



博淼生物

BIOMIAO BIOLOGICAL

-SINCE2009-

Your own Laboratory

您的专属实验室

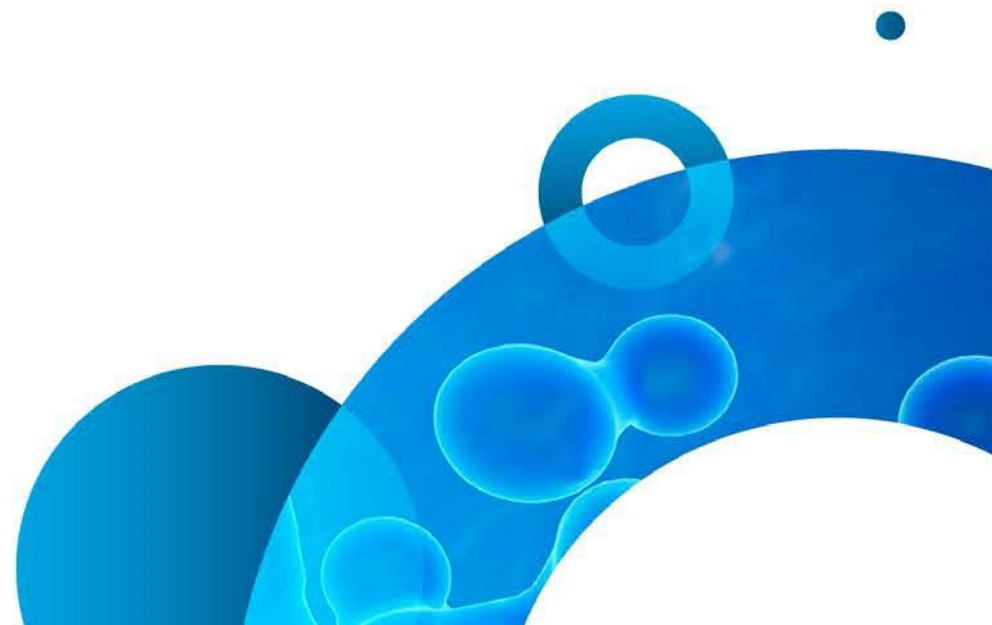
# 博淼质谱技术蛋白组学服务项目介绍

全国统一服务电话：400-6506-908

网址：[www.biomiao.com](http://www.biomiao.com)

邮箱：[marketing@biomiao.com](mailto:marketing@biomiao.com)

地址：北京市丰台区丰管路优橙创新中心3012-3015



# 目录

## CONTENTS

01

质谱技术平台简介

02

蛋白组学技术服务项目



# 质谱平台介绍



Q Exactive™ HF-X



Orbitrap Exploris™  
480 Mass Spectrometer



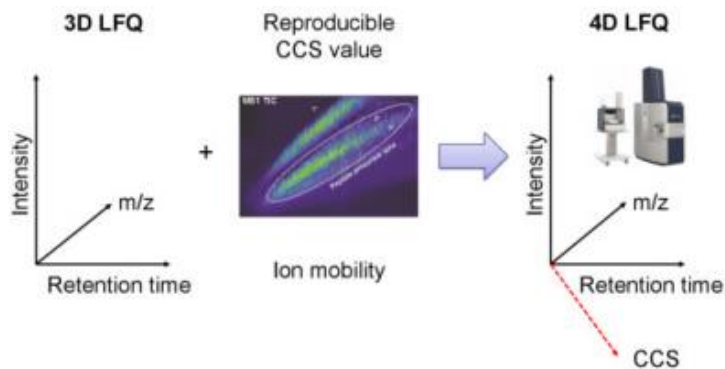
Orbitrap Eclipse™ Tribrid™  
Mass Spectrometer



timsTOF HT

| 仪器系列                                | 机型                | 博淼平台    | 优势   |
|-------------------------------------|-------------------|---------|--|
| QE系列                                | QE\QEplus\HF\HF-X | QE-HFX  | 最佳机型、扫描速度解析性能最强  |
| Exploris                            | 120\240\480       | 480     | 最新机型、性能稳定、选配FAIMS、新增sureqant功能                                     |
| Thermo全能王<br>Orbitrap Eclipse三合一质谱仪 |                   | Eclipse | 完美整合了四极杆、离子阱和Orbitrap质量分析器的多功能性和可用性，具有超高分辨率灵敏度稳定的高质量精度，以及多项可延展性等优点 |

| 仪器名称                  | 分辨率         | 质量范围        | 扫描速度      |
|-----------------------|-------------|-------------|-----------|
| Q Exactive HF-X       | 240000      | 50~6000 m/z | 40HZ      |
| Orbitrap Exploris™480 | 480000      | 40~8000 m/z | 40HZ      |
| Orbitrap Eclipse      | 240000      | 50~8000 m/z | 40HZ      |
| timsTOF HT            | 20000-50000 | 20~40000    | 100-150HZ |

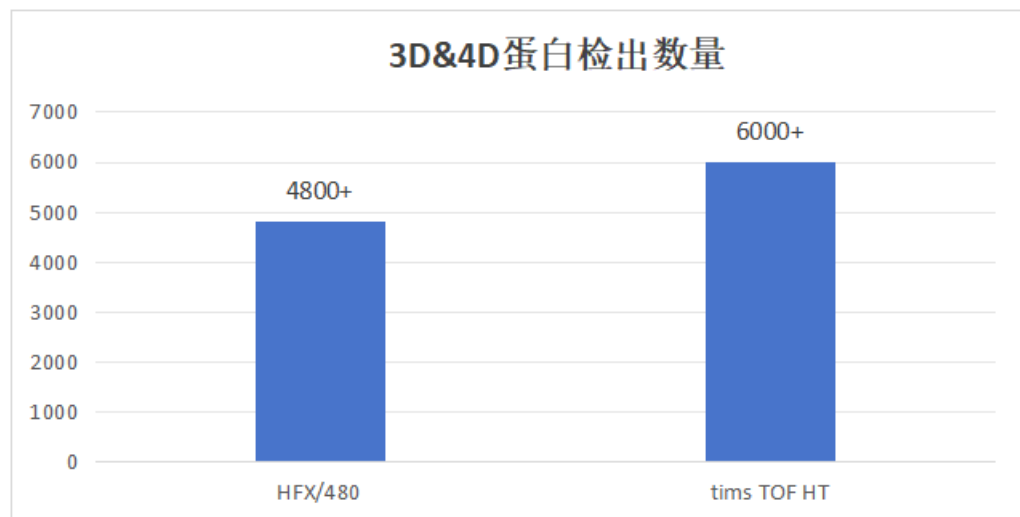


保留时间+质荷比+离子强度  
+离子淌度 (ion mobility)

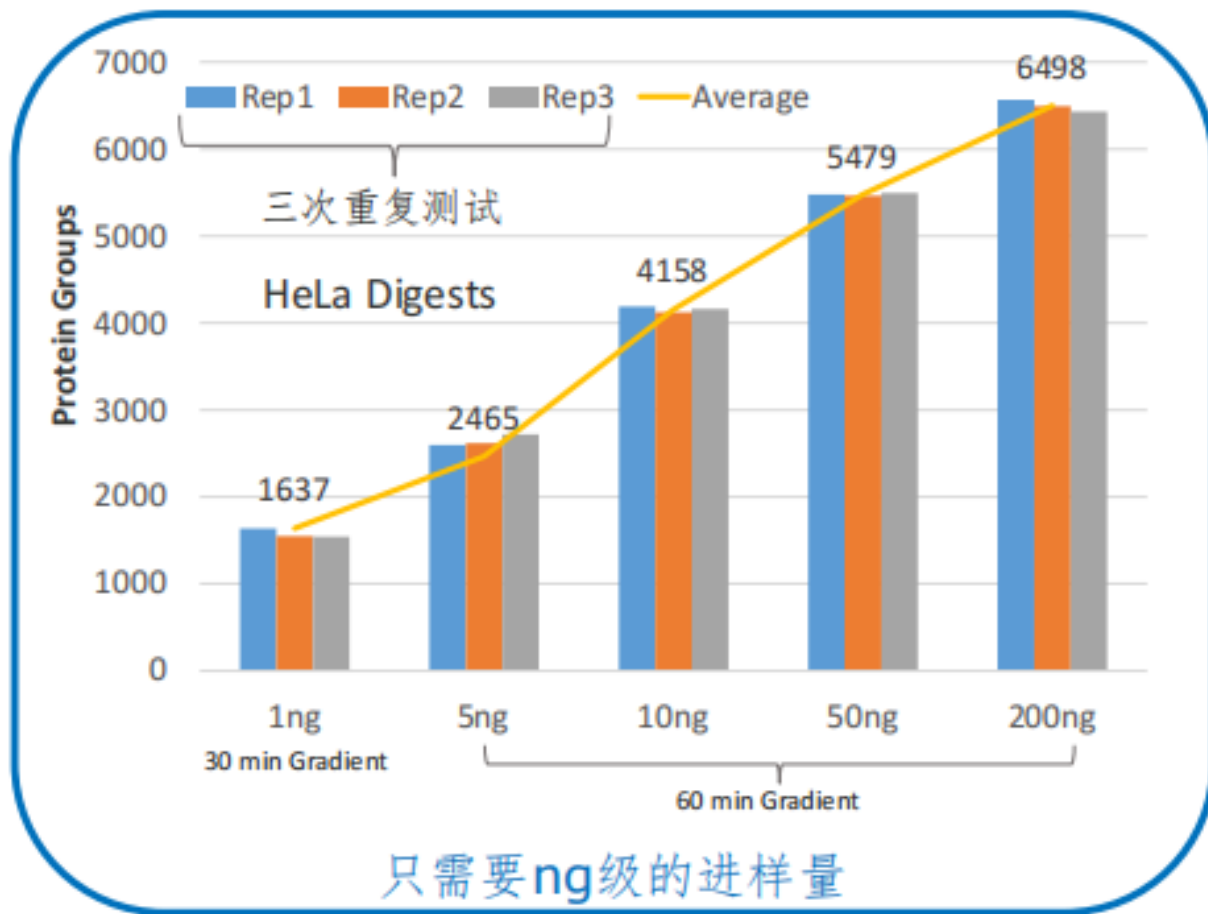


# 3D平台vs4D平台

测试结果：**1ug** 293T细胞肽段，60min梯度，HFX/480上机，采集模式DDA，鉴定数量4800+  
**200ng** 293T细胞肽段，60min梯度，tims TOF HT上机，采集模式DDA，鉴定数量6000+



