一小时蛋白质组: 基于 Q-OT-qIT 质谱系统的蛋白质组学快速鉴定

张伟[†], 顾培明[†], 江峥^{*}, 明红, 陈伟

赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 上海 201206

[†] 同等贡献

^{*} 联系人, E-mail: zheng.jiang@thermofisher.com

收稿日期: 2014-01-25; 接受日期: 2014-02-14

doi: 10.1360/052014-16

摘要 随着“一小时酵母蛋白质组”的实现, 短梯度下实现蛋白质组深度覆盖成为可能. 利用全新 Q-OT-qIT 三合一质谱系统进行“一小时蛋白质组”分析与优化. 50 min 有效梯度, 单次实验分别从 1 μ g 和 50 ng HeLa 全蛋白中鉴定到 20860 和 14100 条肽段, 对应到 3865 和 2877 个非冗余蛋白, 而目前的文献报道至少需要 2~3 h. 同时, 考察了 Q-OT-qIT 碎裂模式、检测方法、最大注入时间和自动增益控制等参数对蛋白质组快速分析的影响, 证明了不同采集方法间的互补性, 阐述了不同扫描参数对鉴定结果的影响. 此外, 还讨论了 Q-OT-qIT 的并列运行原理和扫描组合模式, 为不同实验目的和样本类型的蛋白质组快速分析奠定了基础.

关键词

蛋白质组学
快速鉴定
深度覆盖
静电场轨道阱
Q-OT-qIT 质谱

蛋白质组深度覆盖分析(in-depth proteome)已成为蛋白质组学研究的发展趋势, 通过 2828 大规模鉴定和挖掘极低丰度的蛋白, 为信号通路、分子靶点和生物标志物的研究提供重要信息. 然而, 由于全蛋白样本的复杂性, 蛋白质组深度鉴定对色谱分离要求很高, 通常需要进行二维分离(强阴离子交换、高 pH 反相等), 或使用一维长梯度分离, 以降低高丰度蛋白的干扰^[1,2]. 但这样消耗了大量时间, 重现性也不佳, 成为蛋白质组深度覆盖研究的瓶颈.

静电场轨道阱(orbitrap)质量分析器具有超高分辨率、超高灵敏度等特点, 有效推动了蛋白质组学的发展^[3,4]. 新型 Q-OT-qIT(Orbitrap Fusion)质谱系统首

次将四极杆(quadrupole, Q)、静电场轨道阱(orbitrap, OT)和线性离子阱(linear quadrupole ion trap, qIT) 3 种质量分析器集为一体, 利用动态扫描管理技术, 实现了 3 种质量分析器同时工作并相互协作, 一级、二级扫描同时进行, 使分析效率达到最大化^[5]. Hebert 等人^[6]利用 Q-OT-qIT 质谱, 5 次重复实验, 在 70 min 有效梯度下鉴定到约 4000 个酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)蛋白, 同样的结果, 目前的文献报道至少需要 4 h, 分析效率(单位时间蛋白鉴定数量)提高了 4 倍以上^[7,8]. 基于此, Hebert 等人^[6]首次提出“一小时酵母蛋白质组”的概念, 即 1 h 左右的短梯度实现酵母蛋白质组深度覆盖. 蛋白质组学已进入新的时代.

引用格式: 张伟, 顾培明, 江峥, 等. 一小时蛋白质组: 基于 Q-OT-qIT 质谱系统的蛋白质组学快速鉴定. 中国科学: 生命科学, 2014, 44: 528–536

Zhang W, Gu P M, Jiang Z, et al. The one hour proteome: Q-OT-qIT mass spectrometry based rapid proteome identification. SCIENTIA SINICA Vitae, 2014, 44: 528–536, doi: 10.1360/052014-16

本文使用 Q-OT-qIT 质谱系统对 HeLa 和酵母细胞全蛋白进行短梯度快速鉴定, 并对基于 Q-OT-qIT 质谱的“一小时蛋白质组”深入考察与优化. 结果显示, 单次实验, 50 min 有效梯度, 分别从 1 μg 和 50 ng HeLa 中鉴定到 20860 和 14100 条肽段, 对应 3865 和 2877 个非冗余蛋白, 分析效率相比目前的报道提高了至少 2~3 倍^[9]. 本文还对比和优化了多种扫描组合和参数设置, 为各类实验提供了最合适的采集模式.

