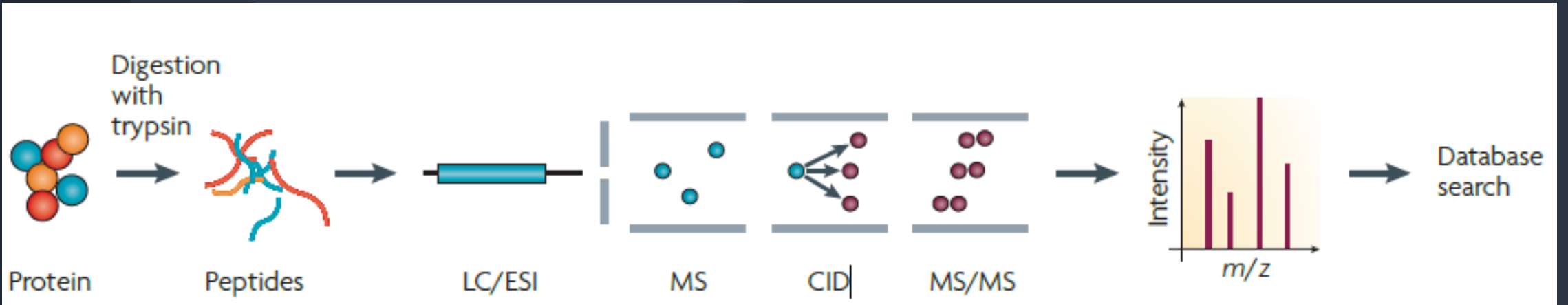


# 应用基于质谱分析的蛋白质组学于 遗传学、基因组学及网络生物学

## 小组成员：

程瀚	文献翻译，ppt制作
宁卫东	文献翻译，ppt制作
史泽伟	文献翻译，ppt讲解

# 1.通过质谱分析鸟枪法识别蛋白质



- 1、蛋白质样品被胰蛋白酶降解形成多肽混合物。
- 2、多肽混合物被反相液相色谱分级 ( LC ) 电喷雾电离 ( ESI ) 。
- 3、求离子的质荷比，肽离子的通过 MS 中未破碎的碰撞细胞来求；特定离子从 CID 中随机选择；碎片离子从第二次质谱 MS/MS 中找；MS 先导离子在 MS 第一阶段获得。
- 4、根据四种离子的质荷比在数据库中搜索。

## 2.Quantitative MS：定量质谱分析

质谱分析技术是实现大规模、高通量蛋白质定量的主要方法。尽管现阶段基于质谱的蛋白质定量主要局限于相对定量研究，但是由于质谱仪器精度和灵敏度的不断提高，基于质谱的蛋白质组定量越来越受青睐。

