

## 基于电感耦合等离子体质谱的蛋白质定量技术研究进展\*

米薇 王晶\*\*

(中国计量科学研究院生物能源环境所, 北京 100013)

**摘要** 综述了 ICP-MS 法应用于蛋白质定量技术方面的研究进展。蛋白质定量研究已成为蛋白质组学研究领域的热点, 它是解析生物体蛋白质功能的重要途径。基于同位素标记和生物质谱分析技术是蛋白质定量最常用的方法之一, 近年来, 随着质谱技术的发展, 电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)技术成为元素测量的重要手段, 这使其在蛋白质定量中具有一定的应用前景。

**关键词** 电感耦合等离子体质谱, 蛋白质定量, 蛋白质组学, 稀土金属标记

**学科分类号** Q51

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2009.00498

随着人类基因组精确图谱的公布, 基因组功能的阐明已经成为生命科学研究中一项极重要的任务。蛋白质是基因的最终产物同时也是基因功能的最终执行体, 为了充分了解蛋白质在细胞、组织以及人体内的功能, 就必须用量的信息来表征蛋白质<sup>[1]</sup>。蛋白质定量在临床检验、生物医药等重要领域起着关键作用, 对于肿瘤标志物测定、临床疾病的诊断和治疗、蛋白质和多肽药物的质量检验等具有重要意义<sup>[2]</sup>。快速发展的质谱技术, 为蛋白质定量提供了关键的技术手段, 也使规模化定量分析生物样本包括细胞或组织内的蛋白质成为可能。随着蛋白质组学研究的不断深入, 蛋白质定量技术和方法的研究正逐渐成为蛋白质研究领域的热点。近年来, 除了基于稳定同位素标记与 ESI-MS、MALDI-TOF 等生物质谱联用技术迅速发展之外, 基于电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)的蛋白质定量新技术新方法也不断涌现。ICP-MS 是重要的无机多元素分析手段, 具有灵敏度高、检出限低、选择性好、线性动态范围宽、能够进行多元素同时测定和同位素分析等优点。自 20 世纪 80 年代第一台 ICP-MS 商品化的仪器问世以来, ICP-MS 基础理论研究不断深入, 仪器性能日益改进, 这些都极大地推动了 ICP-MS 分析技术的应用和发展, 使其已经成为分析化学中重要的痕量元素分析技术<sup>[3-4]</sup>。随着 ICP-MS 分析技术日趋成熟, 应用领域也在不断拓宽。当前, 生命科学的迅猛发展极大地推动了

ICP-MS 在蛋白质分析领域中的应用<sup>[5-9]</sup>。

本文对近年来基于 ICP-MS 质谱的蛋白质定量技术进行了综述, 着重论述了电感耦合等离子体质谱利用蛋白质结合的金属元素、内在元素和标记的稀土金属元素进行蛋白质定量研究的几种技术方法, 并对方法的应用研究进行了讨论, 以期为蛋白质定量和蛋白质组学研究提供可以借鉴的研究策略。

### 1 基于金属元素 ICP-MS 测定的蛋白质定量技术

作为无机元素分析的重要手段, ICP-MS 在生命科学领域中应用并不十分广泛。之前, ICP-MS 对生物大分子的分析主要集中在金属蛋白研究中, 人体内存在一些重要的金属蛋白, 金属元素的存在对保持这些蛋白质的功能、结构和稳定性是不可缺少的。金属蛋白在人体各项生理活动中发挥着重要作用<sup>[7-8]</sup>。ICP-MS 对金属蛋白进行定量, 是通过测定金属元素的量, 再根据每种蛋白质所含金属的计量比, 计算出蛋白质的绝对量。Harrington 等<sup>[9]</sup>利

\* 国家科技重大专项资助项目(2008ZX08012-003), 国家科技支撑计划资助项目(2006BAK04A02)。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 010-64203542, E-mail: wj@nim.ac.cn

