



蛋白质组分析-Label Free 解决方案

后基因组时代的全方位生物信息研究

苏州帕诺米克生物科技有限公司

地 址：苏州市星湖街 218 号生物纳米园

邮 编：215125

电 话：86-512-62959105

传 真：86-512-62959106

E-mail: info@bionovogene.com

网 址: www.bionovogene.com

蛋白质非标记定量技术 (Label Free)

目 录

- 一、蛋白质非标记定量技术概述
- 二、实验大致流程
- 三、生物信息分析
- 四、案例解析
- 五、参考文献

一、蛋白质非标记定量技术概述

蛋白质定量，作为后基因组时代的一个非常重要的领域，在生物系统及疾病和医疗领域起到了非常重要的作用。研究和分析差异蛋白则在阐明医药分子、药物靶标筛选及发现和验证蛋白生物标记物等领域起到了重要的一环。除了传统的2D-PAGE鉴定差异蛋白以外，近些年来，质谱技术已经日新月异，成为了蛋白相对和绝对定量的关键手段。其中研究蛋白相对和绝对定量的常用质谱分析技术是同位素标记，包括如SILAC、LIT及较新的技术iTRAQ等。

近些年来，另外一种技术是一蛋白质非标记标记技术（Label free）越来越受到关注，它克服了传统的同位素标记的缺点，即过高的样品浓度，复杂的实验方案及价格过高的原料等，该方法具有速度更快，更简洁及更简明的结果等优点，大有取代同位素标记技术。

能够得到：一般至少400种蛋白，一般有2000-3000种蛋白，以及不同样品间蛋白质表达的差异。

应用特点：

- 对液相色谱串联质谱的稳定性和重复性要求较高
- 无需昂贵的同位素标签做内部标准，实验耗费低
- 对样本的操作也最少，从而使其最接近原始状态，并且不受样品条件的限制，克服了标记定量技术在对多个样本进行定量方面的缺陷

同位素标记和非标记技术比较：

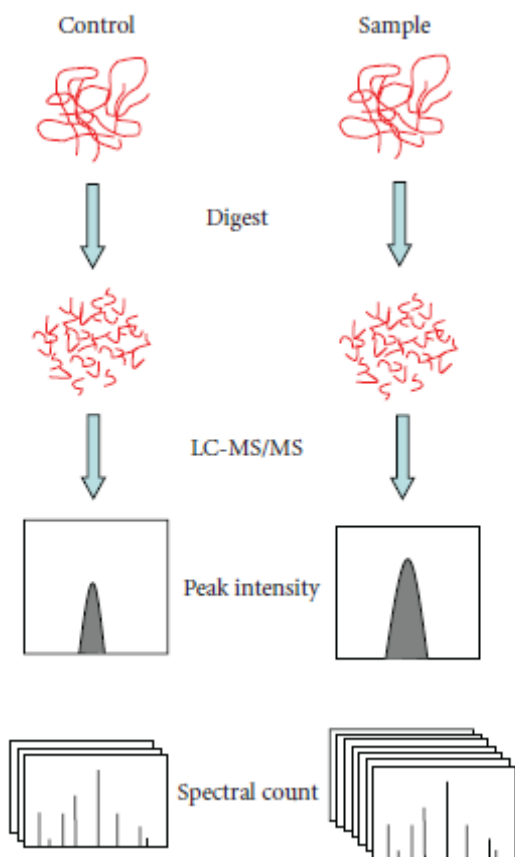
| Non label free | Label free |
|-------------------------|--------------------|
| 样本标记同位素 | 样本非标记 |
| 样本量限制，ICAT(2)，iTRAQ(8)等 | 样本无限制 |
| 在大样本过程中，难于跟踪蛋白丰度 | 易跟踪蛋白丰度 |
| 多数肽段难于识别 | 能够识别大多数肽段 |
| 难于识别和定量低丰度蛋白 | 能够鉴别低丰度肽段 |
| 需提前进行二级质谱蛋白鉴定 | 可以鉴定差异后再进行二级质谱蛋白鉴定 |
| 实验重现性高 | 实验重现性低 |

