

蛋白质组学

基于 Orbitrap Excedion 质谱仪实现高精度、高准确度无标记定量蛋白质组学研究

作者

Mikayla Shanafelt¹、Jolene M. Duda¹、Brett Larsen²、Joshua Kline¹、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, 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)、定量蛋白质组学、高分辨精确质量 (HRAM)

研究目的

本研究旨在验证 Thermo Scientific™ Orbitrap™ Excedion™ 二合一质谱在数据非依赖采集 (DIA) 工作流程中的高准确度与高精密度定量能力, 同时在不同通量条件下保持深度蛋白质组覆盖和稳定、可重复的分析性能。

引言

DIA 质谱技术已成为定量蛋白质组学的主流研究手段, 能够在大量样本队列研究中实现肽段稳定检出, 并显著提升数据完整性。当前各科研实验室越来越依赖无标记定量 (LFQ) 研究复杂生物体系, 对质谱定量性能的要求也在持续提高。当前的蛋白质组学工作流程不仅需要实现深度蛋白质组覆盖, 还需要具备高定量准确度、低数据波动性, 并能够满足不同通量条件下的稳定分析需求。

要实现该性能, 需要高分离度且高重现性的色谱系统、高效离子传输、高分辨质谱分析能力与快速扫描速度等能力之间的协同配合。即使质量准确度、动态范围或谱图质量出现轻微下降, 也可能影响比值保真度并增加定量变异, 尤其是在检测微小丰度差异或开展高通量研究时更为明显。

全新推出的 Orbitrap Excedion 质谱仪专为应对定量蛋白质组学不断发展的需求而设计。基于成熟的四极杆 -Orbitrap 架构, Orbitrap Excedion 质谱仪具备超高灵敏度、运行稳定性与高分辨检测一致性, 完美适配 DIA 全套分析流程。这些性能既可支持深度覆盖的发现型实验, 也能够满足大规模比较研究中对可靠、可重复定量的需求。

本文通过对人源 (HeLa)、大肠杆菌、酵母菌酶解蛋白构建三组分蛋白质混合物进行 DIA 分析, 系统评估 Orbitrap Excedion 质谱仪的定量准确度与精密度。该实验设计可在保持背景复杂度恒定条件下, 精准评估既定动态区间内定量比值的真实可靠性。本研究在不同通量条件和不同上样量下考察仪器性能, 以覆盖高灵敏度分析和高通量分析等应用场景。研究结果表明, Orbitrap Excedion 质谱仪可实现稳定、可重复的肽段与蛋白质定量, 并具有较低的比值偏差和变异系数, 是无标记定量蛋白质组学领域全新高性能分析平台。

实验部分

推荐耗材

- Fisher Chemical™ Optima™ 含 0.1% 甲酸水溶液 (货号 LS118-500)
- Fisher Chemical™ Optima™ 80% 乙腈水溶液(含 0.1% 甲酸, 货号 LS122-500)
- Fisher Chemical™ Optima™ LC-MS 级甲酸 (≥ 99.0%, 货号 A117-50)
- Fisher Chemical™ Optima™ LC-MS 级水 (货号 10505904)
- Fisher Chemical™ Optima™ LC-MS 级乙腈 (货号 A955-1)
- Fisher Chemical™ Optima™ LC-MS 级异丙醇 (货号 A461-212)
- Thermo Scientific™ SureSTART™ 微量进样瓶 (货号 60180-1655)
- Thermo Scientific™ SureSTART™ 螺旋盖 (货号 6PSC9STB1)

样品

- ProTec Diagnostics 物种混合 HYE 酶解物 A (货号 SmixDA_1)
- ProTec Diagnostics 物种混合 HYE 酶解物 B (货号 SmixDB_1)

