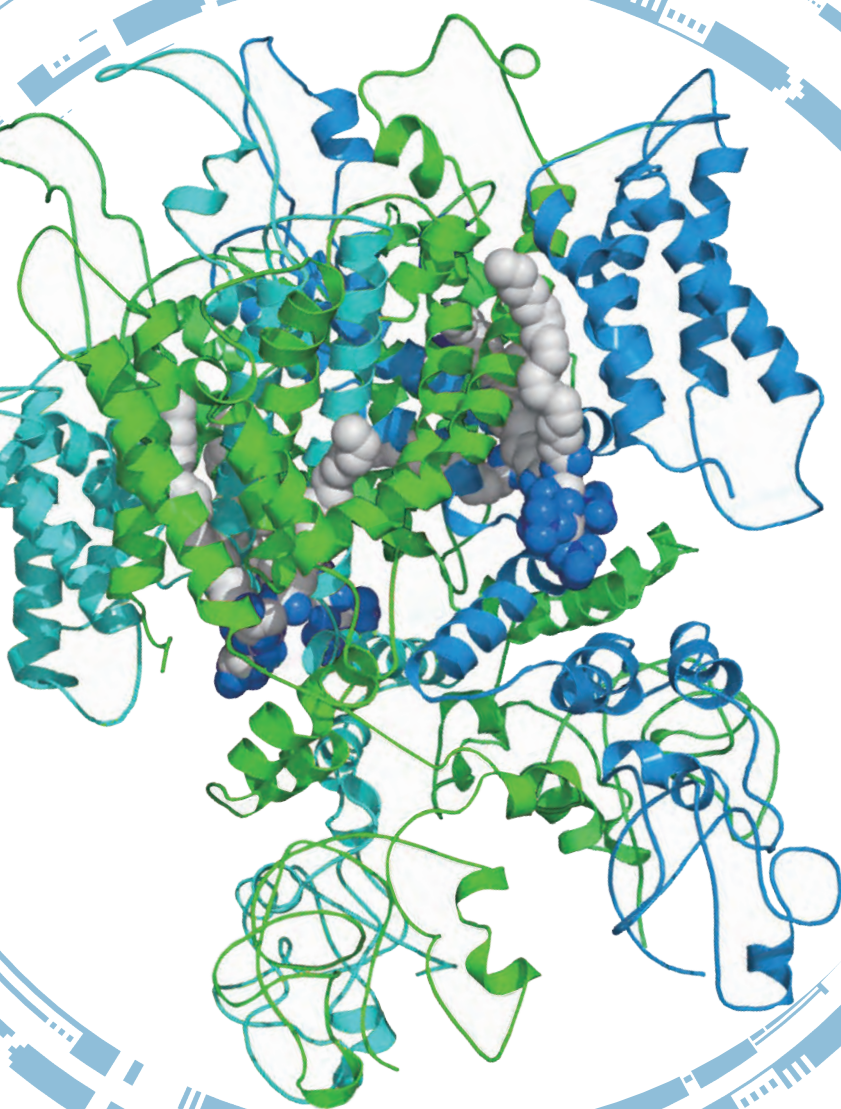


# 蛋白质组与代谢组

▶ 数据分析    ▶ 质谱检测

2019年第1版



# 目录

## Contents

### ● 诺禾致源公司介绍 /4

---

### ● 定性蛋白质组 /12

---

#### 产品介绍

- > 蛋白胶点胶条鉴定 /13
- > 蛋白质相互作用鉴定 /13
- > 蛋白质组全谱鉴定 /14
- > 修饰定性蛋白质组 /14

#### 技术参数 /15

信息分析流程 /15

典型结果展示 /15

典型案例解析 /16

### ● 定量蛋白质组 /21

---

#### 产品介绍

- > Label-free 定量蛋白质组学 /22
- > iTRAQ/TMT /23
- > DIA 定量蛋白质组 /25

典型结果展示 /27

#### 技术比较 /29

典型案例解析 /30

### ● 修饰蛋白质组 /41

---

#### 产品介绍

- > 磷酸化蛋白质组 /42
- > 乙酰化蛋白质组 /43
- > 泛素化蛋白质组 /44
- > N-糖基化蛋白质组 /45
- > 琥珀酰化蛋白质组 /46
- > 丙酰化蛋白质组 /47
- > 多通路磷酸化 (Multi-pathway) /48

产品优势 /49

技术参数 /50

实验流程 /50

信息分析流程 /51

典型结果展示 /52

典型案例解析 /54

### ● 高深度蛋白质组 /76

---

技术原理 /77

技术参数 /77

实验流程 /78

信息分析流程 /78

典型案例解析 /80

### ● 代谢组 /93

---

非靶向代谢组学 /94

方法流程 /94

信息分析流程 /94

典型结果展示 /95

典型案例解析 /96

### ● 附录 /107

---

## 卓越的质谱检测平台 ▶

随着蛋白质组学与代谢组学研究的不断深入，对质谱的灵敏度、扫描速度、分辨率、处理数据能力，以及操作的便捷性都提出更高的要求。Q Exactive™ HF-X 为 QE 系列高精度高分辨率的质谱仪器平台，配备大容量传输管、电动离子漏斗和超高场 Orbitrap 质量分析器，扫描速度达到前所未有的 40Hz，灵敏度高达 10 倍的飞跃。



图 1 Q Exactive™ HF-X 质谱平台

表 1 Q Exactive™ HF-X 质谱性能参数

分辨率	240,000 @ m/z 200
质量扫描范围	50-6,000 m/z
扫描速度	最高 40Hz (7,500 @ m/z 200)
质量准确度	内标 <1 ppm RMS; 外标 <3 ppm RMS
灵敏度	全扫描 MS: 100 fg 上柱量利血平的 S/N 为 150: 1 SIM: 50 fg 上柱量利血平的 S/N 为 150: 1
动态范围	>5,000:1

## 树立蛋白质组学新标准

### 前所未有的蛋白鉴定效率

Q Exactive™ HF-X 配备大容量传输管、电动离子漏斗和超高场 Orbitrap 质量分析器，扫描速度最高可达 40Hz，相对于中端质谱 Q Exactive HF，鉴定相同数量的蛋白可以节省一半的时间。相同的扫描时间下，Q Exactive™ HF-X 识别的 Unique 肽段比 Q Exactive HF 增加 40%。Q Exactive™ HF-X 前所未有的蛋白鉴定效率，助力蛋白质组学的深度研究。

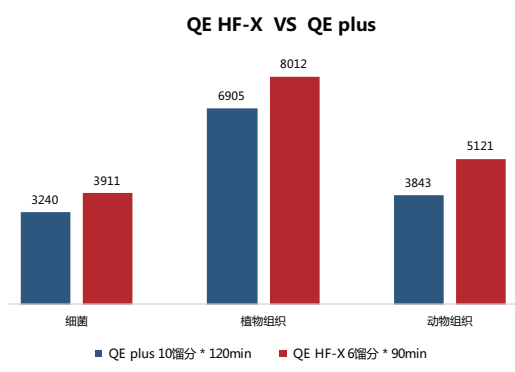


图 2 取细菌、植物组织、动物组织进行蛋白提取、酶解、iTRAQ 标记，一式两份，分别分离成 10 和 6 个馏分，进行 QE plus 和 QE HF-X 质谱检测。相对于低端质谱 QE plus，虽然，QE HF-X 质谱时间不到原来的一半，但鉴定蛋白数目平均提升了 20%。

### 开启下一个蛋白质组学新高度

Q Exactive™ HF-X 整合了超快的扫描速度、最高的灵敏度和选择性，能够准确实现 Label-free、SILAC、iTRAQ/TMT 技术的蛋白鉴定和定量，可筛选差异表达蛋白，也能够通过平行反应监测 (PRM) 对某些关键蛋白进行验证。

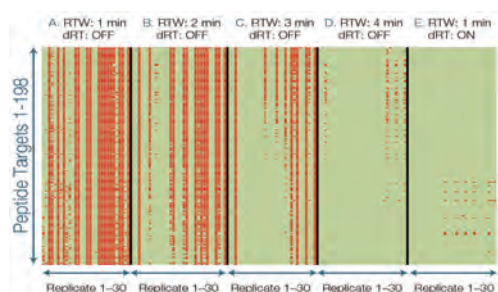


图 5 靶向肽段定量自动校正

### 超高的准确性与卓越的重现性

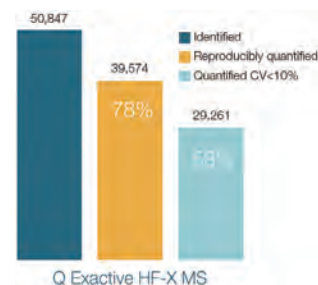


图 3 Q Exactive™ HF-X 蛋白定量重现性。在 Q Exactive™ HF-X 上使用 DIA 策略分析 4μg HeLa 细胞酶解产物，总共鉴定多肽 50,847 条。分辨率为 120,000 时的 MS1 定量可重复鉴定到其中的 39,574 条多肽 (78%)，CV < 10% 的多肽有 29,261 条 (58%)。

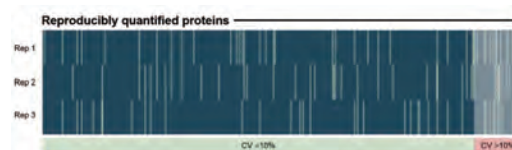


图 4 Q Exactive™ HF-X 蛋白定量准确性。在 Q Exactive™ HF-X 上使用 DDA 策略分析 1μg HeLa 细胞酶解产物。分辨率为 120,000 时，1μg HeLa 细胞酶解后可鉴定到 4,383 个蛋白，其中 CV < 10% 的蛋白质所占比例高达 87%。

Q Exactive™ HF-X 的平行反应监测 (PRM) 进一步改进了新的动态保留时间 (dRT) 技术。Q Exactive™ HF-X 质谱仪通过调整保留时间窗口 (RTW) 来矫正不同 run 间的保留时间差异，因此可以更准确地分配保留时间，并捕获较窄 RTW 内的母离子。Q Exactive™ HF-X 在保证足够的采集样本率的同时，可进行更多数量的肽段定量分析。

# 代谢组定性和定量能力的完美结合

超高分辨率，清除复杂基质的干扰，全面检测

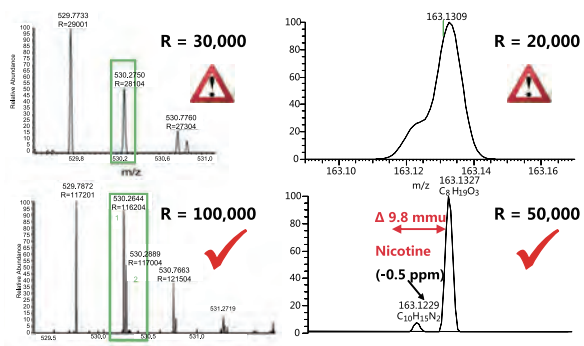


图 1 代谢组学分析的样品基质复杂，且需要在有限的分析时间内尽可能实现全组分的同时检测，而超高的分辨率对于分析那些基质复杂、干扰大的样品尤为重要

高质量精度，确保 MS 色谱峰每一点的高质量精度

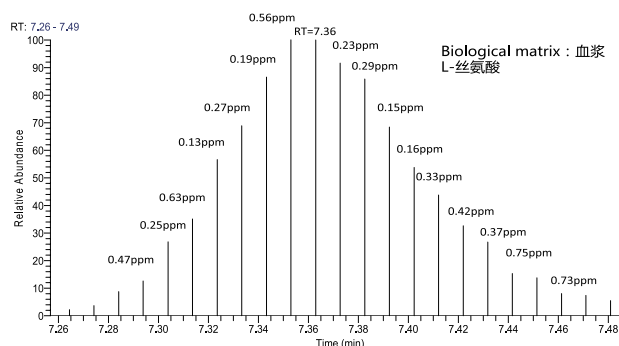


图 2 精确质量数覆盖整个色谱峰，无需平均质谱图

极佳的稳定性，满足代谢组学对于重现性的高要求

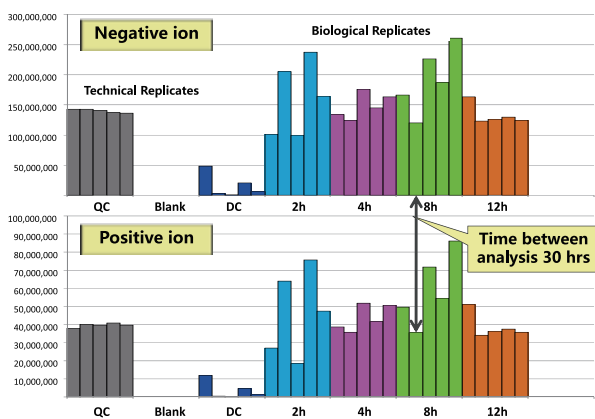


图 3 正离子和负离子两种模式运行时间相隔 30 小时，血清样品在两种模式下测定的尿酸变化结果完全一致

## 强大的代谢组数据库及分析软件

基于 Orbitrap 质谱平台的 mzCloud 数据库，包含超过 8000 种代谢物、270 万张二级谱图信息（持续扩充中），搭配集成多种数据处理功能的 Compound Discoverer 软件，可实现对样本中代谢物的定性与定量分析的有机统一。



图 4 mzCloud 数据库

(数据来源 <https://www.mzcloud.org/>，数据实时更新)

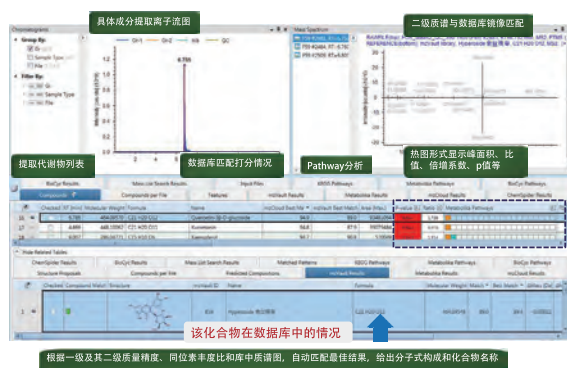


图 5 Compound Discoverer 软件（上）  
及数据处理流程（下）

表 2 Orbitrap 系列质谱仪比较分析

	扫描速度	质量准确度	灵敏度	分辨率
Q Exactive™ HF-X	40Hz	内标 <1 ppm RMS 外标 <3 ppm RMS	全扫描 MS: 100 fg 上柱量利血平的 S/N 为 150: 1 SIM: 50 fg 上柱量利血平的 S/N 为 150: 1	240,000 @ m/z 200
Q Exactive HF	18Hz	内标 <1 ppm RMS 外标 <3 ppm RMS	全扫描 MS: 柱上进样 500fg 丁螺环酮 S/N 100:1 SIM: 柱上进样 30fg 丁螺环酮 S/N 100:1	240,000 @ m/z 200
Q Exactive Plus	12Hz	内标 <1 ppm RMS 外标 <3 ppm RMS	全扫描 MS: 柱上进样 500fg 丁螺环酮 S/N 100:1 SIM: 柱上进样 30fg 丁螺环酮 S/N 100:1	140,000 @ m/z 200
Q Exactive	12Hz	内标 <1 ppm RMS 外标 <5 ppm RMS	全扫描 MS: 柱上 500 fg 丁螺环酮 S/N 100:1 SIM: 50 fg 丁螺环酮进样, S/N 100:1	140,000 @ m/z 200
参数说明	扫描速度越快，鉴定相同物质所需的时间越短	质量准确度 ppm 值越小，物质鉴定成功率越高	灵敏度越高，鉴定到的物质数目越多	分辨率越高，物质鉴定的准确性越高

# 定性蛋白质组

蛋白质定性分析是指利用**质谱法**进行蛋白质鉴定和序列分析。质谱技术具有较好的灵敏度、分辨率、准确度，随着质谱技术的不断发展和成熟，利用质谱法进行蛋白质定性分析愈来愈广泛。

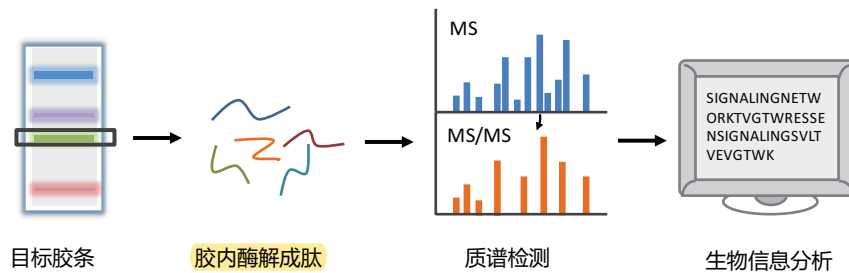
# 定性蛋白质组

## 产品介绍

## 蛋白胶点胶条鉴定

利用双向电泳 (2D) 和聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白质混合物，收集目的蛋白质胶点和胶条，经胶内酶解后，利用质谱来确定样品中的蛋白质组成，其基本原理是利用质谱仪得到二级质谱的离子峰分布来鉴定样品中的肽段，进而鉴定蛋白种类。

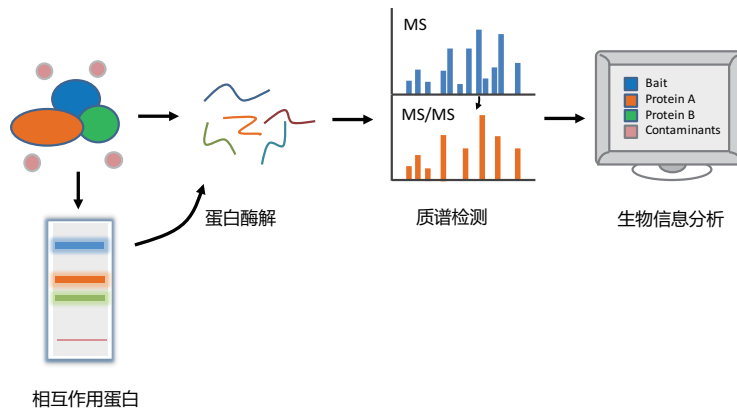
### 实验流程



## 蛋白质相互作用鉴定

通过液质联用技术 (LC-MS/MS) 对 IP、Co-IP、Pull-down 等纯化样本中的蛋白混合物进行鉴定，可同时鉴定目的蛋白及其相互作用蛋白，从而构建蛋白质相互作用谱。该技术既适用于蛋白混合物 SDS-PAGE 分离后经胶内酶解 (In-gel digestion) 的质谱分析，也适用蛋白混合物溶液内直接酶解 (In-solution digestion) 的质谱分析。

### 实验流程

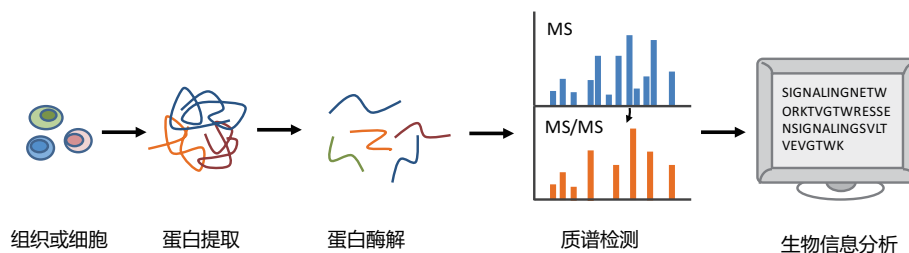




## 蛋白质组全谱鉴定

蛋白质组全谱鉴定是以完整的组织、血液或体液等复杂样本为研究对象，目的在于识别出样品中尽可能多的肽段和蛋白质。基于质谱技术的全谱分析，可为蛋白高通量的定量和修饰分析提供参考信息。此外，将全谱分析数据和转录组数据结合，可相互补充并共同验证基因注释。

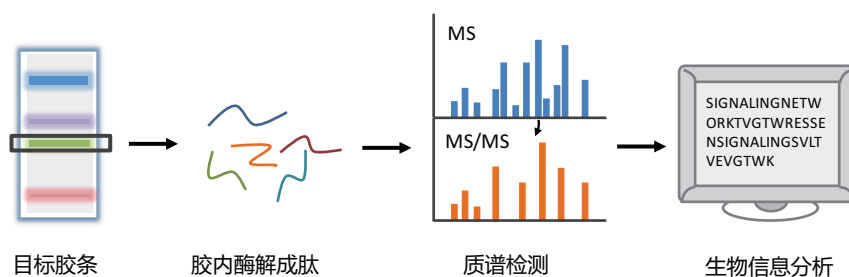
### 实验流程



## 修饰定性蛋白质组

通过 SDS-PAGE 和液质联用技术 (LC-MS/MS) 对 IP 所得蛋白上的修饰位点进行鉴定，可以对目前所有已知的修饰类型及一些特殊的小分子药物在蛋白上的修饰位点进行鉴定。如果修饰蛋白存在比例较高，可以直接将酶解的肽段进行质谱检测。但如果修饰蛋白存在比例较低，需要对酶解后的肽段进行修饰肽段的富集，然后再对富集后的肽段进行质谱检测。

### 实验流程

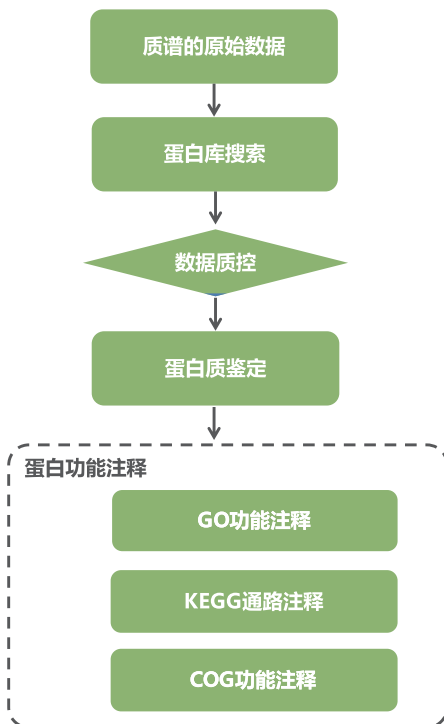


技术参数

产品类型		仪器平台	承诺指标	项目周期
定性蛋白质组	胶点胶条鉴定	Thermo Q Exactive™ HF-X	需根据样本实际情况而定	20个自然日
	组织、溶液等蛋白鉴定			40个自然日

信息分析流程

基于质谱检测得到的Raw文件，进行对应数据库的搜索，然后基于数据库搜索的结果进行蛋白质鉴定，同时进行肽段、蛋白和母离子质量容差分布分析来评定质谱检测数据的质量。然后对鉴定到的蛋白进行常见功能数据库注释，包括COG、GO和KEGG数据库。信息分析流程如下图：



典型结果展示

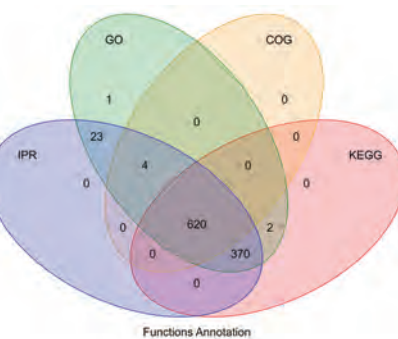


图1 功能注释结果



图2 GO 功能注释

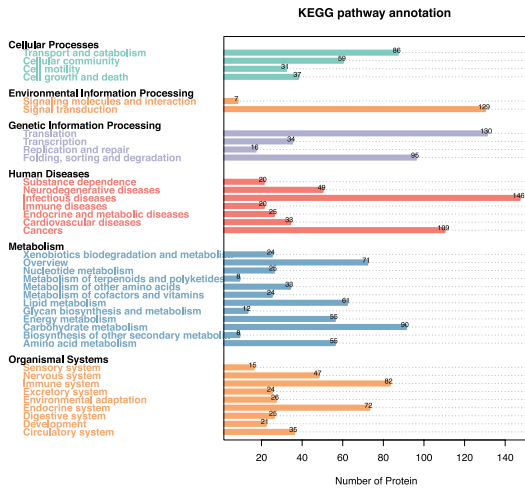


图 3 KEGG 功能注释

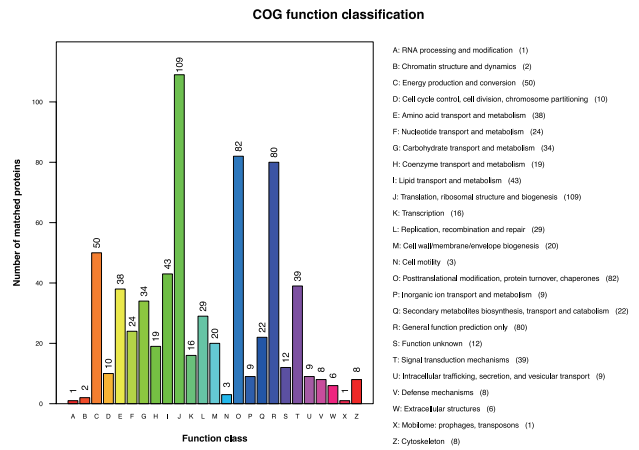


图 4 COG 功能注释

典型案例解析

代表性文献盘点

研究对象	发表时间	发表期刊	影响因子	链接
农学 绿藻膜蛋白质组分析	2017.01	Plant Physiology	5.949	PMID: 27837088
农学 甘蔗叶子与茎在不同发育阶段的蛋白质组研究	2017.11	Proteomics	3.532	PMID: 29035686
医学 人类成牙本质细胞层蛋白质组研究	2017.10	Journal of Dental Research	5.380	PMID: 2927424

## 案例一

### 通过绿藻膜蛋白质组学进行的绿藻生理机能与分类研究

Membrane proteomic insights into the physiology and taxonomy of a green microalga

研究对象：绿藻（Green microalga） | 期 刊：Plant Physiology | 影响因子：5.949

发表单位：墨西哥国立自治大学、南十字星大学 | 发表时间：2017 年 1 月

## 摘要

*Ettlia oleoabundans* is a nonsequenced oleaginous green microalga. Despite the significant biotechnological interest in producing value-added compounds from the acyl lipids of this microalga, a basic understanding of the physiology and biochemistry of oleaginous microalgae is lacking, especially under nitrogen deprivation conditions known to trigger lipid accumulation.

Using an RNA sequencing-based proteomics approach together with manual annotation, we are able to provide, to our knowledge, the first membrane proteome of an oleaginous microalga. This approach allowed the identification of novel proteins in *E. oleoabundans*, including two photoprotection-related proteins, Photosystem II Subunit S and Maintenance of Photosystem II under High Light1, which were considered exclusive to higher photosynthetic organisms, as well as Retinitis Pigmentosa Type 2-Clathrin Light Chain, a membrane protein with a novel domain architecture. Free-flow zonal electrophoresis of microalgal membranes coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry proved to be a useful technique for determining the intracellular location of proteins of interest. Carbon-flow compartmentalization in *E. oleoabundans* was modeled using this information. Molecular phylogenetic analyses of protein markers and 18S ribosomal DNA support the reclassification of *E. oleoabundans* within the trebouxiophycean microalgae, rather than with the Chlorophyceae class, in which it is currently classified, indicating that it may not be closely related to the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. A detailed survey of biological processes taking place in the membranes of nitrogen-deprived *E. oleoabundans*, including lipid metabolism, provides insights into the basic biology of this nonmodel organism.

## 关键词

*Ettlia oleoabundans*, 产油微藻, 膜蛋白质组学, PSBS, MPH1, RP2, 脂质代谢, 共球藻纲

## 研究背景

*Ettlia oleoabundans* 是一种未被测序过的产油绿色微藻，尽管利用这种微藻的酰基脂质加工化合物具有显著的生物价值，但是我们对于 *Ettlia oleoabundans* 的生理学与生物化学缺乏最基本的理解，特别是氮缺乏状况下的脂质积累过程。本文使用基于 RNA-Seq 的蛋白质组学方法，配合手工注释，首次报道了 *Ettlia oleoabundans* 的膜蛋白质组。利用此方法，本研究首次鉴定到了几种新发蛋白，并证明 LC MS/MS 技术与电泳技术相结合可用于确定目标蛋白的细胞内定位。

## 研究策略

### 取样策略

*E. oleoabundans* 在缺氮状态下培养 4 天，提取微粒体

### 质谱策略

使用 FFZE 方法将样本分组分，选取总微粒体样本与 FFZE 组分样本进行质谱检测，DDA 质谱策略 (Orbitrap)

### 信息分析

基于 RNA-Seq 结果，构建 *E. oleoabundans* 蛋白质数据库，并与 Viridiplantae 蛋白库合并搜库，对所鉴定蛋白进行功能注释

## 研究结果

### 1. *Ettlia oleoabundans* 膜蛋白质组

本文使用基于 RNA-Seq 的蛋白质组学策略，利用从头测序产生的转录组数据作为指导，组建包含 54,652 条非冗余预测蛋白质序列的 *E. oleoabundans* 蛋白质数据库。将 *E. oleoabundans* 蛋白质数据库与 Viridiplantae 蛋白库进行合并后搜库，共鉴定到 551 种蛋白质 (18,902 个谱图)，其中 404 种蛋白在 4 个生物学重复中的至少 2 个鉴定到。与仅使用 Viridiplantae 数据库相比，这个数字增加了 13.5 倍。

### 2. 发现几种新发蛋白，并通过质谱分析，确定了其细胞定位

本研究对 *E. oleoabundans* 中新发现的光合作用蛋白 PSBS (图 1) 和 MPH1 进行了鉴定。PSBS 和 MPH1 蛋白之前被认为是高等光合作用生物所特有的。除了与光合作用相关的蛋白外，本研究还检测到 RP2-CLC 蛋白 (图 2)，这是一种新型的结构域蛋白，可能参与低等真核生物中网格蛋白包裹的囊泡细胞内运输过程。本研究还证实 PSBS 和 MPH1 存在于叶绿体，而 RP2-CLC 存在于细胞膜 (图 3)。

### 3. 膜蛋白质组功能注释，重新确定了 *E. oleoabundans* 的系统分类学地位

*E. oleoabundans* 目前被归属于绿藻纲，不过本研究发现的 92% 的蛋白质与共球藻纲类物种具有同源性，而仅有 3% 的蛋白与绿藻纲类同源。而且对于特异蛋白 PSBS、MPH1、TBCC、RP2-CLC 的系统进化分析也显示，*E. oleoabundans* 与 *C. variabilis* (共球藻纲) 的亲缘关系比绿藻纲更近。

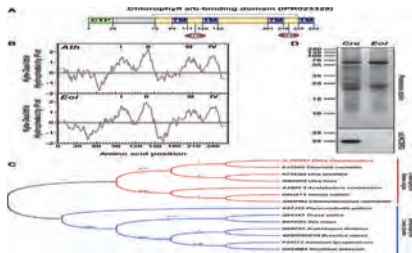


图 1 EoPSBS 蛋白结构与系统发育研究

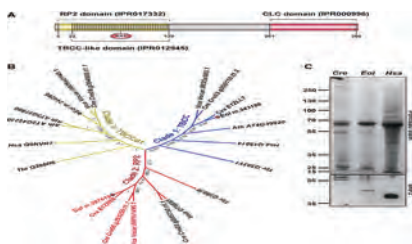


图 2 RP2-CLC 蛋白结构与系统发育研究

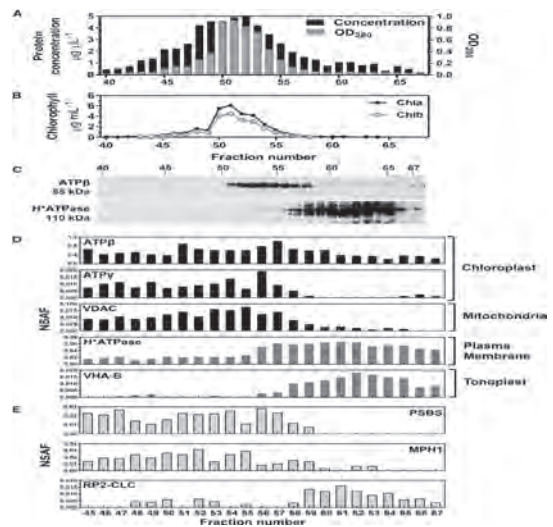


图 3 通过 FFZE 分组与质谱方法，确定新发蛋白的亚细胞定位

## 研究结论

本研究针对产油微藻的膜蛋白质组学进行了详细的研究。利用基于 RNA-Seq 的蛋白质组学策略，共鉴定到 551 种蛋白质，其中 404 种蛋白在 4 个生物学重复中的至少 2 个都鉴定到。发现 2 种与光合作用相关的新发蛋白 PSBS 和 MPH1。另外还检测到 1 种新型的结构域蛋白 RP2-CLC，预测其可能参与囊泡的细胞内运输。对于膜蛋白质组的功能注释重新确定了 *E. oleoabundans* 与共球藻纲亲缘性更近。

## 参考文献

Garibay-Hernández A, Barkla B J, Vera-Estrella R, et al. Membrane Proteomic Insights into the Physiology and Taxonomy of an Oleaginous Green Microalga [J]. Plant Physiology, 2017, 173(1):390-416.

## 案例二

### 人成牙质细胞层和牙髓的蛋白质组

The Human Odontoblast Cell Layer and Dental Pulp Proteomes and N-Terminomes

研究对象：人牙齿 | 期 刊：Journal of Dental Research | 影响因子：5.38  
发表单位：不列颠哥伦比亚大学 | 发表时间：2017 年 10 月

### 摘要

The proteome and N-terminome of the human odontoblast cell layer were identified for the first time by shotgun proteomic and terminal amine isotopic labeling of substrates (TAILS) N-terminomic analyses, respectively, and compared with that of human dental pulp stroma from 26 third molar teeth. After reverse-phase liquid chromatography–tandem mass spectrometry, >170,000 spectra from the shotgun and TAILS analyses were matched by 4 search engines to 4,888 and 12,063 peptides in the odontoblast cell layer and pulp stroma, respectively. Within these peptide groups, 1,543 and 5,841 protein N-termini, as well as 895 and 2,423 unique proteins, were identified with a false discovery rate of  $\leq 1\%$ . Thus, the human dental pulp proteome was expanded by 974 proteins not previously identified among the 4,123 proteins in our 2015 dental pulp study. Further, 222 proteins of the odontoblast cell layer were not found in the pulp stroma, suggesting many of these proteins are synthesized only by odontoblasts. When comparing the proteomes of older and younger donors, differences were more apparent in the odontoblast cell layer than in the dental pulp stroma. In the odontoblast cell layer proteome, we found proteomic evidence for dentin sialoprophosphoprotein, which is cleaved into dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein.

By exploring the proteome of the odontoblast cell layer and expanding the known dental pulp proteome, we found distinct proteome differences compared with each other and with dentin. Moreover, between 61% and 66% of proteins also occurred as proteoforms commencing with a neo-N-terminus not annotated in UniProt. Hence, TAILS increased proteome coverage and revealed considerable proteolytic processing, by identifying stable proteoforms in these dynamic dental tissues. All mass spectrometry raw data have been deposited to ProteomeXchange with the identifier <PXD006557>, with the accompanying metadata at Mendeley Data (<https://data.mendeley.com/datasets/b57zfh6wmy/1>).

### 关键词

牙本质，细胞外基质，蛋白质组学，同位素标记底物末端氨基酸法（TAILS），N-端基因组学，牙本质唾液酸焦磷酸蛋白

### 研究背景

NeXtProt 人类蛋白质组学的官方数据库中有 3124 种蛋白被列为“missing proteins”，其证据等级仅为 PE1 级。牙髓是唯一含有成牙本质细胞，但不论体内还是体外都未进行成牙本质细胞蛋白质组学分析的组织。本研究假设牙髓表达独特蛋白，且可能为“missing proteins”，借助同位素标记底物末端氨基酸法（TAILS）和 LC MS/MS，进行成牙本质细胞的蛋白质组学分析。

### 研究策略

#### 取样策略

采集 9 名患者（2 女，7 男，15-39 岁）的 26 份牙髓组织，并提取蛋白质

#### TAILS

同位素标记底物末端氨基酸法（TAILS）

#### 质谱策略

样本 TAILS 标记后，经 C18 柱脱盐，再经 nano HPLC(Agilent 1200) 进行 G6550A quadrupole TOF(Agilent) 质谱检测

#### 信息分析

使用 4 个软件 Mascot, X!Tandem, MS-GF+ 和 Comet 在 UniProt 中搜库，使用 PeptideProphet 在 iProphet 中进行蛋白鉴定

## 研究结果

本研究使用鸟枪法蛋白质组学和同位素标记底物末端氨基酸法 (TAILS) (图 1), 第一次对人成牙本质细胞层的蛋白质组和 N- 端基因组学进行了分析鉴定。借助反相液相色谱 - 串联质谱, 本研究分析了 170,000 个谱图, 分别匹配到成牙本质细胞层的 4,888 个肽和牙髓基质中的 12,063 个肽 (图 2)。在这些 peptide groups 中, 发现 N 末端蛋白 1,543 个 (成牙本质细胞层) 和 5,841 个 (牙髓基质), unique 蛋白 895 个 (成牙本质细胞层) 和 2,423 个 (牙髓基质) (图 2 和图 3)。此外, 人成牙本质细胞层的 222 种蛋白在牙髓基质中未被发现, 表明此类蛋白仅在人成牙本质细胞层合成。本研究另外发现了牙本质唾液酸焦磷酸蛋白存在的蛋白质组学证据。

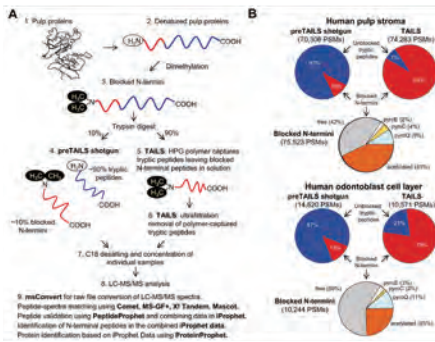


图 1 利用同位素标记底物末端氨基酸法 (TAILS) 和 LC MS/MS 进行的成牙本质细胞和牙髓间质的蛋白质组学分析

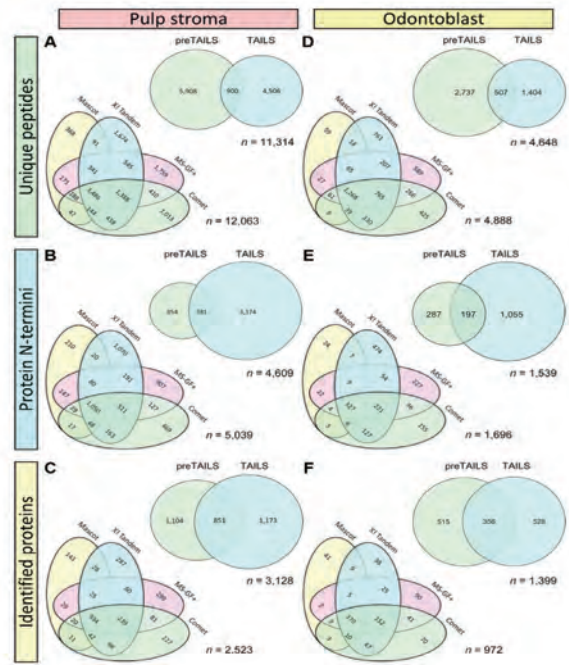


图 2 比较成牙本质细胞和牙髓间质所检测到的 unique 肽段、N-termini 蛋白与已鉴定蛋白的差异

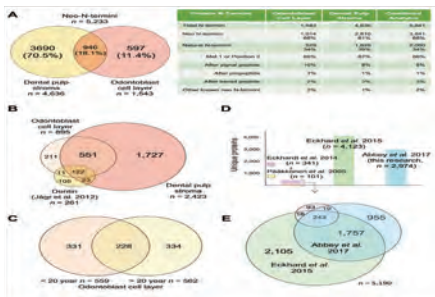


图 3 成牙本质细胞层和牙髓间质的蛋白质组和 N- 端基因组学分析结果

## 研究结论

本研究利用 LC-MS/MS 技术, 确定了将近 900 种人成牙本质细胞蛋白, 这是首次针对成牙本质细胞进行的蛋白质组学研究。蛋白质的 N 端与蛋白质的成熟、转换、加工、结合及下游蛋白酶的作用息息相关。本研究提供了强有力的证据, 证实存在多种不同 N 端开始的蛋白质形式, 包含目前已知或在 UniProt 和 TopFIND 数据库中未知的蛋白。本研究总共鉴定到 5097 种人牙髓基质蛋白质 (FDR<1%), 在至少 2 种不同的牙髓样本中可再现的识别上述约 40% 的蛋白, 这是目前人类牙齿蛋白质组鉴定到的最多数目的研究。

## 参考文献

Abbey S R, Eckhard U, Solis N, et al. The Human Odontoblast Cell Layer and Dental Pulp Proteomes and N-Terminomes [J]. Journal of Dental Research, 2017(15):22034517736054.

