

## 同位素稀释法在绝对定量蛋白质组中的研究进展\*

陆亚丽<sup>1)</sup> 孙爱华<sup>2)</sup> 贺福初<sup>2)</sup> 姜颖<sup>2)\*\*</sup>

<sup>1)</sup>中南大学药学院, 长沙 410013;

<sup>2)</sup>蛋白质组学国家重点实验室, 北京蛋白质组研究中心, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 102206)

**摘要** 绝对定量蛋白质组是指基于蛋白质组学方法对细胞、组织或体液中的蛋白质进行绝对量或浓度测定。目前, 常用的绝对定量方法主要有基于同位素稀释法的蛋白质组学绝对定量方法和基于质谱数据统计分析的非标记方法。基于同位素稀释法的绝对定量方法是用已知量的同位素标记物对与其混合的样本蛋白质浓度进行测定。常见的同位素标记物包括: 由 AQUA 法、QconCAT 法产生的特异性水解肽段, 由 PSAQ 法、Absolute SILAC 法产生的标记蛋白和由 PrESTs-SILAC 法产生的蛋白抗原表位标签。由于同位素稀释法可以对蛋白质进行准确和精确定量, 对于临床疾病的诊断和治疗具有明显的现实意义。本文对同位素稀释法在绝对定量蛋白质组中的研究进展及其优缺点和最新应用进行了评述。

**关键词** 同位素稀释法, 绝对定量, 质谱, 蛋白质组学

**学科分类号** O65, Q1

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2012.00569

随着定量蛋白质组研究的不断发展, 尤其是差异蛋白质组的研究进展, 大量功能蛋白质和潜在的疾病蛋白质标志物被鉴定, 如何进一步测定这些蛋白质的表达丰度, 深入阐明其功能和在疾病研究中的意义, 变得越来越重要。目前, 大多数蛋白质组研究提供了不同条件下蛋白质表达水平的相对变化数据<sup>[1-3]</sup>。但是, 由于蛋白质的相对定量结果在不同实验室间可比性差, 这些数据在实际应用中受到质疑, 且不适用于相关数据库的构建<sup>[4]</sup>。绝对定量可以克服相对定量目前存在的局限性<sup>[5-7]</sup>, 由不同实验室、不同实验批次得到的绝对定量实验数据(不需要对照样品)均具有可比性。另外, 为了充分了解蛋白质在相互作用网络中的功能, 也需要用量的信息来表征蛋白质<sup>[8]</sup>。同时, 绝对定量对于临床疾病的诊断和治疗具有明显的现实意义<sup>[9]</sup>, 蛋白质生物标记物量的变化, 可以直接反映疾病的发展状况, 通过对疾病不同时期生物标记物绝对量的监测, 可以直观地判断疾病的发展情况, 制定相应的治疗措施。因此, 绝对定量蛋白质组技术和方法的研究正逐渐成为蛋白质组学领域方法学研究的热点。

随着绝对定量蛋白质组学研究的深入, 迫切需

要发展具有高精度和高准确度的绝对定量方法使测定值与目标蛋白质的实际浓度尽可能一致<sup>[10]</sup>。同位素稀释法作为一种权威计量方法, 十几年前已应用于基于质谱的小分子化合物的计量研究中<sup>[10]</sup>, 现在也广泛用于生物样本中蛋白质的绝对定量。同位素标记肽段与目标蛋白质特异的水解肽段具有相同的序列、液相色谱保留时间、质谱离子化效率及二级碎裂离子, 由于质量数不同, 能在质谱上获得二者峰强度的比值, 进一步通过同位素标记肽段量计算出样本中相应水解肽段的量, 最后根据肽段的化学计量值得到对应蛋白质的量。目前, 同位素稀释法在蛋白质组学上的应用主要是与质谱多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)技术结合用于蛋白质绝对定量<sup>[11]</sup>, 本文就基于同位素稀释法在绝对定量蛋白质组学中的最新研究进展进行综述。

\* 国家自然科学基金(81001470)和国家重点基础研究发展计划(973)(2011CB505304)资助项目。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 010-80705299, E-mail: jiangying304@hotmail.com

收稿日期: 2013-02-24, 接受日期: 2013-04-24

## 1 结合不同同位素稀释法的蛋白质绝对定量技术

结合同位素稀释法的蛋白质绝对定量主要经过以下 3 个步骤: a. 通过实验或预测的方法得到目标蛋白质的水解肽段, 这些水解肽段具有目标蛋白质的序列特异性和质谱可检测性的特点; b. 在分析样本中加入一定量的同位素标记物为内标, 以减小实验过程中由于基质效应、离子化效率和仪器响应信号不稳定等引起的定量差异; c. 通过标记 / 非标记肽段的比值及标记肽段的绝对量计算样本目标蛋白质的量. 目前, 常用于获得同位素标记物的方法有用绝对定量法 (absolute quantification, AQUA)、定量串联体法 (quantification concatamers, QconCAT)、蛋白质标准物绝对定量法 (protein standard absolute quantification, PSAQ)、细胞培养条件下稳定同位素标记绝对定量技术法 (absolute stable isotope labeling with amino acids in cell culture, Absolute SILAC)、蛋白抗原表位标签 - 细胞培养条件下稳定同位素标记技术法 (protein epitope signature tags-stable isotope labeling with amino acids in cell culture, PrESTs-SILAC). 图 1 描述了这 5 种方法和结合这些方法的蛋白质绝对定量的工作流程.

