

甲醇介导的多膜集成过滤装置用于多组学样品的快速制备

闫 帅, 崔春萍, 秦伟捷, 张万军

(军事科学院军事医学研究院, 国家蛋白质科学中心, 医学蛋白质组学全国重点实验室, 北京 102206)

摘要: 高质量多组学数据的生成对样本制备技术的严谨性与可靠性提出了极高要求。然而, 当前该领域仍缺乏可同时兼顾高效、快速与稳定的多组学样品并行制备策略。本研究开发了甲醇介导的多膜集成过滤装置用于蛋白质组与代谢组样品并行快速制备(3M-Filter)的策略, 该方法处理细胞样品无需借助超声裂解辅助, 不仅缩短了额外的处理时间, 而且避免了下游污染。凝胶电泳实验证明, 3M-Filter 适用于细胞、组织及体液等多种类型样品的蛋白质捕获及代谢物小分子的同步提取。以 HeLa 细胞为模式样本, 在相同蛋白质起始量下, 3M-Filter 在蛋白质和多肽的鉴定深度、重复性、定量准确性、酶切效率及处理速度等方面均优于溶液酶切、过滤器辅助样品制备(FASP)和单管固相增强样品制备(SP3), 且适用于低至 5 000 个细胞的微量样品。与基于裂解液的蛋白质提取方法相比, 3M-Filter 在蛋白质与多肽的鉴定数量上更具优势, 且定量精度更高, 同时显著降低了氧化副反应修饰的发生率。3M-Filter 的关键优势是可在支持深度细胞蛋白质组分析的同时, 实现对细胞小分子代谢物的高覆盖检测(超过 2 000 个谱图特征)。综上, 3M-Filter 适用于珍贵临床样本的多组学样品制备, 为大规模队列分析提供了新的样品制备方案。

关键词: 蛋白质组学; 液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS); 样品前处理

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2026)03-0514-13

DOI: 10.7538/zpxb.2025.0137

CSTR: 32365.14.zpxb.2025.0137

3M-Filter: Rapid and Integrated Methanol-Mediated Multi-Omics Sample Preparation via Filter

YAN Shuai, CUI Chun-ping, QIN Wei-jie, ZHANG Wan-jun

(State Key Laboratory of Medical Proteomics, National Center for Protein Sciences (Beijing), Academy of Military Medical Sciences, Beijing 102206, China)

Abstract: High-quality multi-omics data generation for comprehensive molecular characterization demands stringent standards of robustness, reproducibility and time-efficiency in sample-preparation workflows. However, current mainstream methodologies in proteomics and metabolomics sample processing frequently compromise analytical depth to accelerate throughput, or necessitate discrete and independent pipelines for proteome and metabolome extraction, which critically limits the parallel multi-omics processing of scarce, low-input or clinically precious biological samples. To address this long-standing technical gap and develop an integrated sample preparation strategy, a

methanol-mediated, multi-membrane integrated filtration device for the rapid parallel preparation of proteome and metabolome samples, named methanol-mediated multi-omics via filter (3M-Filter), was developed in this study. The core 3M-Filter workflow relies on methanol-induced protein precipitation and immobilization on stacked functional membrane layers, while simultaneously enabling efficient solvent-phase collection of unbound small-molecule metabolites. This innovative design obviates the need for ultrasonic cell lysis, thus not only reducing total sample processing time but also mitigating the risk of exogenous contamination in downstream analyses. Systematic validation experiments, including sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), were conducted to verify the consistent performance of 3M-Filter in efficient protein capture and synchronous metabolite recovery from heterogeneous biological matrices, including cultured cells, solid tissues and biofluids. Further benchmark evaluations were conducted using HeLa cells as the model sample with identical initial protein inputs, in direct comparison with three mainstream sample preparation methods of traditional in-solution digestion, filter-aided sample preparation (FASP), and single-pot solid-phase-enhanced sample preparation (SP3). This study demonstrated that 3M-Filter achieved a superior depth of protein and peptide identifications, enhanced reproducibility across technical replicates, higher quantitative accuracy, and improved tryptic digestion efficiency compared with all three comparator workflows. Additionally, the 3M-Filter strategy exhibited exceptional throughput advantages and maintained stable analytical performance for ultra-low-input samples containing as few as 5 000 cells. Compared with conventional lysis-buffer-based protein extraction protocols, 3M-Filter yielded significantly increased numbers of identified proteins and peptides with elevated quantitative precision, while remarkably suppressing the incidence of oxidative side-chain modifications in proteins and peptides. A pivotal merit of 3M-Filter is its unique capacity to support deep-coverage cellular proteome analysis while concurrently enabling high-coverage detection of endogenous small-molecule metabolites, generating more than 2 000 detectable spectral features in this experimental setting and thus realizing true integrated proteome-metabolome profiling from a single aliquot of sample. Collectively, these comprehensive findings confirm that 3M-Filter is a rapid, reliable and scalable sample-preparation approach that retains high proteomic depth and quantitative fidelity, while facilitating extensive metabolomic characterization without additional sample consumption. Consequently, 3M-Filter is uniquely well adapted for multi-omics sample processing of limited or clinically valuable specimens, and further represents a practical, effective and novel alternative for large-scale cohort studies that require high-quality, parallel proteomic and metabolomic measurements from minimal sample input.

Key words: proteomics; liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); sample preparation

细胞、体液、组织等生物样品中蛋白质的表达水平蕴含着极为丰富的生理和病理信息,是阐明生命活动机制、发现生物标志物及筛选药物靶点的重要依据^[1-3]。近年来,基于液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术的自下而上蛋白质组学(bottom-up proteomics)在大规模蛋白质鉴定、定量及翻译后修饰分析中展现出卓越性能,极大地

推动了精准医学和系统生物学的进程^[4-6]。2024年,贺福初院士等^[7]在《Nature》期刊发表了关于人体蛋白质组导航计划(π -HuB)的前瞻性文章,进一步凸显了蛋白质组学在全球科学研究中的前沿地位和战略价值。然而,在蛋白质组学技术体系中,高效、稳定且重现性良好的样品制备是获取高质量数据的关键一环^[8]。

自下而上蛋白质组学的主流样品制备方法有溶液酶切(in-solution enzymatic digestion, In-Sol)、过滤器辅助样品制备(filter-aided sample preparation, FASP)、单管固相增强样品制备(single-pot solid-phase-enhanced sample preparation, SP3)以及悬架捕获(suspension trapping, S-Trap)等,它们均依赖去垢剂或高盐裂解液以实现细胞裂解与蛋白质提取^[9-15]。尽管这些方法已被广泛应用,但仍存在明显的局限性:它们往往需要额外的物理破碎(如超声)步骤和酶切前去除或稀释裂解液成分的操作,这不仅延长了实验时间、增加了样品损失风险,还可能引入更多的非天然化学修饰(如氧化修饰)、降低胰蛋白酶消化效率,进而提高质谱数据的复杂性、影响定性与定量的准确性。此外,基于酸裂解的策略,如简易提取和消化样品制备(sample preparation by easy extraction and digestion, SPEED)、自动无超声酸辅助蛋白质组(automated sonication-free acid-assisted proteomes, ASAP)等,虽在部分样品制备中表现良好,却无法兼容同一生物样本的多组学分析,尤其难以满足代谢组学的前处理要求^[16-17]。近年来出现的有机试剂辅助蛋白质固定方法,如基于过滤器的细胞内原位蛋白质组样品制备(on-filter in-cell, OFIC)以及增强的高效、有效且经济的蛋白质组分析技术(enhanced, efficient, effective, and economical technology for proteome analysis, E4technology)等,虽避免了裂解液的使用,但其在多组学样品同步前处理方面的潜力尚未得到系统评估^[18-20]。

本研究旨在针对上述问题开发一种甲醇介导的多膜集成过滤装置,用于蛋白质组及代谢组样品的并行制备(methanol-mediated multi-omics via filter, 3M-Filter)。该方法利用甲醇可以固定蛋白质于玻璃纤维隔离膜和并行提取代谢物的特性,通过一步法实现蛋白质回收与代谢分子萃取,以简化操作步骤、缩短处理时间、提高酶切效率,并最大限度减少多肽损失及外源性修饰的引入。希望在不影响蛋白质组学鉴定深度与重复性的前提下,提高样品制备效率、降低经济成本,同时提取完整、可分析的代谢组学样品,以实现蛋白质组与代谢组样本制备的高度集成,为同一生物样本的多组学联合分析提供快捷、可靠的样品制备平台。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

