

组学

基于 Orbitrap Excedion 质谱仪实现通量灵活、稳健可扩展的 DIA 蛋白质组学分析

作者

Jolene Duda¹、Mikayla Shanafelt¹、Martins Jansons²、Brett Larsen³、Amirmansoor Hakimi¹;

¹ 赛默飞世尔科技，美国加利福尼亚州圣何塞；

² 赛默飞世尔科技，立陶宛维尔纽斯

³ 赛默飞世尔科技，加拿大密西沙加

关键词

Orbitrap Excedion 质谱仪、数据非依赖采集、DIA、无标记定量、LFQ

研究目的

本研究旨在评估 Thermo Scientific™ Orbitrap™ Excedion™ 二合一质谱仪在宽范围样品上样量及不同梯度通量条件下，实施 DIA 采集的稳健性与可扩展性。

引言

具备可拓展性的蛋白质组学分析，对于获得具有统计学意义生物学发现至关重要。色谱分离与低流速液相技术的进步，大幅提升了自下而上蛋白质组学的分析灵敏度与重现性。其中微柱阵列色谱可显著提升分离效率、降低谱带展宽，更好地实现低丰度目标蛋白检出¹。结合优化的纳流 / 低流速液相方法，可进一步提升离子化效率，并最大程度提高分析物向质谱仪的传输效率。

数据非依赖采集 (DIA) 已成为实现全面且可重复蛋白质组表征的重要策略，相较传统数据依赖采集方法，可提供更稳定的定量结果和更完整的数据覆盖。近期基于高分辨 Thermo Scientific™ Orbitrap™ 质谱仪的研究表明，DIA 工作流可在不同梯度时间和通量条件下实现可扩展的蛋白质组覆盖，同时保持良好的定量稳定性^{2,3}。然而，要充分发挥 DIA 的潜力，需要高性能质谱仪、高效色谱分离与优化采集策略的无缝整合。

本技术文档评估了 Orbitrap Excedion 二合一质谱仪联用 Thermo Scientific™ Vanquish™ Neo UHPLC 系统及 Thermo Scientific™ μPAC™ Neo Plus HPLC 色谱柱的整体性能。

该集成平台兼具高分辨能力、快速扫描速度和高效离子传输能力，并结合高度规整的微柱阵列色谱与精准低流速控制。μPAC Neo Plus HPLC 色谱柱可提供尖锐峰形、极低峰展宽和优异的保留时间稳定性；Vanquish Neo UHPLC 系统的低流速模式进一步提升离子化效率与待测物向质谱的传输效率（图 1）。

本研究采用 HeLa 标准酶解样本，在 5 – 500 ng 宽进样量范围内开展 DIA 分析，评估方法稳定性与可拓展性。同时探究 FAIMS Pro Duo 离子淌度对蛋白质组覆盖度的提升效果，并在每日约 7 个样品（7 SPD）至 30 个样品（30 SPD）的梯度时长下，考察通量与鉴定深度的平衡关系。所得数据分别采用 Biognosys Spectronaut[®] 20.4 与 Aptila DIA-NN 2.2 软件进行处理，以验证不同分析流程下性能趋势的一致性。

整体结果表明，该赛默飞整合平台可实现具有良好扩展性的蛋白鉴定深度、优异的重复性以及灵活的通量配置能力。该系统支持稳定可靠的蛋白质组分析，在不同分析通量下保留一致的核心蛋白质组，并通过延长色谱分离时间进一步增强低丰度蛋白检测能力，非常适合全面蛋白质组研究。

实验部分

推荐耗材

- Fisher Chemical™ Optima™ LC-MS 级水（含 0.1% 甲酸，货号 LS118-500）
- Fisher Chemical™ Optima™ LC-MS 级 80% 乙腈、20% 水（含 0.1% 甲酸，货号 LS122500）
- Thermo Scientific™ n- 十二烷基 -β-D- 麦芽糖苷 DDM（货号 89902）

样品

- Thermo Scientific™ Pierce™ HeLa 蛋白酶解标准品（货号 88328）

液相色谱柱

- μPAC Neo Plus 色谱柱，50 cm × 180 μm，C18，微柱阵列（货号 COL-UPAC050NAN）
- Thermo Scientific™ EASY-Spray™ 喷针，内径 10 μm（货号 ES993）

