

**Mass spectrometry-based
proteomics**
基于质谱的蛋白质组学

小组成员及分工

侯姝宇：文献翻译，ppt制作

刘贵莹：文献翻译，ppt制作

万靖：文献翻译，ppt展示



内容

1

质谱法与蛋白质组学

2

识别读取肽链的方法

3

蛋白质的定性与定量分析

4

蛋白质组学的应用



1.1 蛋白质组学

蛋白质组学(Proteomics)是从整体水平上研究细胞内蛋白质的组成、活动规律及蛋白质与蛋白质的相互作用，是功能基因组学时代一门新的学科。

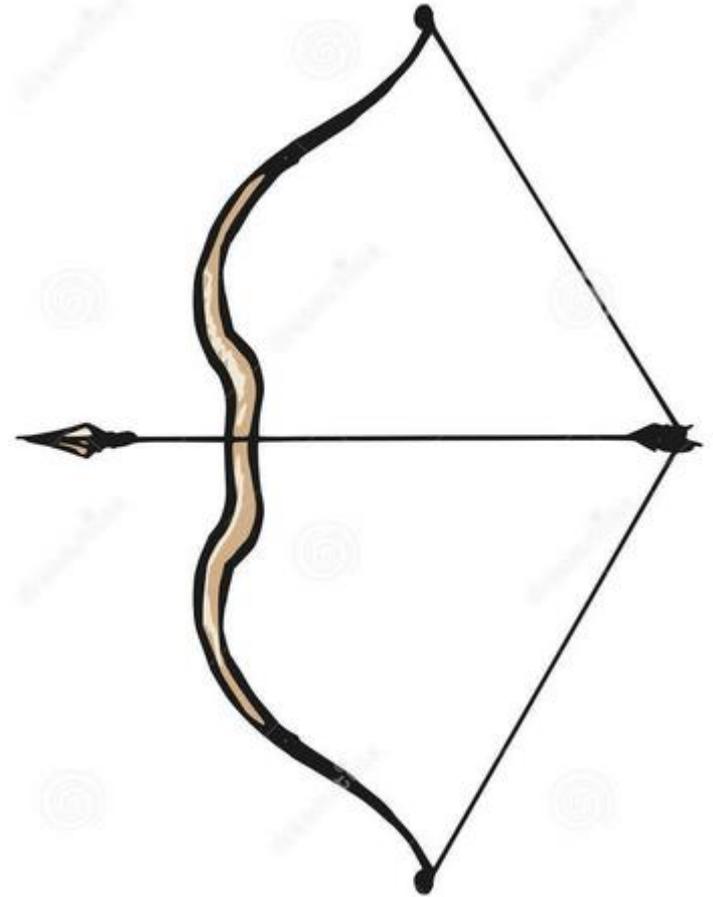
质谱法

用电场和磁场将运动的离子按它们的质荷比分离后进行检测的方法。测出离子准确质量即可确定离子化合物组成。



蛋白质组学与质谱有何联系？

蛋白质的化学结构即氨基酸序列的多变性决定了其不同的结构和性质，蛋白质的结构和动力学变化对其功能的影响也至关重要；而质谱技术为蛋白质组学研究提供了通量和分子信息，从而才能进一步研究蛋白质的结构、功能和相互作用。