Orbitrap Fusion Lumos Tribid 三合一质谱仪、EASY-nLC 1200 纳升超高效液相色谱仪、NanoDrop One 超微量紫外分光光度计:美国 Thermo Scientific 公司产品;ExionLC AD 超高效液相色谱仪、TripleTOF 6600 质谱仪:美国 SCIEX 公司产品;TC20 自动细胞计数器:美国 Bio-Rad 公司产品;Concentrator plus 真空离心浓缩干燥仪:德国 Eppendorf 公司产品。

1.2 主要材料与试剂

磷酸缓冲盐溶液、甲醇(质谱级)、乙腈(质谱级)、甲酸(质谱级):美国 Thermo Fisher 公司产品;乙醇(分析纯):天津市富宇精细化工有限公司产品;丙酮(分析纯):国药集团化学试剂有限公司产品;胰蛋白酶:南京逸微健华生物科技有限公司产品;尿素(Urea)、三氟乙酸(TFA)、氯乙酰胺(CAA)、三乙基铵碳酸氢盐溶液(TEAB):美国 Sigma-Aldrich 公司产品;十二烷基硫酸钠(SDS):北京吉普赛生物技术有限公司产品;去氧胆酸钠(SDC):北京百灵威科技有限公司产品;玻璃纤维隔离膜(glass fiber separator)、C18 膜:北京邦菲生物科技有限公司产品;Amicon® Ultra 超滤离心管(30 ku)、三(2-羧乙基)膦溶液(TCEP):美国 Merck 公司产品;SP3 磁珠(Sera-Mag SpeedBeads):美国 GE Healthcare 公司产品;银染试剂盒:江苏康为世纪科技股份有限公司产品;三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)缓冲液:北京索莱宝科技有限公司产品。

1.3 生物样本的收集

1.3.1 细胞样品 HeLa 细胞在 Dulbecc 改良的 Eagle 培养基(DMEM)中培养,并添加 10%(V/V)胎牛血清和青霉素-链霉素(100 U/mL),置于 37 °C、5%CO₂ 条件下孵育;用冰冷的磷酸盐缓冲盐水(1×PBS)冲洗细胞 2 次,采用刮取解离,向解离的细胞中加入 1×PBS;离心收集细胞沉淀,再用 1×PBS 冲洗 2 次;根据细胞浓度将其分装为所需用量,再次离心弃去上清液;将收集的细胞沉淀,−80 °C 保存,待后续处理(离心条件 1 000×g, 4 °C, 3 min)。

1.3.2 组织样品 将 50 mg 小鼠脑组织置于研磨管中,加入 500 μL 尿素裂解液(8 mol/L 尿素、50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)及不锈钢珠;使用组

织破碎仪于 4 °C 下破碎, 离心(12 000×g, 4 °C, 15 min)后吸取中层液相(避开上层脂质与下层不溶物)进行后续分析。代谢组学样品制备前需在液氮环境下充分研磨。

1.3.3 血浆样品 取-80 °C 冻存血浆样本于冰上复融, 浑浊样本经预离心(12 000×g, 4 °C, 5 min)后取上清液进行后续分析。

1.3.4 尿液样品 取-80 °C 冻存尿液样本于冰上复融, 离心后取上清液, 加入 3 倍体积的-20 °C 丙酮, 于-20 °C 静置 30 min, 离心后取沉淀进行后续分析(离心条件 12 000×g, 4 °C, 30 min)。

1.4 蛋白质组学实验流程

1.4.1 细胞裂解与蛋白提取 将裂解液加入冻存 HeLa 细胞(1×10^5)沉淀, 通过移液器反复吹打充分分散细胞。将裂解液转移至接触式超声仪中, 于冰浴条件下超声处理(超声功率 200 W, 脉冲周期 1 s 工作/1 s 暂停, 总时长 5 min), 经 16 000×g, 4 °C 下离心 10 min 后, 取上清液。

1.4.2 还原烷基化 向蛋白提取液加入终浓度为 10 mmol/L TCEP 与 40 mmol/L CAA, 涡旋混匀后, 于 25 °C 下反应 60 min 或于 95 °C 下反应 10 min。

1.4.3 溶液酶切 使用 50 mmol/L TEAB 缓冲液将还原烷基化后的蛋白溶液稀释, 使尿素浓度小于或等于 1 mol/L, 加入 0.5 μg 胰蛋白酶, 置于 37 °C 热振荡仪中, 以 1 300 r/min 振荡孵育 4 h, 随后再加入等量胰蛋白酶, 继续振荡孵育 8 h。

1.4.4 SP3 样品制备 在离心管中将 SP3 磁珠按 10:1(w/w, 磁珠/蛋白)的比例与还原烷基化后的蛋白溶液混合, 加入等体积的 100%乙醇并充分混匀, 置于 24 °C 热振荡仪中, 以 1 000 r/min 振荡孵育 15 min, 促使蛋白与磁珠结合。利用磁力架, 使用 80%乙醇对结合蛋白的磁珠洗涤 3 次。在磁珠上进行酶解时, 加入以 50 mmol/L TEAB 缓冲液配制的 0.5 μg 胰蛋白酶溶液, 置于 37 °C 热振荡仪中, 以 1 300 r/min 振荡孵育 4 h, 随后再加入等量胰蛋白酶, 继续振荡孵育 8 h。最后, 将离心管置于磁力架上静置 2 min, 转移含多肽的上清液; 再加入 50 mmol/L TEAB 清洗磁珠, 于磁力架上静置 2 min, 合并 2 次收集的上清液。

1.4.5 过滤器辅助样品制备 在 24 °C 恒温离心机中采用 30 ku 超滤离心管进行处理: 将还原烷基化后的蛋白溶液加入滤管中, 再加入 200 μL 8 mol/L 尿素缓冲液进行离心处理; 随后以 200 μL

50 mmol/L TEAB 缓冲液洗涤 4 次(离心条件 14 000×g, 每次 15 min); 更换收集管后, 向滤管内加入以 50 mmol/L TEAB 缓冲液配制的 0.5 μg 胰蛋白酶, 37 °C 下静置孵育 4 h, 随后再加入等量胰蛋白酶, 继续振荡孵育 8 h; 经 14 000×g 离心 5 min 收集多肽, 随后加入 200 μL 超纯水并再次离心洗脱。

1.4.6 C18 除盐 采用移液器吸头固相萃取柱对 SP3、FASP、溶液酶切所得的多肽进行除盐处理: 将 3 层 C18 膜堆叠装入 200 μL 吸头底部, 依次以 100 μL 乙腈、50%乙腈(含 0.1%TFA, *V/V*)、0.1%TFA(*V/V*)活化填料, 通过离心驱动流速(1 000×g, 30 s)。将胰酶消化液重复加载至固相萃取柱(sample loading)3 次, 采用 300 μL 0.1%TFA 水溶液除盐; 随后以 300 μL 50%乙腈(含 0.1%TFA)洗脱多肽, 于 45 °C 下真空离心干燥, -80 °C 保存; 使用 0.1%甲酸溶液复溶后, 即可用于质谱检测。

1.4.7 3M-Filter 用于蛋白质组样品制备实验流程 用打孔器将 C18 膜和玻璃纤维隔离膜裁剪成合适的尺寸, 置于滤管底部, 并放入密封圈, 使用前加入 50 μL 甲醇进行离心预润洗处理。向细胞沉淀加入 200 μL -20 °C 预冷的甲醇, 涡旋至充分分散, 冰上静置孵育 10 min 后转移至滤管中, 离心后用甲醇清洗 1 次, 收集流穿液用于代谢组学分析。向 3M-Filter 装置的滤管内加入 10 mmol/L TCEP、40 mmol/L CAA、50 mmol/L TEAB 溶液, 于室温反应 60 min 或 95 °C 反应 10 min, 随后冷却至室温; 加入以 50 mmol/L TEAB 缓冲液配制的适量胰蛋白酶, 37 °C 下静置孵育 4 h, 随后再加入等量胰蛋白酶, 继续孵育 8 h; 加入终浓度为 1%TFA 终止反应, 离心以加载多肽(重复加载流穿液有助于提高多肽回收率), 并依次用 0.1%TFA 除盐、50%乙腈(含 0.1% TFA, *V/V*)洗脱; 45 °C 真空干燥后, 使用 0.1%甲酸溶液复溶, 即可用于质谱检测。