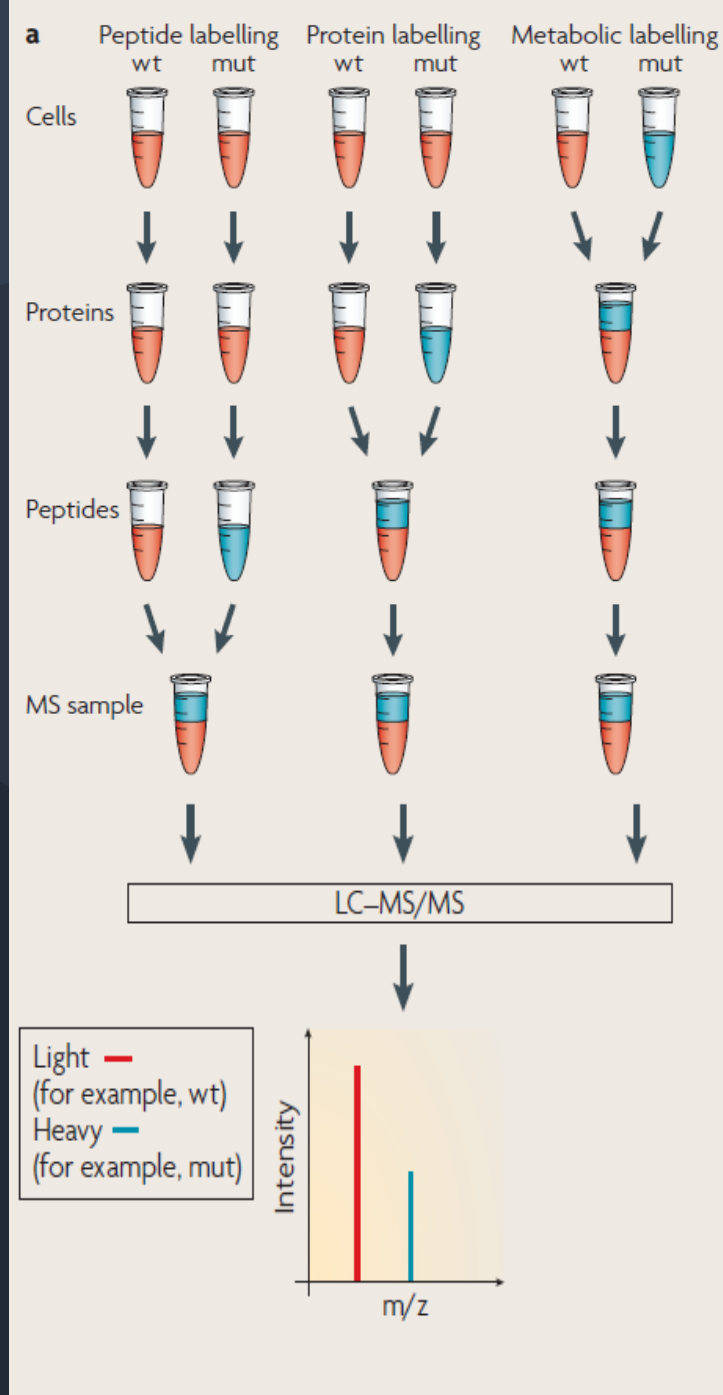
从实验设计上来看，基于质谱的定量分析包括稳定同位素标记(stableisotopiclabeling)和无标记(label-free)两种方法。

## 2.1 Differential isotope labelling : 同位素标记质谱分析

此方法通过使用不同的同位素标记识别，最后分析得到的相对和绝对蛋白丰度也具有比较高的准确率。

其中主要依靠的原理有稳定同位素稀释理论。

稳定同位素标记法通过代谢、化学标记等方法在肽段上引入质量标签，在同一次实验中分析不同标记的混合样本，同时得到不同样本中肽段/蛋白质的响应信号，标记方法定量的精度较高，但是其实验复杂、昂贵，动态范围和覆盖率受到标记方法的限制。