更低上样量，更高检出数量~



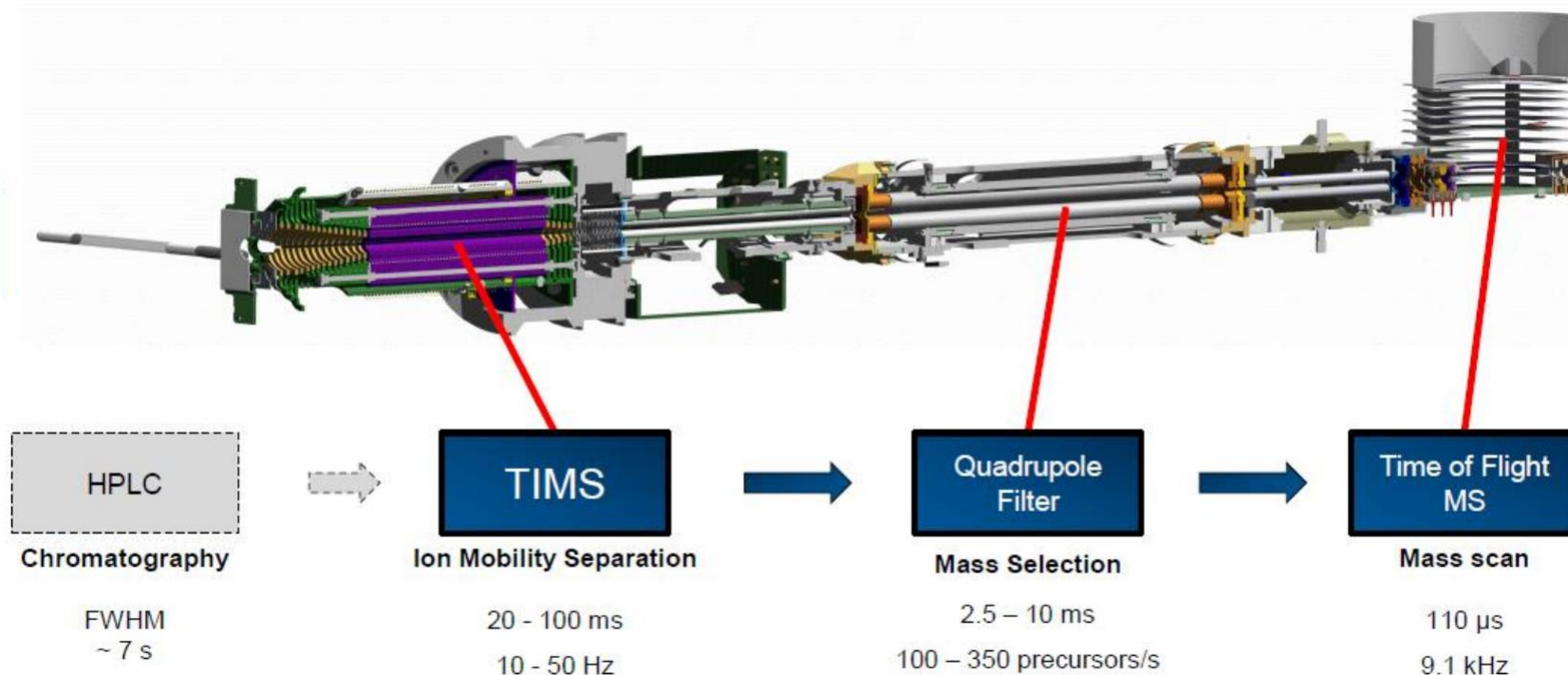
# 布鲁克4D-timsTOF HT

timsTOF系列两大革新技术

捕集离子淌度谱 (TIMS, Trapped Ion Mobility Spectrometry)

平行累积连续碎裂 (PASEF, Parallel Accumulation-Serial Fragmentation)

4D蛋白质组：保留时间 (retention time)、质荷比 (m/z)、离子强度 (intensity)、离子淌度 (mobility)



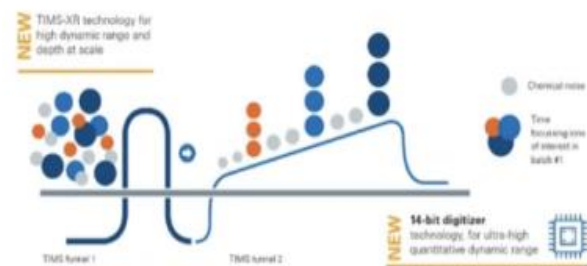
样本经液相色谱 (U3000) 分离后，在进入Q-TOF前经过TIMS，增加离子淌度的分离，从而提高鉴定的深度

# 布鲁克4D-timsTOF HT



timsTOF HT

## HT: High Throughput



速度更快

鉴定更多

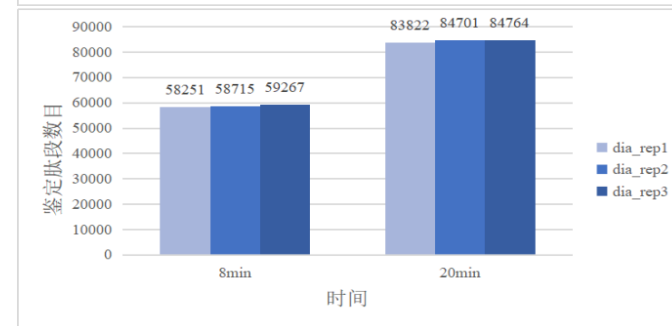
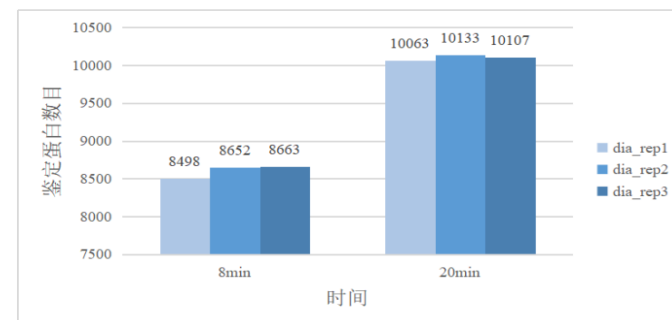
定量更准

通量更高

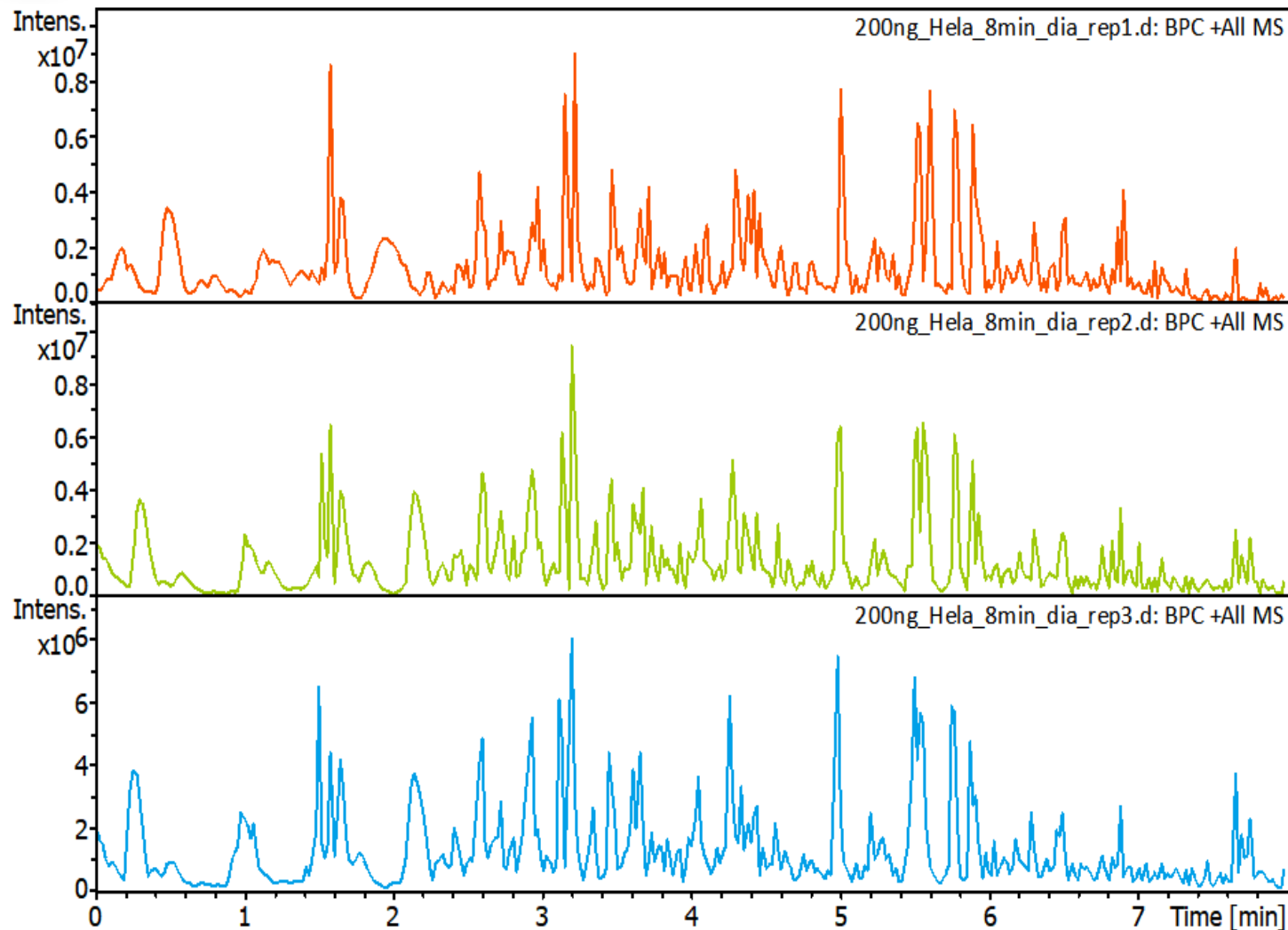
- ✔ 采用第四代TIMS分析器TIMS-XR
- ✔ >150Hz PASEF MS/MS采集速度
- ✔ 14位数字转换器，更宽动态范围
- ✔ 更高的上样量（高达1.6ug载样量）

