

# 自动化血浆蛋白质组学样品前处理

## 使用 PreOmics iST 技术和 Agilent Bravo 自动化液体处理平台

### 作者

Phillipp E. Geyer<sup>2,3</sup>, Garwin Pichler<sup>1</sup>,  
Peter V. Treit<sup>2</sup>, Sophia Doll<sup>2</sup> 和  
Nils A. Kulak<sup>1</sup>

<sup>1</sup> PreOmics GmbH, 德国马丁  
雷德

<sup>2</sup> 蛋白质组学与信号转导研究部,  
Max Plank 生物化学研究所,  
德国马丁雷德

<sup>3</sup> 健康与医学科学学院 NNF  
蛋白质研究中心, 丹麦哥本  
哈根大学

### 摘要

在临床研究中，经常对血液类样品（如血浆和血清）中的蛋白质进行分析。虽然蛋白质的生物学普遍性使其在相关研究理论上具有吸引力，但研究血液类样品中的血浆蛋白质组极具挑战性，因为其中存在大量问题<sup>1</sup>。在这些问题上，最主要的是样品前处理工作流程中涉及耗时且复杂的手动步骤。这使得样品的并行处理非常容易出错，从而影响实现稳定比较分析所需的重现性。随着样品数量的增加，这些处理困难愈发严重，导致结果不可靠。然而，大样品量在统计学上不可或缺，可用于平衡在单个无假说 MS 运行中测量的数千个变量（在本例中，主要涉及蛋白质和肽段）。

为克服前面提到的问题，Geyer 等人开发出快速（2 小时）、稳定的“血浆蛋白质组分析”方案<sup>2</sup>。该方案得益于 PreOmics 的 iST 试剂盒所提供的简单样品前处理工作流程与 Agilent Bravo 液体处理平台高通量自动化的完美结合。与其他样品前处理方法不同，该方案在单个反应样品瓶中完成样品前处理的所有阶段（变性、还原、烷基化、酶解、肽段纯化和脱盐）。使用 Bravo 自动化平台能够最大程度减少污染，并减小由用户带来的系统误差。凭借这些优势，这种单次运行 LC/MS/MS 蛋白质组工作流程能够自动完成对数百个 1  $\mu$ L 样品材料的血浆蛋白质组的可重现定量分析<sup>2,3</sup>。

## 前言

循环系统中的蛋白质能够反映个体的生理机能。目前，通常使用单一蛋白免疫分析法来测定蛋白质水平，但是该方法往往存在若干缺点<sup>4</sup>。使用基于 MS 的蛋白质组学获得高通量、无假说的定量分析数据将是一种非常理想的替代方案，但是这种方案本身面临独特的挑战。最常见的问题是蛋白质组内蛋白质丰度的动态范围很宽，而质谱仪和扫描模式不断改善的性能指标解决了这一问题<sup>1,2</sup>。但是，缺少稳定的高通量蛋白质组学工作流程来鉴定和验证大量潜在的生物标记物，已经严重限制了蛋白质组学工作流程的前处理阶段。

为克服这一局限性，Geyer 等人 (2016)<sup>2</sup> 提出了一种快速且稳定的“血浆蛋白质组分析”方案。基于最近报道的 in-StageTip (iST) 方法<sup>3</sup>，我们进一步简化了专门用于血浆样品的程序。仅利用刺破单指所采集的 1  $\mu\text{L}$  血浆，即可在单个反应样品瓶 (iST 卡盒) 中完成所有前处理步骤 (变性、还原、烷基化、酶解、肽段纯化和脱盐)。按照 iST 试剂盒的说明，整个前期样品处理只需不到两个小时，并且可以在 Bravo 液体处理平台上以 96 孔形式轻松完成。与其他样品前处理方法相反，该工作流程无需去除蛋白质干扰，并且能够使

