BIOF3 组学数据分析

02 DEP 差异蛋白分析

导出日期：2026年5月12日

02 DEP 差异蛋白分析

DEP（Differential Enrichment analysis of Proteomics data）把蛋白组差异分析的完整流程封装成一条管线：过滤 → 归一化 → 插补 → limma 差异检验 → 多重校正。底层用的是 limma，所以统计学上和 bulk RNA-seq 的差异分析是同一套框架。

本章用 DEP 自带的 `UbiLength` 数据走一遍完整流程。数据是 HeLa 细胞在不同泛素链长度处理下的蛋白组（4 个条件 × 3 个重复 = 12 个样本，约 3000 个蛋白）。

完整流程

```
library(DEP)

data(UbiLength)
data(UbiLength_ExpDesign)

# 1. 确保蛋白名唯一
data_unique <- make_unique(UbiLength, "Gene.names", "Protein.IDs", delim = ";")

# 2. 构建 SummarizedExperiment
lfq_cols <- grep("LFQ.intensity.", colnames(data_unique))
data_se <- make_se(data_unique, lfq_cols, UbiLength_ExpDesign)

# 3. 过滤：每组至少 2 个样本有值
data_filt <- filter_missval(data_se, thr = 0)

# 4. VSN 归一化
data_norm <- normalize_vsn(data_filt)

# 5. 缺失值插补（MinProb：从左尾采样）
data_imp <- impute(data_norm, fun = "MinProb", q = 0.01)

# 6. limma 差异检验
data_diff <- test_diff(data_imp, type = "control", control = "Ctrl")

# 7. 标记显著蛋白
dep <- add_rejections(data_diff, alpha = 0.05, lfc = 1)
```

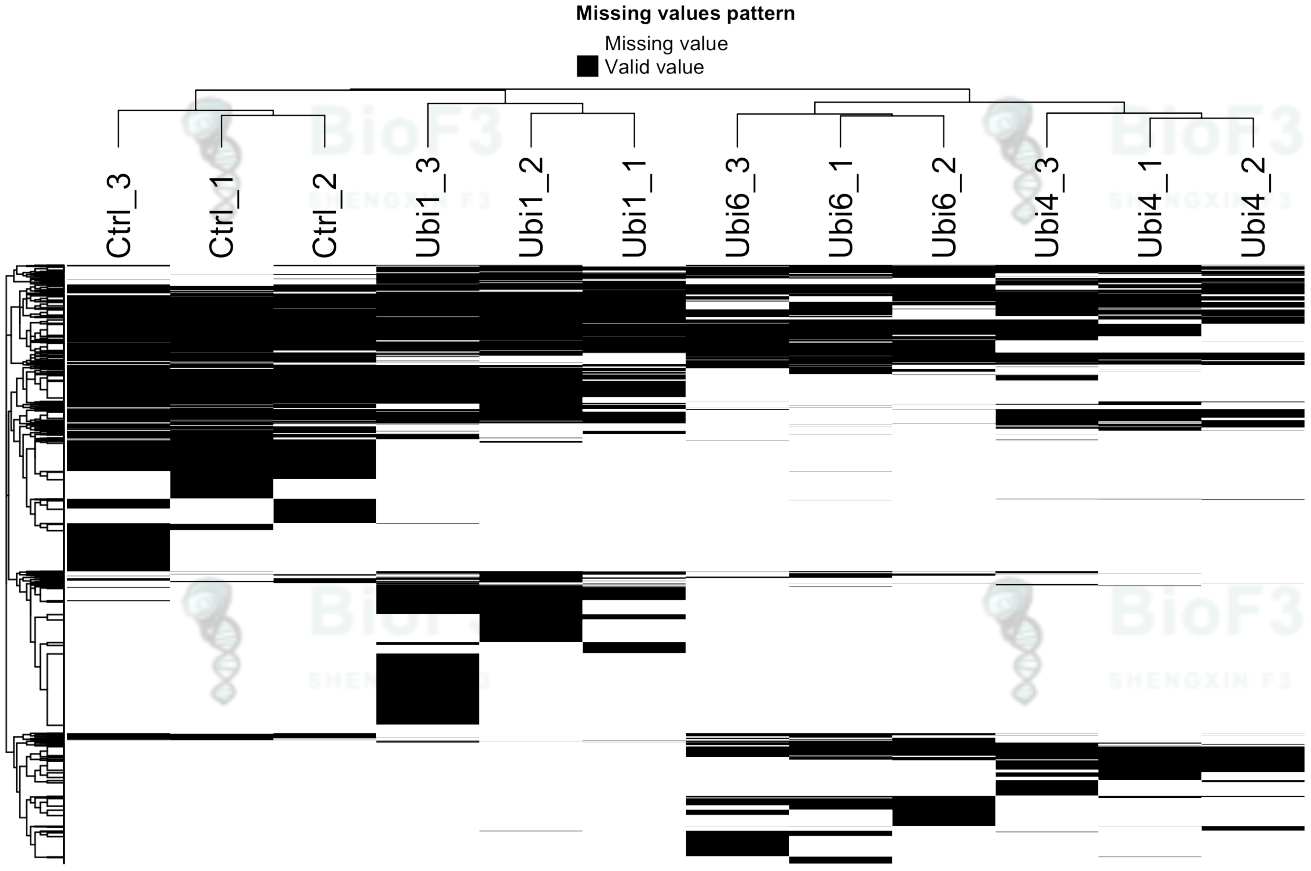
`test_diff(type = "control", control = "Ctrl")` 会自动生成所有"XX vs Ctrl"的对比。如果要做两两比较，用 `type = "all"` 。