## 亮点一：超快扫描速度和超高分辨率

timsTOF HT采用全新的第四代TIMS-XR和更先进的数字转换技术，能够在细胞和组织的定量蛋白质组学分析中，实现更高的蛋白覆盖深度。



# 布鲁克4D-timsTOF HT

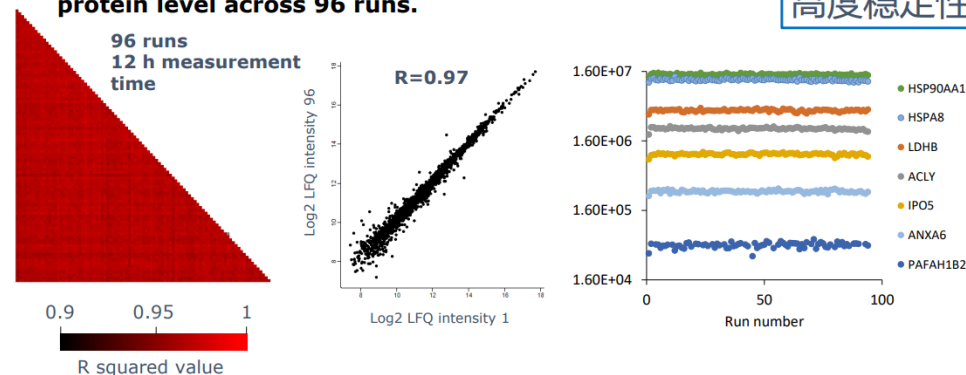


## 亮点二：卓越稳定性保证大队列数据产出

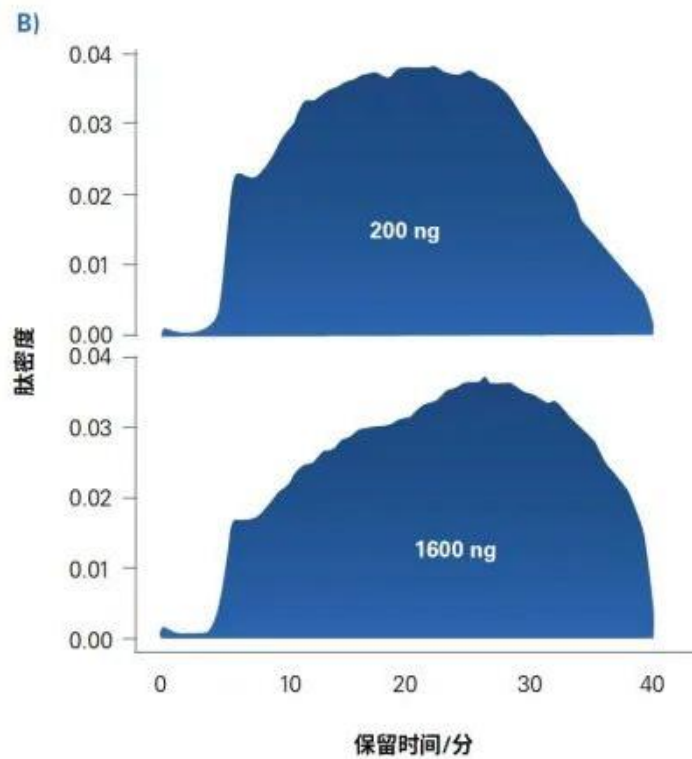
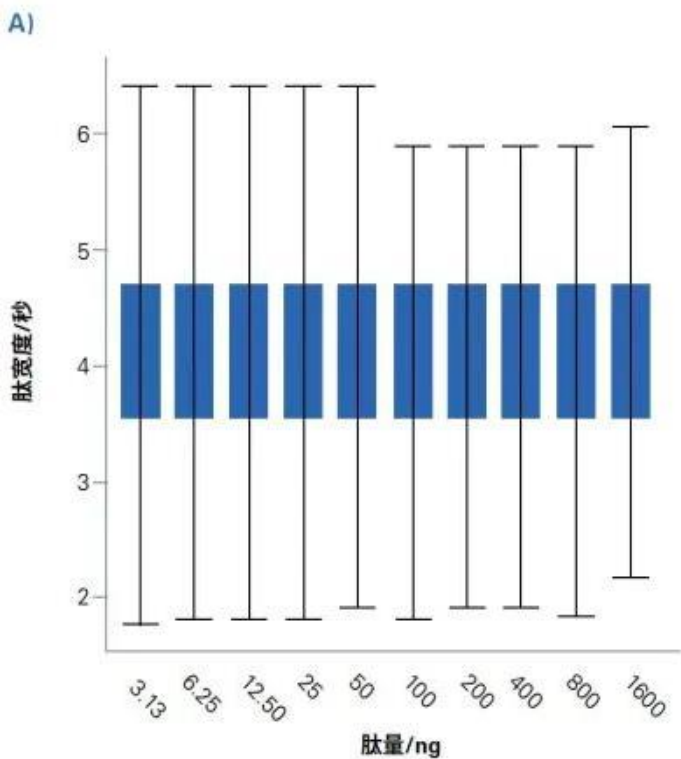
同一样本三次重复鉴定到蛋白数目的相关性高达99%，CV值低于5%，展现了timsTOF HT在数据产出方面的稳定性。

- Only 50 ng HeLa digest per sample
- Very accurate and reproducible quantification on the protein level across 96 runs.

高度重复性  
高度稳定性



# 布鲁克4D-timsTOF HT



A) 3.13 ng 至 1600 ng 的 K562 胰蛋白酶酶解物的平均峰宽较窄。方框和线条分别对应四分位距数据范围的 50% 和 1.5 倍（未显示异常值）。

B) 200 ng 和 1600 ng K562 胰蛋白酶酶解物的肽密度图表明多肽的均匀洗脱。

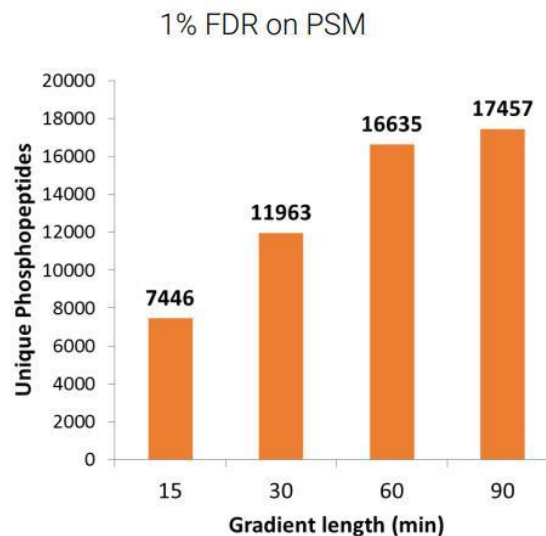
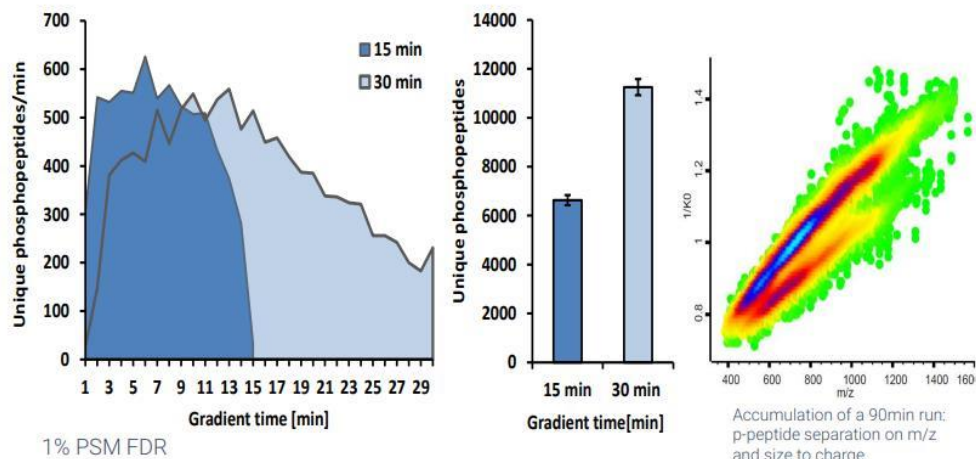
**亮点三：pg到μg超宽浓度上样范围**

对于高至 1600ng的K562胰蛋白酶酶解物（Promega）样本载量，即使在肽段载量较高的情况下，也能在梯度内实现均匀的肽洗脱。



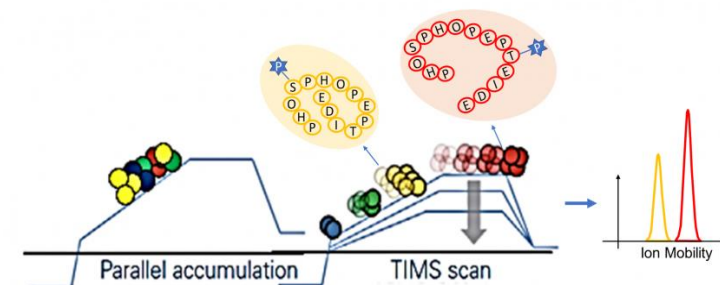
# 布鲁克4D-timsTOF HT

- 50-100  $\mu\text{g}$  starting material (complex cell digest)
- IMAC phosphopeptide enrichment (HPLC column)



## 亮点四：淌度分离提高PTM鉴定可靠性

相同的氨基酸序列；同样一个氨基酸序列上存在多个磷酸化修饰位点；引起修饰位点位置异构



# 布鲁克4D-timsTOF HT



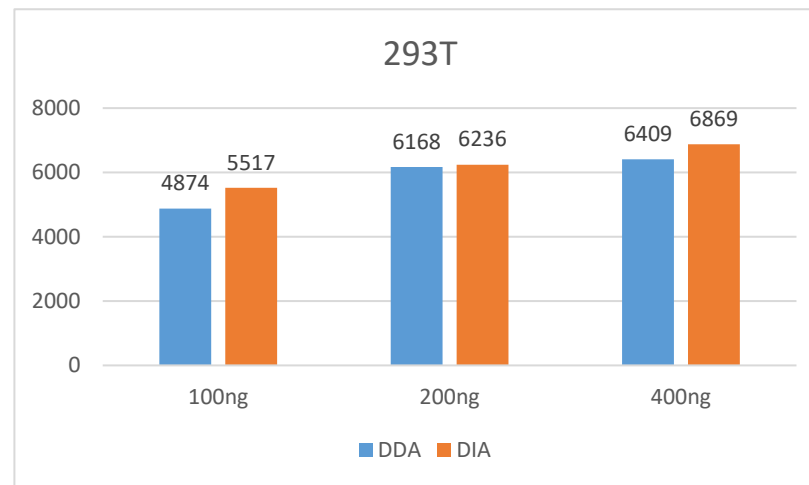
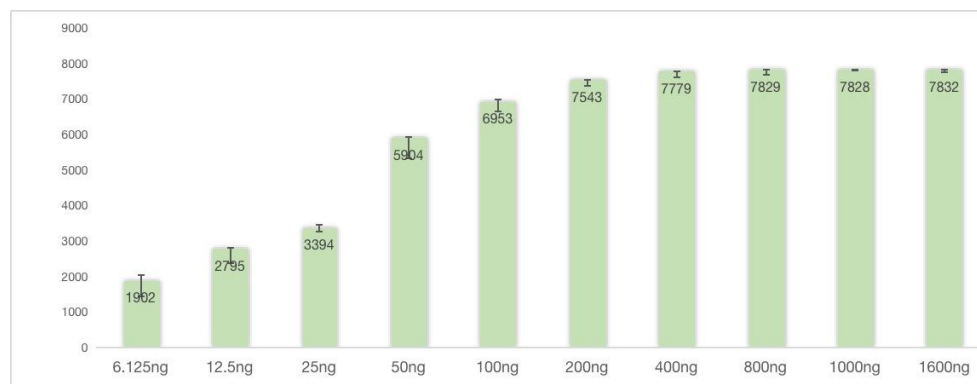
扫描速度: 150Hz  
上样量: 1600ng  
更耐脏, 更稳定

