

# 蛋白质组测序样本制备与送检

一、

## 一、实验目的

制备T24野生型细胞株及低中高耐药T24-RL48细胞株的细胞况液样本，直接送检至测序公司进行测序分析，用于后续差异蛋白表达分析及耐药机制研究。

## 二、实验内容

### 2.1 实验设计

样本类型：T24野生型细胞株、低/中/高度耐药T24-RL48细胞株。

重复次数：每组3个样本。

### 2.2 测定原理

Label-free蛋白组学测序的原理是通过质谱技术直接比较不同样品中肽段的一级质谱(MS1)信号强度或二级质谱(MS2)谱图数，实现蛋白质的相对定量。其核心在于利用液相色谱分离肽段后，质谱系统基于质荷比、保留时间、离子强度以及新增加的高分辨率对肽段进行分离和检测。其中，离子淌度通过区分离子在电场中的迁移率差异，增强低丰度肽段的选择性并降低质谱背景干扰，从而提升检测灵敏度和定量准确性。定量时，

通过积分肽段在色谱-质谱联用中的峰面积 (Peak intensity), 或统计其被质谱捕获的频率 (Spectral count), 建立信号强度与蛋白质丰度的正相关关系, 最终解析样本间的蛋白质表达差异。该技术无需同位素标记, 简化了实验流程, 尤其适用于复杂样本的高通量分析。

### 三、材料与试剂

#### 3.1 材料

枪头-15ml 离心管均购自 Axygen 公司

吸管购自国产公司

移液器: Eppendorf

T25 培养瓶购自 Corning 公司

10cm 细胞培养皿 (Corning 公司)

液氮、干冰

人膀胱移行细胞癌细胞株 (T24)

低、中、高耐药细胞株 T24-RCH48

#### 3.2 试剂

PBS、胰酶均购自美国 Gibco 公司

McCoy's 5A 培养基来自上海源培生物科技股份有限公司

胎牛血清 (FBS, Gibco 公司)

### 五、实验步骤

5.1 将低、中、高耐药及野生型T24细胞株铺在10cm培养皿中，待细胞长至80%以上。

5.2 弃培养液，加入4°C预冷的PBS，平放轻轻摇动1分钟后弃去PBS。重复以上操作3次以充分洗去培养液。

5.3 将培养皿置于冰上，向培养皿内加入1ml 4°C预冷的PBS。用干净的细胞刮刀将细胞快速刮于培养皿的一侧，冰上斜置培养皿，使得缓冲液流向一侧。

5.4 使用移液管吸取细胞悬液至预冷的1.5ml EP管内，离心去上清。

5.5 标记样本编号，液氮速冻后转移至-80°C保存。

5.6 干冰包装，填写测序公司支援单（附样本信息表），寄送至测序公司。

## 六、实验操作照片



图1 蛋白质测序制备的样本

## 七、实验结果

### 7.1 显著性差异蛋白分析

如表1所示，各耐药组与对照组(野生型)及耐药组间存在显著蛋白表达差异：高耐药组相比于对照组，差异蛋白总数达2556个(上调1229, 下调1327)；中耐药组相比于对照组，差异蛋白1943个(上调894, 下调1049)；低耐药组相比于对照组，差异蛋白943个(上调424, 下调519)；而在各耐药组之间，差异蛋白数量随耐药梯度而显著升高。

表1 显著性差异分析结果<sup>a</sup>

Comparisons <sup>a</sup>	Up <sup>a</sup>	Down <sup>a</sup>	All <sup>a</sup>
high VS control <sup>a</sup>	1229 <sup>a</sup>	1327 <sup>a</sup>	2556 <sup>a</sup>
low VS control <sup>a</sup>	424 <sup>a</sup>	519 <sup>a</sup>	943 <sup>a</sup>
moderate VS control <sup>a</sup>	894 <sup>a</sup>	1049 <sup>a</sup>	1943 <sup>a</sup>
high VS moderate <sup>a</sup>	1094 <sup>a</sup>	1081 <sup>a</sup>	2175 <sup>a</sup>
high VS low <sup>a</sup>	1260 <sup>a</sup>	1266 <sup>a</sup>	2526 <sup>a</sup>
moderate VS low <sup>a</sup>	723 <sup>a</sup>	820 <sup>a</sup>	1543 <sup>a</sup>