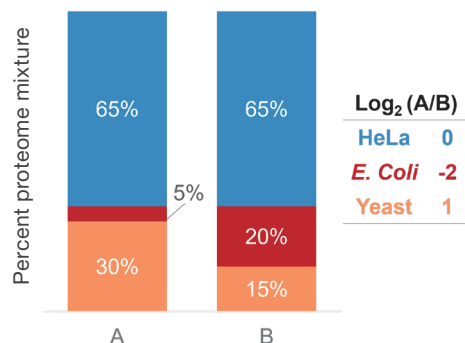


图 1. 样品混合物 A 与 B 中各蛋白质组占比柱状图, 及基于混合物组成的理论 Log₂ 比值。

液相色谱柱及配件

- Thermo Scientific™ μPAC™ Neo Plus 色谱柱, 50 cm (货号 COL-UPAC050NAN)
- Thermo Scientific™ EASY-Spray™ 喷针, 内径 10 μm (货号 ES993)
- Thermo Scientific™ μPAC™ Neo Plus 电压隔套, 10 μm × 60 mm (货号 ACC-VSP1006)
- Thermo Scientific™ μPAC™ Neo 接地线 (货号 ACC-GRNDC)
- Sonation 实验室 μPAC™ Neo 纳流色谱柱柱温箱 (货号 PRSO-V2-PF)

仪器设备

- Thermo Scientific™ Vanquish™ Neo 超高效液相系统 (货号 VN-S10-A-01)
- Orbitrap Excedion 质谱仪 (货号 BRE725573)
- Thermo Scientific™ EASY-Spray™ 离子源 (货号 ES081)

数据分析软件

- Biognosys Spectronaut® 20.4 版软件
- Aptila DIA-NN 软件, 企业版 2.2.0

DIA workflow



图 2. 基于 Orbitrap Excedion 质谱仪的无标记定量 DIA workflow 示意图。

液相色谱 - 质谱分析

样品采用 Vanquish Neo UHPLC 与 Orbitrap Excedion 质谱仪联用, 通过 DIA 模式进行分析。肽段分离在 50 cm μ PAC Neo Plus 色谱柱上完成。流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水溶液, 流动相 B 为含 0.1% 甲酸的 80% 乙腈水溶液。色谱梯度基于上述流动相体系构建。所有实验中, 样品 A 与样品 B 均设置三次技术重复。详细的液相色谱条件与梯度程序见表 1, 离子源参数与 DIA 扫描设置见表 2。

液相色谱 - 质谱数据处理与分析

本研究采用 Spectronaut 与 DIA-NN 两款专业软件对 DIA 数据进行分析。除特殊说明外, 两款软件均采用其推荐的 DIA 数据处理默认参数进行分析。所有数据使用 UniProt 中包含人 (*Homo sapiens*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 蛋白序列参考数据库进行检索。在适用情况下, 各平台间的检索参数保持一致, 以确保肽段和

表 1. 液相方法参数。

液相方法参数	
进样 workflow	直接进样模式
自动进样器温度	7 °C
柱温	50 °C

色谱柱规格	
内径、长度	75 μ m, 50 cm
最大压力	450 bar
最大流速	1.0 μ L/min
最高温度	60 °C

快速上样与平衡设置	
上样模式	压力控制
上样 / 平衡压力	435 bar
上样体积	1 μ L
平衡因子	1.0

96 SPD			48 SPD			24 SPD			12 SPD		
Time, min	Flow, μ L/min	%B	Time, min	Flow, μ L/min	%B	Time, min	Flow, μ L/min	%B	Time, min	Flow, μ L/min	%B
0	0.75	3	0	0.75	3	0	0.75	3	0	0.75	3
0.1	0.7	6	0.5	0.5	6	0.5	0.3	6	1.5	0.2	6
5.6	0.7	22.5	18.8	0.5	22.5	44.0	0.3	30	96.5	0.2	27
7.3	0.7	90	22.0	0.5	90	52.0	0.3	90	112.0	0.2	90
7.4	0.75	99	22.1	0.75	99	52.1	0.75	99	112.1	0.75	99
9.3	0.75	99	24.0	0.75	99	54.1	0.75	99	114.0	0.75	99