收稿日期: 2009-08-19, 接受日期: 2009-10-12

用<sup>65</sup>Cu作为稀释剂(spike),采用ICP-MS同位素稀释法对含铜的金属蛋白进行了绝对定量.王萌等<sup>[10]</sup>使用体积排阻色谱(size exclusion chromatography, SEC)与ICP-MS联用,结合柱后同位素稀释法,分析了两种蛋白质——超氧化物歧化酶Cu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>-SOD和金属硫蛋白Zn<sub>7</sub>-MT的量.通过ICP-MS检测得到<sup>65</sup>Cu、<sup>66</sup>Cu、<sup>66</sup>Zn和<sup>67</sup>Zn四个核素的计数,经过校正和计算,得到被测元素的绝对量.根据柱后同位素稀释和已知金属蛋白的理论计量比计算出蛋白质的量,与称量所得蛋白质质量相比,比值在90%~120%之间.测量的精密度RSD小于4%,Cu和Zn的检出限分别为0.2 ng和1.5 ng.结果证明,ICP-MS可以定量分析金属结合蛋白,而且可以得到金属蛋白所含金属离子的计量比.

## 2 基于硒元素 ICP-MS 测定的蛋白质定量技术

近年来人们通过ICP-MS测定蛋白质中含有的硒元素对硒蛋白这一类功能特殊的蛋白质进行了研究.硒在体内主要通过硒蛋白发挥作用,人体血液中96%~98%的硒是和蛋白质结合的,一般以硒代半胱氨酸(Sec)、硒代甲硫氨酸的形式结合在蛋白质中.由于细胞和组织中硒蛋白含量很低,而不含硒的同源蛋白往往比硒蛋白丰度更高,因此含硒蛋白在检测中很容易被同源蛋白所抑制.ICP-MS具有高分辨率、高灵敏度的特点,它能灵敏高效地识别硒,从而对硒蛋白进行测定<sup>[11]</sup>.

Nyman等<sup>[12]</sup>采用HPLC-ICP-MS定量了血液和前列腺癌组织蛋白酶切液中的硒代甲硫氨酸,绝对检出限为0.1 ng(硒),但是该方法线性比较差.这是因为样品量比较少、硒的含量比较低.另外,样品基体的复杂性以及复杂的前处理包括多次液相分离也影响了定量.采用同位素稀释法(Isotope dilution)应用于ICP-MS,极大地提高了复杂基体样品中硒蛋白分析的精确性.Encinar等<sup>[13]</sup>采用这种精确的方法对血液样品中的硒蛋白进行了定量.血液样本用蛋白酶和脂肪酶混合酶切后,将硒代半胱氨酸用碘乙酰胺烷基化,通过SEC和毛细管高效液相色谱(Cap-HPLC)对硒代甲硫氨酸和烷基化后的硒代半胱氨酸组分进行分离.同位素稀释质谱ICP-MS定量法利用标记<sup>77</sup>Se的硒代甲硫氨酸作为稀释剂,通过测定硒代甲硫氨酸<sup>77</sup>Se和<sup>80</sup>Se的丰度比从而进行定量.这种方法的绝对检出限为75 pg,测量的精密度RSD小于5%,同位素稀释法校正了

样品处理过程以及分析过程的随机和系统误差,提高了ICP-MS定量的精确性.

Tastet等<sup>[14]</sup>将Cap-HPLC-ICP-MS用于硒化酵母中含硒蛋白的定量研究.用8 mol/L尿素和4%的CHAPS通过超声将酵母中的蛋白质提取出来,蛋白质进行二维凝胶电泳分离,胶上蛋白质点经胰酶消化后进行Cap HPLC-ICP-MS检测,硒的检测限可以低于pg水平.由于这种方法灵敏度高、无基质抑制的效应,因此色谱图信噪比能达到10:1 000,高于普通电喷雾四极杆飞行时间串联质谱(ESI Q-TOF MS/MS)的检测能力.另外,Tastet等<sup>[15]</sup>还将Cap-HPLC-ICP-MS和ESI Q-TOF MS/MS结合起来,通过Cap-HPLC-ICP-MS检测提供元素信息和ESI Q-TOF MS/MS提供分子结构信息,这种将ICP-MS质谱和分子质谱相结合的方法为ICP-MS进行蛋白质定量研究提供了新的思路.研究共鉴定了17个硒蛋白,其中12个是新发现的.

利用ICP-MS对硒元素测定从而对硒蛋白进行定量的研究已经取得了一些进展,但由于硒的电离电位很高,以及由于ICP源带来的各种干扰对硒同位素的测量影响较大,自然环境中硒的含量低,以及相关标准物质不足等因素,使依赖于硒准确测量的硒蛋白定量依然面临许多挑战.