1.2 质谱仪组成

离子源——质量分析器——收集器

关键参数

灵敏度，分辨率，质量准确度，从肽碎片的离子质谱中获得丰富信息的能力



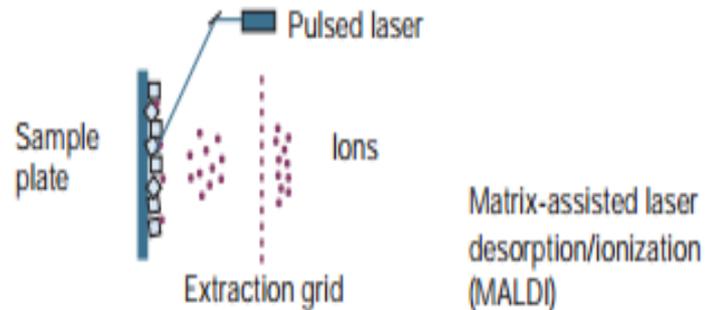
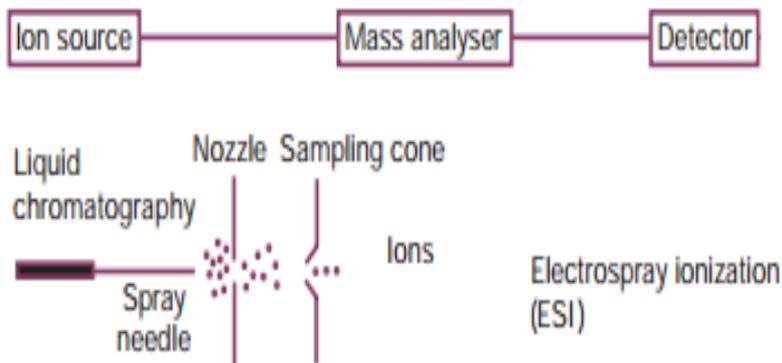
1.3 电离蛋白质和多肽的方法

1 ESI(电喷雾电离)

带电液滴蒸发，液滴变小，液滴表面相斥的静电荷密度增大。当液滴蒸发到一定程度，液滴表面的库仑力使液滴爆炸。产生的小液滴继续这个过程。随着液滴的水分子逐渐蒸发，就可获得自由徘徊的质子化和去质子化的蛋白质分子。

2 MALDI(基质辅助激光解析电离)