用 LC/MS/MS 通过 20 分钟的梯度对刺破手指所采集的数百个 1  $\mu\text{L}$  样品中的血浆蛋白质组进行定量分析。

本应用简报介绍了用于血浆蛋白质组学分析样品前处理工作流程的两步式 Agilent Bravo 方案，并将该方案应用于分析一名女性和一名男性受试者的血浆样品。使用 PreOmics 的 iST 试剂盒对血浆蛋白质进行变性、还原、烷基化和酶解。完成样品前处理后，对样品进行混合相肽段纯化，然后进行 LC/MS/MS 分析。共鉴定出 3486 种独特的肽段序列和 373 种蛋白质，每次运行平均可定量 300 种独特的蛋白质：大部分蛋白质存在于所有 96 个样品中，仅有 2% 的蛋白质仅存在于单次 LC 运行中。重复分析揭示了用于血浆蛋白质组表征的 LC/MS 工作流程的重现性。在整个工作流程重复测定过程中，观察到的 Pearson 相关系数为 0.98。

## 实验部分

### 材料

**血浆样品：**通过静脉穿刺采血，获得 10 mL 血液。在 2000  $\times$  g 下离心 20 分钟后，得到血浆。经 Max Planck 学会伦理委员会事先批准，采集健康供体 (需签署书面知情同意书) 的血液样品。

## 工作流程

**iST 样品前处理 — 裂解、蛋白质变性、还原、烷基化和酶解：**iST 样品前处理方案使用户可以选择在 96 孔板中同时处理 1 至 96 个样品。在本实验中，对 96 个血浆样品进行处理，分别对应于两名受试者各 48 个 1  $\mu\text{L}$  等分试样。按照该方案，Bravo 依次从适当的母板吸取试剂，然后将试剂加入到样品中并在样品板中将溶液混合，具体数量则遵照应用界面输入的参数。

### 试剂配制

1. 将血浆样品按 1:10 (v:v) 的比例溶于水中，得到浓度约 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的溶液
2. 将 10  $\mu\text{L}$  样品加入 MTP 的第 1-12 行  $\rightarrow$  样品
3. 将 120  $\mu\text{L}$  裂解试剂加入 MTP 的第 1-6 行  $\rightarrow$  裂解试剂
4. 将 210  $\mu\text{L}$  重悬试剂加入各个酶解管中并振摇 (室温; 500 rpm; 10 分钟)
5. 将 120  $\mu\text{L}$  酶解试剂加入 MTP 的第 1-6 行  $\rightarrow$  酶解试剂
6. 将 120  $\mu\text{L}$  停止试剂加入 MTP 的第 1-12 行  $\rightarrow$  停止试剂

图 1 示出试剂在 Agilent Bravo 平台上的正确位置。

样品	新枪头	加热 37 °C
废液	iST 卡盒	加热 80 °C
裂解试剂	停止试剂	酶解试剂

图 1. 方案 1 的板配置：裂解、蛋白质变性、还原、烷基化和酶解

## Agilent Bravo 系统工作流程

- 启动自动化系统和培养箱
- 将位置 6 加热至 80 °C
- 将位置 3 加热至 37 °C
- 按图 1 所示方式放置板
- 启动方案
  - 移取裂解试剂至 iST 卡盒中
  - 移取样品至 iST 卡盒中
  - 密封 iST 卡盒
  - 将 iST 卡盒转移至位置 6
  - 在 80 °C 下，对 iST 卡盒中的样品加热 10 分钟
- 冷却 5 分钟
- 在最高 400 g 的条件下对 iST 卡盒进行离心
- 将 iST 卡盒置于位置 5 处
- 揭开顶盖
- 重新启动方案
  - 移取酶解试剂至 iST 卡盒中
  - 将 iST 卡盒转移至位置 3
  - 密封 iST 卡盒
  - 在 37 °C 下，对 iST 卡盒进行 60 分钟的胰蛋白酶酶解
- 在最高 400 g 的条件下对 iST 卡盒进行离心
- 将 iST 卡盒置于位置 5 处
- 重新启动方案
  - 移取停止试剂至 iST 卡盒中
- 将转接板中的 iST 卡盒放到废液位置
- 对 iST 卡盒进行离心：3800 rcf；3 分钟

密封装有肽段的管或卡盒（使用底盖）。肽段可以冷冻保存于 -20 °C 下。肽段在 -20 °C 下的储存不应超过两周。要长期储存，请完成该方案并储存于 -80 °C 下。