VS

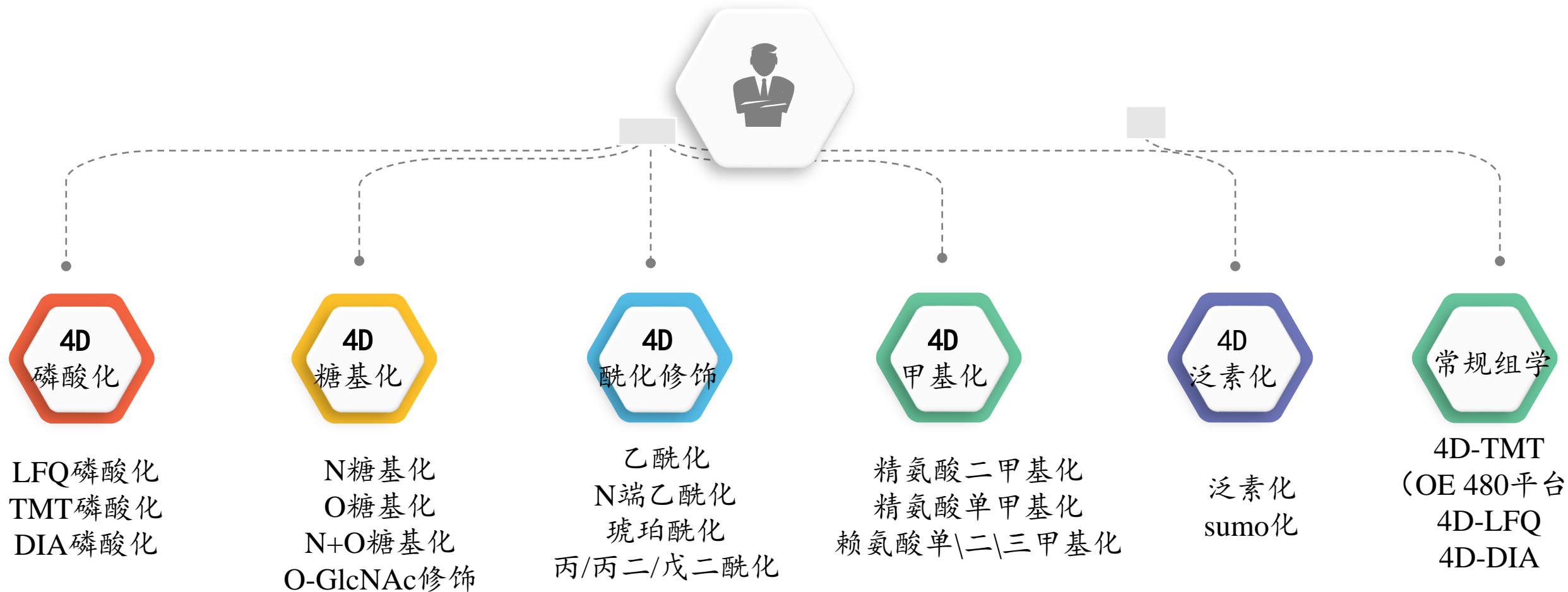


扫描速度: 120Hz  
上样量: 400ng

样本类型: 293T 细胞  
仪器: Tims TOF HT, 梯度30min  
产品类型: 4D-dirc DIA  
搜库方式: DIA-NN



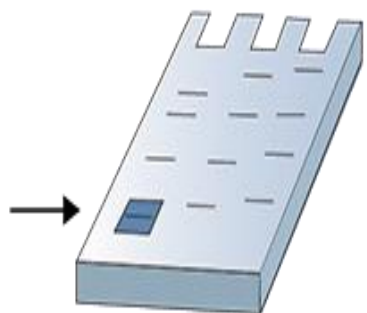
# 4D蛋白质组学产品线



## 蛋白鉴定篇-胶条鉴定

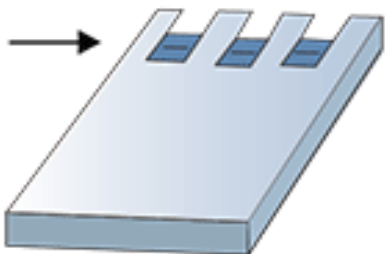
胶条样本:关注目的蛋白、互作蛋白、复杂样本蛋白定性等

### 目的蛋白切胶检测



- ✓ 已知分子量
- ✓ 区分目的与感兴趣蛋白
- ✗ 全蛋白混合物分析

### 全蛋白切胶检测



- ✓ 全蛋白混合物分析
- ✓ IP产物
- ✗ 目的和差异蛋白

| 实验类型  | 送样建议  | 运输条件                       |
|-------|---|----------------------------|
| 胶点/胶条 | 送考马斯亮蓝染色或银染（不含戊二醛）后的胶点/胶条，要求条带清晰，无降解，单个胶条面积小于 $1 \times 1.5 \text{cm}^2$ ，超出部分需额外收取费用 | 4°C保存，放入EP管中，加入去离子水浸泡，冰袋寄送 |

风险预知：考马斯亮蓝染色的条带鉴定到目标蛋白的概率高于银染。但仍不能保证一定检测到目的蛋白

## 蛋白鉴定篇-互作蛋白

### ◆ IP、COIP、PULLDOWN样本怎么送样 ◆

#### 01 情况一：客户会跑SDS-PAGE胶

- 洗脱下来的溶液，加loadingbuffer，跑分离胶1-2cm（也可以根据marker判断，marker跑开2cm），染色脱色，看见条带，切取目标条带至离心管里，加入脱色液，**冰袋**寄送。

#### 02 情况二：客户不会跑SDS-PAGE胶

- 如果客户能找到loading buffer（电泳的上样缓冲液），加上loading buffer，95℃煮10min，**冰袋**寄送。===生产跑胶出QC，客户确认
- 洗脱液或者磁珠，直接**干冰**寄送。===生产跑胶出QC。客户确认



- 关注点：对与**目的蛋白相互作用的蛋白**进行定性定量。
- 送样建议：**Igg组、实验组**
- 风险预知：目的蛋白不一定能检测到
- 蛋白量要求10ug以上或清晰可见蛋白条带

## 蛋白鉴定篇-蛋白全谱

**蛋白质全谱**鉴定主要对原始样本如细胞、组织等，基于质谱技术鉴定出样本中尽可能多的肽和蛋白质混合物的组分。

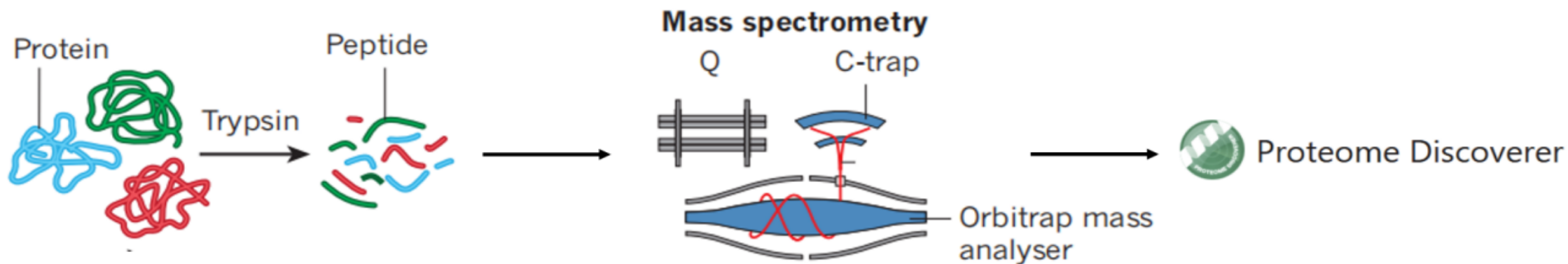
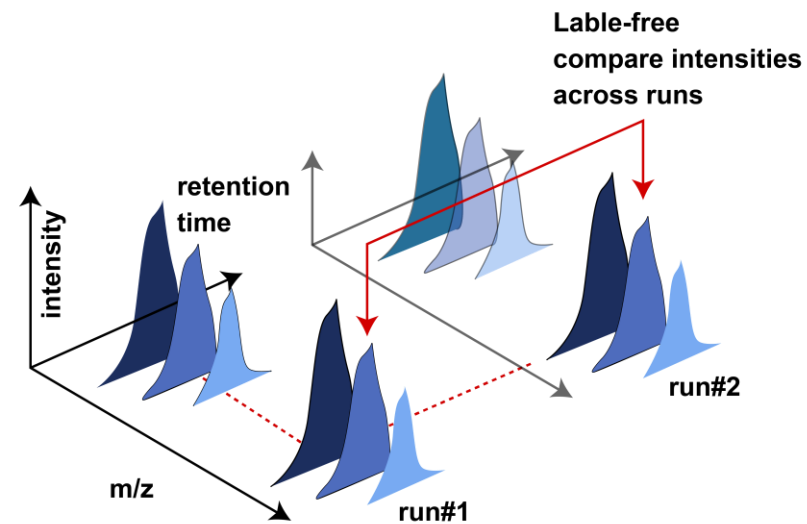


- 关注点：可以不设定生物学重复，结果有蛋白相对定量值但无差异蛋白分析
- 风险预知：纯化后的蛋白溶液检测目的蛋白，依然不能保证能检测到

蛋白量要求20ug以上



LFQ (label-free quantification), 非标记定量技术, **无需对肽段进行特殊处理**, 直接使用液相质谱联用仪对干净的多肽样本进行数据采集, 通过比较不同样品中相应肽段的信号强度, 从而对肽段对应的蛋白质进行相对定量。

