

## Bruker 引領 MALDI-2 和 4D-蛋白質體學發展，再成 ASMS 2020 焦點

### 全新 MALDI-2 離子源大幅提升小分子分析靈敏度

Bruker 一直以 MALDI 技術聞名全球，並已在質譜影像領域上的應用與創新居全球領導地位；自推出 timsTOF Pro 創新體學系統後，在深度覆蓋和高通量蛋白質體學分析中達成了突破性的進展，並且迅速和全球研究機構、大學院校和私人企業開展了一系列深度的合作。2019 年，Bruker 結合蛋白體學和質譜成像的技術優勢，推出了 timsTOF fleX，為空間定位體學配置了可切換的 ESI 和 MALDI 雙游離源。從 timsTOF Pro 到 timsTOF fleX，Bruker 兩項重要產品的發佈都與科學家緊密合作，比如：Matthias Mann、Ruedi Aebersold、Ben Collins 和 Hannes Roest、Jürgen Cox 等；產生了 PASEF (Parallel Accumulation Serial Fragmentation 平行累積序列碎裂)、diaPASEF (資料非依賴採集的 PASEF)、MaxQuant 等合作成果，更快地進行

蛋白質體學深度覆蓋的研究。深耕更廣泛的臨床研究的市場，例如：皇家墨爾本醫院的 Andrew 教授使用 timsTOF Pro，在 17 分鐘的液相梯度，平均鑑定 6,600 個蛋白，每天運行 50 個樣本。日本京都大學的 Yasushi 教授研究藥物與激酶活性，發展了 1 分鐘梯度，每天運行 864 個樣本的方法。

2019 年 ASMS 上推出了 timsTOF fleX 質譜儀，包括於 ESI timsTOF Pro™ 質譜的軟體可切換的 MALDI 源，這種新型 ESI /MALDI 組合功能，可在同一台質譜上進行空間定位體學 SpatialOMx™，可在高空間解析度下進行快速、無標記的 MALDI 成像，而在今年 ASMS 2020 網路會議上，Bruker 推出了世界上第一個商用 MALDI 後電離 (PI) 離子源 MALDI-2 (圖 1)，可用於 timsTOF fleX 質譜儀上，全新的 MALDI-2 離子源可將傳統對 MALDI 不敏感的小分子和脂質分析的靈敏度提高一到兩個數量級，廣泛的擴大 MALDI 技術的質譜成像應用範圍。

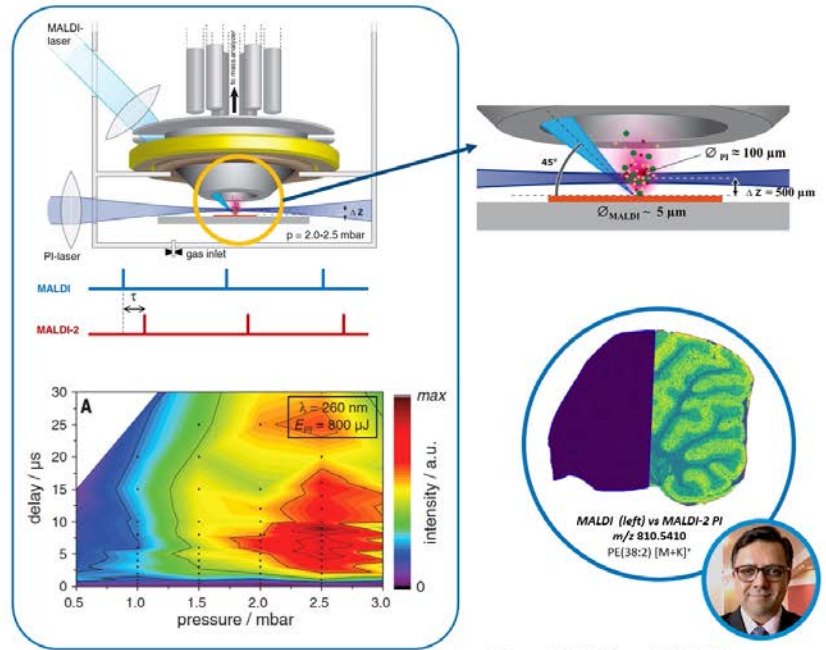
# New! MALDI-2 Post-Ionization (PI)