对于细胞裂解液样品, 需先进行还原烷基化处理, 再加入终浓度为 1%TFA 及 4 倍体积甲醇, 充分混匀以沉淀蛋白; 将全部样品转移至滤管中, 1 000×g 离心 1 min。含高浓度盐或 SDS 等强去垢剂的样品需依次用 90%甲醇清洗 3 次、0.1%TFA 清洗 1 次, 清洗时均在 1 000×g 下离心 1~3 min, 以完全去除杂质。后续的胰酶消化和

多肽处理步骤与甲醇固定方法一致。

1.5 代谢组学样品制备实验流程

1.5.1 3M-Filter 用于代谢组学样品制备实验流程 将 3M-Filter 甲醇固定细胞与清洗步骤中产生的流穿液合并, 质谱检测前加入终浓度 0.1% 甲酸。当生物量浓度(biomass concentration)较低时, 可将样品置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷 30 min, 再进行真空离心冻干, 干燥后的样品于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。质谱检测前加入适量体积的溶液(根据色谱条件选择), 使样品达到理想的最终生物量浓度, 涡旋至充分混匀, 经 $16\ 000\times\text{g}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min 后, 取上清液用于质谱检测。

1.5.2 蛋白沉淀法用于代谢组学样品制备实验流程 将预冷的 80% 甲醇加入生物样品(体液样品中加入纯甲醇使终浓度为 80%) 中, 涡旋至充分混匀, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h, 经 $16\ 000\times\text{g}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min 后, 取上清液用于质谱检测。

1.6 液相色谱及质谱参数设置

1.6.1 蛋白质组学色谱条件 使用 NanoDrop One 超微量分光光度计在 205 nm 处测定多肽浓度, 多肽进样量 $0.6\ \mu\text{g}$; 使用 EASY-nLC 1200 纳升超高效液相色谱仪在 C18 色谱柱 ($30\ \text{cm}\times 150\ \mu\text{m}$) 分离多肽, 填充粒径为 $1.9\ \mu\text{m}$ ReproSil C18 树脂; 柱温 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$; 流速 $600\ \text{nL}/\text{min}$ 。流动相由 0.1% 甲酸(A)和含有 0.1% 甲酸的 80% 乙腈(B)组成。多肽分离梯度洗脱: $0\sim 7\ \text{min}(7\%\sim 12\%\text{B})$, $7\sim 51\ \text{min}(12\%\sim 32\%\text{B})$, $51\sim 64\ \text{min}(32\%\sim 45\%\text{B})$, $64\sim 66\ \text{min}(45\%\sim 95\%\text{B})$, $66\sim 75\ \text{min}(95\%\text{B})$ 。

1.6.2 蛋白质组学质谱条件 在数据依赖性采集(DDA)模式下进行样本分析。高能碰撞解离(HCD)碎裂方式, 正离子模式扫描, 循环时间 2 s; 一级质谱参数: 检测器类型 Orbitrap, 分辨率 120 000, 质量扫描范围 $m/z\ 300\sim 1\ 100$, 自动增益控制(AGC) 1×10^6 , 最大注入时间 50 ms; 二级质谱参数: 分离模式 Quadrupole, 分离窗口 $m/z\ 1.6$, 检测器类型 Ion Trap, AGC 为 Standard, 最大注入时间 35 ms, 质谱数据由 Xcalibur 实时采集。

1.6.3 代谢组学色谱条件 使用 ExionLC AD 超高效液相色谱仪进行分离, 通过双喷雾离子源(DuoSpray Ion Source)在线连接 TripleTOF 6600 质谱仪。代谢物在 C18 色谱柱(Kinetex[®] $2.6\ \mu\text{m}$ C18 $100\ \text{\AA}$, LC Column $100\ \text{mm}\times 2.1\ \text{mm}$) 上分离, 柱温 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 流速 $0.35\ \text{mL}/\text{min}$, 流动相由 0.1% 甲

酸(A)和含有 0.1% 甲酸的乙腈溶液(B)组成。代谢物分离梯度洗脱: $0\sim 1\ \text{min}(5\%\text{B})$, $1\sim 2\ \text{min}(5\%\sim 35\%\text{B})$, $2\sim 8\ \text{min}(35\%\sim 95\%\text{B})$, $8\sim 10\ \text{min}(95\%\text{B})$, $10\sim 10.1\ \text{min}(95\%\sim 5\%\text{B})$, $10.1\sim 12\ \text{min}(5\%\text{B})$ 。

1.6.4 代谢组学质谱条件 在 DDA 模式下进行样本分析。设置离子源温度 $500\text{ }^{\circ}\text{C}$, 气帘气压强 $2.41\times 10^5\ \text{kPa}$, 离子源气体 1、2 压强均设为 $3.42\times 10^5\ \text{kPa}$, 去簇势能 80 V, 一级扫描类型 TOF MS, 累积时间 0.15 s, 正离子模式, 每周检测的最大候选离子数为 15, 勾选动态背景排除。二级扫描类型 Product Ion, 高灵敏模式, 累积时间 0.035 s, 碰撞能量 35 V, 碰撞能量扩散 15 V, 循环时间 0.725 s。

1.7 数据分析

1.7.1 蛋白质组学数据分析 采用 Maxquant(2.4.2) 软件对质谱原始数据进行分析, 用于检索的人类与小鼠数据库均于 2025 年 5 月 26 日从 UniProt 数据库下载, 人类数据库共包含 20 422 个蛋白质, 小鼠数据库共包含 17 237 个蛋白质^[21]。参数设置如下: 胰蛋白酶最大漏切位点设为 2; 肽谱匹配(PSM)和蛋白质的假发现率(FDR)均设为不超过 1%; 蛋白质 N 端乙酰化(acetyl/+42.011 u)与甲硫氨酸氧化(oxidation/+15.995 u)设为可变修饰, 半胱氨酸烷基化(carbamidomethyl/+57.021 u)设为固定修饰。

1.7.2 代谢组学数据分析 采用 MExplorer Ultimate v1.3.0.270(227) 软件对质谱原始数据进行谱图特征提取, 算法选择中心化质谱方法提峰参数(默认)。

1.7.3 KEGG 富集分析 采用 OmicShare Tools 在线工具进行分析。

2 结果与讨论

2.1 实验方案设计

本研究开发并系统评估了一种基于甲醇引导的多膜集成过滤装置, 用于蛋白质组与代谢组样品的并行制备(3M-Filter)。该方法的核心创新在于, 借助一套自制的简易装置, 将原本分散、耗时且易引入样品损失的多个组学样品制备操作无缝整合, 在单管内完成包括代谢物提取、蛋白质固定、还原烷基化、原位酶切及多肽除盐等多组学样品制备全流程。

3M-Filter 滤管装置由过滤单元(滤管)和收集管两部分组成。过滤单元采用多层结构设计,包括密封圈、玻璃纤维隔离膜和 C18 膜。其中,玻璃纤维隔离膜与 C18 膜均具有良好的机械强度和柔韧性,而非脆性材料,因此可使用打孔器手工裁剪为所需尺寸,便于定制化和实验室自行制备。密封圈位于功能膜层的顶部,保障了整个体系的密封性,使液体在离心时仅能通过功能膜层,而无法从膜材与管壁的间隙渗漏,这一设计有效避免了样品绕流导致的非特异性损失,提高了样品回收率的稳定性和重现性。针对不同的样品输入量,本研究开发了 2 种规格的装置:常量规格(Micro trap)适用于蛋白质含量 20~200 μg 的样品;微量规格(Mini trap)适用于蛋白质含量低于 20 μg 的样品,示于图 1。

3M-Filter 在结构设计与 FASP 类似,均采用过滤装置进行样品处理,但其在实际应用中展现出多方面的显著优势。首先,3M-Filter 通过甲醇固定策略可快速提取蛋白质,而 FASP 使用超滤管、裂解液,在处理含 DNA 链的样品时,需额外增设超声辅助及清洗步骤,延长了实验时间。其次,3M-Filter 装置集成 C18 膜,能够在同一封