Mann等提出了在细胞培养过程中用稳定同位素标记氨基酸来标定蛋白质，他们称其为SILAC法

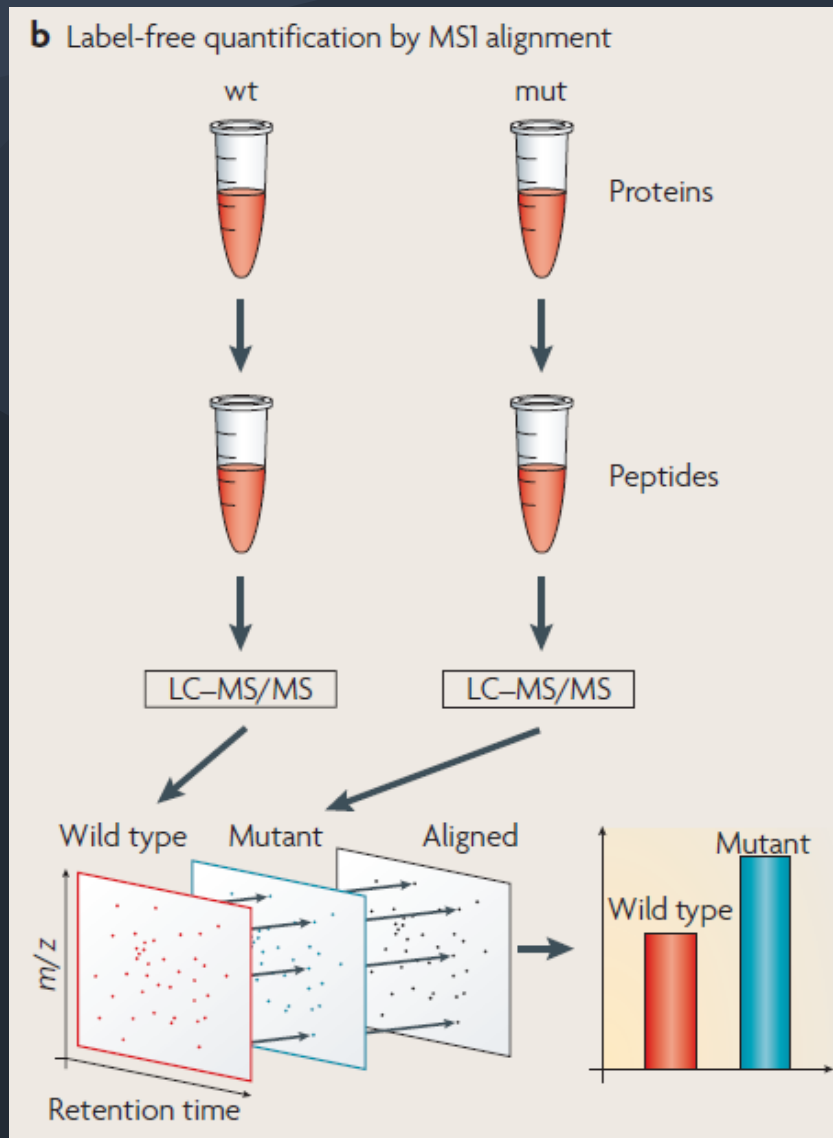
( stableisotopelabelingaminoacidsincellculture )。这一策略是将天然同位素或稳定同位素标记的必需氨基酸添加到细胞培养基中以支持细胞的生长，经过一定数量的细胞倍增后，稳定同位素标记的氨基酸会代谢到细胞新合成的蛋白质里，不同标记的细胞裂解蛋白以细胞个数或蛋白量等比例混合，通过分离、纯化后利用质谱鉴定和定量。