### 7.2 定量重复性评估(RSD分析)

各组样本蛋白质定量值的相对标准差(RSD)结果显示：组内RSD中位数均低于15%，但仍有异常值分布。

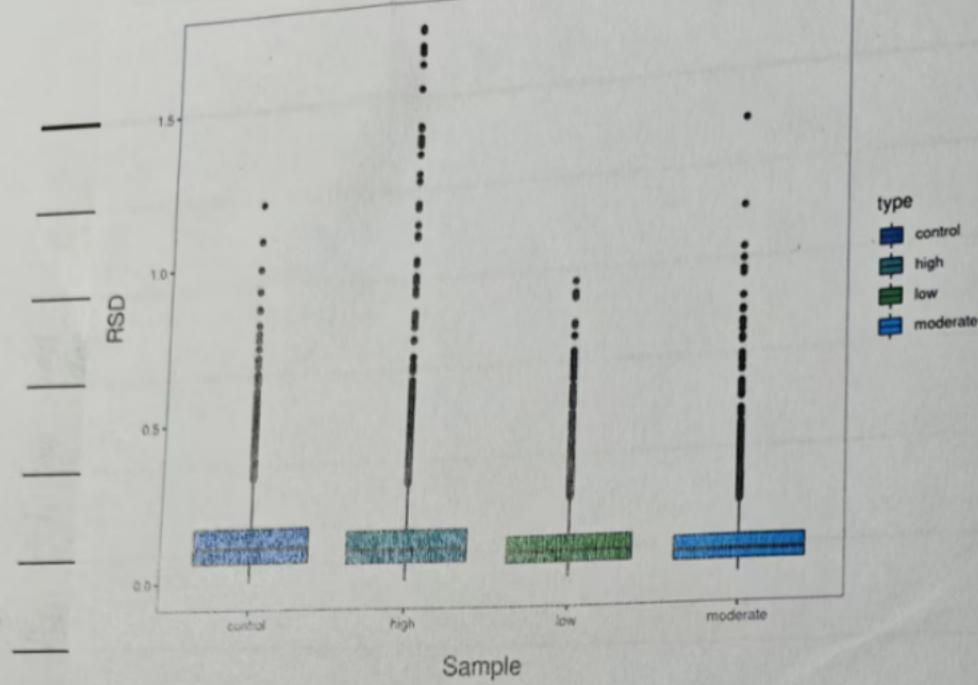


图2 蛋白质定量值的相对标准差 (RSD) 箱线图

### 7.3 样本聚类树与相关性分析

野生型组与各耐药组形成独立分支，组内样本紧密聚集。

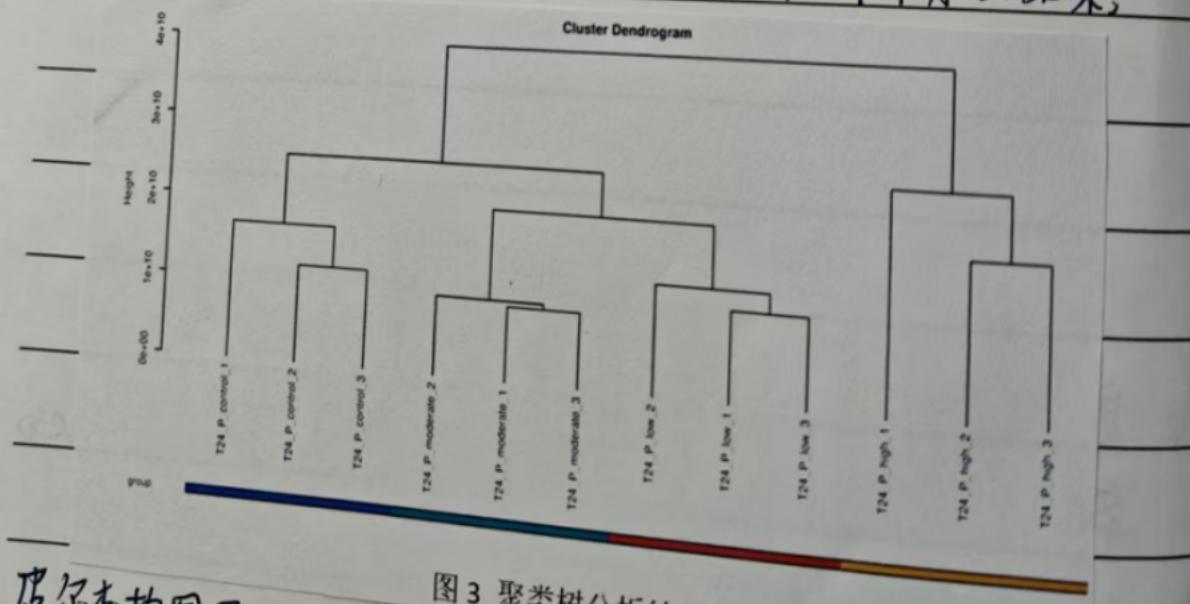


图3 聚类树分析结果

皮尔森热图显示，组内相关系数  $> 0.94$ ，组间系数随耐药差异增大而降低，高耐药组与对照组各样本的相关系数大部分  $< 0.9$ 。

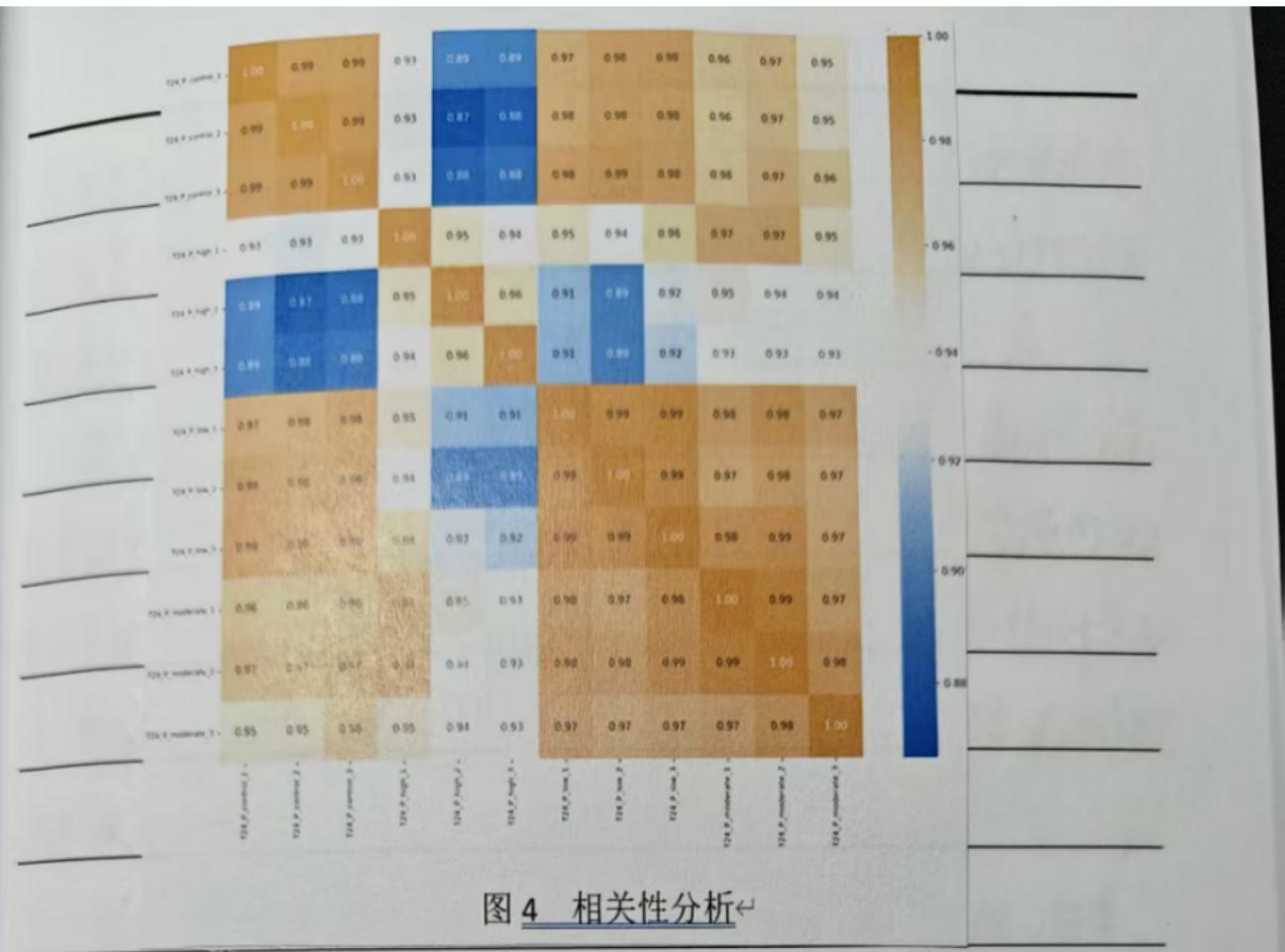


图4 相关性分析

#### 7.4 主要成分分析(PCA)

PCA图中,同组样本在PC1/PC2轴上紧密分布,重复性良好。野生型组与耐药组沿PC1轴完全分离,耐药组间呈现梯度分布(低→中→高耐药性)。