蛋白质鉴定结果具有可比性。肽段前体离子和蛋白质组均按照 1% FDR 进行过滤。各软件平台生成的定量结果, 用于评估鉴定深度、比值准确度和重现性。下游统计分析 with 数据可视化采用 RStudio™ (2025.05.1 Build 513) 和 R (v4.4.2) 软件完成。

结果与讨论

本研究采用含人、大肠杆菌及酵母酶解蛋白的三组分蛋白质混合物, 通过控制配比构建标准样本, 在不同上样量与样本通量条件下开展 DIA 分析, 系统评估 Orbitrap Excedion 质谱仪的定量性能。该实验设计可在复杂但定义明确的无标记定量 workflow 中, 同时实现对蛋白质组覆盖度、定量比值准确度及数据重现性的综合评价。在所有测试条件下, Orbitrap Excedion 质谱仪均能产出高质量 DIA 数据, 同时支撑深度蛋白质组分析与稳定可靠的定量检测。

如预期所示, 随着上样量增加和色谱梯度延长, 蛋白质组覆盖度同步提高。在最高上样量 500 ng、12 样本 / 天 (SPD) 通量条件下, 可从三组分蛋白质组混合物中定量近 12,000 个蛋白质和超过 126,000 条肽段。即使在最快分析方法条件下, 即 96 SPD、梯度时长不足 10 分钟时, 仍可定量 5,657 个蛋白质, 表明该平台在高通量条件下依然具备良好的鉴定性能 (图 3)。综合上述结果表明, Orbitrap Excedion 质谱仪能够在不同上样量和梯度时长条件下实现深度蛋白质组覆盖。

表 2. 质谱方法参数。

质谱全局参数		质谱与 DIA 方法参数	
应用模式	肽段	归一化 AGC 目标	MS ¹ : 300%, MS ² : 800%
喷雾电压	2,000 V	MS ² 扫描范围 (m/z)	145 – 1450
离子传输管温度	275 °C	最大注入时间模式	自动 (MS ¹ 与 MS ²)
EASY-IC	运行开始时校准	窗口重叠	0 m/z
高级峰判定	开启	RF 透镜	40%
默认电荷数	2	归一化 HCD 碰撞能量	28%

	5 ng load	50 – 500 ng load
96 SPD Gradient: 9.3 min	Resolution MS ¹ /MS ² – 60,000/22,500 Precursor scan range (m/z) – 525–800 Isolation window – 35 m/z	Resolution MS ¹ /MS ² – 60,000/22,500 Precursor scan range (m/z) – 525–800 Isolation window – 35 m/z
48 SPD Gradient: 24 min	Resolution MS ¹ /MS ² – 90,000/45,000 Precursor scan range (m/z) – 400–800 Isolation window – 50 m/z	Resolution MS ¹ /MS ² – 60,000/22,500 Precursor scan range (m/z) – 400–800 Isolation window – 22 m/z
24 SPD Gradient: 54 min	Resolution MS ¹ /MS ² – 120,000/60,000 Precursor scan range (m/z) – 400–800 Isolation window – 50 m/z	Resolution MS ¹ /MS ² – 60,000/30,000 Precursor scan range (m/z) – 400–800 Isolation window – 14 m/z
12 SPD Gradient: 114 min	Resolution MS ¹ /MS ² – 120,000/90,000 Precursor scan range (m/z) – 400–800 Isolation window – 50 m/z	Resolution MS ¹ /MS ² – 60,000/30,000 Precursor scan range (m/z) – 400–800 Isolation window – 14 m/z