利用对使用的激光波长范围具有吸收并能提供质子的基质（一般用小分子或结晶化合物）将样品与其混合溶解并形成混合物，在真空下用激光照射该混合体，基体吸收能量并传递给样品，从而使样品解吸电离。



1.4 质谱分析的流程

步骤:

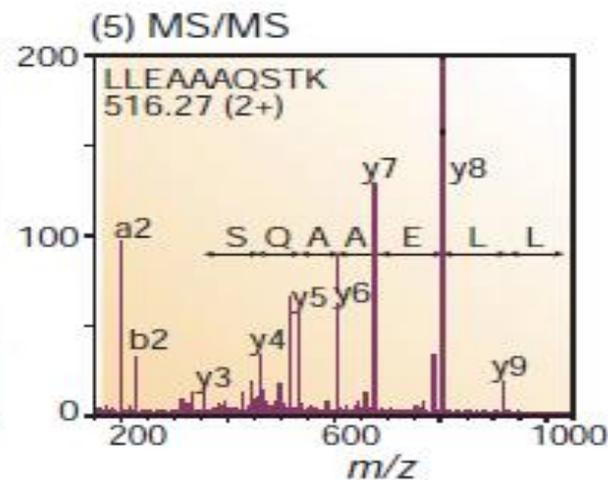
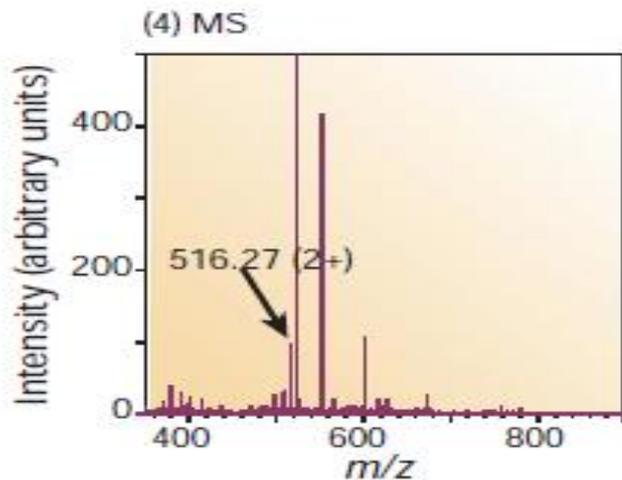
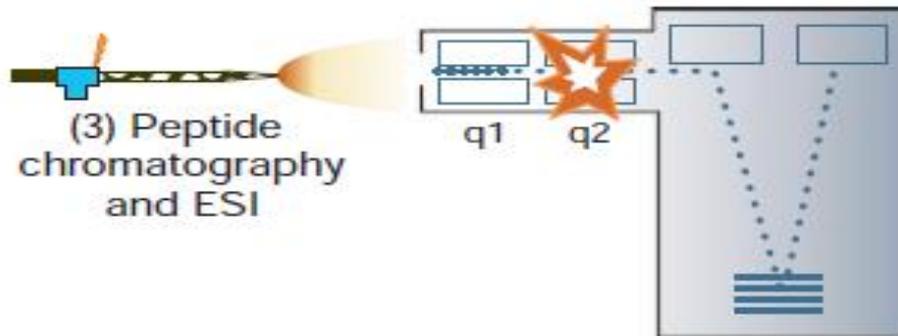
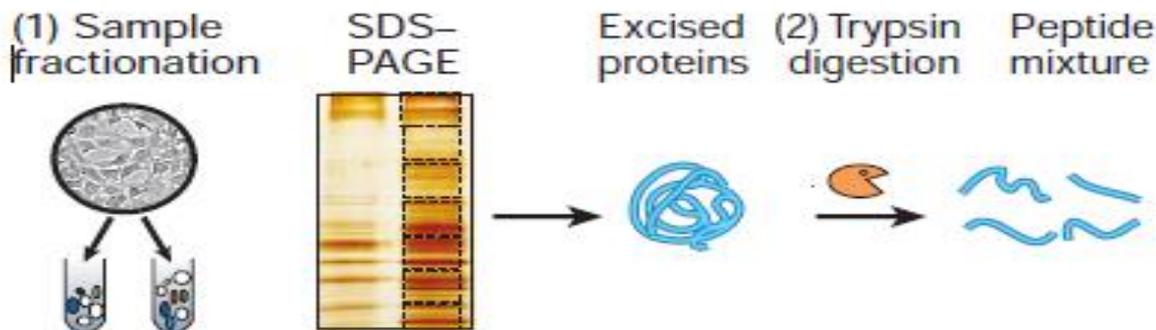
(1)、样品搜集——凝胶电泳分离