超高效液相系统

- Vanquish Neo UHPLC 系统（货号 VN-S10-A-01）

质谱仪

- Orbitrap Excedion 质谱仪
- FAIMS Pro Duo 离子淌度
- Thermo Scientific™ EASY-Spray™ 离子源

数据分析软件

- Spectronaut 软件 20.4 版
- DIA-NN 软件 2.2.0 版

样品制备

将 HeLa 蛋白酶解标准品用含 0.02% 十二烷基 -β-D- 麦芽糖苷与 0.1% 甲酸的溶液复溶，终浓度为 200 ng/μL。并于室温条件下超声 1 分钟。向自动进样瓶中加入 78 μL 复溶缓冲液和 2 μL 浓度为 200 ng/μL 的 HeLa 酶解液，使最终浓度为 5 ng/μL。涡旋混匀 30 秒。最终按照 5 – 500 ng 不同上样量进行 LC-MS 分析。

液相色谱 - 质谱分析

所有 LC-MS 运行均采用 Vanquish Neo UHPLC 系统的直接进样模式，并联用 Orbitrap Excedion 质谱仪完成分析。肽段在 Vanquish Neo UHPLC 系统上通过 μPAC Neo Plus 50 cm HPLC 色谱柱进行分离。流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水，流动相 B 为含 0.1% 甲酸的 80% 乙腈。具体 LC-MS 参数与梯度设置见表 1–表 5。



图 1. 基于 Orbitrap Excedion 质谱仪的无标记定量 DIA 工作流示意图。

表 1. 不同通量实验的全局 LC 与 MS 方法参数汇总。表中未提及参数均为默认值。

全局液相参数	
流动相 A	含 0.1% 甲酸的水
流动相 B	含 0.1% 甲酸的 80% 乙腈

分离柱参数	
内径	75 μm
柱长	50 cm
最大压力	450 bar
最大流速	750 nL/min
最高温度	60 $^{\circ}\text{C}$

实验条件	
柱温	50 $^{\circ}\text{C}$
快速上样 / 平衡	压力控制模式
上样 / 平衡压力	400 bar
平衡因子	2
自动进样器温度	7 $^{\circ}\text{C}$

参数	设置
喷雾电压	2,200 V
鞘气	0 arb
柱温箱温度	50 $^{\circ}\text{C}$
离子传输管温度	275 $^{\circ}\text{C}$
预期峰宽	9 – 23 秒 (随梯度时长变化)
高级峰检测	开启
默认电荷数	2

表 2. 不同通量实验的液相参数。

30 SPD			18 SPD			12 SPD			7 SPD		
Time (min)	%B	Flow rate (nL/min)	Time (min)	%B	Flow rate (nL/min)	Time (min)	%B	Flow rate (nL/min)	Time (min)	%B	Flow rate (nL/min)
0	3	500	0	3	300	0	3	500	0	3	500
0.5	6	500	1	6	300	1.5	6	200	3	4	200
30	22.5	500	60	30	300	90	30	200	150	28	200
36	90	500	69	90	300	105	90	200	180	90	200
36.1	99	750	69.1	99	750	105.1	99	750	180.1	99	750
38	99	750	71	99	750	107	99	750	182	99	750

表 3. 不同通量实验的质谱参数。

MS1 全扫描	
Orbitrap 分辨率	60,000 – 120,000
扫描范围 (m/z)	400 – 800
RF 透镜	40
AGC 目标值	300% (3.0×10^6)
最大注入时间	自动

MS2 DIA 扫描	
Orbitrap 分辨率	15,000 – 60,000
母离子质量范围 (m/z)	400 – 800
隔离窗口 (m/z)	8 – 10
窗口位置优化	开启
AGC 目标值	1000% (1.0×10^6)
最大注入时间	自动
DIA 扫描范围 (m/z)	145 – 1450
HCD 碰撞能量 (%)	25
RF 透镜 (%)	40
循环控制	全部

不同通量下的质谱分辨率与注入时间

	30 SPD	18 SPD	12 SPD	7 SPD
Orbitrap 分辨率 (MS1)	60,000	60,000	120,000	120,000
Orbitrap 分辨率 (MS2)	15,000	30,000	45,000	60,000
隔离窗口 (m/z)	8	8	10	10