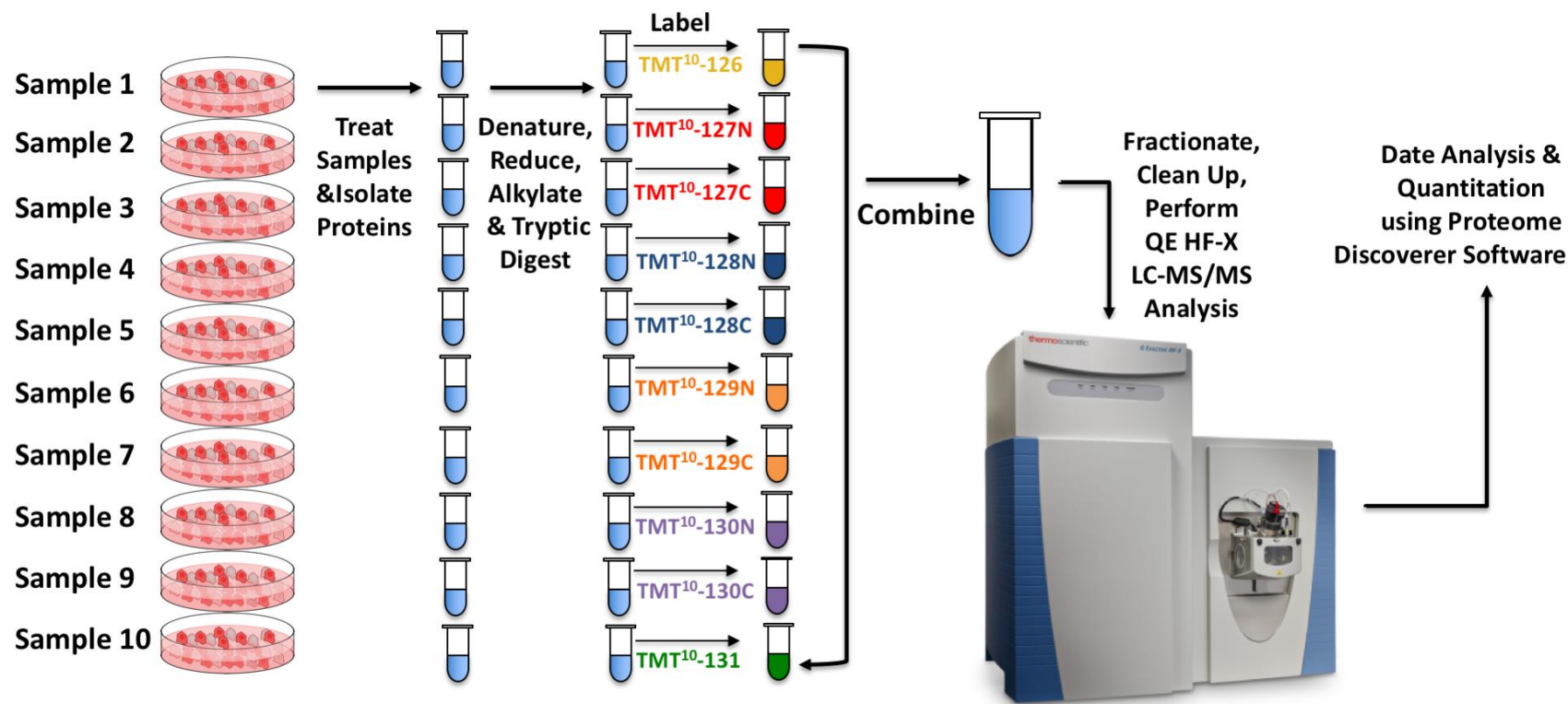


# LFQ定量蛋白组学**优缺点**





**TMT**技术是由Thermo Fisher公司研发的多肽体外标记定量技术。这种技术采用多个 **(2-18)** 稳定同位素标签，特异性标记多肽的氨基基团进行串联质谱分析，能够同时比较多达18种不同样本中蛋白质的相对含量。



注：原始下机数据会和样本个数不同

# TMT定量蛋白组学**优缺点**



## 稳定性好

同一组的样本是同时上机的，同时被采集，不受仪器状态差异的影响，稳定性好。



## 周期短

相对于体内标记方法，TMT操作简单，周期短，使用范围广泛，不受物种限制



## 缺失值极少

TMT使用二级定量报告离子定量，不同样本的丰度信息同时被采集，缺失值非常非常少，能用于后期生信处理的信息非常丰富



## 缺点

价格高，只适用于同一类型的组织

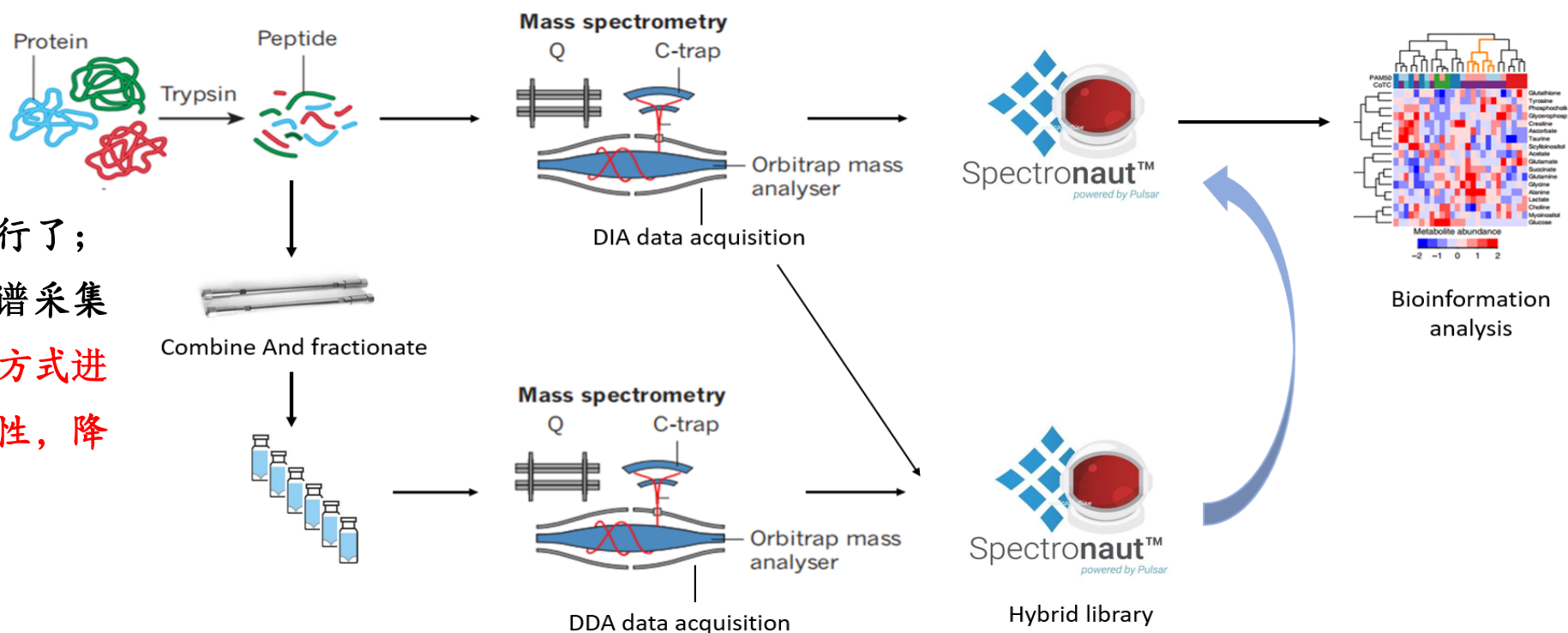


# 组学篇-DIA定量蛋白组

**数据非依赖性采集 (Data Independent Acquisition, DIA)**：是指样品在进入二级质谱时，按照设定的质荷比m/z范围，对该范围内**所有的母离子**进行碎片化，而不是依赖信号强度进行母离子的挑选。与传统的数据依赖性采集 (Data Dependent Acquisition, DDA) 模式相比，DIA方法具有重复性好，蛋白质覆盖率高，定量准确性高等特点。

常规蛋白质组搜索理论图谱就行了；  
而DIA的太复杂，要搜实际质谱采集到的图谱，即library，**通过建库方式进行准确匹配，可提高鉴定准确性，降低匹配难度**

**DIA+DDA (传统DIA)**



# DIA定量蛋白组学**优缺点**

## 特点

### 重复性高

使用内标校正肽段(iRT KIT)  
对不同样品的保留时间进行  
校正, 鉴定与定量结果的可  
重复性高



### 通量高

不受样本物种、样品个数  
的限制, 可用于大规模样  
本数量检测



### 实验操作简单

无需使用昂贵的同位素标  
签, 实验耗费低, 前处理  
简单使样本最接近原始状  
态, 且不受样品条件限制



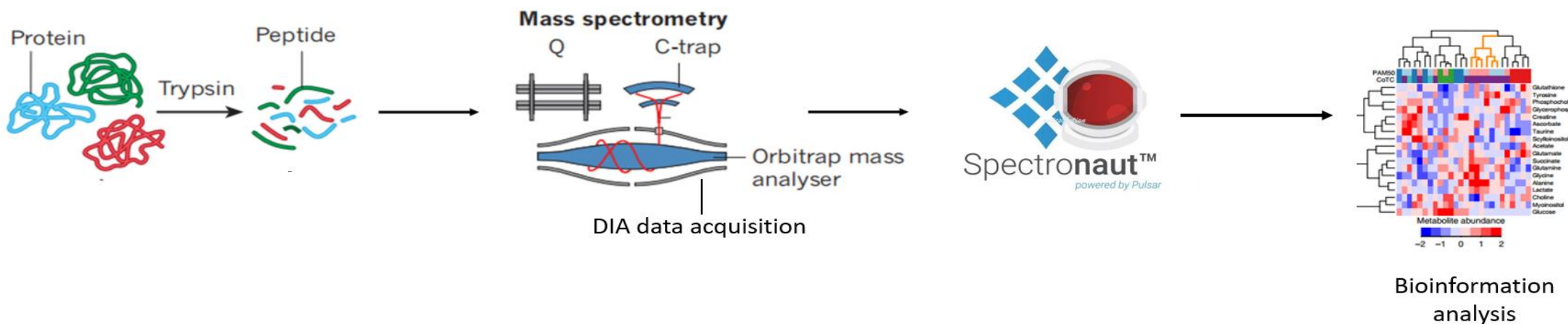
### 缺点

需要额外进行DDA建库, 成本  
有所增加



# 组学篇-dDIA定量蛋白组

Direct DIA (direct Data-independent acquisition), 即DDA-free DIA (dDIA), 与传统DIA分析策略相比, 不用再进行DDA分级建库, 利用**机器深度学习**实现直接通过搜索DIA原始文件谱图生成库。深度学习打分寻找谱峰碎裂规律, 预测保留时间, 去除假阳性结果。改进后的这种方式**提高了效率, 降低了成本, 保留了DIA可重复的定量的优势, 鉴定到的蛋白数目与传统DIA的差距也越来越小。**

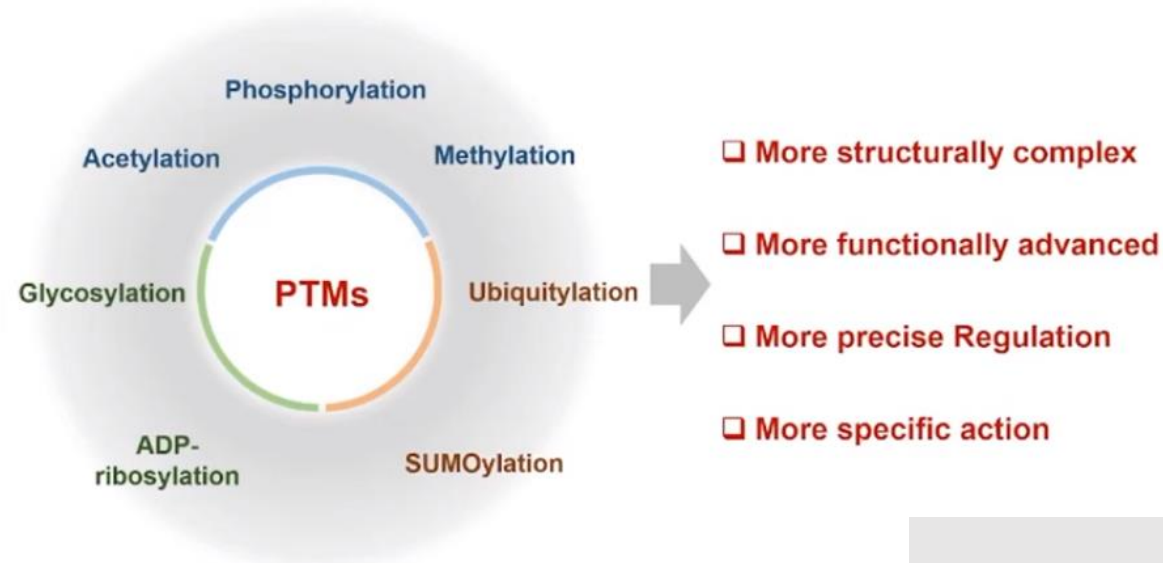
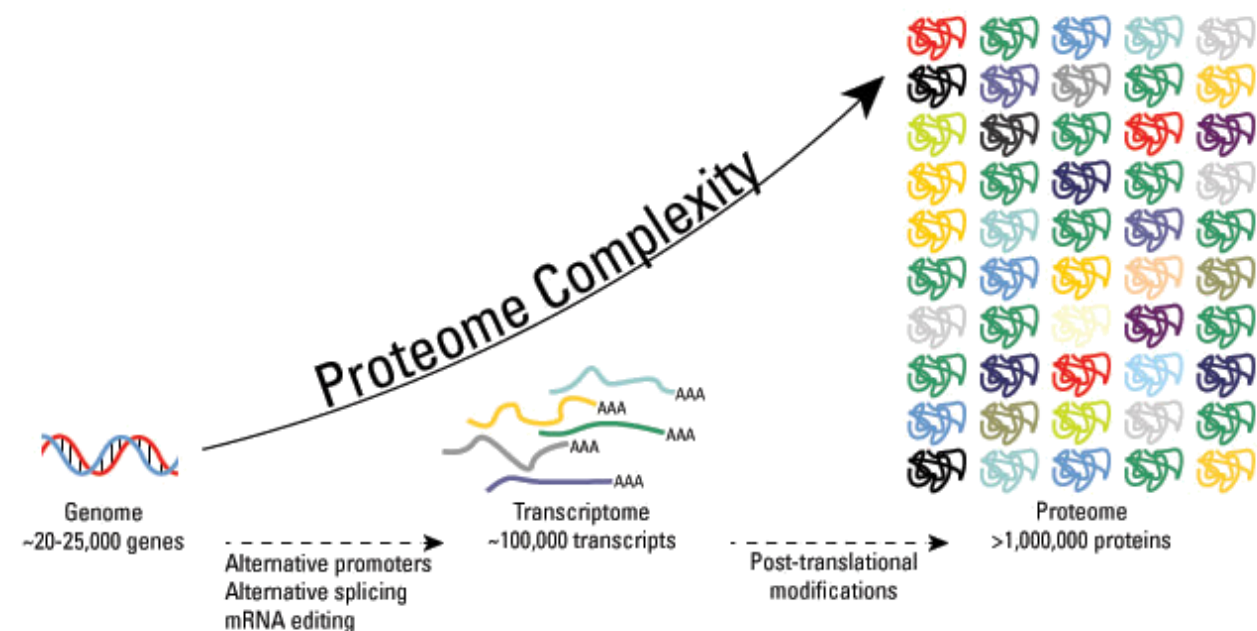


