

COIP-MS结题报告

项目名称: _____

客户单位: _____

客户姓名: _____

完成时间: _____

1.背景介绍

蛋白质之间相互作用渗透于机体每一个细胞的生命活动过程，生物学中会出现很多现象如复制、转录、翻译、剪切、分泌、细胞周期调控、信号传导和中间代谢等都受到蛋白质复合体调控。而复合体由多个蛋白质组成，蛋白质之间的相互作用就显得尤为重要[1]；然而蛋白质与蛋白质之间的相互作用十分复杂：有些蛋白质结合得十分紧密，而有些蛋白质却只有短暂的相互作用。可是不论出现哪些种情况，它们都控制着大量的细胞生命活动事件，比如细胞的增殖、分化和死亡。且通过蛋白质之间的相互作用，能改变细胞内蛋白质的动力学特征，比如底物结合特性、催化活性，也可以产生新的结合位点，对改变蛋白质对底物的特异性有作用，还可以使其他蛋白质失活和其他基因表达得到调控。因此，只有让蛋白质之间相互作用得以顺利进行，细胞的正常生命活动过程才会得到保障。正因为蛋白质之间相互作用具有如此重大的意义，所以它的检测方法的研究也备受关注与重视，自此以后蛋白相互关系的研究愈演愈烈。

定量蛋白质组学（Quantitative Proteomics）是蛋白质组学研究领域最重要的应用之一。通过定量蛋白质组学技术，可以对样品之间的蛋白质水平的变化进行定量比较。比如，样品刺激前后、疾病与健康组或治疗组、敲除或过表达菌株与野生型菌株等情况下蛋白质的相对定量分析都需要使用定量蛋白质组学技术。免疫共沉淀技术和蛋白质组学联用，可以验证蛋白复合物的存在，进而发现新的蛋白复合物，确定诱饵蛋白-目的蛋白在天然状态下的结合情况，确定特定蛋白质的新作用搭档。CoIP-MS是一个相对比较经典的筛选目的蛋白质得的互作蛋白的技术，在研究中应用范围广泛且可信度较高。

2.实验原理

抗体与细胞裂解液或表达上清中相应的蛋白结合后，再与蛋白A/G（Protein A/G）偶联的agarose或Sepharose珠子孵育，通过离心得到珠子-蛋白

A/G-抗体-目的蛋白复合物，在高温及还原剂的作用下，抗原与抗体解离，收集上清，上清中包括抗体、目的蛋白、互作蛋白和少量的杂蛋白。

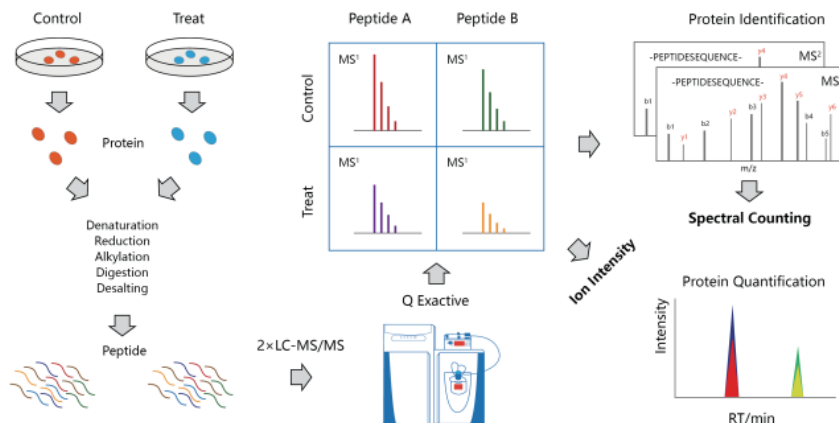


图2.1 coIP-MS实验原理图

3.实验目的

通过目的蛋白免疫共沉淀后，非标记定量蛋白质组学技术对不同样品间的蛋白进行相对定量比较，筛选差异表达的蛋白，并进行后续的生物信息学分析。

4.实验材料

4.1 主要仪器

名称	厂家	型号
电泳仪	Bio-rad	1658001
脱色摇床	Kylin-Bell	BETS-010
迷你金属浴	Monad	GT20701
全自动化学发光成像系统	Tanon	Tanon5200
全自动蛋白质免疫印迹杂交仪自动化western	Precision Biosystems	BlotCycler
eBlot™ L1 快速湿转仪	GenScript	L00686C
高速冷冻离心机	sigma	10020
超低温冰箱	Haier	DW-862-3383
四维旋转混合仪	Kylin-Bell	BE-1100
旋涡混合器	Kylin-Bell	VORTEX-KB3

质谱仪	Thermo	Orbitrap Astral
-----	--------	-----------------

4.2 主要试剂

名称	厂家	货号
Protease Inhibitor Cocktail	Roche	04693132001
IP Lysis Buffer	Thermo	87787
ExpressPlus™ PAGE Gel	GenScript	M42015C
SDS Sample Buffer(4x)	GenScript	M00676
PVDF膜	Millipore	IPVH00010
脱脂奶粉	Solarbio	D8340
TRIS	Solarbio	T8060
NaCl	国药	10019318
甲醇	国药	10014118
GFP-Nanoab-Agarose	Lablead	GNA-250-5K
Protein A/G Agarose	Yeaden	36403ES08
Anti-GFP (Ig mouse)	Roche	11814460001
Anti-Flag (Ig mouse)	MBL	M185-3L
Anti-MYC (Ig rabbit)	Abclonal	AE070
Anti-HA (Ig rabbit)	Abcam	Ab9110
HRP Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Abclonal	AS003
HRP Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)	proteintech	SA00001-2
Normal Rabbit IgG	cellsignal	2729
Normal Mouse IgG	cellsignal	68860
ColorMixed Protein Marker 180	Abclonal	RM19001
Tween-20	BBI	A600560
WesternBright ECL	advansta	K-12045
去内毒素质粒小量提取试剂盒	biorun	REC01B-50