闭系统内完成包括除盐在内的蛋白质组样品制备全流程,极大提升了操作的密闭性和可靠性,避免了因样品在不同容器间转移所产生的吸附、残留及交叉污染风险,从而显著提高了低丰度蛋白质鉴定的重现性。此外,相较于 FASP 需引入可能干扰胰酶消化与质谱鉴定的变性剂和高浓度盐组分,3M-Filter 的甲醇固定策略不仅缩短了样品前处理时间,还能有效降低氧化等外源性修饰的引入。该系统适用于细胞、体液和组织等多种生物样品类型,能够近乎无损地高效捕获各类蛋白质。最重要的是,3M-Filter 支持蛋白质组与代谢组样品的并行快速制备,借助甲醇作为通用介质,可同步实现蛋白质固定与代谢物提取,成功解决了珍贵样本在多组学分析中难以快速、高效分离蛋白质与代谢物的技术痛点。

2.2 3M-Filter 适用于不同类型样品的多组学分析

为评估 3M-Filter 对蛋白质的固定能力,本研究将细胞、血浆、组织和尿液样品在甲醇固定 (MeOH-fixation load) 及清洗 (MeOH washes) 步骤所产生的流穿液冻干,并与滤膜上固定的蛋白质同时进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

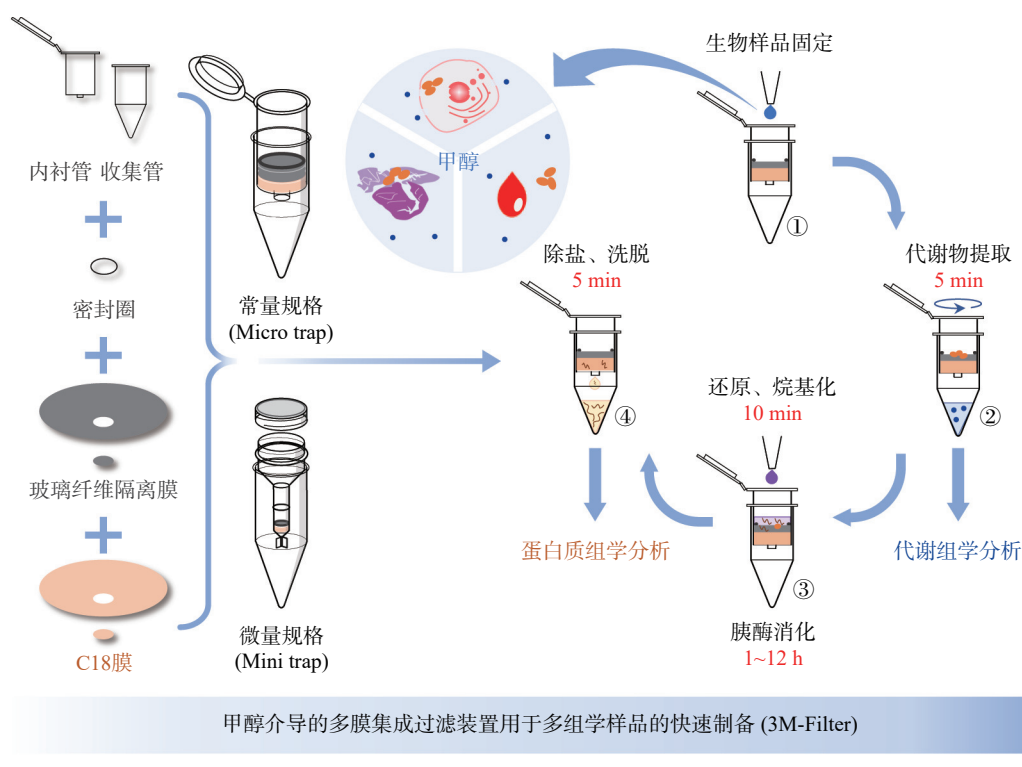
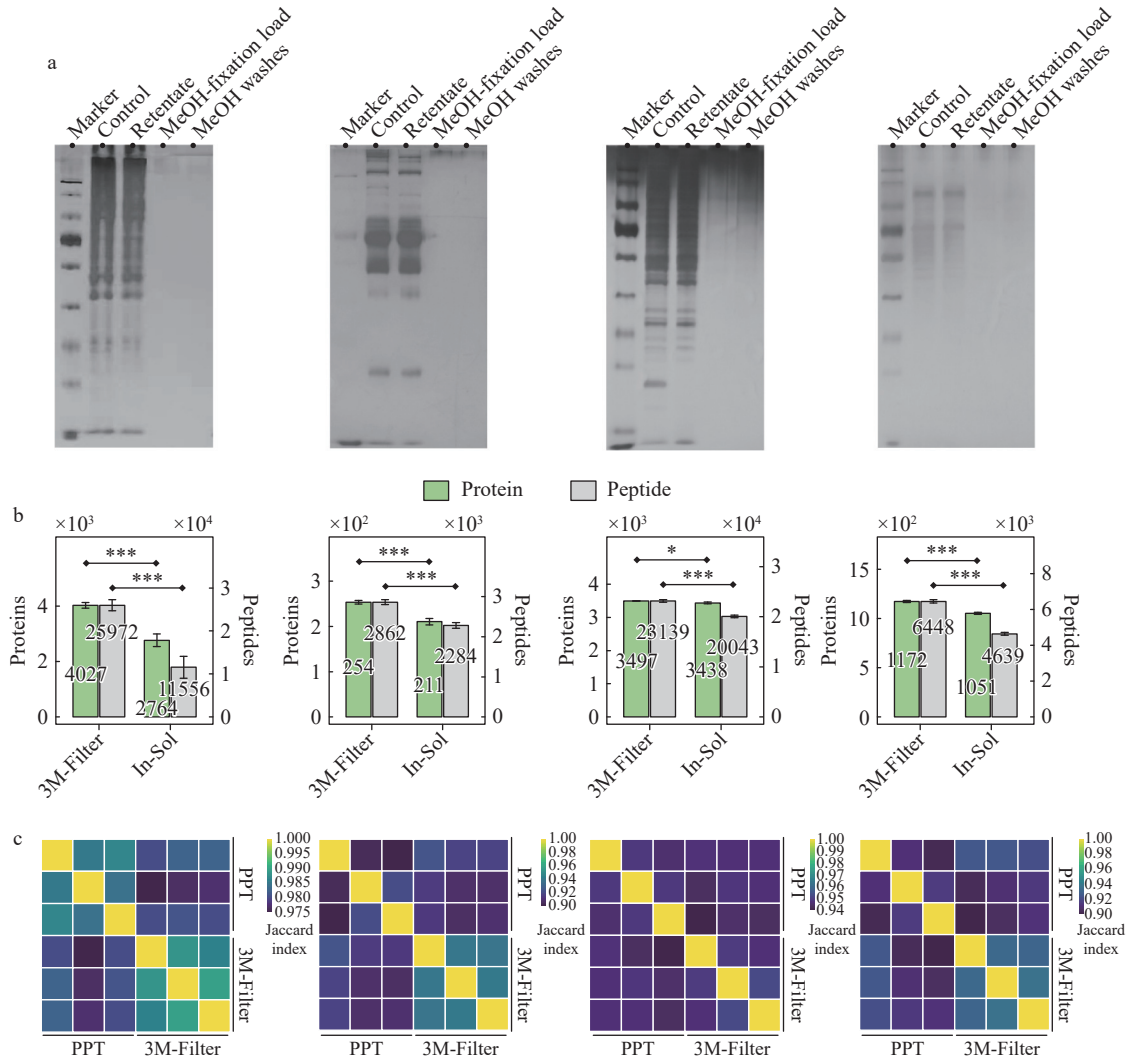


图 1 3M-Filter 的实验流程

Fig. 1 Workflow of the 3M-Filter method

(SDS-PAGE)及银染分析。结果显示,在各样品流穿液通道中均未观察到蛋白质条带;而滤膜固定组分(retentate)通道中可见丰富且清晰的蛋白质条带,其条带分布及灰度与全蛋白裂解液对照组(control)基本一致,示于图2a。流穿液未检出蛋白质残留,表明该方法在处理复杂生物样品时

具有较高的稳健性(robustness),可有效避免样品损失引入的系统误差,这对于微量临床样本(如穿刺活检组织或体液外泌体)处理尤为重要。因此,3M-Filter能高效固定各类样品中的蛋白质,这是保证方法的广泛适用性、提高多肽回收率并实现深度蛋白质组覆盖的重要前提。