表 4. HeLa 稀释实验的全部液相与质谱方法参数汇总。表中未提及参数均为默认值。

全局液相参数	
流动相 A	含 0.1% 甲酸的水
流动相 B	含 0.1% 甲酸的 80% 乙腈
分离柱参数	
内径	75 μm
柱长	50 cm
最大压力	450 bar
最大流速	750 nL/min
最高温度	60 $^{\circ}\text{C}$
实验条件	
柱温	50 $^{\circ}\text{C}$
快速上样 / 平衡	压力控制模式
上样 / 平衡压力	435 bar
平衡因子	0.5
自动进样器温度	7 $^{\circ}\text{C}$
参数	设置
喷雾电压	1,900 V
鞘气	0 arb
柱温箱温度	50 $^{\circ}\text{C}$
离子传输管温度	305 $^{\circ}\text{C}$
FAIMS 模式	Custom Resolution, outer electrode temperature: 85 $^{\circ}\text{C}$ (for runs with the FAIMS Pro Duo interface)
预期峰宽	10 秒
高级峰检测	开启
默认电荷数	2

液相色谱 - 质谱数据处理与分析

所有 LC-MS 数据均以 3 次技术重复：在 36 SPD 条件下分别进样 5 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng 和 500 ng；以及在 200 ng 上样量下分别采用 7 SPD, 12 SPD, 18 SPD 和 30 SPD 通量进行分析。3 次技术重复数据合并后，分别采用 Spectronaut 软件与 DIA-NN 软件进行无谱图库分析策略进行分析²。肽段与蛋白组 FDR 均设置为 1%。导出的结果文件导入 Rstudio™ (2024.12.1 Build 563) 和 R (v4.3.1) 中进行后续数据分析与可视化。

表 5. HeLa 稀释实验的液相色谱 - 质谱参数。

36 SPD	%B	Flow rate (nl/min)
0	1	750
0.05	4	750
2.75	12	750
2.85	12.1	200
16.35	22.5	200
26.35	45	200
34.3	99	200

MS1 full scan		
	5 ng HeLa	50 – 500 ng HeLa
Orbitrap resolution	120k	45k
Scan range (m/z)	400 – 900	400–900
RF lens	50	50
AGC target	300% (3.000e6)	300% (3.000e6)
Maximum IT	Auto	Auto
FAIMS CV (for runs with FAIMS Pro Duo interface)	-45 V	-45 V

MS2 DIA scan		
	5 ng HeLa	50 – 500 ng HeLa
Orbitrap resolution	60k	22.5k
FAIMS CV (for runs with FAIMS Pro Duo interface)	-45 V	-45 V
Precursor mass range (m/z)	400 – 900	400 – 900
Isolation window (m/z)	50	12
Window placement optimization	On	On
AGC target	1,000% (1.00e6)	1,000% (1.00e6)
Maximum IT	Auto	Auto
DIA scan range (m/z)	145 - 1450	145 - 1450
HCD collision energy (%)	28	28
RF lens (%)	50	50
Loop control	2 s	2 s

结果与讨论

不同通量条件下可扩展的蛋白质组深度

为评估分析通量与蛋白质组覆盖深度之间的平衡关系，本研究采用 30 SPD 至 7 SPD 梯度条件开展 DIA 分析（表 1–3，图 2）。在 30 SPD 梯度条件下，系统已实现较高水平的蛋白质组覆盖深度。采用 Spectronaut 软件处理后，共鉴定出约 6,700 个蛋白组和 76,500 条肽段。这些结果表明，Orbitrap Excedion 质谱仪可提供稳定可重复的蛋白质组深度分析能力。

随着梯度时间延长，鉴定深度同步提升；18 SPD 和 12 SPD 条件下覆盖度进一步增加。使用 7 SPD 梯度获得了最深的蛋白质组表征，鉴定出约 8,800 个蛋白组和 135,000 条肽段。值得注意的是，无论采用 Spectronaut 软件还是 DIA-NN 软件处理数据，两款分析软件结果趋势高度一致进一步证明该采集策略具有良好的稳健性及跨分析平台兼容性。