4.3 样本材料

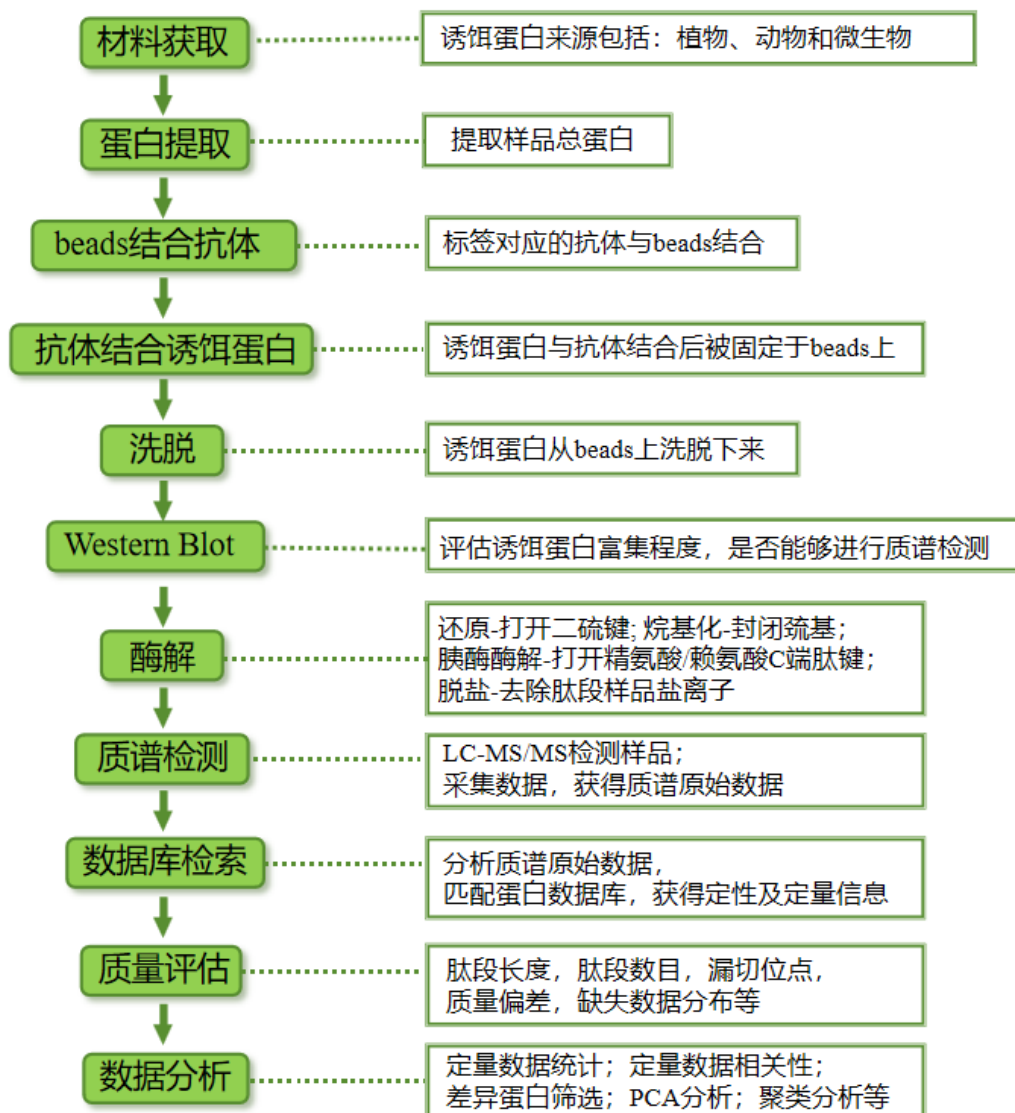
实验方案设计组如下：

对照组	实验组
GFP	A-GFP

收样注意事项：

- (1) 动物组织：单个样品>0.5 g；
- (2) 贴壁/悬浮细胞：贴壁细胞 $\geq 10^7$ 个，悬浮细胞 ≥ 50 mL；
- (3) 种子：单个样品>1 g；
- (4) 植物组织：单个样品>2 g，所有样品确保新鲜；
- (5) 抗体：按照本种属提供满足相应实验要求的抗体，并提供抗体说明书；标签抗体我司可以提供。
- (6) 寄送要求：按照抗体说明书要求寄送，确保足够的量。

5. 技术路线



6. 实验步骤

6.1 材料准备

烟草叶片准备

(1) 在超净工作台中，将1 ug带有目的基因的瞬转载体，加入40 ul感受态细胞中混匀，加入电击杯中，电击杯放入电转仪中电转一下，立即取出加入到200 ul液体LB培养基中混匀；

(2) 电转后的溶液在28℃培养1h，涂到相应抗性的固体培养基菌板上，密封后倒置培养1-2d；

(3) 将固体培养基上的GV3101农杆菌收集到农杆菌侵染液中，混匀后在30℃活化30min；

(4) 用农杆菌侵染液将农杆菌OD₆₀₀调至0.6-1.0，注射1月左右状态良好的烟草叶片；

(5) 2-3d左右摘取烟草叶片速冻后，-80℃保存。

种子发苗

客户提供的种子发苗，取10d左右的幼苗速冻后，-80℃保存。

组织蛋白提取

(1) 取适量组织样本，用消毒的剪刀尽量剪碎于灭菌后的预冷研钵中，放入液氮中研磨至粉末；

(2) 收集1g粉末转移到洁净5 ml EP管中，加入600 ul含有Protease Inhibitor Cocktail (1x) (临用前加入)的IP Lysis Buffer，涡旋混匀成匀浆状态；

(3) 冰浴静置30 min，每10 min涡旋一次，15s/次；

(4) 用高速冷冻离心机离心10 min，4℃，15000 r/min，取上清，重复离心再次取上清即为总蛋白，-80℃保存备用。

原生质体转染

(1) 用质粒小量提取试剂盒提取高纯度高浓度的质粒备用；

(2) 取适量的酶解液于洁净的锥形瓶中，选合适的植物组织部位，切成合适大小投入酶解液中，酶解3-4h；

(3) 用40um滤网过滤，所得溶液4°C 600rpm离心5min，弃上清；

(4) 用W5溶液洗涤3次，再加入适量W5溶液重悬于原生质体；

(5) 加入适量MMG溶液，轻柔混匀，静置5-8min；

(6) 将共转的质粒按比例混好后，按10ul质粒：100ul原生质体的比例将质粒和原生质体混匀，再加入等体积的PEG4000溶液（现配），轻柔混匀，静置5-8min，让质粒进入原生质体；

(7) 加入适量W5溶液终止转染，4°C800rpm离心2min，弃上清，W5洗涤3次；

(8) 加入适量W5溶液重悬原生质体，暗培养12-36h后收集原生质体-80°C保存。

细胞培养及转染

复苏培养293T细胞至10cm细胞培养皿中，待细胞状态良好且密度达到70%左右，加入10-15ug无内毒素的质粒和转染试剂lipo2000，继续培养48-72h收集细胞。

细胞蛋白提取

(1) 收集 10^7 细胞于1.5ml EP管中，加入600ul含有Protease Inhibitor Cocktail（1x）（临用前加入）的IP Lysis Buffer，涡旋混匀成匀浆状态；