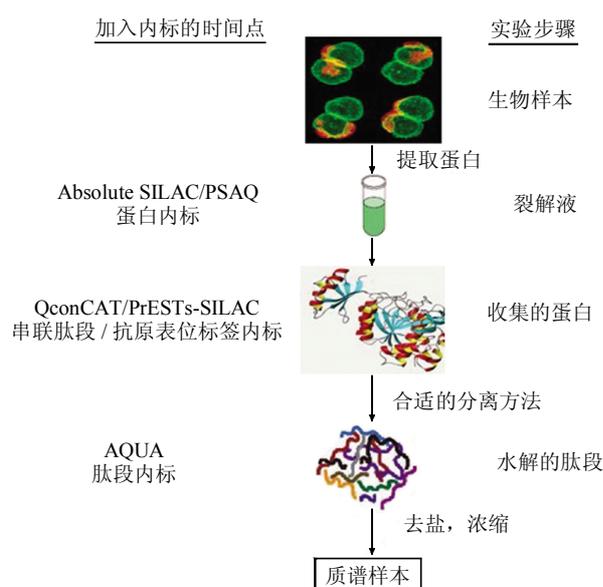


Fig. 1 Experimental workflow in MS-based absolute quantification of proteins

图 1 基于质谱的蛋白质绝对定量工作流程

### 1.1 AQUA 法

1983 年, Desiderio 等<sup>[12]</sup>首次使用化学合成的同位素标记肽段定量蛋白质. 直到 2003 年, Gerber 等<sup>[13]</sup>进一步开发了这一技术并命名为 AQUA. AQUA 技术指在样本经蛋白酶切后, 以化学合成的同位素标记肽段为内标, 检测蛋白质绝对量的方法.

AQUA 肽段选择原则: a. 肽段长度小于 15 个氨基酸; b. 序列中不含有甲硫氨酸和半胱氨酸等易发生化学修饰的位点; c. 不含有肽键易酶解断裂的天冬氨酸 - 甘氨酸序列和脱酰胺的 N 端谷氨酰胺等特殊序列形式. AQUA 方法可以精确、灵敏地在不同样本和不同条件下检测中、高丰度蛋白质, 而且所需样本量少. 对于一组动态范围较大的蛋白质进行定量时, AQUA 肽段可以按比例加入<sup>[14]</sup>. 另外, AQUA 肽段可以商品化购买且使用简单, 使得不同实验室和不同仪器得到的定量数据具有可比性<sup>[15]</sup>. AQUA 法还可以用于翻译后修饰(如磷酸化)蛋白质的绝对定量, 例如磷酸化修饰, 以无修饰 / 磷酸化修饰的 AQUA 肽段各一条作为内标, 检测蛋白质的总表达量及发生磷酸化的蛋白丰度<sup>[14]</sup>. 由于这些优点, AQUA 方法深受广大研究者的欢迎. AQUA 法的不足体现在: a. 严格的序列选择标准降低了可选择肽段的范围; b. AQUA 肽段是以冻干状态提供的, 溶解状态的差异可能导致实验结果不稳定; c. AQUA 肽段是在目标蛋白质酶解之后加入, 蛋白质酶切效率的变化可能导致检测结果与实际值有一定偏差; d. AQUA 肽段需要分别合成、纯化和定量, 进行大规模蛋白质定量时费用昂贵. 针对 AQUA 的不足, 研究者进行了方法改进. Sturm 等<sup>[16]</sup>用胰凝乳蛋白酶酶解蛋白质获得 AQUA 肽段, 这些肽段不含化学修饰位点且适用于大部分哺乳类动物蛋白质的定量, 有效增加了可选择 AQUA 肽段的范围. Havlis 等<sup>[17]</sup>发现, 在 LC-MS 分析前简单地预分离(如 SDS-PAGE)会显著降低 AQUA 法定量的准确性, 计算样本回收率有助于提高定量准确性. 总的来说, AQUA 法用于绝对定量简单易行, 但是定量的准确性还有待提高, 且不适用于大规模的绝对定量实验.

### 1.2 QconCAT 法

由于化学合成的同位素标记肽段费时费力, 而且定量准确性容易受合成的肽段纯度和目标蛋白质酶解完全程度的影响, 因此, 为了克服 AQUA 法

的这些缺点, Beynon 等<sup>[18]</sup>使用人工合成的 QconCAT 质粒表达重标肽段用以代替化学合成的同位素标记肽段. 其基本流程为: 根据一定的标准, 选取目标蛋白质的特异水解肽段, 将这些肽段对应的基因插入到含有标签的质粒中, 转化到异源表达体系(如大肠杆菌中), 在含有重标赖氨酸和精氨酸的缺陷培养基中进行复制和表达, 使重组 QconCAT 蛋白质中的所有肽段都得到同位素标记, 将已知量的 QconCAT 蛋白质与待测蛋白样品混合, 胰酶酶切后进行质谱分析. 由于同位素标记肽段与未标记肽段在质量数上有差异, 可以在质谱图上被区分开, 因此可以根据各自的质谱信号强度对目标蛋白质进行绝对定量.

