说明

公司资质：

公司需具有成熟的管理和服务体系，具备标准的生产流程、完善的质控体系及高素质的检验人员，通过ISO9001质量管理体系认证、Illumina CSPro认证。与国内外高水平科研机构有广泛合作经验，并有高质量的基因组、转录组、蛋白组及多组学相关的发表文章积累。有大数据分析的核心技术能力及经验，能够满足甲方的后续个性化分析需求。公司质谱平台需已发表Science、Cell、Nature、Gut、PNAS等高水平客户文章。

目的：

1. 4D-DIA蛋白质组检测：基于4D平台tims TOF Pro 2），完成人胰腺组织蛋白组检测工作并对数据进行质控/分析，蛋白质的鉴定结果要达到8000个，并完成常规的组学分析及甲方要求的个性化分析（详见技术与参数表）。

2. 非靶代谢组检测：基于Thermo Q ExactiveTM HF (-X)，完成人胰腺组织非靶向代谢组检测工作并对数据进行质控/分析，并完成常规的组学分析及甲方要求的个性化分析（详见技术与参数表）。

3.多组学联合个性化分析：需按甲方的合理个性化需求，提供满意的分析报告。

附：

技术与参数

1. 4D-DIA蛋白质组

2.1基于4D平台tims TOF Pro 2质谱仪，完成人胰腺组织蛋白组检测工作并对数据进行质控/分析。蛋白质的鉴定结果要达到8000个。

2.2 4D-DIA蛋白质组分析

1）服务范围：对样本进行DIA蛋白组检测：样品提取，质检，DDA建库，对DDA，DIA数据进行质控，原始数据搜库解谱，对总蛋白功能注释，蛋白质定量结果，进行蛋白差异分析，差异蛋白富集分析，差异蛋白互作分析；

2）使用设备要求：4D平台TIMS-TOF Pro2；

3）检测要求：

DDA模式液质检测：nanoElute- tims TOF pro2：配制流动相A液（100%水、0.1%甲酸）和B液（100%乙腈、0.1%甲酸）。使用10 μL A液溶解冻干粉末，4℃下14000 g离心20 min，取上清200 ng样品进样，液质检测。使用nanoElute纳升级UHPLC系统，分析柱为（25 cm×75 μm, 1.6 μm），液相色谱洗脱条件如表4所示。使用tims TOF pro2质谱仪，Captive Spray离子源，设定离子喷雾电压为1.5 kV，质谱全扫描范围为m/z 100-1700，Ramp time 100 ms，Lock Duty Cycle to 100%，PASEF settings: 10 MS/MS scans (总循环时间1.17sec)，离子强度阈值2500，Scheduling目标强度为20000；生成质谱检测原始数据（.d），用于构建DDA谱图库。

DIA模式液质检测：nanoElute- tims TOF pro2：配制流动相A液（100%水、0.1%甲酸）和B液（100%乙腈、0.1%甲酸）。使用10μL A液溶解冻干粉末，4℃下14000 g离心20 min，取上清200 ng样品进样，液质检测。使用nanoElute纳升级UHPLC系统，分析柱为（25 cm×75 μm, 1.6 μm），液相色谱洗脱条件如表4所示。使用tims TOF pro2质谱仪， Captive Spray离子源，设定离子喷雾电压为1.5 kV，质谱全扫描范围为m/z 100-1700，Ramp time 100 ms，Lock Duty Cycle to 100%；扫描窗口大小25Da，淌度窗口个数为2。生成质谱检测原始数据（.d）。

1. 检测结果统计要求：

根据人蛋白数据库使用搜库软件 Spectronaut-Pulsar (Biognosys）搜索 DDA扫描模式下机数据。搜库参数设置如下：前体离子的质量容差为 10 ppm，碎片离子的质量容差为0.02 Da。固定化修饰为半胱氮酸的烷基化修饰，可变修饰为甲硫氡酸氧化修饰，N 端为乙酰化修饰，允许最多2个漏切位点。为了提高分析结果质量，Spectronaut-Pulsar 软件对检索结果进一步过滤：可信度在 99%以上的谱肽 （Peptide Spectrum Matches，简称 PSMs）为可信 PSMs，至少包含一 个 unique