(2) 冰浴静置30 min，每10 min涡旋一次，15s/次；

(3) 用高速冷冻离心机离心10 min，4°C，15000 r/min，取上清即为总蛋白，-80°C保存备用。

注意：蛋白提取整个过程都在冰上操作，减少高温造成的蛋白降解；若是磷酸化蛋白检测，提取液中需加磷酸酶抑制剂混合物。

6.2 免疫共沉淀CoIP

6.2.1 beads准备

(1) 将Protein A/G beads从4°C冰箱取出，上下颠倒混匀数次，使beads和溶液混合均匀，分别取40ul到2个洁净的1.5ml EP管中，标记上对应的名称；

(2) 加入0.5ml预冷的PBS重悬beads，500rpm 4°C离心1min，分离beads和溶液，用移液枪小心吸弃上清；

(3) 重复洗涤2次，共洗3次，最后加入30ul PBS重悬beads。

6.2.2 beads结合抗体

(1) 加入10ug目的抗体，室温静音混合1h；

(2) 500rpm 4°C离心1min，分离beads和溶液，用移液枪小心吸弃上清；

(3) 加入0.5ml预冷的PBS重悬beads，500rpm 4°C离心1min，分离beads和溶液，用移液枪小心吸弃上清；

(4) 重复步骤(3)2次，共洗涤3次。

6.2.3抗体结合诱饵蛋白

(1) 加入总蛋白液，4°C静音混合过夜（约16h）；

(2) 500rpm 4°C离心1min，分离beads和溶液，用移液枪小心吸弃上清；

(3) 加入0.5ml预冷的PBS，500rpm 4°C离心1min，分离beads和溶液，用移液枪小心吸弃上清；

(4) 重复步骤（3）4次，共洗涤5次。

6.2.4煮脱

(1) 加入45ul IP Lysis Buffer和 15ul SDS Sample Buffer（4x），100°C金属浴5min，15000rpm离心5min，取上清，记为IP组，-80°C保存备用；

(2) 取45ul总蛋白液，加入15ul SDS Sample Buffer（4x），100°C金属浴5min，记为Input组，-80°C保存备用。

6.3 WB检测

6.3.1上样电泳

将预制胶固定在电泳架上放入电泳槽中，倒入适量电泳缓冲液，将梳子轻轻从凝胶中竖直拔出。按照设定好的上样顺序依次往梳孔中加入样品，加

好后盖上盖子，接通电源，浓缩胶80V 30min，分离胶120V 60min，电泳时间可适当调整。

6.3.2转膜（湿转）

(1) 电泳完成后，将凝胶从玻璃板中取出，去掉浓缩胶，放入纯水中备用；

(2) 剪裁与分离胶相同大小的PVDF膜，PVDF膜做好标记放入甲醇中活化30S，放入平衡液中平衡；

(3) 在转膜夹的负极(-)，依次放入海绵、凝胶、PVDF膜、海绵（类似三明治结构），放PVDF膜后要用滚环赶尽气泡，使胶与膜完全贴合，“三明治”固定好放回快速湿转仪中，选择合适的程序，启动待运行结束即可进行抗体杂交。

注意：转膜时胶在负极，膜在正极，不能放反，接通电源时亦不能反，否则蛋白就转到滤纸上了；制作转膜三明治时，一定要赶尽气泡，否则有气泡的地方蛋白结合不到膜上，显影时会出现气泡。

6.3.3抗体杂交

转膜完成后，将膜从三明治中取出，放入PBS中洗涤5min，转入自动化western杂交仪中，在杂交仪对应的样品槽中加入合适的一抗、二抗和洗涤液，选择合适的程序，启动，等待运行结束即可曝光。

6.3.4曝光

取等体积ECL发光液A液与B液，混匀后避光保存备用。将膜从PBS中夹出用滤纸吸去多余水渍，放在曝光台上，蛋白面朝上，将混匀的发光液覆盖在整张膜上，先拍白光图，再拍荧光图，再将二者合并保存。

6.4 MS鉴定

6.4.1 样品处理

挖取SDS-PAGE中蛋白所在的区域，切成1 mm³左右的小块；加入双蒸水浸没胶块，震荡10分钟后，吸去洗液；用50%ACN/100 mM NH₄HCO₃（pH 8.0）溶液将胶块浸没，震荡10分钟，吸去洗液，重复该过程共三次；加

入100% ACN浸没胶块，震荡10分钟，吸去洗液，然后把胶块在真空抽干仪中抽干；向胶块中加入10 mM DTT/50 mM NH_4HCO_3 (pH 8.0) 溶液，56°C 孵育1h进行还原反应，之后吸去浸液；随后加入55 mM iodoacetamide/50 mM NH_4HCO_3 (pH 8.0) 溶液，置于室温、暗处反应30分钟，之后吸去浸液；加入100% ACN，震荡20分钟，吸去浸液，抽干胶块；向胶块中加入适量的胰蛋白酶，并补加50 mM NH_4HCO_3 溶液以完全覆盖胶块，37°C孵育过夜进行酶切；然后加入抽提液60% ACN/5% formic acid，超声波震荡10分钟，离心后吸取上清至新的离心管；重复抽提过程两次后，合并抽提液，在离心浓缩仪中抽干；使用C18小柱进行肽段除盐，冻存于-20°C等待上机检测。

6.4.2 质谱检测

质谱数据使用全新一代Orbitrap Astral高分辨率质谱仪串联Vanquish NEO液相的液质联用系统进行采集。肽段样品经过上样缓冲液溶解，由自动进样器吸入后结合至分析柱（150 μm *150 mm, C18, 2 μm , 100Å）进行分离。利用两个流动相(流动相A: 0.1% formic acid和流动相B: 0.1% formic acid, 80% ACN)建立14min分析梯度。液相的流速设置为1.8 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。质谱以DIA或DDA模式采集数据。

6.4.3 数据分析

质谱数据通过PD/Maxquant软件进行检索，检索使用的数据库是Uniprot中Human的蛋白质组参考数据库(2022-03-29，含20377条蛋白序列)。主要检索参数如下：可变修饰选Oxidation (M), Acetyl (Protein N-term)；固定修饰选Carbamidomethyl (C)；酶切选Trypsin/P；一级质谱匹配容差在初次检索中设置为10 ppm，主要检索中设置为3 ppm；二级质谱匹配容差设置为20 ppm。