这一定量蛋白组学策略是一种直接的标记过程，省略了除去过量标记试剂的提纯步骤，而且标记效率能接近100%。

## 2.2 Label-free quantification from aligned MS1 spectra 无标记定量质谱分析

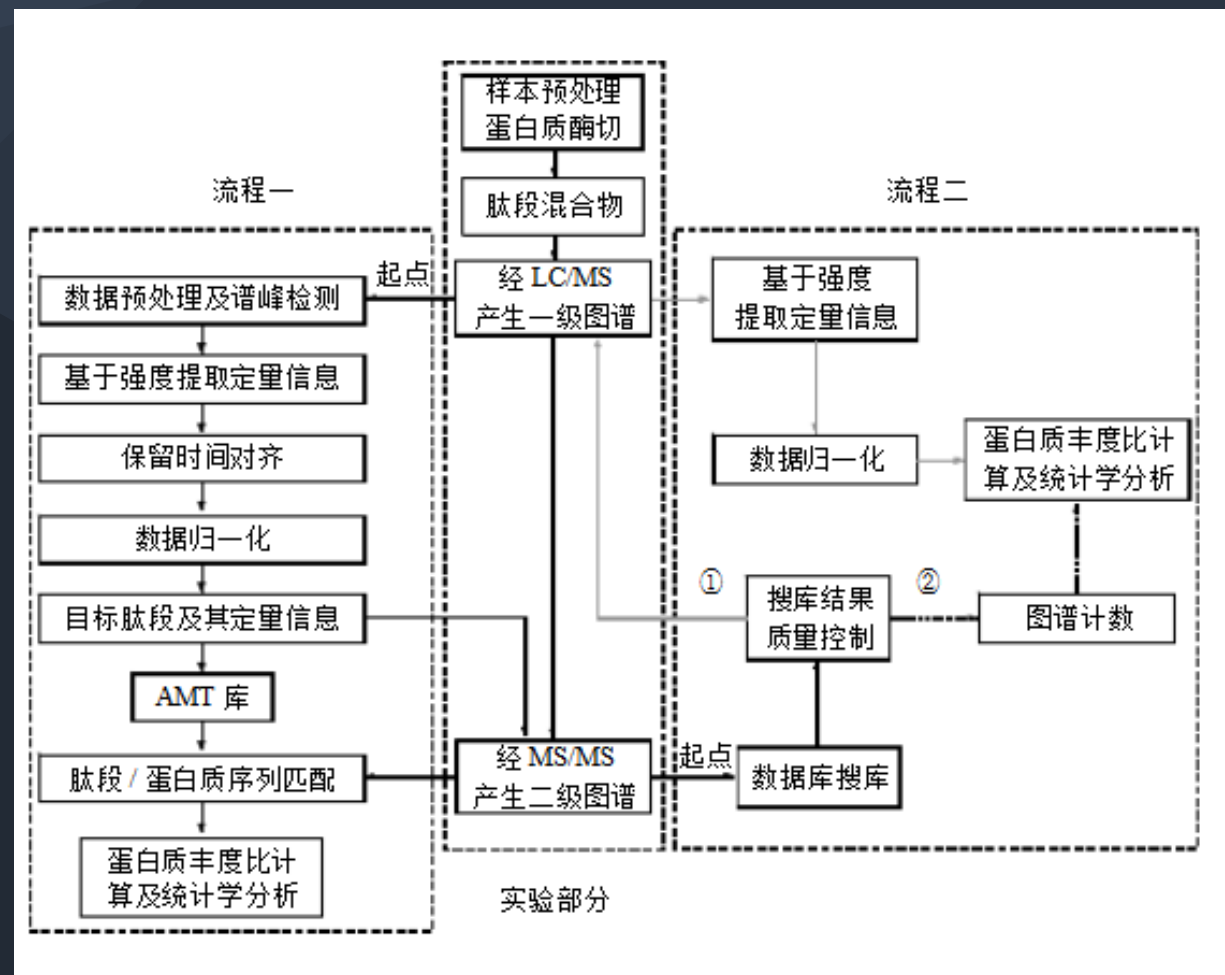
无标记定量主要有LC-MS和LC-MS/MS两种实验策略，其主要差别在于是否利用串联质谱分析来鉴定肽段和蛋白质。