QconCAT 肽段选择原则: a. 肽段长度为 8~25 个氨基酸; b. 不含漏切位点; c. 尽量避免疏水性强的肽段和含有化学修饰位点的肽段. 因此, 与 AQUA 法相比, QconCAT 方法可选择的肽段范围较广. 另外, QconCAT 质粒构建时一般可整合 1500 个外源核酸序列, 即能表达 500 个左右的氨基酸(30~50 个肽段). 调整肽段的连接顺序和优化密码子序列将有助于减少 mRNA 二级结构的生成和增加重组 QconCAT 蛋白质的表达量. QconCAT 方法的高通量特点, 使大规模进行目标蛋白质的绝对定量所需费用明显减少<sup>[19]</sup>. 当目标蛋白质丰度动态范围较大时, 可以把丰度相近蛋白质中的肽段对应的 DNA 构建到一个 QconCAT 质粒中, 这样可以针对不同丰度区段的蛋白质调整加入重标 QconCAT 肽段的量<sup>[4]</sup>. 另外, QconCAT 质粒构建成功后可长期储存, 可以随时按需求扩增、标记目的蛋白质的水解肽段用于绝对定量.

与 AQUA 方法一样, QconCAT 法也需要目标蛋白质完全酶切才能得到精确的定量结果<sup>[20]</sup>. 由于 QconCAT 蛋白结构简单, 酶切速率远远高于目标蛋白质. 为了使 QconCAT 蛋白与目标蛋白质的酶切效率一致, Kito 等<sup>[21]</sup>在构建 QconCAT 质粒时, 在每个水解肽段旁插入相应的旁侧序列以增加 QconCAT 蛋白质的结构复杂性, 尽量避免由于结构复杂性不同导致的定量误差, 结果显示这些水解肽段定量真核细胞翻译起始因子第三亚单位(eIF2B $\gamma$ )的 CV 值小于 5%. Mirzaei 等<sup>[22]</sup>为了评估不同方法产生的同位素标记肽段对蛋白质绝对定量的准确性, 从线虫蛋白质组中随机选取了 25

个疏水性不同的肽段, 采用 AQUA 的轻标肽段与 QconCAT 的重标肽段等摩尔混合进行 MRM 分析, 结果显示, 由于 QconCAT 各肽段酶切效率不一致导致的肽段轻标 / 重标的比值大于 1 的肽段有 6 条, 由于 AQUA 肽段的修饰和疏水性影响引起的轻标 / 重标的比值小于 1 的肽段有 2 条. QconCAT 的另一个关键步骤是肽段的选择, 目标蛋白质与其他蛋白质有较高的同源性或存在不可预测的漏切修饰等情况会导致前期选择的水解肽段在质谱中无法获得可靠的定量数据. Carroll 等<sup>[19]</sup>构建了一个包含 27 个蛋白质、59 肽段的 QconCAT 质粒对酵母蛋白质进行绝对定量, 结果表明, 只有 25 条肽段获得了可靠的定量数据, 3 个蛋白质有 2 条定量结果一致的肽段(CV < 4%), 8 个蛋白质只有 1 条对应的定量肽段, 4 个蛋白质有 2 条定量结果不一致的肽段. 为了减少 2 条肽段定量同一个蛋白质结果不一致的情况, 我们针对一个蛋白质至少选取 2~3 条水解肽段, 构建了 4 个包含目前已知的 41 个肝脏药物代谢酶(CYP450s 和 UGT) 120 个肽段的 QconCAT 质粒, 其中 3 个 QconCAT 蛋白被成功纯化, 这 3 个 QconCAT 蛋白中包含的 87 条肽段中有 47 条被检测到且重标标记效率大于 98%, 有 12 个蛋白质的 2 条水解肽段定量结果一致, 定量结果一致的比例有所增加. Chen 等<sup>[23]</sup>采用了在水解肽段两边插入旁侧序列的方法构建了包含凝聚素(clusterin)的 5 条特异性水解肽段的 QconCAT 质粒, 其中有 2 条水解肽段由于响应信号低未能用于定量, 另外 3 条定量结果一致(CV < 25%). 针对目前 QconCAT 方法存在的问题, 除了插入旁侧序列增加 QconCAT 蛋白质的结构复杂性和增加定量同一个蛋白质的水解肽段外, 我们可以通过选择高灵敏度的定性检测仪器(如 TripleTOF 5600 等)对目标样本进行多次分析, 选择重复鉴定到的响应信号强的且不含漏切和修饰的水解肽段. 只有选择合适的水解肽段才能实现蛋白质规模化的绝对定量.