7. 实验结果

7.1 WB结果

结论：A-GFP富集合格，可以进行质谱鉴定

7.2 数据质量评估

7.2.1 肽段长度分布

新一代Astral质谱MS1扫描范围通常为380 -980 m/z，肽段离子化后大部分电荷数为+2价(+3,+4...依次减少)，蛋白中氨基酸残基平均分子量约为110 Da，因此质谱检测到的肽段大部分位于7-27氨基酸。

本项目检测到的肽段长度分布如下图所示：

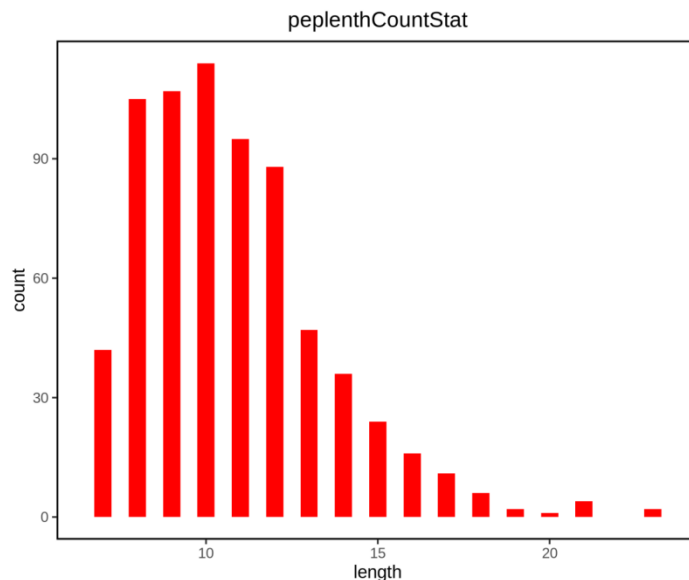


图7.2.1 肽段长度分布

横坐标表示鉴定到的肽段的氨基酸长度，纵坐标表示鉴定到的对应长度肽段的数量。

7.2.2 肽段数目分布

蛋白质组学常用的研究策略是“自下而上”的方式，即蛋白的信息来自于质谱直接检测的肽段信息。理论上每个蛋白包含多个可被检测的酶切肽段，但由于肽段长短、相对丰度、离子化效率等多方面的因素，导致支持每个蛋白的肽段数目有多有少。大规模的蛋白质组学数据中蛋白数据越多，通常该蛋白的相对丰度也越高，二者存在一定程度的正相关。肽段数目分布图统计的就是包含不同数目肽段的蛋白分布情况，多肽段的蛋白占比越高，表明蛋白质组学结果在蛋白层面更加可靠。

本项目检测到的肽段数目分布如下图所示：

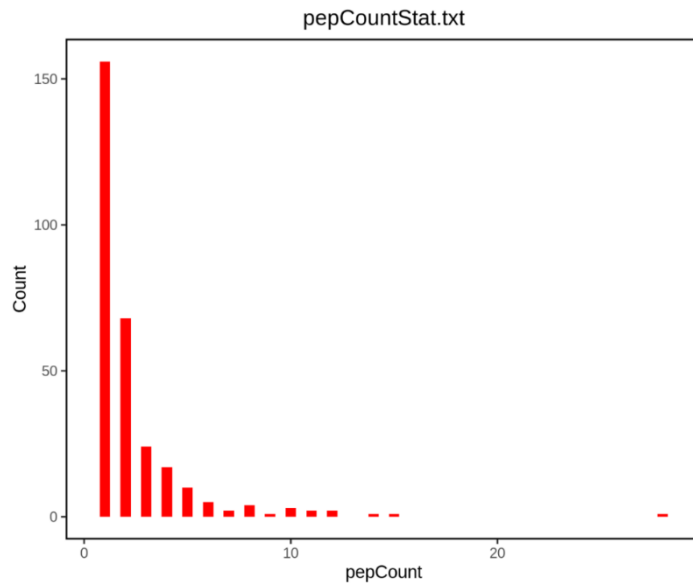


图7.2.2 肽段数目分布

横坐标表示肽段数，纵坐标表示包含相同肽段数的蛋白组的数目。

7.2.3 漏切位点分布

蛋白样品质谱检测前处理过程中，会以胰酶对蛋白进行酶解处理。胰酶会特异性的水解蛋白质中精氨酸和赖氨酸C端肽键，将完整蛋白酶解为不同长度的肽段以进行质谱检测。在某些情况下，如蛋白序列中有相邻精氨酸或赖氨酸、精氨酸或赖氨酸侧链存在翻译后修饰影响胰酶结合等情况，某些精氨酸或赖氨酸C端肽键将不会被胰酶酶解。正常情况下，检测到的肽段中大部分不存在漏切位点，少部分肽段会出现1个或2个漏切位点。如果存在漏切位点的肽段比例明显过高，则可能预示酶解过程中酶切效率较低。