- First major advance in fundamental ionization technique for mass spectrometry since Fenn & Tanaka awarded Nobel prize in 2002
- Invented by Prof. Klaus Dreisewerd & team (Uni. Muenster)
- Two key requirements of MALDI-2 PI
  - A second laser source firing into the initiated MALDI plume
  - Elevated pressure (2.0-2.5mbar)



PROF. Dr. RER. NAT. Klaus Dreisewerd  
Biomedical Mass Spectrometry  
Cells in Motion Interfaculty Center  
University of Muenster, DE



Figs from Science, Vol. 348., Issue 6231, 2015

圖 1 Bruker 發表 MALDI-2 原理：在 MALDI 源後使用第二道雷射激發中性分子提升電離效率

2015 年，德國 University of Muenster 的 Klaus Dreisewerd 在《Science》上發表了 Post Ionization 的 MALDI 技術，使用第二道雷射激發 MALDI 一次激發出的離子束，同時配合冷卻氣體（最適化在 2.0-2.5 mbar 氣壓範圍），距離樣本約 5  $\mu\text{m}$  左右，實現了 MALDI 後的二次離子化。今年 Bruker 首先完成這項技術商品化，推出安裝在 timsTOF fleX 系統上的 MALDI-2 離子源，大幅提升小分子化合物的靈敏度，高達 1-3 個數量級，甚至有些在原有 MALDI 中沒有訊號的小分子（如雌二醇 estradiol、犬尿氨酸 kynurenine、脂溶性維生素）也能穩定地獲得訊號，如圖 2 所示。

MALDI-2 離子源研究先驅，德國 University of Muenster 生物醫學質譜教授 Klaus Dreisewerd 表示：「在過去的 35 年中，MALDI

已成為適用於多種應用、獨特而快速的分析工具。現在我們開發的 MALDI-2 離子源，可以顯著擴展 MALDI 的應用領域，例如為小分子分析提供更高的靈敏度，以及讓那些無法在傳統 MALDI 離子源離子化的分子產生訊號。」隨著 MALDI 成像和 SpatialOMx 在藥物開發中針對用於組織模型分析價值的增長，研究者追求更高的靈敏度與多功能性，憑藉 MALDI-2 顯著提高的靈敏度與可應用化合物類型的增加，MALDI-2 離子源可以進一步增強質譜的非靶向組織分析。Bruker 現在還為其 MetaboScape® 代謝體學分析軟體提供 MALDI-2 化合物質譜圖庫。MetaboScape 軟體在 SCiLS™ Lab 成像軟體內可提供分析物自動標注 (annotation) 功能，直接在組織圖像中對許多代謝物、醣聚物和脂質針對全新 CCS 演算法進行的標注。