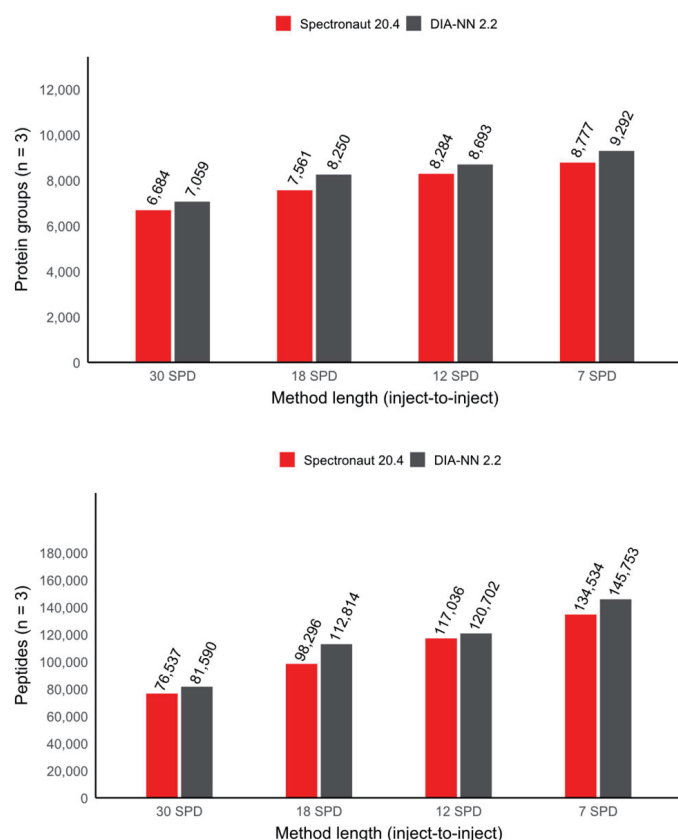


图 2. 不同通量条件下可扩展的蛋白质组鉴定深度。在 Orbitrap Excedion 质谱仪上，采用 30 SPD 至 7 SPD 梯度（进样到进样间隔）对 200 ng HeLa 样品进行三次重复分析，获得蛋白组与肽段鉴定结果。各条件下的数据分别在 Spectronaut 和 DIA-NN 软件中进行处理，蛋白和肽段 FDR 设置 1% 进行过滤。随着梯度时间延长，所有分析流程中的蛋白质组覆盖度均逐步提升。

为进一步评估不同通量条件下蛋白质组覆盖的扩展情况，研究对短梯度与长梯度条件下的蛋白与肽段重叠情况进行了分析（图 3）。30 SPD 与 7 SPD 数据比较结果显示，高通量方法中鉴定到的大多数蛋白均保留在长梯度数据集中，共有 6,609 个共享蛋白组。在肽段水平呈现相似趋势：短梯度中检测到的绝大多数肽段在长梯度中同样被鉴定。仅有不足 2% 的蛋白和肽段为单一条件独有，表明不同梯度条件下具有很强的重现性。因此，长梯度带来的额外鉴定主要反映了对低丰度物质检测能力的提升，而非核心蛋白质组的替换。

按 log₁₀ 蛋白丰度排序的分布结果进一步印证上述结论（见图 4）。随着梯度时间延长，系统对低丰度蛋白的检测能力持续增强，其中 7 SPD 方法实现了接近 6 个数量级的动态范围覆盖。图中标记的 SHLD2 和 CDCA7 两种蛋白，仅在 7 SPD 采集中被检测到，而在较短梯度条件下未被观察到。这两种蛋白均位于丰度分布的最低区域，说明延长色谱分离时间能够检测到高通量方法灵敏度阈值以下的低丰度蛋白。

综上所述，Orbitrap Excedion 质谱仪在支持灵活通量的同时，能够保持稳定的核心蛋白质组，并通过延长色谱分离提升对更低丰度蛋白的检测能力，从而实现蛋白质组深度的可拓展提升。

不同样品上样量下的鉴定深度与稳定性

为表征 Orbitrap Excedion 质谱仪在宽动态范围内的 DIA 蛋白质组表征性能，采用 36 SPD 方法（有效梯度约 26 分钟）对 HeLa 稀释样品（5–500 ng）进行 3 次重复分析（图 5，表 4–5）。HeLa 稀释样品由 5 ng/μL 或 200 ng/μL（50–500 ng 上样）储备液配制，分辨率与隔离窗口根据上样量进行优化（表 4）。每个上样量的 3 次重复进样数据合并后，分别使用 Spectronaut 软件和 DIA-NN 软件进行处理。