表 1. 台板上样品和试剂

iST 样品前处理 — 蛋白质变性、还原、烷基化和酶解	
台板位置和试剂	实验室器皿
1 - 血浆样品，5 µg/µL 水溶液	twin.tec PCR 板 96 LoBind (Eppendorf 部件号 0030129504)
2 - 新枪头	384ST 70 µL 无菌枪头 (部件号 19133-112)
3 - 加热振荡器	Teleshake 加热振荡台板 (G5498B#009)
4 - 废液	
5 - iST 卡盒	转接板 (PreOmics; P.O.00027)
6 - 加热	帕尔贴温控台板 (G5498B#035)
7 - 裂解	twin.tec PCR 板 96 LoBind (Eppendorf 部件号 0030129504)
8 - 停止	twin.tec PCR 板 96 LoBind (Eppendorf 部件号 0030129504)
9 - 酶解	twin.tec PCR 板 96 LoBind (Eppendorf 部件号 0030129504)

表 2. 分析仪器

用于自下而上的蛋白质组学样品前处理的 iST 试剂盒 96x (P.O.000027)	
iST 卡盒	适用于 1–100 µg 蛋白质起始材料的卡盒
转接板	能够将卡盒置于 96 孔 MTP 板中
废液板	用于收集清洗后废液的深孔板
MTP 板	用于收集洗脱后肽段的 LoBind 板
自动化	
核心自动化平台	Bravo 自动化液体处理平台，适合单机使用 (G5523A)
安捷伦移液枪头	96ST 一次性移液头 (G5498B#041)
Agilent Bravo 附件	带抓板机械臂的单机型 Bravo (G5523A#003)
其他附件	液体处理附件 (G5498B)
其他附件	准直台板 (G5498B#028)
其他附件	来自 Inheco 的 MTC 温度控制器 (G5498B#015)
其他附件	Teleshake 加热振荡台板 (G5498B#009)
其他附件	槽/振荡卡 (G5498B#019)
其他附件	超薄型 CPAC，不带控制器 (G5498B#021)
其他附件	用于 CPAC 的定制套件 (G5498B#017)
其他附件	帕尔贴温控台板 (G5498B#035)
其他附件	Bravo 抬升支架，146 mm (G5498B#055)
其他附件	用于 INHECO CPAC NUNC 的转接板 (G5498B#012)
其他附件	V_P PCR 板垫 VP741I6A (G5498B#013)
LC/MS/MS	
液相色谱系统	EASY-nLC 1000 超高压系统 (赛默飞世尔科技公司)
纳流电喷雾离子源	纳流电喷雾离子源 (赛默飞世尔科技公司)
MS 设置	Q Exactive HF Orbitrap (赛默飞世尔科技公司)
液相色谱柱	40 cm HPLC 色谱柱

## iST 样品前处理 — 肽段纯化

用有机和水性清洗溶液清洗胰蛋白酶酶解肽段，除去疏水性和亲水性污染物（如脂质和盐）。

### 试剂配制

1. 将 120  $\mu\text{L}$  清洗溶液 1 加入第 1–12 行 (twin.tec PCR 板 96 LoBind; Eppendorf)
2. 将 120  $\mu\text{L}$  清洗溶液 2 加入第 1–12 行 (twin.tec PCR 板 96 LoBind; Eppendorf)
3. 将 120  $\mu\text{L}$  洗脱液加入第 1–12 行 (twin.tec PCR 板 96 LoBind; Eppendorf)
4. 将 120  $\mu\text{L}$  LC 上样试剂加入第 1–6 行 (twin.tec PCR 板 96 LoBind; Eppendorf)

图 2 示出试剂在 Bravo 平台上的正确位置。



图 2. 步骤 2 — 肽段纯化的板配置（同样在表 1 中列出）

## Bravo 系统上的工作流程

- 启动自动化系统
- 将 iST 卡盒置于位置 5 处
- 启动方案
  - 移取清洗溶液 1 至 iST 卡盒中
- 对 iST 卡盒进行离心：3800 rcf；3 分钟
- 将 iST 卡盒置于位置 5 处
- 重新启动方案
  - 移取清洗溶液 2 至 iST 卡盒中
- 对 iST 卡盒进行离心：3800 rcf；3 分钟
- 将 iST 卡盒置于 MTP 板上
- 将 iST 卡盒置于位置 5 处
- 重新启动方案
  - 移取洗脱液至 iST 卡盒中
- 对 iST 卡盒进行离心：3800 rcf；3 分钟
- 利用 Speed-Vac 在 45 °C 下将 MTP 板中的洗脱液完全蒸干
- 将 MTP 板置于位置 5 处
  - 移取 LC 上样试剂至 MTP 板中
  - 对 MTP 板进行超声或振摇 (2000 rpm)，使肽段完全重悬