真实示例：UbiLength 上的 DEP 分析

配套脚本 `prot02_dep_sci.R` 把上面的流程完整跑了一遍，输出 6 张图：

```
Rscript scripts/proteomics/prot02_dep_sci.R
```

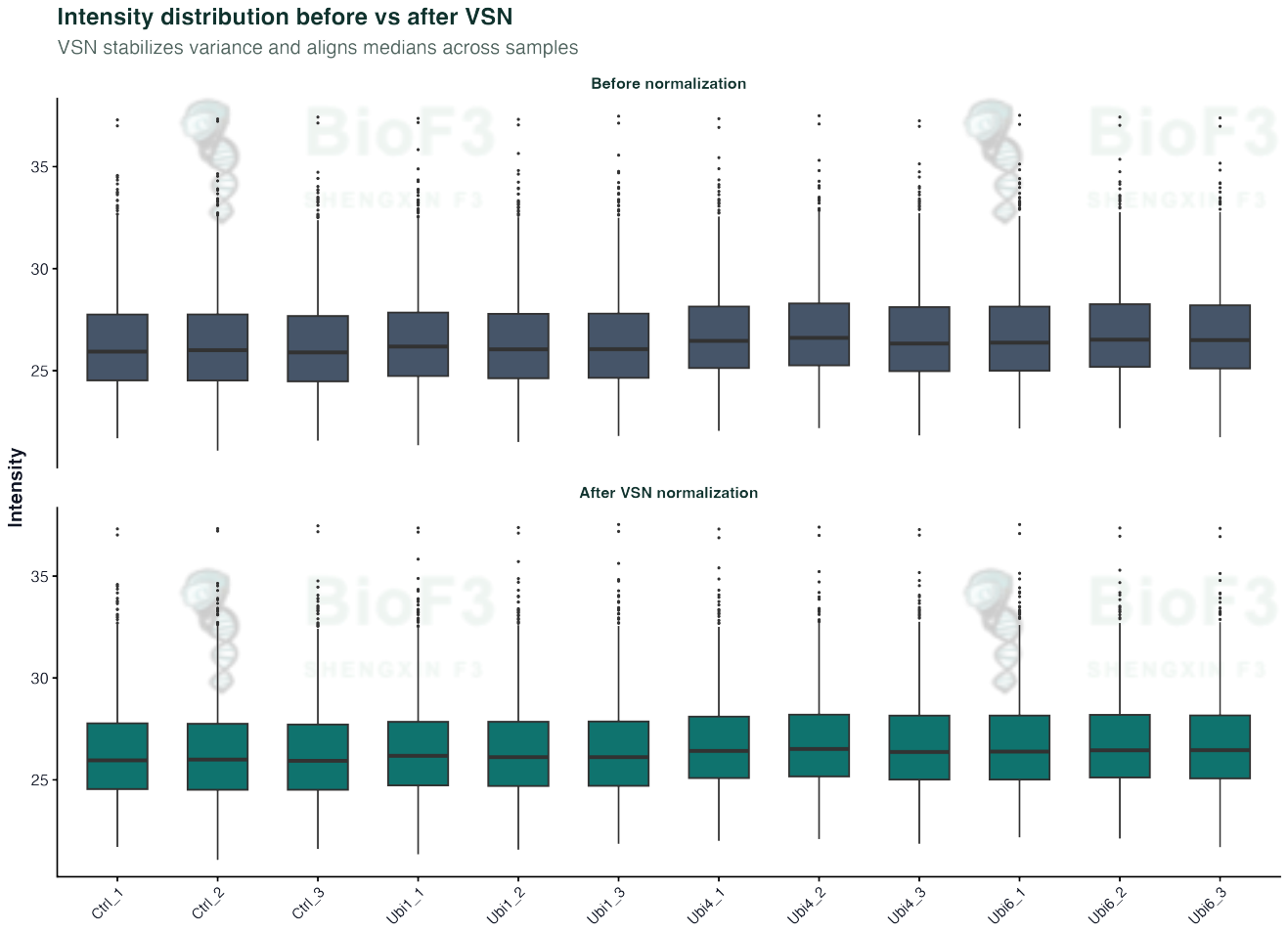
图 1：缺失值热图



每行是一个蛋白，每列是一个样本。黑色 = 有值，灰色 = 缺失。蛋白组的缺失不是随机的 —— 低丰度蛋白在所有样本里都容易缺失（整行灰色），这就是 MNAR 的典型模式。