四种定量方法相似，没有绝对的好与坏，根据实验目的、样本类型、数量、课题组经费来选择合适的方法。

| 定量方法 | 适用范围   |
|------|--|
| LFQ  | <ol style="list-style-type: none"><li>1、微量样本、数量小于10个、课题经费不足</li><li>2、可用于做表达谱、不用组织部位的鉴定、差异较大的样本类型</li><li>3、定量分析建议3个重复以上</li></ol> |
| TMT  | <ol style="list-style-type: none"><li>1、样本要求6个以上，建议3次重复</li><li>2、只适合同类型样本，不用将不同组织部位混合检测</li><li>3、大队列样本需要加入内参</li></ol>           |
| DIA  | <ol style="list-style-type: none"><li>1、样本要求6个以上，需要建库，更适合大队列样本</li><li>2、适用于不同组织部位的样本一起分析</li><li>3、珍贵样本，如临床样本</li></ol>           |
| dDIA | <ol style="list-style-type: none"><li>1、无需额外建库，与传统DIA相比节约成本</li><li>2、DIA采集模式，重现性高，准确性高</li><li>3、目前鉴定蛋白数量和传统DIA有一定差距</li></ol>    |

## 修饰组学-PTM

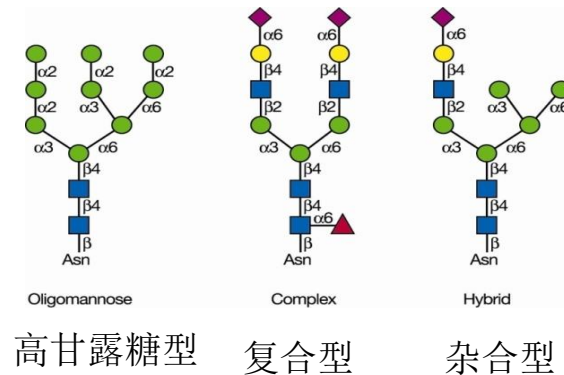
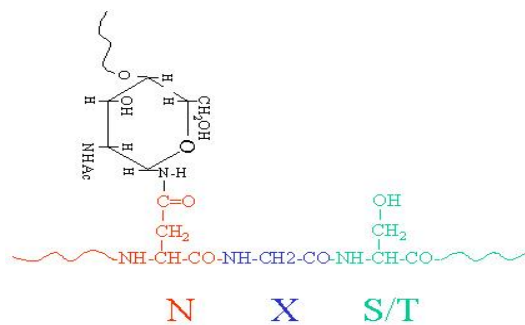
翻译后修饰（post-translation modifications, PTM）：是指对翻译后的蛋白质进行共价加工的过程，通过在一个或多个氨基酸残基加上修饰基团，可以改变蛋白质的理化性质，进而影响蛋白质的空间构象和活性状态，亚细胞定位，折叠机器稳定性及蛋白互作。



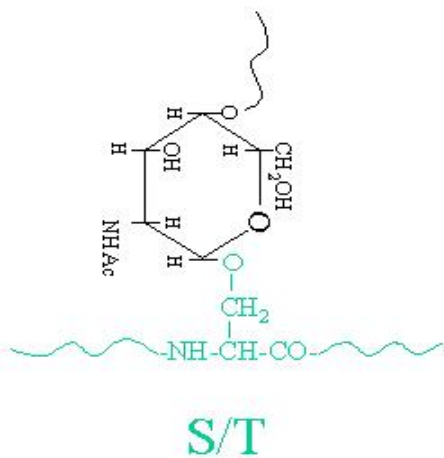
PTM是增加蛋白多样性的关键机制

# 修饰组学-糖基化

N-糖基化，起始于内质网，在高尔基体中完成。通常第一个连接上去的糖单元是N-乙酰氨基葡萄糖，连接部位为特定的天冬酰胺。糖链结构有规律



O-糖基化，在高尔基体中进行，通常第一个连接上去的糖单元是N-乙酰半乳糖，连接部位Ser、Thr,然后逐渐将糖转移上去形成寡糖链，糖链结构无规律。



## Carbohydrate tumor markers

| Marker <sup>a</sup> | Cancer type                    |
|---------------------|--------------------------------|
| AFP                 | Hepatocellular                 |
| β-hCG               | Testicular, ovarian            |
| CA 15-3             | Breast, lung, prostate         |
| CA 19-9             | Gastrointestinal (pancreatic)  |
| CA 27.29            | Breast, lung, prostate         |
| CA 125              | Ovarian                        |
| CA 549              | Ovarian                        |
| CEA                 | Colorectal                     |
| CEACAMs             | Colorectal, pancreatic         |
| HER2                | Breast                         |
| onfFN               | Thyroid                        |
| PLAP                | Testicular, muscle             |
| PSA                 | Prostate                       |
| sTn antigen         | Colon, other                   |
| TAG-72              | Ovarian, other                 |
| TG                  | Thyroid                        |
| Tn antigen          | Colon, breast, cervical, other |