# 定量蛋白质组学

定量蛋白质组学 (Quantitative Proteomics) 是对一个基因组表达的全部蛋白或一个复杂混合体系内所有蛋白质进行精确鉴定和定量。可用于筛选和寻找任何因素引起的样本之间的差异表达蛋白，结合生物信息学揭示细胞生理病理功能，同时也可对某些关键蛋白进行定性和定量分析。

目前定量蛋白质组学方法多种多样，其中基于 LC-MS/MS 的非靶向定量技术，根据质谱的数据扫描方式分为两大类：数据依赖性的扫描模式 (Data-dependent Acquisition, DDA)，包括 Label-free、iTRAQ 与 TMT；数据非依赖性的扫描模式 (Data-independent Acquisition, DIA)，包括 SWATH 与 DIA。



## Label-free 定量蛋白质组

Label-free 即非标记定量技术，通过液质联用技术对蛋白质酶解肽段进行质谱分析，无需使用昂贵的稳定同位素标签做内部标准，只需分析大规模鉴定蛋白质时所产生的质谱数据，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。

### 技术原理

根据一级质谱相关的肽段峰强度 (Mass spectral peak intensity)、峰面积 (Peak area)、液相色谱保留时间 (LC retention time) 等信息，基于肽段母离子强度 (或色谱离子流的峰面积，即 XIC)，以 MS1 为定量基础，计算每个肽段的信号强度在 LC-MS 色谱上的积分，进行定量。

### 技术特征

#### 1. 不需要昂贵的标记，操作简单

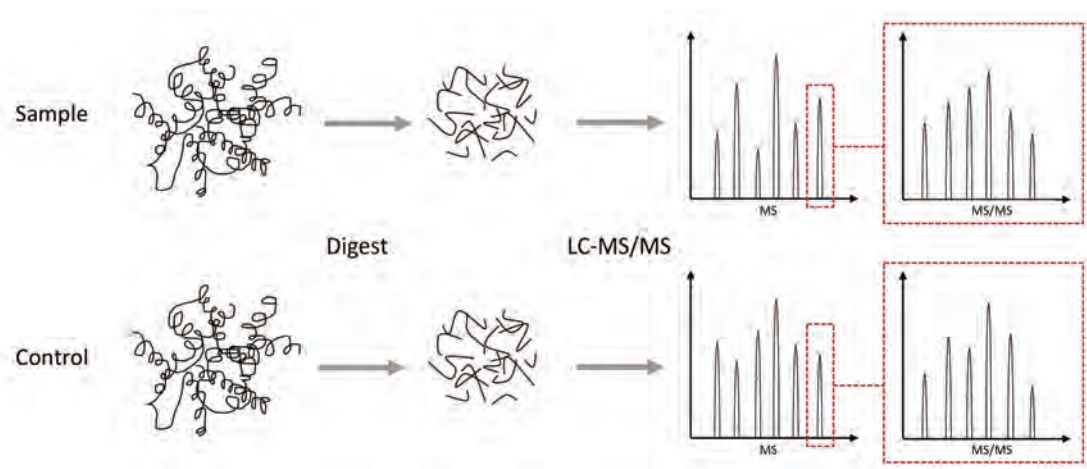
直接根据一级质谱的峰面积进行蛋白定量，不需要同位素标记，实验耗费低。对样本的操作少，从而使其最接近原始状态，所需样本量低。

#### 2. 实验要求高

每一个样本单独上质谱检测，需要有足够的技术重复以确保结果的可靠性，对液相色谱分离及串联质谱鉴定的稳定性和重复性要求较高。

#### 3. 样品不受限制，应用范围广

适用于蛋白差异明显的样本，如近缘物种或同一物种的不同组织类型的样本间的差异比较。可以进行蛋白有无差异分析，如仅在一组样本中有该蛋白表达，另一组样本中不能检测到该蛋白表达的情况。依赖 iBAQ 算法实现蛋白绝对定量，如同一样本中不同蛋白间的丰度比较，计算蛋白的拷贝数或绝对定量分析等。

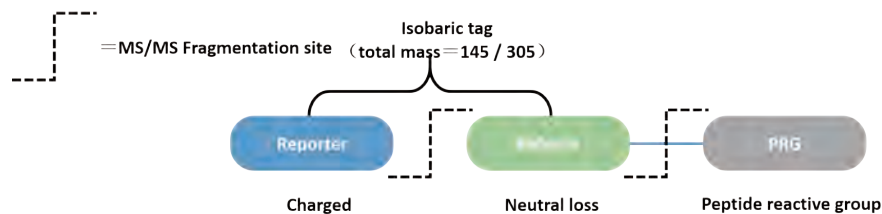


# iTRAQ / TMT

iTRAQ (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation) 和 TMT (Tandem Mass Tags) 分别是由美国 AB Sciex 公司和 Thermo 公司研发的多肽体外标记定量技术，是目前运用最广泛的两种标记定量蛋白质组技术，分别通过与氨基酸末端氨基以及赖氨酸残基的游离氨基结合，实现对多肽的标记，并通过不同分子量的试剂对不同来源样品进行标记的方式实现不同样品间蛋白质组比较的目标。

## 技术原理

iTRAQ 和 TMT 原理一致，以 iTRAQ 试剂为例，该试剂结构由报告基团、中性平衡基团和反应基团三部分组成。不同报告基团及其相对应平衡基团的质量和都相同，而反应基团能与赖氨酸  $\epsilon$  氨基和所有肽链的氨基末端连接，可标记所有氨基酸。不同标记试剂与来源于不同样品胰酶消化后的肽段结合，经过色谱分离，并通过一级质谱和二级质谱。平衡基团在二级质谱时发生中性丢失，而报告基团在二级质谱低质量区域产生多个报告离子，其信号强度分别代表该标记样品的表达量，根据报告离子的峰面积计算同一蛋白质同一肽段在不同样品间的比值，从而实现蛋白的相对和绝对定量。



## 技术特征

### 1. 通量高，不受样本数目的限制

单次上机最多可以同时进行 8 个样品 (iTRAQ) 或 10 个样品 (TMT) 蛋白的鉴定和定量，超过 8 个样品 (iTRAQ) 或 10 个样品 (TMT) 可以通过设置内参，形成搭桥，实现多次上机数据之间的比较，不受样本数目的限制。

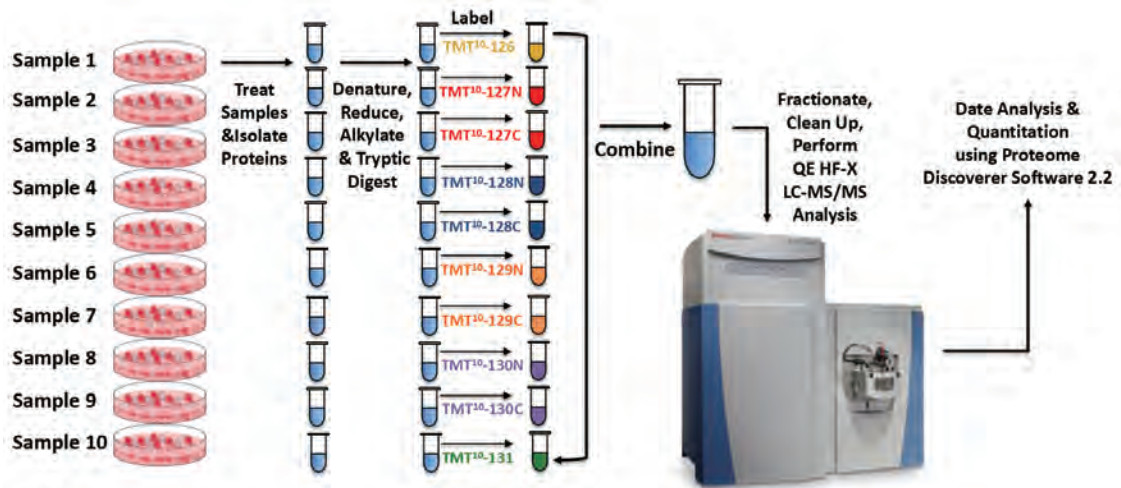
### 2. 定量准确，重复性高

不同样本标记之后混样，统一处理、上机，与非标记定量样本单独处理、上机相比，减少了样本处理和上机造成的实验误差，提高了定量的准确性和重复性。

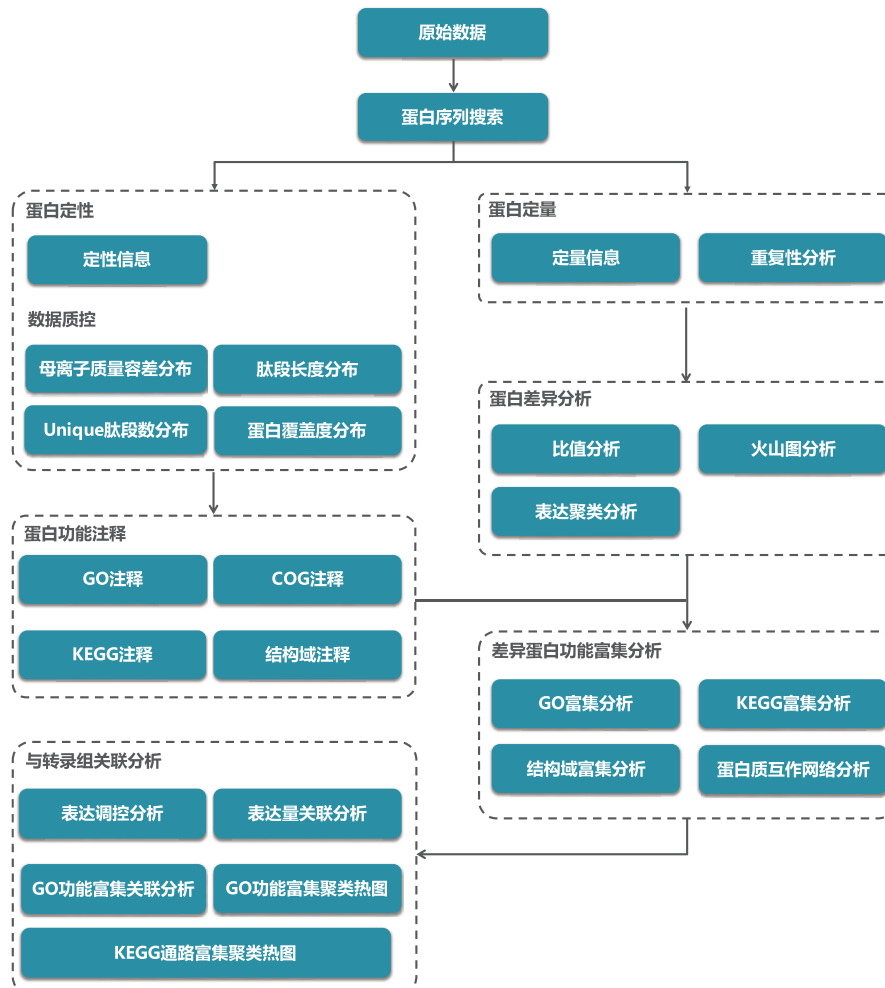
### 3. 蛋白检测范围广

无物种特异性限制，理论上可用于所有物种。蛋白种类广，胞浆蛋白、膜蛋白、核蛋白、胞外蛋白、分泌蛋白等皆可检测。蛋白丰度和分子质量跨度大，可检测出低丰度蛋白、强碱性蛋白、小于 10KD 或大于 200KD 的蛋白。

## 技术路线



## Label-free、iTRAQ/TMT 信息分析流程



# DIA 定量蛋白质组

数据非依赖性的扫描模式 (Data-independent Acquisition, DIA) 是近几年来发展的一种新的质谱数据采集方式。可以对特定质量范围内的所有母离子进行碎裂, 采集所有母离子的碎片离子信息进行蛋白定性和定量。目前流行的蛋白质组学研究手段, 如 iTRAQ\TMT、Label free、SILAC 采用的都是数据依赖性的扫描模式 (Data-dependent Acquisition, DDA)。相对于 DDA, DIA 具有更好的准确性和可重复性, 因此是蛋白质组学的一大重要趋势。

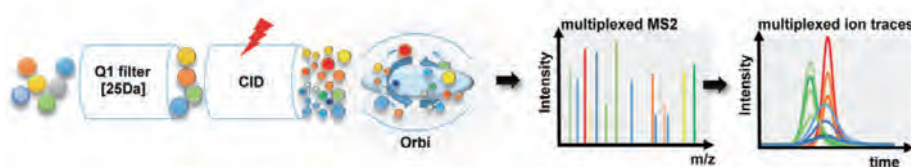
## 技术原理

DIA 扫描模式中, 利用超高分辨质谱对特定质量范围内的所有母离子进行碎裂, 采集所有母离子的碎片离子, 并快速地依次扫描相邻的母离子窗口内的所有碎片离子。如, 以 25Da 作为一个窗口, 先分离 500-525Da 这个范围的肽段, 接下来采集 525-550Da 分子量范围的肽段, 依次类推。

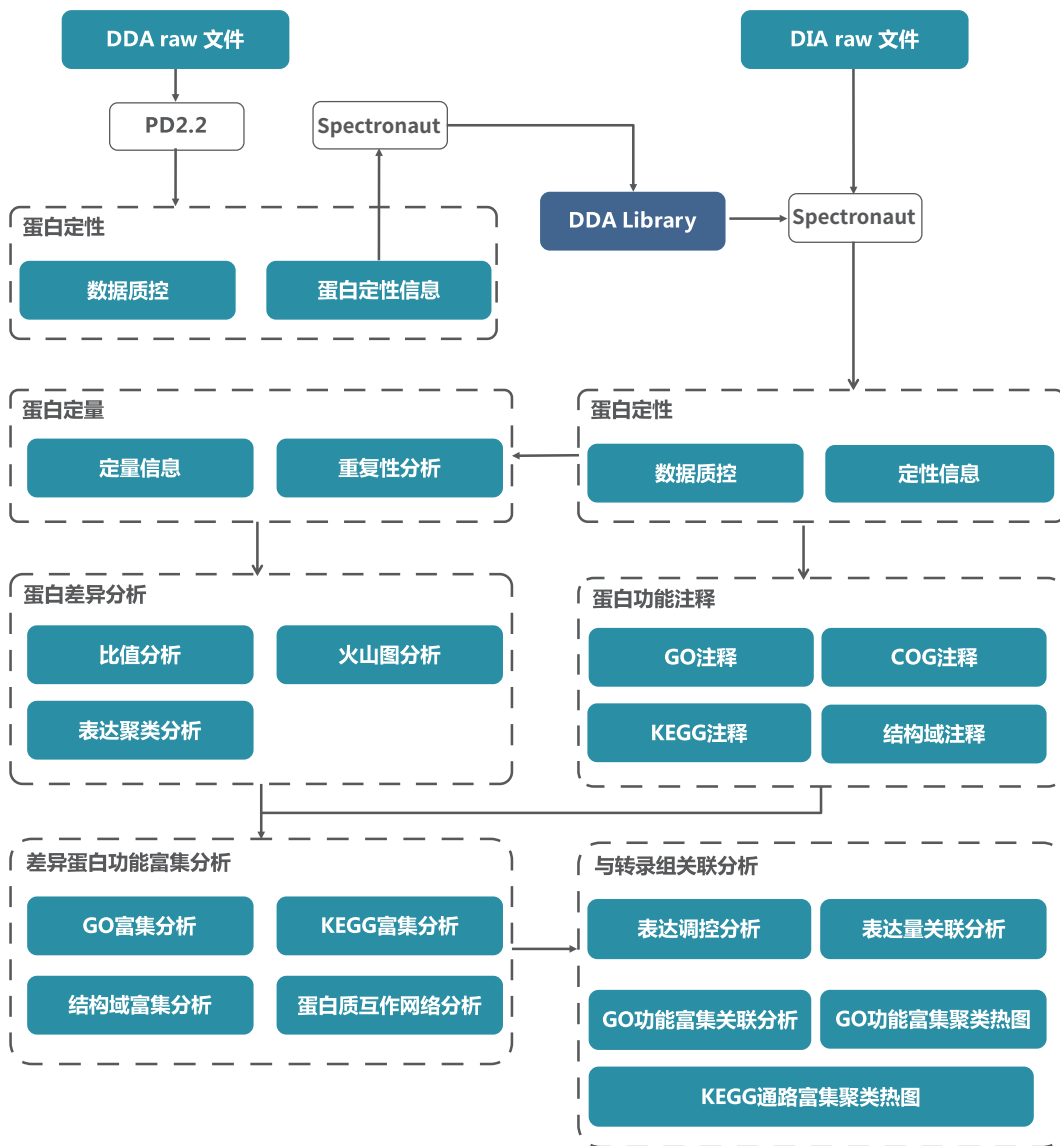
数据采集方式	DIA	DDA
一级质谱	将母离子按照质荷比分为多个范围, 依次采集每个范围内的母离子。	将样本中的酶解肽段, 不筛选质荷比范围, 直接一级质谱。
二级质谱	对一级质谱选择的窗口内的所有肽段进行碎片化, 打二级质谱。	对一级谱图信号最强的 Top40 的多肽依次碎片化, 打二级质谱。
优势	一级质谱可以很均匀地采集每个范围窗口的肽段, 不会有遗漏, 不涉及到对母离子的限制性筛选, 不会造成低丰度蛋白信息的丢失, 数据更加完整; 数据可以回溯, 对于复杂蛋白样本, 特别是低丰度蛋白具有更优异的重现性。	二级谱图所采集肽段信息都是来源于一条肽段, “成分纯粹”, 后续生信分析简单; 实验操作简单; 方法成熟, 参考文献丰富, 成本较低。
劣势	二级谱图所采集肽段信息来源于一级质谱选择的窗口范围内的所有肽段, “成分复杂”, 数据处理难度大; 需要构建混合样本库, 辅助蛋白鉴定, 成本高。	二级质谱只能采集一级谱图信号最强的 Top40 的多肽信息, 容易遗漏低丰度蛋白信息; 一级质谱中根据信号强度排序, 挑选信号较强的肽段母离子进入二级质谱。

注: 进行 DIA 检测, 需先用 DDA 构建一个谱图库。

## 技术路线

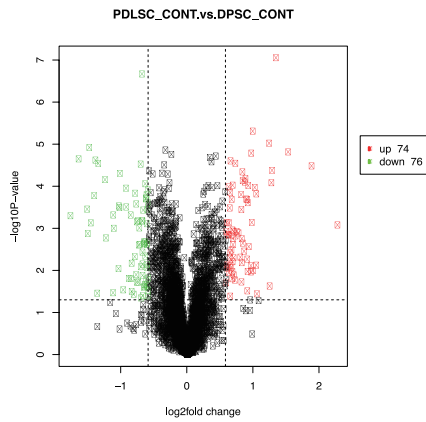


## 信息分析流程

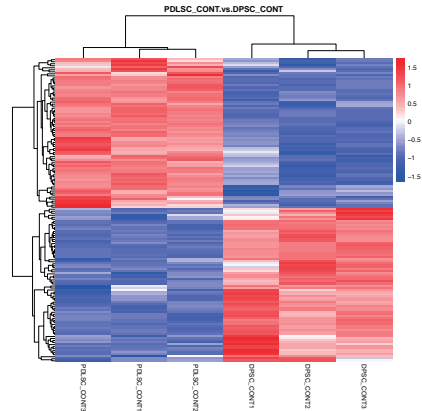


典型结果展示

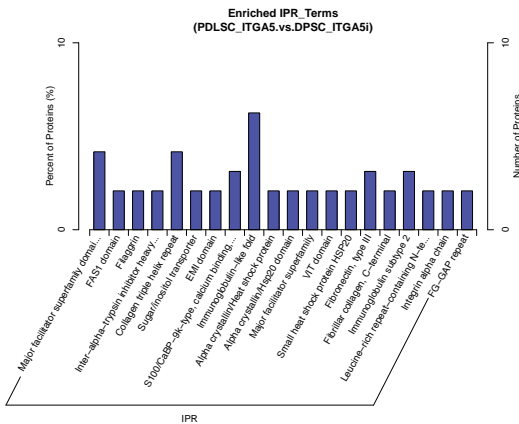
Label-free、iTRAQ/TMT、DIA 定量蛋白质组学典型结果展示



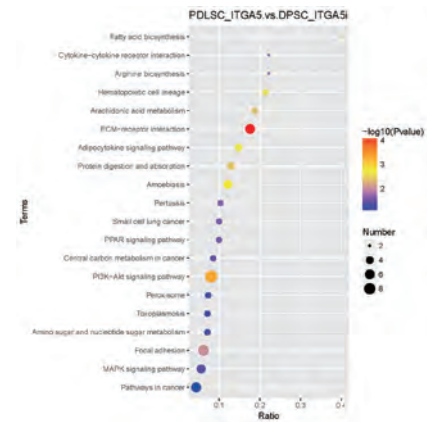
差异蛋白火山图



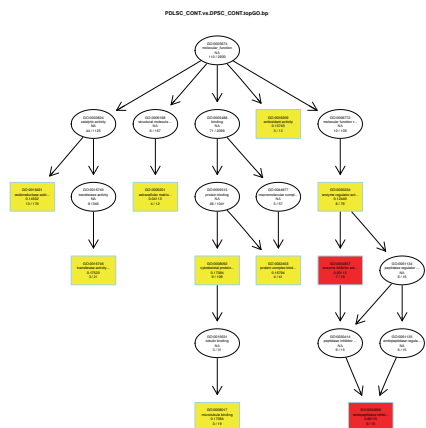
聚类热图



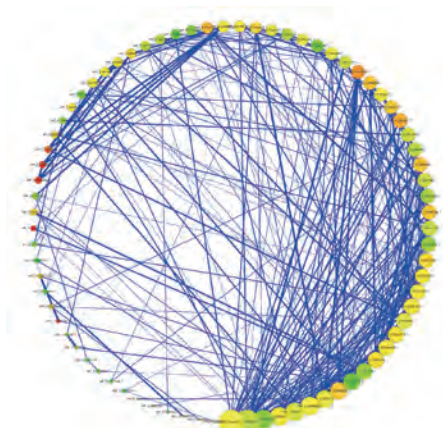
蛋白结构域富集柱状图



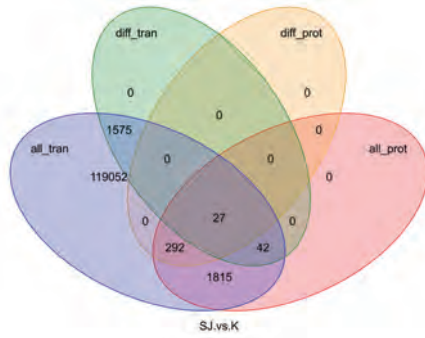
差异蛋白 KEGG 富集气泡图



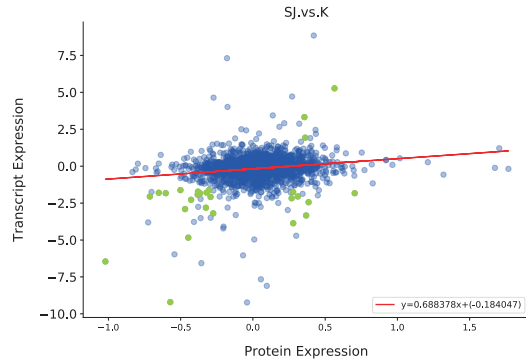
GO 富集有向无环图



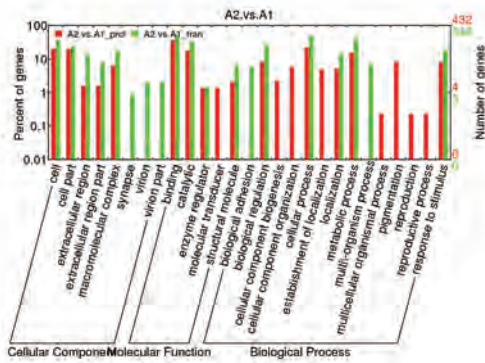
蛋白互作网络图



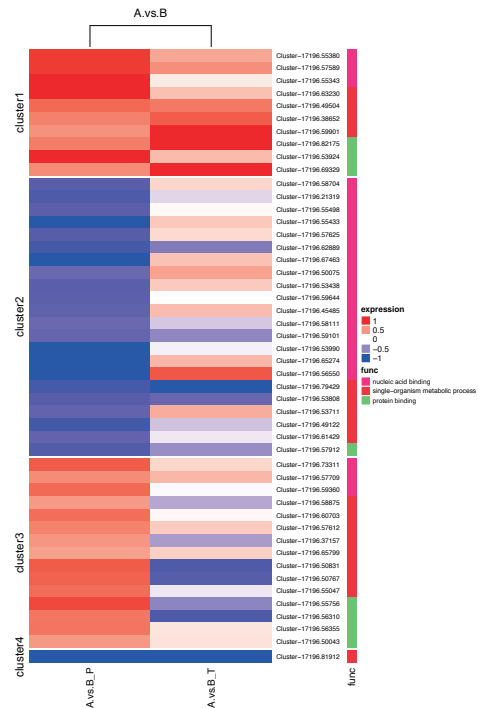
转录组和蛋白组表达调控韦恩图



转录组和蛋白组表达量关联分析



转录组与蛋白组 GO 功能富集关联分析



转录组与蛋白组 GO 功能富集聚类热图

## 技术比较

## 技术特点比较

技术类型	数据扫描模式	是否标记	应用范围	技术特征
Label-free	DDA	否	差异较大的样本 “有无”蛋白比较	不需要昂贵的标记，操作简单 对仪器平台稳定性和重复性要求较高 样品不受限制，应用范围广
iTRAQ	DDA	是	同一物种同一组织类型样本 “共有”蛋白比较	不受样本数目的限制 定量准确，重复性高 鉴定结果可靠，蛋白检测范围广
TMT				
DIA	DIA	否	差异较大的样本 “有无”蛋白比较	数据更加完整 定量准确，重复性高 低丰度蛋白重现性好 样本通量大

## 技术参数比较

产品	质谱平台	承诺指标	周期
Label-free	Thermo Q Exactive™ HF-X	蛋白鉴定数目 3000 以上	40 个自然日
iTRAQ	Thermo Q Exactive™ HF-X	蛋白鉴定数目 5000 以上	50 个自然日
TMT	Thermo Q Exactive™ HF-X	蛋白鉴定数目 8000 以上	50 个自然日
DIA	Thermo Q Exactive™ HF-X	蛋白鉴定数目 6000 以上	60 个自然日

注：每增加 30 个样本，周期增加 10 个自然日，≥ 90 个样本咨询业务线

无法承诺指标的样本类型：坚硬组织（树皮、毛发、老化皮肤、骨组织、指甲、昆虫壳组织、贝壳、钙化组织）；含高丰度蛋白的体液（血液、尿液、唾液、脑脊髓液、卵泡液、细胞或菌类培养基上清）；含高丰度蛋白的组织或细胞（卵细胞、肌肉组织、肌细胞相关组织）；蛋白较少的组织或细胞（动物精子细胞、老化叶片、植物茎、种子）；微生物、藻类（细菌真菌通常覆盖度 60% 或以上）。



典型案例解析

代表性文献盘点

研究对象		研究策略	发表时间	发表期刊	影响因子	链接
农学	番茄果实发育过程	Label free 定量蛋白质组	2017.03	Plant Journal	5.775	PMID: 28112434
农学	秀丽隐杆线虫饥饿应答	Label free 定量蛋白质组 + 转录组	2017.06	Cell Systems	8.982	PMID: 28734827
农学	酵母翻译效率	绝对定量蛋白质组 + 转录组	2017.03	Cell Systems	8.982	PMID: 28365149
农学	枣的枣疯病机理	转录组 + iTRAQ 定量蛋白质组	2017.12	Horticulture Research	3.368	PMID: 29285398
农学	导电磁铁矿对厌氧丙酸降解的影响	宏基因组 + iTRAQ 定量蛋白质组	2017.01	Water Research	7.051	PMID: 27817893
农学	日本虎斑猛水蚤抗逆境	TMT 定量蛋白质组	2017.04	Environmental Science & Technology	6.652	PMID: 28414453
医学	特异性 T 细胞分化	Label free 定量蛋白质组	2017.04	Cell Reports	8.032	PMID: 28467900
医学	早期口腔鳞癌 biomarker 筛选	Label free 定量蛋白质组	2017.06	British Journal of Cancer	5.922	PMID: 28632724
医学	乙型肝炎病毒外泌体传播途径	Label free 定量蛋白质组	2017.02	Molecular & Cellular Proteomics	5.232	PMID: 28242843
医学	B 细胞癌症亚型对比	iTRAQ/TMT 定量蛋白质组	2017.01	Molecular & Cellular Proteomics	5.232	PMID: 28062796
医学	结直肠癌外泌体中蛋白质组研究	TMT 定量蛋白质组	2017.02	International Journal of Cancer	7.360	PMID: 27813080
医学	大肠癌基因改变与蛋白关联	基因组 + TMT 定量蛋白质组	2017.08	Cell Reports	8.032	PMID: 28854368
医学	蛋白互作	TMT 定量蛋白质组	2017.09	Nature Biotechnology	35.724	PMID: 28892078

## 案例一

## 饥饿应答的多组学分析揭示秀丽隐杆线虫中脂蛋白的代谢在饥饿存活中的核心作用

Multi-omics Analyses of Starvation Responses Reveal a Central Role for Lipoprotein  
Metabolism in Acute Starvation Survival in *C. elegans*

研究对象：秀丽隐杆线虫饥饿应答机制 | 期刊：Cell systems  
影响因子：8.982 | 发表单位：南丹麦大学 | 发表时间：2017年6月

## 摘要

Starvation causes comprehensive metabolic changes, which are still not fully understood. Here, we used quantitative proteomics and RNA sequencing to examine the temporal starvation responses in wild-type *Caenorhabditis elegans* and animals lacking the transcription factor HLH-30. Our findings show that starvation alters the abundance of hundreds of proteins and mRNAs in a temporal manner, many of which are involved in central metabolic pathways, including lipoprotein metabolism. We demonstrate that premature death of *hlh-30* animals under starvation can be prevented by knockdown of either *vit-1* or *vit-5*, encoding two different lipoproteins. We further show that the size and number of intestinal lipid droplets under starvation are altered in *hlh-30* animals, which can be rescued by knockdown of *vit-1*. Taken together, this indicates that survival of *hlh-30* animals under starvation is closely linked to regulation of intestinal lipid stores. We provide the most detailed poly-omic analysis of starvation responses to date, which serves as a resource for further mechanistic studies of starvation.

## 关键词

饥饿应答, 线虫, HLH-30, 脂蛋白, Label-free

## 研究背景

饥饿导致全面的代谢变化, 转录因子 HLH-30 调控肠内脂的转运和脂蛋白的表达, 在饥饿应答方面有非常关键的作用。尽管目前已有许多研究揭示了饥饿应答中的调控机制, 但受单一途径的限制, 并没有系统的、全面的分析所有路径中的关联。文章选取了线虫野生型和 HLH-30 突变体, 分别研究了急性饥饿条件下, 蛋白质与转录水平的表达量变化, 通过蛋白质组和转录组的分析, 全面系统的研究线虫急性饥饿胁迫下的应答机制, 脂蛋白代谢和 HLH-30 的重要作用。

## 方法流程

## 取样策略

野生型线虫与 HLH-30 突变体:  
分别取饥饿 0h 为对照组, 取饥饿 1、  
2、3、4、6、16h 为实验组

## 质谱策略

Label-free 定量蛋白质组学

## 信息分析

蛋白质组与转录组差异表达分析,  
功能富集

## 研究结果

### 1. 蛋白定量结果

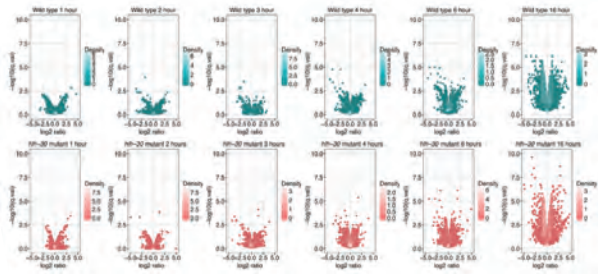


图 1 火山图

(横坐标: 实验组与对照组蛋白丰度的比值以 2 为底取对数; 纵坐标:  $-\log_{10}(q\text{-value})$ ; 图注: 蛋白密度)  
蓝色代表野生型, 红色代表 HLH-30。野生型和 HLH-30 随饥饿时间的延长, 蛋白质水平发生改变, 差异蛋白增多, 差异变大。

### 2. 急性饥饿引起蛋白质组全局性变化

图 2 聚类热图

(横坐标: 样本; 纵坐标: 蛋白; 图注: 蛋白丰度)

将蛋白聚类图按蛋白表达模式进行聚类, ClusterI 和 clusterII 表示蛋白表达上调; ClusterIII 和 clusterIV 表示蛋白表达下调。

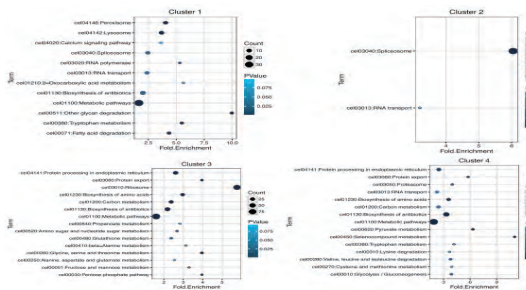
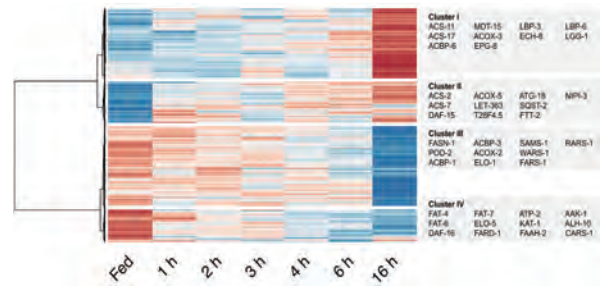


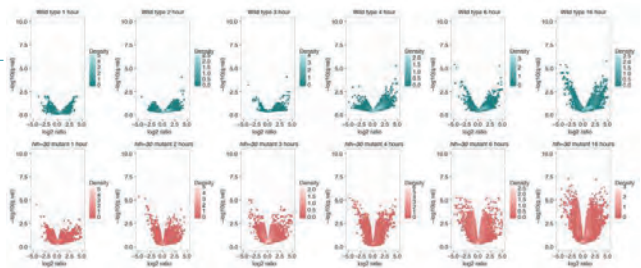
图 3 KEGG 富集点图

(横坐标: 富集倍数; 纵坐标: 富集条目; Count: 蛋白数量; 图注: P-value) ClusterI 中富集到的条目有 Peroxisome、Lysosome、Fattt acid degradation, 说明分解代谢、能量生成途径上调。ClusterIII 和 clusterIV 中富集到的条目包括有 Protein processing in ER、Protein export、Ribosome、Biosynthesis of amino acids, 说明合成代谢途径下调。

### 3. 饥饿引起转录水平的变化, 随饥饿时间的延长, mRNA 差异个数增多, 差异增大。

图 4 火山图

(横坐标: 实验组与对照组 mRNA 丰度的比值以 2 为底取对数; 纵坐标:  $-\log_{10}(q\text{-value})$ ; 图注: 蛋白密度)



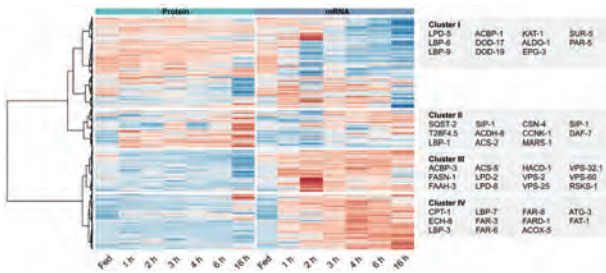


图 5 蛋白质组与转录组聚类热图

(横坐标: 样本; 纵坐标: 蛋白; 图注: 丰度)

按照蛋白质组和 mRNA 的表达模式, 将其分为四个 Cluster。Cluster I 代表蛋白丰度缓慢下降, mRNA 丰度下降; Cluster II 代表蛋白和 mRNA 表达水平上调; Cluster III 和 Cluster IV 代表蛋白表达略有变动, mRNA 表达水平上调。

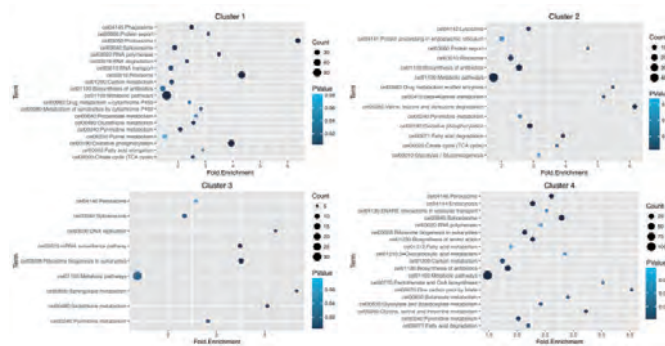


图 6 KEGG 富集点图 (横坐标: 富集倍数; 纵坐标: 富集条目; Count: 蛋白数量; 图注: P-value)

Cluster I 富集到分解代谢途径相关条目, 如 Proteasome、Oxidative phosphorylation、Citrate cycle 与合成代谢途径 Fatty acid elongation; Cluster II 富集到 Lysosome 和 Fatty acid degradation 等与分解代谢相关的途径, 这说明饥饿的应答模式是很复杂的。Cluster III 富集 mRNA 相关的有 Spliceosome、mRNA surveillance pathway 和 Ribosome biogenesis in eukaryotes; Cluster IV 富集到分解代谢 Fatty acid degradation, Peroxisome 和合成代谢 Biosynthesis of amino acids, One carbon pool by folate。Cluster III 和 Cluster IV 中蛋白下调, 然而相应的 mRNA 上调, 为营养充足时的快速应答做准备。

## 研究结论

饥饿引起线虫代谢网络的全局性变化, 且蛋白质与 mRNA 表达水平的变化并不一致。在饥饿应答中, 脂蛋白代谢有很关键的作用, 且 HLH-30 禁食中过早死亡现象可被 vit-1 或 vit-5 的 RNAi 治愈修复。

## 参考文献

Harvald EB, Sprenger RR, Dall KB, et al. Multi-omics Analyses of Starvation Responses Reveal a Central Role for Lipoprotein Metabolism in Acute Starvation Survival in *C. elegans*[J]. Cell systems, 2017, 5(1):38.

## 案例二

### iTRAQ 定量蛋白质组学分析揭示了磁铁矿促进丙酸盐甲烷化

iTRAQ quantitative proteomic analysis reveals the pathways for methanation of propionate facilitated by magnetite

研究对象：导电磁铁矿对厌氧丙酸盐降解的影响 | 期刊：Water Research  
影响因子：7.051 | 发表单位：复旦大学 | 发表时间：2017年1月

## 摘要

Methanation of propionate requires syntrophic interaction of propionate-oxidizing bacteria and hydro-genotrophic methanogens, which is referred to as interspecies electron transfer. The present study showed that 10 mg/L conductive magnetite enhanced the methane production rate from propionate by around 44% in batch experiments, and both direct interspecies electron transfer and interspecies H<sub>2</sub> transfer were thermodynamically feasible with the addition of magnetite. The methanation of propionate facilitated by magnetite was also demonstrated in a long-term operated continuous reactor. The methane production rate from acetate by the enriched mixed culture with magnetite was higher than that without magnetite, while similar methane production rates were found from H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> by the enriched mixed culture with and without magnetite. The ability to utilize molecular H<sub>2</sub> indicated interspecies H<sub>2</sub> transfer played a role in the enriched culture with magnetite, and propionate-oxidizing bacteria relating with interspecies H<sub>2</sub> transfer were also detected by metagenomic sequencing. Meta-genomic sequencing analysis also showed that *Thauera*, possibly relating with direct interspecies electron transfer, were enriched with the addition of magnetite. iTRAQ quantitative proteomic analysis, which was used in mixed culture for the first time, showed that magnetite induced the changes of protein expression levels involved in various pathways during the methanation of propionate. The up-regulation of proteins involved in propionate metabolism were found, and they were mainly originated from propionate-oxidizing bacteria which were not reported to be capable of direct interspecies electron transfer until now. Cytochrome c oxidase was also revealed as the possible protein relating with direct interspecies electron transfer considering its up-regulation with the addition of magnetite and origination from *Thauera*. Most of the up-regulated proteins in methane metabolism were originated from *Methanosaeta*, while most of the enzymes with down-regulated proteins were originated from *Methanosarcina*. However, the up-regulated proteins relating with hydrogenotrophic methanogenesis were originated from neither *Methanosaeta* nor *Methanosarcina*, indicating they were not involved in direct interspecies electron transfer. The hydrogenotrophic methanogens, e.g. *Methanospirillum*, *Methanosphaerula* et al., might be involved in direct interspecies electron transfer. Overall, the present study showed that both direct interspecies electron transfer and interspecies H<sub>2</sub> transfer were present during methanation of propionate facilitated by magnetite.

## 关键词

甲烷，丙酸盐，直接种间 H<sub>2</sub> 电子转移，iTRAQ 定量蛋白质组学分析

## 研究背景

利用微生物厌氧消化有机废弃物用于沼气生产应用普遍。丙酸是厌氧降解有机废物的关键代谢物。丙酸氧化细菌 (POB) 仅在低 H<sub>2</sub> 浓度条件下才可以进行厌氧丙酸氧化。因此，H<sub>2</sub> 清除反应有利于丙酸氧化。丙酸降解产生甲烷需要 POB 和氢营养型产甲烷菌的同步相互作用，这被称为种间电子转移。有效的种间电子转移在产甲烷生态系统中是必不可少的。最近的研究表明，添加导电材料（如磁铁矿）可以提高有机物（如乙酸，乙醇）的厌氧降解速率。本研究通过 iTRAQ 定量蛋白质组学研究添加磁铁矿前后，厌氧丙酸降解代谢途径的变化。

## 方法流程

### 取样策略

培养基加磁铁矿；  
培养基不加磁铁矿

### 质谱策略

宏基因组；  
iTRAQ 宏蛋白质组

### 信息分析

导电磁铁矿促进丙酸盐的甲烷验证  
微生物菌群分析  
定量蛋白组分析  
差异蛋白富集分析

## 研究结果

### 1. 磁铁矿促进丙酸降解，甲烷生成

通过气相色谱分析气体组成；通过 HPLC 测定培养基中乙酸盐，丙酸盐，异丁酸盐，丁酸盐，异戊酸盐和戊酸盐的浓度；通过还原气体检测器（Trace Analytical RGD2）测定液相中的 H<sub>2</sub>。数据证明磁铁矿能促进丙酸降解，甲烷生成；磁铁矿促进的丙酸盐的甲烷化不影响 H<sub>2</sub> 的消耗速率，说明 IHT 在磁铁矿反应中仍然存在。

### 2. 宏基因组分析

磁铁矿的加入导致与 DIET 相关的变形菌门和厚壁菌门的相对丰度略高。基于 DNA 分析不可能揭示由添加磁铁矿引起的实际代谢途径变化。进行了进一步的蛋白质组学分析。

### 3. 蛋白质组分析

鉴定到 9882 个蛋白，470 个差异蛋白，通过差异蛋白 GO/KEGG 富集分析发现，磁铁矿直接或间接地诱导了丙酸向甲烷转化过程中蛋白质表达水平的变化。总体而言，磁铁矿的加入诱导了参与丙酸降解的关键酶的上调表达，并且还鉴定了与 DIET 相关的可能的蛋白质（细胞色素 c 氧化酶）。

### 4. 磁铁矿促进丙酸的甲烷化机理

通过 DIET 和 IHT 以及氢营养型甲烷菌共同实现了丙酸盐甲烷化。

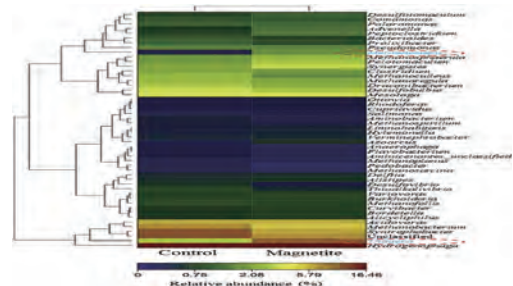


图 1 物种分类热图

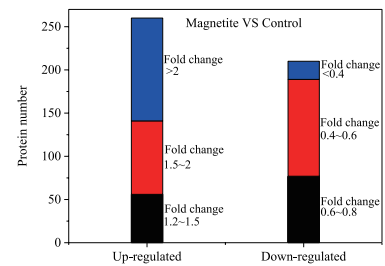


图 2 上调或下调蛋白质的数量

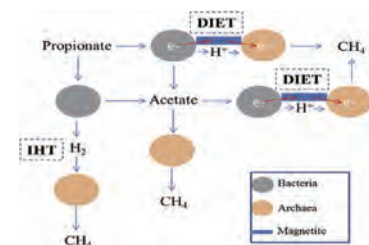


图 3 磁铁矿促进了丙酸的甲烷化机理

## 研究结论

这篇文章从蛋白质组角度去解释了铁磁矿加速丙酸甲烷化的 DIET 机制，对于提高有机废弃物生成沼气率，提高经济效益具有指导意义，研究思路新颖，使我们看到了蛋白质组更广阔的应用前景。

## 参考文献

Jing, Yuhang, et al. "iTRAQ quantitative proteomic analysis reveals the pathways for methanation of propionate facilitated by magnetite." Water Research 108(2017):212-221.