## LC/MS/MS 分析

使用液质联用仪对样品进行测量，该仪器由 EASY-nLC 1000 超高压系统（赛默飞世尔科技公司）与纳米电喷雾离子源（赛默飞世尔科技公司）和 Q Exactive HF Orbitrap（赛默飞世尔科技公司）组成。在 40 cm HPLC 色谱柱（内径 75  $\mu\text{m}$ ；用 ReproSil-Pur C18-AQ 1.9  $\mu\text{m}$  树脂自行装柱；Maisch 博士）上分离经纯化的肽段。用 10%–50% 缓冲液 B（0.1% 甲酸和 60% 乙腈，v:v）的 15 分钟线性梯度洗脱肽段，然后用 98% 清洗溶液在 450 nL/min 的流速下清洗 5 分钟。柱温保持在 60 °C。

### 数据分析

利用 MaxQuant 软件 1.5.2.10 版对 MS 原始文件进行分析<sup>5</sup>，并利用 Andromeda 搜索引擎<sup>6</sup> 在人类 Uniprot FASTA 数据库（2014 年 6 月版）和常见污染物数据库中搜索作为固定修饰的半胱氨酸氨甲基化以及作为可变修饰的 N 端乙酰化和甲硫氨酸氧化。

表 3. 台板上样品和试剂

iST 样品前处理 — 蛋白质变性、还原、烷基化和酶解	
台板位置和试剂	实验室器皿
1 - 清洗溶液 1	twin.tec PCR 板 96 LoBind (Eppendorf 部件号 0030129504)
2 - 新枪头	384ST 70 $\mu\text{L}$ 无菌枪头 (部件号 19133-112)
3 - 加热振荡器	Teleshake 加热振荡台板 (G5498B#009)
4 - 废液	
5 - iST 卡盒	转接板 (PreOmics; P.O.00027)
6 - 加热	帕尔贴温控台板 (G5498B#035)
7 - 清洗溶液 2	twin.tec PCR 板 96 LoBind (Eppendorf 部件号 0030129504)
8 - 洗脱液	twin.tec PCR 板 96 LoBind (Eppendorf 部件号 0030129504)
9 - LC 上样试剂	twin.tec PCR 板 96 LoBind (Eppendorf 部件号 0030129504)

对于最小长度为 7 个氨基酸的蛋白质和肽段，将假阳性率设置为 0.01，并通过搜索反向数据库来确定。使用胰蛋白酶作为蛋白酶，将酶特异性设置为精氨酸和赖氨酸的 C 端，并在数据库搜索中最多允许两个未裂解位点。执行肽段鉴定，允许的初始母离子质量数最大偏差为 7 ppm，允许的碎片离子质量数偏差为 20 ppm。在最小比率计数为 1 的条件下，执行免标记定量分析 (LFQ)<sup>7</sup>。

## 结果与讨论

本应用简报介绍了一种易于应用的血浆蛋白质组学工作流程，该工作流程得益于 PreOmics 开发的 iST 样品前处理方法与 Bravo 系统提供的高通量自动化的完美结合。使用该方法，潜在的用户可以快速、稳定、高重现性地分析大量血浆蛋白质组学样品。

基于最近报道的 in-StageTip (iST) 方法<sup>3</sup> (德国 PreOmics GmbH)，我们利用 Bravo 系统建立了一种并行自动化方案。从 1  $\mu$ L 血浆开始，所有样品前处理步骤均在单个反应样品瓶 (iST 卡盒) 中进行。按照 iST 试剂盒说明，在 1 小时后就