这种质谱分析方法具有更大的动态范围，而且他的层次水平也更高；

主要方法是提取出离子的信号强度的基础上从而排列出肽特征色谱图，然后与MS1光谱进行对照计算相对蛋白丰度



无标记定量主要有LC-MS和LC-MS/MS两种实验策略在数据分析流程上有很大不同，将无标记定量方法分成无需/需要鉴定结果的定量方法，其计算流程分别对应于图1中的流程一和流程二。





## 数据处理：

无需鉴定结果的定量方法以一级图谱数据为处理对象，其定量数据处理主要由以下6步完成：

- a. 数据预处理及谱峰检测(peakdetection).
- b. 基于信号强度(intensity)提取肽段定量信息.
- c. 保留时间对齐(RTalignment).
- d. 数据归一化(normalization).
- e. 肽段/蛋白质序列匹配.
- f. 蛋白质丰度比计算及统计学分析.

需要鉴定结果的定量方法是针对LC-MS/MS策略的实验  
数据处理方法，其数据处理步骤包括：

- a. 数据库搜索及结果质量控制.
- b. 定量信息提取.
- c. 蛋白质丰度比计算及统计学分析.

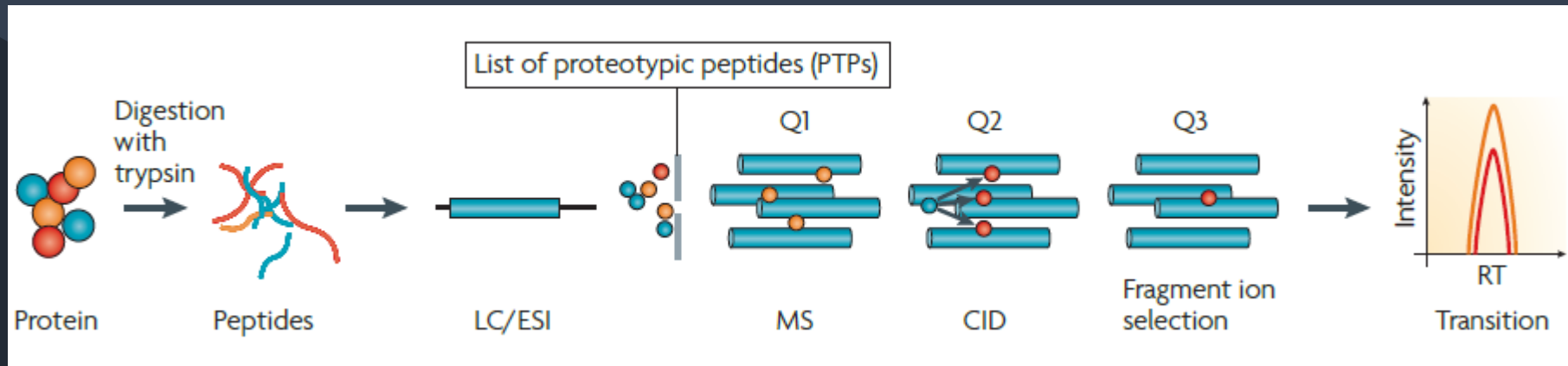
Organism	Genetic model	Method	Refs
Yeast	Parental versus segregants	Label free	14
Yeast	Haploid versus diploid	SILAC	1
Fly	RNAi-mediated knockdown of ISWI	SILAC	69
Worm	<i>daf-2<sup>-/-</sup></i>	<sup>15</sup> N metabolic labelling	15
Mouse	<i>Pdx1-CreKras<sup>G12D</sup> Ink4a/Arf<sup>lox/lox</sup></i>	<sup>13</sup> C acrylamide labelling	24
Mouse	<i>Camk2a<sup>-/-</sup></i>	iTRAQ	70
Mouse	<i>Fermt3<sup>-/-</sup></i>	SILAC	20
Mouse	<i>Tp53<sup>K317R</sup></i>	ICAT	16
Mouse	Huntington's disease	ICAT	18
Mouse	<i>Fmr1<sup>-/-</sup></i>	SILAC	19
Mouse	Triple transgenic ( <i>PS1<sup>M146V</sup>; APP<sup>Swe</sup>; MAPT<sup>P301L</sup></i> ) Alzheimer's model	iTRAQ	17
Rat	Rat1/Myc	ICAT	71

已经进行了基于质谱分析的全局分析突变的蛋白组的最新研究总结

## Phenotypic profiling using targeted MS：基于定向质谱的表型分析

定向蛋白质组学技术：有针对性地，对预先选定的蛋白质进行分析可以为更多的生物学家们提供更准确的定量结果，而且这种试验的敏感性也更高，这就是所谓的定向蛋白质组学（ Targeted proteomics ）技术。

虽然科学家们已经将人类以及其它很多种生物基因组中的蛋白质编码基因“搜刮”得差不多了，但是现在还没人知道这些基因究竟编码生成了多少种蛋白质。再加上存在可变剪接机制（ splice form ）和翻译后修饰机制（ post-translational modification, PTM ），情况就变得更加复杂，所以美国亚利桑那州立大学的Josh LaBaer用“令人震惊的”这个词来形容蛋白质种类的数量。



蛋白质组学质谱鉴定方面存在两种截然不同的研究策略，它们分别是先发现再鉴定的研究策略（discovery-based identification）和定向鉴定的研究策略（targeted quantification）。

三重四极杆质谱仪由两个四极杆质量分析筛选器（dual mass filter）以及串接在中间的惰性气体碰撞室组成。这两个质量分析筛选器能够对预设质量的离子片段进行分选和收集。

在定向蛋白质组学分析工作中，肽段离子首先会进入第一个QQQ质量筛选器，工作人员可以预先设定一个标准，并根据质荷比选择出特定的“前体”离子（‘precursor’ ion），再由第二个QQQ质量筛选器进一步筛选出我们感兴趣的特定的“产物”离子（‘product’ ion），并将其移交给质谱仪进行分析，最终每一个“前体”离子和“产物”离子都会产生一个由信号强度和与之对应的滞留时间（retention time）组成的曲线结果。这种检测手段就是选择反应监测技术（selected reaction monitoring, SRM），也被称作多重反应监测技术（multiple reaction monitoring, MRM）。