本项目中检测到的肽段漏切位点如下图所示：

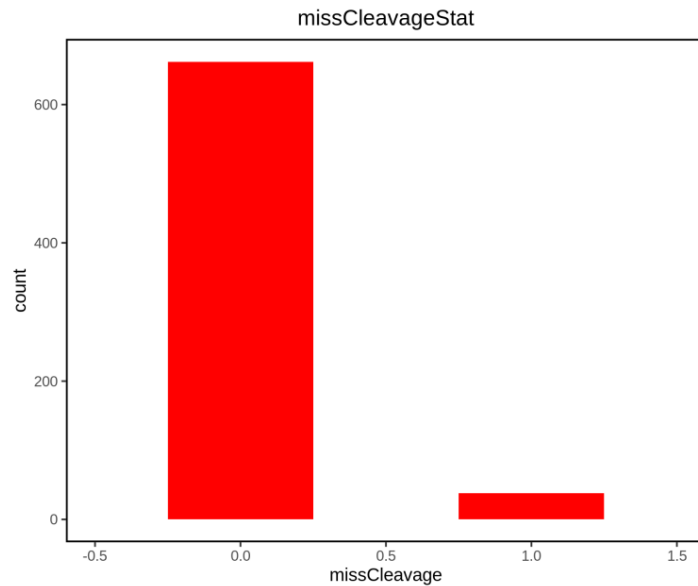


图7.2.3 漏切位点分布

横坐标表示肽段中漏切位点的数目；纵坐标表示漏切位点的肽段数目。

7.3 基础数据分析

7.3.1 蛋白定量数量

本项目的样品进行了质谱检测，蛋白和肽段母离子进行了统计。具体文件见./sup/02.qc 文件夹下面文件。

各样品鉴定到的蛋白和肽段母离子数目，统计如下图所示。

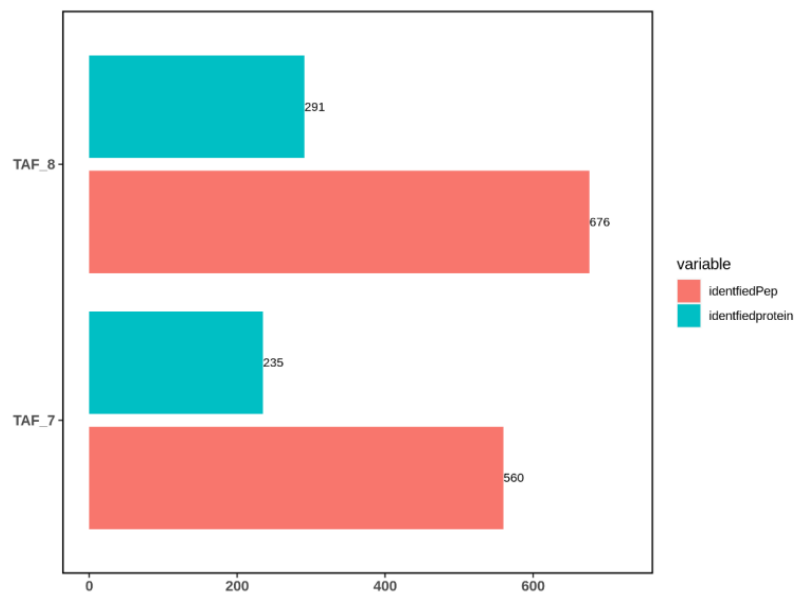


图7.3.1 样品概览图

纵坐标表示样品编号，横坐标表示对应样品中蛋白组、母离子(precursor)数目

7.3.2 定量数据相关性

根据各个蛋白的定量信息，计算样品两两之间的皮尔森相关系数(R)，可用于评估重复样品之间的定量重复性，以及不同组样品间的定量相关性。

本项目所有样品两两之间定量相关系数绘制热图如下所示。红色表示相关系数接近1，定量重复性和相关性好。

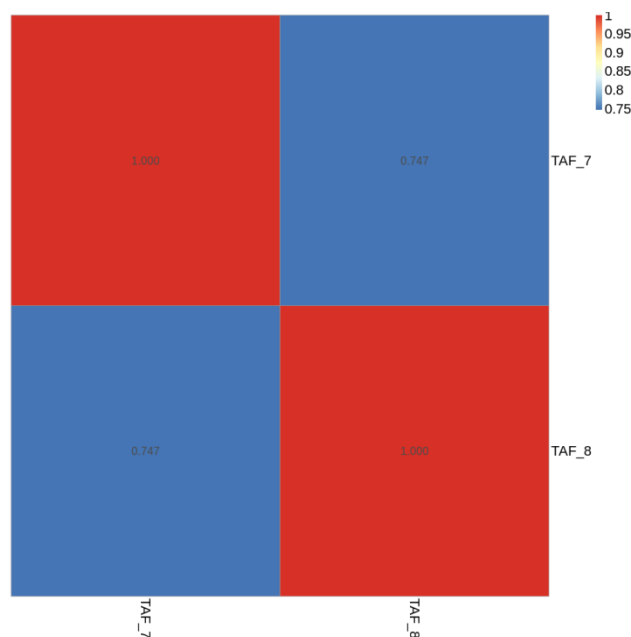


图7.3.2 定量蛋白相关系数分布图

横坐标与纵坐标均为样品编号，图中每个方格表示对应的两个样品间基于蛋白定量信息计算出的相关系数，颜色深浅表示相关系数大小。

7.3.3 差异蛋白筛选

通过对质谱原始数据进行数据库检索可获得各个肽段的检测信号强度，进而计算相应蛋白的定量信息。结果归一化处理之后，可对不同样品间的相同蛋白进行定量比较。根据样品分组，进行有效数据筛选和缺失数据填充之后，可根据蛋白定量数据计算各比较组样品中蛋白定量比值分布。理想情况下，大部分蛋白定量比值经log2转换后位于0附近，在不同组样品中定量接近。少数蛋白定量比值log2转换后偏离0较远，为不同组间的差异蛋白。

本项目中鉴定到的蛋白定量比值分布如下图所示：

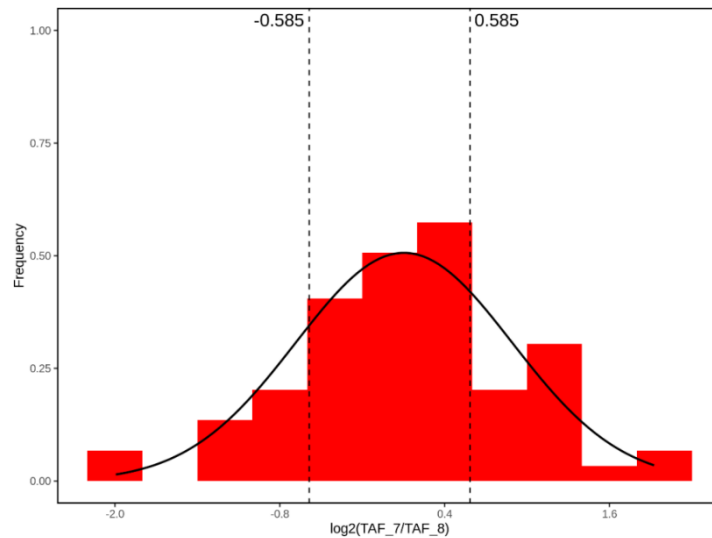


图7.3.3a 定量比值分布图

横坐标表示该比较组中各个蛋白定量比值的 $\log_2$ 数值，纵坐标表示对应比值的蛋白数量，虚线表示筛选差异蛋白时选择的定量比值阈值标准（经过 $\log_2$ 转换）。

本项目筛选出的差异蛋白统计如下表所示，详细信息参见./sup/04.diff表格。差异基因可以在STRING网站上进行互作网络分析。

表7.3.3b 差异蛋白统计表

Ratio name	Up (+)	Down (-)	Total diff
A5-GFP/GFP	129	79	208

7.3.4 PCA分析

PCA（Principal Component Analysis，主成分分析）是目前使用最广泛的一种降维分析方法。以蛋白的定量信息作为变量进行正交变换，将大量蛋白的定量信息转化为组变量绘制PCA主成分分析图，可通过数据空间分布的差异直观地展现不同样本之间的差异。空间分布差异越小，表示数据越接近。PCA分布图中每个点代表一个实验样本，并以不同颜色区分不同分组。重复性较好的实验，同一组内的不同样本应该聚集在一个相对集中的范围内，并可以与其他组的数据聚集区域区分开。