### 1.3 PrESTs-SILAC 法

蛋白抗原表位标签(protein epitope signature tags, PrESTs)是由目标蛋白质一段较短的特异性肽段加上纯化标签(His)及可溶性标签(albumin binding protein, ABP)组成的, 在大肠杆菌中表达. PrESTs 对应于蛋白质的抗原决定簇序列, 最早用于规模化的生产抗体. 一般包含目标蛋白质特异的

50~150个氨基酸区域, 不含跨膜结构域和信号肽序列<sup>[24-27]</sup>. 在此基础上发展的 PrESTs-SILAC 方法<sup>[28]</sup>, 首先利用重标的缺陷型培养基表达含有 His 标签和 OneStrep 标签的重标 ABP 可溶性蛋白, 用 C 端 OneStrep 标签纯化(如果纯度不能满足要求时, 可以采用基于 N 端 His 标签和 C 端 OneStrep 标签进行两次亲和纯化, 确保得到高纯度的全长 ABP 蛋白), 然后用氨基酸分析法得到重标 ABP 蛋白的浓度, 用已知浓度的重标 ABP 蛋白定量出每个 PrEST, 最后, 将 SILAC 重标培养得到的细胞蛋白质样本与 PrESTs 混合, 通过质谱分析, 计算出样本中目标蛋白质的量. 该方法同样适合于组织等不容易重标的样本, 只需要先定量出轻标的 ABP 蛋白, 用轻标 ABP 蛋白定量重标的 PrESTs, 最后通过重标的 PrESTs 计算出样本中目标蛋白质的量.

目前, 人类蛋白质组数据库中 80% 的蛋白质都有相应的 PrESTs<sup>[27]</sup>, 并且对同一个蛋白提供了至少 2 条 PrESTs, 如果第一个 PrEST 不适用于蛋白质的绝对定量, 可以采用其他的 PrESTs. PrESTs-SILAC 方法中, 包含 1~2 个漏切位点的水解肽段与其他未漏切的水解肽段定量同一个蛋白质的结果一致, 增加了绝对定量蛋白质的水解肽段. Marlis 等<sup>[28]</sup>用 PrESTs-SILAC 对 HeLa 细胞的 40 个蛋白质进行绝对定量. 对同一个蛋白质的几个 PrESTs 肽段得出的蛋白质绝对丰度的变异度进行分析, 平均 CV 值为 12%. 为了评估绝对定量各步骤引起的变异, 研究者对整个实验流程(包括 PrEST 的定量、各 PrEST 的混合、细胞内目标蛋白质丰度的检测)均重复 3 次. 结果显示, 各步骤标准差的平均值是 20%, 是目前为止针对细胞内蛋白质表达水平的最精确测定. 不同批次的 PrESTs 混合引起了最大的变异, 自动化制备 PrESTs 混合物将有助于定量的进一步改善. 与 QconCAT、AQUA 相比, PrESTs 酶切效率与内源性蛋白更一致, 但是, 如果待分析样本要进行预分离, 还是会引起较大的定量差异. 另外, 相对于 QconCAT, PrESTs 的制备比较繁琐, 同时增加了分析样本的复杂度, 正因为这些局限性, 限制其广泛应用, 目前没有关于这个方法更新的应用报道.

#### 1.4 基于稳定同位素标记的全长蛋白质绝对定量法

重标全长蛋白质绝对定量法是指体外合成

(protein standard absolute quantification, PSAQ<sup>[29]</sup> / full-length expressed stable isotope-labeled proteins for quantification, FlexiQuant<sup>[30]</sup>)或体内合成(absolute SILAC<sup>[31]</sup>)的同位素重标全长蛋白对目标蛋白质进行定量的方法. PSAQ 和 FlexiQuant 法是在麦芽提取物或细菌细胞提取物反应体系中加入重标的赖氨酸和精氨酸体外合成重标全长蛋白, Absolute SILAC 是在质粒中插入目的蛋白质的全长 DNA, 转化大肠杆菌, 在重标的缺陷培养基中诱导表达获得重标全长蛋白质. Ivan 等<sup>[31]</sup>为了增加同位素标记的效率, 构建了赖氨酸和精氨酸的缺陷型菌株 BL21 (DE3), 用该菌株纯化的同位素标记蛋白的标记效率达到 99.9%, 而用常规的 BL21(DE3)菌株获得的内标蛋白标记效率只有 70%<sup>[32]</sup>.

在这类绝对定量法中, 由于蛋白全序列覆盖所有被检测到的肽段, 因此可以提供较多的定量肽段, 有效提高了绝对定量的精确性和准确性. Picard 等<sup>[33]</sup>采用 PSAQ 法结合 MRM 方法绝对定量生物标志物 IGF-1, 通过 IGF-1 的 3 条特异性水解肽段得到定量准确度为 108%、CV 值小于 10%. 在一个复杂样本中, 即使有些水解肽段不能被检测到, 但是基于重标的全长蛋白的绝对定量法还是可以提供其他水解肽段用于该蛋白定量. 该方法的另一个优点是样本与内标是在蛋白质层面混合并进行后续实验, 有效减少了由于样本预分离和酶切等步骤造成定量误差. 已有报道证实 PSAQ 法与 SDS-PAGE<sup>[34]</sup>和免疫捕获<sup>[35]</sup>相结合不会引起定量偏差. Brun 等<sup>[29]</sup>在尿样本中加入人工重组的 SEA 和 TSST-1 蛋白质, 分别用 PSAQ 法、AQUA 法和 QconCAT 法对其进行绝对定量, 结果证明 PSAQ 法定量的准确性最高. 并且, 除胰酶外, 还可以用其他酶进行酶切产生更多的定量肽段, 使不同的蛋白亚型和蛋白突变体也可被区别鉴定<sup>[35]</sup>. 因此, 采用重标全长蛋白作为内标的绝对定量法适于在复杂的生物样本中精确定量目标蛋白质, 同时也适合候选蛋白标志物的定量和治疗类蛋白的药动力学研究. 但是, 全长蛋白重标的费用大、通量低, 而且只可以定量可溶性蛋白, 因此限制了其规模化的应用.

