

技术说明

使用 Aurora Ultimate 色谱柱对福尔马林固定石蜡包埋的肿瘤样品进行蛋白质组学分析

Vo Van Anh Pham, Matthew J. McKay, Mark P. Molloy
悉尼大学科林研究所, 肠癌与生物标志物实验室



介绍

临床组织通常被处理成福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 的组织块, 这些组织块可以被切片用于组织病理学分析。这些存档的样品非常稳定, 当与成熟的临床数据相匹配时, 为生物标志物的发现提供了契机。目前已开发出从 FFPE 组织块中提取肽段并利用液相色谱-质谱联用 (LC-MS/MS) 进行分析的蛋白质组学方法。在 LC-MS/MS 分析之前, 我们结合激光显微切割 (LMD) 技术来特异性地切取 FFPE 结直肠癌样本中的肿瘤区域和正常粘膜。

我们使用从 FFPE 中提取的癌症样品和 HeLa 细胞裂解液, 评估了 IonOpticks Aurora Ultimate 色谱柱的性能。将激光显微切割的样品分离、处理并用胰蛋白酶消化。样品在 HF-X Orbitrap 质谱仪上使用数据非依赖性采集 (DIA) 模式进行采集。数据使用 DIA-NN 1.9.2 进行处理。通过该分析, 从单次 $1\mu\text{g}$ HeLa 进样中鉴定出 6,000 种唯一蛋白质和 74,000 条肽段。实现这一点的同时, 仍保持了低变异系数 (CV)、7 秒的半峰全宽 (FWHM) 峰宽和稳定的保留时间。

IonOpticks Aurora Ultimate 色谱柱与 Q-Exactive HF-X 质谱仪的结合, 能够从多种不同组织中鉴定出广泛的肽段和蛋白质, 并获得一致的结果, 从而能够可靠地鉴定与癌症生物学相关的标志物。

使用激光显微切割 (LMD) 技术实现空间富集的 H&E 染色结肠肿瘤代表性图像。

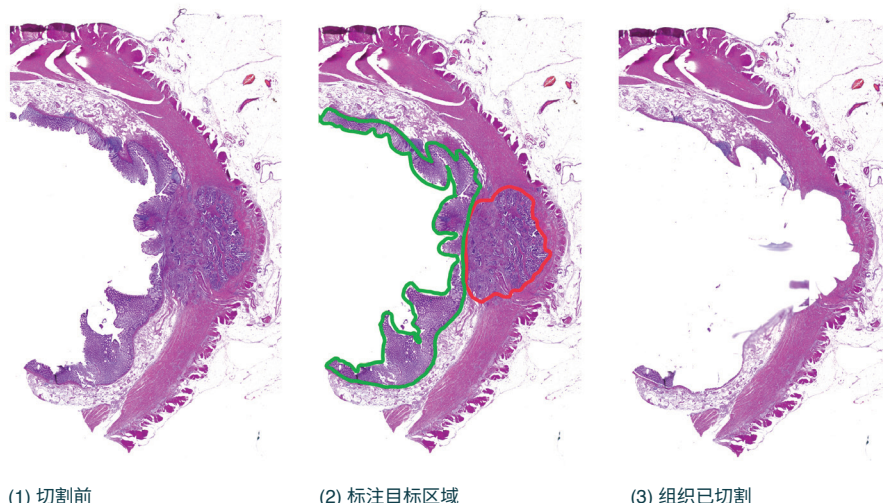


图 1: (1) LMD 切割前的患者样品。(2) 患者样品, 其中肿瘤区域 (红色) 和邻近正常组织 (绿色) 已被标注, 准备进行显微切割。(3) 患者样品, 所有目标组织均被切割并收集到 0.6 mL 管盖中, 切片上残留有肌肉/脂肪组织。放大倍数 2.5x。

方法

通过激光显微切割获取样品, 切割面积约为 $100 \times 10^6 \mu\text{m}^2$, 可从直肠癌和邻近正常组织样品获得约 $20\mu\text{g}$ 的蛋白质 (图 1)。消化后的样品使用 StageTips 进行纯化, 然后重悬于 0.1% FA 中。

样品使用 Thermo Fisher Scientific Dionex Ultimate 3000 进样, 流速为 400 nL/min。液相色谱 (LC) 与 IonOpticks Aurora Ultimate 色谱柱 (25 cm x 75 μm) 连接。数据采集在 Thermo Fisher Q-Exactive HF-X 混合四极杆-Orbitrap 质谱仪上进行, LC 运行时间为 140 分钟。纳升级喷雾离子源设置为正离子模式。