已发生了充分的蛋白质酶解。用有机和水溶液清洗步骤对肽段进行纯化，除去脂质和盐等污染物。整个前期程序只需不到两个小时，并且可以在 Bravo 液体处理平台上以 96 孔形式轻松完成，得到的纯化肽段可直接进行质谱分析。

为评估该自动化方案，处理并分析了 96 个血浆样品 (对应于来自女性和男性受试者的样品各 48 个)。我们使用 MaxQuant 对 LC/MS/MS 数据进行免标记定量分析<sup>7</sup>。对于每名受试者的样品，计算了整个工作流程重复测定的 Pearson 相关系数，结果表明定量分析的蛋白质信号的平均相关值为 0.98 (图 3)。

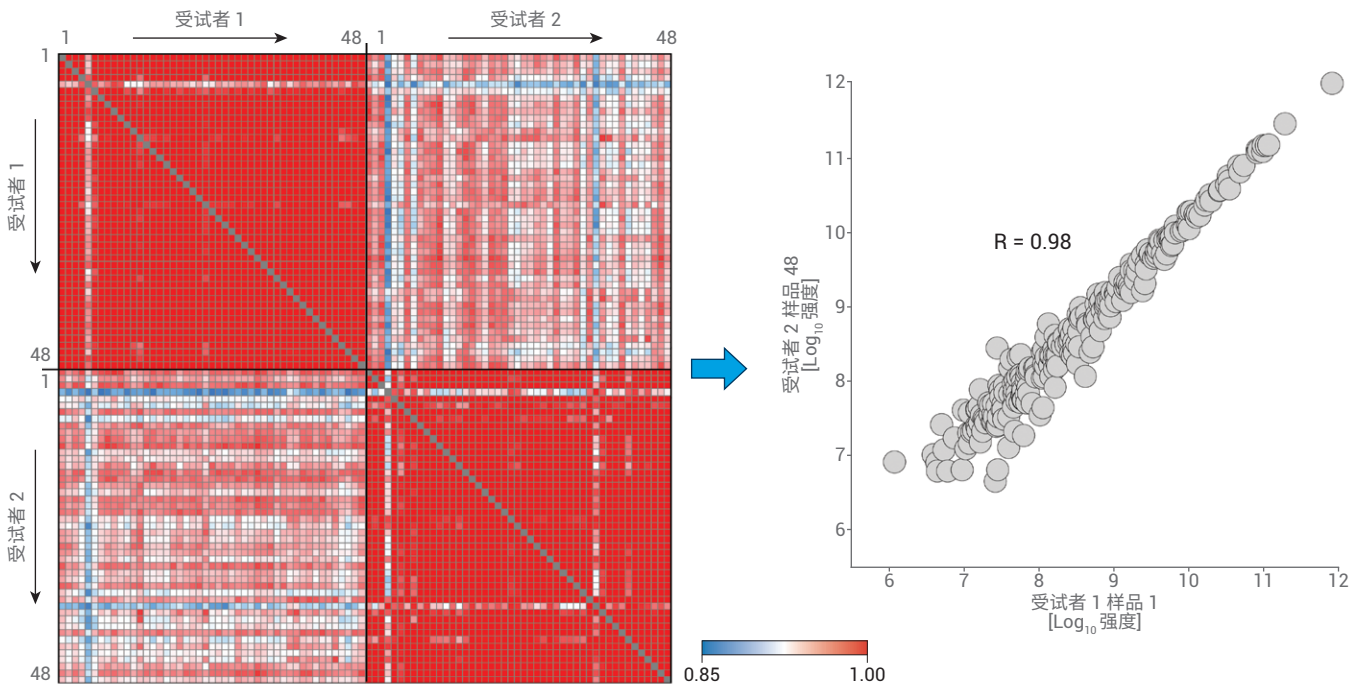


图 3. 在 96 次技术工作流程重复测定的双重比较中得到的颜色标记 Pearson 相关系数。Pearson 相关系数高达 0.98，表明具有良好的重现性



为强调该技术重复测定的优异的重现性，我们将其中一个样品三次重复测定所生成的总离子色谱图 (TIC) 叠加到一起 (图 4)。重要的是，在完成涉及溶液内酶解和肽段纯化的完整血浆蛋白质组学样品前处理工作流程后，仍达到了这一优异的重现性水平。