## 3 基于硫元素 ICP-MS 测定的蛋白质定量技术

在ICP-MS可以测量的所有元素中,硫(S)是最适合作为蛋白质定量分析的内标元素<sup>[16]</sup>.这是由于S是蛋白质中一种常见的元素,S原子多以共价键稳定地存在于蛋白质分子中.蛋白质有两种氨基酸,即蛋氨酸和半胱氨酸含有硫元素.根据统计分析,SwissProt蛋白质数据库人的蛋白质数据库中98.8%的蛋白质含有甲硫氨酸,96.6%的蛋白质含有半胱氨酸<sup>[17]</sup>.几乎每一个蛋白质酶切后都至少有一条包含硫元素的肽段.因此,硫元素在蛋白质定量中发挥着重要的作用.许多经典的依赖于生物质谱的蛋白质定量方法都是通过对半胱氨酸的巯基进行同位素标记从而实现定量的<sup>[18-19]</sup>.如果某种蛋白质已经由生物质谱鉴定,或者这种蛋白质分子的氨基酸序列和其中含有的S原子数已知,那么就可以通过ICP-MS直接测定半胱氨酸或甲硫氨酸中硫的含量实现蛋白质的绝对定量.

因为硫的离子化效率低并且容易受到严重的谱线干扰,ICP-MS直接测量硫原子存在着一些困

难。硫的第一电离能高达 10.36 电子伏特，硫原子不容易失去一个电子，即使在 7 500 K 的等离子体里，硫也只有 10%~14% 的离子化效率，造成 ICP-MS 检测灵敏度不高。另外，硫的测量还会受到质谱中质荷比为 32 和 34 的多原子离子的干扰，例如等离子体中  $O_2^+$  会对硫产生严重的谱线干扰。采用双聚焦扇形磁场的高分辨 ICP-MSD 代替四极杆质量分析器的 ICP-MS 可以比较好地解决这一问题，但是这类仪器的价格昂贵，分析灵敏度也因为分辨率的提高有所降低<sup>[20]</sup>。针对使用低分辨率的四极杆 ICP-MS 时产生的严重质谱谱线干扰问题，人们发展了各种方法和技术，例如使用碰撞池(或反应池)技术来克服这种谱线干扰<sup>[21-22]</sup>。一种方法是在碰撞池中加入气体，例如氦气、氢气、氙气、或者多种气体的混合，来减少对硫的干扰。实验证明，氙气作为碰撞气体是最有效的，它通过电荷转移消除  $O_2^+$  对  $S^+$  测量的干扰，能明显降低硫原子谱峰的背景噪音；Pröfrock 等<sup>[23]</sup>利用氙气作为碰撞气，使用毛细管电泳和电感耦合等离子体质谱，对金属蛋白的硫原子进行了测量， $^{32}S$  和  $^{34}S$  的检测限能达到 3.2  $\mu g/L$  和 1.3  $\mu g/L$ 。另一种方法是加入  $O_2$ ，将  $S^+$  氧化为  $SO^+$ ，从而避开了  $O_2^+$  的干扰。Wang 等<sup>[24]</sup>采用向碰撞池中加入  $O_2$  的方法，使之与 S 反应生成  $SO^+$ ，通过间接测定  $^{32}S^{16}O^+$ ，避开了  $O_2^+$  等多原子离子对 S 测量的严重干扰，以  $^{32}S^{16}O^+$  的峰面积进行定量。研究通过 SEC-ICP-MS 联用，测定了牛血清白蛋白、超氧化物歧化酶、金属硫蛋白等 3 种标准蛋白中的 S，根据每种蛋白质含有的 S 原子数，计算出了 3 种蛋白质的摩尔比值。分析得到的蛋白质比值与天平的称量结果相一致，结果证明该方法的精密度好，峰面积的 RSD < 3% ( $n = 3$ )。

Wind 等<sup>[6]</sup>使用 ICP-MS 和 ESI-MS 两种质谱，利用硫作为内标元素对胰岛素和两个重组蛋白的混合物进行了定量。每个胰岛素蛋白含有 6 个硫原子，通过对  $^{32}S$  的测定实现了对蛋白质的绝对定量。重组蛋白经过酶切后先用 ESI-MS 对肽段进行鉴定，然后再对含有硫的肽段进行 ICP-MS 分析从而进行了定量。实验中将 ESI-MS 对蛋白质的结构分析和 ICP-MS 对蛋白质的定量分析结合起来，实现了对蛋白质的定性和定量研究。