Target protein antigen, determining protein concentration

Target glycan antigen, determining glycan concentration

癌症进程中的遗传、表观遗传、代谢、炎性和微环境机制改变与糖基化修饰改变密切相关，被认为是癌症的标志，FDA批准的大多数肿瘤标志物都是糖蛋白或聚糖抗原。

乳腺癌-Her2/neu、肝癌-AFP、胰腺癌-CA19-9 前列腺癌-PSA、卵巢癌-OVA1、CA125

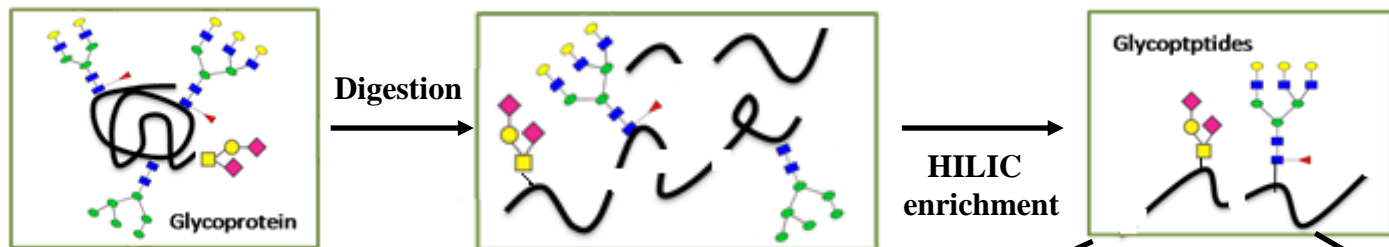


# 糖基化组学研究策略

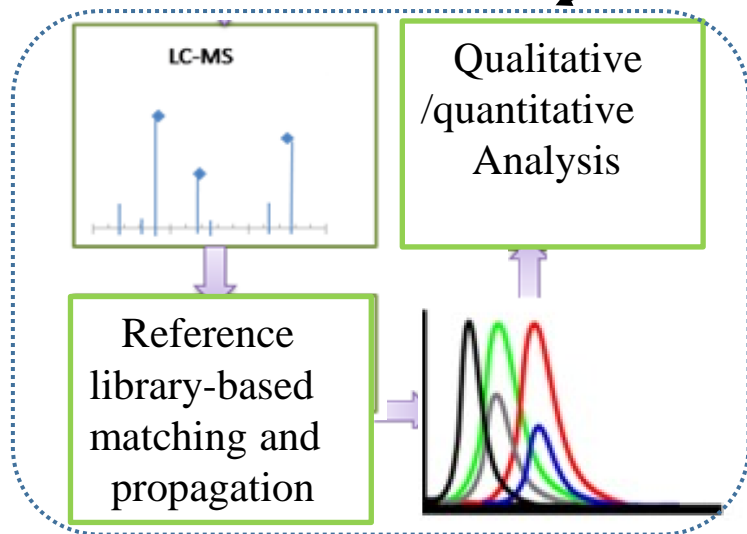
样品制备

质谱检测

数据分析



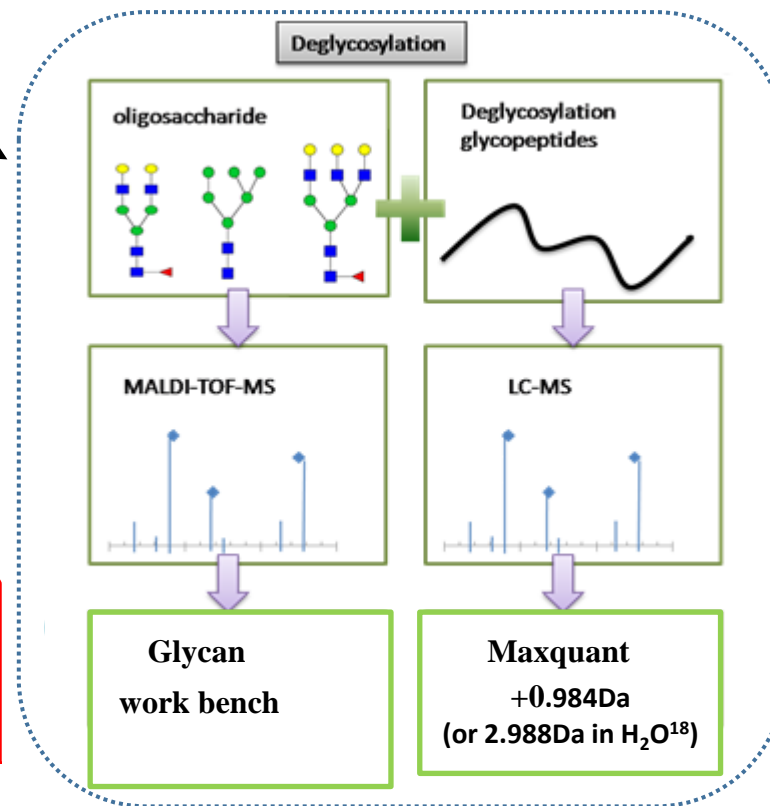
完整糖肽解析



核心技术

N/O糖完整糖肽分析

经典的糖蛋白解析



# 糖基化组学研究策略

## 修饰信息全面

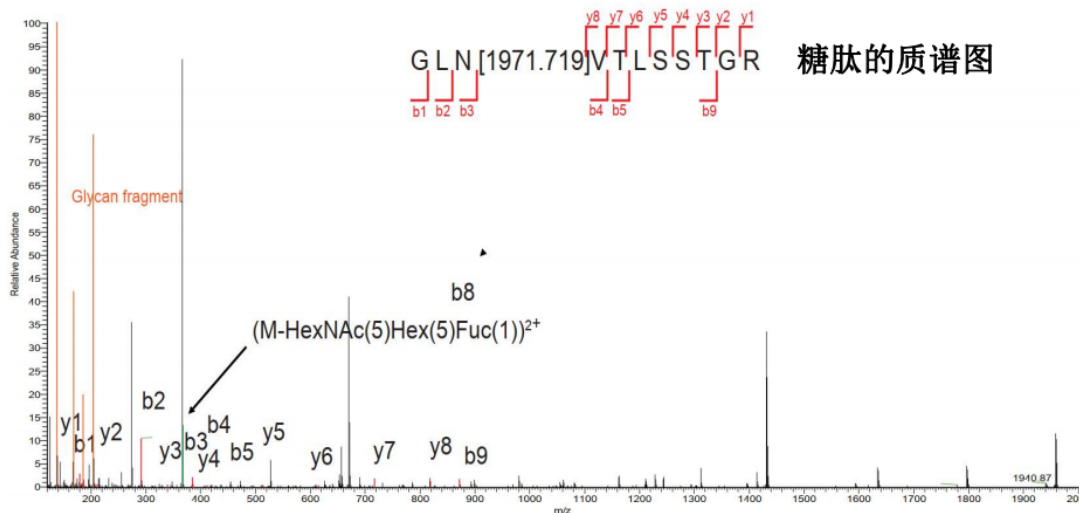
- 同时获得糖蛋白量的变化、修饰位点的变化、糖型变化、糖型位点蛋白序列信息同时获得

## 独家O糖位点及糖型解析

- O糖结构复杂，市面上少有商业化的O糖糖型分析产品

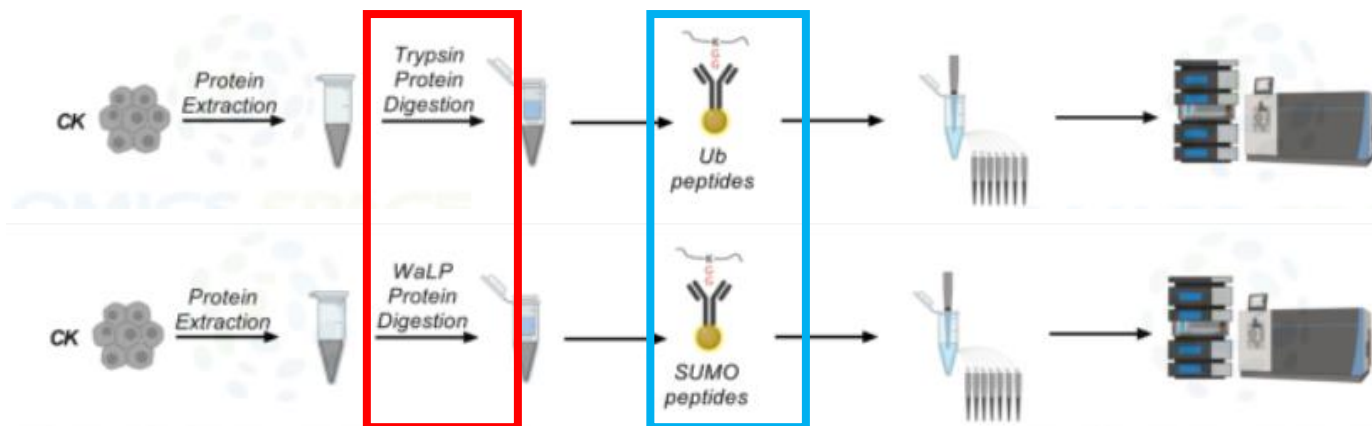
## 糖链谱图

- 除了常规的功能通路分析以外，还能提供糖链谱图

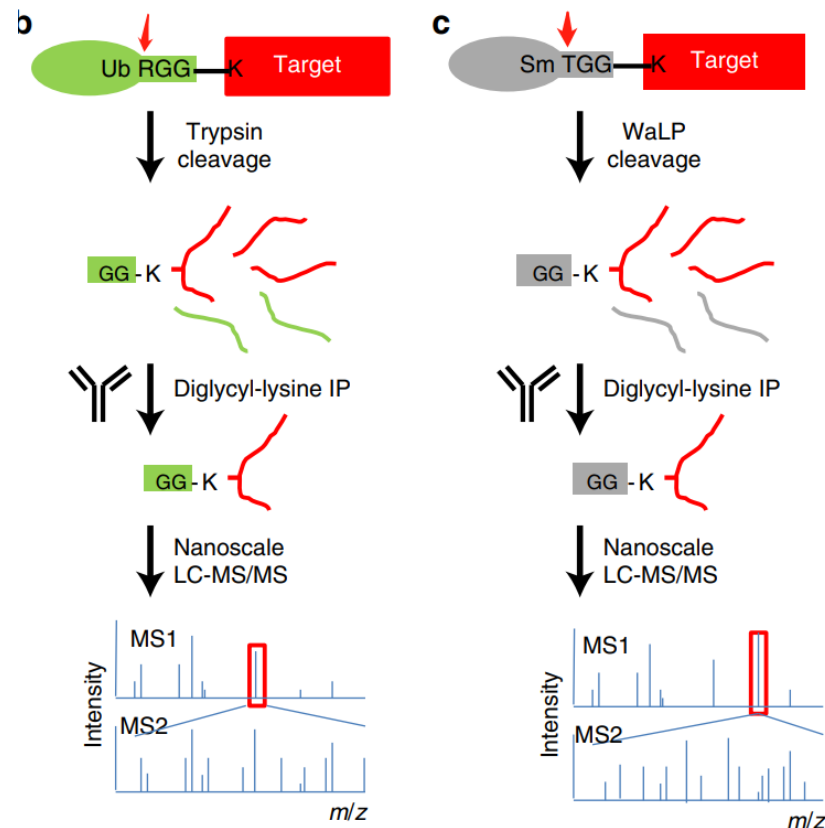


优势：**byonic**搜库，国内最全，70多种O-糖、300多种N-糖糖型

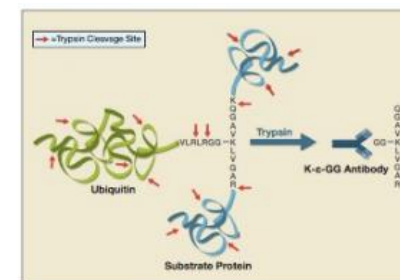
# 泛素化/苏木化研究策略



**泛素化和SUMO**使用同一个高敏试剂盒，两者的区别在前处理时使用的酶，所以两种修饰必须依靠酶解和搜库参数才能分开。一个样本不能同时做泛素化和SUMO化，需要分成两份样本制备，分开上机搜库~



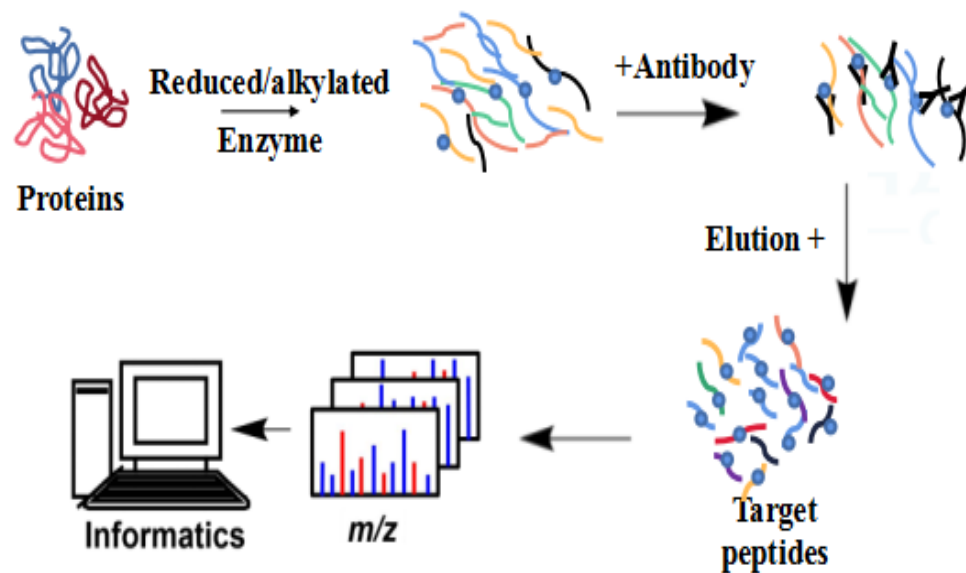
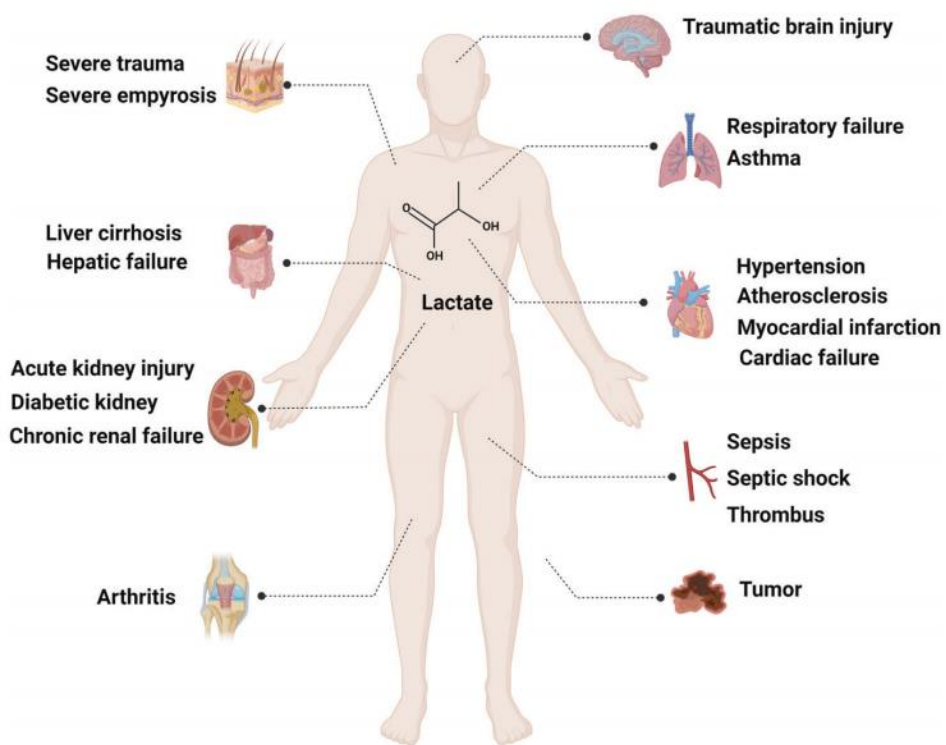
| 修饰类型 | 酶类型            | 酶切位点 | 修饰名称 |
|------|----------------|------|------|
| 泛素化  | <b>Trypsin</b> | KR   | GG   |
| sumo | <b>Walp</b>    | ASTV | GG   |