(2)、蛋白切割——胰蛋白酶消化处理——形成多肽片段

(3)、对多肽的色谱分析与液喷雾（高压液相色谱法）

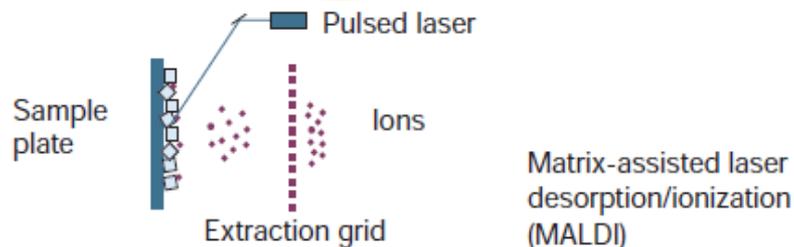
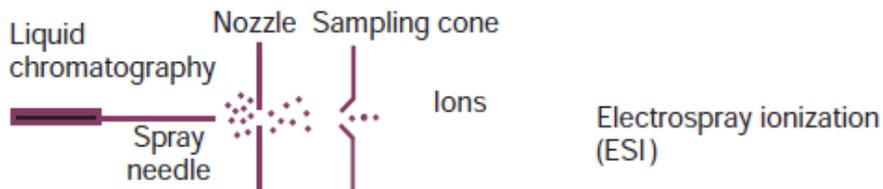
(4)、质谱分析，搜集信号