这张图在 QC 阶段最重要的用途：**看有没有某个样本缺失率异常高**（整列灰色比别的多很多）。如果有，要考虑是不是该样本的质谱跑坏了。

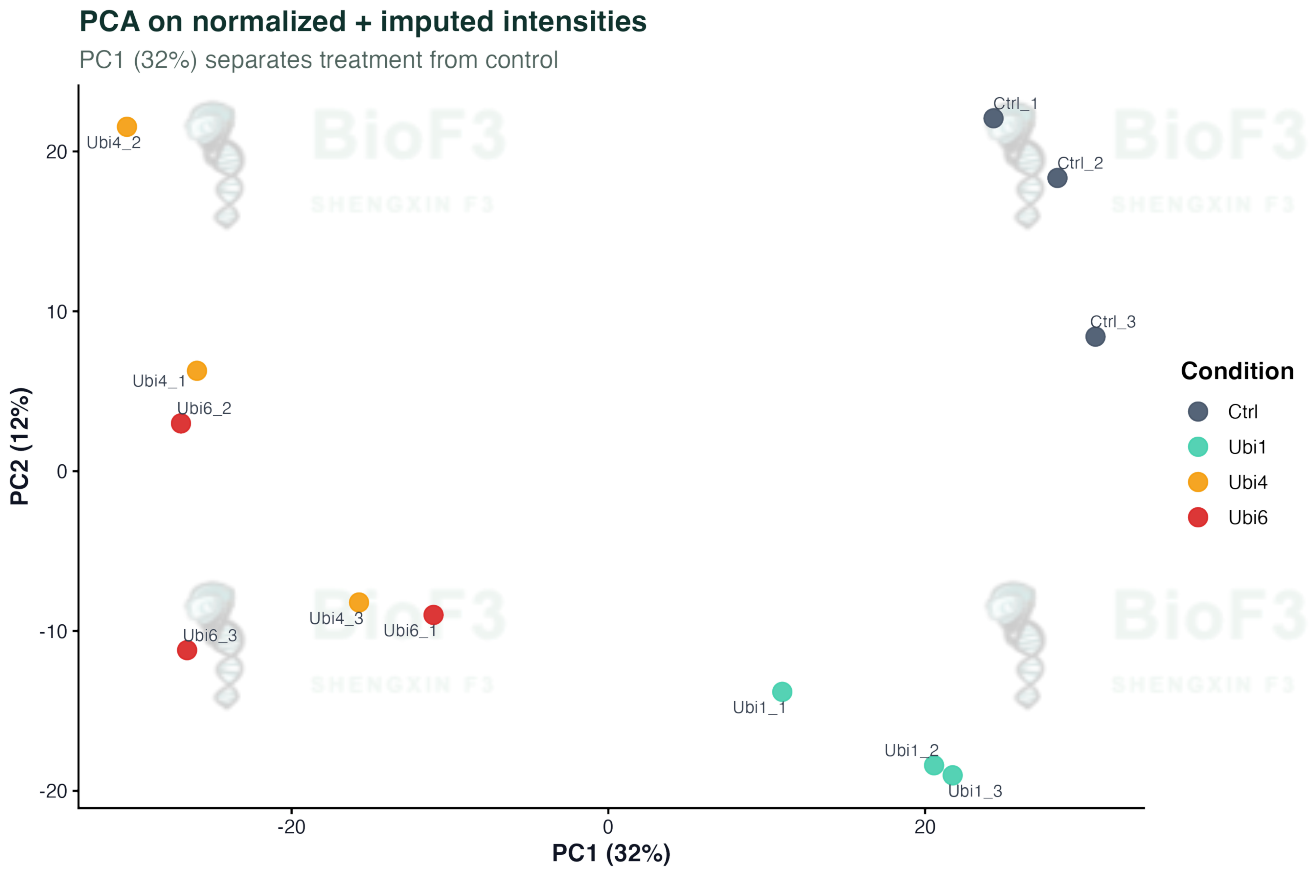
图 2：归一化前后的强度分布



上面是归一化前，下面是 VSN 归一化后。归一化的目标是让所有样本的中位线对齐、方差稳定。如果归一化前某些样本的 box 明显偏高或偏低，说明上样量或质谱响应有系统偏差。

VSN（Variance Stabilizing Normalization）和 bulk RNA-seq 里的 `vst` 思路一样：让高强度和低强度蛋白的方差都差不多，后续 limma 的 t 检验才不会被少数高丰度蛋白主导。