1 材料与方法

1.1 样品前处理

分别取适量 HeLa 和酵母细胞沉淀, 加入含 7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、1 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 和 50 mmol/L 二硫苏糖醇 (DL-dithiothreitol, DTT) 的蛋白提取液 (使用前加入蛋白酶抑制剂), 在超声细胞破碎仪中超声 3×5 s. 冰上放置 20 min 后, 于 4℃ 离心 30 min (15000×g) 并取上清, Bradford 法测定总蛋白浓度.

向蛋白提取液中加入 DTT, 使终浓度为 10 mmol/L, 于 56℃ 振荡 30 min. 再加入碘乙酰胺 (iodoacetamide, IAM), 使终浓度为 50 mmol/L, 于室温避光振荡 40 min. 反应后, 加入 6 倍体积的预冷丙酮, -20℃ 放置 3 h, 再于 4℃ 离心 30 min (15000×g) 弃上清. 按 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的浓度将沉淀重溶于 50 mmol/L NH_4HCO_3 缓冲溶液, 并加入足量胰蛋白酶 (trypsin), 37℃ 酶解过夜. 酶解后, 将全蛋白酶解液稀释至终浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

1.2 纳流液相色谱方法

色谱仪: 纳流速超高效液相色谱 EASY-nLC 1000 (Thermo, 美国); 色谱柱: 纳流 C_{18} EASY-Spray 柱 (2 μm , 100 $\text{\AA}$, 75 $\mu\text{m}\times 25\text{ cm}$ /50 cm), 流速 250 nL/min; 自制纳流 C_{18} 柱 (3 μm , 100 $\text{\AA}$, 75 $\mu\text{m}\times 15\text{ cm}$), 流速 300 nL/min; 流动相 A: 0.1% 甲酸-水溶液; 流动相 B: 0.1% 甲酸-乙腈溶液.

50 min 有效梯度: 0~2 min, 3%~5% B; 2~42 min, 5%~22% B; 42~52 min, 22%~30% B; 52~55 min, 30%~90% B; 55~60 min, 90% B. 70 min 有效梯度: 0~5 min, 3%~8% B; 5~60 min, 8%~20% B; 60~75 min, 20%~30% B; 75~80 min, 30%~90% B; 80~90 min, 90% B.

1.3 质谱方法

质谱仪: Orbitrap Fusion (Q-OT-qIT) 高分辨质谱仪 (ThermoFisher, 美国); 离子源: EASY-Spray 或 Nanospray Flex 纳升电喷雾源; 喷雾电压: 2.2 kV; 离子传输管温度: 275℃; 射频透镜 (RF-lens): 60%.

扫描模式: 速度模式 (top-speed); 循环时间: 3 s; 动态排除: 60 s.

一级扫描: 质量分析器, 静电场轨道阱; 扫描范围, 质核比 350~1800; 分辨率, 120k; 最大注入时间, 50 ms; 自动增益控制 (automatic gain control, AGC): $2\text{e}5$.

二级 IT 扫描: 离子选择, 四级杆; 选择窗口, 2 amu; 质量分析器, 离子阱 (ion trap, IT); 扫描速度, 快速 (rapid); 最大注入时间, 35 ms; AGC: $1\text{e}4$; 碎裂模式, 高能碎裂 (higher-energy collisional dissociation, HCD); 碎裂能量, 35%.

二级 OT 扫描: 离子选择, 四级杆; 选择窗口, 2 amu; 质量分析器, 静电场轨道阱; 分辨率, 15k; 最大注入时间, 35 ms; AGC, $1\text{e}5$; 碎裂模式, HCD; 碎裂能量, 35%.

