

## Orbitrap Exploris平台FAIMS-DIA蛋白质组学快速定量分析

杨湘云

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

## 关键词

Orbitrap Exploris 480, FAIMS Pro, DIA, 定量蛋白质组学

## 前言

数据非依赖性采集（Data-Independent Acquisition, DIA）是当前蛋白质组学中应用范围较广的定量方式。DIA扫描模式中，超高分辨质谱将一级质谱的质荷比范围分为若干窗口，快速地对特定质量范围内所有母离子进行碎裂并采集碎片离子。相比于传统的DDA方法，DIA定量有更好的重现性及准确性，DIA也更加适用于大队列定量蛋白质组学研究<sup>[1]</sup>。

作为应用于大队列的定量蛋白质组学研究策略，拥有一个更高效更稳定的解析平台尤为重要。Orbitrap Exploris系列质谱是赛默飞世尔科技公司从2019年推出的全新静电场轨道阱超高分辨质谱仪平台，采用全新的设计，让仪器具有更佳的性能和更高的稳定性，并且能够兼容FAIMS Pro接口，进一步提高检测灵敏度和抗污染能力。本文使用Orbitrap Exploris 480质谱，对Hela细胞蛋白质组和血浆蛋白质组进行DIA及FAIMS-DIA定量分析，考察Orbitrap Exploris 480的DIA定量能力。

## 实验方法

## 1. 实验材料和方法

Hela细胞、Top 14去高丰度血浆样品，分别抽提蛋白质、还原烷基

化后用FASP方法进行Trypsin酶切，以不同梯度的DIA模式平行采集三针技术重复。

## 2. 色谱方法

高效液相色谱：Ultimate 3000 RSLCnano；

色谱柱：Acclaim™ PepMap™ Column (C18, 2 μm, 100 Å, 75 μm x 25 cm)；

流动相：A: 0.1% Formic acid in water； B: 0.1% Formic acid in 80% Acetonitrile；

有效色谱梯度时长：5min、15min、30min和50min。

表1. 液相梯度示例（50min有效梯度）

Time [mm:ss]	Duration [mm:ss]	Flow [nl/min]	Mixture [B%]
00:00	00:00	300	1
01:00	01:00	300	6
45:00	44:00	300	27
50:00	08:00	300	36
57:00	04:00	300	100
60:00	03:00	300	100

### 3. 质谱分析

#### DIA模式

质谱仪: Thermo Scientific Orbitrap Exploris 480;

喷雾电压: 2.1kV;

毛细管温度: 320 °C;

RF lens: 50% ;

分辨率: 一级60,000@m/z 200, 二级30,000@m/z 200;

Max IT: Full MS 20ms, MS/MS 54ms;

AGC: Full MS 300%, MS/MS 2000%;

母离子扫描范围m/z 350-1200, 子离子扫描范围 m/z 200-2000;

HCD collision energy: 32;

窗口数目: 20 (5min)、30 (15min)、40 (30min)、60 (50min);

Loop control: All。

#### FAIMS-DIA模式

质谱仪: Thermo Scientific Orbitrap Exploris 480; FAIMS CV=-45V;

其他质谱参数与DIA采集模式相同。

### 4. 数据处理

DIA数据采用Spectronaut™ 15软件进行Library-based分析: 1). 建立谱图库: Proteome Discoverer数据检索生成的pd.result文件导入 Spectronaut 建立谱图库, 每个肽段最少含有 3 个碎片离子, 最多含有 6 个碎片离子 (其中细胞谱图库中包含 11221 个蛋白, 血浆谱图库中包含 5117 个蛋白); 2). DIA数据峰抽提: 导入DIA数据, 设定谱图库, 控制  $q < 0.01$ ; 基于MS2峰面积进行定量。

FAIMS-DIA 数据采用 Spectronaut™ 15软件进行Library-free DIA分析: 导入DIA 数据进行峰抽提, 控制 PSM、肽段及蛋白的 $q < 0.01$ , 抽提的碎片离子最小长度 $\geq 3$ , 每个肽段最少含有 3 个碎片离子, 最多含有 6 个碎片离子; 基于MS2峰面积进行定量。