Schaumlöffel 等<sup>[21]</sup>应用柱前同位素稀释法(post-column isotope dilution)对人血清白蛋白和酵母蛋白酶切后的含硫肽段进行了 ICP-MS 的精确定量研究。与柱后同位素稀释法不同，样品在色谱分离前

加入硫元素的同位素稀释剂(Spike)  $^{34}S$ ，然后进行色谱分离再进入 ICP-MS 检测。实验证明应用柱前同位素稀释法，不但可以消除因仪器漂移而产生的偏差，而且可以降低色谱峰的展宽，稳定稀释剂的流速，质谱检测限可以达到 pg 级。

利用 ICP-MS 测定蛋白质和肽段中的硫元素进行蛋白质定量不需要对蛋白质和肽段进行同位素标记或者化学标记，与常规蛋白质定量方法相比，不存在标记效率问题，通过直接测定蛋白质中甲硫氨酸和半胱氨酸的硫，可以实现蛋白质的绝对定量。但是利用硫元素对蛋白质定量还有许多局限。因为进入到 ICP-MS 进行测定时，蛋白质和肽段的任何结构信息都将丢失，所以蛋白质和肽段在测定之前要通过色谱或者电泳等分离手段实现基线分离，另外利用 ICP-MS 测定硫进行蛋白质定量还需要预先知道蛋白质的结构，即含有硫原子的个数。最严重的局限该方法广泛应用的原因还是由于硫原子在 ICP-MS 测定中检测灵敏度低，背景噪音高。该方法现在还只应用在一些简单的标准蛋白定量研究中，例如定量血清白蛋白、胰岛素等。

#### 4 基于磷元素 ICP-MS 测定的蛋白质定量技术

磷是生物体中最重要的元素之一。磷酸化过程是调节蛋白质活性的重要过程，揭示蛋白质磷酸化修饰发生规律是理解生物体复杂多样的生物进程的一个重要前提。磷酸化蛋白在样本中含量低且动态范围广、蛋白质磷酸化水平不均一、磷酸化修饰类型多，这些特点决定了对磷酸化蛋白的研究具有挑战性。蛋白质分子中磷的测定可以对蛋白质的磷酸化状态提供重要信息。ICP-MS 对元素的测定与分析物的结构无关，只与分析物中元素的含量有关，因此 ICP-MS 不仅能够鉴定蛋白质中磷的存在，而且可准确测定蛋白质的磷酸化程度。

在前期的探索研究中，Wind 等<sup>[25]</sup>用高分辨  $\mu LC$ -ICP-MS 联用技术建立了对磷蛋白中的磷酸化程度进行测定的方法，在实验中，通过同时测定  $^{31}P^+$  和  $^{32}S^+$ ，再结合蛋白质的序列信息和  $^{31}P^+/^{32}S^+$  的比值( $^{32}S^+$  作为测定  $^{31}P^+$  的内标物质)可以得到蛋白质的磷酸化信息。

Bandura 等<sup>[22]</sup>报道了采用具有动态反应室的低分辨四极杆 ICP-MS 测定痕量 S 和 P 的方法。以  $O_2$  作为反应气体在动态反应室中将  $P^+$  和  $S^+$  分别氧化为  $^{31}P^{16}O^+$  和  $^{32}S^{16}O^+$  后同时进行测定，减小了直

接测定  $^{31}\text{P}^+$  和  $^{32}\text{S}^+$  受到的质谱干扰, 在 200 V 最佳轴场电压下, P 和 S 的检出限分别为 0.06  $\mu\text{g/L}$  和 0.2  $\mu\text{g/L}$ . 采用此方法对  $\alpha$ 、 $\beta$ -酪蛋白中的磷酸化程度进行了测定, 结果与蛋白质结构相符.