1.4 数据分析

数据使用 Proteome Discoverer 1.4 软件搜库鉴定. 搜索引擎: SEQUEST HT; 数据库: Uniprot 人和酵母蛋白数据库 (www.uniprot.org); 蛋白酶: 胰蛋白酶 (full); 最大漏切位点: 2; 母离子质量精度: 百万分之十; 子离子质量精度: 0.6 Da (qIT)/0.02 Da (OT); 固定修饰: 脲甲基化 (carbamidomethyl, C+57.021 Da); 可变修饰: 乙酰化 (acetyl, N-terminus+42.011 Da), 脱氨基化 (deamidated, N, Q+0.984 Da), 氧化 (oxidation, M+ 15.995 Da). 搜库结果使用 Percolator 计算 q 值进行卡值. 同时, 使用 Preview 软件分析数据质量.

2 结果与分析

2.1 Q-OT-qIT 短梯度分析 HeLa 和酵母蛋白质组

实验对 1 μg 和 50 ng HeLa 进行 50 min 有效梯度采集, 对 1 μg 酵母全蛋白进行 70 min 有效梯度采集, 采用 OT-HCD-IT 扫描模式, 一级静电场轨道阱、二级离子阱扫描, HCD 高能碎裂. 结果显示, 有效出峰时间蛋白酶解产物得到充分分离, 质谱响应良好 (图 1). 即使在 50 ng 的极低样本量下, 仍获得良好的分

图1 HeLa 和酵母蛋白酶解产物的液质联用(LC-MS/MS)总离子流图

A: 1 μ g HeLa; B: 50 ng HeLa; C: 1 μ g 酵母

离效果和质谱响应(图 1B).

1 μg HeLa 样本在 50 min 有效梯度内共获得 53209 张谱图, 平均每秒 1.7 张一级谱图、16.1 张二级谱图, 平均每循环 9.6 张二级谱图; 酵母样本在 70 min 有效梯度内共获得 60295 张谱图, 平均每秒 1.8 张一级谱图、12.5 张二级谱图, 平均每循环 6.9 张二级谱图(表 1). HeLa 细胞比酵母复杂, 存在更多的蛋白, 因此获得更多的二级谱图. 此外, 在 50 ng HeLa 的极低样本量下, 总谱图数也达到 41099 张.

2.2 HeLa 和酵母蛋白质组快速鉴定结果

数据经 SEQUEST HT 搜库和 Percolator 卡值, 从 1 μg 和 50 ng HeLa 样本中分别鉴定到 20860 和 14100

条肽段(q 值 0.01), 分别对应 3865 和 2877 个非冗余蛋白(表 2), 而同样的鉴定数量, 目前的报道至少需要 2~3 h^[9]. 另外, 酵母样本共鉴定到 15083 条肽段(q 值 0.01), 对应 2697 个非冗余蛋白(表 2).

HeLa 数据进一步使用 Preview 软件分析谱图质量精度(图 2). 结果显示, 母离子(质核比)质量精度平均为 0, 子离子质量精度(质核比)平均为 0.075 Da. 静电场轨道阱质量偏差基本保持在百万分之五以内, 具有高质量精度和长期稳定的质量轴; 离子阱质量偏差基本保持在 ± 0.2 Da 以内, 质量精度良好, 保证了数据的质量与结果可信度.