将脱盐后的肽段以阶梯梯度方式上样至色谱柱, 起始缓冲液浓度为 2% 的 B 液 (80% ACN, 0.1% FA) 和 98% 的 A 液 (0.1% FA), 结束时为 95% 的 B 液和 5% 的 A 液。

宽窗口数据非依赖性采集 (DIA) 数据通过一次全扫描质谱图, 随后是 50 个 25 m/z 的 DIA 窗口, 接着是另一次全扫描, 然后是另外 50 个 25 m/z 的窗口, 并且每个 m/z 窗口与第一个循环重叠 50%, 最终形成总共 101 个 m/z 窗口。全扫描质谱图在 30,000 分辨率下采集, 扫描范围为 395-1005 m/z。自动增益控制 (AGC) 目标值为 3×10^6 , 最大注入时间为 55ms。

所有全扫描质谱图均以质心模式采集。每个 DIA 窗口使用 15,000 的分辨率采集, 隔离窗口宽度为 12 m/z, 扫描质量范围为 395-1005 m/z。AGC 目标值为 1×10^6 , 最大注入时间为 25ms。归一化碰撞能量 (NCE) 设置为 27, 默认电荷态设置为 +2。所有 DIA 质谱图均以质心模式采集。

数据通过 DIA-NN 1.9.2 进行分析, 该软件利用神经网络, 使用伪数据库以 1% 的假发现率 (FDR) 来鉴定和定量肽段。用于预测肽段和生成谱图库的数据库是 2023 年 10 月从 UniProt 生成的人类蛋白质 FASTA 数据库, 其中包含 20,434 个条目。

结果

三种样品类型中的唯一肽段鉴定数量

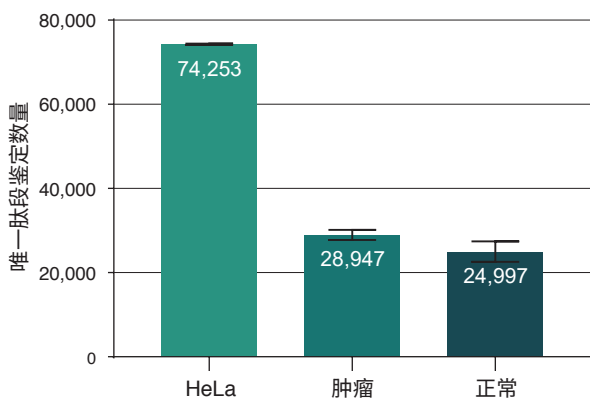


图 2: 使用 1 μ g 的 HeLa 胰蛋白酶酶解物 (n = 4)。对于激光显微切割的样品, 收集了原发性结直肠肿瘤和邻近正常粘膜 (n = 3 个样本)。所有已鉴定肽段的平均半峰全宽 (FWHM) 为 7 秒。样品在 Thermo Fisher Scientific Dionex Ultimate 3000 和 Thermo Fisher Q-Exactive HF-X 质谱仪上, 使用 IonOpticks Aurora Ultimate (25 cm x 75 μ m) 色谱柱运行, LC 运行时间为 140 分钟, 流速为 400 nL/min。数据使用 DIA-NN 1.9.2 进行分析。

三种样品类型中的唯一蛋白质鉴定数量

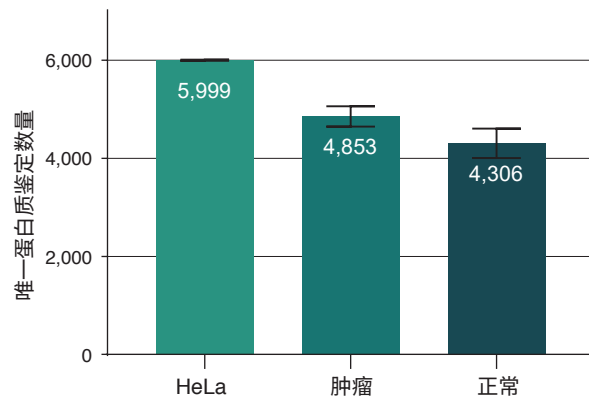


图 3: 使用 1 μ g 的 HeLa 胰蛋白酶酶解物 (n = 4)。对于激光显微切割的样品, 收集了原发性结直肠肿瘤 (n = 3) 和邻近正常组织 (n = 3)。样品在 Thermo Fisher Scientific Dionex Ultimate 3000 和 Thermo Fisher Q-Exactive HF-X 质谱仪上, 使用 IonOpticks Aurora Ultimate (25 cm x 75 μ m) 色谱柱运行, LC 运行时间为 140 分钟, 流速为 400 nL/min。数据使用 DIA-NN 1.9.2 进行分析。