## 案例三

### 定量蛋白表达谱揭示神经元分化的动态变化过程

Quantitative Map of Proteome Dynamics during Neuronal Differentiation

研究对象：神经细胞分化机制 | 期刊：Cell Reports

影响因子：8.032 | 发表单位：乌得勒支大学 | 发表时间：2017年2月

## 摘要

Neuronal differentiation is a multistep process that shapes and re-shapes neurons by progressing through several typical stages, including axon outgrowth, dendritogenesis, and synapse formation. To systematically profile proteome dynamics throughout neuronal differentiation, we took cultured rat hippocampal neurons at different developmental stages and monitored changes in protein abundance using a combination of stable isotope labeling and high-resolution liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Almost one third of all 4,500 proteins quantified underwent a more than 2-fold expression change during neuronal differentiation, indicating extensive remodeling of the neuron proteome. To highlight the strength of our resource, we studied the neural-cell-adhesion molecule 1 (NCAM1) and found that it stimulates dendritic arbor development by promoting actin filament growth at the dendritic growth cone. We anticipate that our quantitative map of neuronal proteome dynamics is a rich resource for further analyses of the many identified proteins in various neurodevelopmental processes.

## 关键词

神经元，轴突，树突，突触，细胞粘附

## 研究背景

神经元分化是一个多步过程，包括轴突生长，树突形成和突触形成等阶段进行神经元的形成和重塑。尽管已有研究报道过神经元分化中 mRNA 水平的变化，但用转录组学方法测量的基因表达变化不能完全反映蛋白质水平测量的变化，另外单个 mRNA 可以被多次翻译，导致情况更加复杂。作者利用定量蛋白质组学，研究了神经元分化不同阶段中蛋白的动态变化情况，及细胞粘附因子在神经元分化中的作用。

## 方法流程

### 取样策略

神经元分化不同阶段的细胞 DIV1(轴突生成)、DIV5(树突产生)、DIV14(突触形成)

### 质谱策略

稳定同位素二甲基标记

### 信息分析

蛋白质定量分析  
差异蛋白聚类分析  
GO 富集分析  
蛋白互作网络分析

## 研究结果

### 1. 神经元分化过程中蛋白表达谱的动态变化

DIV1、DIV5 和 DIV14 中共鉴定到 6,753 个蛋白，而三个分化阶段共有的蛋白有 4,354 个，这其中有 1,793 个蛋白的差异表达变化超过 2 倍，表明在神经元分化期间至少有 1/3 的神经元蛋白质组的重塑 (图 1)。将这些差异蛋白聚类分析，得到 6 个不同表达模式的簇，发现参与细胞周期和 DNA 复制的蛋白在神经元分化早期下调；与 mRNA 代谢相关的蛋白，如转录调控因子 Sox11 在后期上调；与染色体相关的蛋白持续下调；聚糖、氨基酸、脂代谢等与代谢相关的蛋白在后期上调。重要的是，许多的细胞粘附蛋白和细胞信号传导蛋白在 DIV1 到 DIV15 阶段上调，而与突触形成相关的蛋白是持续上调的 (图 2)。

### 2. NCAM1 在树突生长中发挥关键的作用

神经元分化中，突触和细胞粘附蛋白分析显示，细胞粘附因子 NCAM1 在突触生长中是高度富集的。NCAM1 的亚型 NCAM180 在 DIV5 和 DIV16 中高度富集，DIV1-DIV14 免疫染色结果也显示，NCAM1 在树突生长锥中高度富集 (图 3)；用 sh-RNA 敲除 NCAM1 的亚型 NCAM180 后，轴突和树突的生长和分支受到了影响，轴突和树突的长度及树突的分支都减少了。

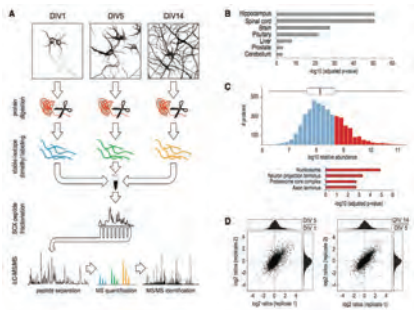


图 1 发育的海马神经细胞的蛋白质组学定量分析 (图 1A. 蛋白质组学实验和分析流程图; 图 1B. 鉴定到的蛋白在组织中的富集; 图 1C. 蛋白丰度分布; 图 1D. 样本重复性分析)

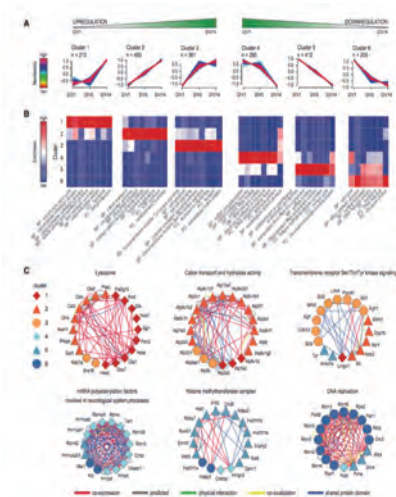


图 2 神经元分化的蛋白质组的动态变化 (图 2A. 差异蛋白聚类分析; 图 2B. GO 富集分析; 图 C. 蛋白互作网络图)

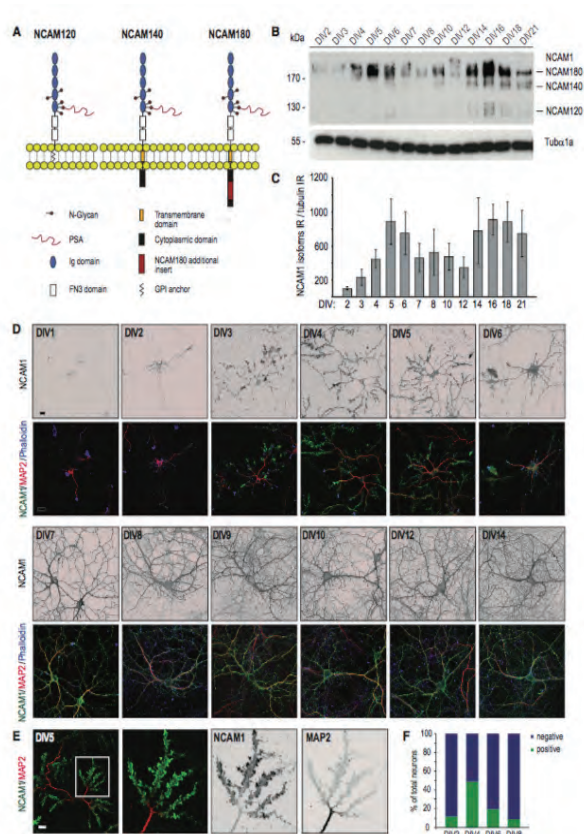


图 3 细胞粘附分子 NCAM1 在神经元发育中的表达 (图 3A. NCAM1 三种亚型图; 图 3B/C. NCAM1 在海马神经细胞 DIV1-DIV21 发育阶段的 western blot 分析; 图 3D. DIV1-DIV21 的免疫染色分析)



### 3. NCAM1 通过调节肌动蛋白稳定性来调控树突的生长

NCAM1 相结合蛋白分析发现, 与肌动蛋白结合、稳定或者稳定聚合相关的蛋白是 NCAM1 主要的互作蛋白, 在年幼小鼠中富集度更高。茉莉酮苷是一种能够稳定肌动蛋白纤维, 促进肌动蛋白聚合的药物。茉莉酮苷处理 NCAM1 敲除的细胞株发现, 轴突和树突的长度及树突的分支削减现象可以被部分恢复, 说明 NCAM1 通过调节肌动蛋白稳定性来调控树突的生长 (图 5)。

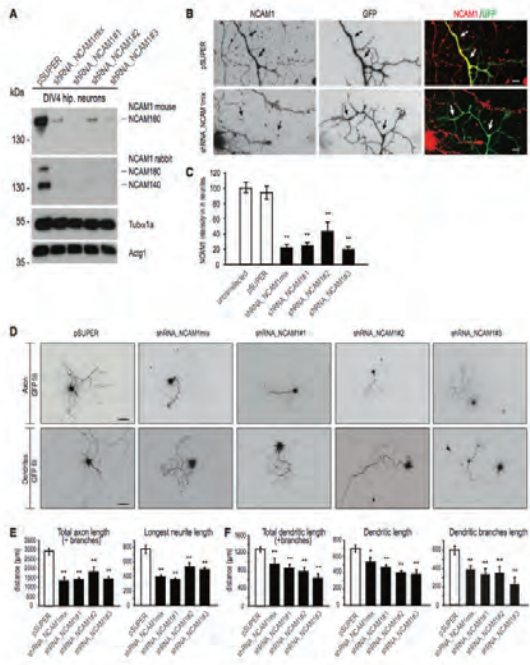


图 4 sh-RNA 介导敲除神经元的 NCAM1 (图 4A. sh-RNA 敲除 NCAM1 的 DIV4 阶段的 western blot; 图 4B. 神经元海马细胞敲除 NCAM1 的 DIV4 阶段分析; 图 4C. NCAM1 染色荧光强度定量结果; 图 4D. DIV1-DIV7 形态学测定; 图 4E/F. 轴突和树突形态学参数定量)

### 研究结论

作者运用同位素标记质谱技术进行了定量蛋白质组学分析, 研究了对海马神经元发育的每个特定阶段差异表达的蛋白质分析, 进而研究了细胞粘附因子 NCAM1 通过在树突生长锥上促进肌动蛋白丝的生长来刺激树突发育。

### 参考文献

Frese C K, Mikhaylova M, Stucchi R, et al. Quantitative Map of Proteome Dynamics during Neuronal Differentiation[J]. Cell Reports, 2017, 18(6):1527-1542.

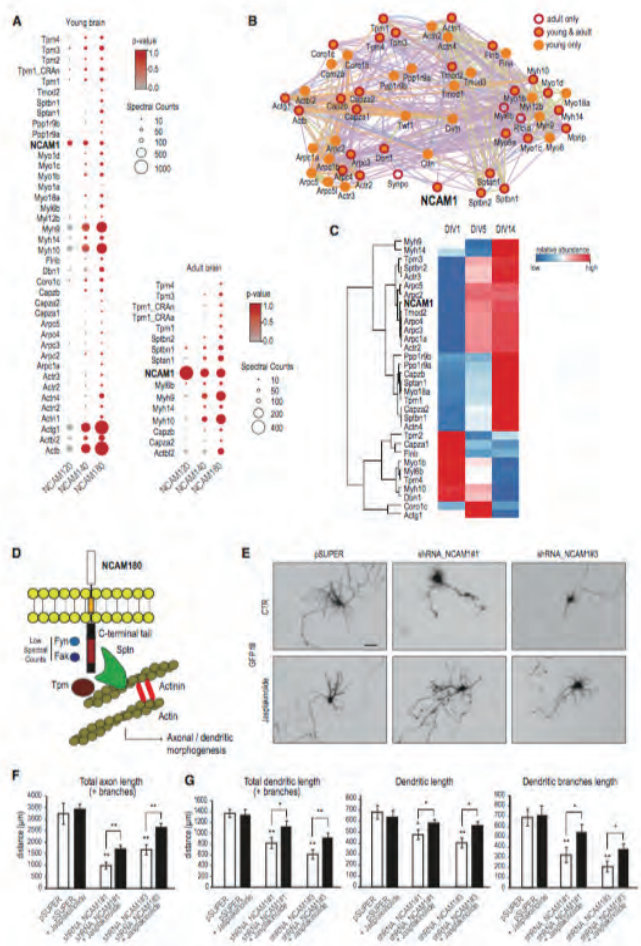


图 5 NCAM1 及其在肌动蛋白细胞骨架稳定中的作用 (图 5A. 年幼和老年小鼠脑的 NCAM1 互作因子分析; 图 5B. NCAM180 与肌动蛋白细胞骨架结合的蛋白网络分析; 图 5C. NCAM1 互作蛋白聚类分析; 图 5D. NCAM180 相关的肌动蛋白; 图 5E. 用 DMSO 或茉莉酮苷处理的原代海马神经元细胞的 DIV1-DIV7 的形态学分析; 图 5F/G. 轴突和树突的形态学参数定量)

## 案例四

### TMT 技术揭示小鼠附睾脂肪组织中年龄和高脂饮食特异性蛋白质组变化

Extended multiplexing of TMT labeling reveals age and high fat diet specific proteome changes in mouse epididymal adipose tissue

研究对象：小鼠脂肪组织代谢机制 | 期 刊：Molecular & Cellular Proteomics

影响因子：6.540 | 发表单位：美国俄勒冈州健康与科学大学 | 发表时间：2017 年 5 月

## 摘要

The lack of high-throughput methods to analyze the adipose tissue protein composition limits our understanding of the protein networks responsible for age and diet related metabolic response. We have developed an approach using multiple-dimension liquid chromatography tandem mass spectrometry and extended multiplexing (24 biological samples) with TMT labeling to analyze proteomes of epididymal adipose tissues isolated from mice fed either low or high fat diet for a short or a long-term, and from mice that aged on low vs. high fat diets. The peripheral metabolic health (as measured by body weight, adiposity, plasma fasting glucose, insulin, triglycerides, total cholesterol levels, and glucose and insulin tolerance tests) deteriorated with diet and advancing age, with long-term high fat diet exposure being the worst. In response to short-term high fat diet, 43 proteins representing lipid metabolism (e.g., AACS, ACOX1, ACLY) and red-ox pathways (e.g., CPD2, CYP2E, SOD3) were significantly altered (FDR < 10%). Long-term high fat diet significantly altered 55 proteins associated with immune response (e.g., IGTB2, IFIT3, LGALS1) and rennin angiotensin system (e.g. ENPEP, CMA1, CPA3, ANPEP). Age-related changes on low fat diet significantly altered only 18 proteins representing mainly urea cycle (e.g., OTC, ARG1, CPS1), and amino acid biosynthesis (e.g., GMT, AKR1C6). Surprisingly, high fat diet driven age-related changes culminated with alterations in 155 proteins involving primarily the urea cycle (e.g., ARG1, CPS1), immune response/complement activation (e.g., C3, C4b, C8, C9, CFB, CFH, FGA), extracellular remodeling (e.g., EFEMP1, FBN1, FBN2, LTBP4, FERMT2, ECM1, EMILIN2, ITIH3) and apoptosis (e.g., YAP1, HIP1, NDRG1, PRKCD, MUL1) pathways. Using our adipose tissue tailored approach we have identified both age-related and high fat diet specific proteomic signatures highlighting a pronounced involvement of arginine metabolism in response to advancing age, and branched chain amino acid metabolism in early response to high fat feeding. Data are available via ProteomeXchange with identifier PXD005953.

## 关键词

肥胖，小鼠模型，调控网络，脂肪组织生物学，炎症，胰岛素抵抗

## 研究背景

肥胖，超重是当代人不可避免的问题，可引起糖尿病，高血压，血脂异常和动脉粥样硬化等有关的全球性流行病发病率增加。腹内脂肪组织是参与全身能量代谢的多功能内分泌器官，腹部白色脂肪组织中肥胖相关的生物学和代谢变化可阐明其在肥胖相关代谢并发症中的作用。

## 方法流程

### 取样策略

低脂喂养 8 周和 18 周  
高脂喂养 8 周和 18 周  
四组（每组 5 只）共 20 只小鼠  
取附睾脂肪组织

### 质谱策略

TMT 定量蛋白质组

### 信息分析

身体代谢指标统计  
差异蛋白分析  
蛋白互作网络图

## 研究结果

### 1. 高脂饮食易造成代谢紊乱

经过 18 个月高脂饮食喂养，小鼠出现了代谢状态系统性紊乱，随时间增长逐渐加剧。在低脂状态下，衰老是引起代谢紊乱主要因素，但紊乱程度较高脂环境要轻。

### 2. 蛋白质组改变伴随代谢紊乱发生

通过对比分析组间定量蛋白质组学数据的差异，研究人员发现衰老是引起蛋白质组变化的重要因素。而在高脂环境下，衰老对于蛋白质组的影响将被放大，表现为代谢相关差异蛋白显著增多。低脂饮食驱使的与年龄有关的差异蛋白有 18 个，高脂饮食达到 155 个。

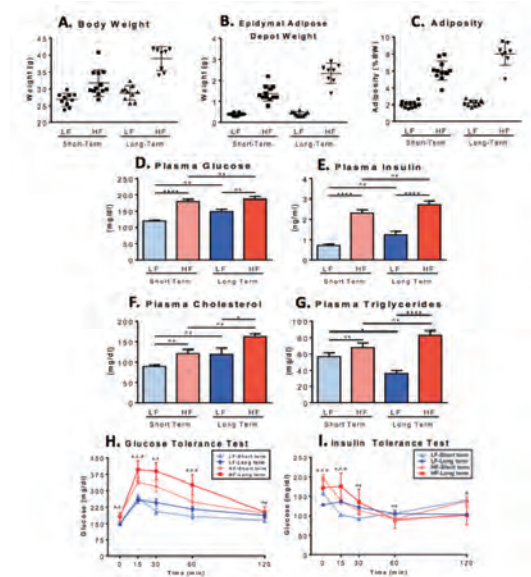


图 1 身体代谢指标统计

3. 通过对差异蛋白谱进行蛋白互作网络分析和 GO 功能分析，进一步明确了，衰老因素主要通过调控脂代谢、氨基酸代谢相关蛋白群改变引发代谢紊乱。而在高脂环境下，衰老对免疫系统、补体激活、基质重塑等蛋白群又产生了新的影响，造成了更严重的代谢紊乱发生。

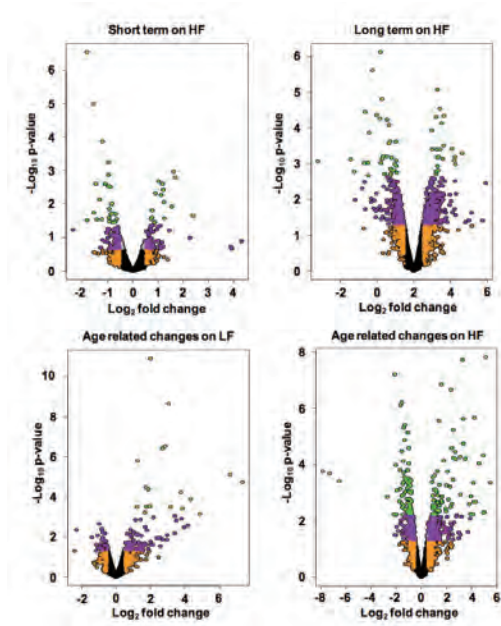


图 2 差异表达蛋白火山图

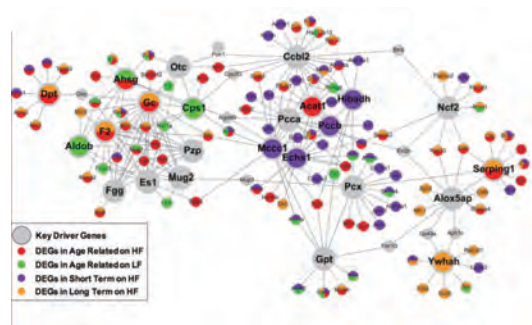


图 3 差异蛋白谱互作网络分析

## 研究结论

作者运用 TMT 标记质谱技术对小鼠附睾脂肪组织进行了定量蛋白质组学分析，结果发现衰老是引起蛋白质组变化的重要因素。而在高脂环境下，衰老对于蛋白质组的影响将被放大，由 18 个差异蛋白增至 155 个。加深了年龄和饮食相关代谢响应的蛋白质网络的理解。

## 参考文献

Plubell, D. L., et al. "Extended Multiplexing of Tandem Mass Tags (TMT) Labeling Reveals Age and High Fat Diet Specific Proteome Changes in Mouse Epididymal Adipose Tissue." *Molecular & Cellular Proteomics* 16.5(2017):873-890.

# 修饰蛋白质组

蛋白质发生翻译后修饰时其分子质量会发生相应的改变，通过质谱能够精确测定蛋白质或多肽的分子质量。同时，由于发生翻译后修饰的蛋白质在样本中含量低且动态范围广，所以在质谱检测前需要对发生修饰的蛋白质或肽段进行富集。蛋白定量技术和修饰富集技术相结合，可对样本中翻译后修饰进行相对定量，筛选差异修饰位点和差异修饰蛋白。

随着蛋白质组学技术的不断发展，特别是修饰蛋白质及肽段的分离和富集，质谱仪器平台灵敏度和分辨率的不断提升，修饰蛋白质组已成为蛋白质组学研究的一个重要领域。



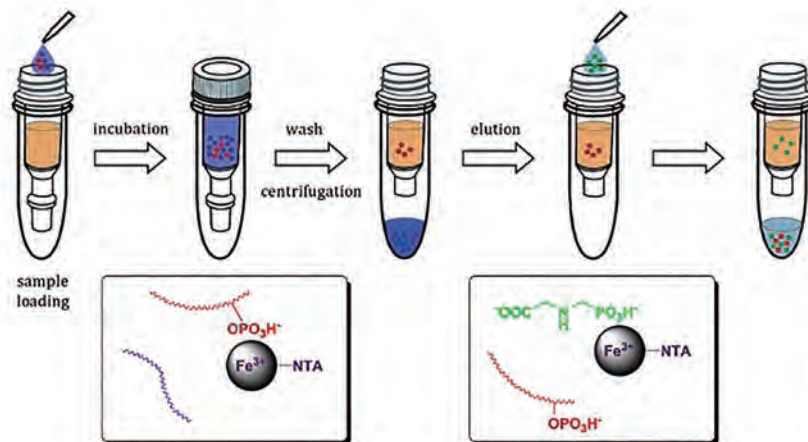
## 磷酸化蛋白质组

蛋白质磷酸化 (Phosphorylation) 是指蛋白质在磷酸化激酶的催化下把 ATP 或 GTP 上的  $\gamma$  位磷酸基转移到蛋白质的特定位点 (氨基酸残基 Ser、Tyr、Thr) 上的过程。

磷酸化是一种非常重要且广泛存在于原核生物和真核生物中的翻译后修饰调控方式, 细胞内至少有 30% 的蛋白质被磷酸化修饰。蛋白质的磷酸化和去磷酸化是调节和控制蛋白质活力和功能最普遍, 也是最重要的调控机制, 参与生命活动的各种生理和病理过程, 调控细胞的增殖、发育、分化、凋亡, 细胞骨架调控、神经活动、肌肉收缩、新陈代谢及肿瘤发生等, 对许多生物的细胞功能起着生物“开/关”作用。

### 基本原理介绍

固相金属离子亲和色谱 (immobilized metal affinity chromatography, IMAC) 是最为常用的分离磷酸化肽段的方法, 其富集原理是: 带正电的金属离子, 如  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Ga}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  可以与带负电的磷酸基团产生静电交互作用而结合。这种结合能力受到 PH 值、离子强度和溶液有机相的影响。在高 PH 值或磷酸盐存在的缓冲液中, 金属离子与磷酸基团间的结合被破坏, 磷酸化肽被释放出来。



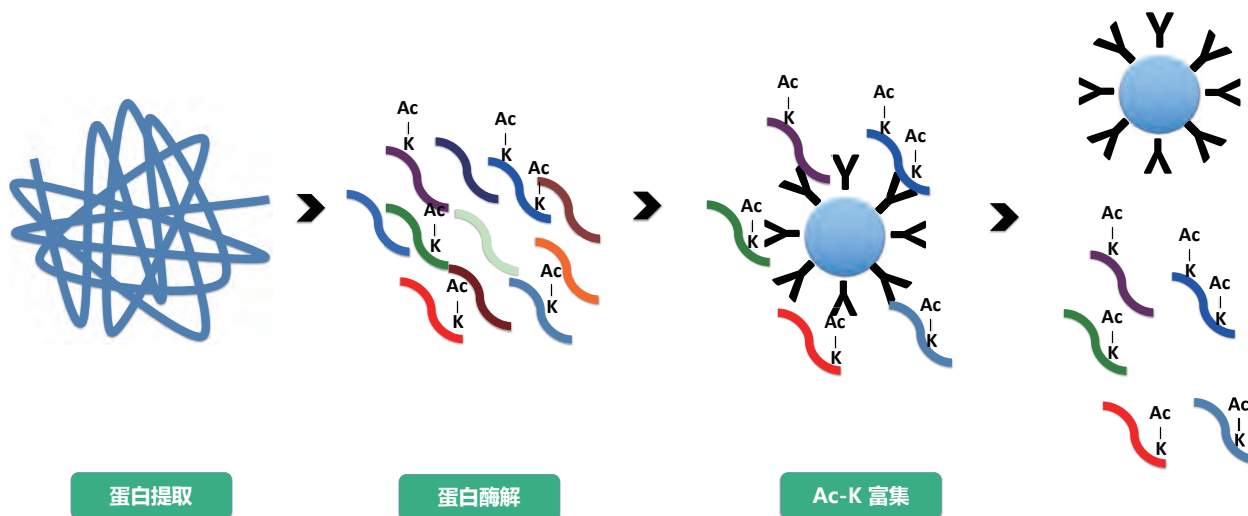
## 乙酰化蛋白质组

蛋白质乙酰化 (Acetylation) 是指在乙酰基转移酶 (HATs/KATs) 的催化下把乙酰基团 (如乙酰辅酶 A 等供体) 共价结合到底物蛋白质中赖氨酸残基上的过程, 主要发生在蛋白质赖氨酸残基的  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> 位。蛋白质去乙酰化是在去乙酰化酶 (HDACs/KDACs) 作用下的可逆性修饰过程。

蛋白质乙酰化修饰由乙酰基转移酶和去乙酰化酶共同调节。蛋白质乙酰化参与了几乎所有的生物学过程, 如转录、应激反应、新陈代谢以及蛋白合成与降解等, 除了影响细胞染色体结构以及对核内转录调控因子的激活外, 对蛋白质的功能也可以产生很大的影响, 包括酶的活化与失活, 蛋白质稳定性, 亚细胞结构定位和特殊功能复合体的形成等。蛋白质乙酰化应用广泛, 在代谢疾病中发挥着重要的调控作用, 而且去乙酰化酶抑制剂已经成为治疗心脏病、糖尿病和癌症等多种疾病的潜在试剂。

### 基本原理介绍

用于乙酰化蛋白质组学的 AcylScan® 技术使用专利抗体来靶向胰蛋白酶消化后含有乙酰基 (Ac - K) 的肽段。乙酰化肽富集完成后, 利用液相色谱 - 串联质谱对其进行检测。将乙酰化抗体富集技术和定量蛋白质组学技术结合, 可实现对乙酰化蛋白质大规模定性定量分析。



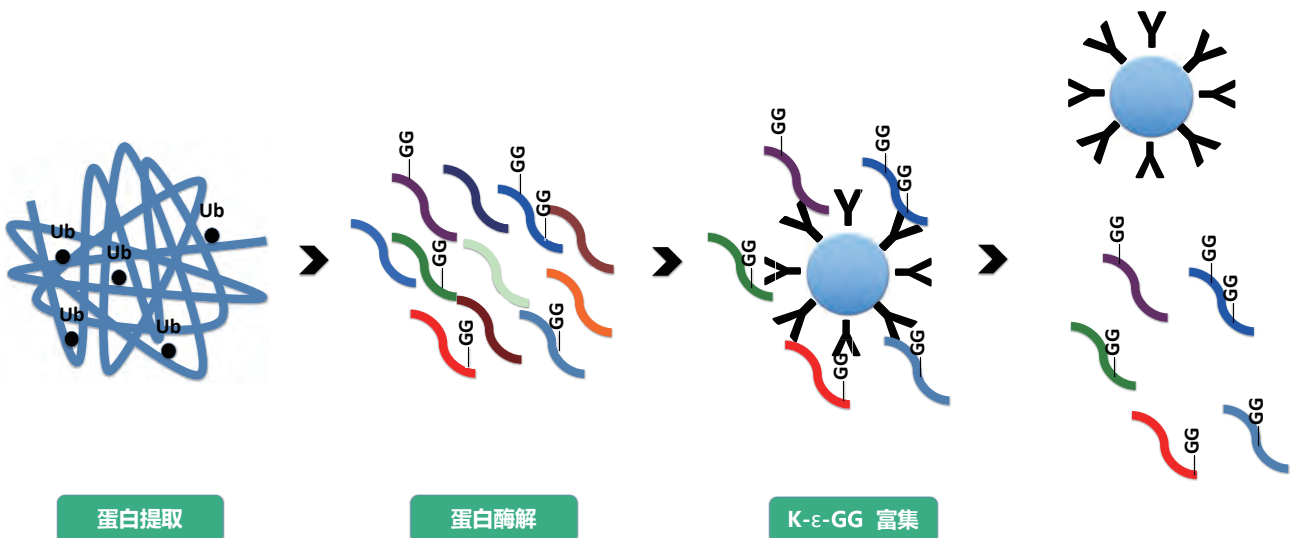
## 泛素化蛋白质组

泛素 (Ubiquitin) 是一种由 76 个氨基酸构成，在真核生物中广泛存在并具有高度保守性的多肽。一个或多个泛素分子在一系列酶的作用下与底物蛋白质分子共价结合的翻译后修饰过程称为泛素化修饰 (Ubiquitination/ Ubiquitylation)。

蛋白质泛素化修饰是一种重要的翻译后修饰，在蛋白质的定位、代谢、功能调节和降解中都起着十分重要的作用。同时，它也参与了细胞周期、增殖、凋亡、分化、转移，基因表达、转录调节、信号传递、损伤修复、炎症免疫等几乎一切生命活动的调控。泛素化与肿瘤、神经退行性病变、肌肉营养不良、免疫疾病、心血管疾病以及代谢综合症的发病密切相关。

### 基本原理介绍

用于泛素化蛋白质组学的 UbiScan® 技术，使用专利抗体来靶向胰蛋白酶消化后，遗留在泛素化赖氨酸残基上的二甘氨酸残基 (K-ε-GG)，该泛素残基抗体可对数千个非冗余的泛素化序列进行富集。泛素化肽富集完成后，利用液相色谱-串联质谱对其进行检测。将泛素化抗体富集技术和定量蛋白质组学技术结合，可实现对泛素化蛋白质大规模定性定量分析。



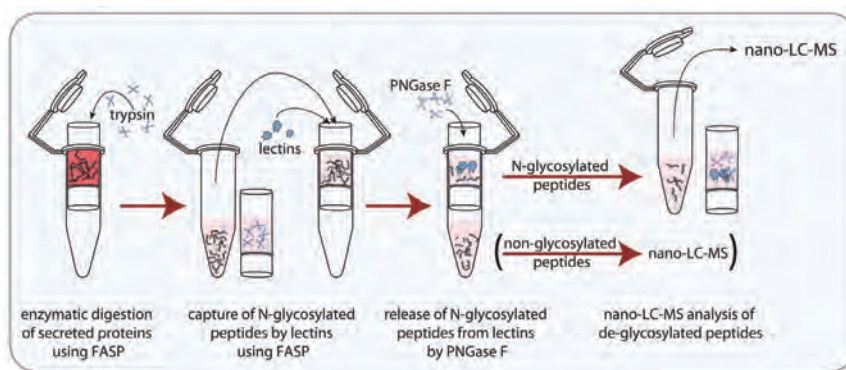
## N-糖基化蛋白质组

糖基化 (Glycosylation) 是指蛋白质在酶的作用下被连接上糖链的过程, 糖通过与蛋白质的天冬酰胺的自由  $\text{NH}_2$  基连接, 称为 N-连接的糖基化 (N-glycosylation)。糖基化的第一步是将一个 14 糖的核心寡聚糖添加到新形成多肽链的天冬酰胺上, 其氨基酸的特征序列是 N-X-S/T (X 代表除脯氨酸以外的任何一种氨基酸), 天冬酰胺 (N) 作为受体。

糖基化调控了蛋白质在组织和细胞中的定位、功能、活性、寿命和多样性, 参与细胞的识别、分化、发育、信号传导、免疫应答等在内的各种重要的生命活动。在各种疾病, 如肿瘤、神经退行性疾病、心血管病、代谢性疾病、免疫性疾病及感染性疾病的发生发展中均伴随着蛋白质糖基化异常的发生。

### 基本原理介绍

凝集素 (lectin) 是一类糖结合蛋白质, 能专一识别某一特殊结构的单糖或聚糖中特定的糖基序列并与其可逆非共价结合, 糖蛋白或糖肽被凝集素捕获之后, 通常用特定的单糖通过竞争结合凝集素将糖蛋白或糖肽洗脱下来。蛋白质经过酶解后利用凝集素 (lectin) 富集 N-糖基化肽段, 然后用 N-糖酰胺酶 (PNGase) 在  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  中切除连接在天冬酰胺残基 (Asn) 上的糖链。该处理致使 Asn 分子量增加 2.9890Da。最后用高精度 LC-MS 质谱仪检测脱糖后的肽段, 并通过 Proteome Discoverer2.2 软件检索数据库, 确认脱糖后分子量与其理论分子量的变化以及糖基化修饰肽段的序列, 从而确定该蛋白质的 N-糖基化位点。将糖基化抗体富集技术和定量蛋白质组学技术结合, 可实现对糖基化蛋白质大规模定性定量分析。



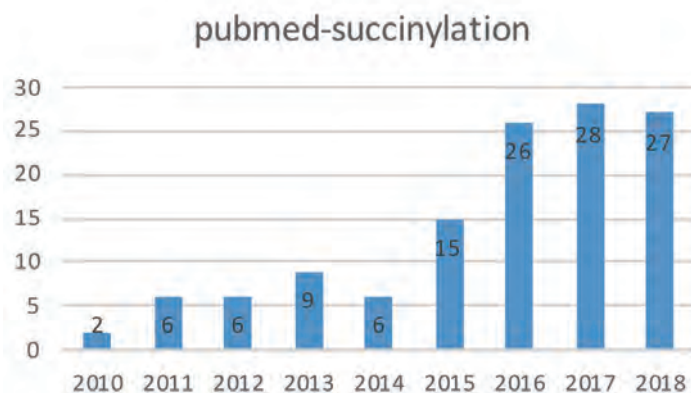


## 琥珀酰化蛋白质组

蛋白质琥珀酰化 (Succinylation) 修饰是指琥珀酰基团供体，如琥珀酰辅酶 A，通过酶学或者非酶学的方式将琥珀酰基团共价结合到底物蛋白质的赖氨酸残基上的过程。

琥珀酰化修饰赋予赖氨酸基团 2 个负电荷，能够引发更多蛋白质特性的改变，且琥珀酰基团空间结构较大，对于蛋白质结构和功能的影响更为显著。

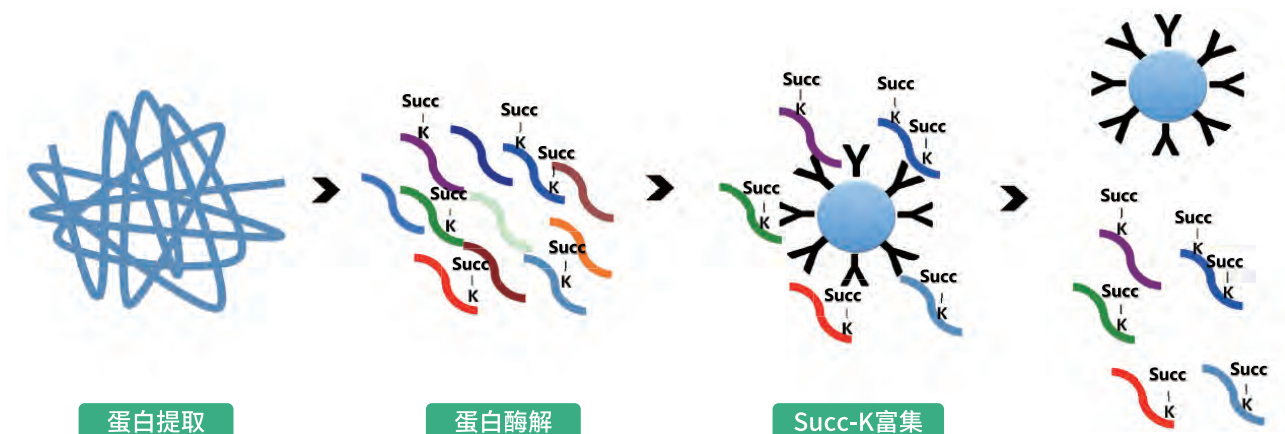
琥珀酰化日益成为当前研究热度较高的一种新的翻译后修饰类型，文章发表数量也逐年增加。



125篇琥珀酰化相关文章

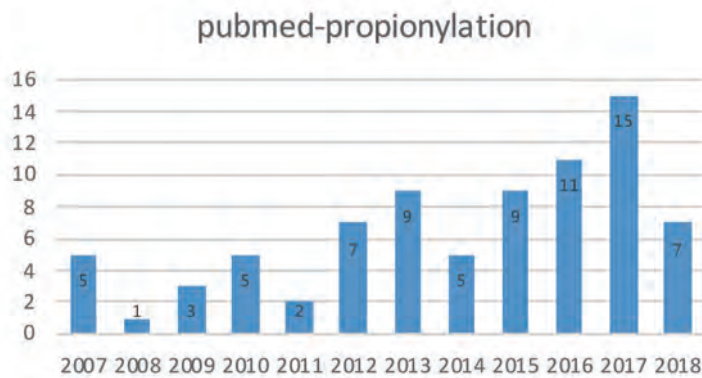
### 基本原理介绍

诺禾致源琥珀酰化蛋白质组学基于 SuccScan® 技术，使用 CST 专利抗体富集含有琥珀酰基 (Succ-K) 的肽段，然后利用 LC-MS 进行检测，可获得全面的定量定性信息，从而实现了对生物功能的深度挖掘。



# 丙酰化蛋白质组

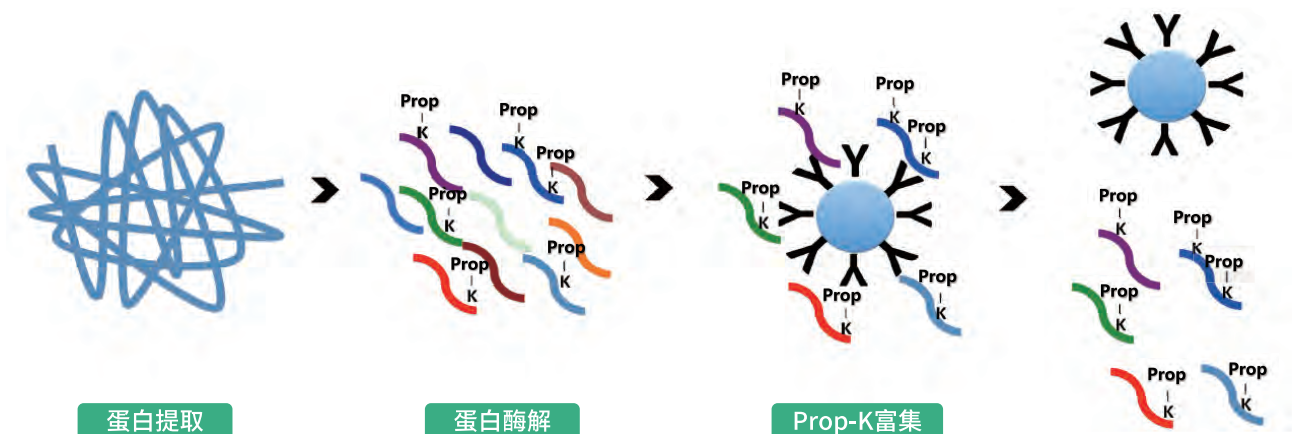
蛋白质丙酰化 (Propionylation) 修饰指在酰基转移酶 (如乙酰基转移酶) 的作用下催化丙酰基团 (如丙酰辅酶 A 等供体) 共价结合到底物蛋白质中赖氨酸残基上的过程。赖氨酸丙酰化修饰是酰化修饰的重要组成部分, 相关文章至今已有近 80 篇, 并逐年递增。



79篇丙酰化相关文章

## 基本原理介绍

诺禾致源丙酰化蛋白质组学基于 PTMScan® 技术, 使用 CST 专利抗体富集含有丙酰基 (Prop-K) 的肽段, 然后利用 LC-MS 进行检测, 可获得全面的定性定量信息, 从而实现对生物功能的深度挖掘。



## 多通路磷酸化 (Multi-pathway)

多通路磷酸化 (Multi-pathway) 是一款基于质谱的信号通路全景筛查产品。相应的抗体可富集并定性定量至少 800 种已知的蛋白和至少 4000 个磷酸化位点，涵盖 19 条经典的信号通路，是样本中靶蛋白高通量筛选和检测的稳健方法。

### 基本原理介绍

多通路磷酸化 (Multi-pathway) 是诺禾致源基于 CST 公司的 Multi-Pathway Enrichment Kit 试剂盒而研发的多通路修饰蛋白质组学产品，可同时对多个通路上的磷酸化肽进行富集。



各种排列在 PTMScan® 多通路免疫亲和蛋白 A 微珠矩阵上的抗体，不同颜色代表不同抗体

## 19 条经典的信号通路

经典信号通路	应用方向
Adherens Junction Dynamics	黏附与细胞外基质
AMPK Signaling	细胞代谢
B Cell Receptor Signaling	免疫和炎症
Cell Cycle Control:G1/S Checkpoint	细胞周期、检查点控制与 DNA 损伤
Cell Cycle Control:G2/M DNA Damage Checkpoint	细胞周期、检查点控制与 DNA 损伤
ErbB/HER Signaling	酪氨酸激酶
G Protein-coupled Receptor Signaling to MAPK/Erk	MAP 激酶信号转导
Insulin Receptor Signaling	细胞代谢
Jak/Stat Signaling:IL-6 Receptor Family	免疫和炎症
MAPK Signaling Cascades	MAP 激酶信号转导
MAPK/Erk in Growth and Differentiation	MAP 激酶信号转导
NF- $\kappa$ B Signaling	免疫和炎症
PI3 Kinase/Akt Signaling*	PI3/Akt 信号转导
Regulation of Action Dynamics	细胞骨架调控与囊泡运输
Regulation of Microtubule Dynamics	细胞骨架调控与囊泡运输
SAPK/JNK Signaling Cascades	MAP 激酶信号转导
Signaling Pathways Activating p38 MAPK	MAP 激酶信号转导
T cell Receptor Signaling	免疫和炎症
Toll-like Receptor Signaling	免疫和炎症