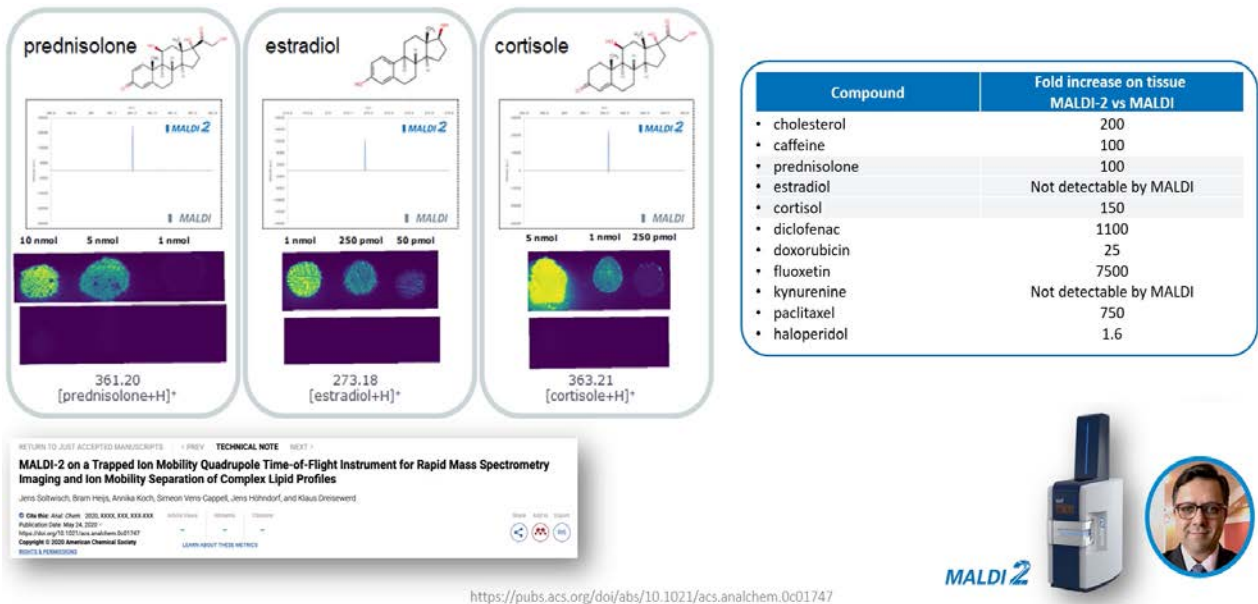


圖 2 使用 MALDI-2 後，小分子化合物的靈敏度得到數量級的提高

timsTOF fleX 在 timsTOF Pro 基礎上增加了 MALDI-2 功能，用 timsTOF fleX 一台儀器即可連接體液、細胞、組織所有研究內容，即空間定位體學 (SpatialOMx™)。以前在體學和疾病之間總有一道鴻溝，有些研究者做高品質的蛋白質體學、脂質體學或代謝體學等，特別是當他們使用 timsTOF Pro 時，他們希望和疾病、癌症患者的醫生交談，但這是一個艱難的對話，因為醫生讀的是組織切片。如果是一個習慣於整天看組織切片的人，旁邊需要有人研磨組織，然後執行 LC-MS 分析。因此兩者之間有一個中斷點，即使體學獲得了豐富的化學資訊，但卻與組織病理的條

件失去直接的關聯性。而 timsTOF fleX 是一台理想的儀器，它構建了一個把體學和疾病兩個領域結合在一起的系統，搭配今年推出的 MALDI-2，在 m/z 之外有離子遷移率的分離，除了得到更豐富的分析資訊，更能對相同質量分子做更細微的分離，如圖 3 所示。Bruker 是第一家從組織中提取細胞，再進行深層次蛋白質體學、代謝體學、脂質體學的公司，在此領域沒有競爭者，如果觀察一個病理組織切片，癌細胞擴散了，到底在哪裡？用 SpatialOMx 就可以了解，timsTOF fleX，在體學基礎和組織學基礎上，可以看到化學標誌物活動的資訊。