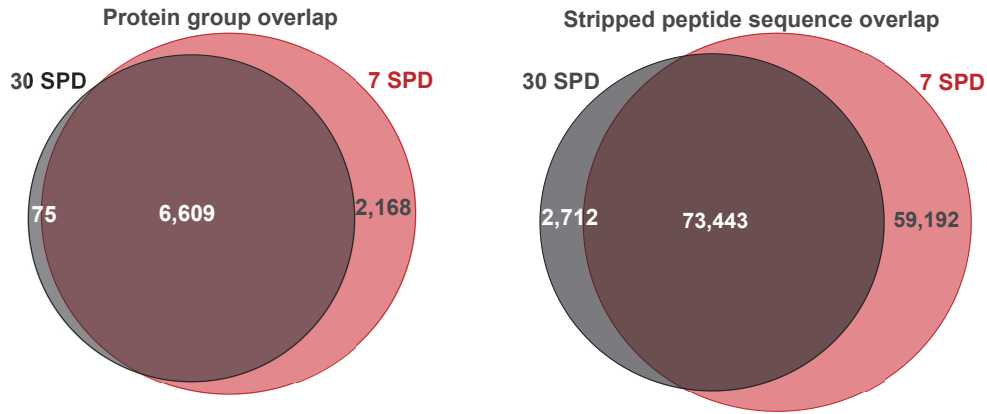


图 3. 长梯度扩展蛋白质组覆盖同时保留核心蛋白质组。维恩图显示 30 SPD 与 7 SPD (进样间隔) DIA 采集中鉴定的蛋白组 (左) 与肽段 (右) 重叠度 (每组 n=3)。每组数据合并用 Spectronaut 软件处理。短梯度检测到的绝大多数蛋白与肽段在 7 SPD 数据集中均被鉴定; 长梯度可额外鉴定更多低丰度蛋白组与肽段。

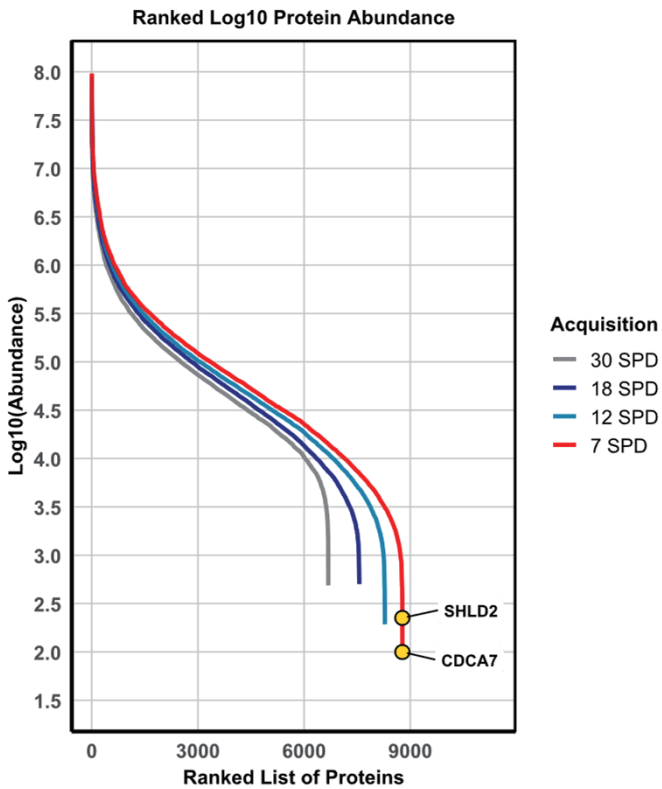
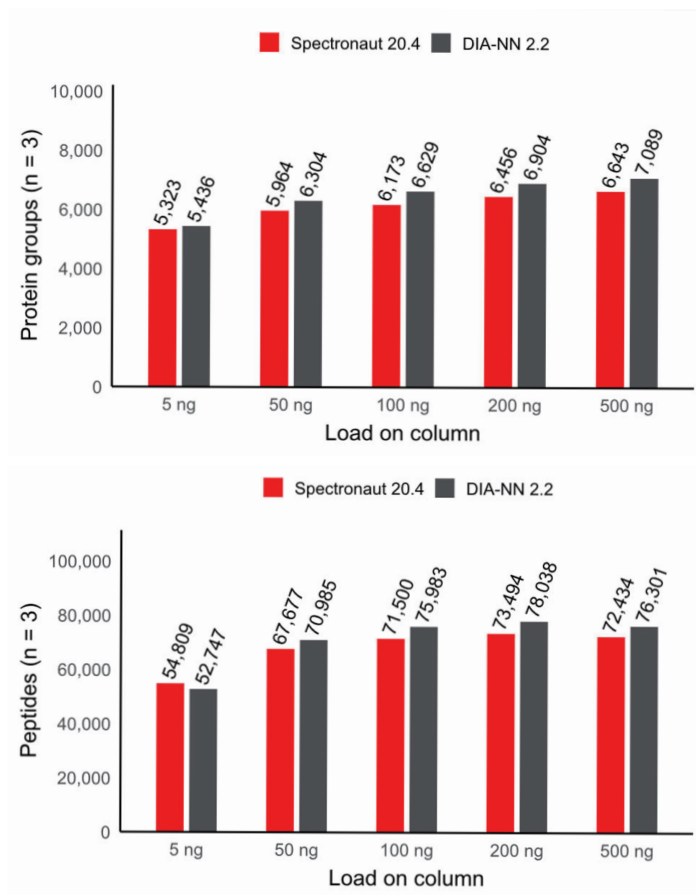


