

# 搭载微升流速液相的SWATH®蛋白质组学解决方案在肺腺癌精准医疗研究中的应用

Eksigent® 415 System with TripleTOF® 5600\* System

## Precision Medicine Research of Lung Adenocarcinoma Based on MicroFlow-SWATH® Proteomics Strategy

刘一颖 (Liu Yiyang), 陈晨 (Chen Chen), 吕小磊 (Lv XiaoLei), 罗继 (Luo Ji)  
SCIEX中国 上海应用支持中心 (SCIEX China)

**Key Word:** SWATH, Proteomics, Precision Medicine Research

蛋白质组学是精准医疗研究板块中不可或缺的一部分。使用纳升液相的传统科研型蛋白质组学解决方案在面对大批量临床样本的数据采集任务时往往会遇到稳定性差的问题。而基于iTRAQ®的定量方式也存在通量不足的问题。SCIEX针对这些难题推出的搭载微升流速液相的SWATH®蛋白质组学解决方案 (MicroFlow-SWATH®), 在稳定性上明显优于纳升液相, 在通量上远超iTRAQ®蛋白质组学方案<sup>[1,2]</sup>。为精准医疗的蛋白质组学项目提供了一套能够长期稳定产出高质量蛋白质组学数据的液质联用平台<sup>[3,4]</sup>。

SWATH® (Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra) 采集模式通过超高速扫描来获得扫描范围内全部离子的所有碎片信息: 首先将一级扫描范围分成最多100个质荷比窗口, 每次扫描一个窗口肽段的二级信息, 一个扫描循环能够保证该事件内所有肽段信息都被采集到。使用SWATH® 2.0, 即可变窗口的算法, 使得各窗口宽度根据离子密度变化, 确保每个窗口的离子密度相当, 提高数据质量。

本实验利用SWATH®技术进行了32例人源肺腺癌组织和癌旁组织的差异蛋白质组学研究。采用Eksigent® 415 MicroFlow-LC进行肽段分离, 搭配Turbo V™离子源的SCIEX TripleTOF® 5600系统进行SWATH®质谱数据采集。

### 方法具有一下特点:

- 1、从蛋白鉴定和定量数目上看, 在相同上样量、相同梯度的条件下, SWATH®相比于传统的IDA方法能够定量到更多的蛋白, 本实验中单次IDA采集鉴定到约2100种蛋白, 而单次SWATH®采集可以获得6557种蛋白的定量信息。
- 2、从通量上看, 传统蛋白质组学, 一个样品需要分级后分成十多

个样品分别采集, SWATH®采集模式对每个样品仅需一针采集就可以获得大量的蛋白和肽段信息, 通量大大提高。

- 3、从数据重现性上看, 相比于蛋白质组研究中比较常用的Nano系统来说, Micro系统的色谱柱寿命更长、保留时间更稳定; 整体液相梯度时间缩短; 喷针在完全解决喷雾不稳这一问题的同时使用更加便捷、寿命更久, 因此更适合于大批量样本数据的工业化产出。

### 仪器设备

Eksigent® 415 MicroFlow液相系统 + TripleTOF® 5600\*高分辨质谱系统



### 样本前处理

蛋白样本由32对肺腺癌病人的癌和癌旁组织 (共64份组织样本) 中分别提取。每个样本中分别取150 µg 蛋白进行FASP法酶解<sup>[5]</sup>。所得的64份肽段样本分成癌和癌旁两组, 每组中的32个肽段样本中各取出13 µg 混合进行分级, 从第6分钟开始收集流出液, 每1 min收集一管, 共48管, 抽干后合并成12个组分进行IDA数据采集, 通过ProteinPilot™分析后将结果建立为SWATH®的

Library。剩余的样本配制成0.5 mg/mL溶液，分别进行SWATH®数据采集。

## 色谱分级方法

色谱柱：XBridge BEH C18 peptide column, 4.6 × 150 mm, 5 μm

流动相：A: 2% ACN, 20 mM甲酸铵 pH10;

B: 80%ACN, 20 mM甲酸铵 pH10

流速：0.8 mL/min

时间 (min)	A%	B%
0	92	8
5	90	10
37	65	35
45	45	55
48	10	90
53	10	90
54	95	5
62	95	5

## MicroFlow-LC液相方法

色谱柱：Eksigent® 300 μm × 15 cm ChromXP C18CL 3 μm  
120 Å, P/N: 5022436

流动相：A: 2% ACN, 0.1% 甲酸;

B: 98 %ACN, 0.1% 甲酸

流速：5 μL/min

时间 (min)	A%	B%
0	95	5
0.5	95	5
45	75	25
55	45	35
60	45	55
60.5	20	80
65	20	80
65.5	95	5
70	95	5

## 质谱方法

离子源：ESI源，正离子模式

离子源参数：

IS电压: 5500 V

气帘气 CUR: 30 psi

雾化气 GS1: 17 psi

辅助气 GS2: 13 psi

源温度 TEM: 330°C

SWATH®数据采集将肽段离子质荷比分成100个窗口，每个窗口的宽度由SWATH® Variable Window Calculator计算得出。所有数据采集均使用Analyst TF 1.7软件进行，所得到的IDA数据使用ProteinPilot™软件进行搜库，SWATH®数据使用PeakView™内的SWATH® Acquisition™ MicroApp和MarkerView™软件进行处理。