## 产品优势

通路筛查结果准确可靠，  
可靶向分析蛋白位点及信号转导节点

高精度

多通路

全景筛查多个信号通路磷酸化修饰

定性定量信号通路相关蛋白800+  
和磷酸化位点4000+

高通量

应用广

便于药物靶点、生物标记物发现  
或诊断学发展

技术参数

产品类型	氨基酸位点	富集方式	仪器平台	周期
磷酸化	Ser /Thr/Tyr	IMAC-Fe	Thermo Q Exactive™ HF-X	60 个自然日
乙酰化	Lys	Ac-K 抗体 (CST)		60 个自然日
琥珀酰化	Lys	Succ-K 抗体 (CST)		60 个自然日
丙酰化	Lys	Prop-K 抗体 (CST)		60 个自然日
泛素化	Lys	K-ε-GG 抗体 (CST)		60 个自然日
N-糖基化	Asn	凝集素 (Sigma)		60 个自然日
多通路磷酸化	Ser /Thr/Tyr	Multi-pathway 抗体 (CST)		60 个自然日

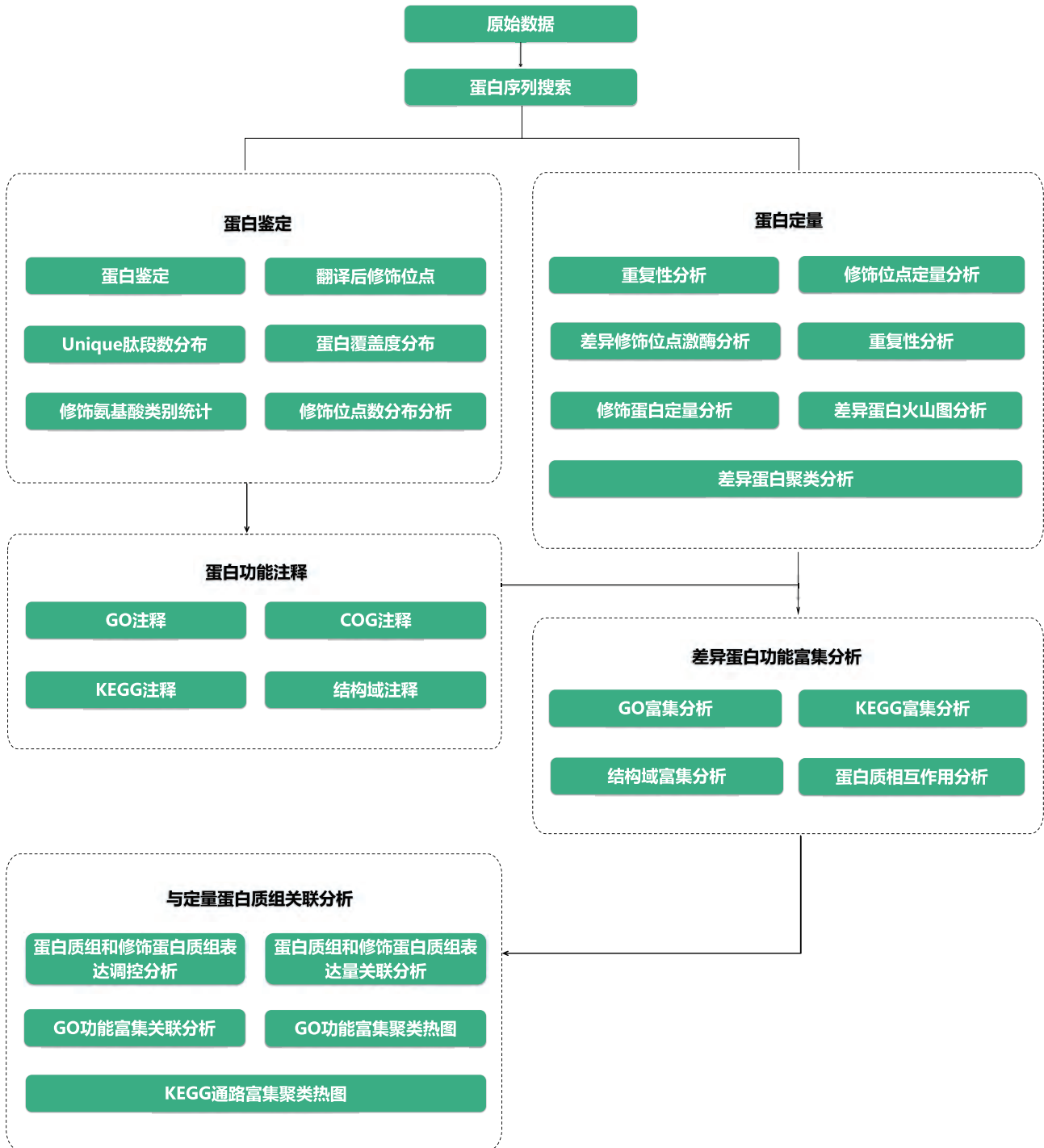
注：每增加 30 个样本，周期增加 10 个自然日，≥ 90 个样本咨询业务线

无法承诺指标的样本类型：**坚硬组织**（树皮、毛发、老化皮肤、骨组织、指甲、昆虫壳组织、贝壳、钙化组织）；**含高丰度蛋白的体液**（血液、尿液、唾液、脑脊髓液、卵泡液、细胞或菌类培养基上清）；**含高丰度蛋白的组织或细胞**（卵细胞、肌肉组织、肌细胞相关组织）；**蛋白较少的组织或细胞**（动物精子细胞、老化叶片、植物茎、种子）；**微生物、藻类**（细菌真菌通常覆盖度 60% 或以上）。

实验流程



信息分析流程



典型结果展示

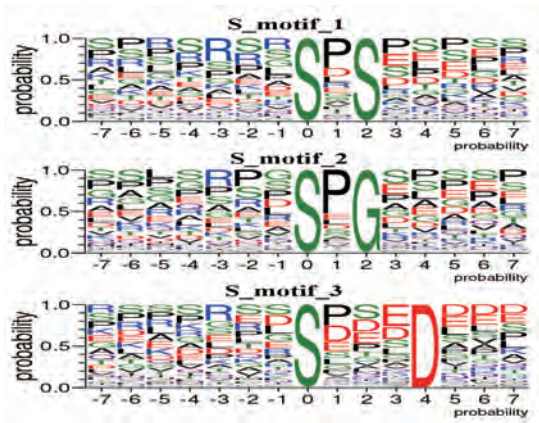


图 1 motif 分析

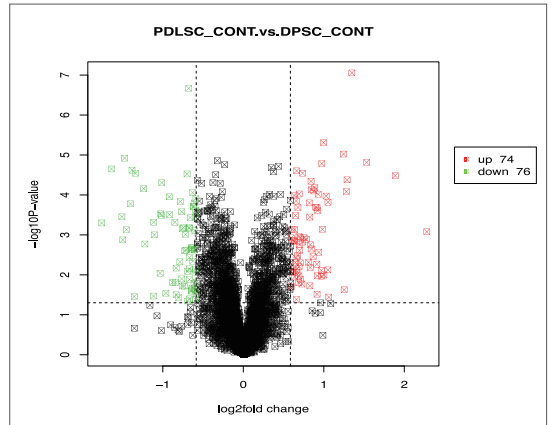


图 2 火山图分析

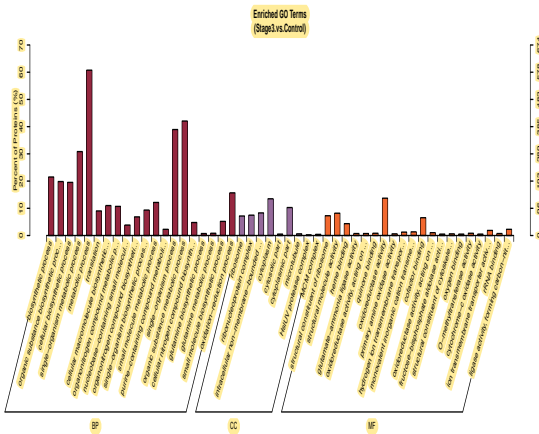


图 3 GO 富集分析

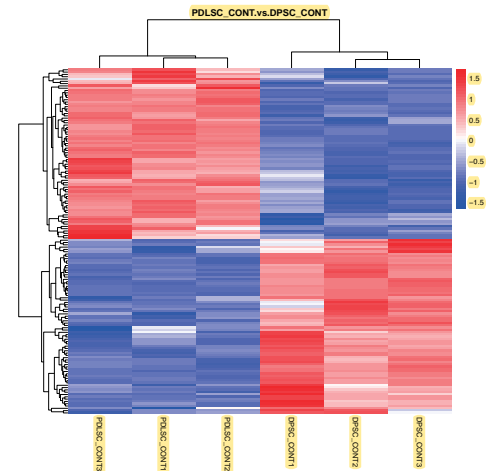


图 4 表达聚类热图分析

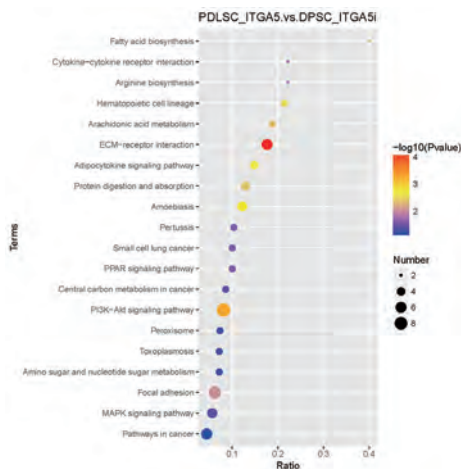


图 5 KEGG 富集分析

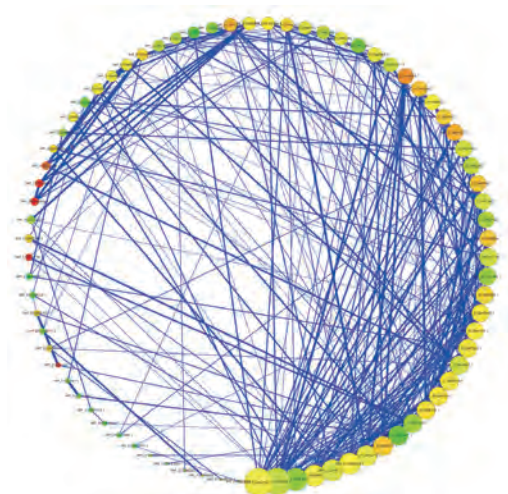


图 6 相互作用网络图

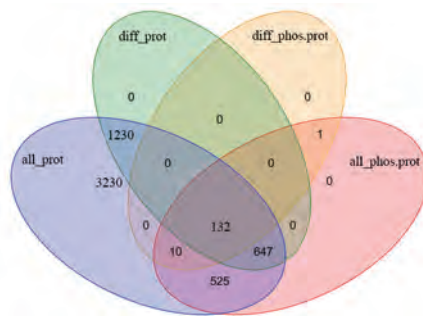


图 7 定量蛋白质组和修饰蛋白质组表达调控韦恩图

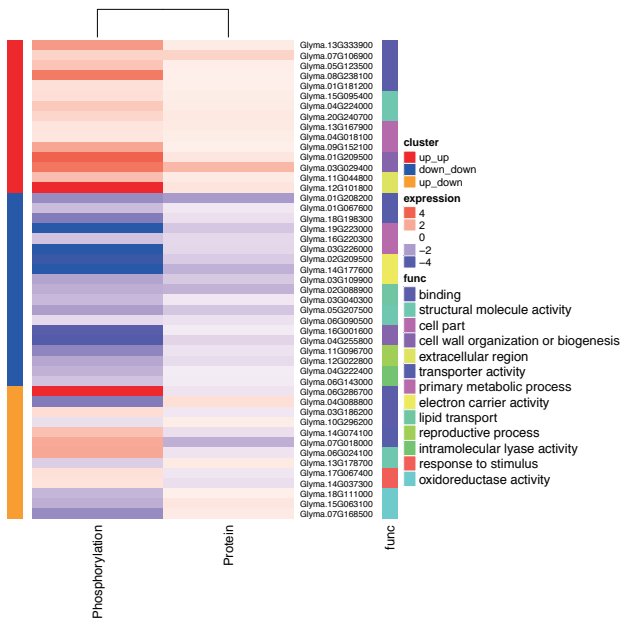


图 8 GO 功能富集聚类热图

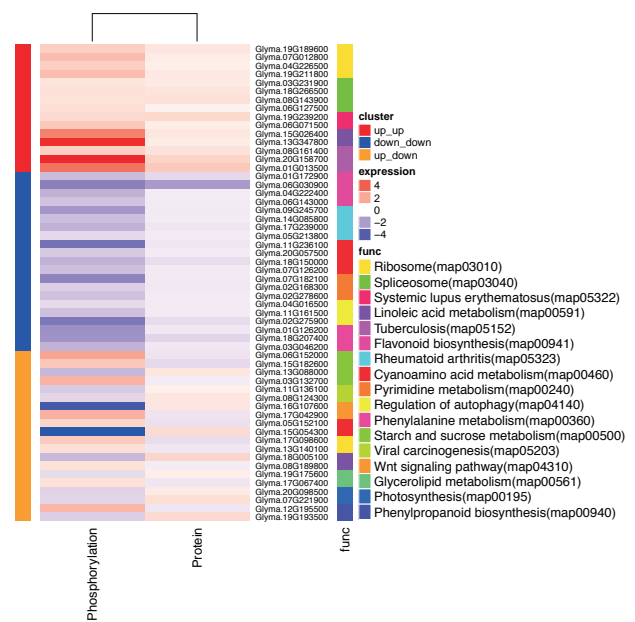


图 9 KEGG 功能富集聚类热图



典型案例解析

代表性文献盘点

研究对象		研究策略	发表时间	发表期刊	影响因子	链接
农学	小鼠昼夜节律	磷酸化蛋白质组	2017.01	Cell Metabolism	20.565	PMID: 27818261
农学	水稻组织磷酸化蛋白图谱	磷酸化蛋白质组	2017.08	Plant Physiology	5.949	PMID:29209414
农学	水稻花粉发育和减数分裂	乙酰化蛋白质组	2018.01	Plant Journal	5.775	PMID:29124795
农学	玉米圆斑病免疫应答	定量蛋白质组 + 乙酰化蛋白质组	2018.01	PNAS	9.504	PMID:29259121
农学	拟南芥光形态发生	泛素化蛋白质组	2017.06	Molecular Plant	9.326	PMID:28461270
农学	拟南芥 N-糖基化蛋白图谱	糖基化蛋白质组	2017.10	Molecular & Cellular Proteomics	5.232	PMID:29237727
农学	布朗葡萄藻 GnTI 的 N-糖基化	糖基化蛋白质组	2017.09	New Phytologist	7.433	PMID:28737213
医学	乳腺癌体细胞突变与信号传导	定量蛋白质组 + 磷酸化蛋白质组	2016	Nature	40.137	PMID:27251275
医学	新型隐球菌致病机制	磷酸化蛋白质组	2017	Cell Host & Microbe	17.872	PMID:28494245
医学	白血病不同亚型分子机制差异	定量蛋白质组 + 磷酸化蛋白质组	2017	Leukemia	10.023	PMID:28111465
医学	表皮细胞 PKA 信号传导	转录组 + 磷酸化蛋白质组	2017	PNAS	9.504	PMID:28973931
医学	拉帕替尼耐药性	定量蛋白质组学 + 蛋白激酶组学 + 磷酸化蛋白质组	2017	Cancer Research	9.130	PMID:28209619
医学	肝脏衰老	乙酰化蛋白质组	2017	Cell	31.398	PMID:28802039
医学	细胞周期	乙酰化蛋白质组	2016	Nature Communications	12.124	PMID:27796307
医学	鼠伤寒沙门氏菌应答机制	泛素化蛋白质组	2016	Molecular Cell	14.714	PMID:27211868
医学	受体信号传导	磷酸化蛋白质组 + 泛素化蛋白质组	2016	Embo journal	9.792	PMID:27307491
医学	黑色素瘤 N-糖基化	糖基化蛋白质组	2017	Molecular & Cellular Proteomics	5.232	PMID:28546465

案例解析

案例一

磷酸化蛋白质组揭示昼夜节律调控机制

Phosphorylation Is a Central Mechanism for Circadian Control of Metabolism and Physiology

研究对象：小鼠肝脏 | 期 刊：Cell Metabolism

影响因子：20.565 | 发表单位：马克斯普朗克研究所 | 发表时间：2017 年 1 月

摘要

Circadian clocks are self-sustainable endogenous oscillators, present in virtually every cell, driving daily cycles of metabolism and physiology. The molecular mechanism of the circadian clock is based on inter-connected transcriptional and translational feedback loops. While many studies have addressed circadian rhythms of the transcriptome and, to a lesser extent, the proteome, none have investigated the phosphoproteome. We apply mass spectrometry-based phosphoproteomics to obtain the first global in vivo quantification of circadian phosphorylation in mammals. Of more than 20,000 phosphosites, 25% significantly oscillate in the mouse liver, including novel sites on core clock proteins. The extent and amplitude of phosphorylation cycles far exceeds those observed in RNA and protein abundance. Our data indicate a dominant regulatory role for phosphorylation-dependent circadian tuning of signaling pathways. This allows the organism to integrate different signals and rapidly and economically respond to daily changes in nutrient availability and physiological states.

关键词

外周生物钟, 磷酸化蛋白质组, 昼夜节律, 新陈代谢, 信号传导

研究背景

生物钟, 作为生物体内一种无形的时钟, 控制着生物体内几乎全部的代谢过程, 并且其自身会不断优化以保证生物体的稳态和代谢健康。生物钟节律的紊乱会导致一系列的疾病, 如糖尿病、肥胖和代谢疾病。研究生物钟, 在医学上有着重要的意义, 并对生物学的基础理论研究起着促进作用。许多研究已经利用转录组和蛋白质组技术研究了昼夜节律, 但是磷酸化蛋白质组尚未涉及。

方法流程

取样策略

小鼠肝脏组织, 两天之中每 3 小时  
取样一次, 每组 4 个生物学重复

质谱策略

磷酸化蛋白质组  
TiO<sub>2</sub> 富集,  
Label-free 定量技术,  
Q Exactive HF 质谱检测,  
MaxQuant 搜库

后续验证

转录激活分析  
Western Blotting 验证

## 研究结果

### 1. 体内大规模昼夜磷酸化蛋白质组

小鼠肝脏组织中共鉴定到 20,404 个磷酸化肽段, 20,076 个磷酸化位点, 4,461 个磷酸化蛋白, 且定量重复性较高。

### 2. 小鼠肝脏磷酸表达水平每天大幅度振荡

其中 27% 的磷酸化肽段, 41% 的磷酸化蛋白表达水平在 2 天内发生大幅度变化 (图 1A)。表达水平聚类分析, 可以将磷酸化肽段分为光照和黑暗两大类 (图 1B)。PCA 分析表明, 磷酸化蛋白质组循环周期为一天 (图 1C)。肝脏磷酸化蛋白质富集到不同代谢通路, 表明翻译后修饰在昼夜节律调控中起着关键作用 (图 1D)。

蛋白质表达量和磷酸化蛋白表达量均随昼夜节律振荡, 但是磷酸化蛋白表达量振荡幅度更大 (图 2A, 图 2B)。蛋白质表达水平平均差异倍数为 1.2, 磷酸化蛋白表达水平平均差异倍数为 5 倍 (图 2C)。FC 值累计曲线表明, 80% 的磷酸化累积强度来自于 20% 的磷酸化水平振荡的肽段, 表明磷酸化水平变化的蛋白为调控蛋白而非结构蛋白 (图 2D)。

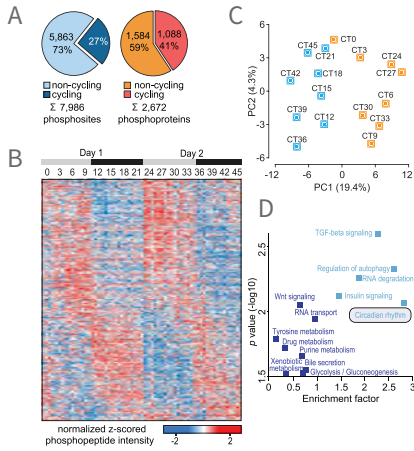


图 1 小鼠肝脏磷酸化蛋白质组振荡

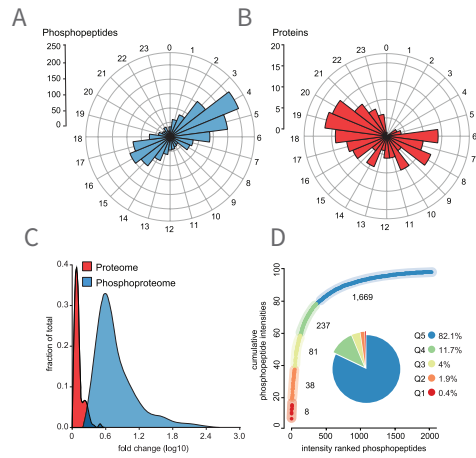


图 2 循环磷酸化蛋白质组相位分布和振荡

### 3. CLOCK 蛋白上氨基酸位点的磷酸化循环

小鼠肝脏中 CRY1 S588 和 CRY2 S557 分别在 CT0 和 CT21 表达量达到峰值 (图 3A)。在 CLOCK 蛋白上发现了新的磷酸化位点 S446 和 S440/441, 其磷酸化水平也出现周期性的变化 (图 3B), 这些氨基酸残基位于蛋白质序列中富含丝氨酸的区域, 在哺乳动物中高度保守 (图 3C)。CLOCK 磷酸化突变体转录活性低于野生型, 然而 CRY1 介导的转录抑制不受影响 (图 3D, 图 3E)。结果表明, CLOCK 蛋白上的 S440 / S441 和 S446 的体内磷酸化循环在不含 CRY1 介导的抑制的情况下即可调节其转录活性。

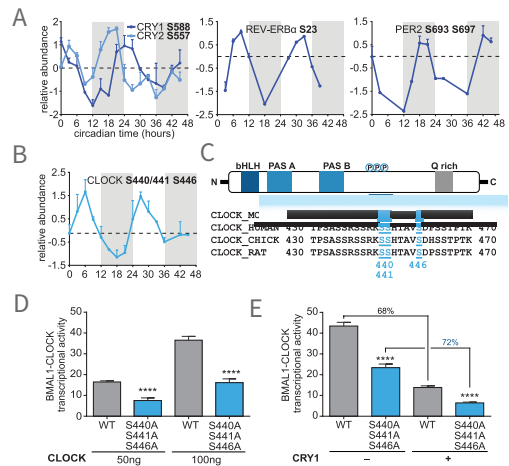


图 3 Clock 核心蛋白磷酸化节律变化

#### 4. 昼夜节律中小鼠肝脏激酶活性调控

激酶富集分析结果表明，ERK 底物和 AKT/mTOR 底物磷酸化水平在白天和晚上分别达到峰值（图 4A）。与 EGFR-RAS-ERK-RSK 级联反应相关的激酶磷酸化水平在白天达到峰值，这些酶多为糖酵解，糖原合成和脂肪合成的限速酶，使得小鼠在食物摄入最少的时候促进糖酵解提供能量，抑制糖原和脂肪的合成。与 insulin-AKT-mTOR 级联反应相关酶的磷酸化水平在夜晚达到峰值，此时小鼠活动活跃，营养充足，使得脂肪合成、生长相关的代谢途径比较旺盛（图 4 B）。

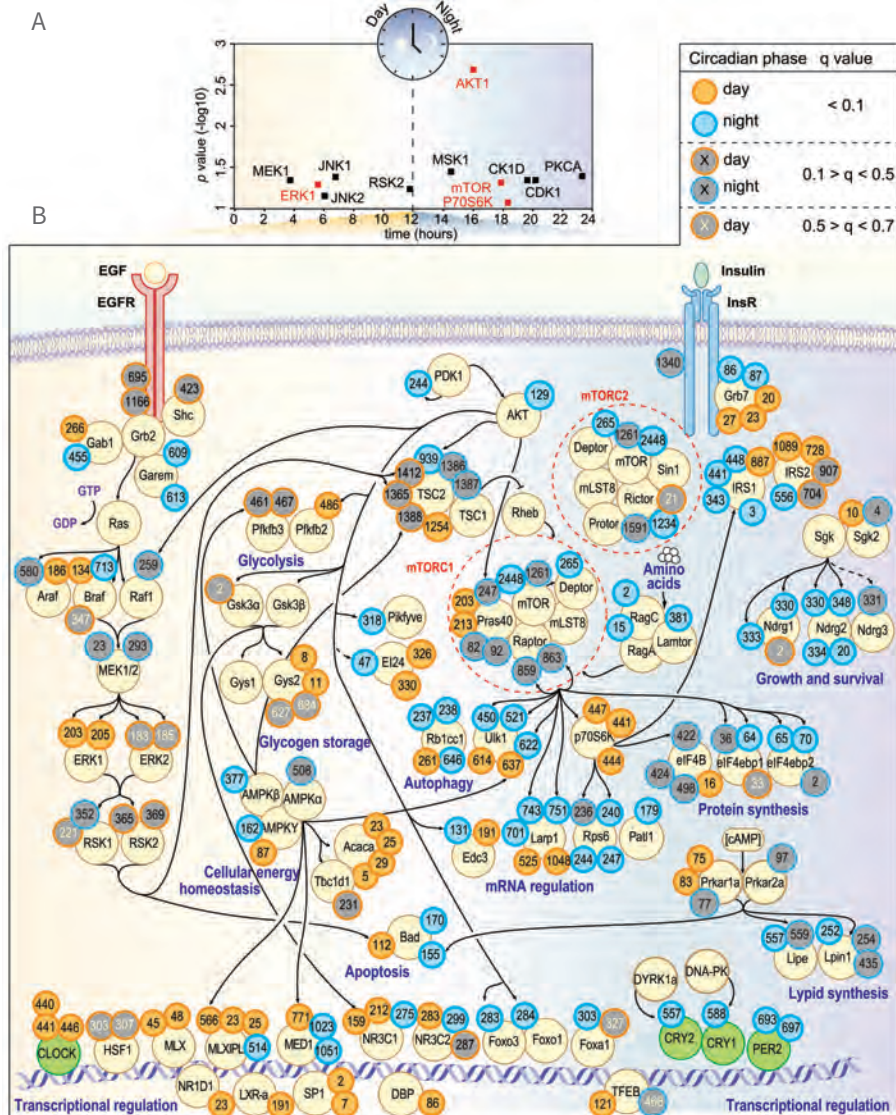


图 4 激酶网络和信号通路实时调控

#### 参考文献

Robles M S, Humphrey S J, Mann M. Phosphorylation Is a Central Mechanism for Circadian Control of Metabolism and Physiology[J]. Cell Metabolism, 2017, 25(1):118.

## 案例二

### 蛋白质基因组学联系乳腺癌体细胞突变与信号通路

Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer

研究对象：人乳腺癌样本 | 期 刊：Nature

影响因子：40.137 | 发表单位：麻省理工学院、哈佛大学、剑桥大学 | 发表时间：2016 年 10 月

### 摘要

Somatic mutations have been extensively characterized in breast cancer, but the effects of these genetic alterations on the proteomic landscape remain poorly understood. Here we describe quantitative mass-spectrometry-based proteomic and phosphoproteomic analyses of 105 genomically annotated breast cancers, of which 77 provided high-quality data. Integrated analyses provided insights into the somatic cancer genome including the consequences of chromosomal loss, such as the 5q deletion characteristic of basal-like breast cancer. Interrogation of the 5q trans-effects against the Library of Integrated Network-based Cellular Signatures, connected loss of CETN3 and SKP1 to elevated expression of epidermal growth factor receptor (EGFR), and SKP1 loss also to increased SRC tyrosine kinase. Global proteomic data confirmed a stromal-enriched group of proteins in addition to basal and luminal clusters, and pathway analysis of the phosphoproteome identified a G-protein-coupled receptor cluster that was not readily identified at the mRNA level. In addition to ERBB2, other amplicon-associated highly phosphorylated kinases were identified, including CDK12, PAK1, PTK2, RIPK2 and TLK2. We demonstrate that proteogenomic analysis of breast cancer elucidates the functional consequences of somatic mutations, narrows candidate nominations for driver genes within large deletions and amplified regions, and identifies therapeutic targets.

### 关键词

乳腺癌，定量蛋白质组，磷酸化蛋白质组，蛋白质基因组学，体细胞突变，信号传导

### 研究背景

基因检测是目前癌症精准分型与精准用药的主要方法。但是，目前还没有充分认识复杂的癌症基因组是如何转化为导致复发和死亡的。乳腺癌全球发病率自 20 世纪 70 年代末开始一直呈上升趋势。已成为当前社会的重大公共卫生问题。

### 方法流程

#### 取样策略

PAM50 分型的 105 例乳腺癌样本，其中基底样型 25 例，管腔上皮 A 型 29 例，管腔上皮 B 型 33 例，HER2 过表达型 18 例，3 例正常样本

#### 质谱策略

磷酸化蛋白质组，IMAC 磷酸化肽段富集，Q-Exactive 质谱检测，Spectrum Mill 搜库

#### 后续验证

细胞系验证

## 研究结果

1. 研究共鉴定到 15,369 个蛋白 (12,405 个基因) 和 62,679 个磷酸化位点。其中 28 例乳腺癌样本由于蛋白质降解, 被过滤掉, 最终参与后续分析的是 12,553 个蛋白 (10,062 个基因) 和 33,239 个磷酸化位点。

2. 蛋白质组检测的突变与外显子和转录组结果不完全匹配, 蛋白质组虽然覆盖度不高 (Figure 1a), 但是也能验证转录组中低丰度突变 (Figure 1b), 并且蛋白质组定量更加准确 (Figure 1c)。

3. 对 7,776 基因进行 CNA 和 mRNA, CNA 和蛋白质相关性分析, 结果表明 CNA 对蛋白质表达水平的顺式作用更多集中在 5q, 10p, 12, 16q, 17q 和 22q (Figure 2a)。其中, 64% 的 CNA 和 mRNA 显著正相关 (反式作用), 31% 的 CNA 和蛋白质显著正相关 (Figure 2b)。502 个不同的 CNA 基因中, 鉴定到 10 个基因受 CNA 获得和缺失的影响, 是 CNA 顺式作用的候选调控蛋白 (Figure 2c)。

4. 转录组和蛋白组能重现 PAM50 对乳腺癌的亚型分型结果 (Figure 3a)。依赖蛋白质组、磷酸化蛋白质组基底样、管腔上皮和基质富集的分型结果与 PAM50 不一致 (Figure 3b), 代谢通路富集结果差异显著 (Figure 3c)。磷酸化分型结果中产生了一个新亚型, 蛋白质组和 PAM50 分型均无富集 (Figure 3d)。

5. ERBB2 位点显示出磷酸化水平增高与基因扩增引起的 RNA 和蛋白质的过表达的强作用 (Figure 4a)。11q 上的乳腺癌驱动激酶 PAK1 与 CLNS1A, RFS1, GAB2 过度磷酸化 (Figure 4b)。PAK1 和 TLK2 特异性集中在基底样型 (Figure 4c), 每种不同的乳腺癌亚型包含特异性异常激酶 (Figure 4d)。

## 参考文献

Mertins P, Mani D R, Ruggles K V, et al. Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer[J]. Nature, 2016, 534(7605):55-62.

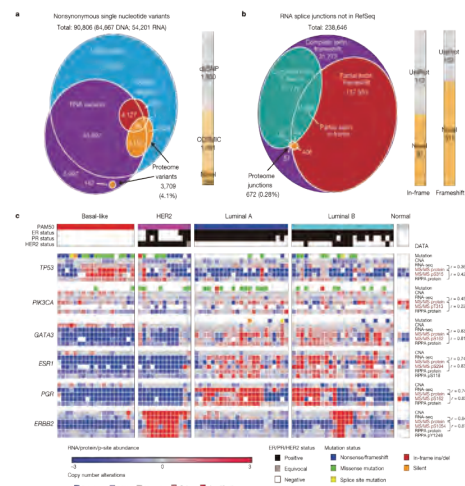


图 1 基因组突变对蛋白质的水平的直接影响

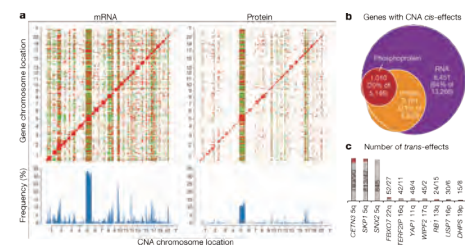


图 2 拷贝数畸变对 mRNA、蛋白质、磷酸化丰度的影响

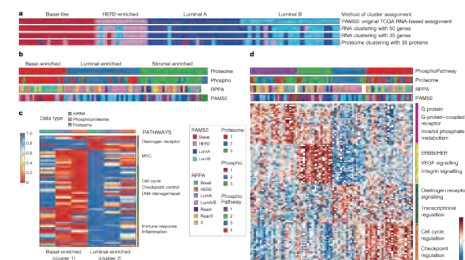


图 3 乳腺癌蛋白质和磷酸化亚型和各亚型特异性富集的代谢通路

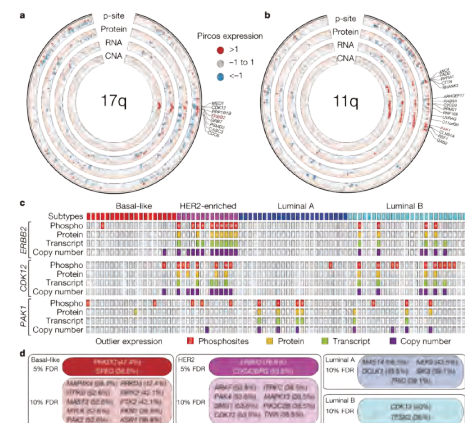


图 4 乳腺癌中异常调控的激酶

### 案例三

## 乙酰化蛋白质组揭示真菌诱导玉米过度乙酰化

Fungal-induced protein hyperacetylation in maize identified by acetylome profiling

研究对象：玉米圆斑病菌侵染后的玉米叶片 | 期 刊：PNAS  
影响因子：9.504 | 发表单位：爱荷华州立大学 | 发表时间：2017 年 10 月

### 摘要

Lysine acetylation is a key posttranslational modification that regulates diverse proteins involved in a range of biological processes. The role of histone acetylation in plant defense is well established, and it is known that pathogen effector proteins encoding acetyltransferases can directly acetylate host proteins to alter immunity. However, it is unclear whether endogenous plant enzymes can modulate protein acetylation during an immune response. Here, we investigate how the effector molecule HC-toxin (HCT), a histone deacetylase inhibitor produced by the fungal pathogen *Cochliobolus carbonum* race 1, promotes virulence in maize through altering protein acetylation. Using mass spectrometry, we globally quantified the abundance of 3,636 proteins and the levels of acetylation at 2,791 sites in maize plants treated with HCT as well as HCT-deficient or HCT-producing strains of *C. carbonum*. Analyses of these data demonstrate that acetylation is a widespread posttranslational modification impacting proteins encoded by many intensively studied maize genes. Furthermore, the application of exogenous HCT enabled us to show that the activity of plant-encoded enzymes (histone deacetylases) can be modulated to alter acetylation of nonhistone proteins during an immune response. Collectively, these results provide a resource for further mechanistic studies examining the regulation of protein function by reversible acetylation and offer insight into the complex immune response triggered by virulent *C. carbonum*.

### 关键词

乙酰化蛋白质组, 蛋白质组, 免疫应答, 玉米, 玉米原斑病菌

### 研究背景

玉米是重要的粮食作物，全世界玉米播种面积和产量仅次于水稻、小麦居第三位，平均单产则居第一。玉米圆斑病菌是玉米十大病害之一，随着农业生产水平的提高、品种的更换及耕作制度的变化，玉米圆斑病菌的发生和危害呈现加重趋势，对玉米生产造成了很大的影响。赖氨酸乙酰化作为一种关键的翻译后修饰，能够调控不同的蛋白质参与一系列的生物过程，其中包括组蛋白乙酰化作用于植物防御，但是植物内源性酶调控蛋白质乙酰化在免疫应答中的机制尚不清楚。

### 方法流程

#### 取样策略

易感玉米植株 hm1A，分别用 mock，HCT，Tox<sup>-</sup>，Tox<sup>+</sup> 处理 22h 后，收集叶片，每组 4 个生物学重复

#### 质谱策略

iTRAQ 定量蛋白质组，  
乙酰化蛋白质组，  
Label-free 定量技术，  
乙酰化赖氨酸泛抗体富集，  
LTQ Orbitrap Velos 质谱检测，  
Spectrum Mill v3.03 搜库

#### 后续验证

Western Blotting 验证

## 研究结果

1. 玉米叶片中共鉴定到 3,636 个蛋白, 912 个乙酰化蛋白, 2,791 个乙酰化位点, 比之前的报道提升了一倍, 显著拓展了对植物乙酰化蛋白质组的认知。

2. HCT (玉米圆斑病菌种 1 产生的组蛋白脱乙酰酶抑制剂, 效应分子 HC- 毒素) 或者  $Tox^+$  处理 22h 后, 171 个蛋白上调, 116 个蛋白下调 (图 1A), 差异蛋白 GO 富集在植物抗毒素前体吲哚和色氨酸合成功能途径中 (图 1B)。HCT 和  $Tox^+$  处理 44h 后, Bx 的水平升高了。结果表明, HCT 转录激活吲哚 / 色氨酸基因的表达, 玉米圆斑病菌改变吲哚 / 色氨酸生物合成使玉米染病。

3. Western blotting 也证实了 HCT 或者  $Tox^+$  处理 22h 后, 组蛋白 H4 (H4K5/8/12/16) 乙酰化水平显著上调 (图 2A, 图 2B)。其中 62 个乙酰化肽段 (155 个乙酰化位点) 上调, 仅 9 个乙酰化肽段 (12 个乙酰化位点) 下调, 并且这种过度乙酰化只存在于 HCT 或者  $Tox^+$  处理中, 在  $Tox^-$  处理中并未发现类似反应 (图 2C, 图 2D)。GO 富集分析表明, HCT 和  $Tox^+$  处理后分别有 31 个和 8 个 GO 条目涉及转录调控的功能条目上调,  $Tox^-$  处理后并未发现类似现象 (图 2E)。结果表明, 玉米圆斑菌利用 HCT 重编码抑制侵害的转录应答, 使防御反应无法阻止碳酸钙感染。另外,  $Tox^+$  通过乙酰化抗毒素使其功能失活, 抑制宿主防御。

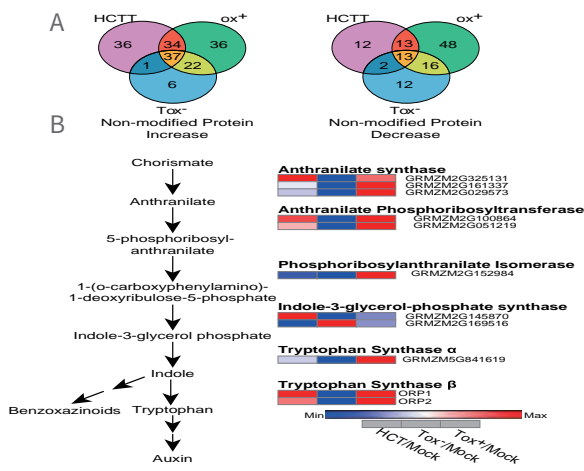


图 1 HCT 诱导色氨酸合成和影响 Bx 植物抗病毒蛋白的表达水平

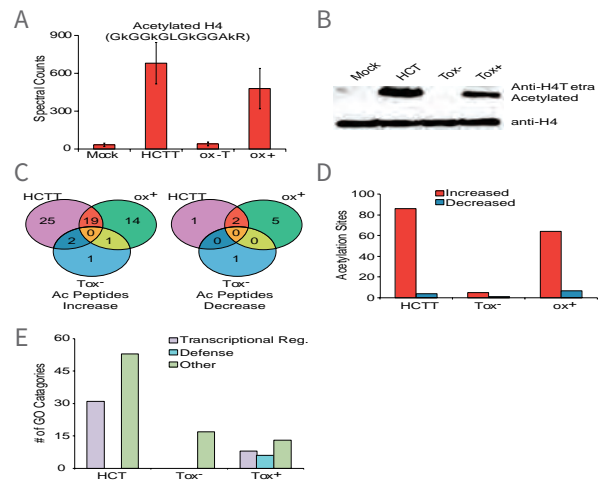


图 2 蛋白表达量和乙酰化动力学

4. MapMan 35 个功能条目中有 32 个包含乙酰化蛋白, 其中排第三的条目包含 108 个蛋白质涉及 RNA 剪切和转录调控被乙酰化 (图 3)。

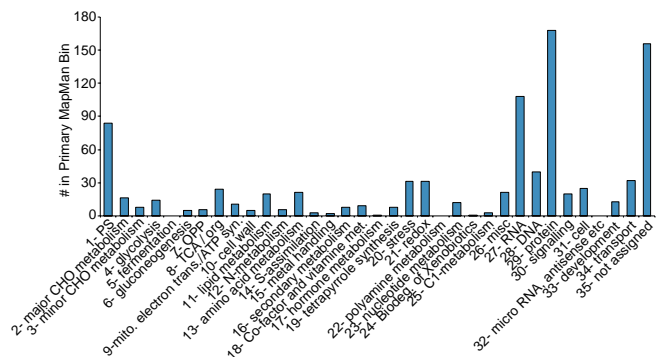


图 3 玉米中乙酰化蛋白功能多样性

## 参考文献

Walley JW, Shen Z, McReynolds MR, Schmelz EA, Briggs SP. Fungal-induced protein hyperacetylation in maize identified by acetylome profiling. Proc Natl Acad Sci U S A [J]. 2018 Jan 2;115(1):210-215.



## 案例四

### 乙酰化蛋白质组揭示 KAT2A/2B 通过调控 PLK4 维持细胞周期稳定的新机制

KAT2A/KAT2B-targeted acetylome reveals a role for PLK4 acetylation in preventing centrosome amplification.