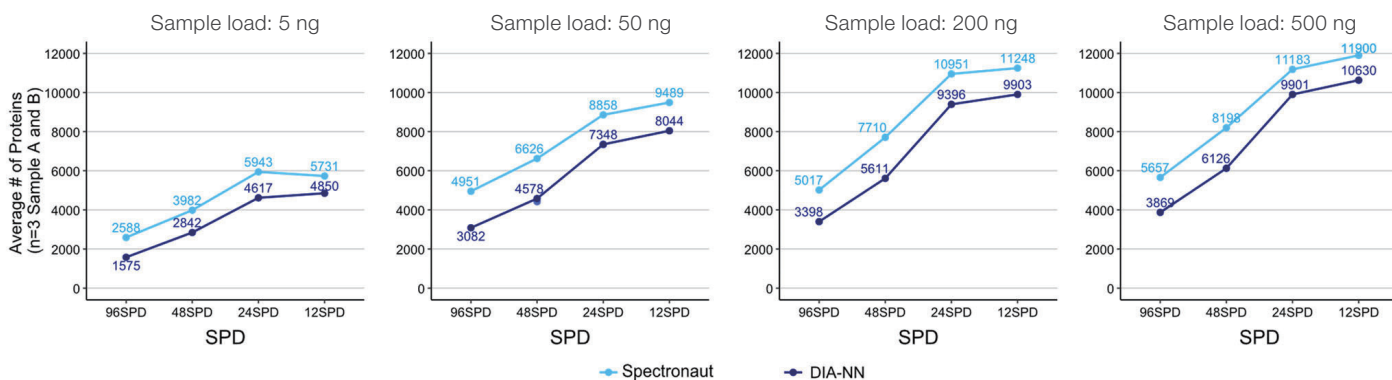


图 3. 在 5/50/200/500 ng 上样量与 96/48/24/12 SPD 通量下，样品 A、B 三次重复中 1% FDR 阈值下鉴定的蛋白质组。

定量准确度与精密度

除了优异的蛋白质组覆盖深度外，Orbitrap Excedion 质谱仪在全数据集中展现出卓越的定量准确度。本研究采用蛋白组混合比例明确的 A、B 样本，为各物种蛋白质组提供了可预期的丰度比值，可直接开展理论值与实测值的对比验证。在上样量 500 ng、12 SPD 通量条件下，人、酵母及大肠杆菌蛋白的实测 Log_2 比值与预期值高度吻合（图 4）。在所有上样量与通量条件下，实测与预期比值的平均百分比误差均低于 10%，充分证明该仪器在测试的动态范围内，可实现稳定可靠的无标记定量分析。

所有测试条件下，Orbitrap Excedion 质谱仪均展现出优异的定量精密度。重复分析结果表明，蛋白质与肽段的测量数据具有极高的重现性：全条件下蛋白质中位数变异系数（CV） $\leq 10\%$ ，肽段中位数 CV $\leq 18\%$ 。在 500 ng 上样量、12 SPD 条件下，蛋白质中位 CV $\leq 4\%$ ，凸显了高深度分析场景下的卓越稳定性。

综合上述结果，Orbitrap Excedion 质谱仪可在宽范围的采集速度与上样量条件下，支撑稳定、精准的 DIA 定量分析。

尤为关键的是，长梯度、高上样量条件下的优异定量性能，在高通量分析方法中同样得到了完整保留。尽管延长梯度与增加上样量可显著提升蛋白质组覆盖度，但在整个研究过程中，定量准确度与精密度始终保持稳定（图 5）。这种跨条件的性能一致性，对现代 DIA 工作流至关重要。实验室往往需要根据不同的实验目标，在通量、灵敏度与数据重现性之间实现平衡。

整体研究结果表明，Orbitrap Excedion 质谱仪将高深度蛋白质组覆盖与稳定可靠的 DIA 定量性能合二为一。在不同通量模式与上样量条件下，仪器均保持了低比值误差与紧凑的 CV 分布，可为复杂蛋白质组样本提供可靠的蛋白质相对定量结果。这些出色的性能表现，使 Orbitrap Excedion 质谱仪成为 LFQ 蛋白质组学领域，兼具通用性与可靠性的理想解决方案。