注: a. 从左至右依次为细胞、血浆、组织及尿液样品经 3M-Filter 捕获蛋白质后的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染分析结果;其中, control 通道对应各类型样品的全蛋白, retentate 为 3M-Filter 过滤后保留的蛋白, MeOH-fixation load、MeOH washes 分别为甲醇固定、清洗步骤中的流穿液。b. 从左至右依次为 3M-Filter 和溶液酶切方法制备细胞、血浆、组织及尿液蛋白质组样品的质谱鉴定结果;其中*、***分别表示 $p \leq 0.05$ 、 $p \leq 0.001$ 。c. 从左至右依次为细胞、血浆、组织及尿液使用 PPT 和 3M-Filter 制备代谢组样品检测谱图特征峰 Jaccard 系数热图

图 2 3M-Filter 适用于制备多类型样品的蛋白质组学和代谢组学样品

Fig. 2 Applicability of 3M-Filter for proteomic and metabolomic sample preparation across multiple sample types

为系统考察 3M-Filter 对样品的适用性,本研究将其与蛋白质组学中经典的 In-Sol 法、代谢组学常用的蛋白沉淀法(PPT)这 2 种传统样品前处

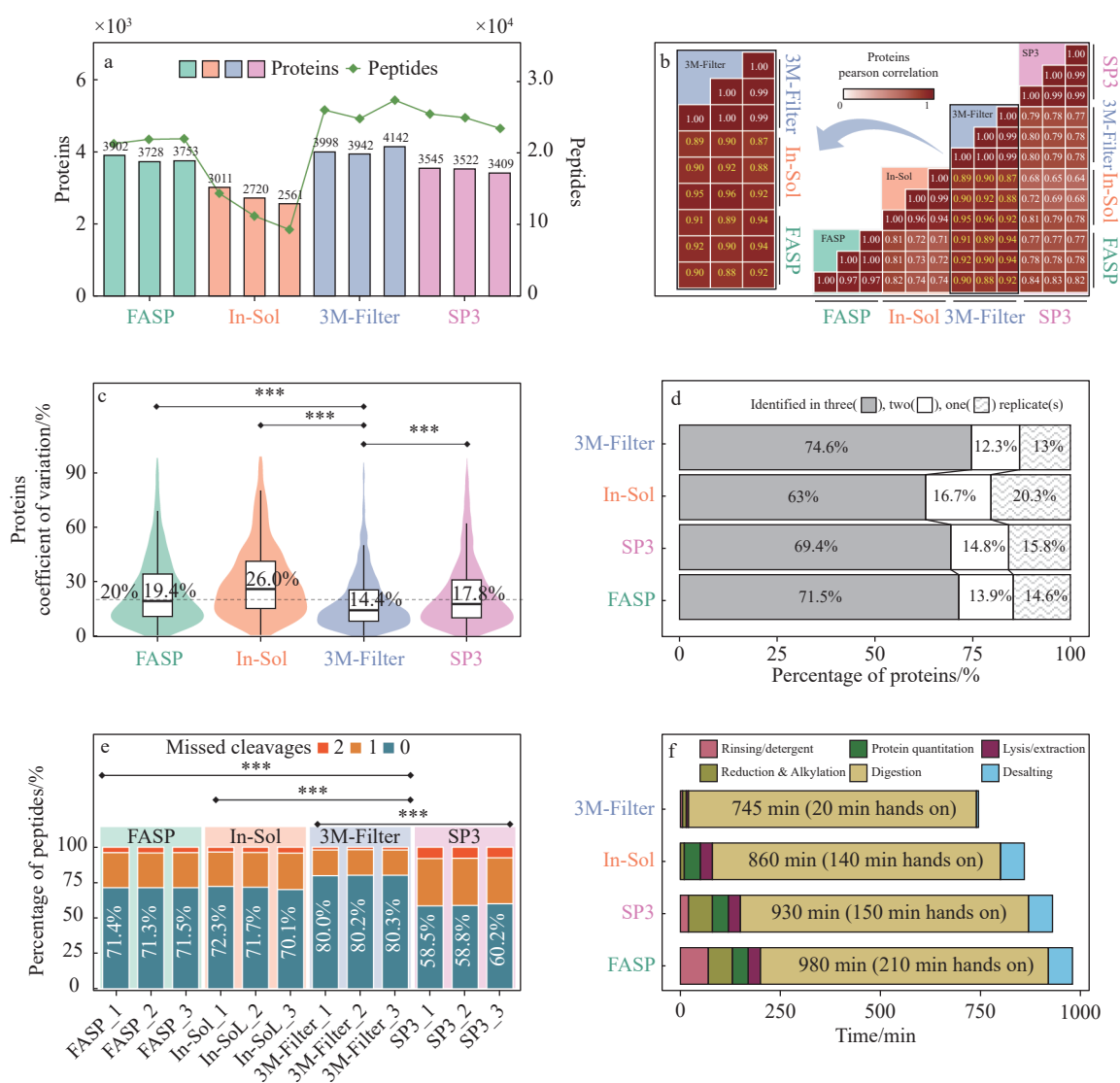
理方法进行平行对比。结果显示:在蛋白质组学方面,3M-Filter 显著提高了培养细胞、血浆样品蛋白质的鉴定量,对于组织、尿液样品蛋白质的

鉴定量略有提高,且对于所有类型样品的多肽鉴定量均有显著提高,示于图 2b;在代谢组学方面, Jaccard 系数热图显示, 2 种方法各自 3 个重复样本内部的相似性系数均处于高值区间 (>0.8), 表明在离子峰检测层面具有良好的重复性和一致性, 示于图 2c。

2.3 3M-Filter 与现有蛋白质组样品制备方法的比较

为系统评估 3M-Filter 的性能, 本研究将其与主流样品制备方法, 如 FASP、SP3 和 In-Sol 进行

平行比较。在样品输入量均为 10 万个 HeLa 细胞的条件下, 3M-Filter 在多个关键性能指标上的表现更佳。首先, 3M-Filter 通过 3 次独立重复实验鉴定到超过 4 000 个蛋白质和 25 000 条多肽, 鉴定数量超过其他方法, 结果示于图 3a。这表明 3M-Filter 集成蛋白提取、酶切、除盐全流程的设计, 能够尽可能减少容器间的样品转移, 降低管壁吸附和操作误差引入的样品损失, 从而将更多的起始蛋白转化为可分析的多肽。相关性分析显示, 3M-Filter 技术重复之间蛋白质定量相关



注: a. 各方法鉴定的蛋白质及多肽数量; b. 不同方法间蛋白质定量相关性分析; c. 各方法技术重复中共有蛋白质的定量变异系数分布; d. 各方法 3 次技术重复中共同鉴定的蛋白质占比; e. 各方法胰酶消化多肽的漏切率分布, *** 表示 $p \leq 0.001$; f. 各方法的实验操作时长及总时长对比

图 3 3M-Filter 与传统蛋白质组样品制备方法的比较

Fig. 3 Comparison of 3M-Filter with conventional proteomics sample preparation methods