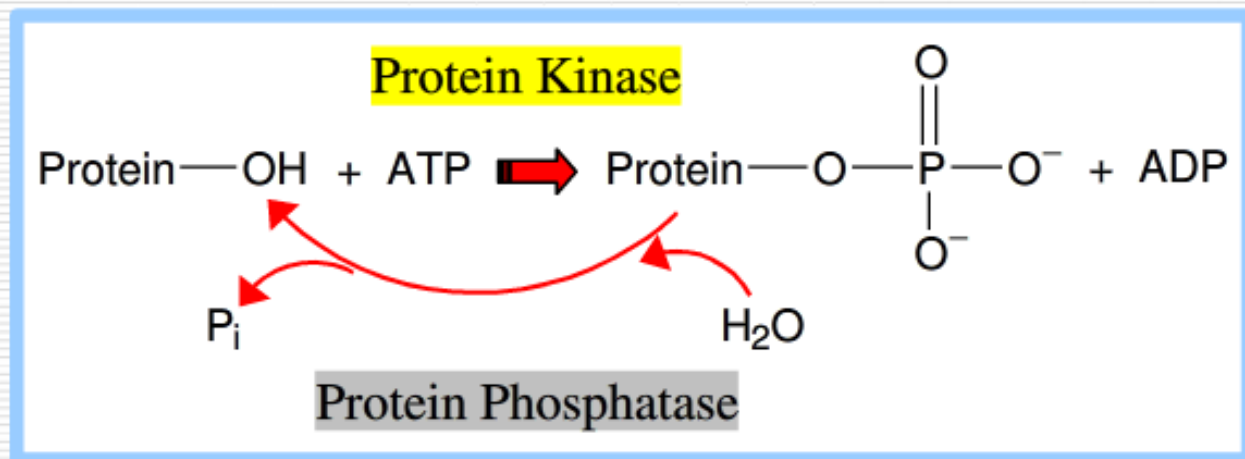
质谱分析可以应用于蛋白质翻译后的修饰

## 蛋白质的翻译后修饰分析

---

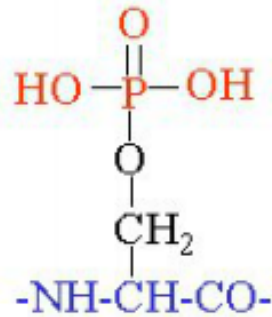
- Post-translational modifications (PTMs)
  - Phosphorylation
  - Ubiquitination
  - Glycosylation
  - Acetylation
  - Sumoylation
  - Methylation.....