Navaza 等<sup>[26]</sup>应用 ICP-MS 对蛋白质组中的磷酸化蛋白进行了定量研究, 其基本策略是: 在酶切后的磷酸化肽段混合物中加入一适当的磷酸化合物 BNPP 作为内标, 经  $\mu\text{HPLC}$  分离后, 在 ICP-MS 中检测磷元素的质谱峰强度, 同时在同样的色谱条件下用 ESI-MS 进行定性鉴定肽段的氨基酸序列, 通过内标的峰强度和已知的加入量, 以及每个肽段含磷酸残基的个数, 就可以计算出含磷酸肽段的绝对量.

用 ICP-MS 对磷酸化蛋白和肽段进行定量有许多优势: a. 通过内标例如 BNPP 能实现对磷酸化蛋白和肽段的绝对定量; b. 因为 ICP-MS 具有灵敏度高、动态范围大的特点, 它能够对蛋白质磷酸化的动态变化过程进行定量研究; c. 因为 ICP-MS 是对磷元素进行测定, 与分子结构无关, 提高了磷酸化蛋白定量研究的速度和精确度. 然而, 用 ICP-MS 测定磷进行磷酸化蛋白定量仍然面临许多问题. 首先磷和硫一样, 具有较高的第一电离能 (10.48 电子伏特), 在 ICP-MS 中的检测灵敏度低. 此外, 空气和样品基体中的多原子离子, 如  $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ 、 $^{14}\text{N}^{17}\text{O}^+$  等, 会严重干扰 ICP-MS 对磷的测定. 另外磷只有单同位素  $^{31}\text{P}$ , 无法选择其他同位素峰或用同位素稀释法进行分析.

## 5 基于标记的稀土金属 ICP-MS 测定的蛋白质定量技术

虽然 ICP-MS 已经很成功地应用到金属蛋白分析中, 但是多数蛋白质主要是由 C、H、O 等元素组成, 采用 ICP-MS 无法通过直接测定对它们进行定量. 另外, ICP-MS 可以通过对硫、磷等蛋白质中的常见原子进行测定从而实现蛋白质定量, 但是由于硫、磷原子在 ICP-MS 测定中检测灵敏度低、背景噪音高、应用难度较大. 长期以来, 人们普遍认为, 如果生物大分子不含有金属原子, 就不能采用诸如 ICP-MS 等无机元素分析法进行测定. 然而, 近来的研究表明, ICP-MS 同样可以作为高灵敏度的检测手段用于不含金属原子的蛋白质的定量分析.

2004 年, Meares 等避开以稳定同位素为质量标签, 而以化学性质很相近的稀土金属元素作为质

量标签, 提出了“元素标记亲和标签”(element-coded affinity tags, ECAT)的新方法, 在该方法中通过四氮杂环十二烷四乙酸(DOTA)作为螯合试剂, 螯合不同的稀土金属元素作为质量标签, 通过与巯基的特异性反应, 标记了一个含有巯基的标准肽段, 对标记有稀土元素钇和铽的肽段混合物的色谱行为和质谱中的裂解行为做了初步的验证<sup>[27]</sup>. 稀土金属元素的化学物理性质非常相近, 在液相上能共洗脱. 与硫、磷等元素相比, 稀土金属元素在 ICP-MS 中质谱响应更强, 受到的同量异位素干扰较少, 更容易检测. 因此, 利用 ICP-MS 检测蛋白质标记的稀土金属从而进行蛋白质定量的方法具有很大的应用前景.

Liu 等<sup>[28]</sup>采用了酸酐类双功能试剂二乙三胺五乙酸双酸酐(DTPAA)作为螯合剂对蛋白质的 N 端进行了酰化衍生. DTPAA 是一种多氨基多羧基类螯合剂, 可以与肽段或蛋白质的 N 端和 Lys 残基侧链上氨基基团发生酰基化反应, 同时它含有多个氮原子和氧原子, 能与稀土金属有很强的螯合力, 形成很稳定的螯合物. 这种标记试剂是针对蛋白质的 N 端或肽段伯氨基的普遍性标记, 这使得标记反应不再局限于含有巯基的蛋白质和肽段.