研究对象：细胞周期 | 期 刊：Nature Communications

影响因子：12.124 | 发表单位：斯特拉斯堡大学 | 发表时间：2016 年 10 月

## 摘要

Lysine acetylation is a widespread post-translational modification regulating various biological processes. To characterize cellular functions of the human lysine acetyltransferases KAT2A (GCN5) and KAT2B (PCAF), we determined their acetylome by shotgun proteomics. One of the newly identified KAT2A/2B substrate is polo-like kinase 4 (PLK4), a key regulator of centrosome duplication. We demonstrate that KAT2A/2B acetylate the PLK4 kinase domain on residues K45 and K46. Molecular dynamics modelling suggests that K45/K46 acetylation impairs kinase activity by shifting the kinase to an inactive conformation. Accordingly, PLK4 activity is reduced upon in vitro acetylation of its kinase domain. Moreover, the over-expression of the PLK4 K45R/K46R mutant in cells does not lead to centrosome over-amplification, as observed with wild-type PLK4. We also find that impairing KAT2A/2B-acetyltransferase activity results in diminished phosphorylation of PLK4 and in excess centrosome numbers in cells. Overall, our study identifies the global human KAT2A/2B acetylome and uncovers that KAT2A/2B acetylation of PLK4 prevents centrosome amplification.

## 关键词

乙酰化蛋白质组，细胞周期，中心体，乙酰基转移酶

## 研究背景

目前已知有大约 6000 个蛋白被乙酰化修饰调控，其中组蛋白的乙酰化是重要的表观遗传学指征，与 DNA 复制和修复、转录激活等过程密切相关。然而还有大量的非组蛋白乙酰化的生物学功能和意义值得探索。另一方面，蛋白质乙酰化修饰受到 20 多种赖氨酸乙酰转移酶（KAT）调控，其中赖氨酸乙酰转移酶 KAT2A/2B 通过调控组蛋白 H3、H4 的乙酰化引起染色质结构的改变，进而影响如细胞周期变化、细胞凋亡等多种重要生理过程。但是关于 KAT2A/2B 调控非组蛋白乙酰化与其生物学功能的研究还处在初级阶段，同时一个完整详实的 KAT2A/2B 底物列表尚未出现，这也阻碍了更深层次作用机理的研究。

## 方法流程

### 取样策略

HeLa, 每组 5 个生物学重复;  
KAT2A 和 KAT2B 敲除的 HeLa, 每  
组 3 个生物学重复

### 质谱策略

乙酰化蛋白质组,  
SLIAC 定量技术,  
赖氨酸乙酰化泛抗体富集,  
LTQ Velos 质谱检测,  
Proteome Discoverer 1.3 搜库

### 后续验证

Western Blotting 验证

## 研究结果

1. 与实验组 (KAT2A 和 KAT2B 敲除细胞) 相比, 仅在对照组中存在的乙酰化位点有 1,569 个, 对应 398 个蛋白。其中 251 个蛋白 (约占总数的 63%) 与已报道的研究结果相同。偏好性分析发现乙酰化修饰多发生在赖氨酸富集区域。

GO 分析发现 KAT2A/2B 靶向修饰的蛋白都是在细胞功能方面发挥作用: 除了先前报道的染色体重建、DNA 复制转录修复以及细胞死亡、细胞周期等方面外, 还有新的通路被发现, 如细胞收缩、蛋白转运、磷酸化以及中心体复制等 (图 1)。

2. 通过体内体外乙酰化实验以及蛋白乙酰化位点质谱鉴定, 发现中心体复制相关蛋白 polo-like kinase 4 (PLK4) 激酶活性区域的 45 和 46 位的赖氨酸残基 (K45, K46) 是 KAT2A/2B 的乙酰化修饰位点 (图 2)。

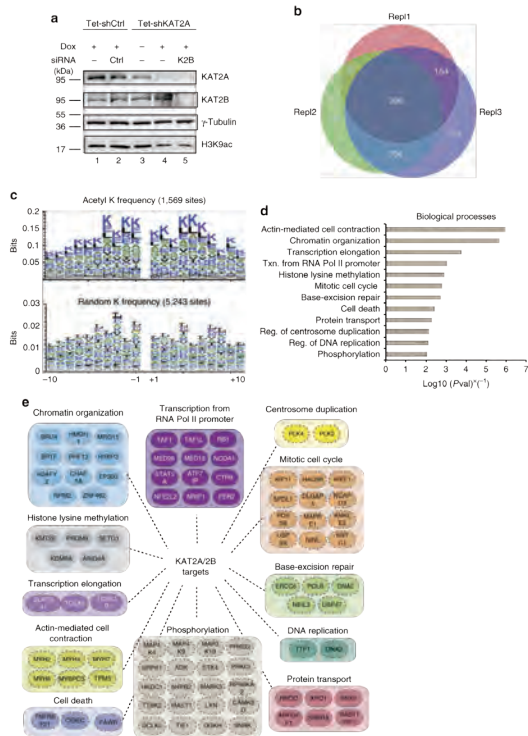


图 1 依赖 KAT2A 和 KAT2B 的乙酰化蛋白质组

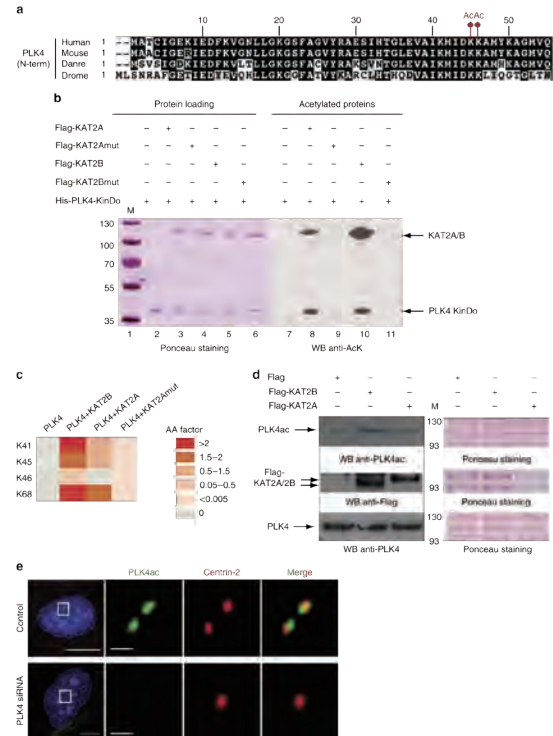


图 2 KAT2A 和 KAT2B 的 PLK4 激酶结构域

3. 共定位实验（免疫荧光检测以及 IP 实验）发现：PLK4/PLK4ac 和共定位与中心体处，尤其是在细胞周期的 G1 晚期和 S 早期含量最高。细胞转染免疫荧光检测实验发现 KAT2A 失活突变会产生多余的中心体，证明的 KAT2A/2B 乙酰基转移酶活性可以抑制中心体异常复制（图 3）。

4. 利用计算机模拟分析预测乙酰化修饰可能通过影响临近区域的氢键网络以及较远区域氨基酸残基间的相互作用稳固非活性状态 PLK4 的空间构象（图 4）。

5. 体外磷酸化实验发现 KAT2A/2B 催化的乙酰化修饰会抑制 PLK4 激酶活性（包括自身磷酸化以及对靶向蛋白的磷酸化）（图 5）。

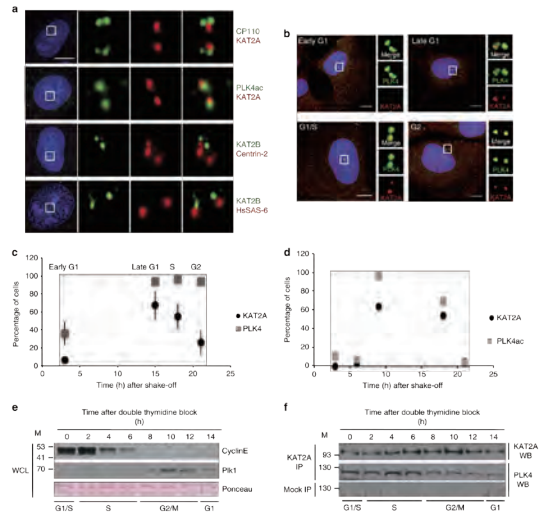


图 3 KAT2A/2B 和 PLK4 在中心体中的共定位

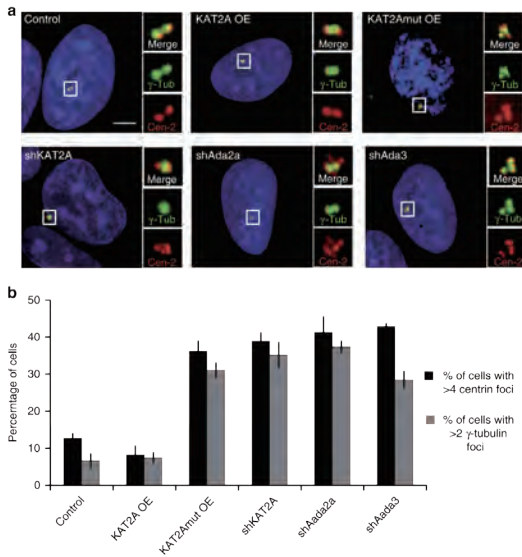


图 4 KAT2A 和 ATAC 复合体调控中心体复制

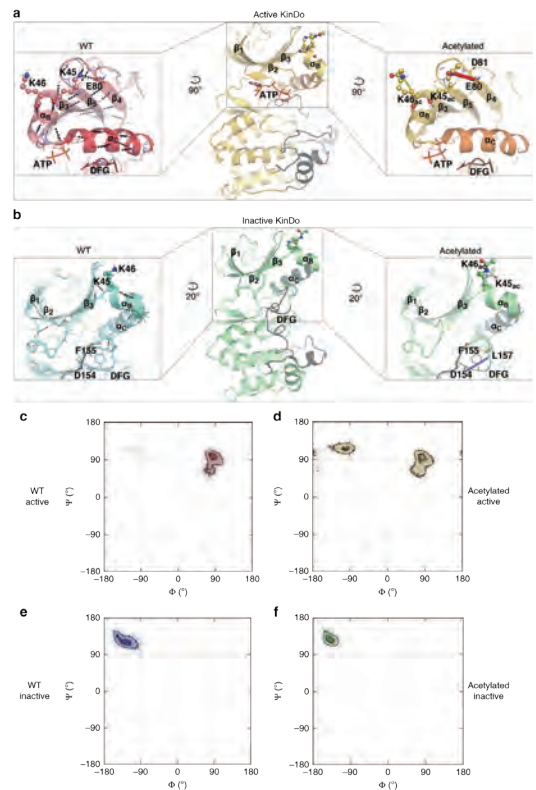


图 5 乙酰化的 PLK4 激酶的动力学转变为失活构象

6. 免疫荧光检测发现或者 KAT2B 被敲除后定位于中心体的 PLK4 总蛋白量没有变化，但是其乙酰化修饰态的蛋白 PLK4ac 含量增加了，说明 PLK4 的磷酸化需要 KAT2A/2B 存在；对转染细胞的荧光检测证实 KAT2A/2B 对 PLK4 的乙酰化修饰作用可以抑制人类细胞中心体的异常复制。

## 参考文献

Fournier M, Orpinell M, Grauffel C, et al. KAT2A/KAT2B-targeted acetylome reveals a role for PLK4 acetylation in preventing centrosome amplification[J]. Nature Communications, 2016, 7:13227.

## 案例五

### 泛素化蛋白质组揭示拟南芥在光形态发生过程中蛋白质组重构

Mass Spectrometric Analyses Reveal a Central Role for Ubiquitylation in Remodeling the Arabidopsis Proteome During Photomorphogenesis

研究对象：拟南芥黄化幼苗 | 期 刊：Molecular Plant  
影响因子：8.827 | 发表单位：华盛顿大学 | 发表时间：2017年6月

## 摘要

The switch from skotomorphogenesis to photomorphogenesis is a key developmental transition in the life of seed plants. While much of the underpinning proteome remodeling is driven by light-induced changes in gene expression, the proteolytic removal of specific proteins by the ubiquitin-26S proteasome system is also likely paramount. Through mass spectrometric analysis of ubiquitylated proteins affinity-purified from etiolated Arabidopsis seedlings before and after red-light irradiation, we identified a number of influential proteins whose ubiquitylation status is modified during this switch. We observed a substantial enrichment for proteins involved in auxin, abscisic acid, ethylene, and brassinosteroid signaling, peroxisome function, disease resistance, protein phosphorylation and light perception, including the phytochrome (Phy) A and phototropin photoreceptors. Soon after red-light treatment, PhyA becomes the dominant ubiquitylated species, with ubiquitin attachment sites mapped to six lysines. A PhyA mutant protected from ubiquitin addition at these sites is substantially more stable in planta upon photoconversion to Pfr and is hyperactive in driving photomorphogenesis. However, light still stimulates ubiquitylation and degradation of this mutant, implying that other attachment sites and/or proteolytic pathways exist. Collectively, we expand the catalog of ubiquitylation targets in Arabidopsis and show that this post-translational modification is central to the rewiring of plants for photoautotrophic growth.

## 关键词

泛素化蛋白质组，光形态发生，光敏色素降解，拟南芥

## 研究背景

光形态发生作用是指植物根据光的变化而对自身的生长和发育进行改变的过程，暗形态向光形态转换是种子植物生命过程中重要的发育过渡阶段。光诱导变化导致的基因表达驱动了大部分蛋白质组的重构，但泛素-26S蛋白酶体(UPS)选择性的降解蛋白质，调节功能蛋白质的周转，在光形态发生中对蛋白组重构的影响尚不清楚。

## 方法流程

### 取样策略

拟南芥黄化幼苗 (D)，MG132 处理的拟南芥黄化苗 (D + MG132)，红外照射 1h 后拟南芥黄花苗 (D - R)，红外照射 1h，并用 MG132 处理后拟南芥黄花苗 (D - R + MG132)

### 质谱策略

泛素化蛋白质组，TUBEs/Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和层析富集，LTQ Orbitrap Velos 质谱检测，SEQUEST version 1.2 搜库

### 后续验证

光谱分析  
免疫共沉淀  
表型分析

## 研究结果

1. D, D + MG132, D - R 和 D - R + MG132 中分别鉴定到 564, 561, 736 和 670 个泛素化蛋白, 共 1279 个泛素化蛋白 (图 1A)。用 MG132 处理的黄化幼苗泛素化蛋白数目上调, 表明 Ub(泛素化)介导蛋白酶体分解 (图 1A)。黄化幼苗中有 42% 的泛素化蛋白在绿色幼苗也鉴定到了, 表明了泛素化蛋白在黄化幼苗中积累 (图 1A)。MG132 处理和红光照射处理的黄化苗泛素化肽段对应的 PSMs (谱图数) 基本一致, 但是红光照射后 PhyA 泛素化肽段丰度显著上调, MG132 处理后进一步上调, 表明光转化为 Pfr 后, PhyA 泛素化和降解增强。

2. 拟南芥黄化幼苗红外照射前后泛素化蛋白互作网络表明, 泛素化蛋白与大量的发育过程的相关, 主要包括光感知, 生长素, ABA 和类固醇激素信号、疾病抵抗、蛋白激酶和过氧化物酶体等 (图 2 和图 3A), 其中大量泛素化蛋白及生长素转运相关的泛素化蛋白都与已有报道相一致 (图 3B)。

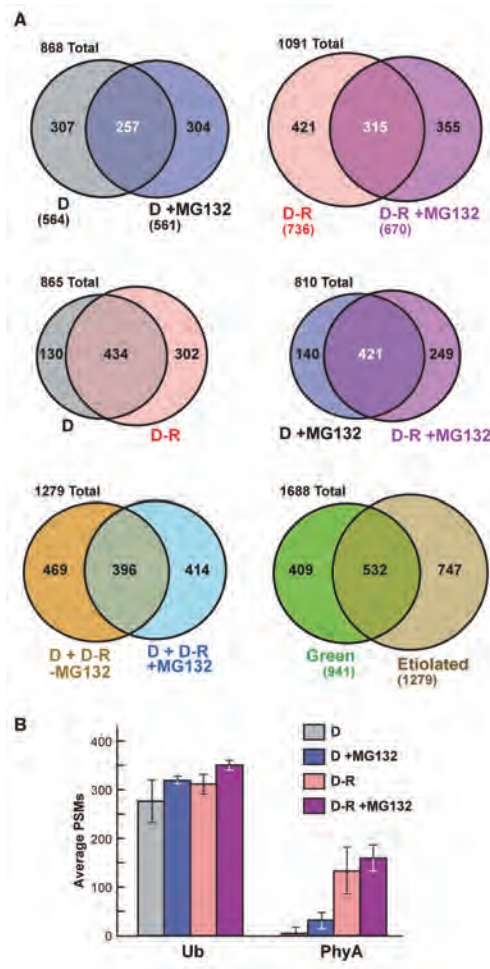


图 1 红光照射和 MG132 处理鉴定到的泛素化蛋白质比较分析

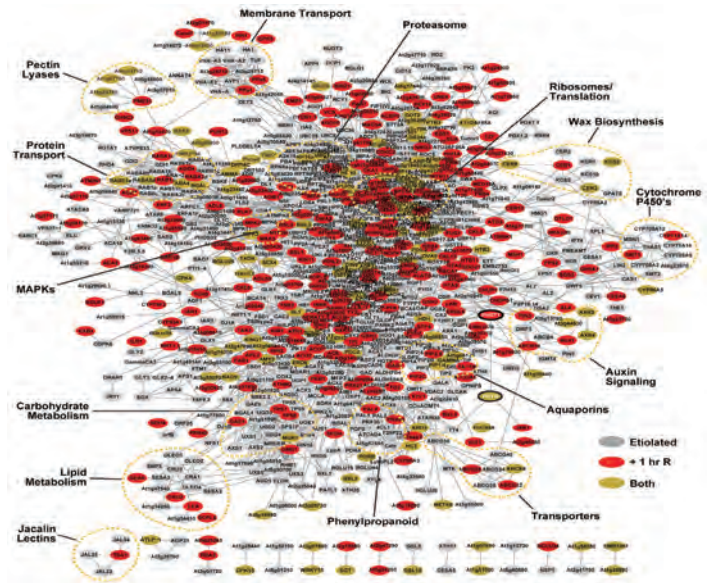


图 2 拟南芥黄化幼苗红光照射前后泛素化蛋白质相互作用网络图

**A** Notable Ubiquitination Targets that are Enriched in Etiolated Arabidopsis Seedlings

Functional Group	Ubiquitination Target
Light Signaling	PhyA, PHOT1, ABCB19, CYP83B1/REO1, CDF3, JAR1/FIN219, CAL4/TH3, NPH3, WRK1, WRK5, R59K/ON10, AFLP/1, PDX1.1, PDX1.3, NPH3-related (At1g20440)
Auxin Signaling	ABCB19, APP1, ARF3, AUX1, AXR2/AA17, AXR4/RGR1, CPK6, GNL3, PIN1, PIN7, PID/WAG2, REF2/CYP83A1, TMK1, ABCB4, AGO1, BIG/ITR3, CPK3/CPK11, GH3.17, PP2A-A3, RPL24B/STV1
ABA Signaling	ABCG25, ABCG46, CDK6, MPK6, MPK11, RDU1, SDR1, SnRK2.2, SnRK2.3, CDK3, EER1/RCN1, SUA
Brassinosteroid Signaling	BSK5, BSK6, BSL1, BSL2, BSL3, CAS1, TRED/DWF5, DWF1/EVE1, GRF10
Disease Resistance	AGO2, CHE, FIN319/JAR1, FLS2, LOX1, MPK6, NRT3.1/WR3, PRL1, LRR4-family (At1g58170, At1g58548, At3g44630, At4g16960, At5g41756, At5g62020), ABCB26/PEN2, ADR1, AWR1, CAD1, CAD2, DHS1, DHAR1, DHARS, HD1/IDA1, HDS, JAL35, KAT3/PEP1
Ethylene Signaling	AUX1/VA5, MPK6, RABARA, ACO2, EER1/RCN1, MPK6
Peroxisomes	ACX3, ACX6, ACL1, ACOAE, FARI, HIR1, Insulin/IAS, MDA1, PEX1, PEX16, PEXD11, SOX, AAF3, ACAT2, ACX1, AIM1, ATGGT11, BGLU26/PEN2, CSY2, CSY3, HIT3, ICL, LAC34, LAC38, MFP2, TPEP

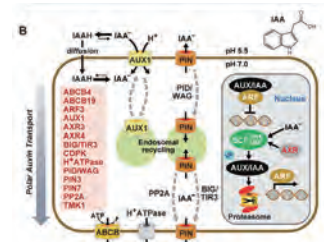


图 3 拟南芥黄化幼苗中的泛素化蛋白

3. 通过质谱鉴定到泛素化位点 227 个，扩展了原有数据库中的泛素化位点。泛素化位点 motif 分析，并未发现很明显的特征序列，但是发生修饰的赖氨酸是暴露在溶剂中的 (图 4A)。对泛素化蛋白分析表明，它们是以聚泛素化链形式在拟南芥黄化幼苗中起作用，发现了 7 个连接泛素化的赖氨酸位点 (K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63)，其中 K11、K48、K63 更易连接泛素化链，除了 K48 外，K11 连接的聚泛素化链也是 UPS 介导的蛋白水解的信号 (图 4B/C)。

4. 泛素化位点分析鉴定到 PhyA 的 6 个泛素化修饰位点存在于 D-R 和 D-R+MG132 样本中，分别为 K65、K92、K143、K206、K603、K942，并发现 K65、K92、K143、K206 极度保守，意味着这些位点对 PhyA 转化是很重要的 (图 5)。

5. PhyA 的 6 个位点的赖氨酸用精氨酸替代 (6K-R)，Pfr 的降解减少，但并没有完全停止 (图 6)。另外，研究表明 PhyA 上可能存在其他的泛素化位点，或者已知的 6 个位点中的一个或多个被替换，其他残基可能参与作用。

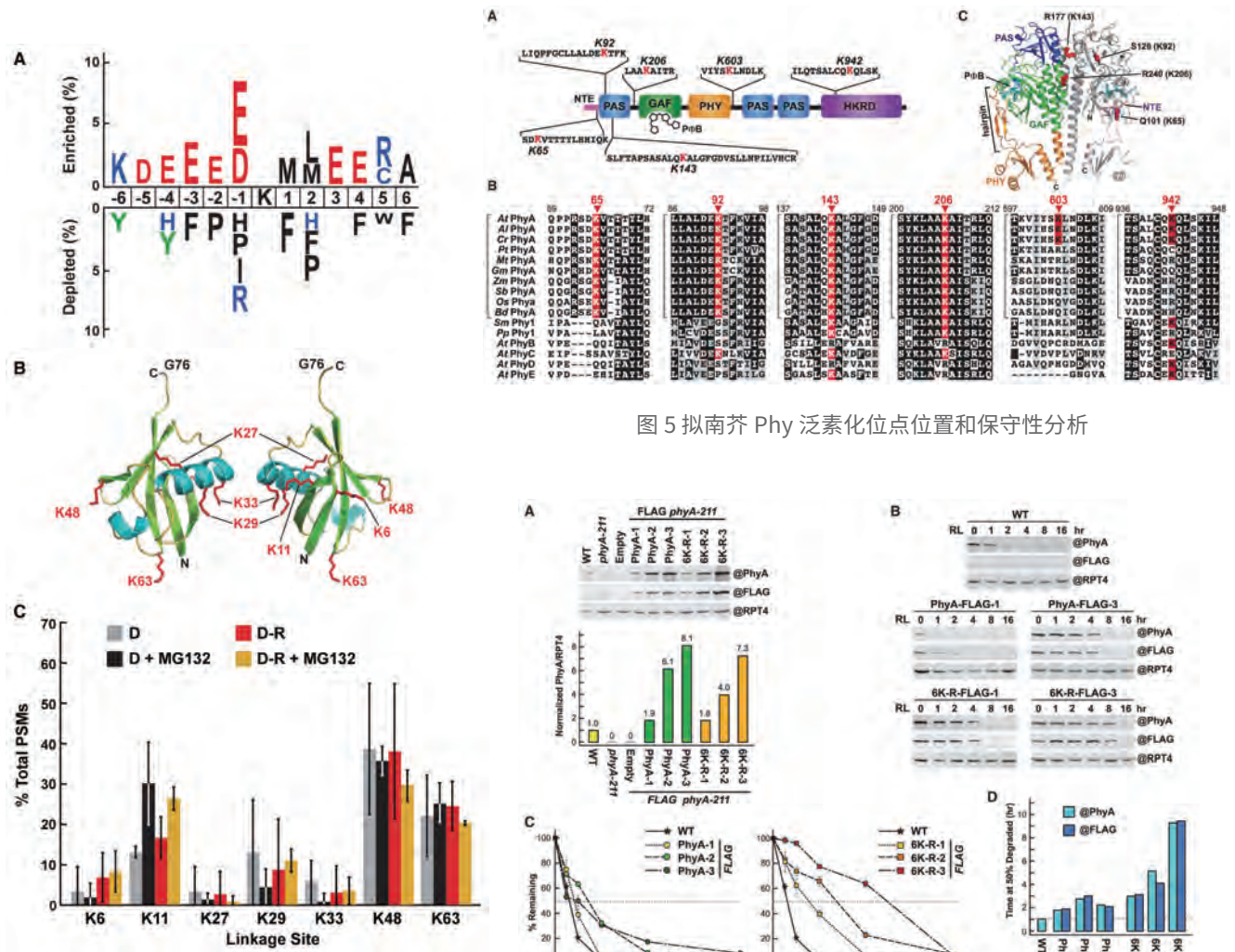


图 4 黄化幼苗中泛素化结合位点分析

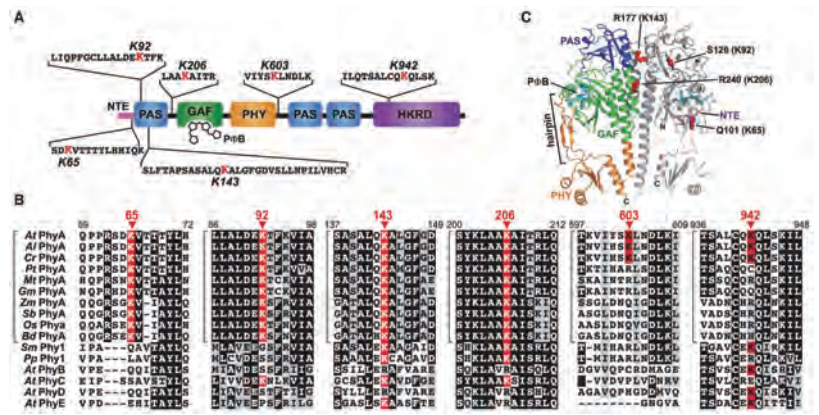


图 5 拟南芥 Phy 泛素化位点位置和保守性分析

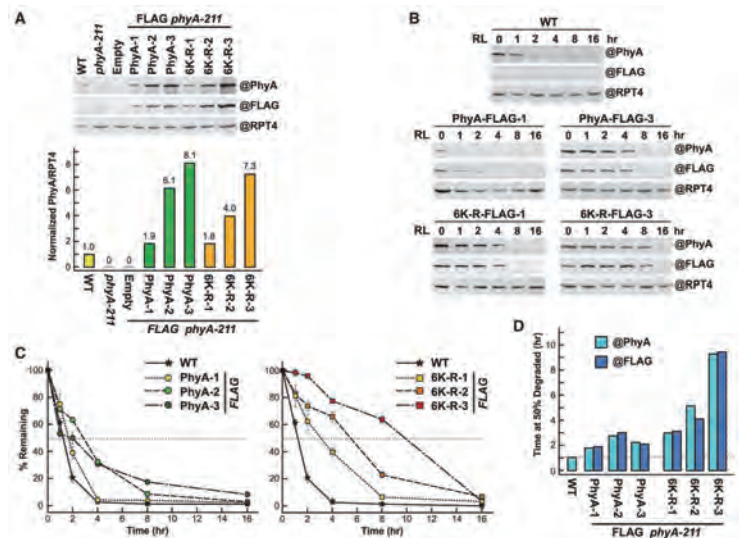


图 6 抑制 PhyA 赖氨酸位点泛素化修饰对 Pfr 的影响

### 参考文献

Aguiarhernández V, Kim D Y, Stankey R J, et al. Mass Spectrometric Analyses Reveal a Central Role for Ubiquitylation in Remodeling the Arabidopsis Proteome During Photomorphogenesis.[J]. Molecular Plant, 2017, 10(6):846-865.

## 案例六

### 泛素化蛋白质组揭示鼠伤寒沙门氏菌感染应答机制

Global Analysis of Host and Bacterial Ubiquitinome in Response to Salmonella Typhimurium Infection

研究对象：鼠伤寒沙门氏菌感染的上皮细胞 | 期 刊：Molecular Cell  
影响因子：14.714 | 发表单位：法兰克福大学 | 发表时间：2016年6月

#### 摘要

Ubiquitination serves as a critical signal in the host immune response to infection. Many pathogens have evolved strategies to exploit the ubiquitin (Ub) system to promote their own survival through a complex interplay between host defense machinery and bacterial virulence factors. Here we report dynamic changes in the global ubiquitinome of host epithelial cells and invading pathogen in response to Salmonella Typhimurium infection. The most significant alterations in the host ubiquitinome concern components of the actin cytoskeleton, NF- $\kappa$ B and autophagy pathways, and the Ub and RHO GTPase systems. Specifically, infection-induced ubiquitination promotes CDC42 activity and linear ubiquitin chain formation, both being required for NF- $\kappa$ B activation. Conversely, the bacterial ubiquitinome exhibited extensive ubiquitination of various effectors and several outer membrane proteins. Moreover, we reveal that bacterial Ub-modifying enzymes modulate a unique subset of host targets, affecting different stages of Salmonella infection.

#### 关键词

鼠伤寒沙门氏菌，泛素化蛋白质组，细胞骨架，NF- $\kappa$ B 通路

#### 研究背景

鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 是引发急性胃肠炎的主要病原菌之一，具有重要的公共卫生和医学研究意义。当感染上皮细胞和巨噬细胞时，沙门氏菌会在宿主产生的液泡内生存和复制，从而逃逸中性粒细胞介导的杀菌作用。蛋白质泛素化 (Ubiquitination) 修饰系统是细胞抵御病菌感染机制的重要一环，同时也是病菌毒力分子的主要攻击对象。然而学术界目前对病原菌感染宿主时两者泛素系统调控的研究还停留在初级阶段。

#### 方法流程

##### 取样策略

HeLa, HCT116, 和 TBK1/IKK $\epsilon$  DKO  
细胞系, SL1344  
沙门氏菌感染 0.5h, 2h, 6h 分别  
取样

##### 质谱策略

泛素化蛋白质组,  
SLIAC 标记,  
K- $\epsilon$ -GG 免疫沉淀富集,  
Orbitrap Elite 质谱检测,

##### 后续验证

Western Blotting 验证

#### 研究结果

1. 研究共鉴定到 3824 个泛素化蛋白质，11606 个泛素化修饰位点。HCT116 和 HeLa 细胞感染 0.5h 和 2h 后，982 个泛素化修饰位点 (589 个泛素化蛋白质) 泛素化水平上调，666 个泛素化位点 (449 个泛素化蛋白质) 泛素化水平下调。

2. 侵染初期 (0.5h)，宿主内与细胞骨架、天然免疫相关的蛋白泛素化修饰水平发生明显改变 (上调 & 下调)，而随着时间推移 (2h)，与抗感染炎症反应密切相关的 NF- $\kappa$ B 信号通路蛋白，与信号转导和细胞骨架调节相关的 Rho GTPase，泛素化系统自身的蛋白等的泛素化水平都有显著上调 (图 1)。当进入到侵染晚期 (6h)，宿主内与囊泡运输、膜结构重塑、溶酶体相关的蛋白泛素化水平有显著改变 (图 2)。

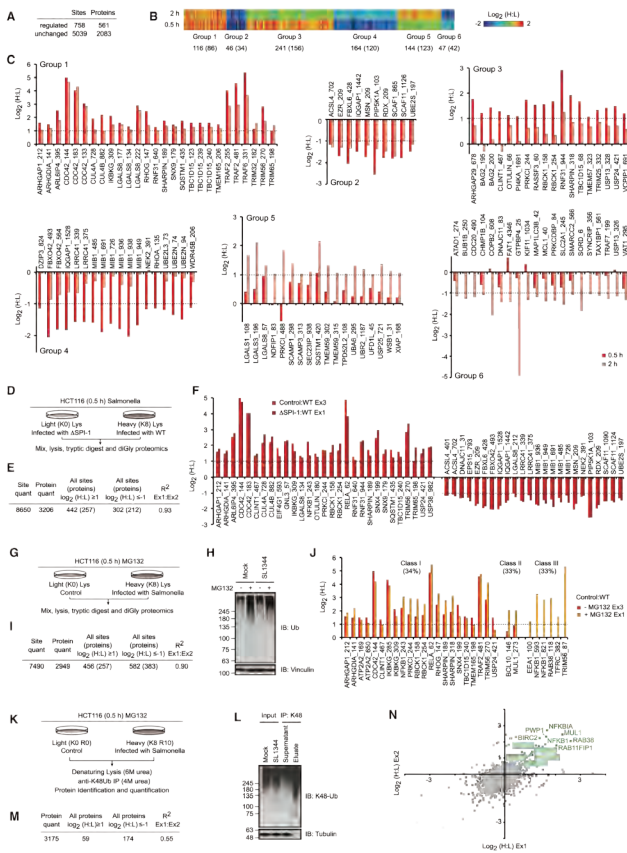


图 1 沙门氏菌侵染早期宿主泛素化修饰动力学

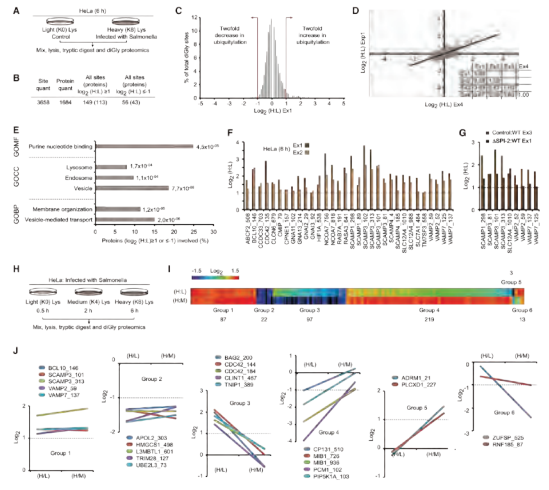


图 2 沙门氏菌侵染晚期宿主泛素化修饰动力学



3. 鼠伤寒沙门氏菌感染后诱导宿主蛋白泛素化，促进了 CDC42 活性和线性泛素链的形成，这两种酶都是 NF- $\kappa$ B 活化所必须的（图 3）。

4. 细菌泛素蛋白酶抑制了各种效应物和几种外膜蛋白的泛素化。此外，细菌 Ub 修饰酶调节宿主靶向的独特子集，影响不同阶段的沙门氏菌的侵染（图 4）。

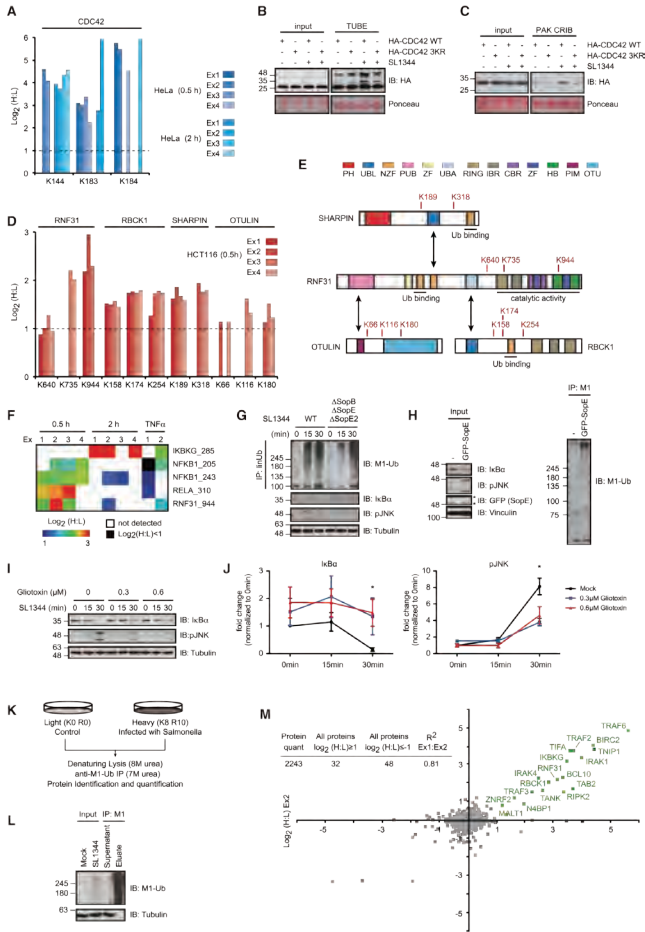


图 3 鼠伤寒沙门氏菌感染诱导 CDC42 和 LUBAC 泛素化

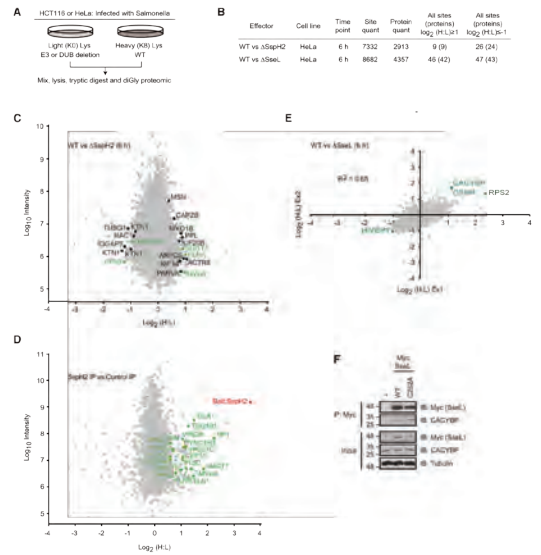


图 4 沙门氏菌 E3 泛素连接酶和 DUBs

**参考文献**

Fiskin et al., Global Analysis of Host and Bacterial Ubiquitinome in Response to Salmonella Typhimurium Infection. Mol Cell. 2016 Jun 16;62(6):967-981.

## 案例七

### 糖基化蛋白质组揭示布朗葡萄糖藻中依赖甲基化 GnTI 的 N- 多糖结构

Identification of methylated GnTI-dependent N-glycans in *Botryococcus braunii*

研究对象：布朗葡萄糖藻 | 期 刊：New Phytologist  
影响因子：7.433 | 发表单位：明斯特大学 | 发表时间：2017 年 6 月

#### 摘要

In contrast to mammals and vascular plants, microalgae show a high diversity in the N- glycan structures of complex N-glycoproteins. Although homologues for  $\beta$ 1,2-N- acetylglucosaminyltransferase I (GnTI), a key enzyme in the formation of complex N-glycans, have been identified in several algal species, GnTI-dependent N-glycans have not been detected so far.

We have performed an N-glycoproteomic analysis of the hydrocarbon oils accumulating green microalgae *Botryococcus braunii*. Thereby, the analysis of intact N-glycopeptides allowed the determination of N-glycan compositions. Furthermore, insights into the role of N-glycosylation in *B.braunii* were gained from functional annotation of the identified N-glycoproteins.

In total, 517 unique N-glycosylated peptides have been identified, including intact N- glycopeptides that harbored N-acetylhexosamine (HexNAc) at the nonreducing end. Surpris- ingly, these GnTI-dependent N-glycans were also found to be modified with (di)methylated hexose.

TheidentificationofGnTI-dependentN-glycansincombinationwithN-glycanmethylationin *B. braunii* revealed an uncommon type of N-glycan processing in this microalgae.

#### 关键词

布朗葡萄糖藻, N- 糖基化蛋白质组, GnTI, 低聚甘露糖苷 N- 聚糖

#### 研究背景

相对于哺乳动物和维管植物，微藻 N- 糖基化蛋白的 N- 多糖结构显示复杂的多样性。尽管  $\beta$ 1, 2-N- 乙酰葡萄糖胺基转移酶 (Gn TI) 的同源蛋白在多种海藻中均有发现。但是依赖 GnTI 甲基化的 N- 多糖结构尚未发现。

#### 方法流程

##### 取样策略

布朗葡萄糖藻 Showa, AC761 和 CCALA778

##### 质谱策略

N- 糖基化蛋白质组，  
胶内酶解，  
TUBEs/Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和层析富集，  
LTQ Orbitrap Velos 质谱检测，  
SEQUEST version 1.2 搜库

##### 后续验证

Western Blotting 验证

## 研究结果

1. 布朗葡萄藻中共鉴定出 517 个 N-糖基化肽段, 428 个 N-糖基化蛋白, 其中 85% 的 N-糖基化肽段是特有的, 仅 9 个糖基化肽段是三个菌株共有的。

2. Showa, AC761 和 CCALA778 中 145 个 N-糖基化肽段中 60 个 N-糖基化位点上连接的是低聚甘露糖苷 N-聚糖, 并被 MeHex 以及 Me2Hex 修饰 (图 1), 三种菌株 N-糖基化修饰差异不显著。

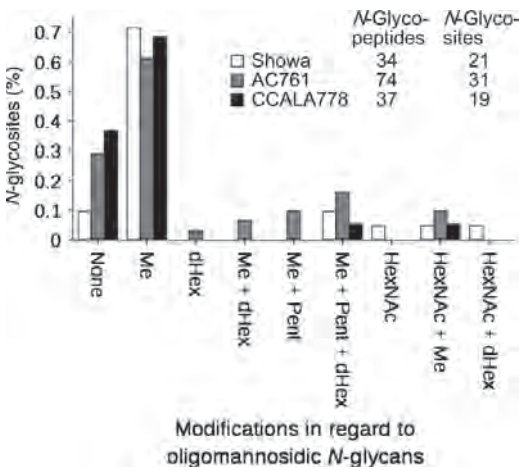


图 1 Showa, AC761 和 CCALA778 中 N-糖基化肽段翻译后修饰比较分析

3. N-聚糖还原性末端鉴定到 HexNAc, 这些 N-聚糖被 MeHex 和 / 或 Me2Hex 修饰 (图 2)。第三个 HexNAc 与 Hex 连接, 导致 N-聚糖核心处具有 MeHex 或 Me2Hex 的杂合 N-聚糖。此外, 末端 HexNAc 可以用 Hex 和 / 或 MeHex 延长 (图 2)。N-聚糖组分与糖基化酶和糖基转移酶的同源物一致, 这些糖基化酶和糖基转移酶参与了高尔基体的 N-聚糖修剪和成熟, 包括  $\alpha$ -甘露糖苷酶 I 和支持将 GlcNAc 连接到 N-聚糖核心的  $\alpha$ 1,3-Man 的 GnTI (图 2)。

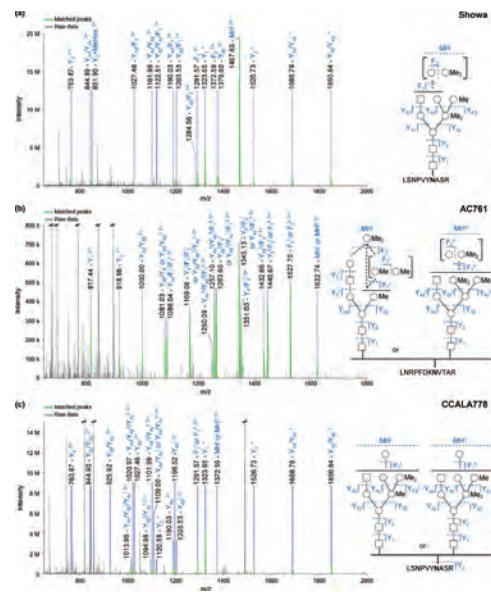


图 2 布朗葡萄藻依赖 GnTI 甲基化的 N-聚糖鉴定

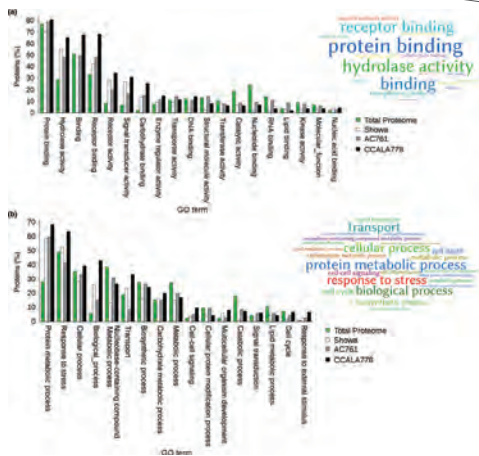


图 3 N-糖基化蛋白 GO 功能注释

4. Showa, GO761 和 CCALA778 N-糖基化蛋白的 GO 注释结果相似, 但是与总蛋白相比差异显著 (图 3A)。与总蛋白相比, “水解酶活性”, “受体活性”, “信号转导活性”和“碳水化合物结合”相关的 N-糖基化蛋白表达量很丰富, “催化活性”和“核苷酸结合”则较少 (图 3A)。包含翻译后修饰以及蛋白质降解的“蛋白质代谢途径”的 N-糖蛋白表达量较高 (图 3B)。

## 参考文献

Schulze S, Urzica E, Reijnders M J M F, et al. Identification of methylated GnTI - dependent N - glycans in Botryococcus braunii[J]. New Phytologist, 2017, 215(4).