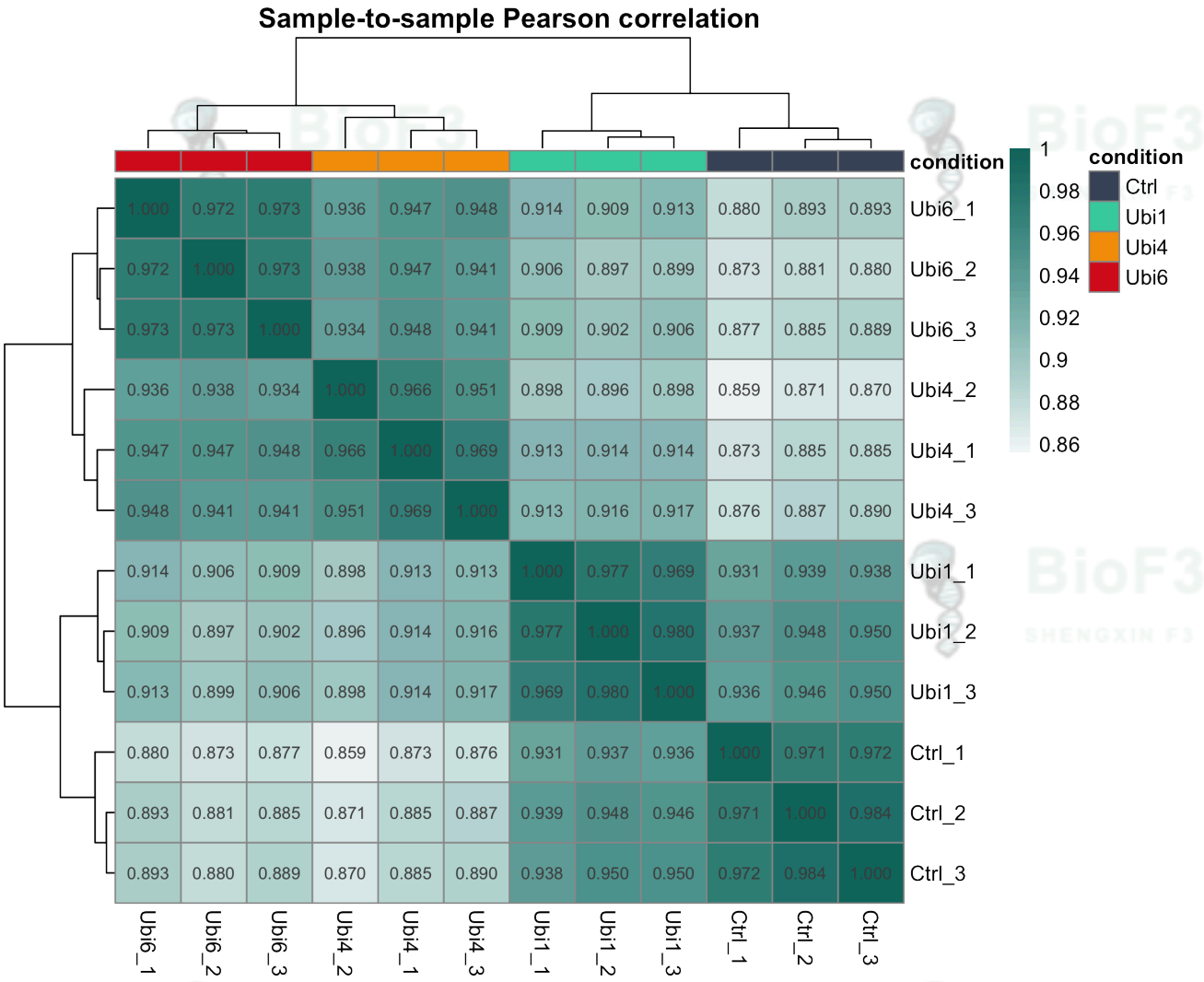
图 3：PCA



归一化 + 插补之后做 PCA。颜色是条件（Ctrl / Ubi1 / Ubi4 / Ubi6）。PC1 应该把处理组和对照组分开。如果同一条件的重复散得很开，说明技术变异大或者某个重复有问题。