(5)、数据处理（通过将读取的数据信号与已知序列作对比）读出蛋白序列

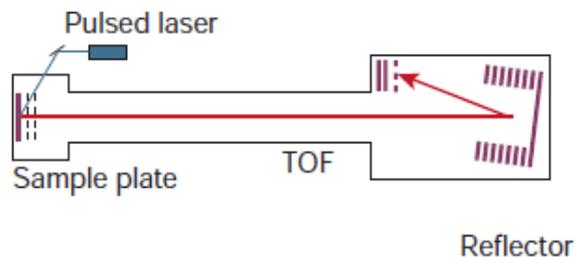


1.5 几种质谱仪的原理图

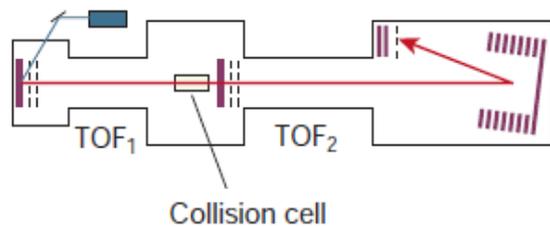
Ion source — Mass analyser — Detector



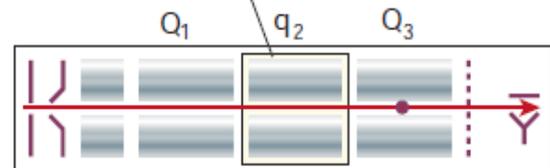
a Reflector time-of-flight (TOF)



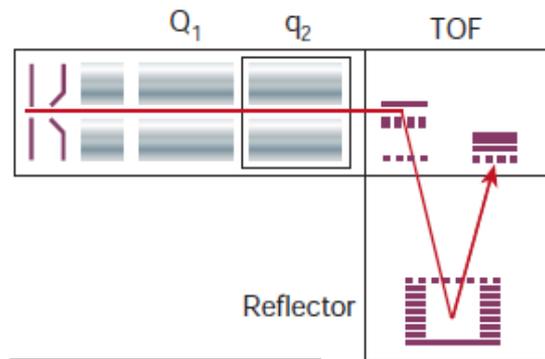
b Time-of-flight time-of-flight (TOF-TOF)



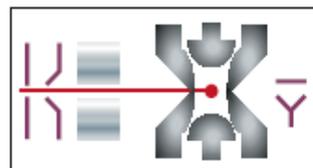
c Triple quadrupole or linear ion trap



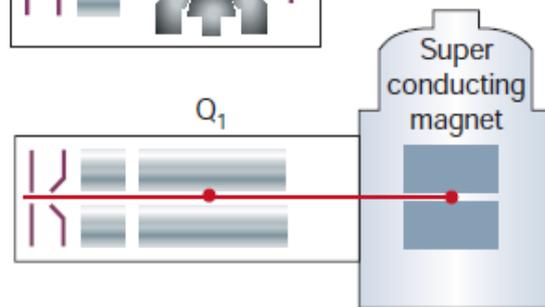
d Quadrupole time-of-flight



e Ion trap



f Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (FT-MS)





二、识别读取肽链的方法

使用肽的**CID**光谱（即碰撞诱导光谱）比靠肽质量图得到的结果要清晰。

除了肽的质量外，**CID**光谱的峰值也提供了关于序列的信息。

- **肽序列标签法**：从峰值中提取一小段明确的核苷序列结合质量信息作为肽序列标签，让它作为一个探针去确定肽的来源。
- **交叉方法**：在数据库中的肽序列用来形成理论的质谱，用测出来的质谱和理论的质谱的重叠确定最佳匹配。
- **“基于匹配的可能性”**：从数据库中肽序列计算出来的片段与观察到的峰值进行比较，计算出一个分数，根据分数去分析肽可能的来源。
- 然后通过与已知数据库比对，从而识别出肽链中氨基酸的类型



三、蛋白质的定性与定量分析

(1) 2DE(双向电泳)和MS的结合

- 具体过程：用双向电泳的方法将蛋白质进行染色，分离，每个被观察到的蛋白质点靠染色的强度来量化，再挑选切离一些点，然后做质谱分析（MS）。
- 双向电泳已经是一个超过25年的成熟的技术，支持大量基因产物的并发定量分析。
- 2-DE面临的挑战是高分辨率和重复性，高分辨率确保蛋白最大程度的分离，高重复性允许进行凝胶间配比。



(2) LC-MS/MS (液相二级质谱)