肽段(特有肽段〉的蛋白为可信蛋白，只保留可信的谱肽和蛋白，并做 FDR 验证，去除 FDR大手 1%的肽段和蛋白。将DIA 数据导入Spectronaut 软件，根据 pulsar 构建 DDA 数据库提取离子对色谱峰，讲行子离子几配和峰面积计算，实现对肽段的同时定性和定量。利用样品中加入的 RT 讲行保留时间校正，前体离子 Qvalue cutoff 值设为0.01。用T-test 检验对蛋白质定量结果进行统计分析，将实验组和对照组之间定量差异品著的蛋白质(0<0.05 1022FCI>\* (FC>\* or FC<\* [fold change,FCJ定义为差异表达蛋白 (DEP)。

1. 结果分析要求：QC质控分析+标准数据分析+高级生物信息学分析。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 1 | 服务内容 | 4D-DIA蛋白定量质谱检测 | |
| 2 | 标准分析内容 | 原始数据搜库解谱 | 1. 使用Spectronaut-Pulsar 搜库软件对DDA扫描方式得到的下机文件，进行搜库解谱，将谱图信息转化为蛋白质信息，同时进行DDA数据质控，将质控后的数据导入Spectronaut构建出一个真实的谱图库DDA library。通过Spectronaut将DIA扫描方式得到的下机谱图文件比对到DDA library进行蛋白鉴定。 |
| 数据质控 | 2. 搜库完成后，对数据进行质控 |
| DDA数据指控 |
| 2.1肽段长度分布 |
| 2.2母离子质量容差分布 |
| 2.3 Unique肽段数分布 |
| 2.4蛋白覆盖度分布及蛋白分子量分布 |
| DIA数据指控 |
| 2.5 DIA数据的蛋白质鉴定数据累积回收率 |
| 2.6 Average data points per peak色谱峰平均数据点 |
| 2.7 Peak capacity 峰能力 |
| 2.8 iRT 的检出率 |
| 2.9 Protein FDR |
| 2.10 Clustering DIA数据的聚类分析 |
| 定量分析 | 3 . 蛋白质定量结果 |
| 3.1 定量结果统计（总差异蛋白数、上/下调数量） |
| 3.2火山图分布 |
| 3.3 检出蛋白层次聚类分析 |
| 3.4 检出蛋白K-means聚类分析 |
| 3.5差异蛋白层次聚类分析（有生物学重复样品） |
| 3.6差异蛋白K-means聚类分析 |
| 3.7修饰位点定量分析 |
| 3.8差异修饰位点激酶分析 |
| 重复性分析 | 4. 定量结果重复性分析（有生物学重复样品） |
| 蛋白功能分析 | 5. 蛋白质功能注释 |
| 5.1 总蛋白功能注释 |
| 5.1.1 总蛋白GO注释 |
| 5.1.2 总蛋白KEGG注释 |
| 5.1.3 总蛋白COG注释 |
| 5.1.4 总蛋白结构域注释 |
| 5.1.5 亚细胞结构定位分析 |
| 5.1.6 不同功能注释韦恩图分析 |
| 5.2差异蛋白富集分析 |
| 5.2.1 GO富集分析 |
| 5.2.2结构域富集分析 |
| 5.2.3 KEGG富集分析 |
| 5.2.4差异蛋白亚细胞定位 |
| 5.3蛋白质互相作用网络图 |
| 5.4 WGCNA绘制 |
| 5.5 GSEA 分析 |
| 关联分析 | 6. 蛋白质组与转录组关联分析 |
| 6.1.转录组和蛋白质组表达调控分析 |
| 6.2.转录组和蛋白质组表达量关联分析 |
| 6.3.转录组和蛋白质组GO功能富集分析 |
| 6.4.转录组和蛋白质组GO功能富集聚类热图 |
| 6.5.转录组和蛋白质组KEGG通路富集分析 |
| 3 | 其他分析 | 其他个性化分析 | 客户提出需求，后台评估后，进行可行性反馈及分析 |

6）项目验收要求：每例样本检测不低于8000个蛋白。

7）售后服务：数据验收合格后，至少提供1年的售后服务；提供技术培训及咨询服务；给出文章投稿建议，并提供文章杂志要求的分辨率和大小合格的图表；对审稿人的修回意见提供专业答复供参考；对蛋白组学生物信息进行培训。