肽段 ATAGDTHLGGEDFDNR 的谱图展示了 Q-OT-qIT 质谱的碎裂效果和灵敏度(图 3), 谱图具有

表 1 有效梯度内的采集数据分析

样本	有效梯度	出峰时间	扫描模式	一级谱图数	二级谱图数	总谱图数	二级/循环
HeLa 1 μg	50 min	8~58 min	OT-HCD-IT	5001	48208	53209	9.64
HeLa 50 ng	50 min	8~58 min	OT-HCD-IT	5762	35337	41099	6.13
酵母	70 min	18~88 min	OT-HCD-IT	7640	52655	60295	6.89

表 2 HeLa 和酵母样本全蛋白鉴定结果

样本	假阳性率(q 值)	总蛋白数	总肽段数	总谱图鉴定数	有效梯度谱图鉴定数	有效梯度谱图解析率
HeLa 1 μg	0.01	3865	20860	29739	28899	59.9%
	0.05	4581	23802	33545	32275	66.9%
HeLa 50 ng	0.01	2877	14100	18675	18327	51.9%
	0.05	3407	16363	21543	21037	59.5%
酵母	0.01	2697	15083	22620	22139	42.1%
	0.05	3079	16984	25330	24788	47.1%

图 2 数据质量精度分析

A: 一级质量精度; B: 二级质量精度

图 3 HeLa 样本 ATAGDTHLGGEDFDNR 肽段二级谱图和匹配信息

A: 1 µg 样本量, CID 碎裂; B: 1 µg 样本量, HCD 碎裂; C: 50 ng 样本量, HCD 碎裂

丰富的碎片信息、良好的匹配度和较高的灵敏度. 此外, HCD 和碰撞诱导解离(collision-induced dissociation, CID)两种碎裂模式效果相当并有着各自的特点: HCD 避免了 CID 的三分之一效应, 低分子量端信息没有丢失, 同时速度比 CID 快 5%; 而 CID 灵敏度更高, 对低丰度肽段碎裂效果更明显.

2.3 不同碎裂模式和检测方法比较与分析

鉴于不同模式的鉴定效果差异明显, 实验深入考察了 HCD/CID 碎裂模式和静电场轨道阱/离子阱二级检测方法对鉴定结果的影响. 首先分析了 HeLa 在 OT-HCD-IT, OT-CID-IT 和 OT-HCD-OT 3 种模式下的鉴定结果, 比较其互补性. 结果表明, HCD 和 CID 共同鉴定到的肽段占 32.7%, 仅一种碎裂模式鉴定到的占 67.3%; OT/IT 同时检测到的肽段占 51.9%, 仅一种质量分析器检测到的占 48.1%(图 4). CID 有三分之一效应, 造成低分子量端的质量歧视, HCD 克服了低质量端歧视, 但灵敏度略低于 CID; 离子阱具有较高的扫描速度和灵敏度, 而静电场轨道阱的高分辨率与高质量精度有效排除了复杂样本基质的干扰. 因此, 两种碎裂模式和检测方法具有一定的互补性.

实验进一步使用 OT-HCD-IT, OT-CID-IT, OT-

图 4 HeLa 样本肽段鉴定结果比较

A: HCD 和 CID 碎裂模式比较; B: 离子阱和静电场轨道阱二级检测比较

HCD-OT 和 OT-CID-OT 4 种扫描模式, 对酵母样本进行 60 min 有效梯度采集, 详细比较了不同扫描模式的差异. 其中, 二级 IT 采用 Rapid 扫描, OT 采用 30k 分辨率. 鉴定结果以 OT-HCD-IT 结果为 100%归一化(图 5). 结果表明, 由于 OT-HCD-IT 速度最快, 获得的谱图总数和鉴定结果最多; CID 比 HCD 慢 5%, 因此鉴定结果少 5%; OT-HCD-OT 为两级高分辨, 一级、二级无法同时运行, 谱图总数和蛋白鉴定数分别是二级 IT 扫描的 70%和 85%; OT-CID-OT 速度最慢, 谱图总数和蛋白鉴定数分别是 OT-HCD-IT 的 60%和 75%. 此外, 4 种扫描模式的谱图解析率相差不大, 表明不同扫描模式对数据质量影响不大.