图 4. 不同采集速度下蛋白组丰度的动态范围。采用 30 SPD - 7 SPD 梯度进行 DIA 采集所得的 log10 蛋白组丰度排序结果 (每个条件 n=3)。每个条件下的数据 3 针合并后使用 Spectronaut 软件进行处理。更长的梯度扩展了对低丰度蛋白的检测能力, 其中 7 SPD 方法实现了超过五个数量级的动态范围。图中高亮显示的蛋白为仅在 7 SPD 梯度条件下鉴定到的最低丰度蛋白。

如图 5 所示, 蛋白与肽段鉴定数量均随样品上样量增加而稳步提升。5 ng 上样量条件下, 鉴定到 5,323 个蛋白组和 54,809 条肽段。当上样量增加到 50 ng 时, 鉴定结果提升至 5,964 个蛋白组和 67,677 条肽段; 在最高评估上样量 500 ng 条件下: Spectronaut 软件鉴定到 6,643 个蛋白组和 72,434 条肽段。这些结果表明, Orbitrap Excedion 质谱仪可在超过三个数量级的样品上样范围内实现良好的可扩展性, 并且在所有数据分析平台中均观察到一致的性能趋势。

除鉴定深度外, 研究还通过计算各浓度下蛋白组丰度的变异系数 (CV) 评估定量重现性 (图 6)。所有上样量的蛋白水平中位 CV 均低于 8%; 50 ng 及以上时低于 3.3%。此外, 所有上样量下至少有 88% 的定量蛋白组 CV 低于 20%, 表明系统在整个梯度稀释系列中均具有稳定的色谱性能、高效离子传输能力以及稳定一致的 DIA 采集性能。



综上所述，这些结果表明，Orbitrap Excedion 质谱仪能够在宽范围样品输入条件下提供稳健且可扩展的蛋白质组深度，支持全面的蛋白质组表征。

FAIMS 提升蛋白质组覆盖度

在 HeLa 系列稀释样品中评估 FAIMS Pro Duo 离子淌度对蛋白质组覆盖度提升效果。将未使用 FAIMS Pro Duo 采集的数据与使用 FAIMS Pro Duo、补偿电压为 -45 V 的数据进行比较。

在整个稀释系列样品中，FAIMS 均持续提升蛋白质组覆盖度（图 7）。其中，在低上样量条件下，覆盖提升幅度最为显著；随着样品上样量增加，相对提升比例逐渐降低。即使在 500 ng 上样量下，根据不同数据处理软件，蛋白质组鉴定数约提高 6% - 7%。值得强调的是，FAIMS 并未损失高上样量条件下的性能，全条件下均实现鉴定深度稳步提升。

综上所述，这些结果表明，FAIMS Pro Duo 可在宽动态范围内提升蛋白质组覆盖度。

图 5. 36 SPD 通量下不同 HeLa 上样量（无 FAIMS）条件下的蛋白组和肽段鉴定结果。在未使用 FAIMS Pro Duo 离子淌度的 Orbitrap Excedion 质谱仪上，对 5 - 500 ng HeLa 标准酶解物进行三次重复分析所得的蛋白质组和肽段鉴定结果。对于每个上样量，三次重复运行的数据合并后，分别使用 Spectronaut 软件和 DIA-NN 软件进行处理。肽段和蛋白质组鉴定结果均按照 1% FDR 进行过滤。在所有数据分析平台中，鉴定深度均随样品上样量增加而提高。