二、实验大致流程：

操作时首先是对不同蛋白质样品分别进行酶解，分别结合多维色谱分离和后续的串联质谱鉴定，从而实现对不同来源样品蛋白进行分离和鉴定的目的，而后进行后续质谱数据的分析，包括肽段识别、定量及统计分析等。

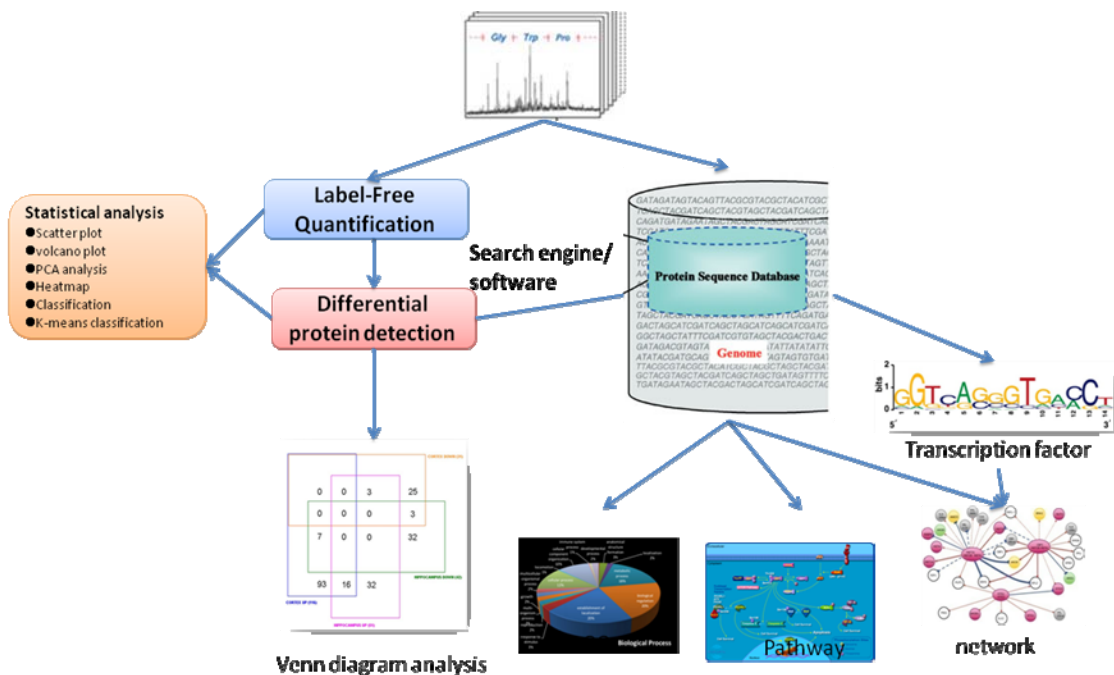
原理：

下图为整个的实验流程：



1. 首先将不同的样品进行蛋白的提取，并对蛋白样品进行变性, 还原烷基化处理, 目的是使样品酶解更加充分
2. 不同的蛋白质样品分别进行蛋白酶水解（通常为胰蛋白酶Trypsin）。
3. 不同的蛋白质样品使用液体色谱和质谱的联用进行一级质谱和二级质谱分析。
4. 对质谱仪所得的数据进行生物信息分析，定性和定量研究。 定量研究包括两种方法，第一种是离子强度分析如峰强或者峰高。第二种方法是色谱技术（spectral counting）。