## 实验结果

经过优化，本实验采用70 min的总梯度来进行肽段的分离。由图1可以观察到10针重复进样得到了非常好的信号强度和保留时间的重现性。按照这一梯度，每天可以采集18个左右的样本，连续运行两周，所得到的数据具有非常好的稳定性。

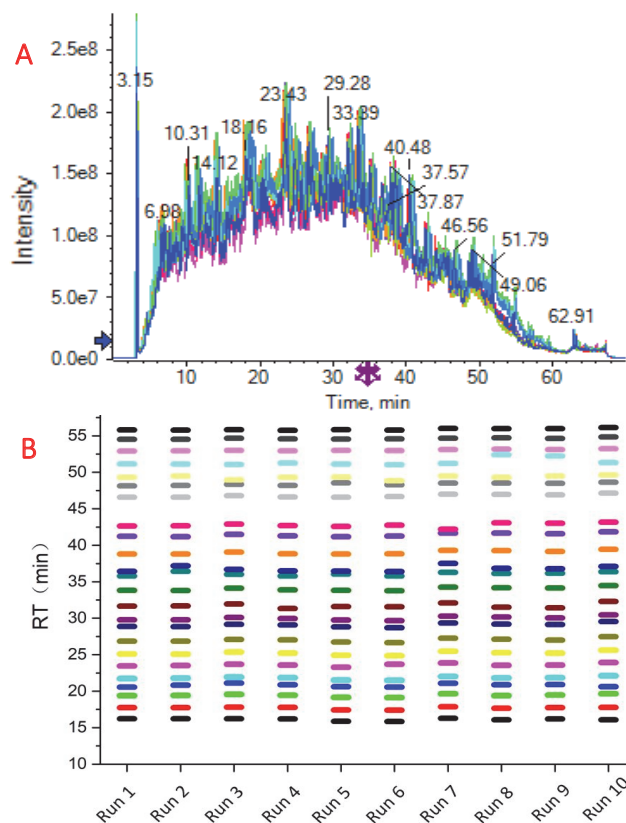


图1. 重复采集10针SWATH®数据的TIC总离子色谱图 (A) 和不同时间段洗脱的肽段的保留时间稳定性对比 (B)。

在SWATH®建库过程中，经过分级，64个肽段样本分为癌和癌旁两组，每组各12个组分。将这24个组分进行IDA数据采集后，使用ProteinPilot™软件分析，共鉴定到124153条肽段，8466种蛋白（FDR=1%）。对64个样本进行SWATH®数据采集，使用SWATH® Acquisition™ MicroApp分析后，在每个样品中定量到6557种蛋白。对这一定量结果使用MarkerView™软件进行样本的PCA分析，如图3所示，癌（红色）和癌旁（蓝色）被明显地分为两个区域，我们能够从基于SWATH®定量的数据结果中看到癌症和癌旁组织在定量信息上呈现明显的差异趋势。在得到的定量结果中，定量差异 Fold Change  $\geq 1.5$  或者  $\leq 0.67$ ， $p$ 值 $\leq 0.05$ ，共找到1965种差异蛋白，其中765种蛋白上调，1230种蛋白下调。



图3. 32对肺腺癌组织（红色）和癌旁组织（蓝色）蛋白组学相对定量的PCA分析结果。

## 结论

基于TripleTOF® 5600+质谱平台的MicroFlow-SWATH®精准医疗解决方案在采集大批量病理样本时具有高通量、高蛋白覆盖度、重现性好、定量准确等优点。能够非常好的胜任精准医疗项目中对于大批量样本的高通量数据采集的任务，在长期的运行中提供稳定且高质量的定量数据，实现工业化的数据产出，有力推进精准医疗版块中蛋白质组学科任务的进程。

## 参考文献

1. Improved Data Quality Using Variable Q1 Window Widths in SWATH® Acquisition, SCIEX Technical note RUO-MKT-02-2879-A.
2. Weixiong Liao, Zhongli Li, Tanshi Li, Qiang Zhang, Heng Zhang and Xinzheng Wang. Proteomic analysis of synovial fluid in osteoarthritis using SWATH® mass spectrometry. Molecular Medicine Reports 2018, 17, 2827-2836.
3. Lin Q, Tan HT, Chung MCM. Next Generation Proteomics for Clinical Biomarker Detection Using SWATH®-MS. Methods Mol Biol. 2019;1977:3-15.
4. Microflow SWATH® Acquisition for Industrialized Quantitative Proteomics, SCIEX Technical note RUO-MKT-02-3637-B.
5. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. Nat. Methods. 2009, 6(5):359-62.

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2019. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-9814-ZH-A



### SCIEX中国公司

北京分公司  
地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院  
1号楼5层  
电话：010-5808 1388  
传真：010-5808 1390  
全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心  
地址：上海市长宁区福泉北路518号  
1座502室  
电话：021-2419 7200  
传真：021-2419 7333  
网址：www.sciex.com.cn

广州分公司  
地址：广州市天河区珠江江西路15号  
珠江城1907室  
电话：020-8510 0200  
传真：020-3876 0835  
微博：@SCIEX