### 实验结果和讨论

#### 1. DIA 定量分析

首先, 经过优化 DIA 采集参数, 结合 Spectronaut的library-based检索方式, 如图1所示, 三次DIA实验具有较好的重现性, 50min的有效梯度内分别可以从500ng HeLa 和去高丰度血浆酶解样品中检测到接近 6000 个和 760 个血浆蛋白。同时, Orbitrap Exploris 480超高分辨质谱凭借其优越的分析性能, 在血浆样品结果展示中丰度最低和丰度最高的蛋白相差 5 个数量级, 显示了 Orbitrap 具有较宽的动态范围 (图1E)。

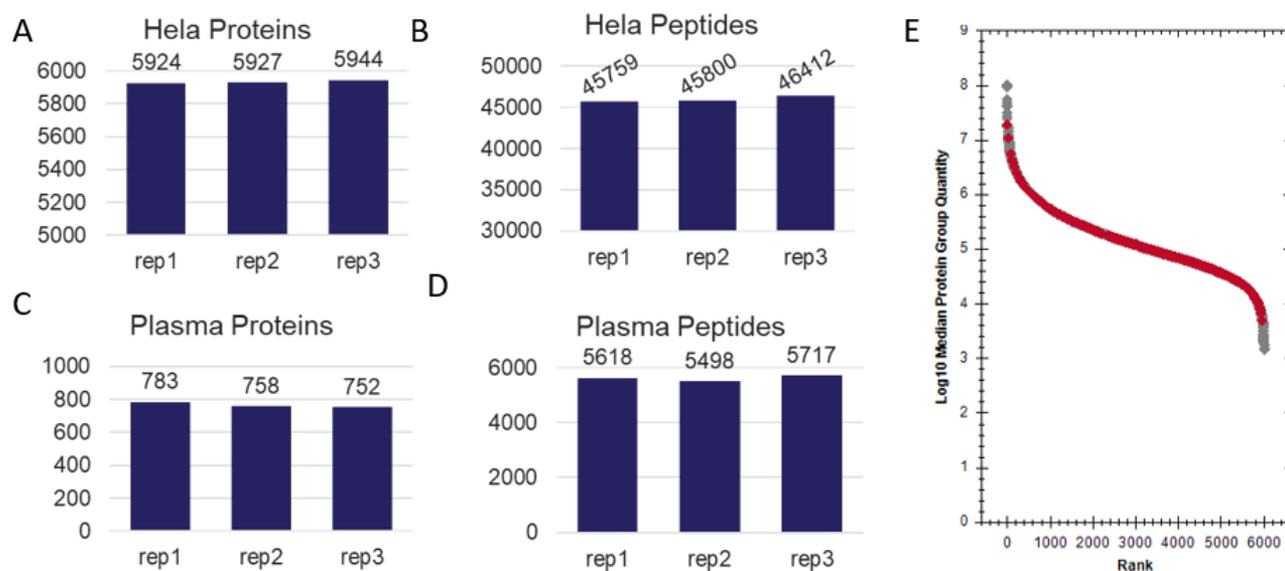


图1. 采用Library-based DIA分析方式, HeLa细胞及血浆的蛋白 (A, C) 和肽段鉴定数目 (B, D); 血浆中定量蛋白的动态范围 (E)

## 2. FAIMS-DIA 高效定量分析

接下来，我们在 Orbitrap Exploris 480 上对FAIMS-DIA 参数进行了优化，包括分析时长、FAIMS CV 电压值、DIA窗口数目等，结果显示60min总梯度（50min有效梯度）内，单个FAIMS CV电压的结果更佳。如图2，上样500ng Hela 肽段，采用DIA和FAIMS-DIA方法结合Library-free 数据分析方式，可分别在50分钟有效梯度内定量超过5500个和6100个蛋白。