2.4 离子最大注入时间与自动增益控制(AGC)对结果的影响

利用 C 型阱(C-trap)控制离子的注入时间和注入数量(自动增益控制)是静电场轨道阱质量分析器的特点, 进入静电场轨道阱的离子数量对检测结果影响很大, 合适的离子数量不仅避免了空间电荷效应, 还能够明显提升谱图质量、动态线性范围和检测线. 实验在 OT-HCD-OT 模式下设置不同参数对 HeLa 样本进行分析(二级 OT 采用 15k 分辨率), 进一步探索不同的最大注入时间和 AGC 设置对结果的影响(表 3).

鉴定结果表明, 当样本浓度较高(1 μg)时, 离子数量充足, 较小的注入时间和 AGC 即可获得良好的结果; 增加注入时间和 AGC 反而会降低扫描速度, 减少谱图数量. 因此, 参数设置为 1.0e5, 35 ms 时获得的鉴定数最多(图 6A). 当样本浓度很低(50 ng HeLa)时, 需要增加注入时间和 AGC 以注入更多的离子, 提高灵敏度和谱图质量; 但如果注入时间过长

图 5 不同扫描模式数据比较

以 OT-HCD-IT 为 100%归一化

表 3 不同的最大注入时间与 AGC 下 HeLa 样本的鉴定结果

二级 AGC	二级最大注入时间	1 μ g HeLa 全蛋白				50 ng HeLa 全蛋白			
		肽段数	谱图鉴定数	二级谱图数	谱图解析率	肽段数	谱图鉴定数	二级谱图数	谱图解析率
1.0e5	35 ms	20153	26397	39508	66.8%	11352	14063	31724	44.3%
2.5e5	35 ms	19749	25853	39229	65.9%	11418	14097	31963	44.1%
2.5e5	60 ms	17481	22354	31725	70.5%	13121	16151	28013	57.7%
2.5e5	120 ms	13494	16317	20692	78.9%	11734	14123	19798	71.3%
2.5e5	200 ms	10059	12233	14724	83.1%	9071	10717	13739	78.0%

图 6 不同的最大离子注入时间和 AGC 结果比较

A: 1 μ g HeLa 结果比较; B: 50 ng HeLa 结果比较. 以每项最高值为 100%

(120 和 200 ms), 谱图数量太少, 也会导致鉴定结果减少. 因此, 2.0e5, 60 ms 的参数设置获得的鉴定数最多(图 6B). 此外, 注入时间越长、离子数量越多, 谱图质量越高, 因此, 离子注入数量与谱图解析率成正比.

3 讨论

随着“一小时酵母蛋白质组”全覆盖的实现, 蛋白质组深度覆盖研究迎来新的时代^[6]. 在复杂样本蛋白质组研究中, 传统方法需要进行二维分离、分级的方式简化样本、充分分离, 这样不仅操作费力, 也需消耗大量的时间. 而 Q-OT-qIT 质谱技术使得在 60 min 左右一维短梯度下实现复杂样本的深度鉴定成为现实.

Q-OT-qIT 的三合一结构实现了传统质谱难以实现的并列运行, 即一级、二级扫描同时进行, 离子注入、选择、碎裂、检测同时进行(图 7). 动态扫描管理技术自动控制 and 实时优化仪器运行, 使 3 种质量分析器相互配合、同时工作, 尽可能减少扫描过程和循环间隙的等待时间. “减一逻辑”将二级扫描与上一次一级扫描相关联, 无需等待本次一级扫描确定母离子及电荷, 提高仪器运行速度和分析效率. 以前 10 位(top 10)的数据依赖扫描(data dependent acquisition, DDA)为例, 240k 分辨率下, 当一级全扫描完成时, 所有二级扫描也同时完成, 一级、二级互不相关、独立运行(图 7). 此外, 速度(top-speed)模式在固定时间内尽可能多地激发二级扫描, 相比传统排名(top-N)模式能更多地采集低丰度肽段, 也保证了一级扫描点数, 有利于同时定性定量.