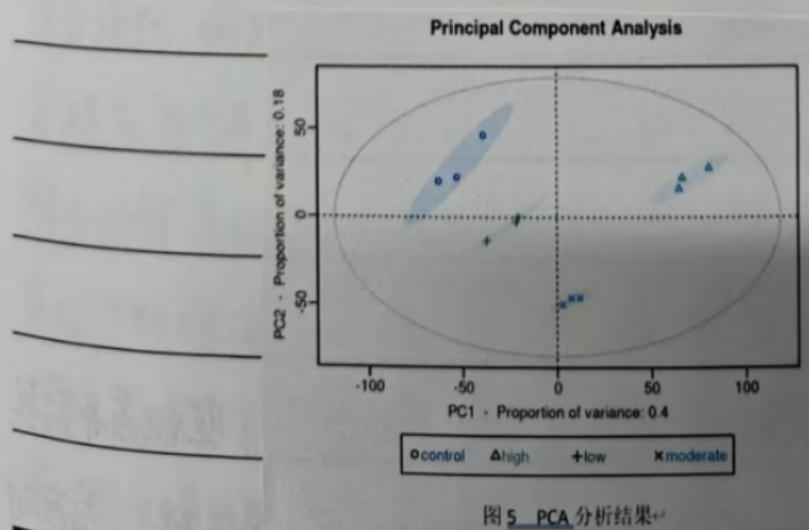


图5 PCA 分析结果

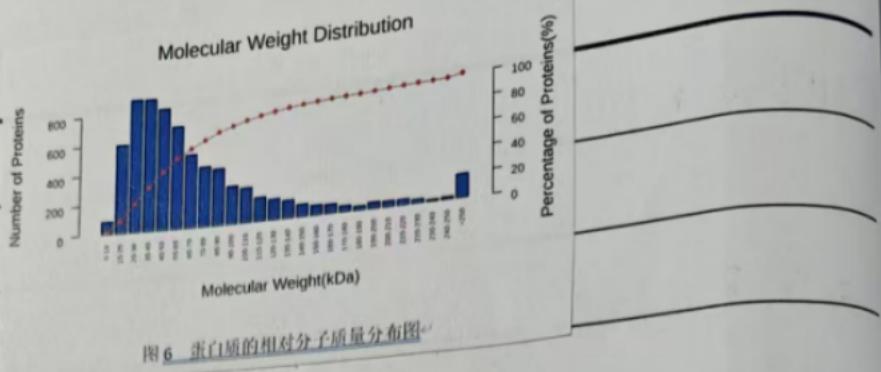


图6 蛋白质的相对分子质量分布图

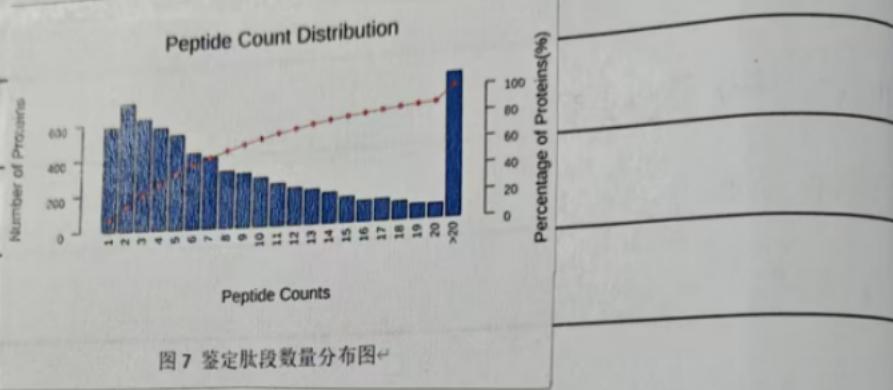


图7 鉴定肽段数量分布图

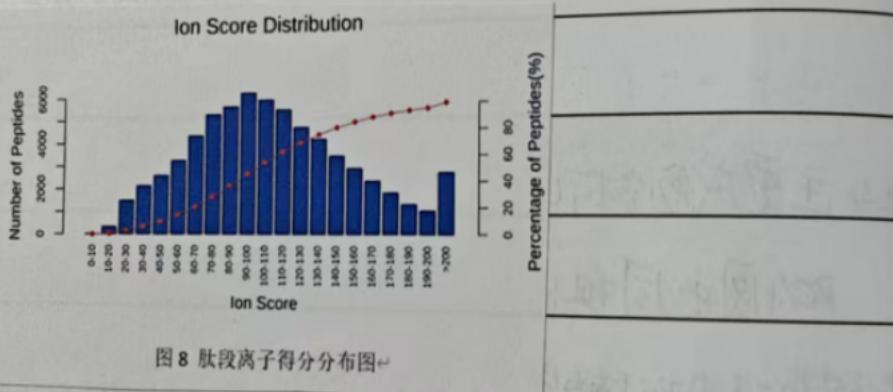


图8 肽段离子得分分布图

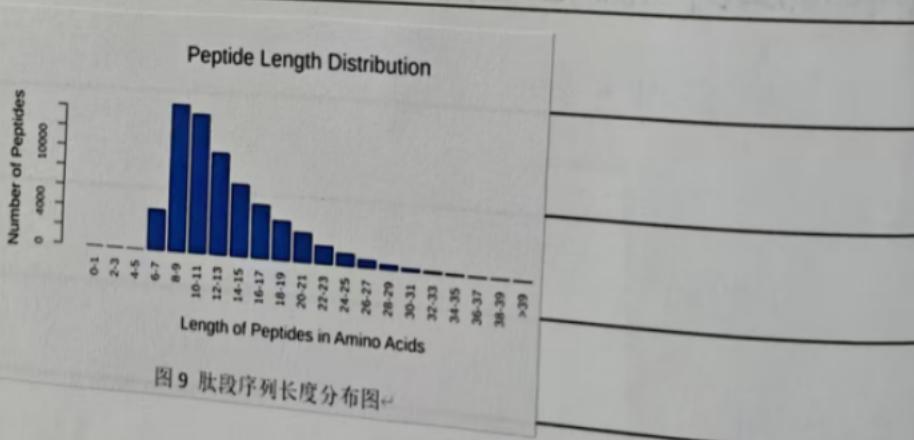


图9 肽段序列长度分布图

## 八. 结果分析

耐药性越高，差异蛋白数量越多，高耐药组与对照组差异显著（2556个），提示耐药机制可能与大量蛋白的动态调控相关，高耐药

药状态下可能涉及代谢重编程、药物外排增强或凋亡抑制等通路的多蛋白协同作用。耐药组间差异蛋白（如高 vs 中耐药组，2175个）可能包含耐药性维持或升级的关键标志物。