三、生物信息分析



生物信息学分析

| 基础服务包 | |
|----------------------|--------------------|
| → 1. 质谱数据注释 | → 2. Label free 定量 |
| → 3. label free 统计分析 | → 4. 显著性差异蛋白分析 |
| → 5. 维恩图分析 | |
| 增殖分析包（功能注释） | |
| → 1. 差异蛋白 GO 显著性分析 | → 2. 差异蛋白代谢通路分析 |
| → 3. 差异蛋白网络分析 | |
| 增强分析包（调控与进化） | |
| → 1. 差异蛋白转录因子分析 | → 2. 差异蛋白调控网络分析 |
| 增强分析包（关联分析） | |
| → 蛋白组与表达组关联分析 | |

分析套餐

1. 强力推荐：蛋白组分析热门套餐 (Cat.No. BNG3301)

| 服务内容 | 说明 | 交付时间 |
|----------------------|----|-----------|
| 1. 基础服务包 (1-4) | | 大约为 2-3 周 |
| 2. 基础服务包 (功能分析) 1, 2 | | |

2. 进阶分析：蛋白组分析进阶套餐 (Cat.No. BNG3302)

| 服务内容 | 说明 | 交付时间 |
|-------------------|----|-----------|
| 1. 基础服务包 | | 大约为 3-4 周 |
| 2. 增值分析包（调控分析）1-2 | | |

3. 定制分析：蛋白组分析定制分析 (Cat.No. BNG3303)

| 服务内容 | 说明 | 交付时间 |
|------|----|------|
|------|----|------|

1. 基础服务包
2. 增值分析包（调控分析）
3. 增值分析包（功能注释）

各项目自选分析内容，用户可以提出新的分析方案

大约为 3-6 周

四、案例解析：

实验处理

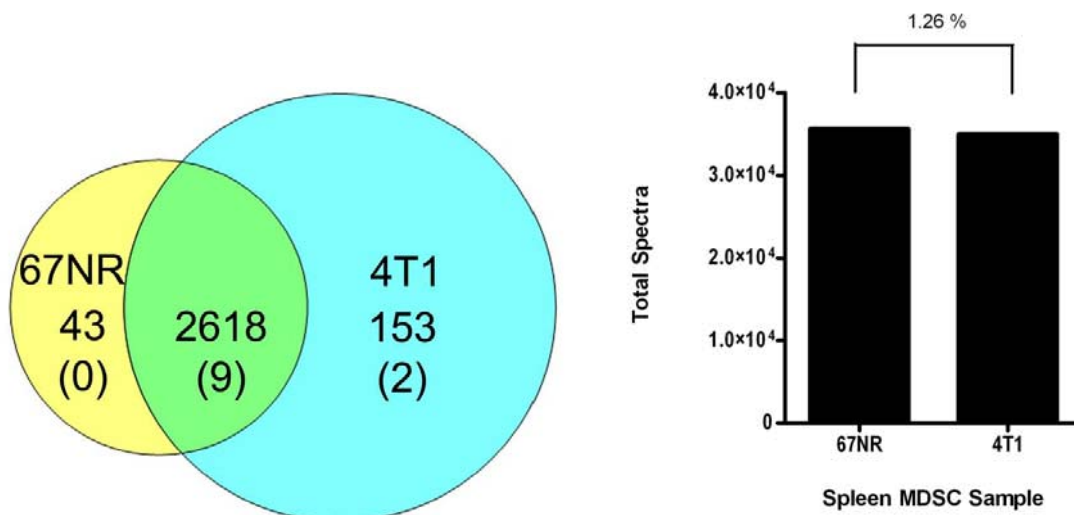
近期，美国范德堡大学医学中心公布了一项利用Label free的鸟枪法蛋白组表征髓源抑制性细胞(MDSC)与转移性小鼠乳腺肿瘤的数据。美国在2010年具有200000个乳腺癌患者，是女性排名第一的常见恶性肿瘤。髓源抑制性细胞是一群异质性细胞，来源于骨髓祖细胞和未成熟髓细胞(imature myeloid cells, IMCs)，是树突状细胞(dendritic cells, DCs)、巨噬细胞和(或)粒细胞的前体。MDSCs可以通过多种途径抑制机体的获得性和天然抗肿瘤免疫，使肿瘤细胞逃避机体的免疫监视和攻击，促进肿瘤发展。在转移性和原发性恶性肿瘤中处于主导地位。而转移性肿瘤往往是死亡的原因，而不是原发性肿瘤。在本研究中，label free鸟枪法蛋白技术研究了转移性(67NR)和非转移性(4T1)小鼠乳腺肿瘤的MDSC的蛋白组，旨在发现转移性肿瘤中与MDSCs相关的肿瘤标记物。

