谱仪数据之间无法联通，造成实验数据无法复现、数据孤岛等问题。

本文中我们使用 Proteonano™ 高通量蛋白组学标准化分析系统，使用健康人混合血浆样本，评估其不同厂家的高分辨质谱仪上性能表现，为高通量血浆蛋白组学在不同质谱仪上建立标准分析流程，为多重蛋白标志物发现和转化提供可行性方案。

## 实验

### 蛋白富集试剂和自动化前处理系统

- Proteonano™ 高深度低丰度血浆蛋白组试剂盒（珞米生命科技，杭州，中国）
- Proteonano™ Pro Suite 高通量蛋白组前处理系统（珞米生命科技，杭州，中国）
- Trypsin (V5111, Promega Corporation, Madison, WI, USA)

### 质谱仪 & 液相

- Vanquish Neo coupled with Orbitrap Astral (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- EASY-nLC™ 1200 coupled with Orbitrap Exploris 480 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- nanoElute® 2 coupled with timsTOF Pro 2 (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA)

### 数据分析软件

- DIA-NN (version 1.8.1)
- Uniprot Reviewed (Swiss-Prot) (20,422 Entries)

### Proteonano™ 高通量蛋白前处理系统

使用珞米生命科技的 Proteonano™ 高通量蛋白组学分析系统进行血浆样本的自动化制备，样本为健康人的血浆样本。Proteonano™ Kit 是专门解决样本低丰度蛋白质组在质谱蛋白检测中的瓶颈的发现平台，由 Proteonano™ Kit 试剂盒和 Nanomation™ G1 设备组成。Proteonano™ Kit 系列试剂盒是珞米生命科技开发的使用多价态多亲和超顺磁性纳米探针针对样本中的低丰度蛋白进行富集 [5]。

## Proteonano™ 平台在不同质谱仪上的技术表现

### 1. 蛋白鉴定数和动态范围

使用 Proteonano™ Kit 试剂盒及 Pro Suite 高通量蛋白组学分析系统， 仅需 ng 级别蛋白上样量， 就可实现蛋白的深度覆盖。在 Orbitrap Exploris 480、timsTOF Pro 2 和 Orbitrap Astral 平台上分别以 200 ng、300 ng、500 ng 进样量进行质谱上样分析， 不同质谱平台采用不同液相梯度， 使用 Swissprot 数据和 DIA-NN 进行数据解析（见图一、表一）。

结果显示， Orbitrap Exploris 480 平台针对血浆样本蛋白鉴定数量结果为 2320 种蛋白； tims TOF Pro 2 平台针对血浆样本蛋白鉴定数量结果为 2914 种蛋白； Orbitrap Astral 平台使用 13 min 梯度针对血浆样本蛋白鉴定数量结果为 3755 种蛋白； Orbitrap Astral 平台使用 8 min 梯度蛋白鉴定数量结果为 2986 种蛋白（见图二）。