PCA分析可用于直观的展示各个样品的总体蛋白定量的相似性，检验不同实验组间的总体定量差异，评估和筛选组内定量异常样品。

本项目中根据差异蛋白定量详细绘制的PCA主成分分析图如下所示：

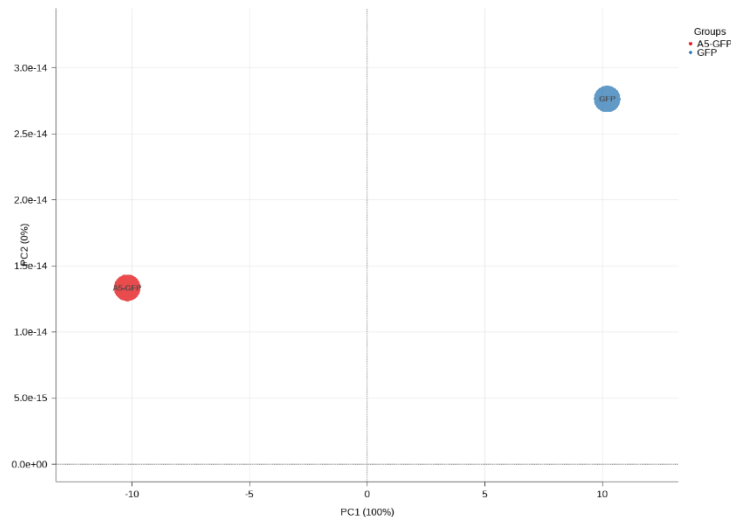


图7.3.4 差异蛋白PCA图

图中每一个点表示一个样品，样品颜色表示其分组；横纵坐标分别为以差异蛋白定量信息作为变量降维分析后的两项组变量。

7.3.5 聚类分析

层级聚类分析（**hierarchical clustering analysis, HCA**）是一种进行蛋白质组学数据挖掘的常用方法，根据各个样品中的蛋白表达谱，对蛋白或样品进行分类。层级聚类分析的主要流程为，根据定量信息计算不同蛋白之间的差异，依次将差异最小的蛋白归为一类，最终形成树型的蛋白聚类结构。通过层级聚类，辅助可视化处理手段，可用于观察蛋白之间的关系，如相同水平表达量、相似表达模式等。

本项目筛选出的所有差异蛋白的层级聚类分析结果如下图所示：每一列为一个样品，每一行为一个蛋白。

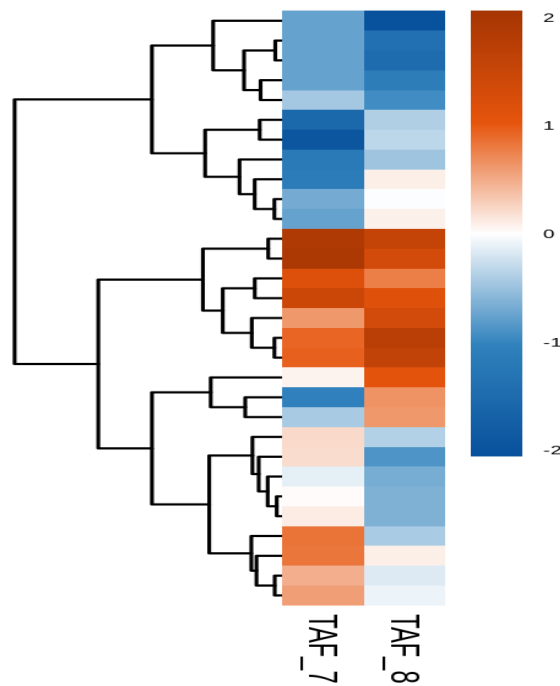


图7.3.5 差异蛋白聚类热图

横坐标表示样品编号，纵坐标表示蛋白；图中每一列表示一个样品，每一行表示一个蛋白，每一个色块表示对应样品中某个蛋白的定量信息，颜色深浅表示定量数值。

8.功能聚类分析

基因本体论（Gene Ontology）简称GO，是一个国际标准化的基因功能分类体系，包含生物学领域知识体系本质的表示形式，本体通常由一组类（或术语或概念）组成，分为3大类：分别是分子功能（Molecular Function, MF）、细胞组分（Cellular Component,CC）、生物过程（Biological Process,BP）。

京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes）简称KEGG，是系统分析基因功能、基因组信息的数据库，它整合了基因组学、生物化学以及系统功能组学的信息，有助于研究者把基因及表达信息作为一个整体网络进行研究。

使用peaks关联的基因进行GO和KEGG富集分析，研究的物种使用相关GO、KEGG注释数据库或利用blast，得到每个基因对应的GO term或KEGG pathway。根据结合峰相关基因注释信息，统计每个基因所在的GO term 或

KEGG pathway，根据每个GO term或KEGG pathway的基因数目，以及背景中此GO term或KEGG pathway的基因数目，用Fisher Exact Test分析每个GO term 或KEGG pathway的显著性。根据校正p-value和百分比作图进行展示前20的GO term 或KEGG pathway。

如果基因较少，部分图可能无法绘制或p-value不会很显著。

8.1 GO功能聚类

此部分是GO功能聚类的气泡图，不分CC，BP，MF。GO 功能聚类气泡图展示。纵坐标是GO Term名称，横坐标是对应GO Term中检出的基因占背景基因的个数，颜色代表显著性p-value。具体文件见./sup/05.gokegg/*_go文件夹下面文件。