血浆蛋白质组中蛋白质的丰度范围涵盖近六个数量级 (图 5)，平均每次运行包含 300 种定量的蛋白质。这 300 种蛋白质代表了各种典型功能的花浆蛋白质。其中包括来自脂质代谢平衡系统的蛋白质 (如载脂蛋白 A1 和 B)、参与炎症反应的蛋白质 (如补体因子 C5) 和转运蛋白 (如视黄醇结合蛋白或胰岛素敏感性参数脂联素 (ADIPOQ))。

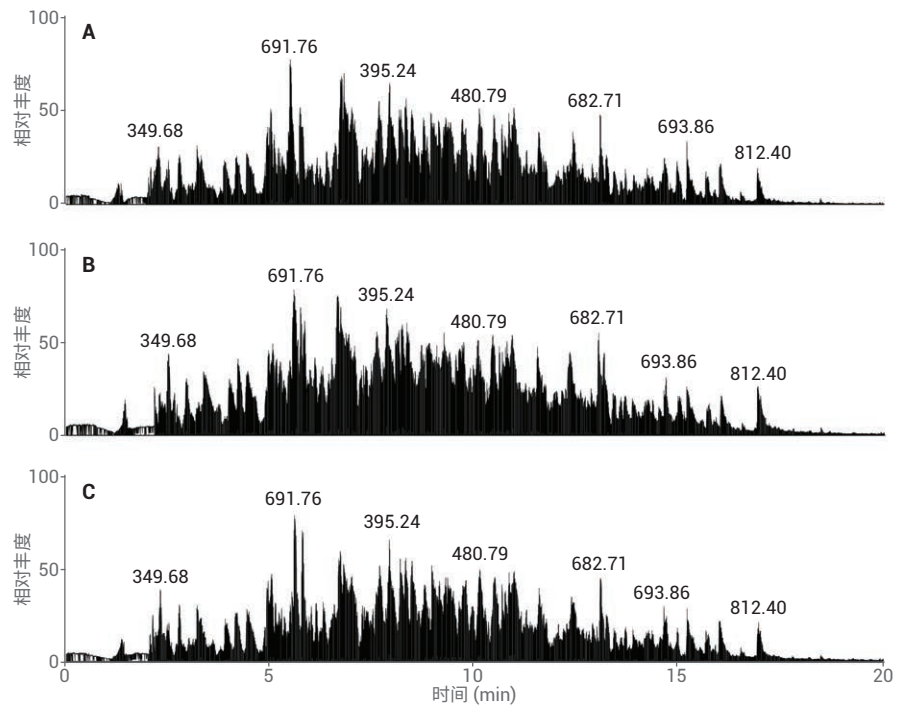


图 4. 直接比较单个样品的三次不同技术重复得到的三幅总离子流色谱图 (TIC)。峰上方的数字表示  $m/z$

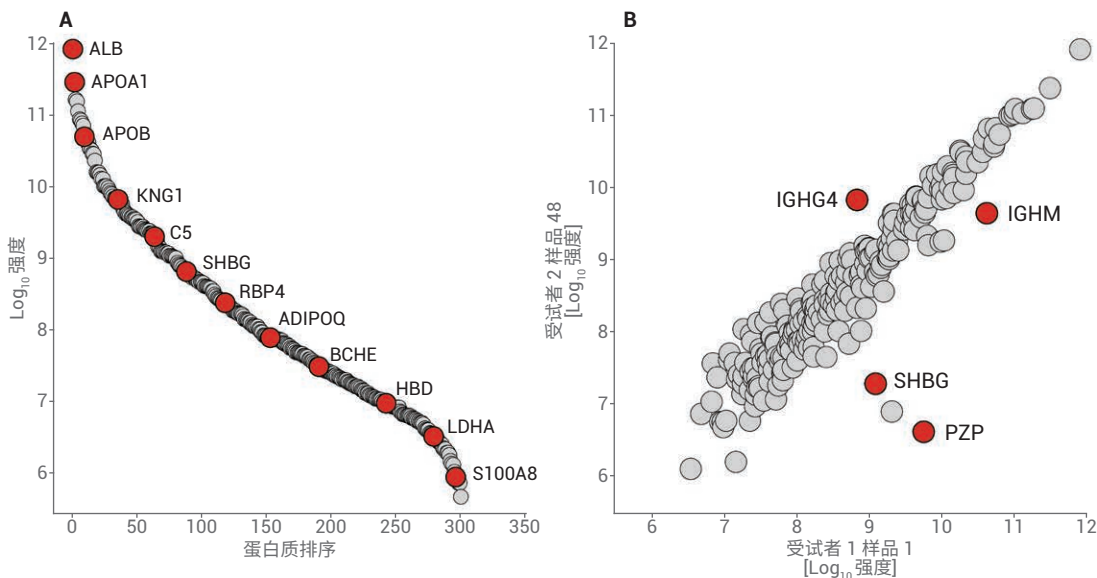


图 5. A) 在 96 次工作流程重复测定的 20 分钟梯度中定量分析得到的蛋白质的分布。B) 直接比较两种血浆样品，在其他定量血浆蛋白质的背景下显示了 IGHG4、IGHM、SHBG 和 PZP 的量级

这一免标记工作流程非常适合用于捕捉个体之间蛋白质水平的自然及病理变化<sup>2</sup>。例如，对两种样品（一名女性和一名男性）之间蛋白质定量水平的直接比较显示，在女性样品的血浆蛋白质组中，妊娠带蛋白 (PZP) 和性激素结合球蛋白 (SHBG) 具有更高的绝对丰度 (图 5)。SHBG 的主要功能是结合雌激素，而 PZP 的主要功能是捕集蛋白酶。免疫球蛋白是由 B 淋巴细胞产生的膜结合或分泌性糖蛋白。免疫球蛋白 IGHG4 和 IGHM 在两种样品之间具有不同的丰度，表明蛋白质表达水平的个体间差异很大。

## 结论

PreOmics iST 试剂盒可完美应用于 Bravo 系统，且无需对方案进行调整。这种方法组合为用户提供了一种稳定、灵敏、快速的血浆蛋白质鉴定技术，最终在仅需两个小时的总样品处理时间内即可得到 LC/MS/MS 级肽段。由于 Bravo 液体处理平台提供的自动化功能，由整个工作流程重复测定所获得的结果也具有高重现性。该工作流程的重现性足以解析两种血浆样品之间的显著差异。我们的结论是，该重现性水平足以发现血浆蛋白质组中全新的生物学相关变化，在纵向研究中

尤其如此，如 Geyer 等人的另一项研究 (2017)<sup>1</sup> 所述。本应用简报通过对来自一名女性和一名男性受试者的 48 份 1  $\mu$ L 重复血浆样品进行样品前处理（总共处理了 96 个样品），证明了这些特性。

平均而言，每次运行可覆盖血浆蛋白质组内的 300 种蛋白质，包括了典型功能的花浆蛋白质组，可用于根据生物学相关参数对样品进行分层。通过将两种技术结合到一个工作流程中，充分利用了高通量和稳定性的组合优势，可用于对数百甚至数千个血浆样品进行前处理。相信这种协同效应将是大规模临床研究应用所不可或缺的。

## 参考文献

1. Geyer, P. E.; *et al.* Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Molecular Systems Biology* **2017**, *13*(9), 942
2. Geyer, P. E.; *et al.* Plasma Proteome Profiling to Assess Human Health and Disease. *Cell Systems* **2016**, *2*(3), 185–195. <http://doi.org/10.1016/j.cels.2016.02.015>
3. Kulak, N. A.; *et al.* Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nature Methods* **2014**. <http://doi.org/10.1038/nmeth.2834>
4. Anderson, L. Six decades searching for meaning in the proteome. *Journal of Proteomics* **2014**, *107*, 24–30. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.005>
5. Cox, J.; Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology* **2008**, *26*(12), 1367–1372. <http://doi.org/10.1038/nbt.1511>
6. Cox, J.; *et al.* Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*(4), 1794–1805. <http://doi.org/10.1021/pr101065j>
7. Cox, J.; *et al.* Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Molecular & Cellular Proteomics* **2014**, *13*(9), 2513–26

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2018  
2018年11月21日，中国出版  
5994-0306ZHCN