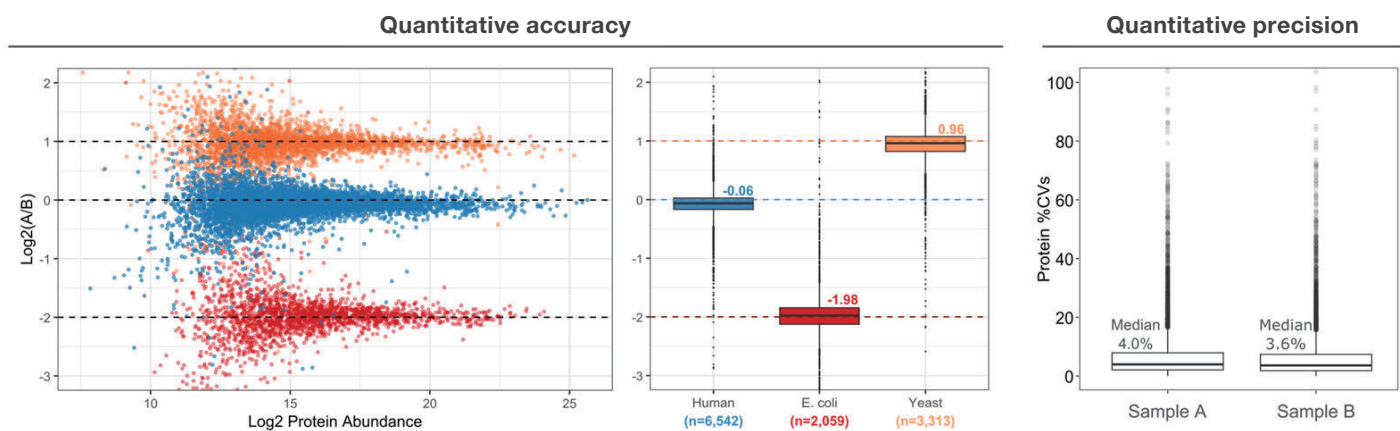


图 4. 500 ng 上样、12 SPD 条件下的定量准确度（散点图与箱线图）：三组分混合物 A、B 的理论比值（虚线）与实测比值对比（n=3）。定量精密度以蛋白质变异系数表示，中位 CV $\leq 4\%$ 。