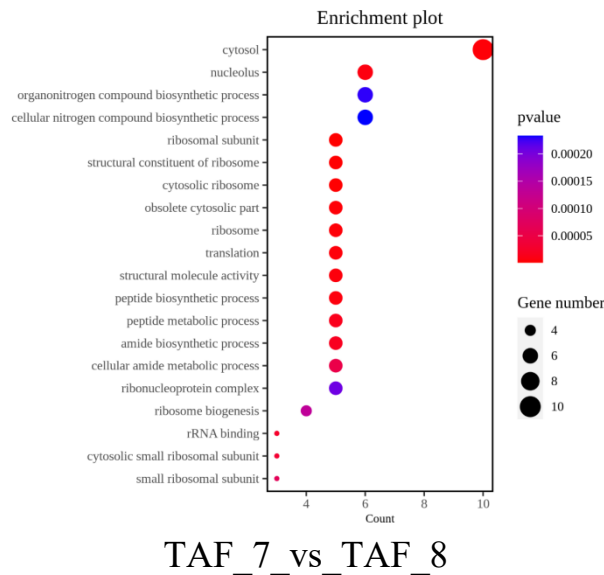
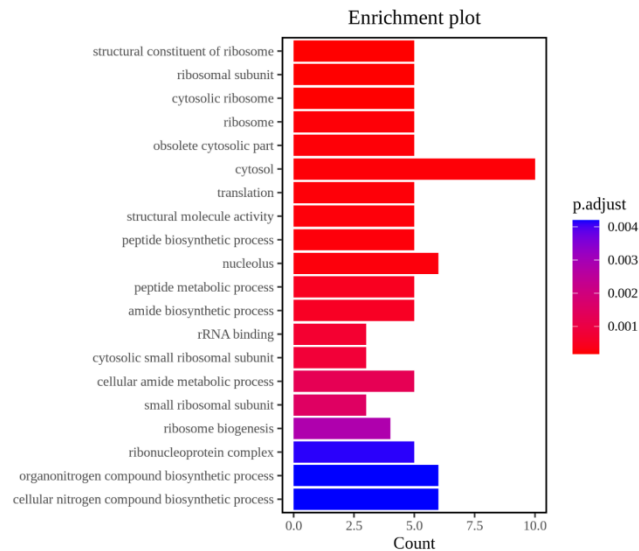


图8.1a GO功能聚类气泡图，不分CC，BP，MF

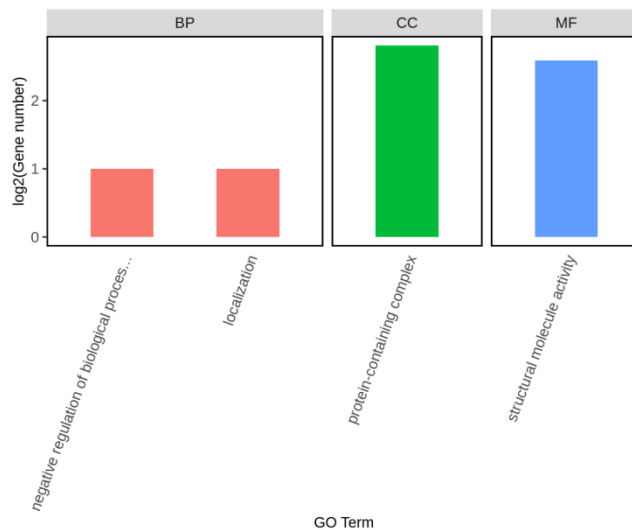
GO功能聚类不分CC，BP，MF的bar图展示。纵坐标是GO Term名称，横坐标是对应GO Term中检出的基因个数，颜色代表显著性p.adjust。



TAF_7_vs_TAF_8

图8.1b GO功能聚类bar图，不分CC，BP，MF

GO 功能聚类wego图展示。横坐标坐标是GO Term名称，纵坐标是对应GO Term中检出的基因个数，取对数。根据GO分成了3大类，分别是分子功能（Molecular Function，MF）、细胞组分（Cellular Component，CC）、生物过程（Biological Process，BP）。

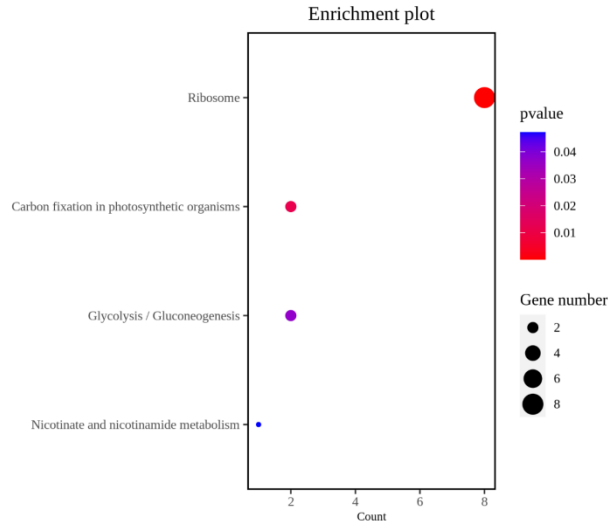


TAF_7_vs_TAF_8_go

图8.1c GO功能聚类wego图

8.2 KEGG 功能聚类

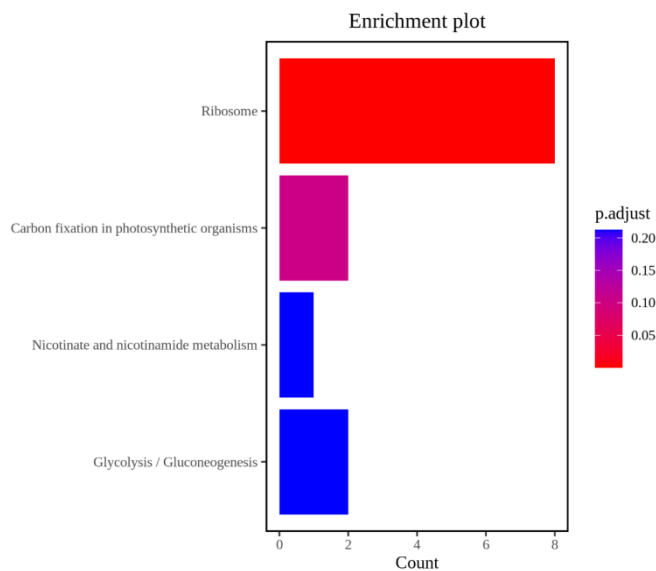
KEGG功能聚类气泡图展示。纵坐标是KEGG pathway名称，横坐标是对应KEGG pathway中检出的基因占背景基因的个数，颜色代表显著性p-value。具体文件见./sup/05.gokegg/*_kegg 文件夹下面文件。



TAF_7_vs_TAF_8

图8.2a 功能聚类气泡图

KEGG功能聚类bar图展示。纵坐标是KEGG pathway名称，横坐标是对应KEGG pathway中检出的基因个数，颜色代表显著性p-value。



TAF_7_vs_TAF_8

图8.2b 功能聚类气泡图

KEGG Pathway主要划分为7类：分别为Metabolism, Genetic information Processing等。其中每类又分为二、三、四级子条目。功能聚类分类图课展示pathway所属一级条目和二级条目的情况。