## 案例八

### 组蛋白丙酰化是活性染色质的标志

Histone propionylation is a mark of active chromatin

研究对象：组蛋白 | 期 刊：Nature structural & molecular biology | 影响因子：12.595  
发表单位：德国弗赖堡马克斯普朗克免疫生物学和表观遗传学研究所 | 发表时间：2017 年 10 月

### 摘要

Histones are highly covalently modified, but the functions of many of these modifications remain unknown. In particular, it is unclear how histone marks are coupled to cellular metabolism and how this coupling affects chromatin architecture. We identified histone H3 Lys14 (H3K14) as a site of propionylation and butyrylation in vivo and carried out the first systematic characterization of histone propionylation. We found that H3K14pr and H3K14bu are deposited by histone acetyltransferases, are preferentially enriched at promoters of active genes and are recognized by acylation-state-specific reader proteins. In agreement with these findings, propionyl-CoA was able to stimulate transcription in an in vitro transcription system. Notably, genome-wide H3 acylation profiles were redefined following changes to the metabolic state, and deletion of the metabolic enzyme propionyl-CoA carboxylase altered global histone propionylation levels. We propose that histone propionylation, acetylation and butyrylation may act in combination to promote high transcriptional output and to couple cellular metabolism with chromatin structure and function.

### 关键词

组蛋白；丙酰化 Kpr；丁酰化 Kbu；H3K14；表观遗传修饰

### 研究背景

组蛋白高度共价修饰，但许多修饰的功能仍然未知，特别是尚不清楚组蛋白标记如何与细胞代谢相结合以及这种偶联如何影响染色质结构。最近又鉴定出多种先前未知类型的组蛋白 PTMs, 其中包括赖氨酸酰化修饰。值得注意的是，大多数新发现的组蛋白酰化位点与已知的组蛋白乙酰化 (Kac) 位点重叠。在新发现的组蛋白酰化中，组蛋白赖氨酸丙酰化 (三碳分子: C3) 和丁酰化 (C4) 是首次报道的，它们的化学结构和性质最类似于乙酰化 (C2)。

作者将组蛋白 H3 Lys14 (H3K14) 鉴定为体内丙酰化 (Kpr) 和丁酰化 (Kbu) 的位点，并进行组蛋白丙酰化的第一次系统表征。

### 方法流程

#### 取样策略

研究对象：组蛋白  
取样策略：HeLa 细胞的组蛋白；  
小鼠肝脏组蛋白

#### 研究策略

丙 / 丁酰化蛋白质组：Q-Exactive；  
Top 10；抗体富集丙 / 丁酰化肽；  
母离子 HCD 碎裂 Mascot 2.2 搜库；  
数据库：PEAKS-studio

#### 信息分析

分析：修饰位点分析、火山图、  
GO 富集、箱型图、韦恩图、  
相关性分析  
验证：免疫沉淀；体外转录系统；  
免疫荧光

## 研究结果

### 1. 组蛋白 H3K14 丙酰化和丁酰化的鉴定

作者对 HeLa 组蛋白进行了质谱分析，并在组蛋白 H3 和 H4 的尾部鉴定了总共 5 个 Kpr 和 7 个 Kbu 位点 (图 1)。同时，所有鉴定的位点也是已知的乙酰化位点 (Kac)。因为 H3K14 的乙酰化与转录激活有关，作者选择 H3K14 作为研究组蛋白 Kpr 和 Kbu 的模型。

### 2. 代谢酶调控组蛋白丙酰化

Kpr 和 Kbu 的推定共底物丙酰辅酶 A 和丁酰辅酶 A，分别是脂肪酸分解代谢中的中间体 (2a)。因此，由于代谢活性导致其水平的变化可能影响组蛋白丙酰化和丁酰化的水平，从而将细胞代谢与染色质酰化状态联系起来。

丙酰辅酶 A 羧化酶 (PCC) 和酰基辅酶 A 脱氢酶短链 (ACADS) 都降解它们各自的 CoAs (图 2a)，PCC 和 ACADS 的消耗可导致丙酰辅酶 A 和丁酰辅酶 A 浓度全面增加，从而增加一般蛋白质丙酰化和丁酰化 (图 2b、c)。

### 3. H3K14pr 和 H3K14bu 在小鼠肝脏中的基因组定位

研究人员选取不同禁食处理的小鼠，在代谢相关组织肝脏中进行染色质免疫沉淀测序 (ChIP-seq) 实验，证明组蛋白酰化可以在染色质上共同发生。

组蛋白的质谱分析证实 H3K14pr 和 H3K14bu 存在于小鼠肝脏中 (图 3a)，H3K14pr 和 H3K14bu 显示出与其他“活性”组蛋白标记相似的整体特征，且富含 H3K14pr 和 H3K14bu 的区域的注释显示它们在启动子和转录起始位点 (TSS) 区域高度富集 (图 3b、c)。尽管 H3K14pr，H3K14bu 和 H3K9ac 靶基因之间存在高度重叠，但仍然发现一些基因 (~11%~13%) 仅检测到 H3K14pr 或 H3K14bu 富集 (图 3d)。

### 4. H3K14pr 和 H3K14bu 与转录活性染色质有关

分析再喂食和禁食的小鼠肝脏 RNA 表达情况，发现跨越 TSS 的 H3K14pr 和 H3K14bu 富集与 RNA 表达水平相关 (图 4a)，最活跃的基因在其 TSS 的 1kb 内显示出高于多个酰化阈值 (H3K9ac, H3K14pr 和 / 或 H3K14bu) 的富集 (图 4b、c)。GO 富集表明，“羧酸代谢过程”为最显著的富集条目 (图 4d-f)，同时也富集了与脂肪酸或脂质代谢相关的其他条目。总之，数据表明组蛋白 Kpr 和 Kbu 与转录激活有关。

### 5. 组蛋白酰化被 BAF 或 PBAF 重塑复合物差异性结合

质谱分析发现 H3K14ac 和 H3K14pr 肽结合了几乎相同的蛋白质组，主要是哺乳动物 BAF 或 PBAF 复合体的所有亚基，但是，没有发现任何特异性结合 H3K14bu 的 BAF 或 PBAF 亚基 (图 5a、b)，免疫印迹也支持此结果 (图 5c)。

(P) BAF 亚基含有的溴结构域，研究者采用下拉实验和独立的持久测定实验证明 PBRM1 溴结构域可以与含有 H3K14pr

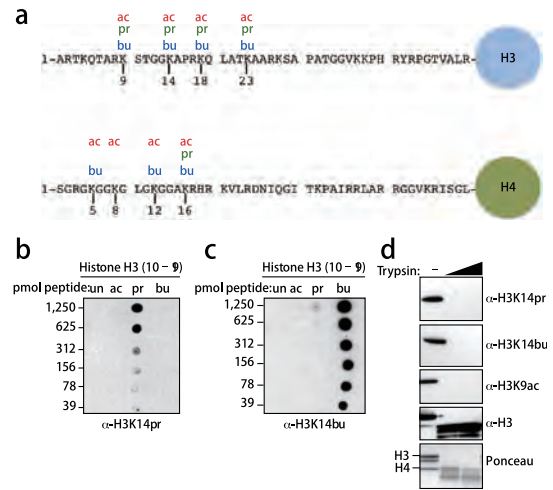


图 1 HeLa 细胞组蛋白上的 Kpr 和 Kbu 位点

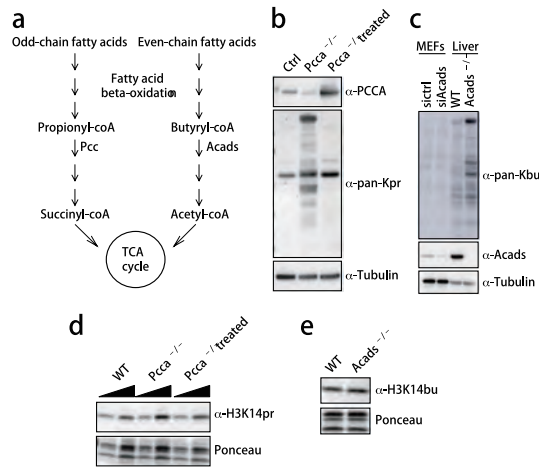


图 2 组蛋白丙酰化对丙酰辅酶 A 代谢敏感

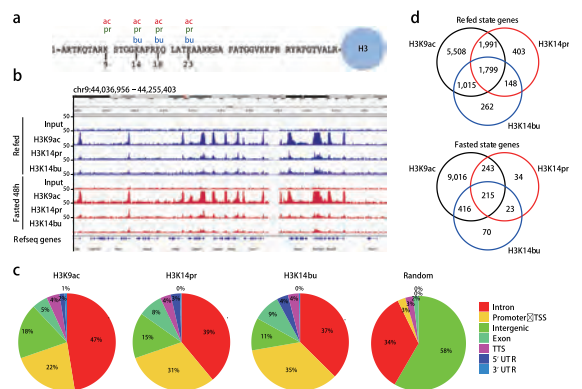


图 3 组蛋白酰化在活性启动子区域特别富集

和 H3K14ac 的肽结合 (图 5d、e)，利用溴结构域的抑制剂 PFI-3 来抑制 HeLa 核提取物中的 BRG1 和 PBRM1 溴结构域功能，导致 PBRM1 与所有 H3K14 肽的结合降低 (图 5f)，证明，Kpr 和 Kac 被高度重叠的含溴结构域的蛋白质识别，包括 BAF 或 PBAF 复合物，参与结合活性。

研究者选择 4 个 H3K14pr 靶基因并敲除 *Pbrm1*，研究 *Pbrm1* 的缺失是否影响 H3K14pr 靶基因的表达 (图 6a、b)。发现在 NIH3T3 细胞中，所测试的所有靶基因在 siPbrm1 细胞中表达降低 (图 6c)。但是，在相同靶基因的 TSS 处的 ChIP-qPCR 实验揭示了 H3K9ac 和 H3K14pr 的富集都没有受到影响 (图 6d)。

### 6. 组蛋白丙酰化刺激转录

研究者在 293 个 T-Rex 细胞中应用了一个稳定整合的报告系统研究组蛋白丙酰化在转录激活中的作用，其中荧光素酶基因在 TK 启动子的控制下，前面有 5 个 Gal4 结合位点 (图 6e)。ChIP-qPCR 实验显示，瞬时转染 Gal4-PCAF 后，TK 启动子的 H3K14pr 富集增加 ~2.5 倍 (图 6f)。这种增加伴随着荧光素酶表达增加 ~3.3 倍 (图 6g)，因此表明 TK 启动子处增加的组蛋白丙酰化有助于转录激活。

为了测试丙酰化是否确实可以刺激转录，研究者使用无细胞体外转录系统，其中可以添加乙酰辅酶 A 或丙酰辅酶 A (图 6h)。发现丙酰辅酶 A 能够与乙酰辅酶 A 相似的程度刺激转录 (图 6i)。使用 H3K14pr 抗体，证实 H3K14 确实在体外组装的染色质上丙酰化 (图 6j)。综上，组蛋白丙酰化至少在体外刺激转录，并且与组蛋白乙酰化转录激活的程度相似。

## 研究结论

结果表明 H3K14 丙酰化是先前未知的代谢物指导的组蛋白 PTM，其定义转录活性染色质状态。H3K14pr 和 H3K14bu 通过组蛋白乙酰转移酶沉积，优先富集活性基因的启动子并被酰化状态特异性读取蛋白识别。此外，丙酰辅酶 A 能够在体外刺激转录系统。值得注意的是，丙酰化在代谢状态改变后重新定义了全基因组 H3 酰化谱，并且代谢酶丙酰辅酶 A 羧化酶的缺失改变了全局组蛋白丙酰化水平。所以，组蛋白丙酰化，乙酰化和丁酰化可以组合起作用以促进高转录输出并将细胞代谢与染色质结构和功能结合。

## 参考文献

Kebede A F, Nieborak A, Shahidian L Z, et al. Histone propionylation is a mark of active chromatin[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2017.

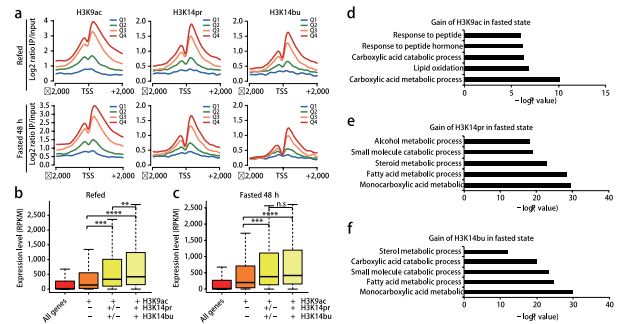


图 4 组蛋白酰化与基因表达的相关性

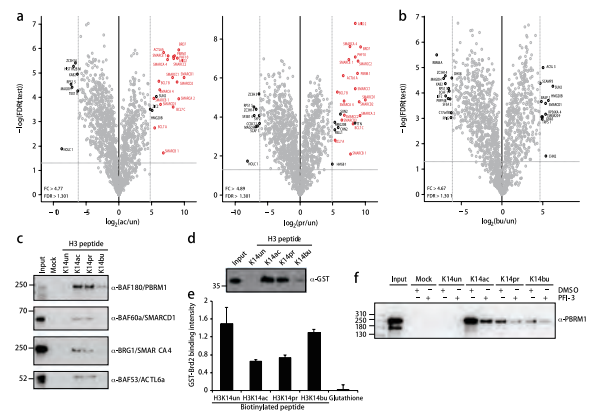


图 5 组蛋白酰化差异地结合 BAF 重塑复合物

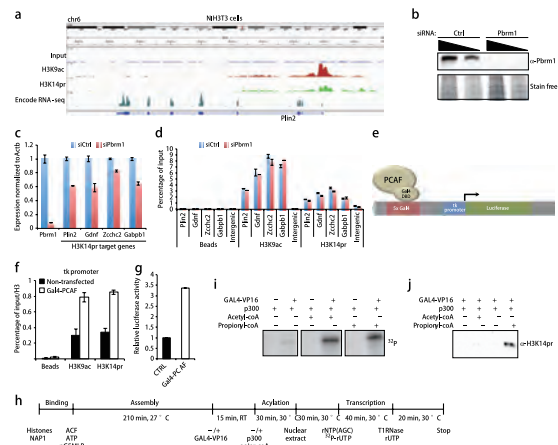


图 6 组蛋白丙酰化刺激转录

# 高深度蛋白质组

蛋白质是生物表型和疾病发生的直接功能分子。传统的基于2D双向电泳分离的蛋白质组通常可以鉴定出约1,000种蛋白，常规的基于酶解多肽的蛋白质组学分析方法约能鉴定3,000~4,000个蛋白，对全蛋白质组的覆盖仅在5~20%左右，远远不能满足高通量定量蛋白质组分析的要求，因此高通量高覆盖度的蛋白质组学研究技术尤为重要。

## 技术原理

蛋白质是生物表型和疾病发生的直接功能分子。传统的基于 2D 双向电泳分离的蛋白质组通常可以鉴定出约 1,000 种蛋白，常规的基于酶解多肽的蛋白质组学分析方法约能鉴定 3,000 ~ 4,000 个蛋白，对全蛋白质组的覆盖仅在 5 ~ 20% 左右，远远不能满足高通量定量蛋白质组分析的要求，因此高通量高覆盖度的蛋白质组学研究技术尤为重要。

超高扫描速度、超高灵敏度的质谱平台为该方面研究提供了强有力的平台基础，诺禾致源拥有 Thermo Scientific 全新的 Q Exactive HF-X 平台，搭配多组分、长梯度的技术策略，实现常规细胞、组织等样本鉴定蛋白质个数大于 10,000 个，磷酸化修饰位点大于 20,000 个，乙酰化修饰位点大于 3,000 个，泛素化修饰位点大于 10,000 个，实现了蛋白质组学和修饰组学的高深度研究。

## 技术参数

产品	仪器平台	富集方法	承诺指标	周期
高深度定量蛋白质组	Thermo Q Exactive™ HF-X	无富集	≥ 10000 个蛋白	70 个自然日
高深度磷酸化蛋白质组	Thermo Q Exactive™ HF-X	IMAC	≥ 20000 个磷酸化位点	80 个自然日
高深度乙酰化蛋白质组	Thermo Q Exactive™ HF-X	赖氨酸乙酰化基序抗体	≥ 3000 个乙酰化位点	80 个自然日
高深度泛素化蛋白质组	Thermo Q Exactive™ HF-X	赖氨酸泛素化基序抗体	≥ 10000 个泛素化位点	80 个自然日

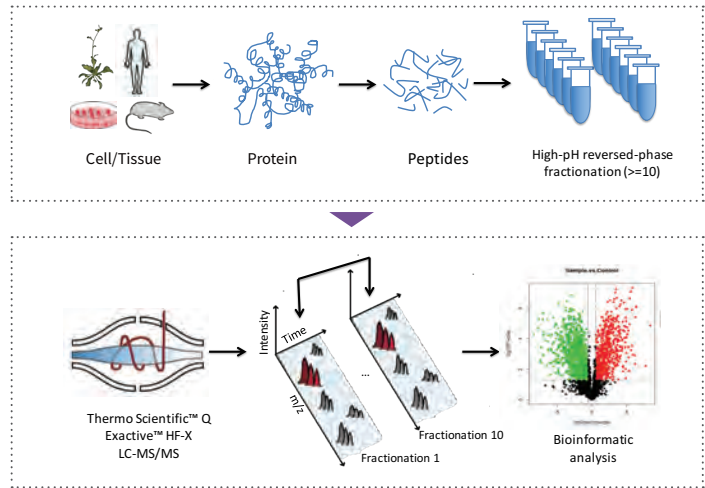
注：每增加 30 个样本，周期增加 10 个自然日，≥ 90 个样本咨询业务线

无法承诺指标的样本类型：坚硬组织（树皮、毛发、老化皮肤、骨组织、指甲、昆虫壳组织、贝壳、钙化组织）；含高丰度蛋白的体液（血液、尿液、唾液、脑脊髓液、卵泡液、细胞或菌类培养基上清）；含高丰度蛋白的组织或细胞（卵细胞、肌肉组织、肌细胞相关组织）；蛋白较少的组织或细胞（动物精子细胞、老化叶片、植物茎、种子）；微生物、藻类（细菌真菌通常覆盖度 60% 或以上）。



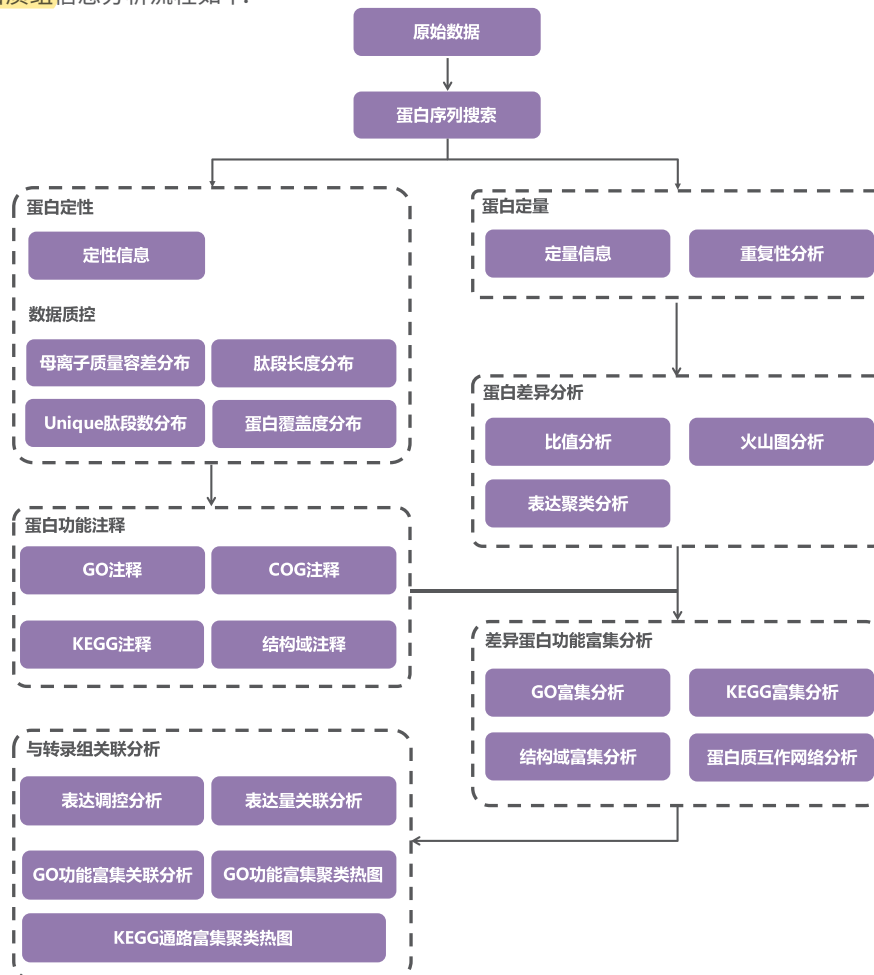
## 实验流程

高深度蛋白质组和高深度修饰蛋白质组采用多馏分、长梯度的实验策略，从而达到鉴定尽可能多的蛋白个数和修饰位点个数，常规高深度蛋白质组实验流程如右：

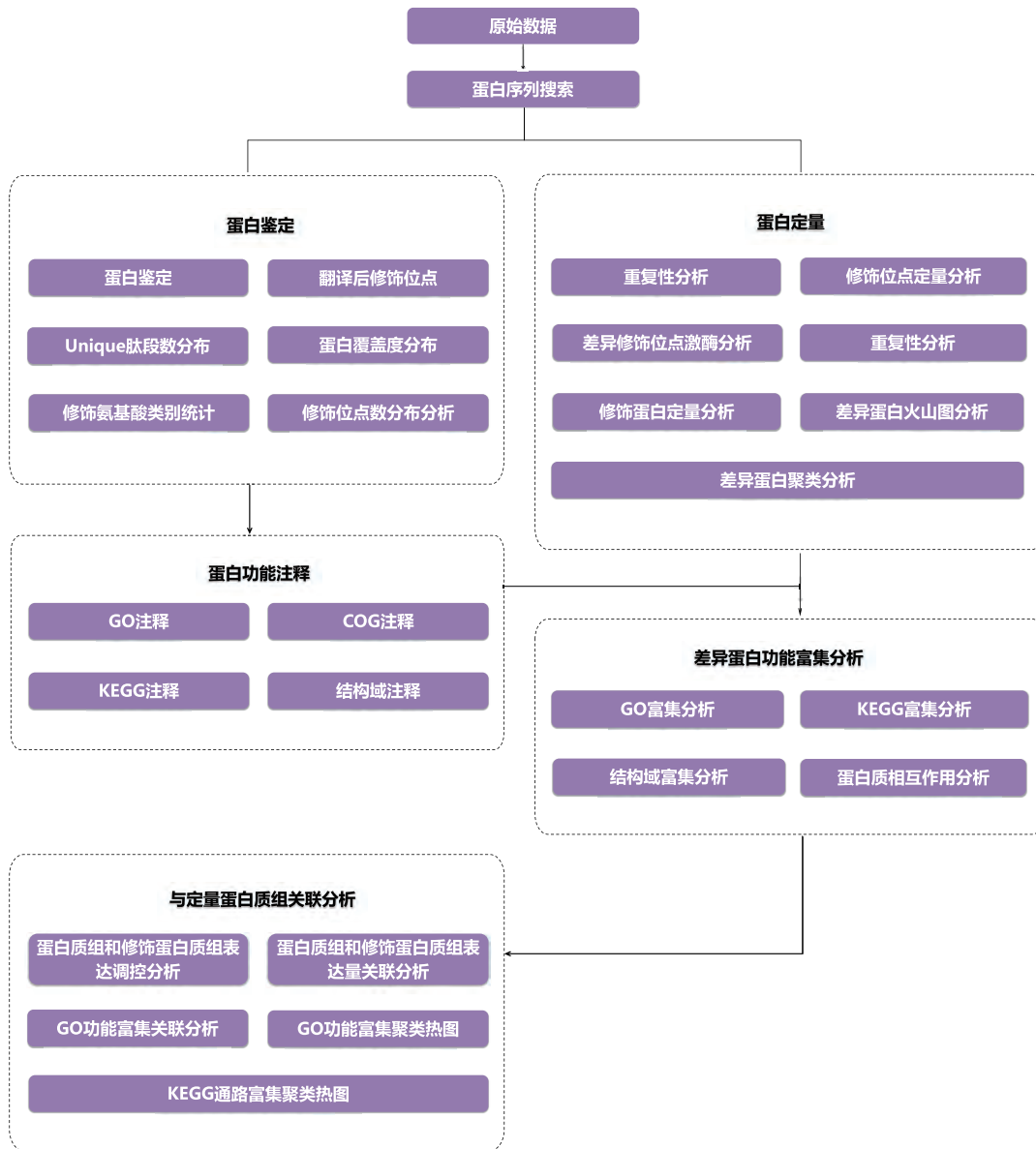


## 信息分析流程

高深度定量蛋白质组信息分析流程如下：



高深度修饰蛋白质组信息分析流程如下:



典型案例解析

代表性文献盘点

研究对象		研究策略	蛋白或修饰位点个数	发表时间	发表期刊	影响因子	链接
农学	果蝇	高深度定量蛋白质组	总蛋白: 7952	2017.07	Genome Research	10.101	PMID:28381612
农学	小鼠主动脉组织	高深度定量蛋白质组	总蛋白: 5117	2018.02	Molecular & Cellular Proteomics	5.232	PMID:29208753
农学	拟南芥	高深度糖基化蛋白质组	糖基化肽段: 971 糖基化蛋白: 262	2017.02	PNAS	9.504	PMID:26641532
农学	大肠杆菌	高深度定量蛋白质	总蛋白: >2300	2016.01	Nature Biotechnology	41.667	PMID:26641532
农学	细胞系和小鼠组织	高深度泛素化蛋白质组	细胞系泛素化肽段: 10218; 组织泛素化肽段: 10572	2016.10	Cell systems	8.406	PMID:27667366
农学	小鼠脑组织和神经细胞	高深度定量蛋白质组	总蛋白: 12934	2015.10	Nature Neuroscience	17.839	PMID:26523646
医学	人心脏组织和细胞	高深度定量蛋白质组	总蛋白: 心脏组织 10751 个; 细胞 10447 个;	2017	Nature Communications	12.353	PMID:29133944
医学	Hela 细胞	高深度蛋白质组+磷酸化+乙酰化	总蛋白: 14200; 磷酸化位点: 10000; 乙酰化位点: 7000	2017	Cell systems	8.982	PMID:28601559
医学	人肌纤维	高深度蛋白质组	总蛋白: 6000	2017	Cell Reports	8.032	PMID:28614723
医学	小鼠主动脉组织	高深度定量蛋白质组	总蛋白: 5117	2017	Molecular & Cellular Proteomics	5.232	PMID:29208753
医学	人乳腺癌组织	高深度定量蛋白质组	总蛋白: >10000	2016	Nature Communications	12.124	PMID:26725330
医学	细胞系和小鼠组织	高深度泛素化蛋白质组	细胞系泛素化肽段: 10218; 组织泛素化肽段: 10572	2016	Cell systems	8.406	PMID:27667366
医学	人血浆	高深度定量蛋白质组	血浆总蛋白: 1000	2016	Cell systems	8.406	PMID:27135364
医学	小鼠脑组织和神经细胞	高深度定量蛋白质组	总蛋白: 12934	2015	Nature Neuroscience	16.721	PMID:26523646

## 案例解析

## 案例一

## 果蝇的发育蛋白质组学

The developmental proteome of *Drosophila melanogaster*

研究对象：果蝇 | 期 刊：Genome Research

影响因子：10.101 | 发表单位：分子生物学研究所 (IMB)，美因茨，德国 | 发表时间：2017 年 4 月

## 摘要

*Drosophila melanogaster* is a widely used genetic model organism in developmental biology. While this model organism has been intensively studied at RNA level, a comprehensive proteomic study covering the complete life cycle is still missing. Here, we apply label-free quantitative proteomics to explore proteome remodeling across *Drosophila*'s life cycle, resulting in 7,952 proteins, and provide a high temporal-resolved embryogenesis proteome of 5,458 proteins. Our proteome data enabled us to monitor isoform-specific expression of 34 genes during development, to identify the pseudogene Cyp9fpsi as a protein-coding gene and to obtain evidence of 268 small proteins. Moreover, the comparison with available transcriptomic data uncovered examples of poor correlation between mRNA and protein, underscoring the importance of proteomics to study developmental progression. Data integration of our embryogenesis proteome with tissue-specific data revealed spatial and temporal information for further functional studies of yet uncharacterized proteins. Overall, our high resolution proteomes provide a powerful resource and can be explored in detail in our interactive web interface.

## 关键词

果蝇 (*Drosophila melanogaster*)，基因调控，发育，胚胎发生，蛋白质组学，系统生物学

## 研究背景

果蝇是研究发育和衰老最好的模式生物之一。在其生命周期中，它通过胚胎，幼虫，蛹和成虫等阶段，经历完全的表型变态。目前，果蝇发育机制研究多基于转录水平，然而，转录水平仅仅是蛋白质表达的中度预测因子，因为它们不涉及翻译后调节或蛋白质稳定性等转录后过程。但是目前具有可用抗体的蝇蛋白数量只有 1586 个，只覆盖一小部分表达的基因。基于质谱的研究，多局限于果蝇某一阶段，蛋白质组学覆盖率相对较低（大约 2000 个蛋白质），并不包括完整的发育过程。

## 方法流程

## 取样策略

果蝇生命周期的 15 个时间点（成虫雌雄分别取样）共 17 种样本；4 个生物学重复；共 68 个样本

## 质谱策略

Label-free 定量蛋白质组，每个样本 5h；共 68 个 runs, 340h

## 后续验证

整个生命周期核心蛋白质组分析  
整个生命周期的差异蛋白质组分析  
转录组与蛋白质组关联分析  
性别特异性蛋白质分析  
小蛋白质 / 假基因分析  
胚胎发育相关蛋白质组分析

## 研究结果

### 1. 蛋白质组鉴定结果

鉴定了 9,627 个蛋白质，在 FDR < 0.01 时具有 144,067 个独特的肽序列。1,078 个酵母和 8,549 个果蝇蛋白质。鉴定出的酵母蛋白质几乎完全来源于以酵母为食物来源的幼虫阶段。过滤后，对 7,952 个蛋白质进行后续分析。

### 2. 核心蛋白质组和蛋白质表达动力学

将生命周期的四个主要阶段中的蛋白质做韦恩图，发现 4,627 个蛋白质，超过一半的蛋白质可以在所有阶段检测到（图 1A）。对这些连续表达的蛋白质进行 GO 注释富集分析发现，这些核心蛋白与基本细胞生命活动代谢相关（图 1B）；丰度分析过滤后发现整个生命周期中有 1,386 个稳定表达和 1,978 个差异表达的蛋白质（图 1C）。

### 3. 整个生命周期的差异蛋白质组

蛋白质组涵盖超过 6 个数量级的动态范围。这些 1,535 个差异调节的蛋白质组中的大多数在成年果蝇中发现（556），其次是胚胎（473），蛹（317）和幼虫（189）。对不同阶段的差异蛋白进行 GO 富集分析（图 2A），发现在胚胎发生过程中，主要是与有丝分裂的细胞周期调控相关的蛋白表达；幼虫和蛹中的阶段特异性蛋白主要是几丁质的角质层和表皮蛋白；在成虫中，主要是气味结合蛋白、光感官系统蛋白与肌肉蛋白（图 2B）。

### 4. 转录组与蛋白质组关联分析

以基因家族 71E (*Eig71E*) 为例研究转录组与蛋白质组表达（图 2C）。蛋白表达在转录组之后，并且影响更加持久（图 2D）。甚至有时，在很多情况下，我们在一个时间点检测蛋白质，而在多个时间点检测到 RNA（图 2E），表明转录组学不能直接预测蛋白质水平，这也证明了蛋白质组研究果蝇发育的必要性。

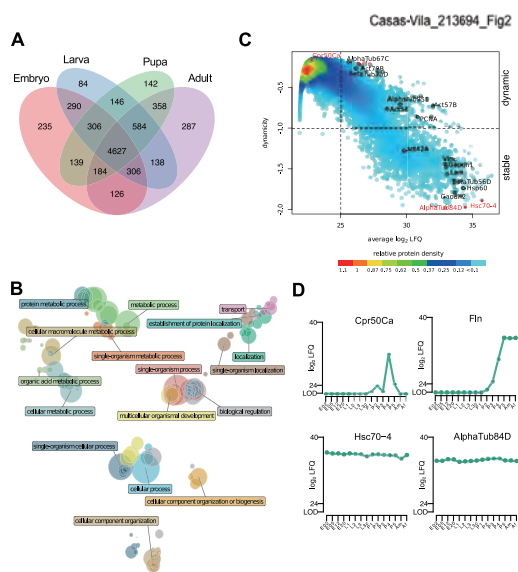


图 1 共有蛋白分析

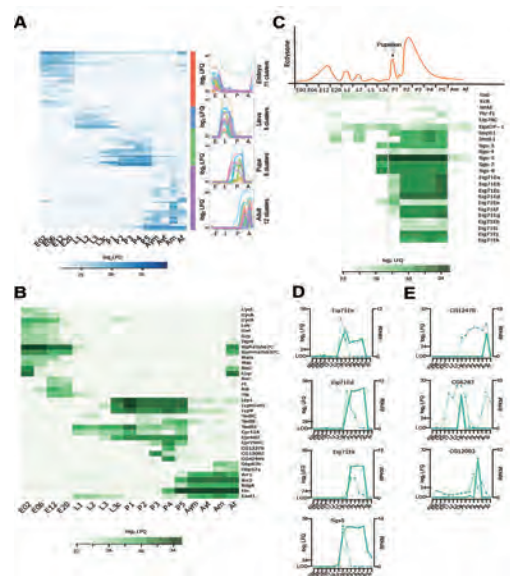


图 2 差异蛋白分析

### 5. 成年果蝇中性别特异性蛋白质分析

发现了 308 个雄性和 374 个雌性特异性蛋白质 (图 3A)。在幼蝇中仅检测到 21 种雌性特异性蛋白质; 在其雄性对照中有 155 种蛋白质表达较高 (图 3B)。

### 6. 小蛋白质分析

翻译的小 ORF (smORF) 可达 100 个氨基酸, 这些小蛋白定位到特定的亚细胞区室, 并像任何其他蛋白一样执行细胞功能, 但它们的蛋白质编码潜力很难在生物信息学上评估。检测 268 个小蛋白 (图 4A), 其中 84% 有两个或多个独特的肽和时间表达信息。

### 7. 假基因分析

鉴定了 29 个推定的蛋白质。尽管大多数这些蛋白质只鉴定到单个肽, 但是原来认为的假基因 *Cyp9f3psi* 检测到 5 个独特序列的 23 个肽, 测得的肽与 N 末端和 C 末端区域相匹配, 表明这可能不是假基因 (图 4C)。

### 8. 胚胎发育相关蛋白质组分析

以较小的间隔收集整个胚胎 (图 5A), 检测到 6487 个蛋白质, 其中 5458 个在至少两个时间点的重复中定量, 差异表达蛋白 1644 个 (图 5B)。对差异表达的蛋白进行了 GO 富集分析 (图 5C-E)。

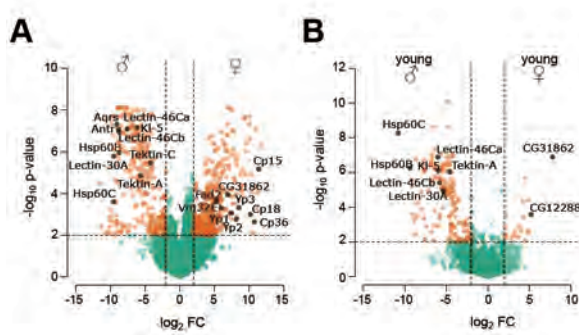


图 3 性别特异性蛋白质分析

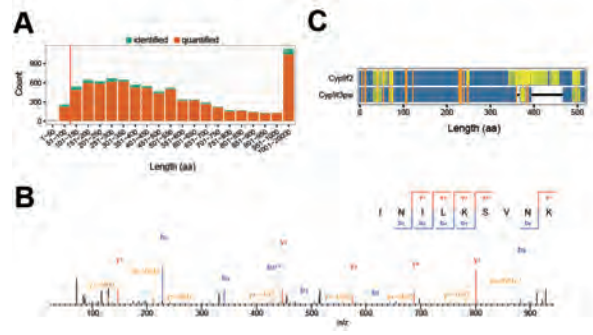


图 4 小蛋白分析与 *Cyp9f3psi* 假基因验证

## 研究结论

作者运用高深度非标记质谱技术对果蝇生命周期各个阶段进行了定量蛋白质组学分析, 弥补了这方面研究缺失。深入研究了生命周期各个阶段共有蛋白质组, 差异蛋白组; 雌雄差异蛋白组, 小蛋白组, 假基因等。通过转录组与蛋白组关联分析, 强调了蛋白质组学研究发育进程的重要性。

## 参考文献

Casas-Vila, N, et al. "The developmental proteome of *Drosophila melanogaster*." *Genome Research* 27.7(2017):1273.

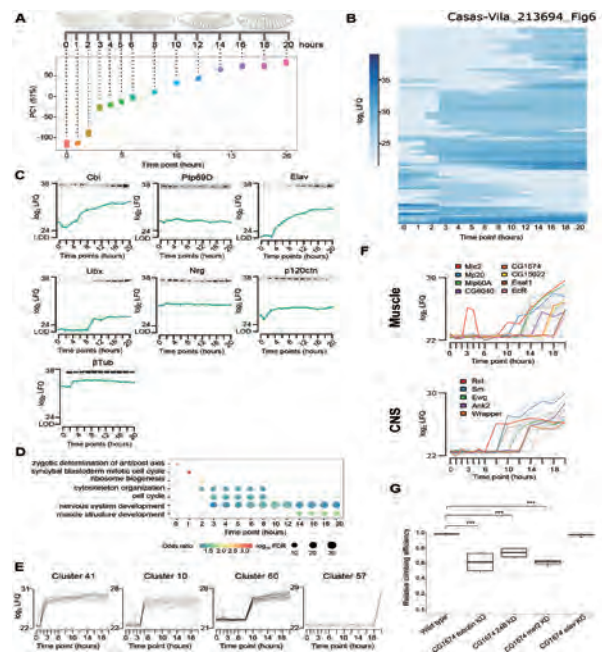


图 5 胚胎发育蛋白质组分析

## 案例二

### 泛素蛋白质组揭示蛋白质泛素化在弓形虫的细胞周期转换中的作用

The Ubiquitin Proteome of *Toxoplasma gondii* Reveals Roles for Protein Ubiquitination in Cell Cycle Transitions

研究对象：弓形虫速殖子 | 期刊：Cell Host Microbe

影响因子：12.552 | 发表单位：阿尔伯特爱因斯坦医学 | 发表时间：2015 年 11 月

## 摘要

Protein ubiquitination plays key roles in protein turnover, cellular signalling, and intracellular transport. The genome of *Toxoplasma gondii* encodes ubiquitination machinery but the roles of this posttranslational modification (PTM) are unknown. To examine the prevalence and function of ubiquitination in *T. gondii*, we mapped the ubiquitin proteome of tachyzoites. Over 500 ubiquitin-modified proteins, with almost 1000 sites, were identified on proteins with diverse localisations and functions. Enrichment analysis demonstrated that 35% of ubiquitinated proteins are cell cycle-regulated. Unexpectedly, most classic cell cycle regulators conserved in *T. gondii* were not detected in the ubiquitinome. Furthermore, many ubiquitinated proteins localise to the cytoskeleton and inner membrane complex, a structure beneath the plasma membrane facilitating division and host invasion. Comparing the ubiquitinome with other PTM proteomes reveals waves of PTM enrichment during the cell cycle. Thus, *T. gondii* PTMs are implicated as critical regulators of cell division and cell cycle transitions.