2.3 交付期限：

承诺在样本检测合格后35个自然日内交付数据。

2.4 交付形式：

提供原始数据，质控报告，结题报告，结果文件等；数据交付根据采购人需求提供硬盘、ftp或云传输等多种途径交付形式。

1. 非靶代谢组

3.1基于Thermo Q ExactiveTM HF (-X)高分辨质谱仪，完成人胰腺组织样本非靶代谢组检测工作并对数据进行质控/分析。

3.2 LC-MS非靶向代谢组检测分析

1）服务范围：对胰腺组织样本进行非靶代谢组学检测：样品提取，等量混匀制备QC，上机检测，对下机数据数据进行质控，原始数据搜库解谱，对代谢物进行功能注释，对定量结果进行差异分析，功能富集分析；

2）使用设备要求：Q Exactive™ HF-X；分辨率≧240000；质量扫描范围100-1500 m/z，扫描速度：up to 40 Hz，质量精确度：内标< 1 ppm RMS；外标<3 ppm RMS；灵敏度：全扫描MS：100 fg上柱量利血平的S/N为150:1；SIM：50 fg上柱量利血平的S/N为150:1；动态范围：> 5000:1；

3）检测要求：DDA模式液质检测：Vanquish UHPLC；色谱柱：Hypesil Gold column (100×2.1 mm, 1.9 μm) ；离子源：Nanospray Flex™（ESI）；喷雾电压：3.2 kV；Sheath gas flow rate:40arb;Aux Gasflow rate:10arb;Capillary Temp:320°C. Polarity: positive； negative；MS/MS 二级扫描为DDA数据依赖性采集模式。

4）检测及结果统计要求：基于液质联用（LC-MS）技术进行非靶向代谢组学研究，QC质控分析+标准数据分析+高级生物信息学分析。使用mzCloud 和 mzVault 以及 MassList 一级数据库检索（搜库）。利用QC质控样本对检测过程中的仪器状态进行监控，实验流程主要包括：样本的代谢物提取、LC-MS/MS 检测以及数据分析等。

5）结果分析要求：QC质控分析+标准数据分析+个性化分析。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 1 | 服务内容 | LC-MS非靶向代谢组学检测分析 | |
| 2 | 标准分析内容 | 原始数据搜库解谱 | 1. 先将质谱检测得到的原始文件（.raw）导入Compound Discoverer 3.1（以下简称CD3.1）软件中，进行谱图处理及数据库搜库，得到代谢物的定性定量结果，然后对数据进行质控保证数据结果的准确度、可靠性。接下来对代谢物进行多元统计分析。 |
| 数据质控 | 2. 搜库完成后，对数据进行质控 |
| 2.1 QC样本相关性分析 |
| 2.2 总样本PCA分析 |
| 代谢物通路及分类注释 | 3 . 代谢物功能注释 |
| 3.1 1KEGG通路注释 |
| 3.2 HIMDB分类注释 |
| 3.3 LIPID MAPS分类注释 |
| 差异代谢物筛选， | 4. 对差异代谢物进行筛选 |
| 4.1 主成分分析 (PCA) |
| 4.2 偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA) |
| 4.3 差异代谢物筛选结果 |
| 4.4 差异代谢物火山图 |
| 4.5 差异代谢物火柴杆图 |
| 蛋差异代谢物分析 | 5. 对差异代谢物进行分析 |
| 5.1 差异代谢物Venn图分析 |
| 5.2 差异代谢物箱线图分析 |
| 5.3 差异代谢物聚类分析 |
| 5.4 差异代谢物相关性分析 |
| 5.5 差异代谢物和弦图分析 |
| 5.6 Z-score分析 |
| KEGG富集分析 | 6. 对检测到的差异代谢物进行通路富集分析 |
| 6.1 KEGG富集结果 |
| 6.2 KEGG富集气泡图 |
| 6.3 KEGG富集通路图 |
| 6.4 KEGG调控网络图 |
| 6.1 KEGG富集结果 |
| ROC分析 | 7. 差异代谢物ROC曲线分析 |
| 3 | 其他分析 | 关联分析及其他个性化分析 | 客户提出需求，后台评估后，进行可行性反馈及分析 |

3. 售后服务：数据验收合格后，至少提供1年的售后服务；提供技术培训及咨询服务；给出文章投稿建议，并提供文章杂志要求的分辨率和大小合格的图表；对审稿人的修回意见提供专业答复供参考；对蛋白组学生物信息进行培训。

4. 交付期限：

承诺在样本检测合格后45个自然日内交付数据。