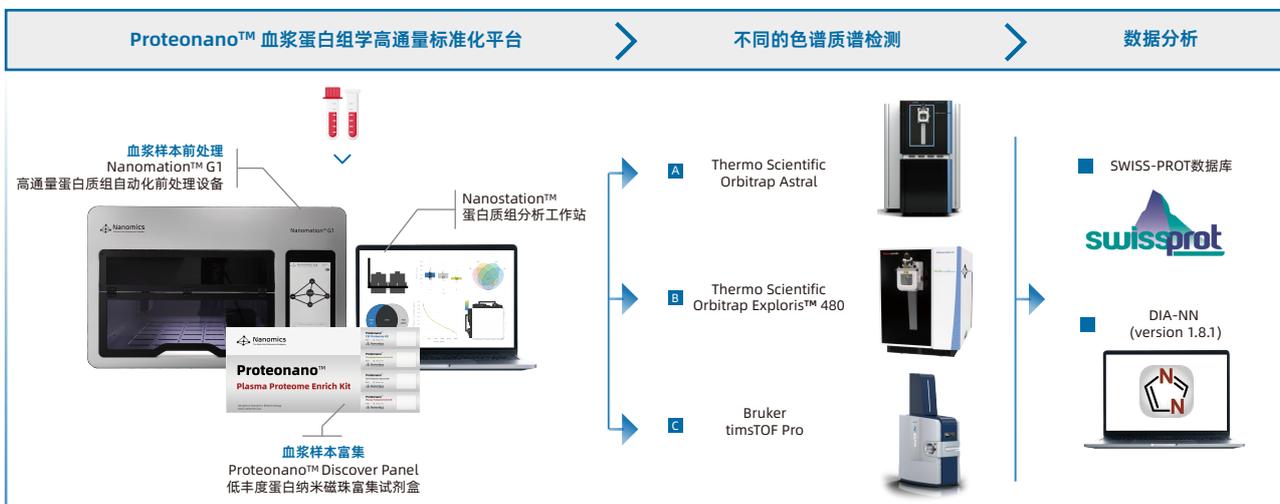


图1. Proteonano™ 高通量前处理系统在三款质谱仪的全流程

质谱平台	试剂盒	样品信息	进样量 (ng)	梯度 (min)
Orbitrap Exploris 480	Proteonano™ Plasma Kit	人混合血浆	500	48
TimsTOF Pro 2			200	60
Orbitrap Astral			300	13
			300	8

表1. 实验中所用前处理试剂盒和测试样本信息

高分辨质谱平台	蛋白鉴定数	蛋白鉴定数 CV值中位数	蛋白定量 CV值中位数	动态范围	覆盖HPPP比例	备注
Exploris 480 24SPD	2320 ± 19	0.80%	12.00%	8.47 logs	40.20%	3个前处理平行样本
Orbitrap Astral 180SPD	2986 ± 21	0.70%	8.80%	8.52 logs	51.10%	同一样本连续3针
Tims TOF Pro 2 24SPD	2914 ± 38	1.30%	12.70%	8.73 logs	47.20%	3个前处理平行样本
Orbitrap Astral 100SPD	3755 ± 7	0.20%	8.10%	8.73 logs	55.80%	同一样本连续3针

表2. 实验中所用前处理试剂盒和测试样本信息

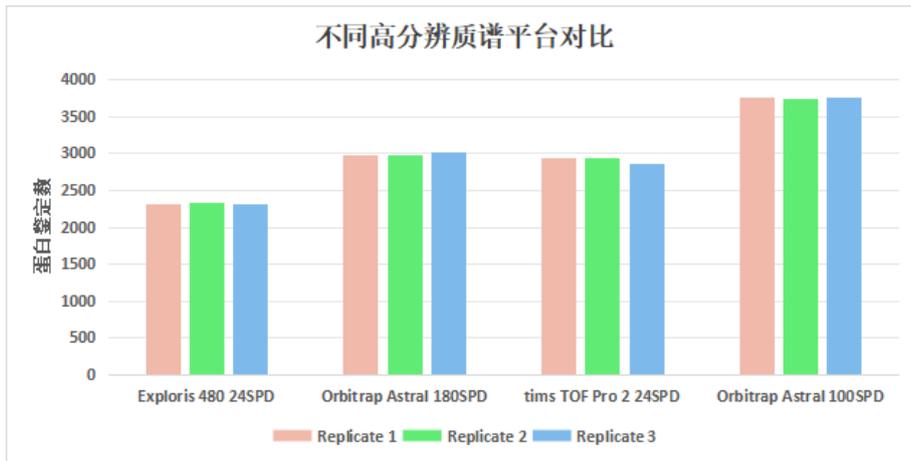


图2. 不同质谱平台蛋白鉴定数量

timsTOF Pro 2 虽然梯度时间较长，但相对于 Orbitrap Exploris 480 具有更高的蛋白鉴定能力，同时，进样量更低有利于降低实验成本。Orbitrap Astral 梯度时间短，蛋白鉴定能力强，相对于 Orbitrap Exploris 480 和 timsTOF Pro 2，在蛋白鉴定能力上与 Proteonano™ Kit 试剂盒及 Pro Suite 高通量蛋白组学分析系统更适配。

各个质谱平台鉴定结果的 CV 值在 0.25%~1.47%，CV 值分析均表现出数据结果具有高稳定性。由此可见，即使在上样量低的条件下，不同质谱平台也能够达到超高的蛋白鉴定水平，同时能够保证数据的准确性，进一步凸显了 Proteonano™ Kit 试剂盒及 Pro Suite 高通量蛋白组学分析系统高灵敏度的优势。

同时，Proteonano™ 在三个不同的平台上，检测到的蛋白丰度范围均超过了 8 个数量级（见图三），相比传统方法只有 3-5 个数量级，鉴定深度提升了接近 10000 倍。