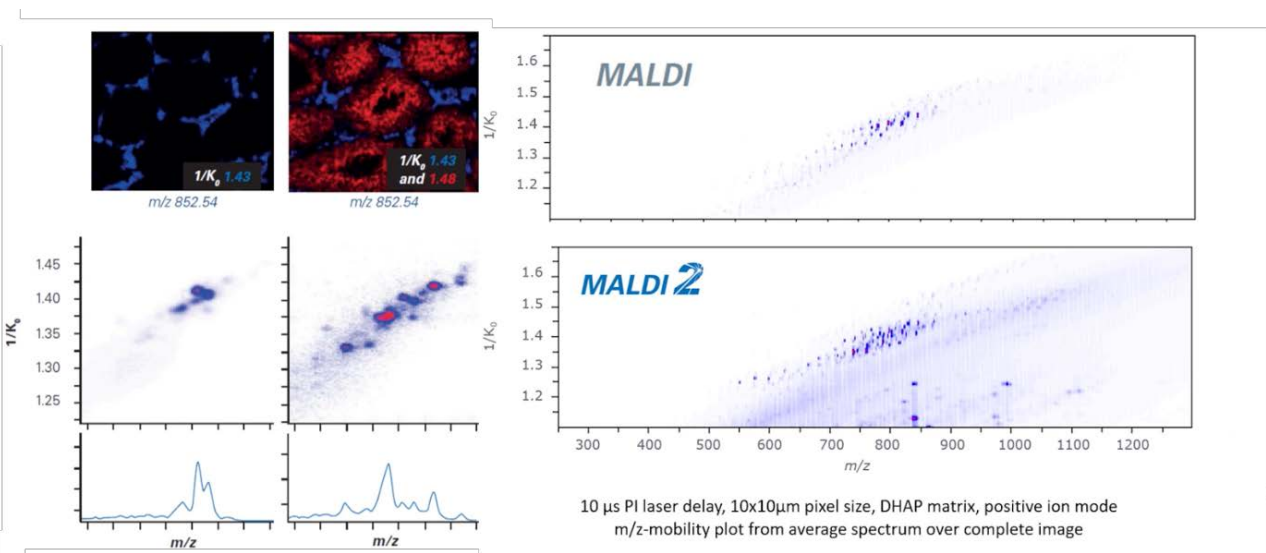


圖 3 在 timsTOF fleX 上運用 MALDI-2 後，大幅提升按照 CCS 離子遷移率分離的化合物訊號和成像品質

## 新的 PRM-PASEF 方法讓 4D-蛋白質體學分析技術更強大

在上一屆 ASMS 中，Bruker 與 Matthias Mann 發表了 4D 蛋白質體的 4D-DIA (diaPASEF) 技術，並展現其在深度、靈敏度、可靠性方面的優勢，進一步提高 30% 離子利用率 (如圖 4)，而至本屆 ASMS 中，diaPASEF 技術已臻成熟，進入到實用階段。常用的 DIA 資料庫搜尋軟體 Skyline 和 Spectrunaut 都已經全面支援 diaPASEF 資料處理，而 Spectrunaut 在本屆 ASMS 公佈最新的軟體版本，將功能擴展至 4D 平臺，進一步提高檢測的效率。

除了大規模的 discovery proteomics 分析，靶向的 targeted proteomics 技術同樣在驗證和臨床方面有主要應用前景。2019 年發佈的 diaPASEF 主要用於快速、大規模的定性，今年 ASMS 新發佈的 PRM-PASEF® 主要用於定量，在 timsTOF™ Pro 上，將 PASEF 與平行反應監測 (PRM) 相結合，使其非標記定量 (label-free) 蛋白質體學技術得到提升，利用 TIMS 的第 4 維分離與 PASEF 的高速掃描優勢，提高了多肽離子的選擇性和靈敏度，增加了標靶離子的數目 (圖 5)。Bruker 並與 Skyline 進行 PRM-PASEF 方法開發，現在 Skyline 軟體已經可以分析 PRM-PASEF 資料並生成定量分析報告。

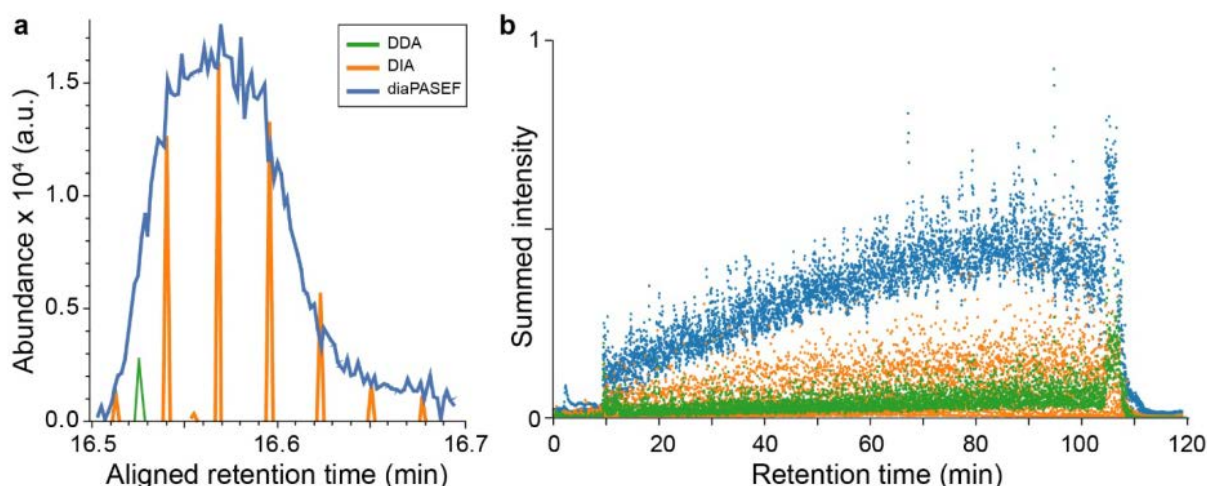


圖 4 不同資料獲取方法的效率。a. 碎片離子的提取離子層析圖，由 BSA 酶解的雙電荷 DLGEEHFK 母離子產生，對比 DDA、DIA 和 100% 週期利用的 diaPASEF 方法；b. 合計的提取離子層析圖，由一次實驗中 Hela 酶解的多電荷母離子產生，對比 DDA、DIA 和 25% 週期利用的 diaPASEF 方法