RSD分析中，样本间蛋白定量值的相对标准差越小，表明蛋白质组学的定量重现性越好。在本实验中，低组内RSD验证了实验操作的标准化和样本制备的一致性，支持后续差异分析和统计学效力。部分异常RSD蛋白可能需结合生物学重复进一步验证，排除技术误差对特定蛋白定量的影响。

聚类分析目的是在相似性的基础上对数据进行分组、归类。

通过计算所有样本间的相似度，形成表现样本间相似度的树状图。

在聚类树中，不同类别的原始数据点是树的最低层，树的顶层是一个聚类的根节点。本实验采用自下而上的方法创建聚类树，计算样本间的相似性，对所有样本中最为相似的两个样本进行组合，反复迭代。将距离最近的两个样本合并为一个Cluster后，重新计算其余样本与合并簇的距离矩阵，直到全部合并为了一个Cluster，整个过程就是建立一个树结构的过程。通过聚类树，我们可以直观了解组间、组内样本的相似性，观察有无异常或者离群样本的存在。在本实验中，聚类树和热图均显示耐药性诱导的全局蛋白表达模式模式改变，且耐药程度与蛋白组特征呈正相关。

组内高相关性表明生物学重复可靠，排除了批次效应对结果的干扰。

主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)反映了样本的组内和组间差异。PCA图上同组内的样本的聚集程度越高，则表示组内样本的组学特征越相似，即组内样本平行性或重复性越好；而不同样本的组学特征越相似，表明组间的组学特征差异越明显。PCA分组样本分离效果越好，表明组间的组学特征差异越明显。PCA分离趋势与耐药表型一致，提示蛋白组数据可有效区分不同耐药阶段。

综上所述，Label-free结合离子淌度的策略在复杂样本分析中展现出卓越的重复性和灵敏度，能够有效提升数据的可靠性和分析能力。同时，高通量测序数据凭借其全面性和精确性，在揭示复杂生物学过程和耐药表型的分子基础方面表现出显著优势，这为耐药机制的深入解析奠定了坚实的基础。