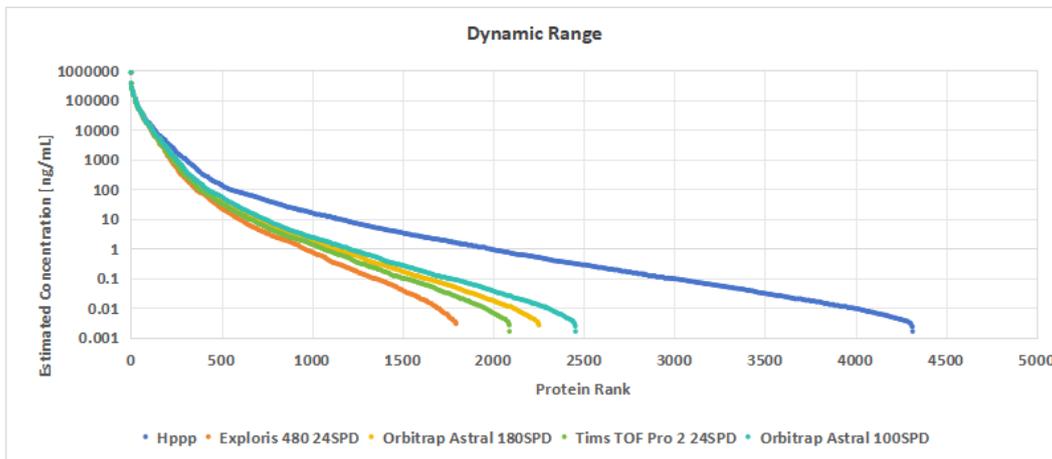


图3. 不同质谱平台蛋白鉴定深度（动态范围）

## 2. 定量稳定性：蛋白强度定量 CV 值中位数 <15%

我们进一步探讨了 Proteonano™ Platform 在不同高分辨质谱仪上蛋白检测定量的稳定性。从图四可以看到，在 Orbitrap Astral、Orbitrap 480、timsTOF Pro2 上面，CV 值中位数从 8.1% 到 12.7%。

同时我们也看到，在 Orbitrap Astral 180SPD 和 100SPD 下，其 CV 值中位数位于 10% 以下，也进一步证实了这款由 Thermo Fisher 在 2023 年发布的最新款高分辨质谱仪在数据采集稳定性方面的提升。

### 3. 覆盖 HPPP (人类血浆蛋白组数据库) 比例

我们把不同质谱平台 (Orbitrap Exploris 480、timsTOF Pro 2 和 Orbitrap Astral) 鉴定到的蛋白与人类血浆蛋白组数据库 (Human Plasma Proteome Project, HPPP) 数据库进行分析。结果显示 (见图五), 基于 Proteonano™ 平台在 Orbitrap Astral、Orbitrap 480、timsTOF Pro2 上可检测到的蛋白质覆盖 HPPP 数据库中大约 50% 的蛋白质, 其中有 1690 种蛋白被三个质谱仪同时检测到。这也体现了不同质谱仪之间存在的差异和互补性。