## 1.5 各种方法的优缺点比较

上述几种方法的优缺点比较见表 1.

**Table 1 Isotope dilution strategies for absolute quantitative proteomics**

**表 1 绝对定量蛋白质组学中的各种同位素标记物的优缺点**

	AQUA	QconCAT	PrESTs-SILAC	PSAQ/Absolute SILAC
肽段的选择范围	非常窄	较窄	较广	非常广
费用	非常高	非常低	较低	较高
制备过程	简单	较简单	复杂	较简单
通量	较低	非常高	非常高	非常低
准确性	非常差	较差	较好	非常好
精确性	非常好	非常好	非常好	非常好
酶切完全的评估	需要	需要	需要	不需要
与样品预分离的兼容性	非常差	较差	较好	非常好
翻译后修饰蛋白的定量	可以	可以	不可以	不可以

## 2 同位素稀释法在绝对定量蛋白质组学上的应用

### 2.1 结合 MRM 技术的蛋白质绝对定量

质谱多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)是一种质谱工作模式, 是基于已知信息或假定信息设定质谱检测规则, 对符合规则的离子进行信号记录, 去除大量不符合规则离子信号的干扰, 从而得到质谱信息的一种数据获取方式<sup>[9]</sup>. 它作为一种高特异性、高灵敏度的质谱数据获取方式, 逐步受到生物标志物研究者们关注, 成为定量蛋白质组学研究中的重要技术<sup>[6]</sup>. 基于质谱的蛋白质绝对定量是通过比较作为内标的同位素标记肽段与相应的目的蛋白水解肽段的离子信号(峰高或峰面积)来进行的. 为了得到可靠的定量信息, 重复的分析检测和不同的水解肽段定量同一个蛋白质是必要的. 在分析化学领域, 这种质谱扫描模式已成熟地用于复杂体系中小分子化合物的分析, 如环境分析、毒物分析、药物代谢物分析等<sup>[7]</sup>. MRM 技术有以下几个特点: a. 灵敏度高. 通过两级离子选择, 排除了大量干扰离子, 使质谱的化学背景大大降低. b. 重现性好. 降低了复杂生物样本基体和共流出组分对待测分子离子化、质谱信号的抑制及源内碰撞碎裂过程的影响, 提高了重现性. c. 准确度高. 对各离子对进行检测, 并且进一步进行增强产物扫描分析, 得到高分辨的串联质谱(MS/MS)碎片数据, 使分析过程中的假阳性率大大降低. d. 通量高. 使用目前最先进的质谱系统, 每个工作循环能

处理多达 300 对母离子 / 子离子. e. 线性动态范围广. 定量范围可扩大到 4~5 个数量级, 而鸟枪法的线性动态范围只有 1~2 个数量级<sup>[8]</sup>. 正是 MRM 技术的这些特异性优点, 使其广泛应用于蛋白质的绝对定量.

### 2.2 同位素稀释法在翻译后修饰蛋白研究中的应用

对于蛋白质组科研工作者来说, 蛋白质翻译后修饰的鉴定一直是一项极大的挑战. 蛋白质的磷酸化和去磷酸化是目前所知道的最主要的信号传导调节方式, 也是分子生物学家和药理学家们的研究热点, 因此, 对磷酸化蛋白质进行定量对于理解蛋白质的相互作用网络是必需的. Kettenbach 等<sup>[9]</sup>联合 AQUA 与 SRM/SIM(selected ion monitoring)法对多种肺癌细胞系中 Polo 样激酶 1(Polo-like kinase 1, PLK1)和从 S 期释放的发生 210 位苏氨酸(T210)磷酸化的 PLK1 蛋白质进行绝对定量. 结果表明, H23 细胞中含有最高丰度的 PLK1(每 20  $\mu\text{g}$  总蛋白中含 6.7 fmol), H1650 含有最低丰度的 PLK1(每 20  $\mu\text{g}$  总蛋白中含 0.95 fmol), 此结果与 Western blot 结果一致. 另外, T210 磷酸化的 PLK1 蛋白的增加与进入分裂期的细胞增加相关, 这与基于流式细胞仪的分析结果也是一致的. Hannah 等<sup>[40]</sup>利用 QconCAT 方法分别获得目标蛋白质的非磷酸化 / 磷酸化肽段, 用非磷酸化肽段得到目标蛋白的绝对量, 用磷酸化肽段得到磷酸化修饰的蛋白量, 进而得到目标蛋白质被磷酸化修饰的比例, 为定量已知位点的磷酸化蛋白提供了一种新方法.