## 蛋白质的磷酸化修饰

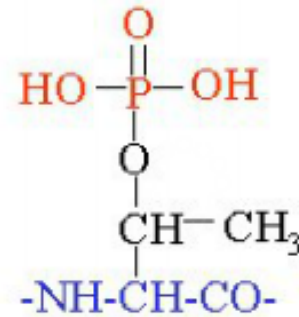


- 蛋白激酶将ATP末端的磷酸基团转移到蛋白质侧链的羟基上；
- 磷酸酶催化蛋白质侧链上磷酸基团的水解。

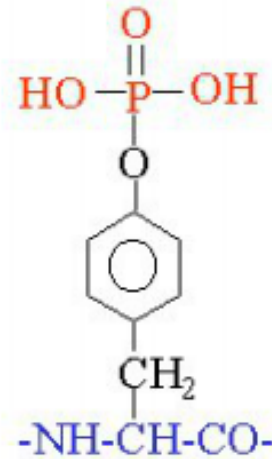
## 磷酸化修饰的氨基酸



PhosphoSerine



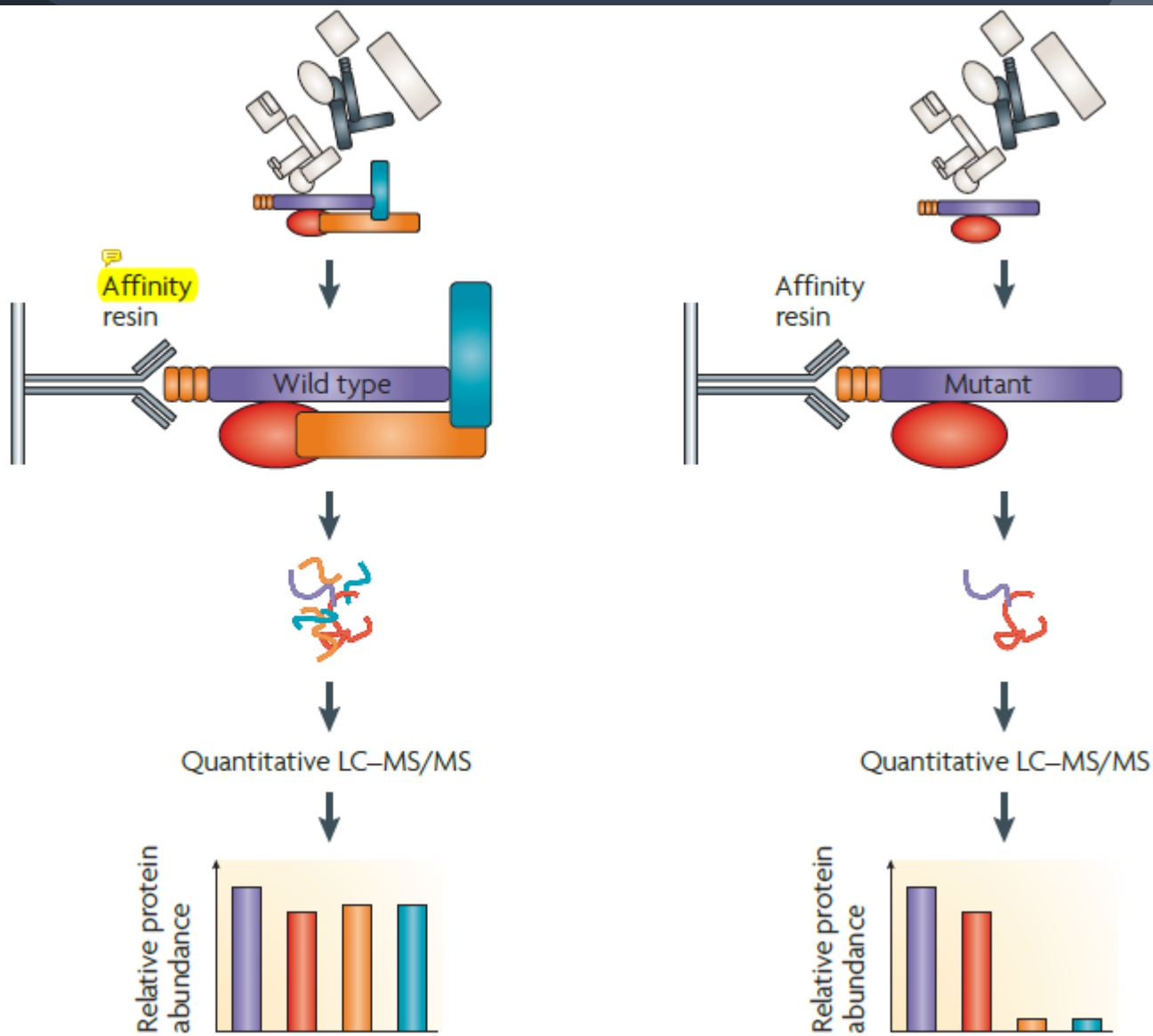
PhosphoThreonine



PhosphoTyrosine



## “改变了的蛋白” 互作分析（野生型与突变型）

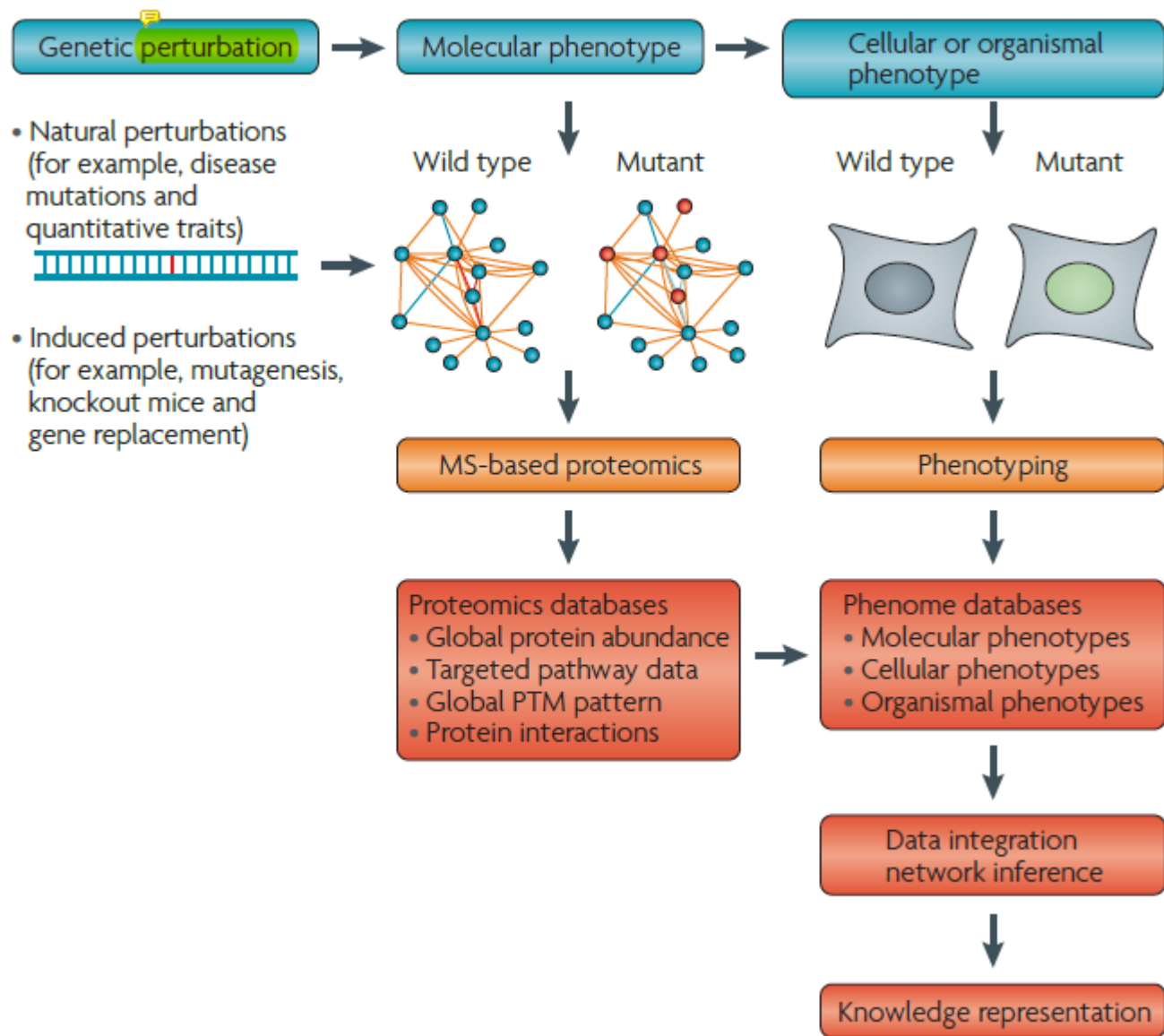


- 1、 复合物包括野生型或相应的纯化的突变诱导蛋白；
- 2、 通过亲和层析提取纯化的蛋白；
- 3、 通过质谱分析得到相应的数据；
- 4、 最后，将得到的两种不同蛋白质丰度数据进行比较。

亲和纯化和定量质谱的应用，可以测量在蛋白质互作中，由于突变引起的相对的和绝对的变化，有利于对突变体的分析。

Eg：通过这种方法，原癌基因或抑癌基因的产物的信号通道被找到，阐明了它们在肿瘤形成中的作用，并且得到了它们的蛋白互作数据。