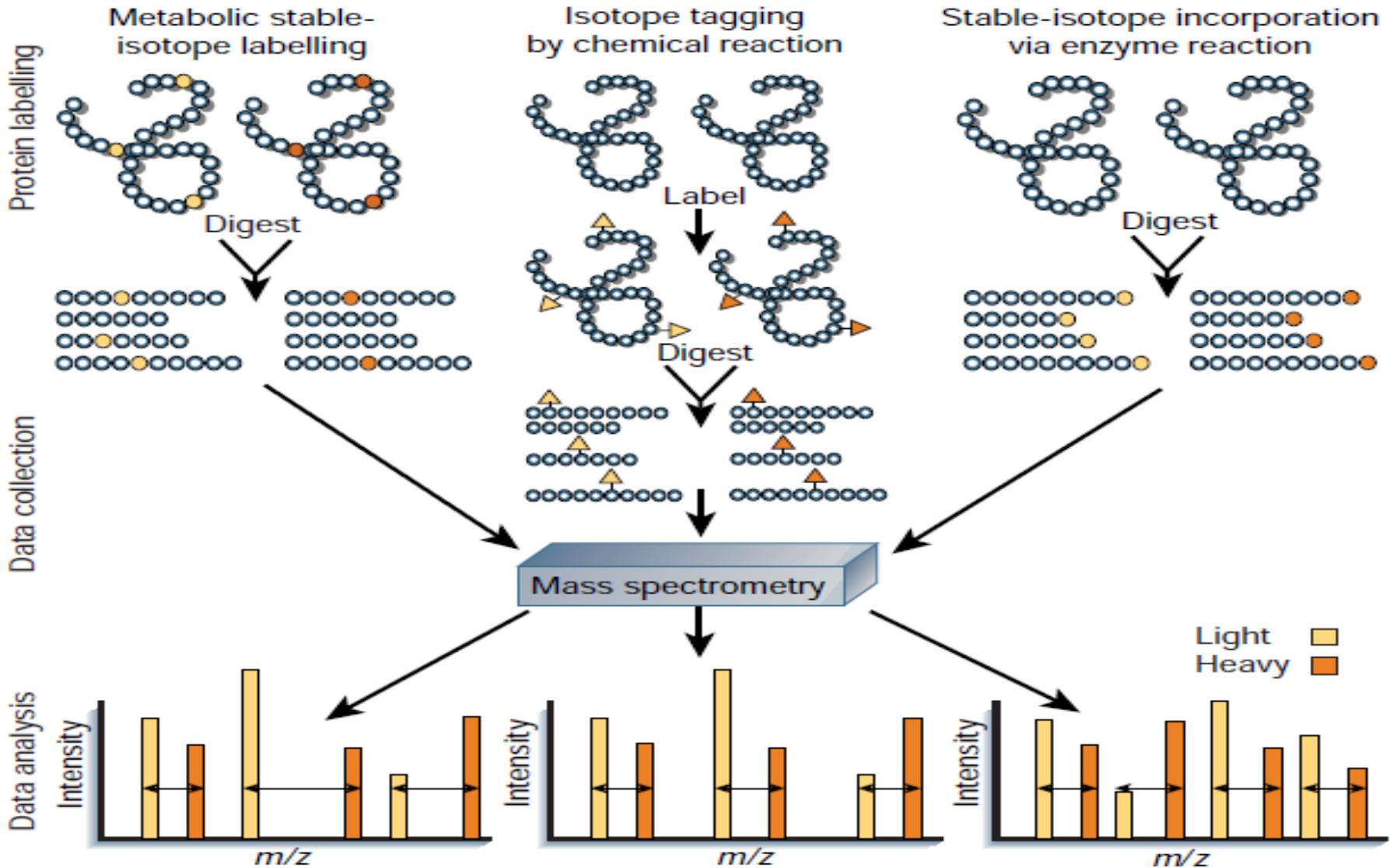
将色谱的分离能力与质谱的定性能力相结合，常用于蛋白分析，特别在药物分析中有着广泛应用。