首先利用anti-CD11b的抗体磁珠获取4T1和67NR肿瘤的Gr1+/CD11b+ MDSC细胞，并获得MDSC的阳性克隆。从细胞中获取蛋白，并利用TCEP进行变性、还原烷基化处理及用胰蛋白酶Trypsin进行水解。并利用C18反相柱和强离子交换柱进行HPLC色谱分离，而后进行LTQ离子阱质谱进行串联质谱鉴定。最后利用相关软件提取色谱数据，进行蛋白注释及蛋白定量，进行倍性变化分析，获得差异的蛋白。

数据分析

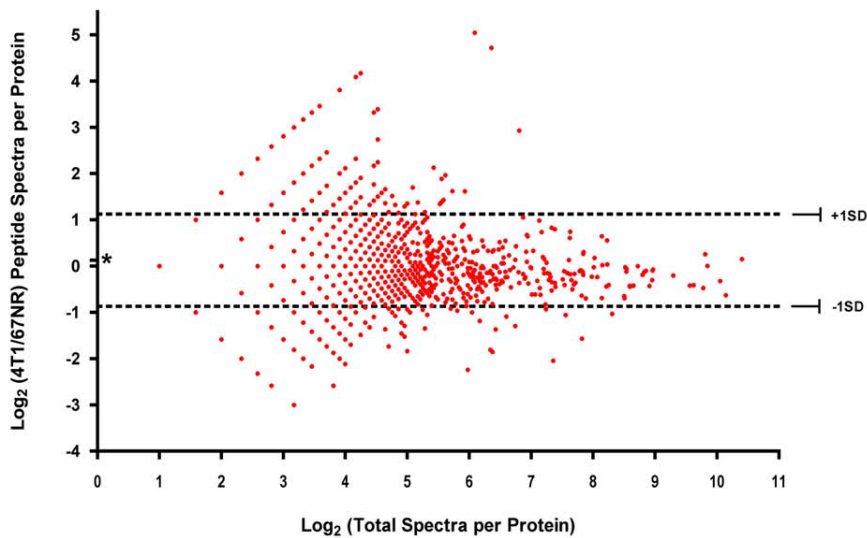
1. 肽段注释

得到的相关数据，用蛋白注释软件检索小鼠蛋白数据库(uniprot)，对各个肽段进行注释，共识别了2814个蛋白，其中43个属于67NR-MDSCs，153个属于4T1-MDSCs，2618个共有(下图左)。其中4T1-MDSCs共具有35009个光谱(spectra)，67NR-MDSCs具有35637个光谱(下图右)。