### 2.3 同位素稀释法在生物标志物研究中的应用

生物标志物的研究是医学领域关注的热点, 同位素稀释法与 MRM 结合大大加快了临床确证阶段的研究进程, 对筛选出来的标记物进行定量, 能进行与同一疾病相关的多个标记物同时测定而不需要制备其相应的抗体. Huillet 等<sup>[41]</sup>采用 PSAQ 与 MRM 结合的方法, 绝对定量了心肌梗塞患者血清样本中已知的临床心血管标志物(LDH-B、CKMB、myoglobin、troponin I), 结果与 ELISA 实验一致. Adrait 等<sup>[42]</sup>对败血症患者的血清采用免疫捕获技术制备样本, 然后采用 PSAQ 与 MRM 结合的方法对败血症的候选标志物葡萄球菌肠毒素 A(SEA) 进行绝对定量, 不仅首次成功鉴定到该蛋白, 而且确定最低检测限和最低定量限分别为 352 ng/L、1057 ng/L. Pannee 等<sup>[43]</sup>采用 AQUA 结合 MRM 技术对老年性痴呆病人和正常人脑脊液中的生物标志物(A $\beta$ 38、A $\beta$ 40、A $\beta$ 42)进行绝对定量, 结果显示, A $\beta$ 42 的定量下限为 62.5 ng/L, 而且 CV 值小于 10%. 同时, 初步证明在阿尔茨海默病患者中的 A $\beta$ 42 蛋白量低于正常人, 此结果与 ELISA 实验结果一致. 因此, 采用同位素稀释法-SRM 显著改善了蛋白质定量的灵敏性、精确度和通量性, 将有助于生物标志物的研究进展.

### 2.4 同位素稀释法在定量高度同源性蛋白同工酶上的应用

高度同源性蛋白同工酶指的是氨基酸序列比较接近, 一般用特异性的抗体也无法区别鉴定的酶. 例如, CYP3A4 和 CYP3A5 都属于相同的亚族, 氨基酸序列中有 84% 相同, CYP4F2 和 CYP4F3 也属于相同的亚族, 氨基酸序列中有 93% 相同, 像这样高度同源性的蛋白用特异性抗体是无法分别鉴定的. 但是, 用同位素稀释法结合 MRM 技术可以很好地区分并分别进行绝对定量. 在 CYP2C9 与 CYP2C19 的氨基酸序列中只有一个氨基酸不同, 仅仅根据这个不同氨基酸位点所在的特异性肽段, Hirotaka 等<sup>[44]</sup>利用 AQUA 方法成功定量人肝微粒体中 CYP2C9 和 CYP2C19 的蛋白表达水平, 也同时定量了其他 9 种细胞色素 P450. 我们的研究首次采用 QconCAT 方法定量人肝微粒体中细胞色素 P450 和 UGT, 可以定量数十个肝脏药物代谢酶, 这为药物代谢性相互作用的研究提供了一种新的高通量研究方法.

### 2.5 同位素稀释法在检测低丰度蛋白上的应用

同位素稀释法结合 MRM 技术在一定程度上提

高了测定的动态范围, 其原因一方面是因为离子对的选择性检出, 更容易被捕捉到, 另一方面是因为加入了内标使内源性肽段在质谱图上更容易被区分, 因此, 降低了复杂组分的背景信号, 同时增强了一些低丰度蛋白质的检测灵敏度. 对于血浆中的低丰度蛋白质, Keshishian 等<sup>[45]</sup>也采用 MRM 和 AQUA 方法进行了定量分析. 在未进行蛋白质或多肽亲和富集的条件下, 去除血浆 6 种高丰度蛋白质后, 低丰度蛋白质的检测限是 1~10 mg/L, CV 值是 3%~15%, 与质谱直接检测血浆蛋白的方法相比, 灵敏度增加了 1000 倍.

## 3 结 语

目前, 随着质谱仪器的不断发展, 在复杂样本中鉴定和定量蛋白质已完全可以实现, 但是, 随着蛋白质组全覆盖计划的进一步实施, 规模化蛋白质组的绝对定量迫在眉睫. 从目前的研究报道来看, 绝对定量主要是针对一个或几个感兴趣的蛋白质进行, 大规模定量还有困难, 而且由于肽段响应信号不同、色谱分离行为不同、内标肽段合成困难、质谱分析软件评价标准不同等因素也制约着蛋白质绝对定量的发展. 利用 QconCAT 法可以进行大规模定量, 但是由于水解肽段的不可预知的修饰和漏切等原因, 导致不同肽段定量的同一蛋白结果不一致. SILAC-PrEST 法可以改善 QconCAT 法的一些缺点, 但是 PrEST 和分析样品的预处理与酶切并不完全一致, 新的适用于大规模定量的同位素稀释法急需产生. 随着质谱仪的不断更新换代, 同位素稀释法的不断优化和更新及 MRM 方法的进一步优化, 可以预见规模化定量蛋白质将很快能够实现.