存在三个技术问题：

- 1 一维的肽色谱分析法不能提供足够的峰容量来区分开肽混合物，比如全部的溶菌产物。（目前可以用二维或三维的层析分离，从而测出极低丰富度的蛋白质）
- 2 MALDI 和ESI-MS 中，分析物的数量和测出的信号强度的关系很复杂，还不能完全理解。（目前用同位素标记结合质谱仪的方法）
- 3 用这个方法收集到的数据量非常大，为了找到一张能正确识别蛋白质的图谱将会耗费大量的时间。

利用同位素标记的三种蛋白质组学定量分析方法

流程：蛋白标记—（消化酶切）—数据搜集—（质谱仪分析）—数据分析





四、应用

1. 蛋白质分析
2. 蛋白质相互作用
3. 分析蛋白质的修饰





4.1 应用于蛋白质分析

基于质谱的蛋白质组学在生物学问题上应用得较好的三个方面：

1. 建立蛋白质连锁图谱；
2. 使用蛋白质识别技术注释或矫正基因组序列；
3. 通过定量方法分析蛋白质表达谱作为细胞状态函数，从而推断细胞功能。



4.2 应用于蛋白质相互作用

基于质谱的蛋白互作实验分三个部分：

诱导物呈现，复合物的亲和纯化，结合蛋白分析

存在的问题：

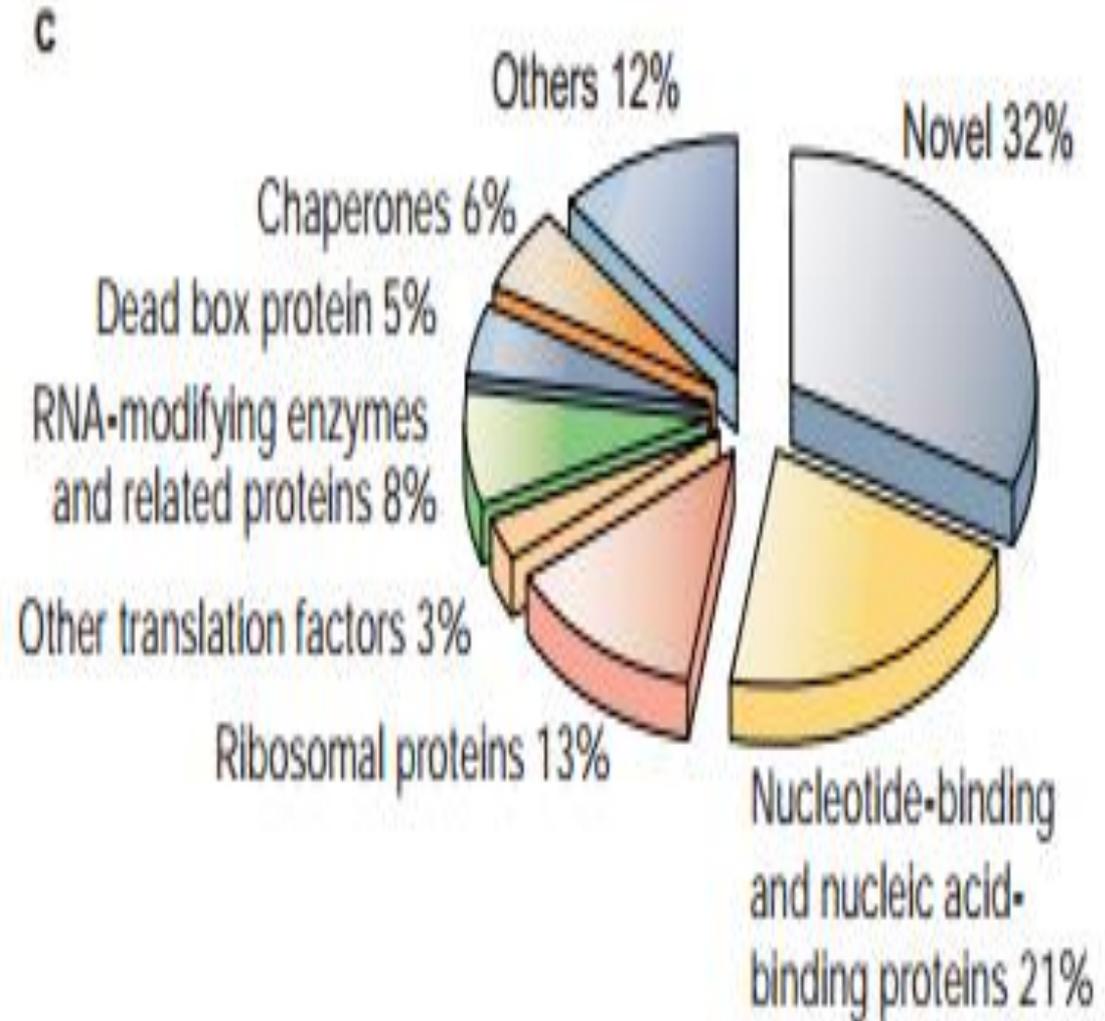
如果一个抗体或其他试剂能够使蛋白质与其结合的蛋白质特定分开，那么这个蛋白就可以作为诱导物，但是当前没有足够全面的抗体库，许多抗体没有很好的免疫沉淀反应或缺乏专一性。