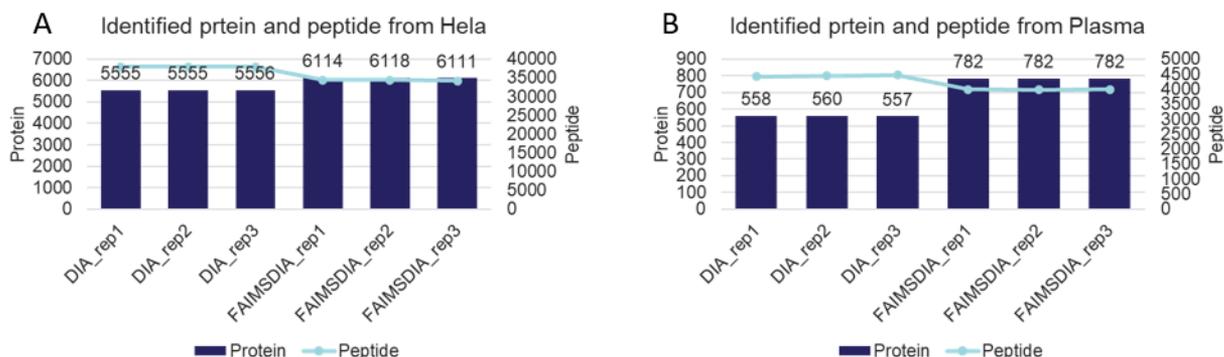


图2. 采用Library-free DIA分析方式，Hela细胞及血浆样品的DIA和FAIMS-DIA方法蛋白鉴定量分别为图A（Hela细胞）和图B（血浆）

在精准医学和大队列组学背景下，研究人员往往需要对大量样本实现快速高效检测<sup>[2]</sup>，在这里我们以Orbitrap Exploris 480配合5min (80 SPD)、15min (52 SPD)和30min (34 SPD) 短梯度进行高通量蛋白组学分析，结果如表2所示。从中可知，上样500ng Hela细胞肽段，配合15分钟短梯度及单电压FAIMS-DIA方法和Library-free检索方式，可定量超过4650个Hela蛋白和550个血浆蛋白，实现快速蛋白组学分析。其中，CV小于20%的蛋白占97.5%，CV小于20%的肽段占96.3%，medium CV 分别为3.4%（蛋白）和4.9%（肽段）。

表2. 采用Library-free DIA分析方式，Hela细胞及血浆样品在不同梯度中的蛋白和肽段鉴定数目，以及对应的CV值

	Effective gradient	Protein ID	Protein < 20% CV	Protein medium CV(%)	Peptide ID	Peptide < 20% CV	Peptide medium CV(%)
Hela	5min	2638	97.2	3.3	8563	96.5	4.3
	15min	4650	97.5	3.4	20076	96.3	4.9
	30min	5650	97.3	3.5	28061	94.6	5.3
	50min	6114	94.2	4.3	34344	88.8	6.7
Plasma	5min	310	96.5	3.5	1804	94.6	5
	15min	552	97.5	4.4	2820	92.9	5.6
	30min	633	94.6	4.7	3518	90.3	6.1
	50min	783	91.7	4.9	4001	84.0	6.6

## 结论

相较于传统的 DDA 定量方式，DIA方法具有重现性好、定量准确性高、受干扰小等优点，也越来越广泛地被运用于大队列分析。而DIA分析通常采取 1D LC-MS/MS 的分析方法，想获得深度的定量分析结果是非常有挑战的。因此，一个稳定、高效的DIA解决方案对于大队列及临床研究是必不可少的。

本文基于最新的 Orbitrap Exploris 480质谱平台，以 Hela细胞肽段和去高丰度血浆样品为模型考察 DIA及FAIMS-DIA的定量蛋白的能力。使用 50min 的有效梯度及Spectronaut软件无谱图库检索方法，FAIMS-DIA 方法就能定量到6100个蛋白、35000条肽段，并且仪器稳定性高，动态范围宽，显示了Orbitrap 质谱出色的DIA定量能力。并且通过短梯度高通量的测试，15分钟短梯度即可定量超过4650个Hela蛋白，满足大规模临床样本等研究的高强度检测需求。

## 参考文献

1. Bruderer, R., et al, Extending the limits of quantitative proteome profiling with data-independent acquisition and application to acetaminophen-treated three-dimensional liver microtissues. *Mol Cell Proteomics* 2015, 14, (5), 1400-10.
2. Dorte B. Bekker-Jensen, et al., A Compact Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer with FAIMS Interface Improves Proteome Coverage in Short LC Gradients. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2020, 19, 716–729.



赛默飞  
官方微信

热线 800 810 5118  
电话 400 650 5118  
[www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)

**Thermo Fisher**  
SCIENTIFIC