## 关键词

弓形虫；泛素；顶复；寄生虫；细胞周期；翻译后修饰

## 研究背景

泛素是一种由 76 个氨基酸组成的小蛋白，可与蛋白的赖氨酸残基结合，能够调节大量的细胞过程。蛋白质泛素化在蛋白转运、蛋白质相互作用、亚细胞定位、转录调控以及蛋白降解中起关键作用。弓形虫是专性胞内寄生虫，通过胞内生殖的独特形式进行细胞分裂复制，其中在分裂期间在母体细胞内形成两个子细胞。弓形虫的基因组编码泛素化所需物质，但这种翻译后修饰（PTM）的作用尚不清楚。因此本研究针对弓形虫速殖子进行泛素化蛋白质组研究，以阐释弓形虫泛素化的普遍性和功能。

## 方法流程

### 取样策略

研究对象：弓形虫速殖子  
取样策略：细胞周期不同阶段取样  
(胞内速殖子 2 个技术重复和 2 生物学重复, 胞外速殖子 2 个技术重复)

### 质谱策略

泛素化蛋白质组：LC-MS/MS  
修饰肽段富集：K-ε-GG 抗体, Mascot 搜库  
数据库：弓形虫和人蛋白质的组合数据库以及诱饵库

### 后续验证

Motif 分析、GO 富集分析、聚类热图、亚细胞机构定位  
基因簇富集：采用新组装和预定义的基因组（前人研究）进行泛素化蛋白富集

## 研究结果

### 1. 泛素化在弓形虫细胞周期中的变化

通过 Western Blot 证明泛素化在速殖子中普遍存在 (图 1A)。利用免疫荧光实验 (IFA) 检测蛋白质的泛素化在弓形虫细胞周期中情况 (图 1B)，表明细胞周期调节弓形虫中蛋白质的泛素化。

### 2. 胞内速殖子中的泛素化位点鉴定

利用质谱手段，在胞内速殖子中鉴定到 454 个泛素化蛋白和 800 个位点。分析发现泛素化蛋白具有多种定位和功能 (图 2B、C)，细胞骨架蛋白和内膜复合物 (IMC) 的组分占鉴定到的泛素化蛋白的 18% (图 2B、D)，并且 8% 的泛素化蛋白集中细胞核和细胞质，有 13 种泛素化蛋白定位于顶质体或线粒体，并且根据功能推测另外 8 种泛素化蛋白定位于线粒体。

GO 富集分析，在染色质调节相关的过程中，与二聚化、结构功能以及核糖体成分相关的 GO 条目被显著富集 (图 2E)，大部分泛素化蛋白在翻译中起作用 (33 个核糖体蛋白有 60 个位点)。此外，代谢酶和参与生物合成的酶 (例如糖酵解) 也有显著占比 (10%)，涉及囊泡运输和离子运输的蛋白也检测到了泛素化。

### 3. 泛素化修饰位点的 motif 分析

与人类细胞一样，弓形虫中的泛素化没有严格的泛素化基序，如围绕每个泛素化赖氨酸 (-7to+7) 的氨基酸富集热图 (图 3A) 和 WebLogo 共识图 (图 3B)。尽管富集和消耗的模式与人类不同，但趋势相似，泛素化的肽富含疏水性残基。

### 4. 组蛋白泛素化和独立验证

组蛋白的共价修饰调节转录和染色质动力学，在 8 个弓形虫组蛋白上检测到 35 个泛素化位点 (图 4A)。虽然有研究表明弓形虫组蛋白上的赖氨酸残基也可以被乙酰化、甲基化或琥珀酰化，但是除了 H3K24 外很少出现在与泛素化蛋白相同的赖氨酸残基上 (图 4A)。使用泛素特异性抗体进行 H2BK120 和 H2BV 的 WB 检测，均观察到了高分子量的条带 (图 4B)，表明在弓形虫染色质中存在泛素-组蛋白缀合物，具有保守功能 (图 4E)。

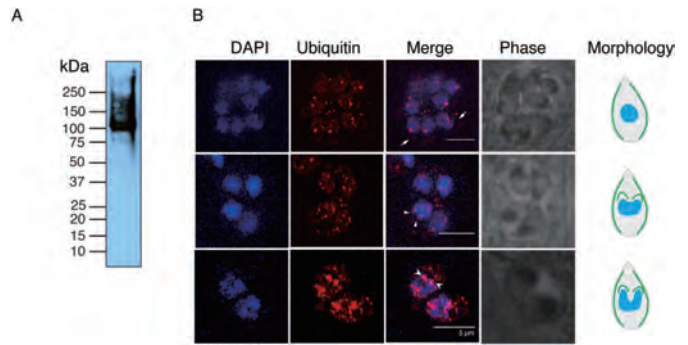


图 1 泛素在细胞周期中的变化情况

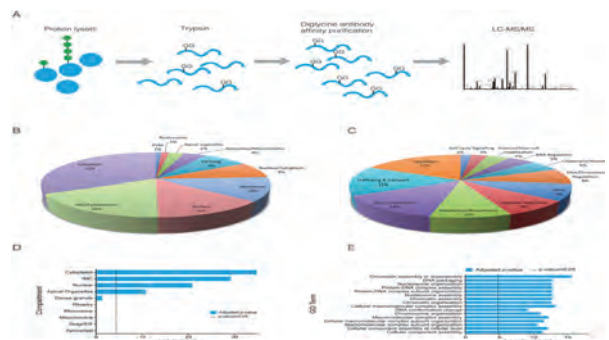


图 2 弓形虫中泛素化蛋白的鉴定

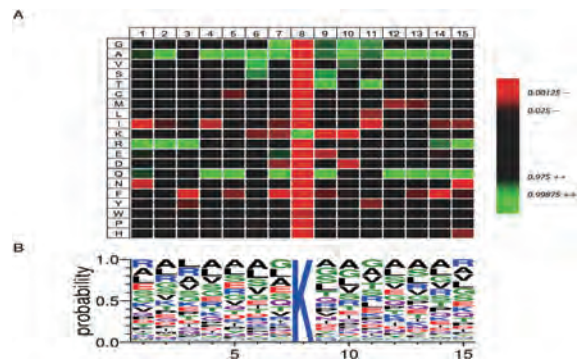


图 3 泛素化赖氨酸残基周围的氨基酸环境

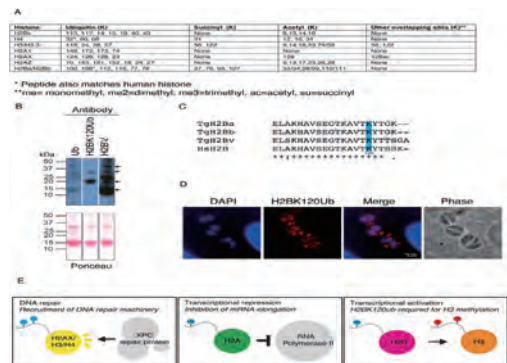


图 4 弓形虫中与转录激活、抑制和 DNA 修复相关的泛素化修饰位点



### 5. 利用细胞周期调控的基因富集泛素化蛋白质

在弓形虫 8h 细胞周期期间有两个转录波，对应于 G1 和 S / M 期（图 5A）。统计学检验发现泛素化蛋白质组显著富集蛋白质的 mRNA 在细胞周期中的两个点上上调：G1 末期（6.8-7.6h），以及 S / M 期中期（3-4h）（图 5B、C）。其中 mRNA 在 G1 中上调的 51 种泛素化蛋白中有 DNA 许可因子和转录因子。转向 S / M 期，泛素化蛋白的 70 个基因被上调，特别是那些编码 IMC 和细胞骨架蛋白的基因。

### 6. E3 连接酶和去泛素化酶在细胞周期中的表达及速殖子泛素蛋白的差异

泛素化过程由 E1、E2 和 E3 的泛素连接酶介导，E3 连接酶直接催化泛素向底物的转移并赋予泛素特异性。在鉴定的 94 个弓形虫候选 E3 连接酶中，24 个候选 E3 连接酶的 mRNA 在细胞周期中上调，其中 13 个在 G1 期间完全上调，11 个在 S / M 期期间完全上调，与专用的 G1 和 S / M 期 E3 连接酶一致（图 5D、E）。去泛素化酶通过选择性地从靶蛋白中去除泛素链来抵消 E3 连接酶的泛素化活性。使用当前的去泛素化酶模型，扩展了弓形虫中候选去泛素化酶的列表，其中 30 个是细胞周期调节的。与 E3 连接酶一样，几种去泛素化酶在 S / M 期中间上调表达（图 5D、E）。

进一步检测从宿主细胞中自然排出的胞外速殖子的泛素蛋白，发现 346 种泛素蛋白质，其中 51 种蛋白质是胞外速殖子特有的。在胞外寄生虫中发现的泛素化位点较少，G1 蛋白的富集程度更高（图 5F、G）。

### 7. 泛素化和其他翻译后修饰（PTMs）之间的 crosstalk

泛素化显与其他修饰尤其是乙酰化和磷酸化存在密切的 crosstalk，通过与其他修饰组比对（6A），发现 21% 的泛素化蛋白质也被乙酰化，同时发现泛素蛋白和 SUMO 修饰之间存在关联（图 6B）。

磷酸化通常是泛素介导的降解的先决条件，胞内 78% 的泛素化蛋白也被磷酸化（图 6A）。使用与上述相同的细胞周期基因组对已公布的 PTM 数据集和未发表的 PTM 数据集进行富集分析（图 6C）。发现在细胞周期调节的基因中有三波磷酸化，其中两条波在 G1 中明显，一条在 S / M 中。在 G1 晚期泛素化蛋白质中有 35 个同时发生磷酸化，虽然大多数 PTM 蛋白质组未显示 S / M 期基因的富集，但泛素化和磷酸化蛋白质组均富集在 S / M 期边界上调的基因，其中 63 种蛋白质重叠，且许多泛素化和磷酸化的蛋白质是 IMC 和细胞骨架蛋白质。

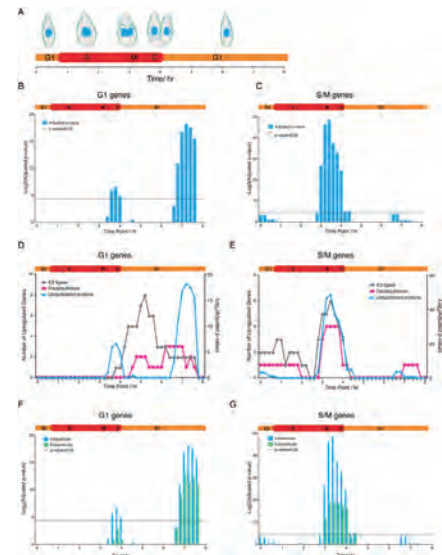


图 5 泛素化蛋白质富含细胞周期调节蛋白质

PTM Proteome	Reference for Proteome (DOI)	Genes in Dataset	Overlap with Ubiquitin Proteome	Percent of		
				Ubiquitin Proteome	Common Proteome	Total Proteome
Astroglia (Taq)	10.1101/012000-12	464	105	23	27	1
Astroglia (Hematolysis)	10.1101/012000-12	500	102	20	27	1
Astroglia (Acanthamoeba)	10.1101/012000-12	500	102	20	27	1
Biochemistry (Hematolysis)	10.1101/012000-12	500	102	20	27	1
D-Glycolysis (Taq)	Manuscript in Preparation	500	49	17	30	15
D-Glycolysis (Hematolysis)	Manuscript in Preparation	500	49	17	30	15
D-Glycolysis (Acanthamoeba)	Manuscript in Preparation	500	49	17	30	15
Phosphoproteome (Acanthamoeba)	10.1101/012000-12	2138	365	17	23	15
Phosphoproteome (Hematolysis)	10.1101/012000-12	2138	365	17	23	15
Phosphoproteome (Taq)	10.1101/012000-12	2138	365	17	23	15
Ubiquitin Proteome	Manuscript in Preparation	500	500	100	100	100
Ubiquitin Proteome	Manuscript in Preparation	500	21	4	11	2
Ubiquitin Proteome	Manuscript in Preparation	500	14	3	11	2
Ubiquitin Proteome	10.1101/012000-12	500	30	6	30	15

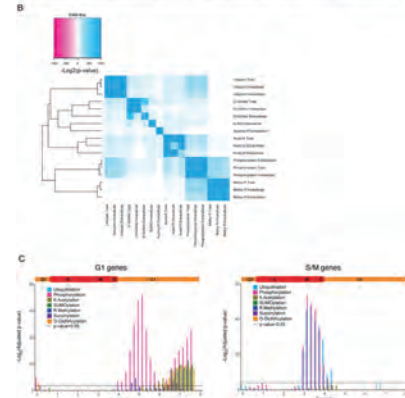


图 6 PTM 蛋白质组的细胞周期富集分析

## 研究结论

本研究针对弓形虫速殖子进行泛素化蛋白质组分析，在具有不同定位和功能的蛋白质上鉴定了超过 500 种泛素化修饰的蛋白质，其具有近 1000 个位点。富集分析表明，35% 的泛素化蛋白质是细胞周期调节的。此外，许多泛素化蛋白定位于细胞骨架和内膜复合物，质膜下面的结构促进分裂和宿主入侵。将泛素组与其他翻译后修饰（PTM）蛋白质组进行比较揭示了细胞周期中 PTM 富集的波动。因此，弓形虫 PTM 被认为是细胞分裂和细胞周期转换的关键调节因子。

## 参考文献

Silmon NC, Yakubu RR, Chen AL, et al. The Ubiquitin Proteome of Toxoplasma gondii Reveals Roles for Protein Ubiquitination in Cell-Cycle Transitions.[J]. Cell Host & Microbe, 2015, 18(5):621-633.

### 案例三

## 人类心脏不同区域与细胞类型的定量蛋白质组学研究 Region and cell-type resolved quantitative proteomic map of the human heart

研究对象：人类心脏 | 期 刊：Nature Communications

影响因子：12.124 | 发表单位：德国心脏中心和 Max Planck 生化研究所 | 发表时间：2017 年 11 月

### 摘要

The heart is a central human organ and its diseases are the leading cause of death worldwide, but an in-depth knowledge of the identity and quantity of its constituent proteins is still lacking. Here, we determine the healthy human heart proteome by measuring 16 anatomical regions and three major cardiac cell types by high-resolution mass spectrometry-based proteomics. From low microgram sample amounts, we quantify over 10,700 proteins in this high dynamic range tissue. We combine copy numbers per cell with protein organellar assignments to build a model of the heart proteome at the subcellular level. Analysis of cardiac fibroblasts identifies cellular receptors as potential cell surface markers. Application of our heart map to atrial fibrillation reveals individually distinct mitochondrial dysfunctions. The heart map is available at [maxqb.biochem.mpg.de](http://maxqb.biochem.mpg.de) as a resource for future analyses of normal heart function and disease.

### 关键词

心脏, 蛋白质组学, Label-free, 高深度, 房颤, 心脏成纤维细胞, 心肌细胞, 平滑肌细胞

### 研究背景

心脏是人体的重要器官，人的心脏在一生中平均跳动 20 亿次，每一次收缩都是由电信号和机械力之间错综复杂的相互作用所完成的。在解剖层面，心脏由四个腔体，四个瓣膜，大动脉和静脉组成。心脏的细胞类型主要有四类，心脏成纤维细胞（CF），心肌细胞（AF），平滑肌细胞（SMC）和内皮细胞（EC）。但目前对于这四类细胞的数量比例仍然存在争议。与其他肌肉组织一样，心脏收缩装置中少量的关键蛋白质支配完成心脏的收缩运动。心脏疾病是目前世界范围内的死亡主因，从生理学与病理学角度，研究心脏在空间与细胞水平上的分子特征，将成为调查心脏疾病的重要切入点。

### 方法流程

#### 取样策略

3 个成年健康心脏，每个心脏按照解剖学采集 16 份不同区域的样本，iST 方法制备样品

#### 质谱策略

高 PH 反相分馏为 8 个馏分，Label-free 质谱分析，100min/ 馏分

#### 后续验证

心脏蛋白质组图谱  
不同心脏解剖部分的蛋白质组分析

## 研究结果

### 1、建立心脏蛋白质组图谱

本研究共鉴定到 181,814 个 unique peptides，匹配到 11,236 个 protein groups。所有蛋白的平均序列覆盖率为 38%，不过高丰度蛋白具有较高的蛋白序列覆盖度，如肌球蛋白调控轻链 2 (MYL7) 序列覆盖率为 100%。MaxLFQ 算法定量了 11,163 个蛋白，10,751 个蛋白来自心脏的 16 个解剖区域，10,447 个蛋白来自心肌的四种细胞类型 (图 1d)。所有区域的蛋白质组学深度都很高，包括 4 个心脏瓣膜区域，虽然它们主要由 ECM 组成，但仍平均鉴定到了 7,800 个蛋白。与 “human draft-proteome” 相比，蛋白鉴定数目是其三倍，且大部分为低丰度蛋白。

### 2、不同心脏解剖区域的蛋白质组分析

为了全面评估 16 个心脏解剖区域的蛋白质组相似性与差异性，本研究采用了 PCA 分析的方法。来自不同样本的腔室蛋白、血管蛋白和瓣膜蛋白各自清晰的聚集在一起 (图 2a)。三个组别的蛋白区分，主要与 MYL7、MYL5、COX7A1、SRL、TTN、胶原蛋白 (COL4A2, COL14A1)、整联蛋白 (ITGA7, ITGA8 和 ITGB1)，以及双联蛋白聚糖 (BGN) 等相关。这些蛋白反应了腔室与 ECM 成分丰富的血管与瓣膜之间的生物学差异，ECM 成分可作为本研究蛋白质组学分析的阳性对照 (图 2b)。

进一步定量研究不同细胞器的蛋白质组水平，本研究发现线粒体蛋白占腔室蛋白总含量的 21% (图 3b)，相比之下，HeLa 细胞中线粒体蛋白质占比 7%，瓣膜和血管中占比 3%。

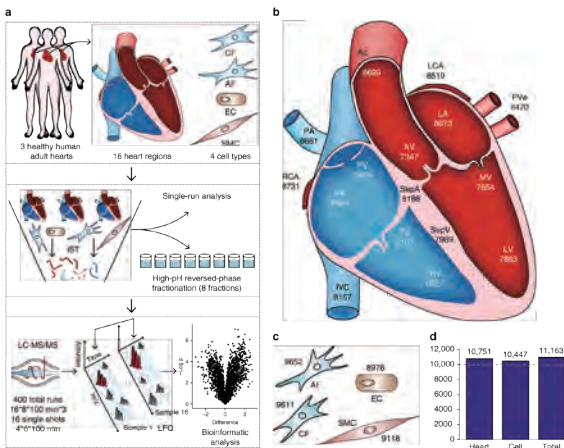


图 1. 人类心脏的定量蛋白质组。

- a. 实验设计。b. 显示心脏不同结构区域的定量蛋白质数目。
- c. 显示四种心脏细胞类型的定量蛋白质数目。d. 所有心脏区域、细胞类型以及总蛋白数目的 Bar 图。

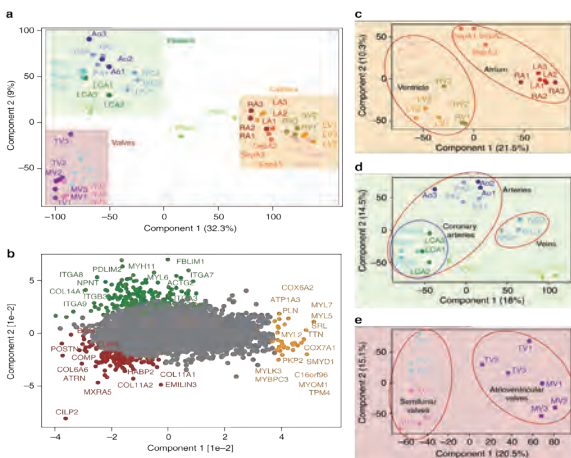


图 2. 基于 16 份心脏样本的蛋白质组表达谱进行的 PCA 分析

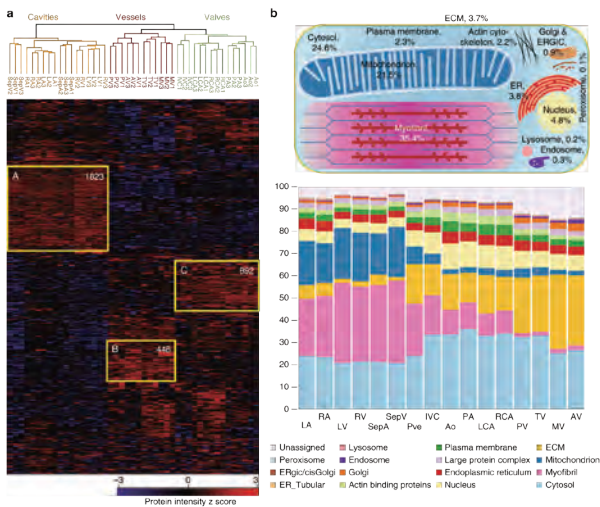


图 3. 不同心脏区域差异表达的蛋白。a. 差异蛋白的聚类热图 (FDR<0.05), 黄色标注的 A、B、C 区域显示在腔室、血管和瓣膜中显著上调的蛋白。b 上图显示平均的心脏细胞组分蛋白占比, 下图显示不同心脏区域细胞蛋白占比。

### 3、心脏蛋白质图谱在房颤中的临床应用

为了确认本研究结果是否可以作为健康心脏与患病心脏之间分子差异的参考, 研究人员后续收集了 3 位房颤患者的左心房样本。房颤是最为常见的心率失常疾病, 是导致患者死亡的主要原因。借助 iST 样品制备方法, 本研究可以在不到 2 天的时间内对任何心脏样本进行分析, 其中 300min 为质谱检测时间 (图 4a)。通过这种方法, 研究人员对 4147 个健康心脏左心房蛋白与 3681 份房颤患者左心房蛋白进行定量分析, 与健康样本相比, 房颤样本 104 个蛋白显著下调, 307 个蛋白上调 (图 4b)。

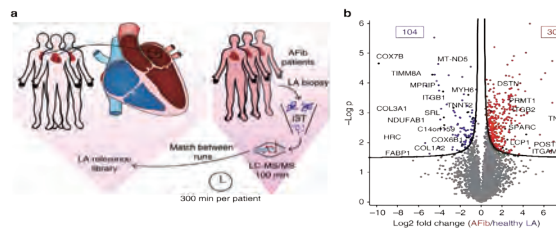


图 4. 心脏蛋白质图谱在房颤中的临床应用

## 研究结论

本研究使用“loss-less”的高 PH 反相分馏和高分辨率质谱, 定量检测心脏组织的不同区域与细胞类型的蛋白质组图谱。本研究鉴定到了超过 11,000 种蛋白质, 这是迄今为止针对人类健康心脏进行的最深度的蛋白质组学。

本研究使用微量样本, 精简工作流程, 在不到两天的时间内便可对心脏样本进行检测, 为未来的临床应用提供了可能。在解剖层面, 不同心脏区域的蛋白表达存在差异, 为找寻可靠的疾病标志物提供了可能。研究结果还显示房颤患者呈现与健康人群不同的蛋白质图谱, 为找寻疾病病因提供了初步线索。

## 参考文献

Doll S, Dreßen M, Geyer P E, et al. Region and cell-type resolved quantitative proteomic map of the human heart[J]. Nature Communications, 2017, 8(1):1469.

## 案例四

### 不同细胞类型和脑区域的蛋白质组学研究

Cell type- and brain region-resolved mouse brain proteome

研究对象：小鼠脑组织与神经细胞 | 期刊：NATURE NEUROSCIENCE  
影响因子：17.839 | 发表单位：马克斯普朗克研究所 | 发表时间：2015 年 11 月

## 摘要

Brain transcriptome and connectome maps are being generated, but an equivalent effort on the proteome is currently lacking. We performed high-resolution mass spectrometry-based proteomics for in-depth analysis of the mouse brain and its major brain regions and cell types. Comparisons of the 12,934 identified proteins in oligodendrocytes, astrocytes, microglia and cortical neurons with deep sequencing data of the transcriptome indicated deep coverage of the proteome. Cell type-specific proteins defined as tenfold more abundant than average expression represented about a tenth of the proteome, with an overrepresentation of cell surface proteins. To demonstrate the utility of our resource, we focused on this class of proteins and identified Lsamp, an adhesion molecule of the IgLON family, as a negative regulator of myelination. Our findings provide a framework for a system-level understanding of cell-type diversity in the CNS and serves as a rich resource for analyses of brain development and function.

## 关键词

脑区域组织，神经细胞，高深度的蛋白质组学研究，大脑边缘系统相关膜蛋白

## 研究背景

为了了解大脑的功能，来自马克斯普朗克生物化学研究所以及哥根廷实验医学研究所的科学家，首次量化了成年小鼠大脑内的所有蛋白质。他们发现，在成年小鼠脑中有大约 13,000 种不同的蛋白质。不同类型的细胞和脑区中的蛋白质数量，以及它们彼此之间有何区别，这个蛋白质分布图，来自于小鼠中五种不同细胞类型和十个不同脑区的蛋白质数据，构成了目前最全面的蛋白质数据集，这种深层次的蛋白质组调查，为分析大脑发育和功能提供了丰富资源。

## 方法流程

### 取样策略

P60 male C57BL/6 小鼠的 10 个不同的脑区域：海马体、纹状体、丘脑、小脑脑干嗅球、运动皮质、前额皮质、胼胝体、视神经；  
5 种神经细胞：星形胶质细胞、少突细胞、小神经胶质细胞、皮层神经元、小脑颗粒神经元

### 质谱策略

使用 SAX 方法将每个样本的多肽分为 6 个组分，每组分进行 4 小时的高精度质谱分析 (Q Exactive)

### 后续验证

各区域组织和细胞鉴定到蛋白情况分析，并和转录鉴定到基因情况进行比较分析；  
各区域各细胞之间差异蛋白和功能富集分析；  
细胞粘附相关蛋白分析

## 研究结果

1、脑区域组织和细胞中总共鉴定到 13,214 个 protein groups，其中有 10,529 个蛋白是所有细胞类型和脑区域组织共有的蛋白。蛋白水平和 mRNA 水平的韦恩图分析表明，中枢神经系统细胞类型总共 12,934 个蛋白对应了 11,690 个 ENSEMBL 基因，和 mRNA 共有基因 10,375 个，表明蛋白的覆盖度已经可以达到 RNA 的水平。

2、使用 GOBP、GOCC 和 KEGG 注释和富集分析表明了各细胞类型的生物学过程、组成和代谢通路情况。少突细胞的代谢通路和生物学功能富集到已知高特异性通路，例如髓鞘形成、轴突形成、脂质代谢和膜相关通路。在少突前提细胞中，我们观察到重点富集到 RNA 相关的代谢通路，同时，研究发现在少突细胞分化的过程中累积髓鞘的成分。小神经胶质细胞富集的主要代谢通路涉及免疫过程、抗原的形成、防御反应和白细胞形成。皮质和小脑的颗粒神经元主要涉及突出相关代谢通路，包括树突发育和形态发生、轴突形成、钙调节信号。星形胶质细胞主要的代谢通路涉及常规的形成代谢，包括细胞酮、有机酸、羧酸和氧化还原途径。

3、在四种细胞类型中主要表达的蛋白，只有 15% 的蛋白和细胞类型相关，GO 富集分析表明细胞类型特异性蛋白主要是细胞表面和胞外蛋白。和 RNA 关联分析表明，细胞特异性转录本也主要涉及细胞膜和胞外蛋白。

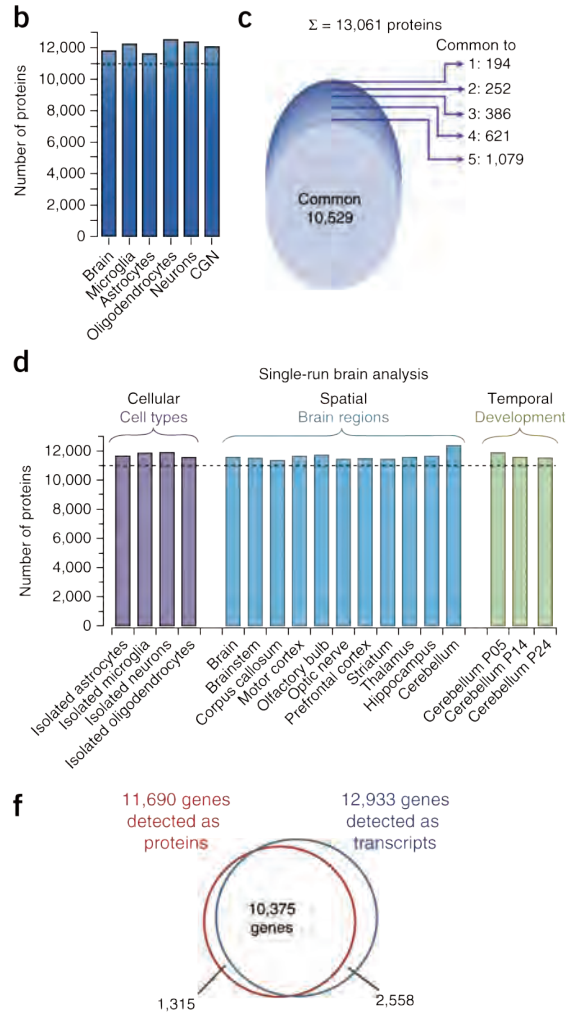


图 1 各类型样本蛋白和转录组结果比较分析

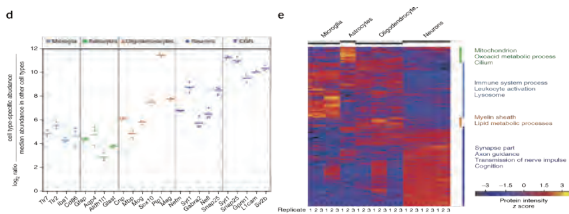


图 2 各细胞类型差异表达的 marker 蛋白和功能聚类热图

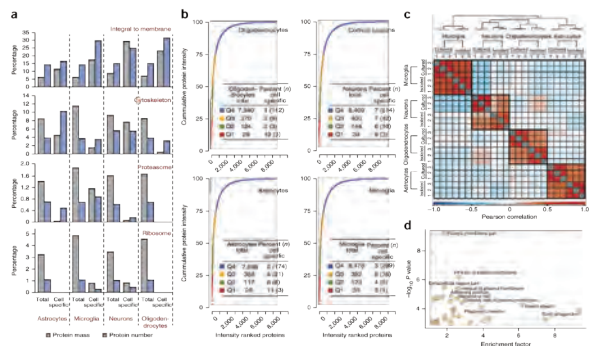


图 3 各细胞类型细胞特异性蛋白分析

4、不同脑区域组织蛋白分析结果显示，鉴定出 2901 个脑区域富集蛋白 (>4-fold difference)，其中丘脑最少，为 154 个蛋白，视神经最多，为 1179 个蛋白。各脑区域蛋白富集情况如下：脑干为 Prph, Sncg 和 Serpinb1b，嗅球为 Omp 和 S100a5，胶状体为 Ppp1r1b, Actn2 和 Pde10a，丘脑为 Plcb4, Prkcd 和 Synpo2。

5、细胞粘附相关代谢在神经元和胶质细胞中共有的代谢通路，研究发现有 282 个蛋白属于细胞粘附分子集，其中两个明显富集的蛋白是 Ncam1 — 负调控髓鞘的形成，Lsamp 属于 IgLON 家族，该家族还包括 Ntm、Opcml 和 Negr1。

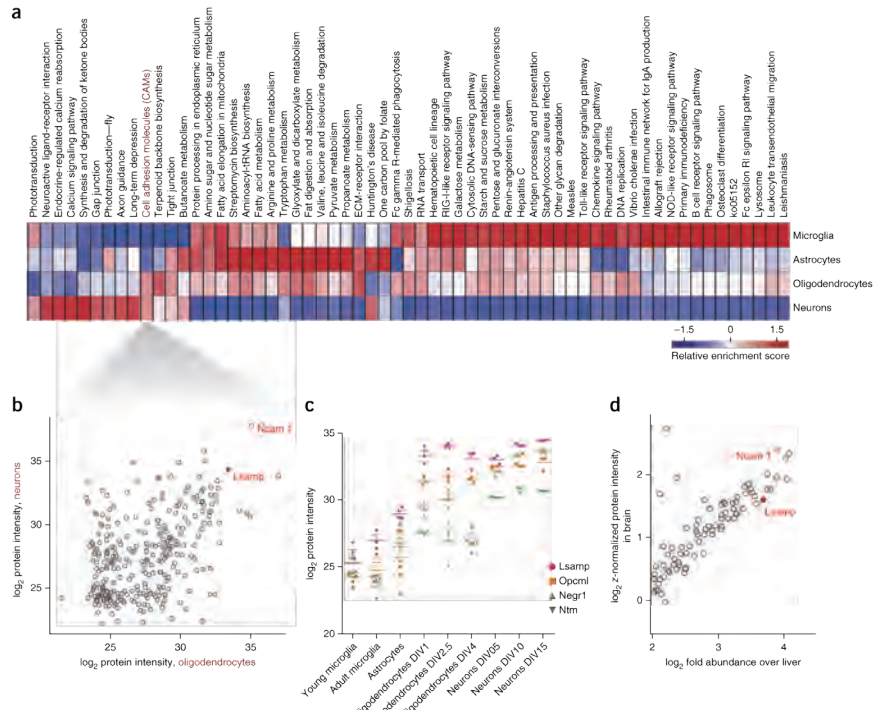


图 4 少突细胞和神经元中细胞粘附分子富集比较

## 参考文献

Sharma K, Schmitt S, Bergner CG, et al. Cell type- and brain region-resolved mouse brain proteome.[J]. Nature neuroscience, 2015, 18(12):1819.

# 代谢组学

代谢组 (Metabolome) 是指细胞、组织、器官或者生物体内的所有小分子代谢组分 (主要是相对分子量 1000Da 以内的内源性小分子) 的集合。代谢组学 (Metabolomics) 是继基因组学和蛋白质组学之后的最新组学领域之一, 通过考察生物体系 (细胞、组织或生物体) 受到刺激或扰动后 (如将某个特定的基因变异或者环境变化后), 其代谢产物的变化或代谢产物随时间的变化, 来研究生物体系的一门科学。

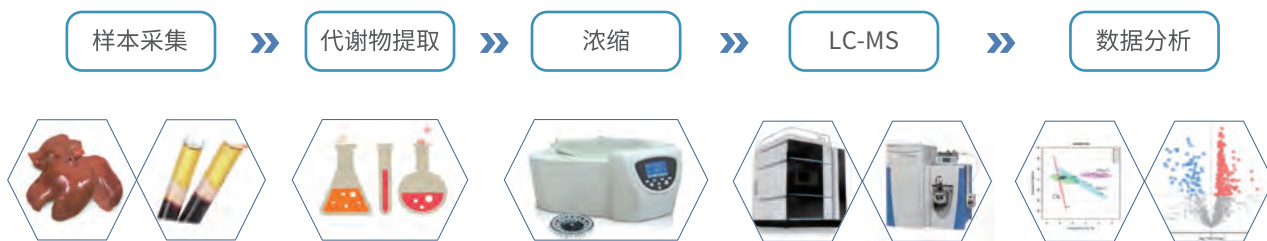


## 非靶向代谢组学

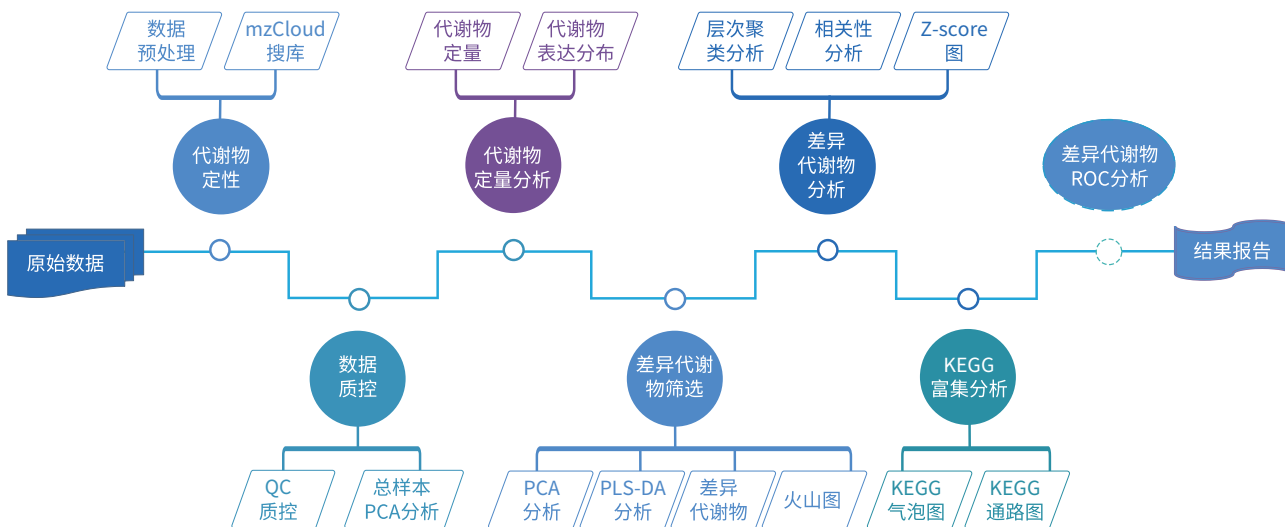
代谢组学分为非靶向代谢组 (Untargeted metabolomics) 和靶向代谢组 (Targeted metabolomics)。非靶向代谢组学即发现代谢组学，主要是将对照组和实验组的代谢物进行比对，找出两组间的差异代谢物，同时进行代谢物的鉴定，进一步解释差异代谢物在其参与的代谢通路中所发挥的生物学作用。

### 方法流程

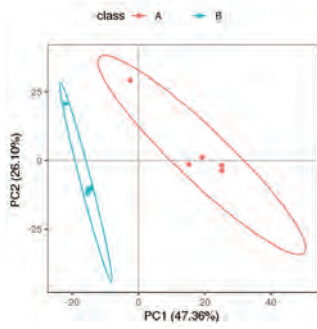
通过液质联用 (LC-MS) 的代谢组学研究实验流程可分为样本采集及前处理、代谢物提取及浓缩、上机检测以及数据分析，最终进行生物学解释。诺禾致源对每一个实验步骤都严格把控，实现标准化操作，从根本上确保了高质量数据的产出。



### 信息分析流程

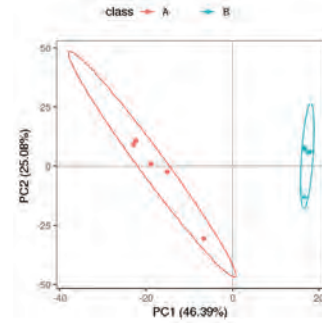


典型结果展示



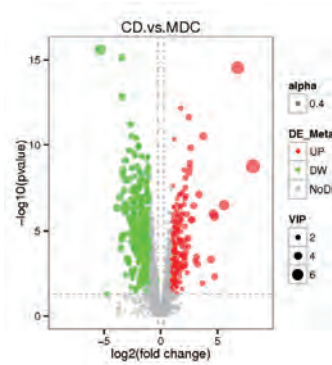
PCA 图

表示样本间的总体代谢差异以及组内样本间的变异度大小



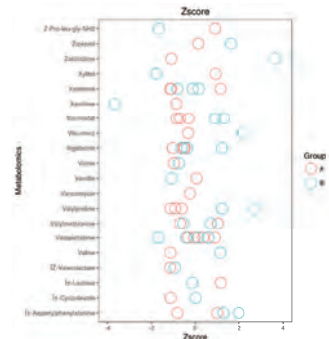
PLS-DA 图

忽略组内误差、消除与研究目的无关的随机误差，发现组间差异及差异化合物



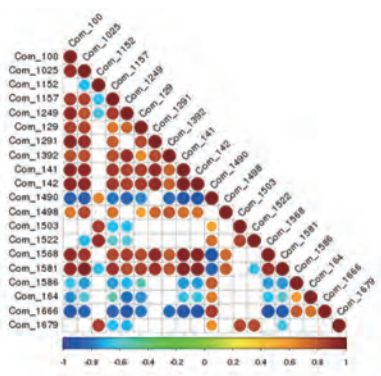
火山图

表示不同分组间差异代谢物的分布情况，红色表示上调，绿色表示下调



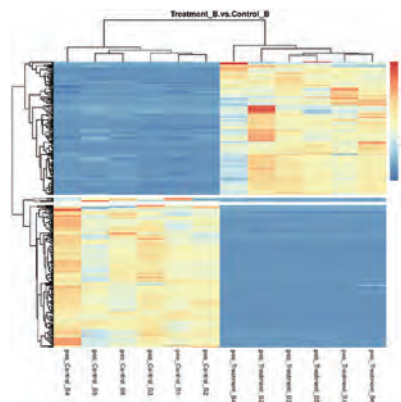
Z-score 图

不同组间相对含量的高低



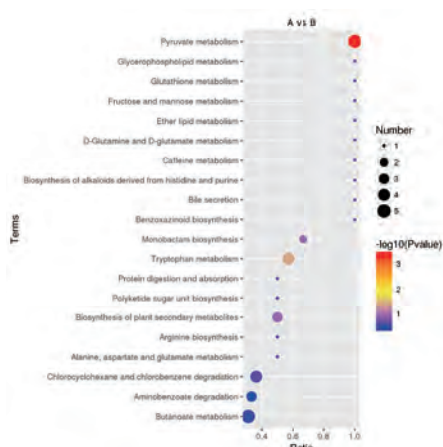
相关性分析图

代谢物两两之间变化趋势的一致性，红色表示正相关，蓝色表示负相关



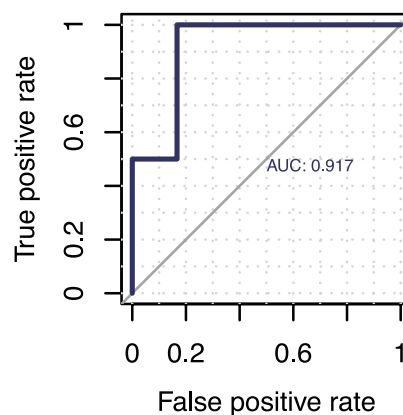
层次聚类分析图

代谢模式相同或相近的代谢物聚成一类，用来推测代谢物的生物学功能



代谢通路富集结果

超几何检验算法分析两组差异代谢物富集的  
相关代谢通路



ROC 曲线图

使用曲线下面积 (AUC) 来评估代谢物检测的  
灵敏度和特异性

## 典型案例解析

### 代表性文献盘点

研究对象	研究策略	发表时间	发表期刊	影响因子	链接
胰腺导管腺癌和慢性胰腺炎生物标志物的筛选	非靶向代谢组学	2018	Gut	17.016	PMID:28108468
女性冠心病代谢标志物筛选	非靶向代谢组学	2018	Circulation	18.88	PMID:29459470
两种鹰嘴豆品种耐旱胁迫	非靶向代谢组	2018	Plant Cell & Environment	5.415	PMID:29532945
小鼠脂肪组织产热的机制	非靶向代谢 + 靶向代谢	2018	Nature	41.577	PMID:30022159
转基因水稻、野生型水稻	靶向代谢组学	2018	Plant Physiology	5.949	PMID:29363563
阿尔茨海默症生物标志物 $\beta$ -淀粉样蛋白含量变化	靶向代谢组学	2018	Nature	41.577	PMID:29420472
大鼠肺组织	脂质组学	2018	Nanotoxicology	5.811	PMID:29635945
油菜种子的发育过程	脂质组学	2018	Molecular and Cell Biology of Lipids	5.547	PMID:29275220
心衰患者红细胞的氧化胆固醇的积累	脂质组学 + 靶向代谢	2018	Redox Biology	7.126	PMID:29101899

## 案例解析

## 案例一

## 琥珀酸累积对脂肪组织热激活的影响

Accumulation of succinate controls activation of adipose tissue thermogenesis

研究对象：小鼠棕色脂肪组织 | 期刊：Nature

影响因子：41.577 | 发表单位：哈佛医学院 &amp; 麻省理工学院 | 发表时间：2018年7月

## 摘要

Thermogenesis by brown and beige adipose tissue, which requires activation by external stimuli, can counter metabolic disease<sup>1</sup>. Thermogenic respiration is initiated by adipocyte lipolysis through cyclic AMP-protein kinase A signalling; this pathway has been subject to longstanding clinical investigation<sup>2-4</sup>. Here we apply a comparative metabolomics approach and identify an independent metabolic pathway that controls acute activation of adipose tissue thermogenesis *in vivo*. We show that substantial and selective accumulation of the tricarboxylic acid cycle intermediate succinate is a metabolic signature of adipose tissue thermogenesis upon activation by exposure to cold. Succinate accumulation occurs independently of adrenergic signalling, and is sufficient to elevate thermogenic respiration in brown adipocytes. Selective accumulation of succinate may be driven by a capacity of brown adipocytes to sequester elevated circulating succinate. Furthermore, brown adipose tissue thermogenesis can be initiated by systemic administration of succinate in mice. Succinate from the extracellular milieu is rapidly metabolized by brown adipocytes, and its oxidation by succinate dehydrogenase is required for activation of thermogenesis. We identify a mechanism whereby succinate dehydrogenase-mediated oxidation of succinate initiates production of reactive oxygen species, and drives thermogenic respiration, whereas inhibition of succinate dehydrogenase suppresses thermogenesis. Finally, we show that pharmacological elevation of circulating succinate drives UCP1-dependent thermogenesis by brown adipose tissue *in vivo*, which stimulates robust protection against diet-induced obesity and improves glucose tolerance. These findings reveal an unexpected mechanism for control of thermogenesis, using succinate as a systemically-derived thermogenic molecule.