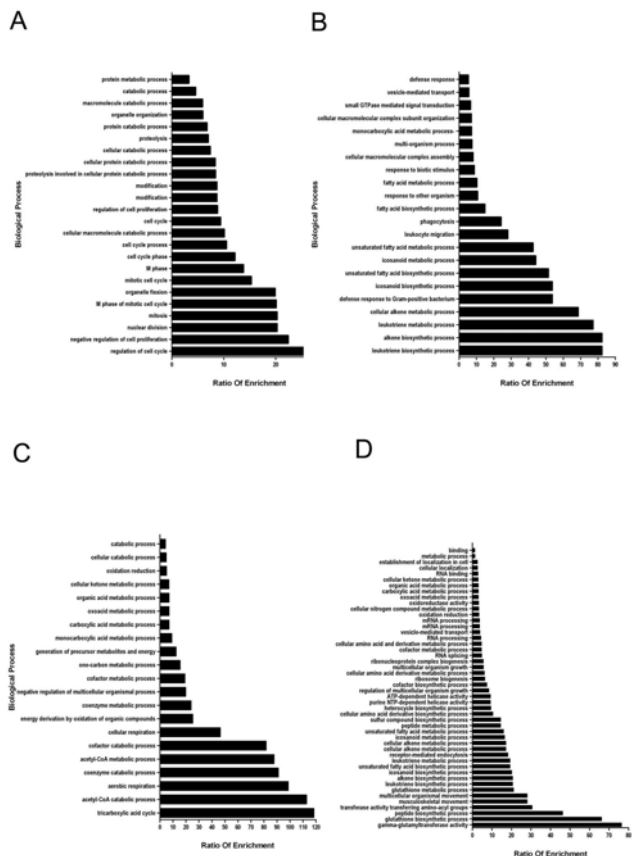
2. 筛选差异表达蛋白

随后进行差异蛋白筛选，根据先前经验，光谱数处于25-300的用于最后的分析，目的是去除表达过高或者过低的蛋白。最后通过结合蛋白光谱数倍性差异的对数值及总的光谱数获得差异表达的蛋白，如下图。



3. 基因本体 (GO) 富集分析

随后对差异表达的蛋白分为4组，（1）67NR-MSDCs独有的蛋白；（2）上调的；（3）下调的（4T1相对于67NR-MSDCs）；（4）4T1-MSDCs独有的蛋白，进行后续的功能分析。对各组进行基因本体(GO)的生物学过程(Biological Process),分子功能(Molecular function)细胞组件(Cellular component)分析，如67NR-MSDC蛋白主要集中于基本的细胞功能，例如M期细胞周期、核分裂、细胞调控等。比较有意思的是细胞增值在67NR组中处于负调控（下图A）。在下调的组中间则主要包括碳来源，脂肪酸代谢等。在上调的组中间，最显著的则是最常见的TCA循环。

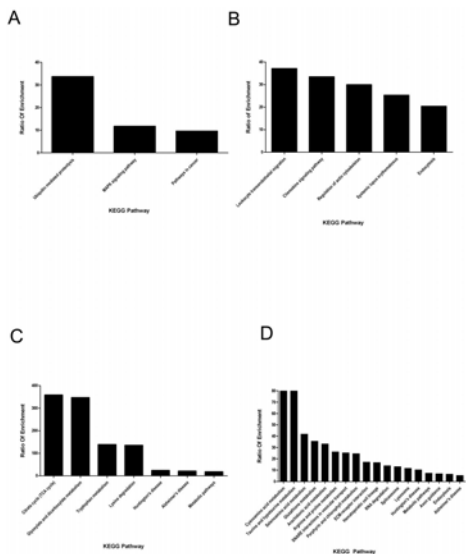


4. 代谢通路 (PATHWAY) 富集分析

同样对差异表达的蛋白分为4组，（1）67NR-MSDCs独有的蛋白；（2）上调的；（3）下调的（4T1相对于67NR-MSDCs）；（4）4T1-MSDCs独有的蛋白，进行KEGG PATHWAY分析。