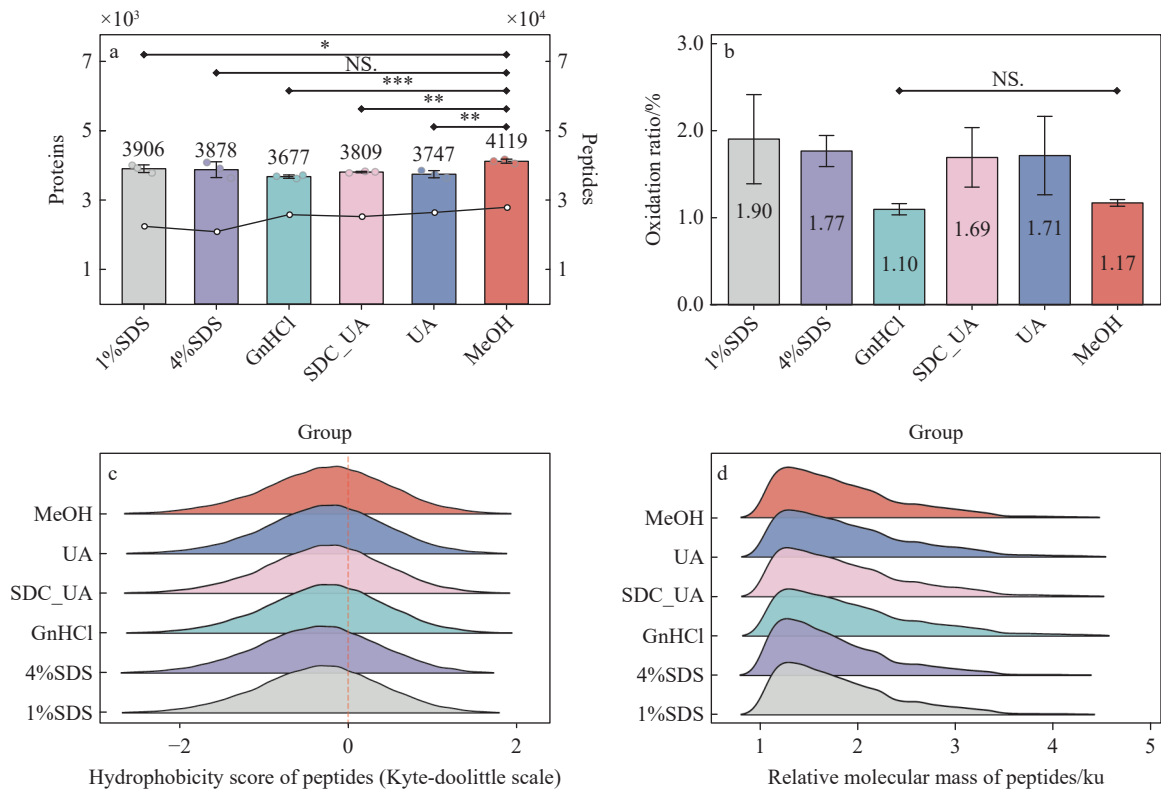
性在 0.99 以上, 且与 FASP 的相关性较高, 表明 3M-Filter 以类似的膜过滤方式纯化蛋白, 但其甲醇固定蛋白与全流程集成化策略可减少约 3 h 的实验操作时间, 示于图 3b。对各方法技术重复中共有蛋白质的定量结果进行分析, 结果显示, 3M-Filter 变异系数(CV)的中位数最低, 为 14.4%, 表明其在定量精准度上优势显著, 示于图 3c。对各方法蛋白质鉴定的重复性进行分析, 结果显示, 3M-Filter 在 3 次技术重复中均鉴定到的蛋白质占比最高, 达 74.6%, 示于图 3d。更低的定量 CV 和更高的重复性意味着方法具有更好的稳健性, 这对于依赖定量比较的蛋白质组学研究(如标志物筛选、药物作用机制研究)至关重要。在胰酶消化的多肽漏切率方面, 3M-Filter 同样表现出更优的性能, 其完全酶切(0 missed cleavage)的多肽比例最高, 平均为 80.1%, 较 FASP 方法高出 8.7%, 示于图 3e。更完全的胰酶消化不仅提升了多肽的鉴定数量, 也提高了蛋白质鉴定的准确性。值得注意的是, 上述性能的提升是在显著

缩短实验时间的条件下实现的, 与 FASP 相比, 实验操作时间减少了约 90%, 总时长缩短了约 25%, 这一特点与质谱技术不断向高通量发展的趋势一致, 示于图 3f。

2.4 3M-Filter 实验流程的系统优化

2.4.1 不同细胞裂解方式对 3M-Filter 使用的影响评估

为系统评估 3M-Filter 装置对不同裂解液的兼容性, 本研究对几种常见裂解液提取的蛋白质处理效果与甲醇固定策略(MeOH)进行比较。所用裂解液中的缓冲液均使用 50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)配制, 其中的变性剂分别为 4% SDS(w/w)、1% SDS(w/w)、8 mol/L UA、含 1% SDC 的 8 mol/L UA(SDC-UA)以及 6 mol/L 盐酸胍(GnHCl)。不同裂解液所提取的蛋白质经清洗后, 与 MeOH 组接受相同的 3M-Filter 方法进行后续处理。结果显示, MeOH 组在蛋白质和多肽鉴定数量上显著高于除 4% SDS 外的其他裂解液组, 示于图 4a。这一差异可能与甲醇固定策略避免使用高浓度盐、去垢剂等干扰质谱检测的物



注: a. MeOH 组与各裂解液组的蛋白质及多肽鉴定数量, NS、*、**、*** 分别表示 $p > 0.05$ 、 $p \leq 0.05$ 、 $p \leq 0.01$ 、 $p \leq 0.001$; b. 各组多肽的氧化修饰比例; c. 基于 Kyte-Doolittle 标度的各组鉴定多肽的亲疏水性分布; d. 各组鉴定多肽的相对分子质量分布, 其中 1 ku=1000 u

图 4 使用 3M-Filter 时不同细胞蛋白提取方式对鉴定结果的影响

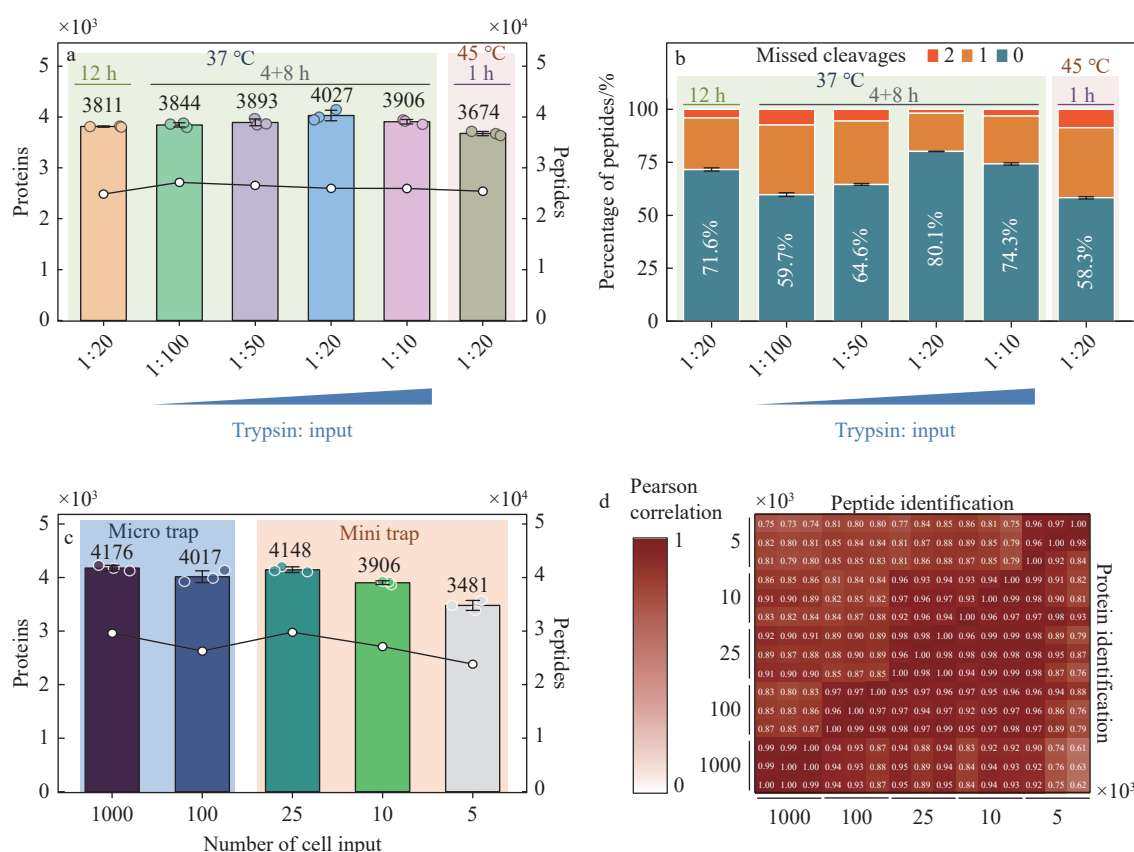
Fig. 4 Impact of different cellular protein extraction approaches on identification results using 3M-Filter

质有关。在多肽外源性修饰方面,所有组别都不可避免地引入了一定比例的氧化修饰,而 MeOH 组的氧化修饰比例为 1.17%,与最低的 GnHCl 组无显著差异,示于图 4b。推测该优势源于甲醇固定大幅缩短了样品处理时间,从而避免了水溶性氧气在裂解环境中的氧化作用。此外,3M-Filter 的集成化设计尽可能地减少了样品与空气的接触,因此所有组别的氧化修饰水平均处于较低范围内(最高为 1.90%)。进一步分析显示,各组所鉴定的多肽除鉴定量存在差异外,在基于 Kyte-Doolittle 标度的亲疏水性和相对分子质量的分布上高度一致,示于图 4c、4d,这表明甲醇固定策略未对蛋白质组的质谱鉴定带来系统性偏差,同时显著提升了鉴定效果。