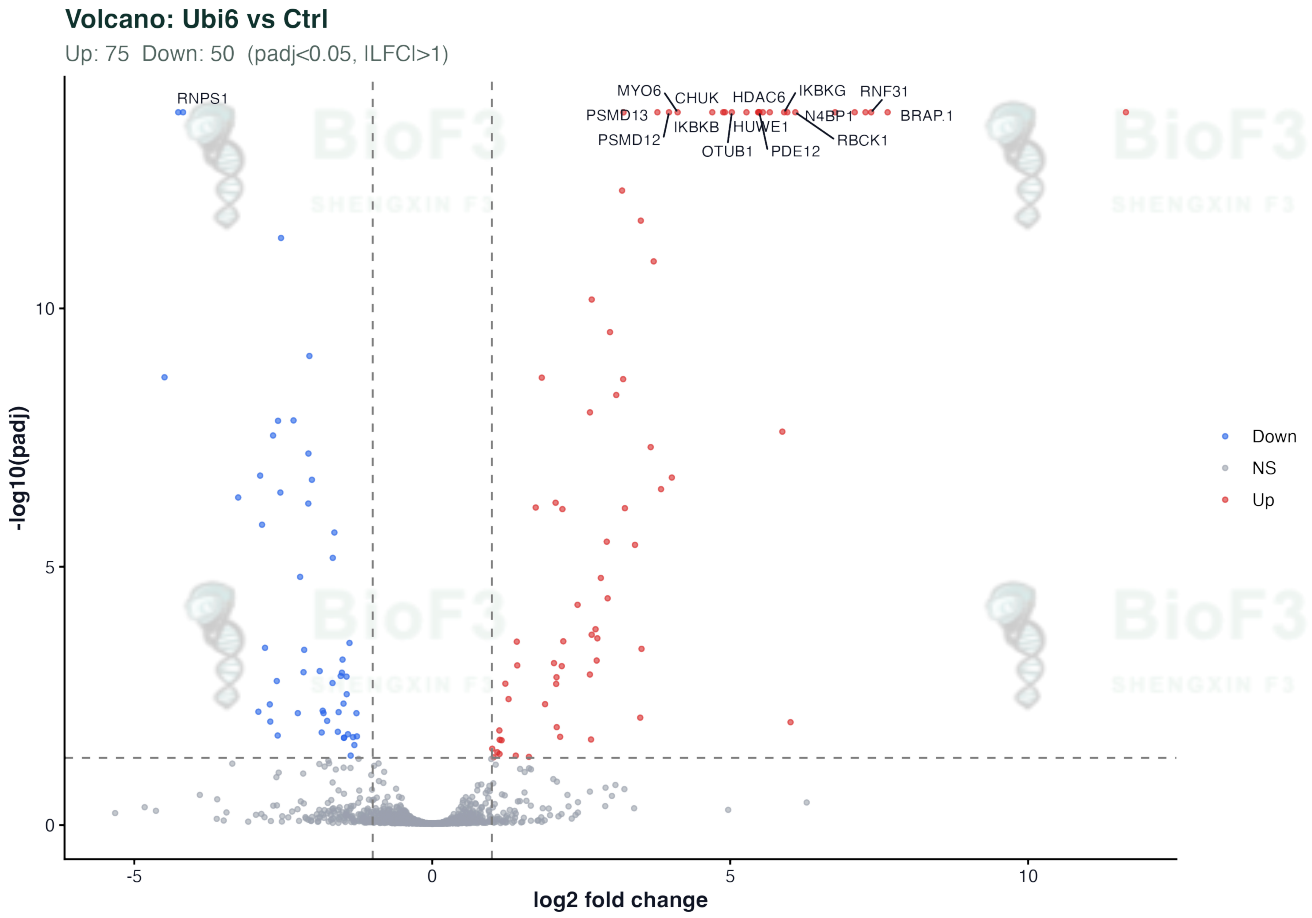
UbiLength 里 Ubi6（最长泛素链）和 Ctrl 分得最远，Ubi1 和 Ctrl 最近 —— 符合生物学预期：泛素链越长，蛋白组变化越大。