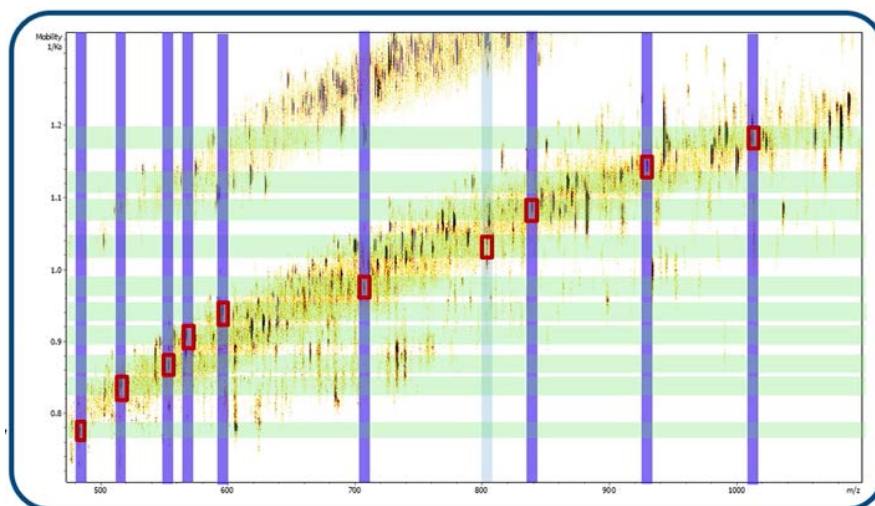


圖 5 PRM-PASEF 在 m/z 與離子遷移率上選擇 (圖中紅框)，增加了標靶離子的數目，提高多肽離子的選擇性

哈佛醫學院 Dana-Farber Cancer Institute 中 Brigham and Women's Hospital 副教授賈 Jarrod Marto 博士表示：「自從開始與 Bruker 合作開發 PRM-PASEF 以來，我們獲得了大幅進展。timsTOF Pro 超快的採集速度和離子遷移率資訊的獨特結合，使我們在臨床大量樣本研究中，能夠可靠地定量分析潛在的候選生物標誌物。此外，利用 PRM-PASEF 即時調整採集參數功能，增加用戶分析彈性，更可進一步提高離子利用率和分析通量。」

圖 6 顯示 PRM-PASEF 的定量表現。當不使用 tims 時，無論高濃度 (125 amol) 或低濃度

(31.25 amol)，碎片沖提的時間有所跳動，並且有許多干擾；然而，當使用 tims 增加分離維度時，高或低濃度的碎片沖提時間都被聚焦，也免除干擾訊號，此結果展示了 tims 在 PRM-PASEF 定量應用的可靠性。

來自 Luxembourg Institute of Health 的 Dr. Antoine Lesur，在今年 ASMS 中展示了使用 timsTOF Pro 的 PRM-PASEF 方法，使用 30 分鐘梯度在 100ng HeLa 裂解物基質中，外添加 215 個目標物進行定量分析，濃度範圍覆蓋 5 amol-50 fmol，有良好的檢量線 ( $R^2 > 0.999$ )，如圖 7。

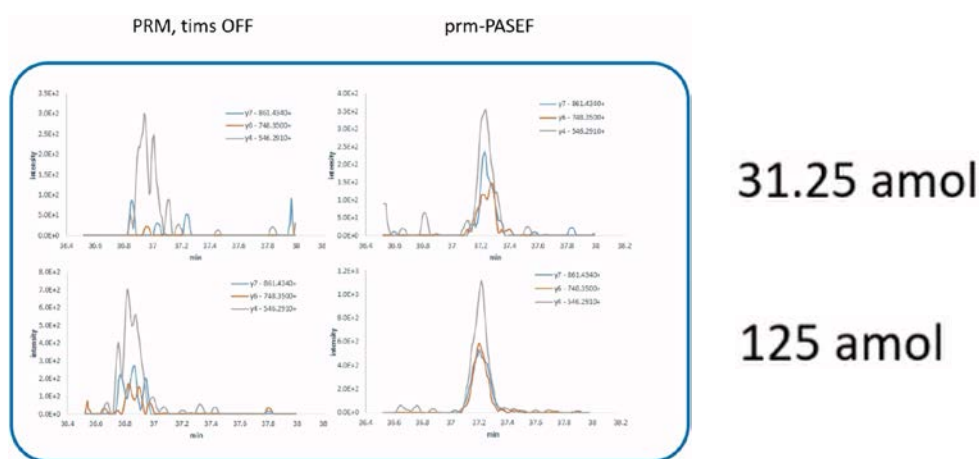


圖 6 PRM-PASEF 定量分析效能。左側僅運用四極桿選擇母離子，不同碎片彼此仍存在干擾，且沖提時間跳動；右側選擇離子遷移率後則會消除干擾，並聚焦碎片沖提時間，因此提升定量的準確度