2.4.2 胰蛋白酶酶切方式、时间及蛋白输入量对 3M-Filter 使用的影响 尽管基于甲醇固定的原位酶切策略使胰酶用量无法通过测量蛋白浓

度来精确计算,但实验结果表明,由于 3M-Filter 能够避免裂解液成分对酶活性的影响,在一定范围内,胰酶用量及添加方式的变化对蛋白质和多肽鉴定量的影响较小,示于图 5a。此外,可通过细胞计数估算样本中蛋白质含量,本研究推荐按胰酶:蛋白质理论含量=1:20(w/w)分 2 次(间隔 4 h)添加胰酶,于 37 °C 下共孵育 12 h 可达到最佳酶切效果;如需快速完成样品处理,也可在 45 °C 孵育 1 h,但这会造成鉴定深度和酶切效率出现一定程度的降低,示于图 5b。

另外,本研究评估了 3M-Filter 在微量样品中的应用效果。尽管微量组由于未经除盐且回收的多肽较少,既无法通过稀释减弱缓冲盐引发的基质效应,同时又受质谱仪灵敏度的限制,进而导致鉴定深度随细胞输入量下降而有所降低,但仍保持较好的定性性能,示于图 5c。相关性分析显示,在细胞样品输入量为 5 000 至 100 万个范



注: a. 不同胰酶用量及添加方式对样品中蛋白质和多肽鉴定量的影响; b. 不同孵育温度(37、45 °C)和时间下的酶切效果对比; c. 不同 HeLa 细胞输入量(5 000 至 100 万个)样品的蛋白质鉴定深度; d. 不同 HeLa 细胞输入量(5 000 至 100 万个)样品的组内技术重复及组间蛋白质和多肽鉴定的相关性分析

图 5 胰酶消化及样品输入量条件的系统测评

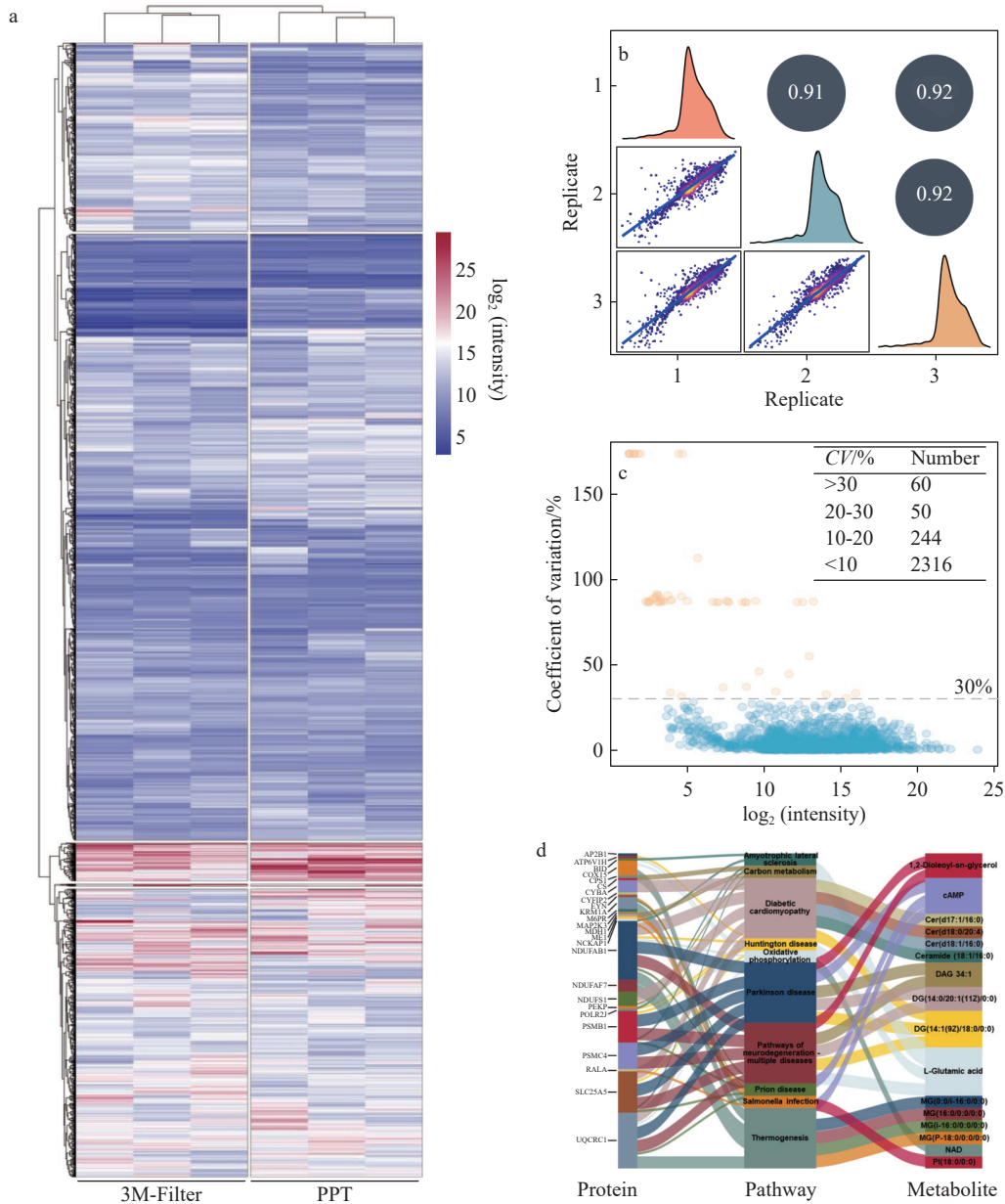
Fig. 5 Systematic evaluation of trypsin digestion and sample input amount conditions

围内,组内技术重复及组间蛋白质和多肽定量结果均表现出良好的一致性,示于图 5d。实验表明,3M-Filter 兼容从常量到最低 5 000 个 HeLa 细胞的样本,能够满足翻译后修饰多肽富集、微量样品处理等各类实验的需求。

2.5 3M-Filter 在同一样品代谢组学以及多组学联合分析上的应用

为进一步验证 3M-Filter 策略在同一样品中

对代谢组样品制备性能及蛋白质组数据联合分析的适用性,本研究以 10 万个 HeLa 细胞为模式样品,将细胞经甲醇固定与清洗后所得的流穿液加入终浓度为 0.1%甲酸后进行代谢组质谱检测,并与 PPT 法提取代谢物的检测结果进行比较。实验结果表明,3M-Filter 与 PPT 法经 3 次技术重复检测到的谱图特征定量强度基本一致,示于图 6a,其中,3M-Filter 3 次技术重复相关性良



注: a. 3M-Filter 与 PPT 谱图特征定量值热图; b. 3M-Filter 3 次技术重复定量值的相关性分析; c. 3M-Filter 3 次技术重复的代谢物谱图特征定量值 CV 分布; d. 10 万个 HeLa 细胞通过 3M-Filter 方法并行处理,同步获取蛋白质组与代谢物数据,蛋白质(左)、富集 KEGG 通路(中)及代谢物(右)之间的关联分析

图 6 3M-Filter 在同一个样品中代谢组学与多组学关联分析上的应用

Fig. 6 Application of 3M-Filter for metabolomics and multi-omics association analysis in the same sample

好, 示于图 6b。3M-Filter 质谱检测结果中 97% 以上的谱图特征定量值 CV 低于 30%, 示于图 6c, 表明该方法在代谢组样品制备中具有优异的重复性和定量稳定性。通过 KEGG 富集分析得到了 HeLa 细胞经 3M-Filter 方法处理后的蛋白质组与代谢组数据关联可视化结果, 示于图 6d。综上, 3M-Filter 实现了同一样品中蛋白质组学样品制备与代谢物提取的并行处理, 为 2 种组学数据的通路层级关联分析提供了样品制备层面的技术支持。