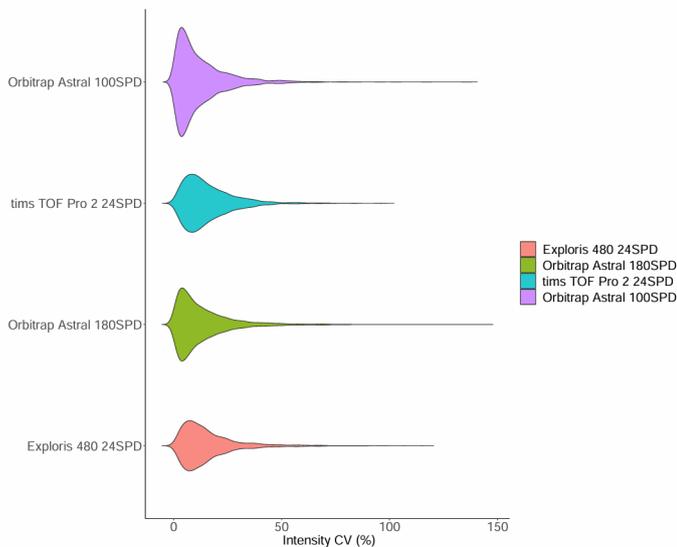


图4. 不同质谱平台蛋白定量CV值中位数

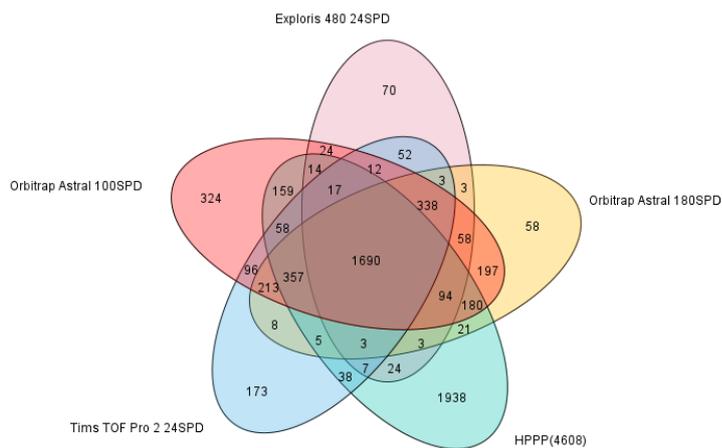


图5. 不同质谱平台蛋白和HPPP重合数量

### 4. 不同质谱平台之间的相关性

我们对质谱平台 (timsTOF Pro 2 和 Orbitrap Astral) 均鉴定到的 2497 个蛋白进行 Pearson 相关系数计算, 以评估两个平台的检测一致性, 其中 Intensity TOP20 的蛋白已经被剔除。

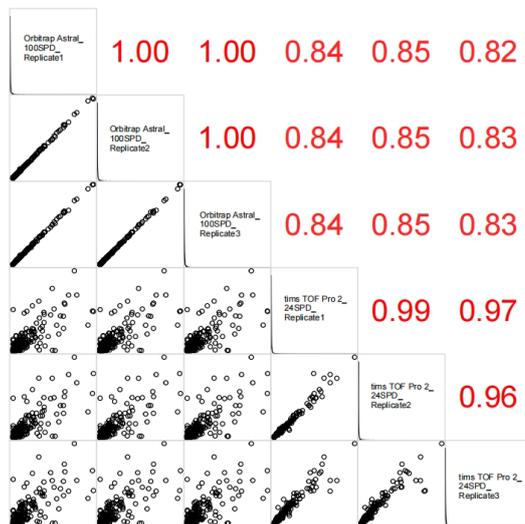


图6. 不同质谱平台均鉴定到的2497个蛋白的Pearson 相关系数

## 小结

本文基于使用珞米生命科技开发的 Proteonano™ 高通量蛋白组学分析系统，评估其在三款不同高分辨质谱平台（Orbitrap Exploris 480、timsTOF Pro 2 和 Orbitrap Astral）上的超多重血浆蛋白组性能。

### 结论为：

（1）Proteonano™平台具有优秀的通用性：在 Orbitrap Exploris 480、TimsTOF Pro 2、Orbitrap Astral 上都实现了超多重深度血浆蛋白组实验，蛋白鉴定数量位于 2000 到 4000 之间，且蛋白数量差异值小于 5%。

（2）Proteonano™平台具有优秀的蛋白定量准确性：在三款高分辨质谱仪上的蛋白鉴定定量 CV 值均小于 15%，能够确保数据的准确性，进一步说明 Proteonano™系统具有高灵敏度、高可重复性的优势。

（3）Proteonano™平台具有高度的标准化：在三款高分辨质谱仪上均采用了自动化、严谨的数据库（Swiss-Prot）和数据分析流程，保证了结果的可靠性和可标准化。

综上所述，Proteonano™高通量超多重蛋白组学分析系统在不同质谱平台用于血浆蛋白组学分析应用中，均展现出了优异的准确性和灵敏度，为高通量血浆蛋白组学在不同质谱仪上建立标准分析流程，为多重蛋白标志物发现和转化提供可行性方案。

## 参考文献

- [1] 丛浦珠, 苏克曼. 分析化学手册 [J]. 第九分册. 质谱分析, 2000, 837.
- [2] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics[J]. Nature, 2003, 422(6928): 198-207.
- [3] Aebersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function[J]. Nature, 2016, 537(7620): 347-355.
- [4] Prudent R, Annis D A, Dandliker P J, et al. Exploring new targets and chemical space with affinity selection-mass spectrometry[J]. Nature Reviews Chemistry, 2021, 5(1): 62-71.
- [5] Zhao B, Gao X, Ouyang X, et al. Proteonano: a novel deep proteomics platform with 1000-plex profiling capacity and picogram sensitivity and its application in diabetic kidney disease[J]. bioRxiv, 2023: 2023.09. 12.556305.