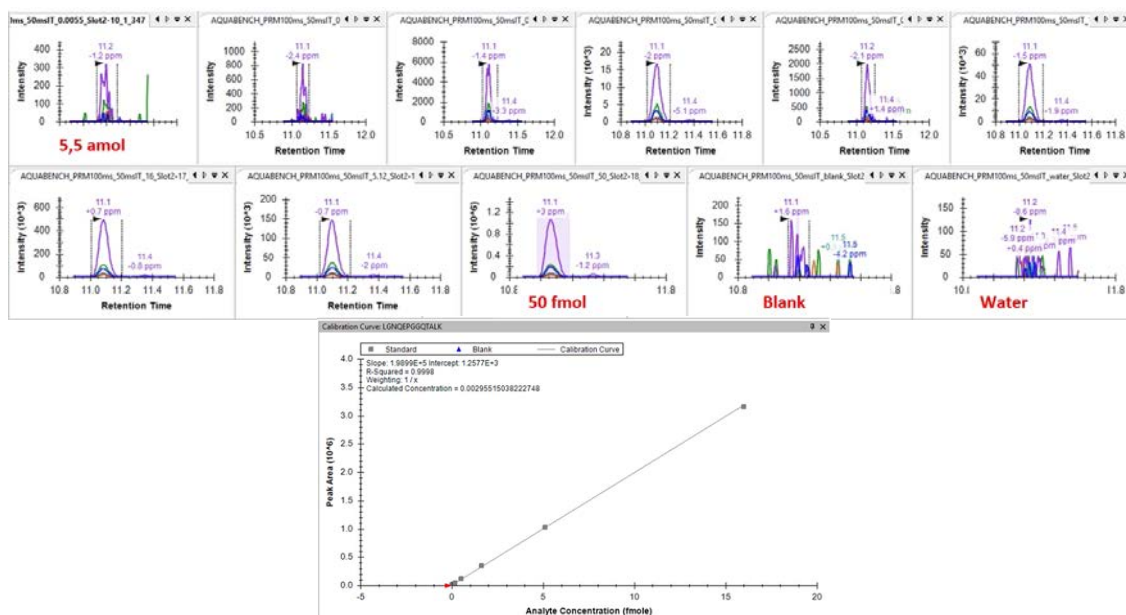


圖 7 基質為 100ng HeLa 裂解物，同時對 215 個目標分析物進行定量分析，30 分鐘梯度下獲得的該肽段定量結果，濃度範圍覆蓋 5 amol-50 fmol，具有良好線性

## 4D 蛋白質學結合深度學習，預測 CCS 數值提高鑑定可靠性

目前 4D 蛋白質組中的 CCS 值可用於相互比對，提高鑑定定性定量的能力。如果能夠提前確定 CCS 這個數字的絕對常量，那麼將能夠進一步提升其鑑定的可靠性。應用深度學習有望實現這一目標。Matthias Mann 在今年 ASMS 上做 “Deep learning the peptide universe from one million peptide collisional cross sections” 的口頭報告，展現該領域的最新進展，這為 4D 蛋白質組技術賦予新的能力。採用獨特的 TIMS

技術，多肽的 CCS 值可以被大規模精確測定，最近 Matthias Mann 教授團隊在 bioRxiv 上線上發表了題為《Deep learning the collisional cross sections of the peptide universe from a million training samples》的論文，研究中，他們在 timsTOF Pro 使用 PASEF 分析了來源於 5 種生物，並經過預分級的蛋白酶解物，進行大規模肽段碰撞截面積 CCS 測量。一共採集 360 針樣本得到 570,000 個 CCS 值，用於深度學習中的模型建立，藉此進行大規模多肽 CCS 值的預測 (圖 8)。