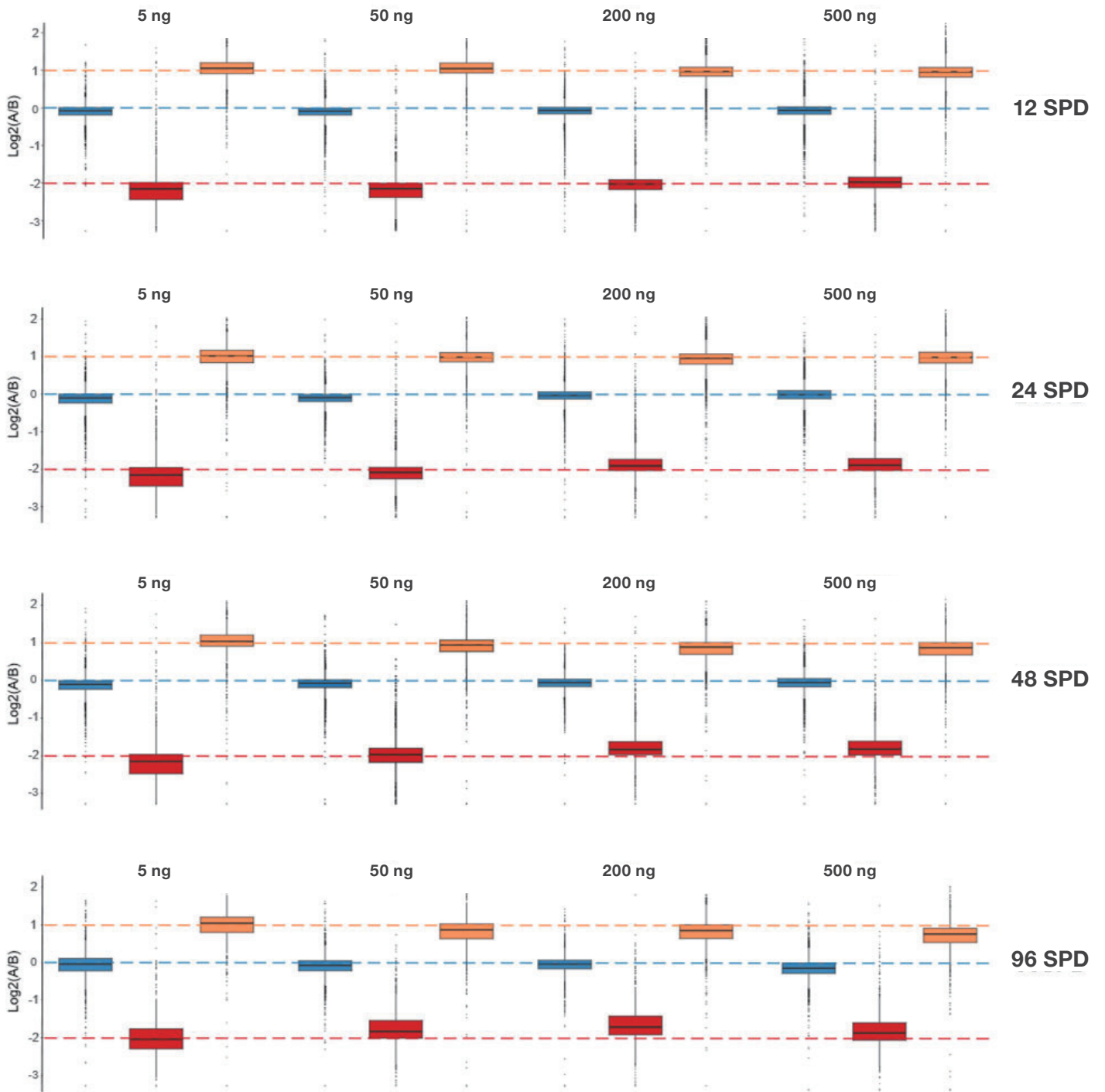


图 5. 所有上样量与通量下无标记定量的准确度。所有实测比值平均误差 $< 10\%$ ；所有蛋白质中位 $CV \leq 10\%$ ，肽段中位 $CV \leq 18\%$ 。

结论

- **全通量条件下均实现高深度蛋白质组覆盖:** 在 500 ng 上样量、12 SPD 低通量深度分析条件下, 可定量近 12,000 种蛋白质; 即使在 96 SPD 高通量快速分析条件下, 仍可定量 5,657 种蛋白质。
- **全条件下保持稳定的定量准确度:** 在所有上样量与样本通量条件下, 实测与预期蛋白质 Log_2 比值的平均百分比误差均低于 10%。
- **蛋白质与肽段水平均展现优异的定量重现性:** 所有测试条件下, 蛋白质中位数变异系数 (CV) $\leq 10\%$, 肽段中位数 CV $\leq 18\%$ 。

Orbitrap Excedion 质谱仪在宽范围上样量与样本通量条件下, 展现出卓越的 DIA 无标记定量蛋白质组学综合性能。

本研究采用配比受控的三组分蛋白质混合物进行验证, 结果表明该平台可同时实现高深度蛋白质组覆盖与优异的定量准确度、精密度, 为复杂生物样本提供可靠的蛋白质相对定量结果。凭借在样本通量、分析灵敏度与数据重现性之间的稳定平衡, Orbitrap Excedion 质谱仪使实验室能够灵活拓展 DIA 分析工作流, 满足多样化的定量蛋白质组学研究目标。

随着实验室研究需求的不断升级, Orbitrap Excedion 质谱仪让用户能够提前布局 Thermo Scientific™ 新一代 Orbitrap™ 技术, 同时保留清晰的内部升级路径, 可直接升级至 Thermo Scientific™ Orbitrap™ Excedion™ Pro 二合一质谱仪, 解锁更先进的碎裂模式、更快的采集速度与灵活性, 以及更丰富的定量分析工作流。

了解更多信息, 请访问 thermofisher.com/orbitrapexcedion

通用实验室设备 —— 不用于诊断程序。©2026 赛默飞世尔科技公司。保留所有权利。TN004610-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