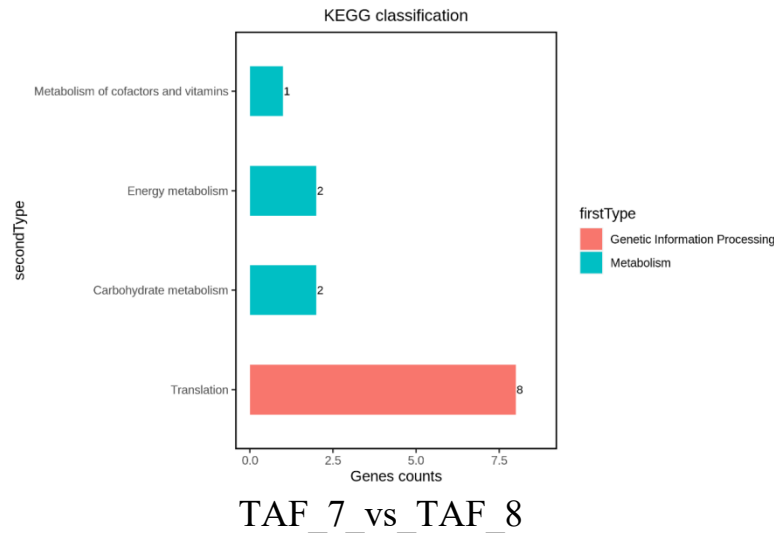


图8.2c 功能聚类分类图

KEGG通路图具有强大的图形功能，将代谢、调控、通路、生化、疾病、药物等相关的分子相互作用整合到一起并形成关系网络，通过功能富集分析得到的KEGG通路示例图如下，部分富集结果中可能没有KEGG通路图。具体文件见./sup/05.gokegg/*_kegg 文件夹各组下面的map文件夹。

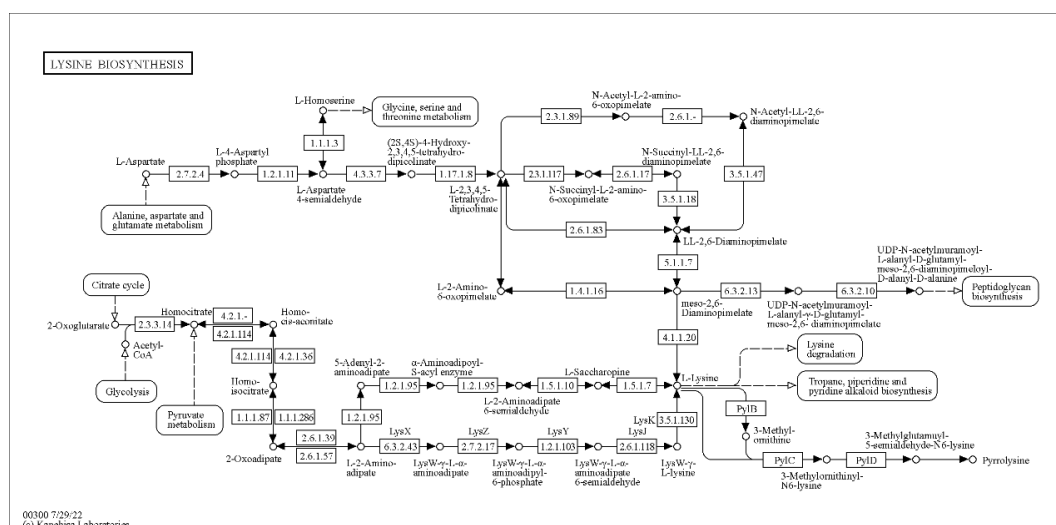


图8.2d KEGG通路示意图

8.3 后续功能研究参考

得到大规模的蛋白质组学数据之后，需要进行各种生物信息学分析，以便寻找规律、挖掘数据。本项目报告后续可进行常见的生物信息学分析和相关个性化的分析，以便筛选互作蛋白。一般会选取5-10个蛋白进行表达量的验证，可采取Western Blot等方法。如需挑选关键蛋白或信号通路做进一步的功能研究，可选取与表型相关的差异表达倍数较大的蛋白，或者功能富集分析中差异显著的信号通路进行。使用合适的细胞株或动物模型或植物，采取敲降或者过表达这些挑选的蛋白，检测其表型或下游分子的变化是否符合表型的变化或者预期。找到这些蛋白参与某个特定通路或者行使某些特定功能之后，参考相关的文献，再设计各种实验进一步探索其作用机制。比如，寻找与目标蛋白互作的蛋白，检测是否通过互作蛋白发挥作用，还是与互作蛋白协同作用；如果是一个调控蛋白，检测其是否影响了其他下游基因或者蛋白的表达水平。

9.参考文献

[1]. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. Nature 509, 582-587 (2014).

[2]. Identification and Characterization of Potential Biomarkers by Quantitative Tissue Proteomics of Primary Lung Adenocarcinoma. Molecular & cellular proteomics 15, 2396-2410 (2016).

[3]. DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput. Nat Methods, 2020. 17(1): p. 41-44.

[4]. Targeted Data Extraction of the MS/MS Spectra Generated by Data-independent Acquisition: A New Concept for Consistent and Accurate Proteome Analysis. Molecular & Cellular Proteomics, 11(6): p. O111.016717 (2012).

[5]. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. Nature protocols 8, 1551-1566 (2013).

[6]. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. Nature 509, 582-587 (2014)人类蛋白质组学计划草图公布.

10. 常见问题

Q1: CoIP-MS可以在那些物种里面做？

A: 目前我司可提供烟草叶片瞬转，水稻、拟南芥、玉米、小麦原生质体瞬转和HEK293T哺乳动物工具细胞瞬转等物种验证蛋白之间的互作，不是上述物种的可以在相近物种做，或者提供稳转材料。

Q2: CoIP-MS需要准备多少样本量？

A: 本实验需要保证足够的蛋白浓度才能维持原本存在的蛋白互作状态，尤其当蛋白丰度较低、相互作用力不强、使用不易提蛋白组织等情况时。而且CoIP的实验条件往往需要反复摸索。因此用于CoIP-MS实验需准备细胞 $>2 \times 10^7$ ，动物组织 $>0.5\text{g}$ ，植物组织 $>3\text{g}$ ，并且须更加注意采集后速冻 -80°C 保存和避免反复冻融。

Q3: CoIP-MS需要客户准备什么？

A: ①客户有稳转材料，可以直接提供稳转材料；

②客户有现成可以做CoIP-MS的载体，可以直接给载体，并告知抗性与检测标签；

②客户提供基因序列与用于扩增目的基因的模板，由我司构建；

③客户提供基因序列，由我司全基因合成并构建。

Q4: 质谱什么时候做定量什么时候不定量？

A: 根据自己的实验需要来选择，如果要知道两者之间的差异蛋白（如用质谱比较空白对照与目的蛋白过表达之间的差异蛋白来鉴定与目的蛋白相互作用），就需要定量，如果只是想知道所提供的材料里面的蛋白种类就不需要定量。