实验结果表明, 1 μ g HeLa 样本在 50 min 有效梯度内采集到 53209 张谱图, 扫描速度为 17.7 Hz, 其中包括 120k 分辨率的一级静电场轨道阱扫描, 并列运行的工作模式提高了仪器整体运行速度. 在严格卡值(1%假阳性率)下, 鉴定到 20860 条非冗余肽和 3865 个非冗余蛋白, 而最新的文献报道需要至少 2~3 h 才能达到相同结果^[9]. 酵母样本虽未达到 Hebert 等人^[6]报道的蛋白鉴定数量, 但上样量更低, 并且未进行重复, 比目前其他仪器的报道结果也有 2 倍以上的提高^[8,9]. 在扫描速度方面, Q-OT-qIT 虽然未达到 Q-TOF(time of flight, 飞行时间)类质谱的极限速度, 但谱图质量更高, 谱图解析率比 Q-TOF 类质谱高 2~3 倍^[8].

1 μ g HeLa 样本在多次实验中的谱图解析率基本达到 60%以上, 在加大离子注入时间和注入数量的情况下甚至达到 83.1%(表 3), 显示了良好的谱图质量. 全蛋白样本体系复杂, 短梯度下会有共流出肽段和基质杂质的干扰, 大量低丰度肽段的二级响应也

图 7 Q-OT-qIT 质谱结构与并列运行原理

静电场轨道阱一级全扫描的同时，四极杆依次进行若干母离子选择，离子阱依次进行若干母离子的二级碎片扫描，三者同时运行

很弱，在这样的情况下，谱图解析率达到 80% 以上，显著高于目前的文献报道^[8,9]。此外，样本量决定了蛋白鉴定数量，传统蛋白质组学分析需要微克级的全蛋白，而本实验尝试将样本量降低到纳克级，即 50 ng 上样量，鉴定结果已达到目前微克级的水平，为低浓度样本和极低丰度蛋白分析提供可能。

Q-OT-qIT 的三合一结构使扫描方式灵活多样。C-trap 与离子阱之间的多极离子通道使离子可以正反向自由移动，实现了 CID/HCD/电子转移裂解 (electron-transfer dissociation, ETD) 3 种碎裂模式在 MSⁿ 任意一级使用，并任意使用静电场轨道阱或离子阱检测，产生多种组合的扫描模式。其中，CID 碎裂相比 HCD 灵敏度略高，但是速度略慢，且有三分之一效应，即低质量端歧视，而 HCD 在低分子量段具有丰富的碎片信息；静电场轨道阱的超高分辨率与质量精度可以最大程度地排除干扰，而离子阱速度更快，并且可以和静电场轨道阱同时运行，提高效率。可见，由于机理的不同，各种扫描模式的效果不同，具有一定的互补性。Q-OT-qIT 控制离子注入时间和注入数量的能力也是保证分析效率和灵敏度的重要因素。注入时间越长、注入数量越多，则灵敏度越高、谱图质量越高，但扫描速度越慢；相反，离子注入数量越少，速度越快，但低丰度离子损失越大，灵敏度下降。可见，实验目的和样本不同，适合的扫描模式和参数也不同，因此，实验进一步考察了扫描模式和

离子注入参数对结果的影响。

结果表明，不同碎裂模式和检测方法均具有良好的互补性。静电场轨道阱和离子阱之间有 1/2 的鉴定结果不重复，HCD 和 CID 之间有 2/3 结果不重复，不同的扫描方法结合可以达到更大的覆盖范围。另一方面，线性离子阱相比传统离子阱质量精度更高，质量偏差稳定保持在 0.2 Da 以内，达到中高分辨质谱水平，因此，OT 和 IT 扫描均具有较高的谱图解析率。在离子控制方面，通过提高最大注入时间和最大注入数量，可以增加离子注入量，提高低浓度样本和极低丰度蛋白的灵敏度；而降低离子注入量，能够加快常规样本的分析速度、增加鉴定数量。通过几种模式和参数的考察、优化，为蛋白质组快速分析和深度覆盖研究提供了更多选择。