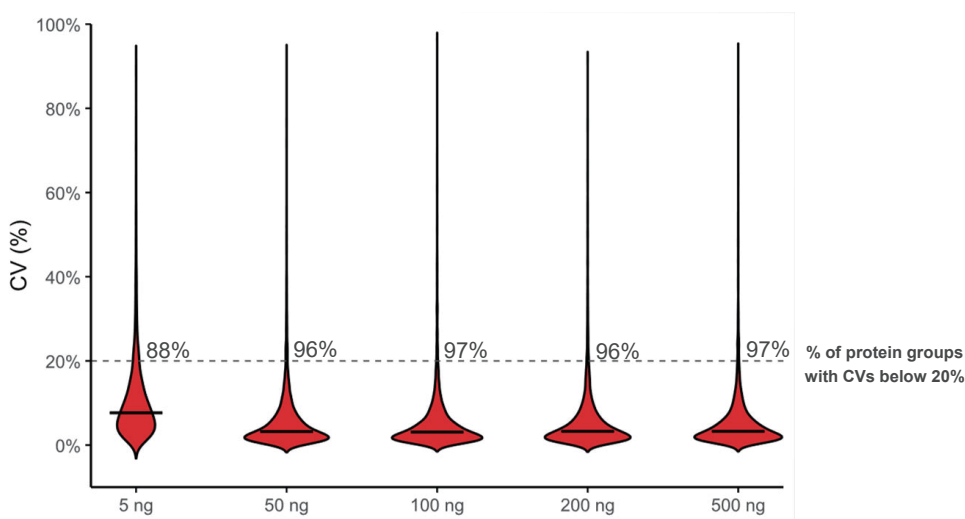


图 6. 不同 HeLa 上样量下的定量精密度。5 - 500 ng HeLa 标准酶解物上样量条件下蛋白质组丰度的变异系数（CV，%）。小提琴图表示每个浓度三次重复分析的 CV 分布，黑线为中位 CV 值。数据使用 Spectronaut 软件进行处理。中位 CV 低于 8%。虚线表示 20% CV 阈值。各分布上方的百分比表示 CV 值低于 20% 的蛋白质组所占比例；在所有上样量条件下，该比例均至少为 88%，表明在宽动态范围的样品输入下具有良好的定量重现性。