不同样品类型的变异系数

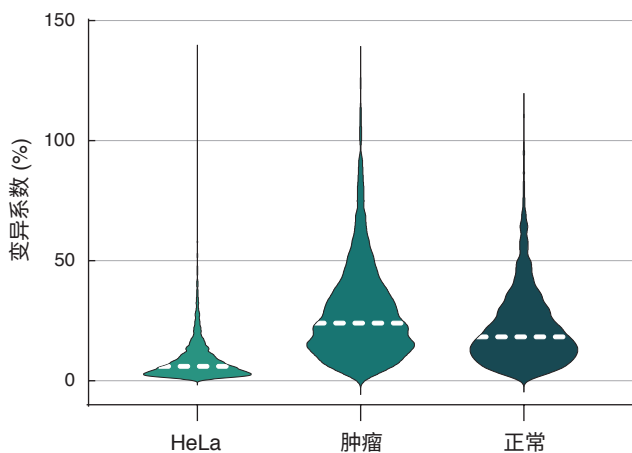


图 4: HeLa 和结直肠肿瘤样品中, 所有样品中均鉴定出的蛋白质的变异系数 (CV) 小提琴图。使用 1 μ g 的 HeLa 胰蛋白酶酶解物 (n = 4) (中位 CV = 8.06%)。对于激光显微切割的样品, 收集了原发性结直肠肿瘤 (n = 3 个样本) (中位 CV = 24.1%) 及其对应的邻近正常组织 (n = 3 个样本) (中位 CV = 19.25%)。样品在 Thermo Fisher Scientific Dionex Ultimate 3000 和 Thermo Fisher Q-Exactive HF-X 质谱仪上, 使用 IonOpticks Aurora Ultimate (25 cm x 75 μ m) 色谱柱运行, LC 运行时间为 140 分钟。虚线代表每个样品的中位值。数据使用 DIA-NN 1.9.2 进行分析。

差异表达蛋白

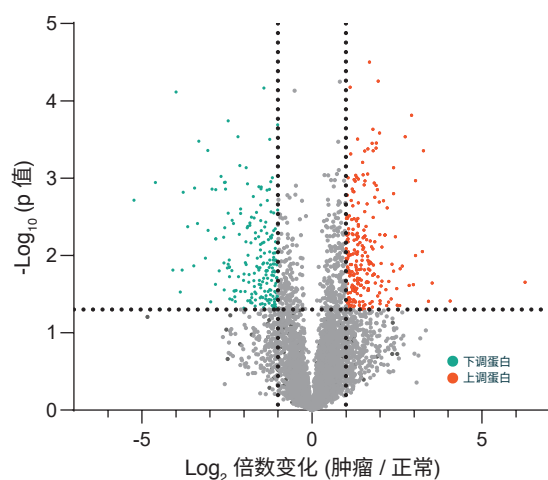


图 5: 火山图显示了早期结直肠肿瘤的肿瘤与邻近正常组织样本之间的差异表达蛋白。由绿色和橙色点表示的差异表达蛋白被定义为 p 值 < 0.05 且 Log₂ 倍数变化 (FC) > 1 的蛋白质。垂直虚线表示 Log₂ FC 在 ± 1 的截断值。水平虚线表示 -Log₁₀(p-value) 在 1.3 的截断值。统计使用学生 t 检验, p 值 < 0.05 被认为具有显著性。

结论

通过使用从 FFPE 存档的结直肠癌生物样本中提取的蛋白质, 成功地展示了 IonOpticks Aurora Ultimate 色谱柱与高分辨率 LC-MS/MS 在数据非依赖性采集模式下的深度蛋白质组覆盖度和高灵敏度。

相关产品



Aurora Ultimate 25x75 集成式喷射色谱柱
部件号 AUR3-25075C18A (25 cm x 75 μ m 内径, 1.7 μ m C18)