## 关键词

棕色脂肪组织；琥珀酸；TCA；活性氧（ROS）；体重

## 研究背景

棕色和米色脂肪组织的热生成激活会增加能量消耗，并能改善代谢疾病。在寒冷环境中刺激肾上腺素和棕色脂肪组织（BAT）产生热量，能够改善人体代谢。然而，迄今为止肾上腺素能受体的靶向药理作用在应用上受到限制。

长期以来，cAMP-蛋白激酶A信号传导刺激途径受到广泛关注，本文采用比较代谢组学的方法，确定了一种控制体内脂肪组织产热的独立代谢途径。

## 方法流程

## 取样策略

研究对象：C57BL/6J小鼠、BAT细胞（棕色脂肪细胞）、白色脂肪细胞  
 取样策略：C57BL/6J小鼠暴露在4°C、23°C和29°C环境中BAT，SubQ和附睾脂肪中琥珀酸的含量测定。高脂饲料喂养后测定血糖、粪便中的能量

## 技术策略

非靶代谢组：Q Exactive Plus orbitrap mass  
 靶向代谢组：UPLC (Waters) -5500 QTRAP(AB)  
 蛋白组学：QE-Orbitrap Fusion TMT  
 细胞呼吸测定：海马生物能量测定仪XF24  
 活性氧(ROS)测定：DHE氧化法和比值法测定  
 全身能量代谢评估：使用综合实验室动物监测系统（CLAMS, Columbia Instruments）

## 信息分析

主要采用单向ANOVA，双向ANOVA，双向t检验

## 研究结果

### 1. 非靶向代谢筛选脂肪组织中产热的代谢特征

采用比较代谢组学的方法筛选小鼠脂肪组织中生热的代谢特征（图 1a），该方法基于以下三个标准：（1）热源性脂肪组织中代谢物的富集（棕色脂肪组织 BAT 与皮下白色脂肪组织相比；图 1b）；（2）热源性脂肪组织中代谢物的浓度（为注释代谢物最强离子强度的 10%；图 1c）；（3）暴露在 4°C 与 29°C 相比，BAT 急性激活后代代谢物的浓度增加（图 1d）。只有两个代谢物符合以上三个标准（图 1a-d）。其中一个为线粒体三羧酸（TCA）循环的中间

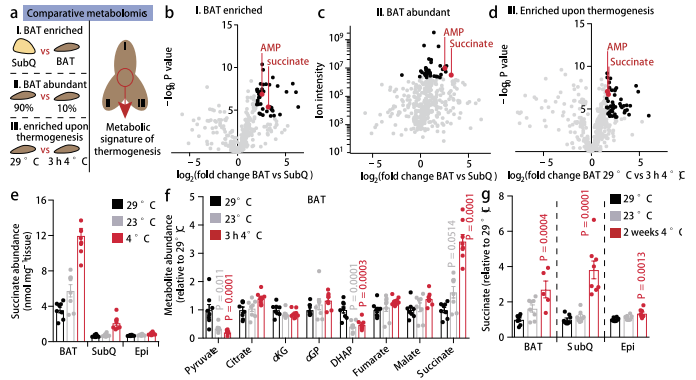


图 1 琥珀酸的选择性累积是脂肪组织热发生的代谢特征

产物琥珀酸，另一个为 cAMP-蛋白激酶 A 信号通路中的 AMP。在 4°C 低温刺激下，发现 BAT 中琥珀酸水平明显高于 TCA 循环中的其他代谢物（图 1e, f）。此外，长期暴露于 4°C 时，皮下脂肪组织中米色脂肪细胞的含量增加，可显著提高琥珀酸的浓度（图 1g）。

### 2. 靶向测定棕色脂肪组织和细胞外琥珀酸的含量

通过尾静脉注射 [U-<sup>13</sup>C] 葡萄糖和 [U-<sup>13</sup>C] 棕榈酸，发现在 BAT 中乳酸循环作为 TCA 循环的主要碳源，但 BAT 在低温 4°C 暴露刺激，[U-<sup>13</sup>C] 葡萄糖不影响琥珀酸的含量。考虑可能 BAT 能够从细胞外整合琥珀酸（图 2a）。琥珀酸处于动态平衡，细胞外琥珀酸的浓度高低不一，小鼠暴露于 4°C 会导致琥珀酸升高，表明细胞外琥珀酸有助于 BAT 的累积。检测标准培养基培养的分化原代棕色脂肪细胞，发现该细胞缺乏琥珀酸，表明离体 BAT 比活体 BAT 中琥珀酸的含量低，而加入的 [U-<sup>13</sup>C] 琥珀酸则导致细胞内琥珀酸浓度水平显著升高（图 2b）。从 BAT 中分离的分化的白色脂肪细胞或前脂肪细胞中未发现琥珀酸内化（图 2c）。此外，在 BAT 中没有发现与琥珀酸结构相似的富马酸和 α-酮戊二酸的内化能力（图 2d）。通过 BAT 中琥珀酸的内化，导致线粒体 TCA 循环中 (m+4) 标记的琥珀酸下游代谢物的累积（图 2e）。此外，我们观察到 (m+4) 天冬氨酸、(m+2) 和 (m+3) 柠檬酸在线粒体中的积累（图 2f）。尾静脉注射 [U-<sup>13</sup>C] 琥珀酸，发现在 BAT 快速积累（图 2g），琥珀酸与 TCA 循环下游代谢产物的代谢（图 2h）和血浆中 [U-<sup>13</sup>C] 琥珀酸消除趋势（图 2i）的一致。我们的结果表明，棕色脂肪细胞具有从细胞外环境中积累和氧化琥珀酸的能力。

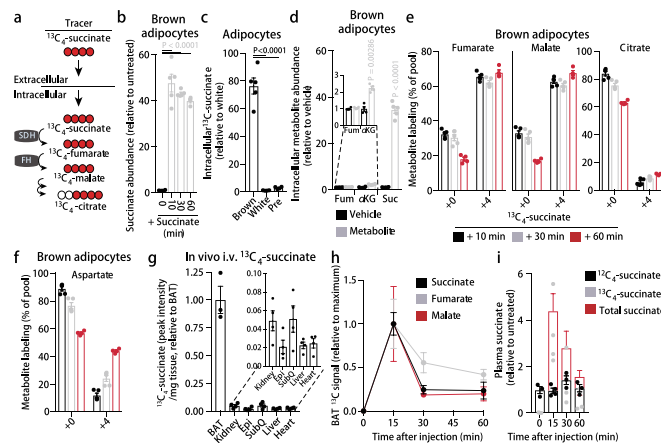


图 2 棕色脂肪细胞累积和细胞外氧化

### 3. 琥珀酸对棕色脂肪细胞产热的控制

为了研究琥珀酸积累在棕色脂肪细胞产热中的潜在作用，我们利用这些细胞能够快速内化细胞外琥珀酸的能力（图 2b）。在棕色脂肪细胞中加入琥珀酸会导致急性和强烈的浓度依赖性呼吸刺激（图 3a, b）。琥珀酸刺激呼吸，是由于泄漏呼吸引起的，其在棕色脂肪细胞中依赖于 UCP1，并且负责这些细胞的产热（图 3c）。对化学解偶联最大呼吸没有影响，说明其作用并不是由线粒体底物增加所致。此外，与其他底物相比，琥珀酸能够提高呼吸能力（图 3d）。通过对不同类型细胞测试，发现琥珀酸刺激呼吸的能力仅限于成熟的原代棕色脂肪细胞、永生化的小鼠棕色脂肪细胞和永生化的棕色脂肪细胞都有影响（图 3e）。在棕色脂肪细胞中加入琥珀酸导致活性氧（ROS）水平快速增加，半胱氨酸是 ROS 的主要信号靶点，随着活性氧水平的升高，它表现出对磺酸（ $\text{SO}_3^-$ ）的超氧化反应。现在利用线粒体靶向抗氧化剂 MitoQ 耗尽琥珀酸诱导线粒体 ROS 或过 N-乙酰半胱氨酸（NAC）抑制依赖于 ROS 的半胱氨酸氧化（图 3f）。在线粒体呼吸链中琥珀酸通过电子电路加速超氧化物的产生控制 ROS 的水平（图 3g）。所有这些途径都需要通过琥珀酸脱氢酶（SDH）上的黄素位点进行琥珀酸氧化。用丙二酸盐处理棕色脂肪细胞，丙二酸是 SDH 黄素氧化琥珀酸的竞争性抑制剂。抑制琥珀酸依赖的活性氧产生和琥珀酸依赖呼吸（图 3h）。

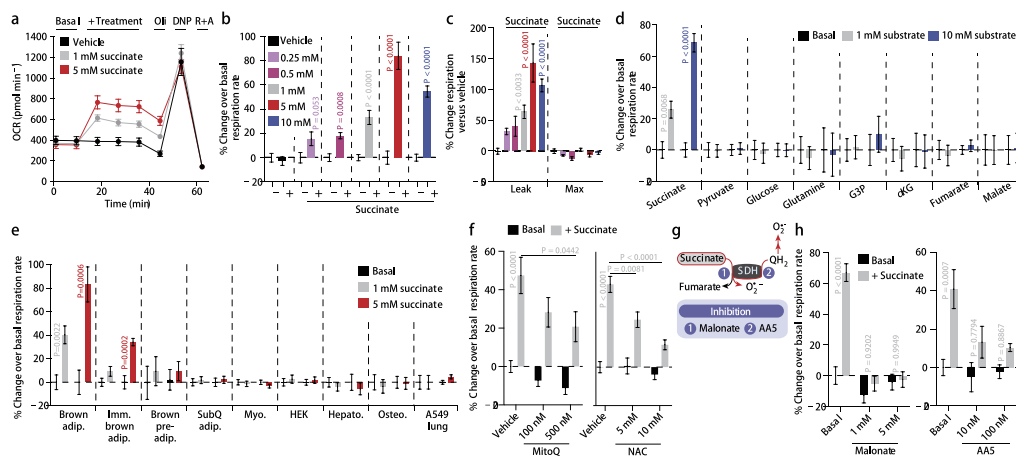


图 3 琥珀酸通过 SDH 氧化和 ROS 控制棕色脂肪细胞的产热

### 4. 高脂喂养小鼠体内成分发生变化

为脂肪细胞热致呼吸的激活途径提供了一种模型：BAT 具有利用细胞外高浓度琥珀酸的能力（图 2），并能通过 SDH 快速氧化琥珀酸，促进线粒体 Q-pool 还原，活性氧生成和产热（图 3），该模型能够预测急性琥珀酸处理促进 BAT 产热。静脉注射琥珀酸会导致 BAT 温度升高和全身耗氧量迅速升高。在缺乏 UCP 1 (KO) 的小鼠中，未观察到琥珀酸的致热作用。相反，SDH 抑制剂丙二酸能够抑制由低温暴露引发的产热。实验组高脂饲料喂养老鼠，给予含琥珀酸的水，小鼠对琥珀酸无明显反应，并表现出明显的浓度依赖性，对照组高脂喂养 4 周后体重增加（图 4a）。首先，琥珀酸的摄入不会抑制热量的摄入，控制成对喂养表型再现（图 4b）。琥珀酸并不会抑制热量吸收或能量同化，能量平衡方法表明琥珀酸在四周内推动了全身能量消耗的增加（图 4c），同时还能够降低空腹血糖水平（图 4d），在 UCP1 (KO) 小鼠中，琥珀酸补充剂对体重增加有抑制作用（图 4e, f）。

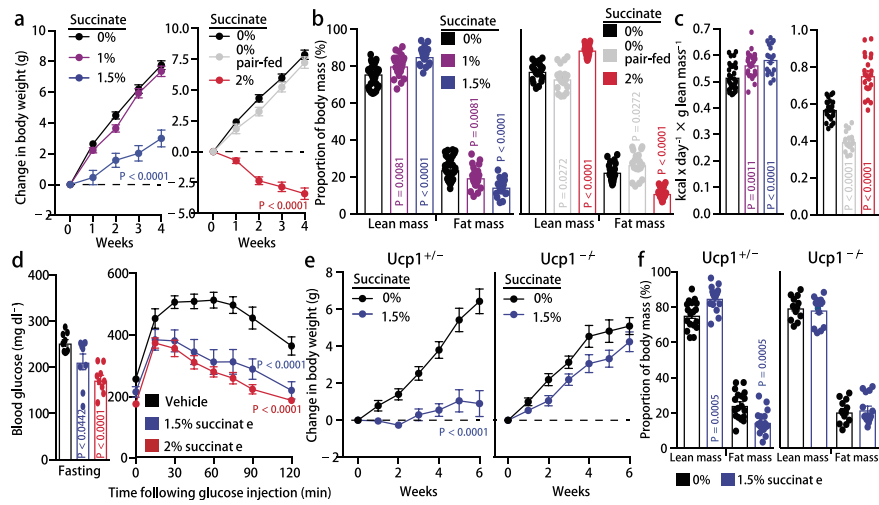


图 4 琥珀酸通过 SDH 氧化和 ROS 控制棕色脂肪细胞的产热

## 研究结论

确定 TCA 循环中间体琥珀酸激活 BAT 产热的机制。琥珀酸通过 SDH 氧化触发线粒体产生 ROS 对脂肪组织产热的急性控制，并且棕色脂肪细胞能够代谢细胞外的琥珀酸。发现棕色脂肪组织的 UCP1 依赖性产热是饮食诱导的肥胖强有力的保护，并能够提高葡萄糖的耐受性。揭示了琥珀酸作为控制产热分子发生的机制。

## 参考文献

Mills EL, Pierce KA, Jedrychowski MP, et al. Accumulation of succinate controls activation of adipose tissue thermogenesis Nature[J]. Nature,2018.

## 案例二

## 脂质组学揭示心脏衰竭患者红细胞中的氧化胆固醇积累

Lipidomics reveals accumulation of the oxidized cholesterol in erythrocytes of heart failure patients

研究对象：心脏衰竭患者 | 期刊：Redox Biology

影响因子：7.126 | 发表单位：台湾长庚大学 | 发表时间：2018年4月

## 摘要

Lipids play an important role in the pathogenesis of cardiovascular disease. Changes in lipids of erythrocytes are indicative of the outcome of pathophysiological processes. In the present study, we assessed whether the lipid profiles of erythrocytes from heart failure (HF) patients are informative of their disease risk. The lipidomes of erythrocytes from 10 control subjects and 29 patients at different HF stages were analyzed using liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. The lipid composition of erythrocytes obtained from HF patients was significantly different from that of normal controls. The levels of phosphatidylcholines (PCs), phosphatidylethanolamines (PEs), and sphingomyelins decreased in HF erythrocytes as compared with those of control subjects; however, the levels of lysoPCs, lysoPEs, and ceramides increased in HF erythrocytes. Notably, the oxidized cholesterol 7-ketocholesterol (7KCh) accumulated to higher level in HF erythrocytes than in plasma from the same patients. We further validated our findings with a cohort of 115 subjects of control subjects (n=28) and patients (n=87). Mechanistically, 7KCh promoted reactive oxygen species (ROS) formation in cardiomyocytes; and induced their death, probably through an ATF4-dependent pathway. Our findings suggest that erythrocytic 7KCh can be a risk factor for HF, and is probably implicated in its pathophysiology.

## 关键词

心脏衰竭；脂质组学；7-酮基胆固醇；氧化应激

## 研究背景

在全球范围内心血管疾病是造成死亡的最主要原因。由于心脏功能恶化妨碍了血液循环，会导致心力衰竭（heart failure, HF），HF发病机理非常复杂，心肌梗死、高血压、心肌病、心脏瓣膜病、炎症诱导的氧化应激都是疾病进展的危险因素。脂质在心血管疾病的发病机制中发挥着重要作用，红细胞的脂质变化可以反应疾病进展过程中的病理生理变化，但研究红细胞代谢组和脂质组的报道较少，针对HF的研究更是没有。在本研究中，研究者评估了HF患者红细胞的脂质水平是否可以提示疾病风险。

## 方法流程

## 取样策略

10个正常人以及29个不同分期（Stage A 10个、Stage B 9个、Stage C 10个）心衰患者的红细胞

## 技术策略

脂质组：Waters QTOFMS，正负离子模式  
靶向代谢组：Waters Xevo TQ-S MS

## 信息分析

PLS-DA 分析  
差异代谢物筛选及鉴定  
目标差异代谢物（7KCh）含量验证  
WB、IF、活性氧检测等功能验证



## 研究结果

### 1. HF 患者红细胞的脂质组变化

基于 LC-TOF-MS 对红细胞进行非靶向脂质组检测，正离子模式下得到 457 个分子特征，负离子模式下得到 438 个分子特征（图 1A、B）。OPLS-DA 得分图显示，正负离子模式下对照组、stage A、stage B、stage C 明显分开（图 1C、E）。为了确定对照组和 stage C 中亲脂性代谢物的差异又进一步分析，OPLS-DA 得分图（图 1D、F）以及 S-plot（图 1G、I）结果如下图。以 VIP>1、p<0.05 为阈值筛选 stage C 与正常对照组的差异代谢物，在正负离子模式下分别得到 30 和 23 个代谢物（图 1H、J）。固醇、磷脂和神经酰胺是区别对照组和 stage C 的重要物质，溶血磷脂（如 lysoPC 和 lysoPE）、神经酰胺、氧化型胆固醇（如 7KCh）在 HF 患者红细胞中的含量高于对照组，而磷脂（如 PCs、PEs 和 SMs）的水平含量低于正常。

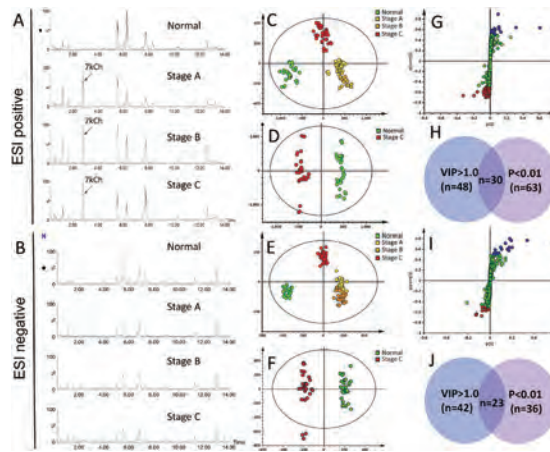


图 1 基于液质的 HF 红细胞脂质组学分析

### 2. HF 患者红细胞和血浆中 7KCh 的含量

研究发现，所有样本血浆中 7KCh 的含量远远低于羊毛甾醇、烯胆甾烷醇、7-脱氢胆固醇（胆固醇生物合成途径的中间体），但是在红细胞中 7KCh 的含量显著高于以上这些代谢物（图 2，3）。stage A-C 的 HF 患者红细胞中 7KCh 的含量明显高于正常组（图 2B），表明红细胞中的 7KCh 可以作为 HF 风险的早期鉴定标志物。胆固醇在血浆中以游离形式和酯形式存在，胆固醇酯随脂蛋白储存及运输。正常组和 HF 患者血浆中 7KCh 含量并无差异（图 2F），当考虑总胆固醇（游离胆固醇 + 胆固醇酯）时，stage C 患者血浆中 7KCh 水平略高与正常对照组（图 3I）。

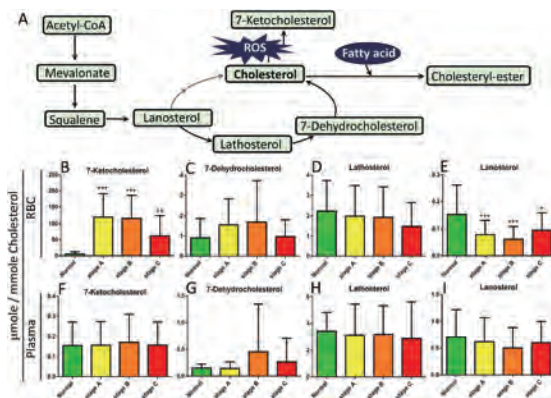


图 2 HF 患者及正常对照的血浆和红细胞中游离 7KCh 及其他固醇的含量

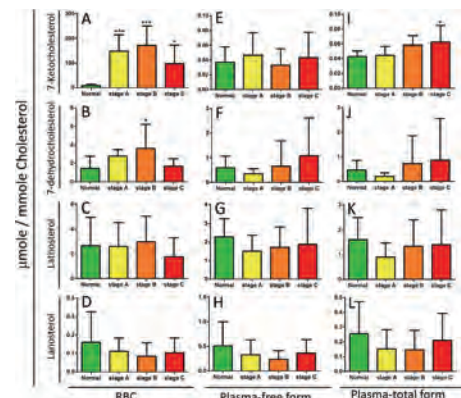


图 3 HF 患者血浆总 7KCh 及其他固醇的含量

### 3. 7KCh 的胞内积累增加 ROS 生成并降低心肌细胞生存力

为了确认 7KCh 是否对心肌功能有损伤作用, 研究者检测了经 7KCh 处理的心肌细胞 HL-1 的生存活力。结果显示随 7KCh 浓度升高, HL-1 生存活力降低, 但固醇处理对 HL-1 生存活力则无影响 (图 4A, B)。可能的原因是 7KCh 从红细胞中释放进而影响心肌细胞的生存力, 所以将负载 7KCh 的红细胞膜与 HL-1 共孵育, 结果发现 HL-1 活力确实降低, 并具有剂量依赖性 (图 4C, D)。结果表明, 红细胞可以递呈 7KCh 引起细胞损伤。此外, 通过免疫荧光实验观察到了 7KCh 在 HL-1 中的积累 (图 4E)。

使用流式细胞仪检测 7KCh 对活性氧产生的影响 (以  $H_2O_2$  处理为阳性对照), 发现相对于对照组 7KCh 处理的 HL-1 细胞 ROS 产生更多, 甚至高于阳性对照 (图 4F)。

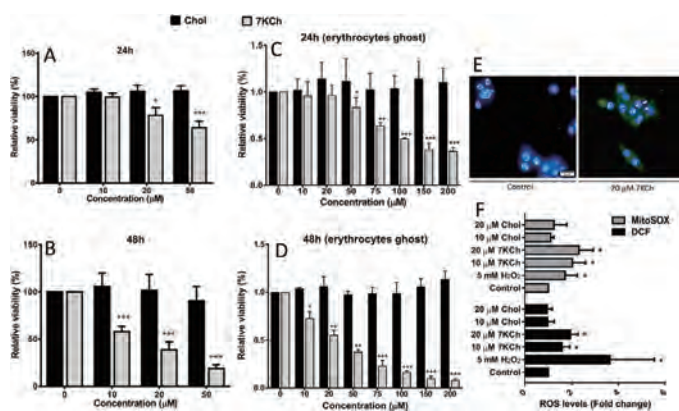


图 4 7KCh 积累的 HL-1 细胞活力及活性氧检测

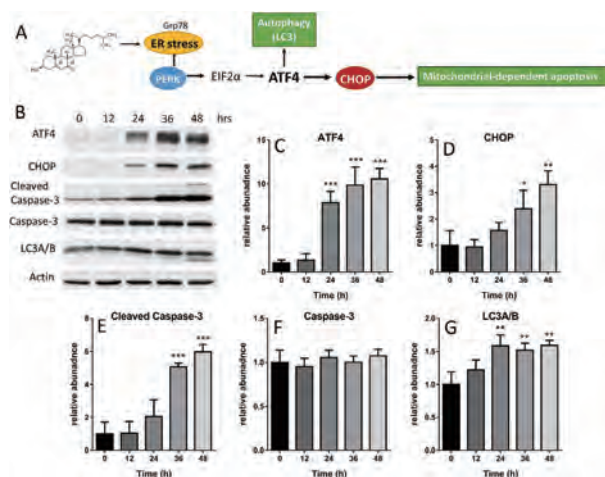


图 5 7KCh 激活 ATF4 通路

## 研究结论

本研究针对 10 例正常人以及 29 例 HF 不同分期的患者进行脂质组质谱分析, 发现 HF 患者红细胞的脂质组成与正常对照组明显不同。HF 患者红细胞中的 PCs、Pes、SMs 水平降低, 而 lysoPCs、lysoPEs 和神经酰胺水平升高。其中, 7KCh 能够明显将 HF 患者与正常对照组区分开, 且其在红细胞中积累的水平高于血浆。而 7KCh 在红细胞中的积累导致了活性氧产生以及 ATF4/CHOP 介导的心肌细胞死亡, 表明 7KCh 参与了 HF 的致病过程, 所以红细胞 7KCh 可能是 HF 的一个潜在危险因素。

局限性: 样本量较小, 红细胞 7KCh 升高导致 HF 进展的证据不足, 仍需动物模型来进一步证实。

## 参考文献

Tang H Y, Wang C H, Ho H Y, et al. Lipidomics reveals accumulation of the oxidized cholesterol in erythrocytes of heart failure patients[J]. Redox Biology, 2018, 14:499-508.

## 案例三

### 区分胰腺导管腺癌和慢性胰腺炎的代谢性生物标志物

Metabolic biomarker signature to differentiate  
pancreatic ductal adenocarcinoma from chronic pancreatitis

研究对象：胰腺导管腺癌和慢性胰腺炎 | 期刊：Gut

影响因子：17.016 | 发表单位：格赖夫斯瓦尔德大学 | 发表时间：2018年

## 摘要

**Objective:** Current non-invasive diagnostic tests can distinguish between pancreatic cancer (pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and chronic pancreatitis (CP) in only about two thirds of patients. We have searched for blood-derived metabolite biomarkers for this diagnostic purpose.

**Design:** For a case-control study in three tertiary referral centres, 914 subjects were prospectively recruited with PDAC (n=271), CP (n=282), liver cirrhosis (n=100) or healthy as well as non-pancreatic disease controls (n=261) in three consecutive studies. Metabolomic profiles of plasma and serum samples were generated from 477 metabolites identified by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

**Results:** A biomarker signature (nine metabolites and additionally CA19-9) was identified for the differential diagnosis between PDAC and CP. The biomarker signature distinguished PDAC from CP in the training set with an area under the curve (AUC) of 0.96 (95% CI 0.93-0.98). The biomarker signature cut-off of 0.384 at 85% fixed specificity showed a sensitivity of 94.9% (95% CI 87.0%-97.0%). In the test set, an AUC of 0.94 (95% CI 0.91-0.97) and, using the same cut-off, a sensitivity of 89.9% (95% CI 81.0%-95.5%) and a specificity of 91.3% (95% CI 82.8%-96.4%) were achieved, successfully validating the biomarker signature.

**Conclusions:** In patients with CP with an increased risk for pancreatic cancer (cumulative incidence 1.95%), the performance of this biomarker signature results in a negative predictive value of 99.9% (95% CI 99.7%-99.9%) (training set) and 99.8% (95% CI 99.6%-99.9%) (test set). In one third of our patients, the clinical use of this biomarker signature would have improved diagnosis and treatment stratification in comparison to CA19-9.

## 关键词

胰腺导管腺癌；慢性胰腺炎；代谢组学；生物标志物

## 方法流程

### 取样策略

914名受试者血清和血浆样本：271位胰腺导管腺癌(PDAC)、282位慢性胰腺炎(CP)、100位肝硬化(LC), 261份对照样本  
三阶段生物标志物开发策略：探索集(n=201)，训练集(n=474)、测试集(n=239)

### 技术策略

非靶向代谢组学：GC-MS (Agilent)，LC-MS (Agilent)  
类固醇：SPE-LC-MS/MS  
脂质组：LC-MS/MS  
数据库及软件：SIMCA-P V.13.0、TIBCO Spotfire、R 2.8.1

### 信息分析

简单线性方差分析 (ANOVA)  
惩罚逻辑回归 (penalised logistic regression)  
PCA分析  
ROC分析

## 研究结果

### 1 实验设计

招募来自三个三级诊疗中心的 914 名受试者，包括 271 位胰腺导管腺癌 (PDAC)、282 位慢性胰腺炎 (CP)、100 位肝硬化 (LC)，以及包括健康献血者 (BDs) 和术前非胰腺疾病患者的 261 份对照样本，进行 LC-MS 和 GC-MS 的代谢组学检测。应用三阶段生物标志物开发策略 (探索集, 训练集和测试集) 进行, 共鉴定到 477 种代谢物。

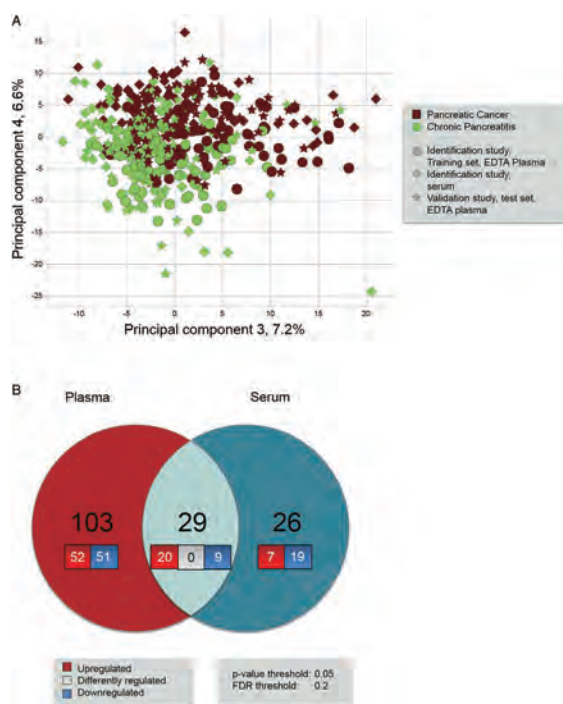


图 2 PDAC 和 CP 患者代谢组学数据的主成分分析

### 3 代谢物的临床表现评估

将上述 9 种代谢物和 CA19-9 作为组合生物标志物群用于诊断训练集中 PDAC 和 CP 患者的 AUC、敏感性、特异性、诊断准确度 (图 3A)。组合标志物群甚至可检测出 98% 的可切除 (78 例中的 55 例, IA 至 IIB 期), 而准确率达 90.4% (95% CI 80.4% 至 90.9%); 相比于该标志物群, 腹部超声检查仅具有 68% 敏感性和 75% 特异性。根据计算将胰腺生物标志物群评分 Cut-off 值设定为  $\geq 0.384$ 。将 Cut-off 值 0.384 从训练集转移到测试集, 并评估其诊断性能。由结果可见组合标志物的 AUC 显著高于 CA19-9 的 AUC (0.94 对 0.85,  $p < 0.001$ ), 敏感性 (89.9% 比 74.7%,  $p < 0.01$ ) 和特异性 (91.3% 比 77.5%,  $p < 0.05$ ) 也显著改善。与 CA19-9 相比 (图 3B), 生物标志物群提高了训练集和测试集中胰腺癌和可切除胰腺癌的诊断准确性 (0.93 比 0.84,  $p < 0.001$ )。在胰腺癌与非胰腺对照对比时, 生物标志物群在训练集 (血清) 中 AUC 为 0.95 并且在测试集 (血浆) 中 AUC 为 0.90 (图 3C)。当仅考虑可切除阶段时, 生物标志物群和 CA19-9 在训练集和测试集中的 AUC 没有显著差异 (图 3D)。

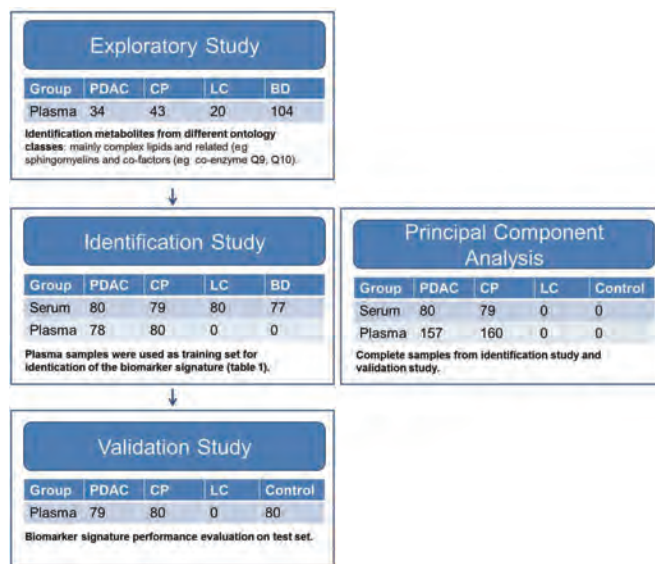


图 1 实验设计

### 2 胰腺癌与慢性胰腺炎生物标志物发现

通过多组学平台检测, 在血清和血浆样品中发现了 10 类代谢物群共 477 个代谢物 (探索集: 364 个, 训练集: 477 个, 测试集: 337 个)。在探索集研究中, 最多的一类代谢物是复合脂质、脂肪酸和相关代谢物, 含量高达 64%。在最能区分 PDAC 和 CP 的 9 种生物标志物群有五种 (除 CA19-9 外) 属于脂质类。PCA 分析显示 237 名胰腺癌患者和 239 名 CP 患者由主成分 3 (7.2%) 和 4 (6.6%) 进行分离 (图 2A)。根据性别、年龄、体重指数 (BMI) 和样本存储时间校正后, 在训练集血清和血浆样品方差分析中筛选出 29 种代谢物在 PDAC 和 CP 之间发生显著变化 (图 2B)。

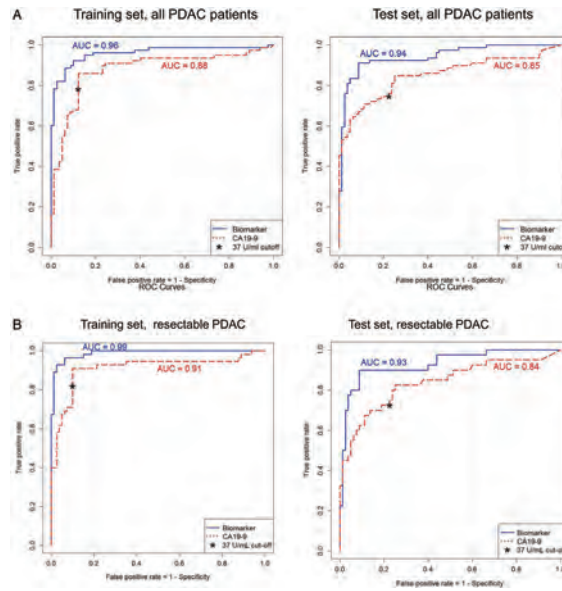


图 3 生物标志物对于胰腺癌患者与慢性胰腺炎患者区分的 ROC 曲线

从测试集的生物标志物得分图 (Fig.4A) 中可以看出, 非胰腺对照与 CP 患者之间出现重叠, 表明生物标志物群对于胰腺癌具有特异性。黄疸在所有胰腺癌患者 (敏感性 90%) 和胰腺癌可切除期 (敏感性 100%) 中均未影响代谢标志物群的敏感性。采用 CA19-9 诊断时, 测试集中存在 25% (n = 20) 的假阴性率 (cut-off: 37 U/ mL), 而使用生物标志物群时假阴性率降至 11% (n = 8, Fig. 4B)。此外, CA19-9 的假阳性为 23% (n = 18), 而生物标志物群仅为 9% (n = 7)。也就是说在测试集 80 例 CP 患者中有 14 例 (17.5%) 疑似胰腺癌患者不必执行手术。相反, 79 例胰腺癌患者中有 12 例 (15.2%) 根据生物标志物群诊断需进行胰腺癌手术, 但若单独使用 CA19-9 标志物时将会被遗漏。可见应用标志物群筛查将降低假阳性率和假阴性率, 从而使诊断结果更加准确可靠。此外使用 EDTA 抗凝血浆样本测试将比血清样本获得更高的准确性。

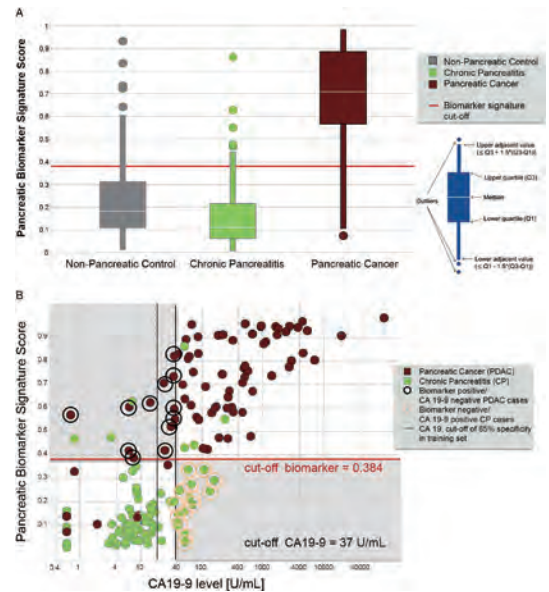


图 4 (A) 在训练集中识别并应用于测试集的胰腺癌的生物标志物的评分;  
(B) 生物标志物得分散点图

## 研究结论

本文采用质谱方法对大量临床血样进行非靶向及靶向代谢组学研究, 筛选出 9 个潜在的生物标志物, 将这 9 个代谢物与现有胰腺癌诊断血液指标 CA19-9 联合使用将明显提高诊断的准确度、敏感性和特异性。

## 参考文献

Mayerle J, Kalthoff H, Reszka R, et al. Metabolic biomarker signature to differentiate pancreatic ductal adenocarcinoma from chronic pancreatitis [J]. Gut, 2018, 67 (1) : 128-137.

## 送样要求 ▾

## 定性蛋白质组

样本类型	推荐送样量
胶点胶条	<p>胶点 / 胶条或者泳道皆可。有明确的目的蛋白,则根据目的条带大小切胶送样,若无明确的目的蛋白,则在样本跑出分离胶 1~1.5cm 后停止电泳,切胶送样,不要跑完整个泳道。</p> <p><b>注:</b> 胶点胶条样品,必须先进行染色再送样。推荐考马斯亮蓝染色,次选银染,要求条带清晰,无降解。</p>
互相作用谱 (IP/Co-IP/Pull-down)	<p><b>推荐胶条:</b> IP/Co-IP/Pull-down 的蛋白洗脱液,跑 SDS-PAGE 胶,按照以上胶条样本处理方法送样。</p> <p><b>次选溶液:</b> 必须提供溶液成分或详细样本处理过程及试剂,蛋白总量为 50μg 以上。</p>

## 定量蛋白质组 &amp; 修饰蛋白质组

样本类型		定量蛋白质组			修饰蛋白质组	
		iTRAQ/TMT/DIA	Label-free	高深度定量	磷酸化	乙酰化 / 泛素化 / N-糖基化
动物组织	常规组织 (脑、心、肝、脾、肺、肾、肌肉、皮肤等)	300mg	150mg	600mg	1g	3g
	坚韧组织 (软骨 / 毛发)	500mg	400mg	1.2g	5g	10g
植物组织	柔软组织 (木本植物的叶、花等,草本植物、藻类、蕨类植物等)	500mg	250mg	1g	5g	10g
	坚硬组织 (树根、树皮、树枝,果实种子等)	3g	2g	9g	10g	20g
	花粉	200μl	100μl	600μl	800μl	2ml
微生物	细菌、真菌菌体	100mg 或 100μl 沉淀	60mg 或 60μl 沉淀	300mg 或 300μl 沉淀	500mg 或 500μl 沉淀	1g 或 1ml 沉淀
细胞	悬浮 / 贴壁培养细胞	50μl 细胞沉淀	50μl 细胞沉淀	150μl 细胞沉淀	200μl 细胞沉淀	500μl 细胞沉淀
液体类	血浆 / 血清	500μl	300μl	1.5ml	1ml (不去高丰度)	1.5ml (不去高丰度)
	唾液 / 泪液	600μl	400μl	1.8ml	2ml	3ml
	培养基上清	10ml	10ml	30ml	30ml	30ml
其它	蛋白溶液	200ug 2ug/μl	100ug 2ug/μl	1mg 2ug/μl	5mg 2ug/μl	10mg 2ug/μl

## 代谢组学

样本类型	送样量	处理方法	样本保存	样本寄送
动物组织	250mg	液氮淬灭	-80° C 保存	足量干冰寄送
植物组织	250mg	液氮淬灭		
细胞	>10 <sup>7</sup>	液氮淬灭		
细胞上清	>5mL	离心, 上清液氮淬灭		
血清 / 血浆	200μl	血液离心取上清		
尿液	500μl	取晨起中段尿		
脑脊液 / 羊水 / 胆汁等体液	200μl	液氮淬灭		
微生物	干重 250mg/200μl	液氮淬灭		
微生物上清	>5mL	离心, 上清液氮淬灭		
粪便 / 肠道内容物	250mg	液氮淬灭		

## 代谢组学生物学重复推荐

样本类型	生物学重复
细胞、微生物、植物	≥ 6 个
动物	≥ 10 个
临床样本	≥ 30 个