3 结论

本研究建立了一种基于甲醇介导的多膜集成过滤装置用于多组学样品并行制备的快捷方法——3M-Filter, 实现了在同一装置中高效完成两类组学样品的同步制备。与 FASP、SP3 和 In-Sol 等主流方法相比, 3M-Filter 在多个维度表现出明显优势: 显著提高了蛋白质和多肽的鉴定深度、定量重复性与酶切效率, 相较于 FASP 缩短了约 90% 的实验操作时间, 并且降低了实验操作的复杂性与成本投入。该方法适用于多类型样本, 且在微量样本(如 5 000 个细胞)中仍保持稳健性能, 有效避免了常见裂解液额外引入的外源修饰干扰。在代谢组学方面, 3M-Filter 所获代谢物谱图具有高度的重复性与定量准确性, 表明其在多组学整合分析中具备良好的兼容性与可靠性。综上, 3M-Filter 是一种高效、经济且易操作的样品前处理平台, 特别适用于微量、珍贵临床样本的高通量多组学研究, 为生物标志物发现和大规模队列分析提供了解决方案。未来工作可致力于推动该方法的自动化与标准化, 以促进其更广泛的科研转化与应用推广。

参考文献:

- [1] ZHAI Y, CHEN L, ZHAO Q, ZHENG Z, CHEN Z, BIAN H, YANG X, LU H, LIN P, CHEN X, CHEN R, SUN H, FAN L, ZHANG K, WANG B, SUN X, FENG Z, ZHU Y, ZHOU J, CHEN S, ZHANG T, CHEN S, CHEN J, ZHANG K, WANG Y, CHANG Y, ZHANG R, ZHANG B, WANG L, LI X, HE Q, YANG X, NAN G, XIE R, YANG L, YANG J, ZHU P. Cysteine carboxyethylation generates neoantigens to induce HLA-restricted autoimmunity[J]. *Science*, 2023, 379(6 637): eabg2482.
- [2] XING X, CAI L, OUYANG J, WANG F, LI Z, LIU M, WANG Y, ZHOU Y, HU E, HUANG C, WU L, LIU J, LIU X. Proteomics-driven noninvasive screening of circulating serum protein panels for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 8 392.
- [3] KAUFMANN M, SCHAUPP A L, SUN R, COSCIA F, DENDROU C A, CORTES A, KAUR G, EVANS H G, MOLLBRINK A, NAVARRO J F, SONNER J K, MAYER C, DeLUCA G C, LUNDEBERG J, MATTHEWS P M, ATTFIELD K E, FRIESE M A, MANN M, FUGGER L. Identification of early neurodegenerative pathways in progressive multiple sclerosis[J]. *Nature Neuroscience*, 2022, 25(7): 944-955.
- [4] GUO T, STEEN J A, MANN M. Mass-spectrometry-based proteomics: from single cells to clinical applications[J]. *Nature*, 2025, 638(8 052): 901-911.
- [5] BAI B, VANDERWALL D, LI Y, WANG X, POUDEL S, WANG H, DEY K K, CHEN P, YANG K, PENG J. Proteomic landscape of Alzheimer's disease: novel insights into pathogenesis and biomarker discovery[J]. *Molecular Neurodegeneration*, 2021, 16(1): 55.
- [6] XIA L, KONG X, SONG H, HAN Q, ZHANG S. Advances in proteome-wide analysis of plant lysine acetylation[J]. *Plant Communications*, 2022, 3(1): 100 266.
- [7] HE F, AEBERSOLD R, BAKER M S, BIAN X, BO X, CHAN D, CHANG C, CHEN L, CHEN X, CHEN Y J, CHENG H, COLLINS B C, CORRALES F, COX J, E W, van EYK J E, FAN J, FARIDI P, FIGEYS D, GAO G, GAO W, GAO Z, GODA K, BIN GOH W W, GU D, GUO C, GUO T, HE Y, HECK A J R, HERMJAKOB H, HUNTER T, IYER N G, JIANG Y, JIMENEZ C R, JOSHI L, KELLEHER N L, LI M, LI Y, LIN Q, LIU C, LIU F, LIU G, LIU Y, LIU Z, LOW T Y, LU B, MANN M, MENG A, MORITZ R L, NICE E, NING G, OMENN G S, OVERALL C M, PALMISANO G, PENG Y, PINEAU C, POON T C W, PURCELL A W, QIAO J, REDDEL R R, ROBINSON P J, RONCADA P, SANDER C, SHA J, SONG E, SRIVASTAVA S, SUN A, SZE S K, TANG C, TANG L, TIAN R, VIZCAÍNO J A, WANG C, WANG C, WANG X, WANG X, WANG Y, WEISS T, WILHELM M, WINKLER R, WOLLSCHIED B, WONG L, XIE L, XIE W, XU T, XU T, YAN L, YANG J, YANG X, YATES J, YUN T, ZHAI Q, ZHANG B, ZHANG H, ZHANG L, ZHANG

- L, ZHANG P, ZHANG Y, ZHENG Y, ZHONG Q, ZHU Y. π -HuB: the proteomic navigator of the human body[J]. *Nature*, 2024, 636(8 042): 322-331.
- [8] JIANG Y, REX D A B, SCHUSTER D, NEELY B A, ROSANO G L, VOLKMAR N, MOMENZADEH A, PETERS-CLARKE T M, EGBERT S B, KREIMER S, DOUD E H, CROOK O M, YADAV A K, VANUOPADATH M, HEGEMAN A D, MAYTA M L, DUBOFF A G, RILEY N M, MORITZ R L, MEYER J G. Comprehensive overview of bottom-up proteomics using mass spectrometry[J]. *ACS Measurement Science Au*, 2024, 4(4): 338-417.
- [9] WIŚNIEWSKI J R, ZOUGMAN A, NAGARAJ N, MANN M. Universal sample preparation method for proteome analysis[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 359-362.
- [10] HUGHES C S, MOGGRIDGE S, MÜLLER T, SORENSEN P H, MORIN G B, KRIJGSVELD J. Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments[J]. *Nature Protocols*, 2019, 14(1): 68-85.
- [11] ZOUGMAN A, SELBY P J, BANKS R E. Suspension trapping (S-Trap) sample preparation method for bottom-up proteomics analysis[J]. *Proteomics*, 2014, 14(9): 1 006-1 000.
- [12] ELINGER D, GABASHVILI A, LEVIN Y. Suspension trapping (S-trap) is compatible with typical protein extraction buffers and detergents for bottom-up proteomics[J]. *Journal of Proteome Research*, 2019, 18(3): 1 441-1 445.
- [13] HAILEMARIAM M, EGUEZ R V, SINGH H, BEKELE S, AMENI G, PIEPER R, YU Y. S-Trap, an ultrafast sample-preparation approach for shotgun proteomics[J]. *Journal of Proteome Research*, 2018, 17(9): 2 917-2 924.
- [14] LIN Y H, EGUEZ R V, TORRALBA M G, SINGH H, GOLUSINSKI P, GOLUSINSKI W, MASTERNAK M, NELSON K E, FREIRE M, YU Y. Self-assembled STrap for global proteomics and salivary biomarker discovery[J]. *Journal of Proteome Research*, 2019, 18(4): 1 907-1 915.
- [15] MOGGRIDGE S, SORENSEN P H, MORIN G B, HUGHES C S. Extending the compatibility of the SP3 paramagnetic bead processing approach for proteomics[J]. *Journal of Proteome Research*, 2018, 17(4): 1 730-1 740.
- [16] DOELLINGER J, SCHNEIDER A, HOELLER M, LASCH P. Sample preparation by easy extraction and digestion (SPEED)-a universal, rapid, and detergent-free protocol for proteomics based on acid extraction[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2020, 19(1): 209-222.
- [17] BARNABAS G D, GOEBELER V, TSUI J, BUSH J W, LANGE P F. ASAP-Automated sonication-free acid-assisted proteomes-from cells and FFPE tissues[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(6): 3 291-3 299.
- [18] ELSAYYID M, TANIS J E, YU Y. Simple in-cell processing enables deep proteome analysis of low-input *caenorhabditis elegans*[J]. *Analytical Chemistry*, 2025, 97(17): 9 159-9 167.
- [19] MARTIN K R, LE H T, ABDELGAWAD A, YANG C, LU G, KEFFER J L, ZHANG X, ZHUANG Z, ASAREOKAI P N, CHAN C S, BATISH M, YU Y. Development of an efficient, effective, and economical technology for proteome analysis[J]. *Cell Reports Methods*, 2024, 4(6): 100 796.
- [20] HATANO A, TAKAMI T, MATSUMOTO M. *In situ* digestion of alcohol-fixed cells for quantitative proteomics[J]. *Journal of Biochemistry*, 2023, 173(4): 243-254.
- [21] COX J, MANN M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized ppb-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(12): 1 367-1 372.

(收稿日期: 2025-10-31; 修回日期: 2025-12-30)