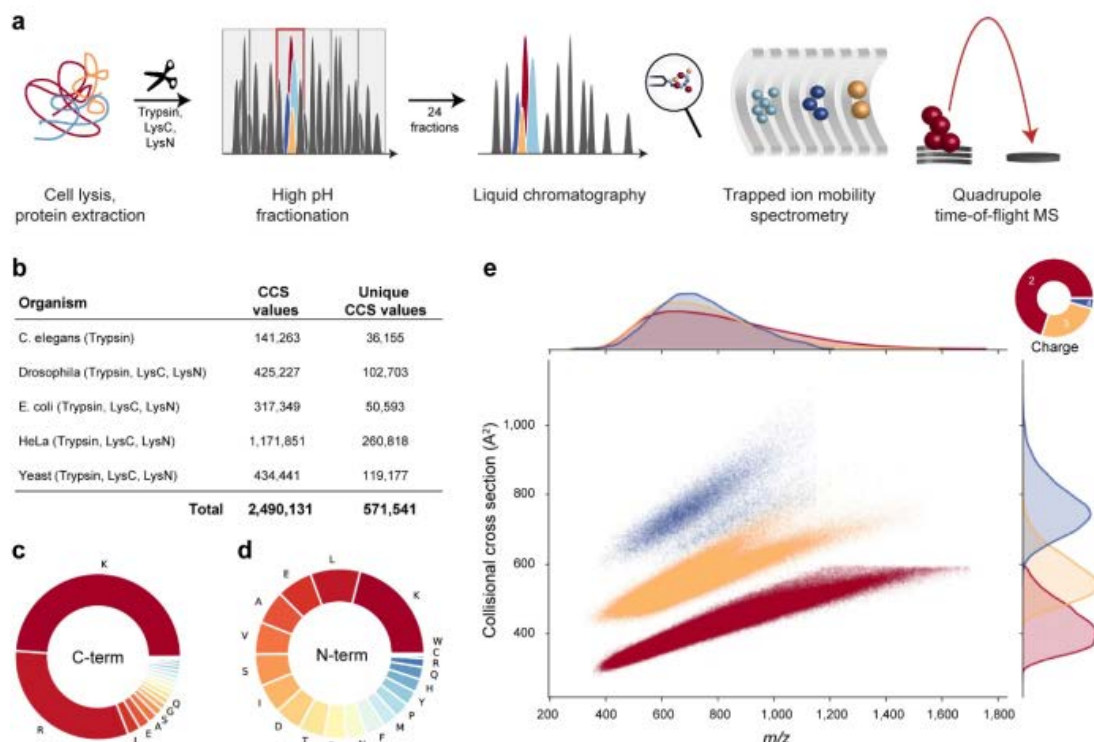


圖 8 a. 從全細胞蛋白質體提取到裂解，分級分離和層析分離至 timsTOF 質譜儀以 PASEF 模式運行的工作流程; b. 本研究中按生物源分列的 CCS 數據組; c. C-terminal 胺基酸頻率; d. N-terminal 胺基酸頻率; e. 559,979 特徵數據點對 CCS vs. m/z 分布，包括序列修飾與電荷數(以顏色區分)，m/z 與 CCS 值的密度分布各別投影在數軸的頂端與右側。

## “Run & Done” 即時搜尋引擎用於高通量 4D-蛋白質體學

蛋白質體資料量大，其資料庫搜尋的時間和計算資源都是導致通量無法提升的要因，在 4D 蛋白質體中，由於增加了新的維度，其資料計算的消耗資源相比傳統技術又會更加龐大。當前，

由於演算法和電腦性能的提升，Real-time 的即時搜尋方法成為了新的趨勢，於樣品分析進行數據採集的同時、同步進行數據處理資料庫搜尋的方式能夠大大提升蛋白質組技術的便捷性和檢測通量。

Bruker 在 ASMS 發表，傑出貢獻獎得主 John Yates 開發的 ProLuCID 搜尋工具，基於

GPU 計算的 Proteomic Pipeline ( IP2 ) 引擎已經可應用於 timsTOF Pro 產生的 4D 蛋白質體資料。這個運用 GPU 運算的獨特軟體由 Robin Park 博士開發，它允許使用者在資料擷取期間即時搜

尋 timsTOF Pro 的分析資料，資料擷取完成同時即可得到搜尋結果，進行大量多執行緒的平行計算，並將搜尋結果回傳至資料擷取控制軟體，指導質譜資料擷取，從而大幅縮短搜尋等待時間。

- IP2/GPU is developed by Robin Park, who works out of the Yates lab at TSRI. It is a GPU based search-engine that can be deployed stand-alone, on a HPC or the Cloud (AWS).
- As short gradients find wider use in translational proteomics, data processing requirements (speed) will need to be addressed.
- IP2/GPU software performs 'on-the-fly' search on a timsTOF Pro, providing search results as soon as the run is finished, in a method called, 'Run & Done'.