泛素化残基基序 (K-ε-GG) 抗体可用于富集复杂混合物中含K-ε-GG的肽段

# 修饰组学-乳酸化

乳酸化修饰（Lactylation）是指在细胞代谢过程中，乳酸的积累修饰组蛋白上的赖氨酸残基。作为一种蛋白翻译后的修饰类型，在肿瘤发生、败血症和免疫疾病发生中发挥重要的作用。研究证实，乳酸化修饰是乳酸发挥功能的重要方式，参与糖酵解相关细胞功能，巨噬细胞极化，血管功能、线粒体、神经系统调控等重要生命活动，可为肿瘤、免疫等各种领域的研究指引新方向。



 Anti-L-Lactyl Lysine Rabbit pAb

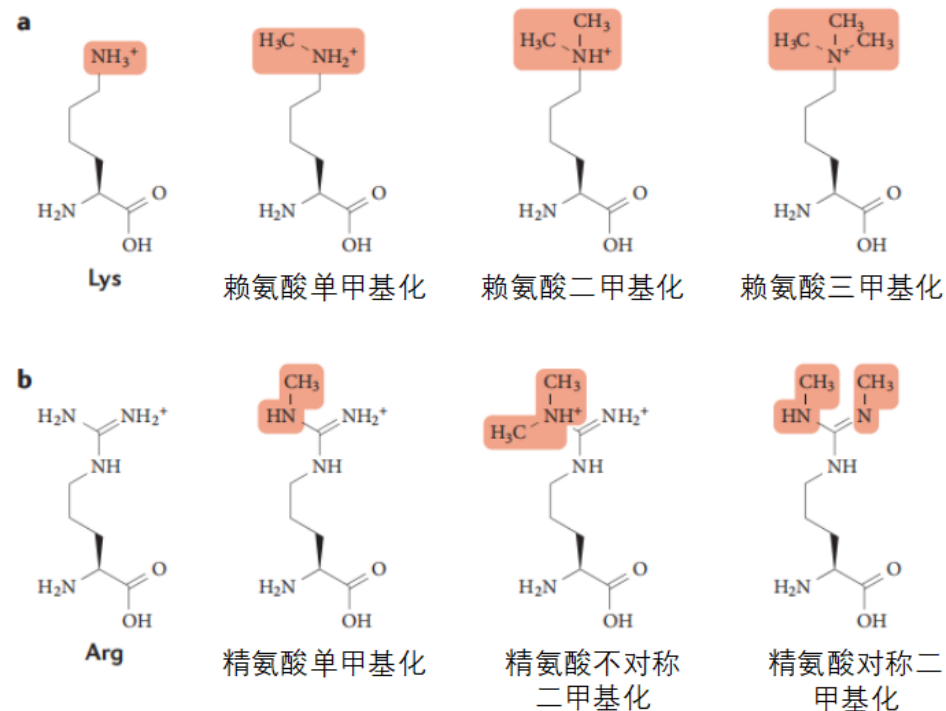
货号: PTM-1401

利用**乳酸化抗体**,富集乳酸化修饰肽段从而开展高质量的乳酸化修饰组学分析

# 修饰组学-甲基化

蛋白质甲基化修饰（Methylation）是表观遗传学的重要研究内容之一。甲基化多发生在转录因子和核蛋白质上，也有少量胞质蛋白会发生。蛋白质的甲基化是指将甲基在酶的作用下转移到蛋白质的某个残基上，通常是**赖氨酸或精氨酸**，也包括组氨酸、半胱氨酸和天冬酰胺等。

甲基化蛋白组使用专有的**甲基化精氨酸(Me-R)**或**甲基化赖氨酸(Me-K)**抗体在进行LC-MS/MS分析之前富集胰蛋白酶消化样本中含甲基化成分的段。



## MethylScan®-甲基化蛋白质组

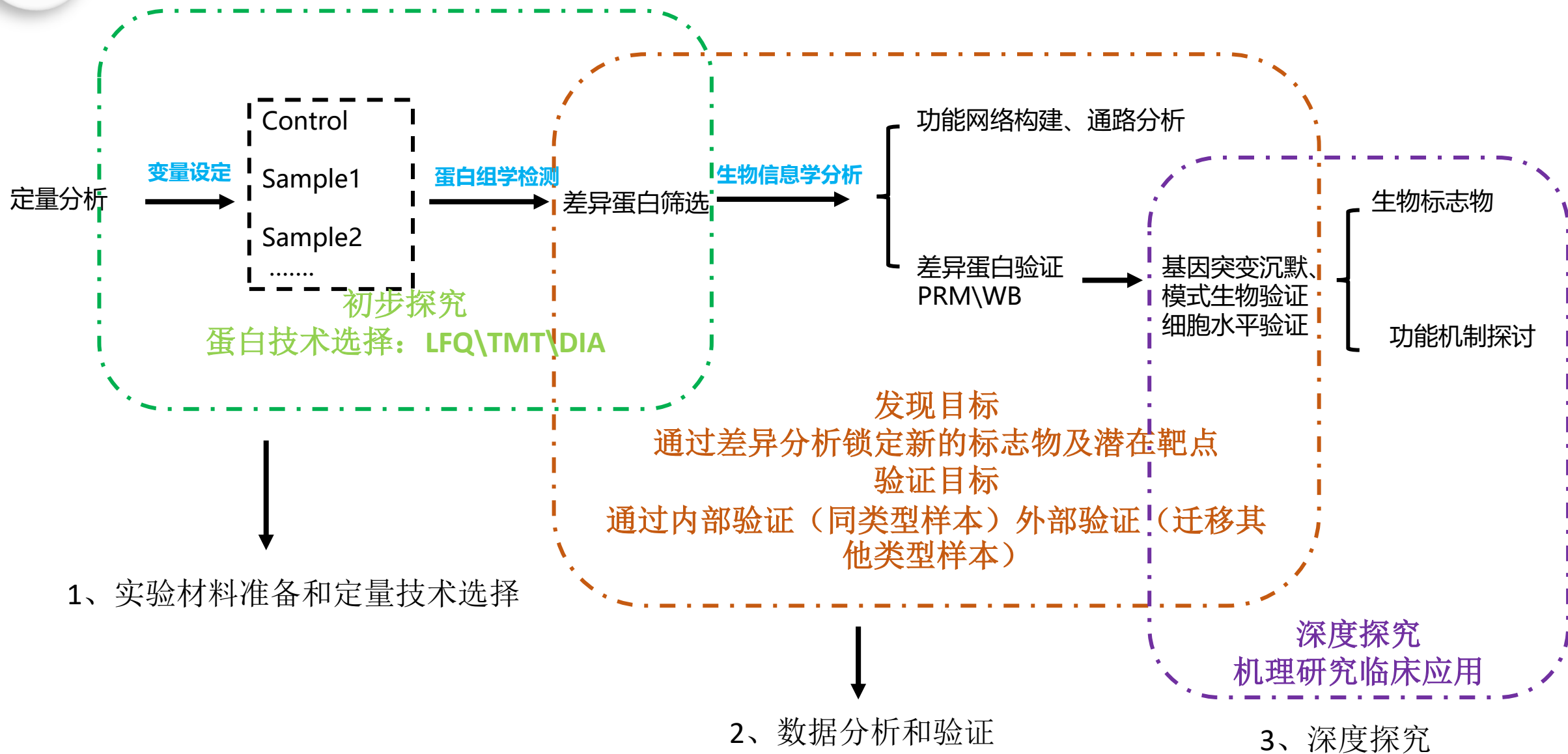
| MethylScan®-甲基化蛋白质组 |                  | 抗体 <sup>†</sup>              | PTMScan® |    | KinomeView® |    |
|---------------------|------------------|------------------------------|----------|----|-------------|----|
| 靶标                  | 基序               | 编号                           | 试剂盒      | 服务 | Kit #9812   | 服务 |
| 单甲基精氨酸              | R-Me             | #8015                        | #12235   | ✓  | —           | ✓  |
| 非对称二甲基精氨酸           | R-2Me(a)         | #13522                       | #13474   | ✓  | —           | ✓  |
| 对称二甲基精氨酸            | R-2Me(s)         | #13222                       | #13563   | ✓  | —           | ✓  |
| 泛甲基赖氨酸              | K-Me/K-2Me/K-3Me | #14117 (2Me)<br>#14680 (3Me) | #14809   | ✓  | —           | ✓  |

# 修饰蛋白组学富集方法

| 修饰类型             |             | 位点       | +分子量(Da)   | 修饰肽段富集方法 | 调控生物过程                                  |
|------------------|-------------|----------|------------|----------|---|
| methylation      | 赖氨酸、精氨酸单甲基化 | K/R(me1) | 14.01565   | CST抗体富集  | 染色质结构以及转录调控；稳定蛋白质，调控蛋白转录以及结合活性、DNA复制和损伤 |
| dimethylation    | 赖氨酸双甲基化     | K(me2)   | 28.0313    |          |   |
| trimethylation   | 赖氨酸三甲基化     | K(me3)   | 42.04695   |          |   |
| aDMA             | 精氨酸不对称二甲基化  | R(me2)   | 28.0313    |          |   |
| sDMA             | 精氨酸对称二甲基化   | R(me2)   | 28.0313    |          |   |
| malonylation     | 丙二酰化        | K(Mal)   | 86.000394  |          | 基因表达调控、细胞凋亡、细胞代谢                        |
| succinylation    | 琥珀酰化        | K(Succ)  | 100.016044 |          |   |
| glutarylation    | 戊二酰化        | K(Glu)   | 114.03169  |          |   |
| Acetylation      | 乙酰化         | K(Ac)    | 42.010565  |          |   |
| N-Acetylation    | N端乙酰化       | -        | 42.010565  |          | 代谢、生长、形态发生、凋亡、转录等                       |
| HexHAcylation    | O-乙酰葡萄糖胺修饰  | S/T      | 203.0794   |          |   |
| phosphopropargyl | 多通路磷酸化      | S/T/Y    | 79.966     |          |   |
| GG-Ub            | 泛素化/SUMO化   | K(GG)    | 114.042927 |          | 细胞周期调控、增殖与分化、凋亡以及蛋白质周转代谢                |



# 定量蛋白质组学研究思路



# 感谢各位的聆听

## Your own Laboratory

——您的专属实验室