图 4：样本相关性热图



样本两两之间的 Pearson 相关。同一条件的样本之间相关性应该最高（对角线附近的深色块）。如果某个样本和同组的相关性反而低于和别组的，要回头看 QC。

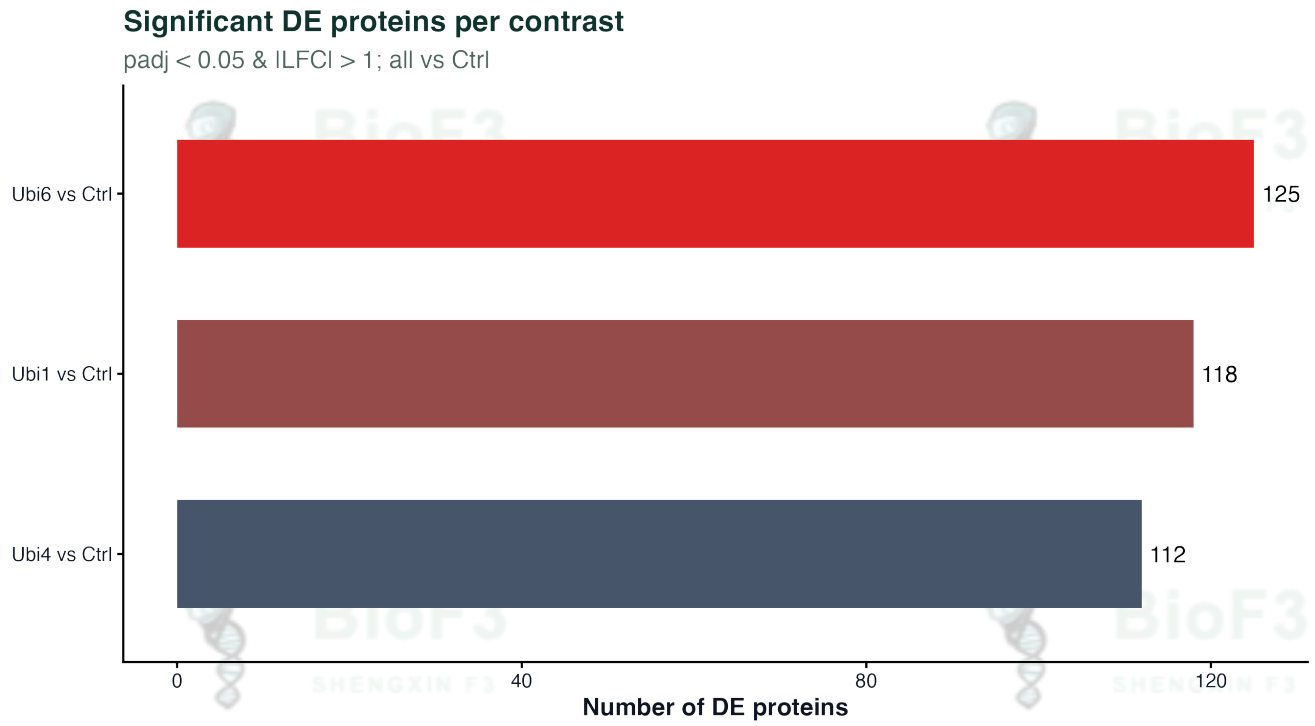
图 5：火山图（Ubi6 vs Ctrl）



横轴 log2 fold change，纵轴 `-log10(padj)`。红色 = 上调（Ubi6 里更高），蓝色 = 下调。标注了 padj 最小的 15 个蛋白。

和 RNA-seq 火山图的读法完全一样。蛋白组的特点是：点数少（几千 vs 几万）、效应大小通常比转录组小（蛋白翻译后调控会缓冲 mRNA 变化）。

图 6：每个对比的显著蛋白数



三个对比（Ubi1/Ubi4/Ubi6 vs Ctrl）各自有多少显著差异蛋白。Ubi6 最多、Ubi1 最少，和 PCA 的分离程度一致。

套到自己数据上

脚本的前 10 行把 `UbiLength` 换成自己的 `proteinGroups.txt` 就行：

```
data <- read.delim("proteinGroups.txt")
data <- data[data$Reverse != "+", ]
data <- data[data$Potential.contaminant != "+", ]
data_unique <- make_unique(data, "Gene.names", "Protein.IDs", delim = ";")
```

`UbiLength_ExpDesign` 换成自己的样本表（label / condition / replicate 三列）。

几个常见调整：

- **DIA 数据**：DIA-NN 输出的 `report.pg_matrix.tsv` 已经是宽表，列名就是样本名，直接 `make_se` 即可
- **插补策略**：如果缺失率 > 50%，MinProb 可能不够好，试 `fun = "knn"` 或 `fun = "mixed"`
- **多因子设计**：`test_diff(type = "manual", test = ...)` 可以传自定义 contrast

下载资源

prot02_dep_sci.R
8 KB

下载 DEP 差异蛋白完整脚本 ↗

下一步

- 03 功能富集与 Reactome 通路
- 04 可视化与蛋白互作网络

参考资源

- DEP Bioconductor 文档
- limma 用户手册
- Zhang et al. 2017, UbiLength 原始研究

扫码关注微信公众号【生信F3】

获取文章完整内容，分享生物信息学最新知识。