

diaPASEF 一种质谱技术的优化方法

周加
201801073

1

先提出第一个问题——抗体干扰

- 对于抗体标记的细胞做蛋白质组学质谱分析，存在一个常见的问题，即抗体（尤其是IgG）的高丰度会干扰质谱检测，可能掩盖其他中低丰度蛋白的信号。

2

解决方法——目前去抗体的方法

• IgG去除步骤

在质谱分析前，可以通过选择性去除IgG的方法来减少抗体的干扰。例如，使用专门的抗体去除试剂盒、IgG消化酶（如IdeS或GingisKH）或免疫亲和层析技术，这些方法能够专门去除样本中的IgG，从而避免其在质谱中产生干扰。

• 改用DIA和解卷积方法

现代质谱分析软件也可以利用去卷积算法，去除特定抗体的信号或将其排除在外，这有助于在分析中增强目标蛋白的识别精度。例如使用特定的DIA解卷积方法或数据处理算法，从而在数据处理层面减弱IgG的影响。

3

质谱前IgG去除步骤

- Bernd O. Keller, Jie Sui, Alex B. Young, Randy M. Whittall, Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry, Analytica Chimica Acta, Volume 627, Issue 1, 2008, Pages 71-81, ISSN 0003-2670, <https://doi.org/10.1016/j.jaca.2008.04.043>.
- Sánchez-Hernández, L., Montealegre, C., Kiessig, S., Moritz, B. and Neusüß, C. (2017), In-capillary approach to eliminate SDS interferences in antibody analysis by capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry. ELECTROPHORESIS, 38: 1044-1052. <https://doi.org/10.1002/elps.201600464>

4

DIA结合解卷积算法去除特定抗体的信号

- Demichev,V., et al. (2020). DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput. *Nature Methods*, 17(1), 41-44.

5

前置知识——DDA DIA

	DDA (数据依赖采集)	DIA (数据无关采集)
选择离子	根据离子强度选择前体离子进行碎片化	所有离子在预定义的m/z范围内都进行碎片化
灵敏度	对强离子较敏感，低丰度离子可能错过	对低丰度蛋白质也能提供数据覆盖
数据复杂度	相对简单	更复杂，需要解卷积算法
覆盖范围	仅分析强度高的离子	分析所有离子，覆盖更广泛
应用场景	小规模分析、已知前体离子分析	大规模、高深度分析、复杂样本分析

6

DIA能避免抗体的干扰

DIA通过将所有离子分为多个预设的m/z窗口进行并行分析，这使得它在整个质谱范围内对所有离子进行碎片化，无论它们的丰度如何。具体来说：

- **所有离子都被同时分析：**在DIA中，所有的离子都会在预定义的m/z范围内被捕获并进行碎片化，不会受到前体离子丰度的强烈影响。因此，即使抗体蛋白（如IgG）的丰度很高，DIA模式也能确保其他低丰度蛋白得到充分分析。
- **减少信号干扰：**由于DIA模式不会单独选择强信号离子进行分析，而是以预设的m/z范围处理多个离子，它可以减少抗体丰度过高造成的干扰。

实际应用：在使用DIA分析时，质谱仪通过不断循环对多个离子群体进行碎片化，使得数据的覆盖更广，能够在复杂的样本中实现更全面的分析。对于细胞或组织特异性的标志蛋白质，DIA可以提供更高的灵敏度和准确性，避免传统方法中因抗体标记引入的丰度偏差。

7

提出第二个问题——DIA也有缺点

在DIA模式中，质谱仪会在一个预定义的质量/电荷比（m/z）范围内，分批对不同的离子前体进行选择 and 碎片化。这种方法虽然确保了所有前体离子在采集周期内都能被检测到，但有几个限制：

- **离子利用率低：**传统的DIA技术在每个采集周期内，质谱仪只能采集1-3%的离子信号，这意味着大部分离子被忽略，导致了检测灵敏度不足。
- **复杂的碎片光谱：**DIA将多个离子同时碎片化，得到的碎片光谱混杂了不同前体的信号，数据分析难度大。

8

解决方法——换用timsTOF Pro结合diaPASEF

- **利用更高分辨率的质谱技术**

现代质谱技术（如timsTOF Pro结合diaPASEF）由于具有较高的灵敏度和分辨率，能够在复杂样本中精确区分出目标蛋白的信号。离子迁移谱（TIMS）在TIMS质谱系统中也起到了重要作用，它可以通过迁移时间将不同种类的离子分离，减少抗体信号的干扰，从而增加检测中低丰度蛋白的可能性。

- Meier, F., Brunner, A.D., Frank, M. et al. diaPASEF: parallel accumulation–serial fragmentation combined with data-independent acquisition. Nat Methods 17, 1229–1236 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41592-020-00998-0>