## 参 考 文 献

- [1] Julka S, Regnier F E. Recent advancements in differential proteomics based on stable isotope coding. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2005, **4**(2): 158-177
- [2] Ong S E, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat Chem Biol*, 2005, **1**(5): 252-262
- [3] Yan W, Chen S S. Mass spectrometry-based quantitative proteomic profiling. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2005, **4**(1): 27-38
- [4] Pratt J M, Simpson D M, Doherty M K, *et al.* Multiplexed absolute quantification for proteomics using concatenated signature peptides encoded by QconCAT genes. *Nat Protoc*, 2006, **1**(2): 1029-1043
- [5] Ohtsuki S, Schaefer O, Kawakami H, *et al.* Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities. *Drug Metab Dispos*, 2012, **40**(1): 83-92

- [6] Wienkoop S, Weckwerth W. Relative and absolute quantitative shotgun proteomics: targeting low-abundance proteins in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 2006, **57**(7): 1529–1535
- [7] Hanke S, Besir H, Oesterhelt D, *et al.* Absolute SILAC for accurate quantitation of proteins in complex mixtures down to the attomole level. *J Proteome Res*, 2008, **7**(3): 1118–1130
- [8] Havlis J, Shevchenko A. Absolute quantification of proteins in solutions and in polyacrylamide gels by mass spectrometry. *Anal Chem*, 2004, **76**(11): 3029–3036
- [9] Arnidge D R, Goodmanson M K, Klee G G, *et al.* Absolute quantification of the model biomarker prostate-specific antigen in serum by LC-MS/MS using protein cleavage and isotope dilution mass spectrometry. *J Prot Res*, 2004, **3**(3): 644–652
- [10] Viswanathan C T, Bansal B S, Booth A J, *et al.* Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. *Pharm Res*, 2007, **24**(3): 1962–1973
- [11] Sebastien G, Elodie D, Bruno D. Selected reaction monitoring applied to proteomics. *J Mass Spectro*, 2011, **46**(3): 298–312
- [12] Desiderio D M, Kai M. Preparation of stable isotope-incorporated peptide internal standards for field desorption mass spectrometry quantification of peptides in biologic tissue. *Biomed Mass Spectrom*, 1983, **10**(8): 471–479
- [13] Gerber S A, Rush J, Stemman O, *et al.* Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(12): 6940–6945
- [14] Kirkpatrick D S, Gerber S A, Gygi S P. The absolute quantification strategy: A general procedure for the quantification of proteins and post-translational modifications. *Methods*, 2005, **35**(3): 265–273
- [15] Kettenbach A N, Rush J, Gerber S A. Absolute quantification of protein and post-translational modification abundance with stable isotope-labeled synthetic peptides. *Nat Protoc*, 2011, **6**(2): 175–186
- [16] Sturm R, Sheynkman G, Booth C, *et al.* Absolute quantification of prion protein (90-231) using stable isotope-labeled chymotryptic peptide standards in a LC-MRM AQUA workflow. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2012, **23**(9): 1522–1533
- [17] Havlis J, Shevchenko A. Absolute quantification of proteins in solutions and in polyacrylamide gels by mass spectrometry. *Anal Chem*, 2004, **76**(11): 3029–3036
- [18] Beynon R J, Doherty M K, Pratt J M, *et al.* Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides. *Nat Methods*, 2005, **2**(8): 587–589
- [19] Carroll K M, Simpson D M, Evers C E, *et al.* Absolute quantification of the glycolytic pathway in yeast: deployment of a complete QconCAT approach. *Mol Cell Proteomics*, 2011, **10**(12): M111.007633
- [20] Rivers J, Simpson D M, Robertson D H, *et al.* Absolute multiplexed quantitative analysis of protein expression during muscle development using QconCAT. *Mol Cell Proteomics*, 2007, **6**(8): 1416–1427
- [21] Kito K K, Ota T, Fujita T. A synthetic protein approach toward accurate mass spectrometric quantification of component stoichiometry of multiprotein complexes. *J Proteome Res*, 2007, **6**(2): 792–800
- [22] Mirzaei H, McBee J, Watts J R, *et al.* Comparative evaluation of current peptide production platforms used in absolute quantification in proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2008, **7**(4): 813–823
- [23] Chen J, Wang M, Turko I V. Mass spectrometry quantification of clusterin in the human brain. *Mol Neurodegener*, 2012, **7**(1): 41–47
- [24] Berglund L, Bjorling E, Jonasson K, *et al.* A whole-genome bioinformatics approach to selection of antigens for systematic antibody generation. *Proteomics*, 2008, **8**(14): 2832–2839
- [25] Uhlen M, Bjorling E, Agaton C, *et al.* A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2005, **4**(12): 1920–1932
- [26] Nilsson P, Paavilainen L, Larsson K, *et al.* Towards a human proteome atlas: high-throughput generation of monospecific antibodies for tissue profiling. *Proteomics*, 2005, **5**(17): 4327–4337
- [27] Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, *et al.* Towards a knowledge based human protein atlas. *Nat Biotech*, 2010, **28**(12): 1248–1250
- [28] Marlis Z, Werner L S, Emma L, *et al.* A protein epitope signature tag (PrEST) library allows SILAC-based absolute quantification and multiplexed determination of protein copy numbers in cell lines. *Mol Cell Proteomics*, 2012, **11**(3): O111.009613
- [29] Brun V, Dupuis A, Adrait A, *et al.* Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2007, **6**(12): 2139–2149
- [30] Singh S, Springer M, Steen J, *et al.* FLEXIQuant: a novel tool for the absolute quantification of proteins, and the simultaneous identification and quantification of potentially modified peptides. *J Prot Res*, 2009, **8**(5): 2201–2210
- [31] Ivan Matic, Ellis G Jaffray, Senga K Oxenham, *et al.* Absolute SILAC-compatible expression strain allows sumo-2 copy number determination in clinical samples. *J Proteome Res*, 2011, **10**(10): 4869–4875
- [32] Janecki D J, Bemis K G, Tegeler T J, *et al.* A multiple reaction monitoring method for absolute quantification of the human liver alcohol dehydrogenase ADH1C1 isoenzyme. *Anal Biochem*, 2007, **369**(1): 18–26
- [33] Picard G, Lebert D, Louwagie M, *et al.* PSAQ™ standards for accurate MS-based quantification of proteins: from the concept to biomedical applications. *J Mass Spectrom*, 2012, **47**(10): 1353–1363
- [34] Brun V, Masselon C, Garin J, *et al.* Isotope dilution strategies for absolute quantitative proteomics. *J Proteomics*, 2009, **72**(5): 740–749
- [35] Dupuis A, Hennekinne J A, Garin J, *et al.* Protein standard absolute quantification (PSAQ) for improved investigation of staphylococcal food poisoning outbreaks. *Proteomics*, 2008, **8**(22): 4633–4636
- [36] Rifai N, Gillette M A, Carr S A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol*, 2006, **24**(8): 971–983
- [37] Ronquist Nii Y, Edlund P O. Determination of corticosteroids in tissue samples by liquid chromatography-tandem mass

- spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, **37**(2): 341–350
- [38] Wolf Yadlin A, Hautaniemi S, Lauffenburger D A. Multiple reaction monitoring for robust quantitative proteomic analysis of cellular signaling networks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(14): 5860–5865
- [39] Kettenbach A N, Rush J, Gerber S A. Absolute quantification of protein and post-translational modification abundance with stable isotope-labeled synthetic peptides. *Nat Protoc*, 2011, **6**(2): 175–186
- [40] Hannah J, Claire E E, Patrick A E, *et al.* Rigorous determination of the stoichiometry of protein phosphorylation using mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, **20**(12): 2211–2220
- [41] Huillet C, Adrait A, Lebert D. Accurate quantification of cardiovascular biomarkers in serum using protein standard absolute quantification (PSAQ™) and selected reaction monitoring. *Mol Cell Proteomics*, 2012, **11**(2): M111.008235
- [42] Adrait A, Lebert D, Trauchessec M, *et al.* Development of a protein standard absolute quantification (PSAQ™) assay for the quantification of staphylococcus aureus enterotoxin A in serum. *J Proteomics*, 2012, **75**(10): 3041–3049
- [43] Pannee J, Portelius E, Oppermann M, *et al.* A selected reaction monitoring (SRM)-based method for absolute quantification of A $\beta$ 38, A $\beta$ 40, and A $\beta$ 42 in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients and healthy controls. *J Alzheimers Dis*, 2012, **29**(3): 537–547
- [44] Hirota Kawakami, Sumio Ohtsuki, Junichi Kamiie, *et al.* Simultaneous absolute quantification of 11 cytochromeP450 isoforms in human liver microsomes by liquid chromatography tandem mass spectrometry with in silico target peptide selection. *J Pharm Sci*, 2011, **100**(1): 341–352
- [45] Keshishian H, Addona T, Burgess M, *et al.* Quantitative, multiplexed assays for low abundance proteins in plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution. *Mol Cell Proteomics*, 2007, **6**(12): 221–229

## Development of Absolute Quantification of Proteome Based on Isotope Dilution\*

LU Ya-Li<sup>1)</sup>, SUN Ai-Hua<sup>2)</sup>, HE Fu-Chu<sup>2)</sup>, JIANG Ying<sup>2)\*\*</sup>

<sup>1)</sup> School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013, China;

<sup>2)</sup> State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 102206, China)

**Abstract** Absolute quantification methodologies, which allow the determination of protein concentrations in biological samples such as cell, tissue and body fluid. Recently, protein quantification methodologies mainly are one which rely on the isotope dilution for absolute quantification of proteome and another one which rely on the statistic analysis of MS data called the label-free technique. In these approaches, the sample is spiked with defined amounts of isotope-labeled analogue(s) of specific proteolytic peptide(s) (AQUA and QconCAT strategies) or protein(s) (PSAQ strategy) or PrESTs (PrESTs-SILAC). Because isotope dilution can provide accurate and precise absolute quantification, so they are crucial for specific applications such as the evaluation of clinical biomarker candidates and understanding the biological function of proteins. In this review, we present a critical overview of these isotope dilution methodologies.

**Key words** isotope dilution methodology, absolute quantification, mass spectrometry, proteomics

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2012.00569

\* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (81001470) and National Basic Research Program of China(2011CB505304).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-10-80705299, E-mail: jiangying304@hotmail.com

Received: February 24, 2013 Accepted: April 24, 2013