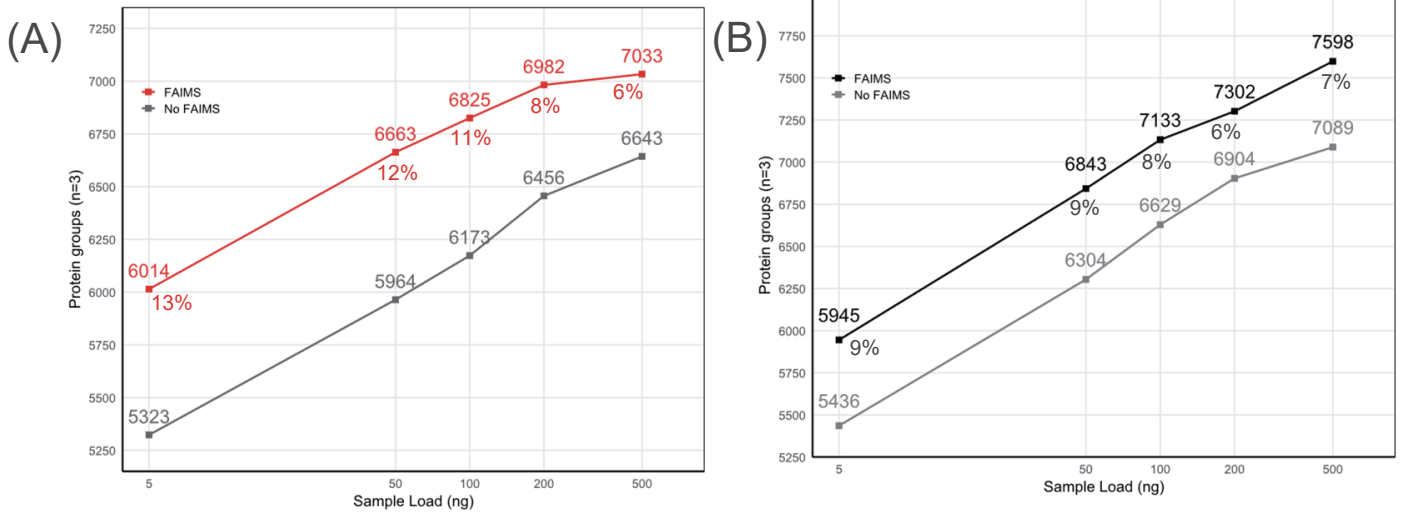


图 7. 不同 HeLa 上样量下 FAIMS Pro Duo 的评估。在 Orbitrap Excedion 质谱仪上，以 36 SPD 通量对 5 – 500 ng HeLa 标准酶解物进行采集，比较使用与不使用 FAIMS Pro Duo 时的蛋白组鉴定结果。每个上样量旁标注的百分比表示使用 FAIMS 相较于未使用 FAIMS 时蛋白鉴定数量的提升百分比。所有样品均进行三次重复分析；对于每个上样量，三次运行数据合并后，分别使用 (A) Spectronaut 软件或 (B) DIA-NN 软件进行处理。

结论

Orbitrap Excedion 质谱仪联用 Vanquish Neo UHPLC 系统与 μ PAC Neo Plus HPLC 色谱柱，可在宽动态范围内实现稳健、可重复且可扩展的 DIA 蛋白质组研究。

- 在 36 SPD 条件下，对 5 – 500 ng HeLa 系列稀释样品进行分析时，所有数据分析平台中的蛋白鉴定数均随样品上样量增加而稳定提升。
- 在 500 ng 条件下，鉴定到超过 7,000 个蛋白组和 76,000 条肽段，蛋白水平中位 CV 约为 3%。
- FAIMS Pro Duo 进一步提升了覆盖深度，在所有上样量条件下均增加了蛋白鉴定数。
- 通量评估表明，该系统可实现深度蛋白质组表征。7 SPD 梯度条件下，蛋白组鉴定数超过 9,000，肽段鉴定数超过 145,000，动态范围接近六个数量级。
- 重叠分析证实，不同采集通量下核心蛋白质组保持一致，仅有 < 2% 的鉴定结果为单次分析独有，表明梯度条件之间具有良好的重复性。

- 延长色谱梯度所新增的鉴定数量，并非替换原有核心蛋白组，而是实现了更多低丰度蛋白的有效检出。

综合而言，Orbitrap Excedion 质谱平台能够提供高度可扩展、稳健且灵活的 DIA 采集能力，为高重复性蛋白质组表征研究提供可靠支持。

参考文献

- Stadlmann, J.; Hudecz, O.; Krššáková, G. et al. Improved Sensitivity in Low-Input Proteomics Using Micropillar Array-Based Chromatography. *Anal. Chem.* **2019**, 91(22), 14203–14207. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.9b02899>
- Hoch, D.G.; Stucchi, R.; op de Beeck, J.; et al. Thermo Scientific Technical Note TN002688: Unleashing the power of DIA acquisition on an Orbitrap Exploris 240 mass spectrometer – precise and accurate quantitation at 260 SPD. <https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Technical-Notes/tn-002688-lsms-ht-dia-acquisition-orbitrap-exploris-240-tn002688-na-en.pdf>
- Zheng, R.; Pynn, C.; Sun, X.; et al. Thermo Scientific Technical Note TN74152: Vanquish Neo UHPLC system sets new performance standards for nanoLC-MS bottom-up proteomics. <https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Technical-Notes/tn-74152-lc-nanolcms-bottomup-proteocs-tn74152-en.pdf>

了解更多信息，请访问 [thermofisher.com/orbitrapexcedion](https://www.thermofisher.com/orbitrapexcedion)

通用实验室设备——不用于诊断程序。根据产品文件、手册与标签，赛默飞世尔科技™ 通用实验室设备、耗材与软件不用于体外诊断用途。仅用于通用实验室研究。不用于诊断流程。这些产品未针对诊断应用测试或验证；用于体外诊断可能导致结果不准确，更严重时可能带来健康与安全风险。产品设计与预期用途为科研、学术与工业用途。

©2026 赛默飞世尔科技公司。保留所有权利。所有商标归赛默飞世尔科技及其子公司所有，另有注明除外。Spectronaut 为 Biognosys AG 商标。Rstudio 为 Posit Software, PBC 商标。本信息仅作为赛默飞产品性能示例。无意以任何侵犯他人知识产权的方式鼓励使用本产品。规格、条款与价格如有变更，恕不另行通知。并非所有产品在所有国家均有售。详情请咨询当地销售代表。TN004568-EN 0526S



赛默飞
官方微信



赛默飞色谱
与质谱中国

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.cn

ThermoFisher
SCIENTIFIC