Prof. John Yates III, PhD  
Department of Molecular Medicine  
The Scripps Research Institute



Robin Park  
CEO IPA  
Staff Scientist Yates Lab  
The Scripps Research Institute

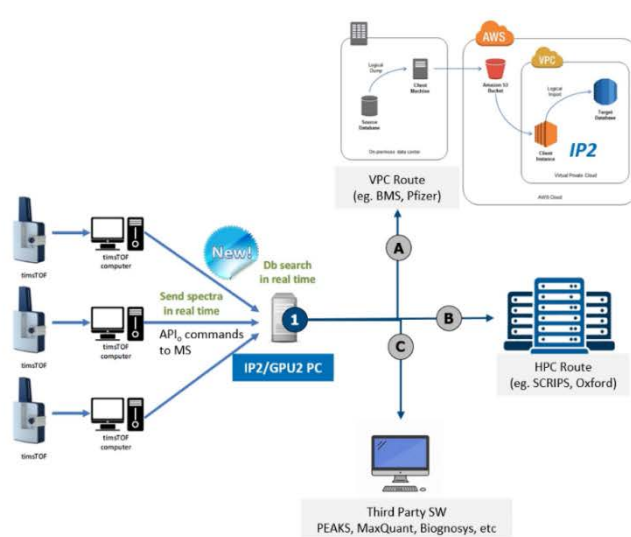


圖 9 timsTOF Pro “Run & Done” 即時搜尋示意圖，一旦完成資料分析也同時完成資料庫搜尋

## 結語

近三年 Bruker 質譜針對複雜科研市場推出大量高端產品，顯見重要的三大發展方向是：多體學、製藥(尤其是生物製藥)、空間定位成像技術。這三大領域也是本屆 ASMS Bruker 的重點。奠基於 PASEF 的穩定性、靈敏度和離子利用率近 100% 的短梯度方法，再隨著 MALDI-2、prm-PASEF 的推出、dia-PASEF 的日益成功，使

timsTOF Pro 或是 timsTOF fleX 具有將 4D-蛋白質體學轉化至臨床應用的能力。此外，tims 獨特的 MOMA ( Mobility Offset Mass Aligned ) 特性，能夠區分共同沖提出來的同分異構離子，得到對未知物更加專屬的 MS/MS 結果。MOMA 功能有助於提高使用短梯度時蛋白覆蓋率深度，這對蛋白質體學研究的用戶來說至關重要，如此一來能讓用戶每天在 timsTOF Pro 上分析 >50 個樣本。

## 參考文獻：

1. Jens Soltwisch, Hans Ketting, Simeon Vens-Cappell, Marcel Wiegelmann, Johannes Müthing, Klaus Dreisewerd. **Mass spectrometry imaging with laser induced postionization**. Science 10 Apr 2015: Vol. 348, Issue 6231, pp. 211-215.
2. Florian Meier, Andreas-David Brunner, Max Frank, Annie Ha, Eugenia Voytik, Stephanie Kaspar-Schoenefeld, Markus Lubeck, Oliver Raether, Ruedi Aebersold, Ben C. Collins, Hannes L. Röst, Matthias Mann, **Parallel accumulation – serial fragmentation combined with data-independent acquisition (diaPASEF): Bottom-up proteomics with near optimal ion usage**. bioRxiv preprint first posted online May. 31, 2019.
3. Jarrod J Sandow, Giuseppe Infusini, Laura F Dagley, Rune Larsen, Andrew I Webb, **Simplified high-throughput methods for deep proteome analysis on the timsTOF Pro**. bioRxiv preprint posted online June 3, 2019.
4. Florian Meier<sup>1</sup>, Niklas D. Köhler, Andreas-David Brunner, Jean-Marc H. Wanka, Eugenia Voytik, Maximilian T. Strauss, Fabian J. Theis and Matthias Mann, **Deep learning the collisional cross sections of the peptide universe from a million training samples**. bioRxiv preprint posted online May 21, 2020.