4 结论

本文利用 Q-OT-qIT 三合一质谱，对 HeLa 和酵母全蛋白进行了短梯度快速鉴定：(i) 50 min 有效梯度，从 1 μg HeLa 中鉴定到 20860 条非冗余肽和 3865 个非冗余蛋白，时间相比目前的报道缩短了 50%~60%；(ii) 50 ng 极低样本量，鉴定到 14100 条非冗余肽和 2877 个非冗余蛋白，谱图解析率超过 50%；(iii) 考察了 HCD/CID 碎裂模式和 IT/OT 检测方法的异同，结果显示，不同方法间互补性良好，并且均有较高的谱

图解析率; (iv) 考察了离子最大注入时间和自动增益控制对结果的影响, 表明提高注入时间和注入数量可以显著提高低浓度样本的检测灵敏度。综上所述

述, 基于 Q-OT-qIT 质谱, 本文实现了短时间内对复杂样本蛋白质组深度覆盖分析, “一小时蛋白质组”时代已经到来。

致谢 部分图片素材由赛默飞世尔科技圣何塞工厂提供。

参考文献

- 1 Delahunty C M, Yates III J R. MudPIT: multidimensional protein identification technology. *Biotechniques*, 2007, 43: 563–569
- 2 Jones K A, Kim P D, Patel B B, et al. Immunodepletion plasma proteomics by triple TOF 5600 and orbitrap elite/LTQ-orbitrap Velos/Q exactive mass spectrometers. *J Proteome Res*, 2013, 12: 4351–4365
- 3 Mann M, Kelleher N L. Precision proteomics: the case for high resolution and high mass accuracy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 18132–18138
- 4 Geiger T, Wehner A, Schaab C, et al. Comparative proteomic analysis of eleven common cell lines reveals ubiquitous but varying expression of most proteins. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11: M111.014050
- 5 Senko M W, Remes P M, Canterbury J D, et al. Novel parallelized quadrupole/linear ion trap/orbitrap tribrid mass spectrometer improving proteome coverage and peptide identification rates. *Anal Chem*, 2013, 85: 11710–11714
- 6 Hebert A S, Richards A L, Bailey D J, et al. The one hour yeast proteome. *Mol Cell Proteomics*, 2013: M113.034769
- 7 Nagaraj N, Kulak N A, Cox J, et al. System-wide perturbation analysis with nearly complete coverage of the yeast proteome by single-shot ultra HPLC runs on a bench top orbitrap. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11: M111.013722
- 8 Andrews G L, Simons B L, Young J B, et al. Performance characteristics of a new hybrid quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer (TripleTOF 5600). *Anal Chem*, 2011, 83: 5442–5446
- 9 Kelstrup C D, Young C, Lavalley R, et al. Optimized fast and sensitive acquisition methods for shotgun proteomics on a quadrupole orbitrap mass spectrometer. *J Proteome Res*, 2012, 11: 3487–3497

The One Hour Proteome: Q-OT-qIT Mass Spectrometry Based Rapid Proteome Identification

ZHANG Wei, GU PeiMing, JIANG Zheng, MING Hong & CHEN Wei

ThermoFisher Scientific China, Shanghai 201206, China

With the realization of “the one hour yeast proteome”, in-depth proteome under rapid LC-MS/MS gradient is achieved. The current study utilized a novel Q-OT-qIT mass spectrometer to analyze and optimize “the one hour proteome”. Within 50 min LC-MS/MS gradient, a total of 20860 and 14100 unique peptides were identified from 1 µg and 50 ng HeLa digest, corresponding to 3865 and 2877 proteins, respectively. Similar result from current reports used at least 2–3 h gradient. The effects of various collision modes, detectors, maximum injection times and automatic gain control settings were further evaluated, and the complementarity between different acquisition methods and scan parameters were described. Moreover, the massive parallelization of Q-OT-qIT was discussed, providing useful information for rapid proteome analysis.

proteomics, rapid identification, deep coverage, orbitrap, Q-OT-qIT MS

doi: 10.1360/052014-16