解决方法：

将蛋白质上结合一个tag（标签），抗体和tag进行结合，使标记的蛋白质与其结合的蛋白质分开。

蛋白互作研究举例——核仁内的蛋白互作

人类核仁中存在**400**多种蛋白，目前很难将各个蛋白单独分离提纯，只能对其进行一个广泛的分类，因此要研究他们之间的相互关系和作用仍然是一个很大的挑战





4.3 应用于分析蛋白质修饰

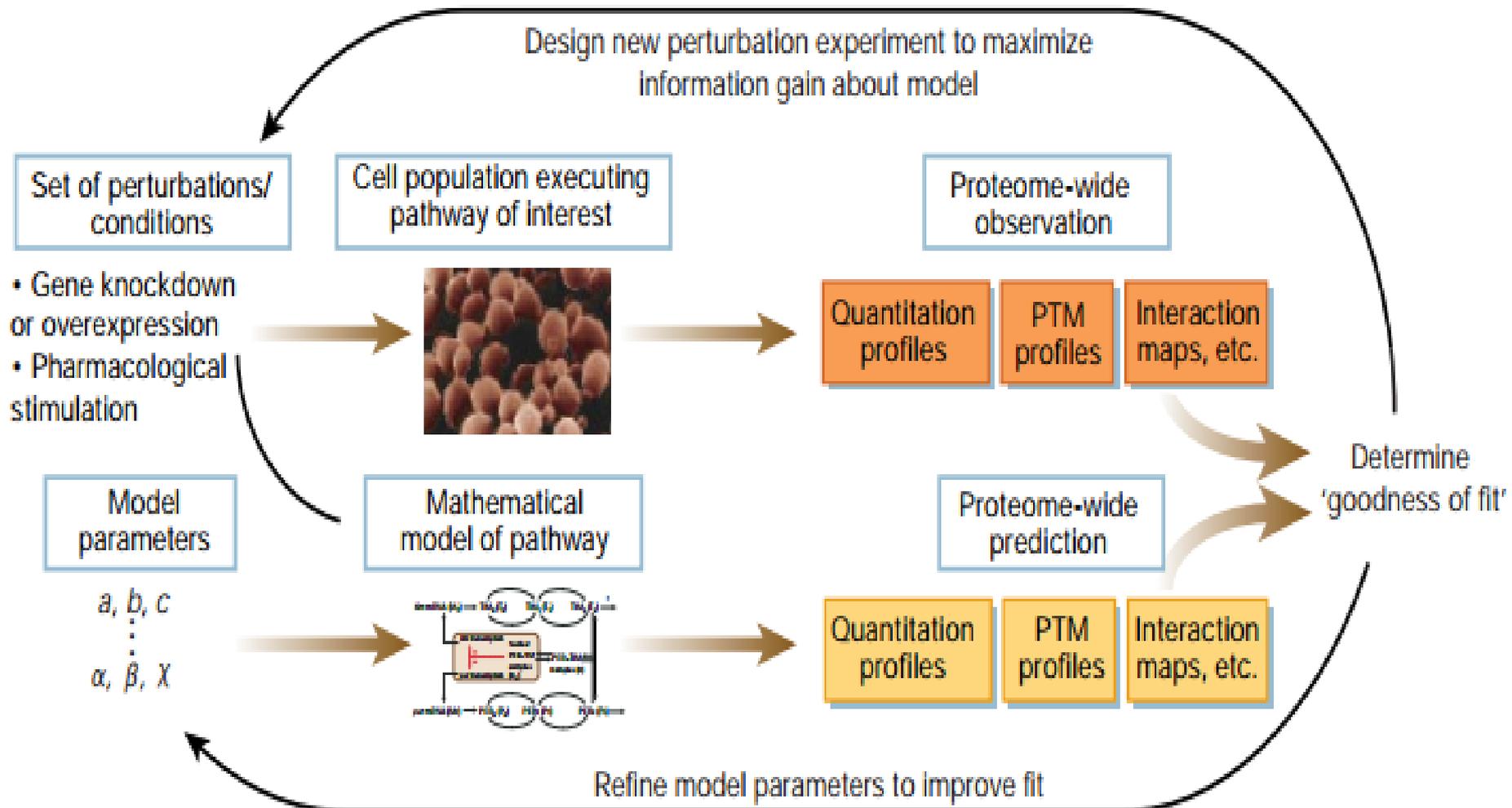
5种重要的蛋白质翻译后修饰（PTMs）：

磷酸化、糖基化、泛素化、乙酰化和甲基化

蛋白质翻译后加工和修饰过程存在着一系列复杂的相互关系，许多翻译后的修饰是可控和可逆的，尤其是蛋白质磷酸化，通过多种机制控制着生物功能。

通过质谱法确定单修饰类型和位点，用不同的肽谱图来“覆盖”尽可能多的蛋白质序列，通过检查比对分析的质量来确定具体的蛋白质修饰，然后通过手工或计算机辅助各个修饰之间的相互联系。

用系统生物学的方法研究蛋白质组学





面对蛋白质组学的挑战

——我们还需要解决以下问题

1. 建立更加完善全面数据库
2. 提高质谱对复杂蛋白互作的信息提取能力与分析能力
3. 提高实验技术上对复杂细胞器蛋白的分离提纯能力（如对核仁中的大量复杂蛋白的分离）
4. 从系统水平上研究蛋白质网络和相互关系以及与外界的联系，而不是孤立地研究某一个蛋白的性质与功能

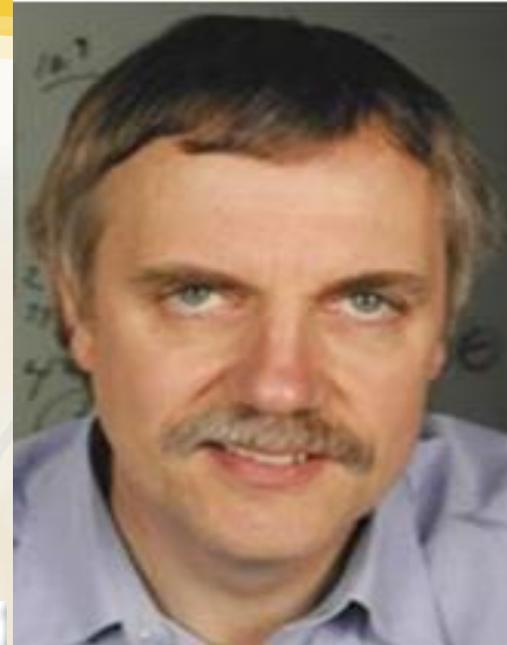


题外话——关于本文作者

蛋白质组学领域两大元老：

Ruedi Aebersold

与系统生物学传奇人物Leroy Hood共同创建世界上第一个系统生物研究所；发明同位素代码标记技术。



Mathias Mann

发明蛋白质体内标记技术





Thank You!