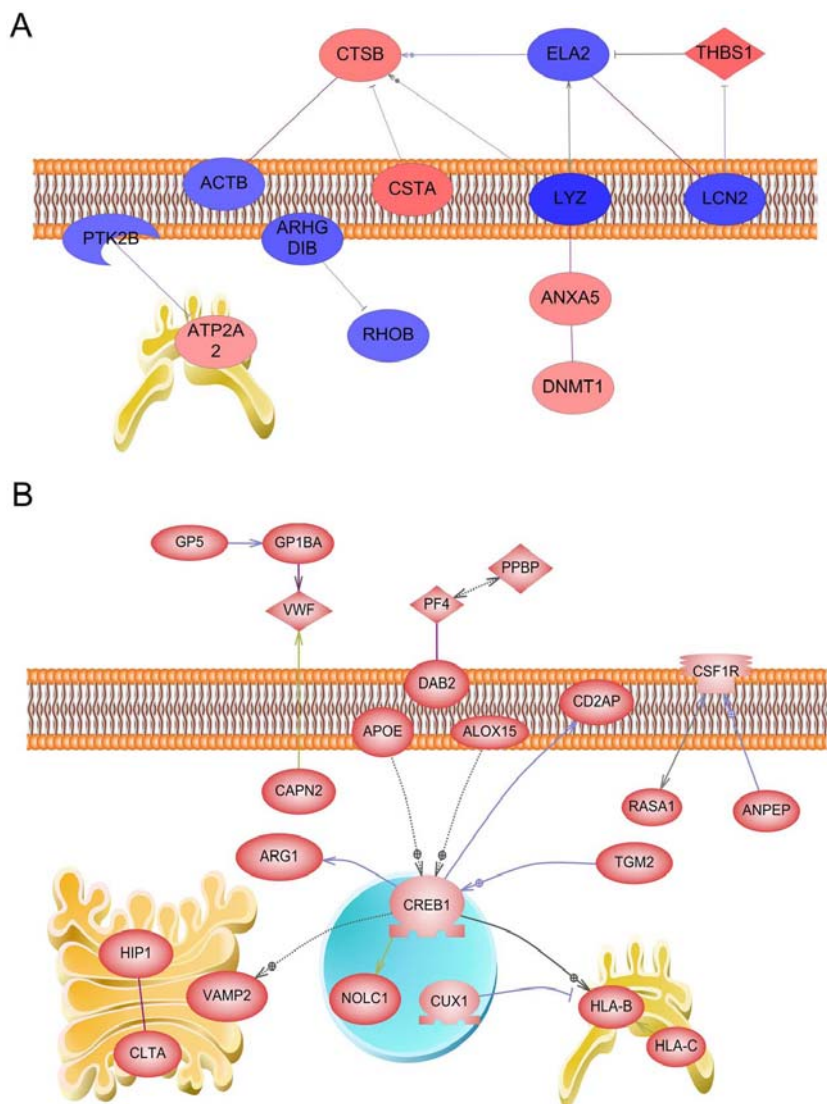
4T1-MSDCs相对于67NR-MSDCs下调的蛋白主要位于白细胞跨内皮细胞迁移、趋化因子信号和细胞骨架调节代谢通路。4T1-MSDCs相对于67NR-MSDCs上调的蛋白则主要位于细胞代谢的代谢通路中。其

他的代谢通路描述可以详见下图。



5. 差异的MDSC蛋白-蛋白相互作用跟非转移或者转移乳腺癌相关

直接的蛋白蛋白相互作用往往能够进一步研究与疾病相关的潜在生物学标记。在随后的分析中，分析了4T1-MDSCs相对于67NR-MDSCs差异的上调或者下调的色谱计数的蛋白蛋白相互作用（见下图A和B）。



五、参考文献：

1. Boutte, A.M., et al., *Characterization of the MDSC proteome associated with metastatic murine mammary tumors using label-free mass spectrometry and shotgun proteomics*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e22446.
2. Gamez-Pozo, A., et al., *PTRF/cavin-1 and MIF proteins are identified as non-small cell lung cancer biomarkers by label-free proteomics*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33752.
3. Zhu, W., J.W. Smith, and C.M. Huang, *Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 840518.
4. Arike, L., et al., *Comparison and applications of label-free absolute proteome quantification methods on Escherichia coli*. J Proteomics, 2012. **75**(17): p. 5437-48.

苏州帕诺米克生物科技有限公司

地 址：苏州市星湖街 218 号生物纳米园

邮 编：215125

电 话：86-512-62959105

传 真：86-512-62959106

E-mail: info@bionovogene.com

网 址：www.bionovogene.com