# 集合数据构建生物学网络



集合数据构建生物学网络，可以极大地提高数据分析效率，并在今后的研究中，发挥更大作用。

目前已经运用这项手段分析了SUMO（一种多功能的蛋白翻译后修饰方式）以及运用蛋白质组学、功能基因组学和生物学网络的数据整合，改善了对癌症表型的预测。

## 总结：

从表型基因分子扰动起源于突变的细胞。功能基因组学和代谢组学是，现在仍然是，有帮助的在再继续研究的过程中，去理解和模型化分子网络。然而，这些方法没有考虑到占一个重要级的网络组件 - 蛋白质。在这篇综述中，我们已经表明，进展基于MS的蛋白质组学现在允许系统范围内的并假设驱动突变蛋白质组分析。然而，这仍然是研究的一个新的区域仍需要解决的全部复杂的限制和细胞蛋白质组的动态特性。新的分析概念，比如有针对性的蛋白质组学，目前正在探讨克服许多现有的局限性，并且MS仪器将继续提高当前MS的灵敏度和准确度测量。这将是一个有效计算工作作为整合功能基因组蛋白质组学数据信息和重构分子网络，以及发现在突变的细胞中如何被扰动-----一个必不可少的步骤在弥合基因型 - 表型缺口。

**2016**

**THANK  
YOU!**