Patel 等<sup>[29]</sup>采用循环二乙三胺五乙酸酸酐(cDTPA)作为螯合剂, 衍生缓激肽和 P 物质, 螯合  $\text{Eu}^{3+}$ , 通过 HPLC-ICP-MS 检测金属元素和对多肽进行定量, 并测定  $^{151}\text{Eu}/^{153}\text{Eu}$  同位素比值用来校正肽段的原始比例, 这种方法实现了肽段的绝对定量. 但是采用稀土金属标记蛋白的 ICP-MS 定量技术关键在于肽段的衍生和金属标记的特异性和效率, 如果反应的特异性和效率不高, 衍生和标记后的产物就不能反应蛋白质和肽段的真实量.

为了提高蛋白质金属标记的效率和特异性, Rappel 和 Schaumlöffel<sup>[30]</sup>优化了酸酐类双功能试剂标记蛋白, 肽段的反应步骤和反应缓冲液, 提高了蛋白质和肽段稀土金属标记的反应效率, 发展了一种高效的 ICP-MS 定量检测稀土金属标记蛋白的技术. 他们用螯合稀土金属镱的二乙三胺五乙酸酸酐(Lu-DTPA)对肽段进行了标记, 通过 ESI-MS 检测验证标记反应的特异性, 标记后的肽段回收率可以达到 100%, 方法的精密密度为 4.9%. Lu-DTPA 标记的肽段检测限可以达到 179 amol, 比通过检测蛋白质的硫、磷原子进行 ICP-MS 定量的灵敏度高 4 个数量级.

利用稀土金属元素标记进行蛋白质 ICP-MS 定

量研究具有许多优点: a. 这种定量方式元素专一性强、检测灵敏度高、动态范围大、受化合物本身的性质影响较小; b. 通过 ICP-MS 测定稀土金属, 可以实现溯源, 测定结果具有可比性; c. 与同位素试剂相比, 稀土金属价格便宜, 并且螯合可以选择的稀土元素范围比较广, 大大扩展了蛋白质金属标记的选择范围, 可以进行多元素多同位素检测。但是该方法也存在一些不足: 首先由于蛋白质需要进行标记反应, 会存在标记效率的问题; 另外螯合剂螯合金属需要考察它的稳定性, 在前处理过程中可能会存在金属原子的交换; 最关键的是被定量的肽段与其他被定量的肽段要能实现基线分离, 同时需要利用其他质谱方法例如 ESI-MS、MALDI-TOF 等对其序列进行鉴定, 确定蛋白质和肽段的结构才能实现定量。

## 6 结论与展望

ICP-MS 技术因其灵敏度高、准确度和精确度好、本底效应低等特点为蛋白质定量研究提供了新的思路和新的方法。随着质谱技术、高效的分离手段包括多维色谱分离技术和 2-DE 等技术的不断发展, 以及对蛋白质金属标记等相关新技术、新方法研究的不断深入, 基于 ICP-MS 的蛋白质定量研究已经取得了较大的发展。但现阶段 ICP-MS 的蛋白质定量方法主要还是集中在对标准样品和简单蛋白质样品的应用上。为了实现对复杂蛋白质样品的定量, 需要发展强有力的高分辨率分离技术与高灵敏度的 ICP-MS 联用, 将不同机理和模式的分离技术(如各种电泳技术、色谱技术)有效组合, 进行多维分离, 以获得对蛋白质或多肽混合物的基线分离。另外, ICP-MS 作为元素的分析手段, 需要 ESI-MS、MALDI-TOF 等生物质谱提供蛋白质结构信息, 将元素定量分析的无机质谱和蛋白质结构分析的生物质谱有机地结合。基于分离技术的发展和质谱技术的辅助, 蛋白质的 ICP-MS 定量技术在生物样本的蛋白质定量和蛋白质组学研究中会具有潜在广泛的应用价值。

## 参 考 文 献

- [1] Havlis J, Shevchenko A. Absolute quantification of proteins in solutions and in polyacrylamide gels by mass spectrometry. *Anal Chem*, 2004, **76** (11): 3029-3036
- [2] Barnidge 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 Proteome Res*, 2004, **3** (3): 644-652
- [3] Praphairaksit N, Houk R S. Reduction of space charge effects in inductively coupled plasma mass spectrometry using a supplemental electron source inside the skimmer: ion transmission and mass spectral characteristics. *Anal Chem*, 2000, **72**(11): 2356-2361
- [4] Praphairaksit N, Houk R S. Reduction of mass bias and matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry with a supplemental electron source in a negative extraction lens. *Anal Chem*, 2000, **72** (18): 4435-4440
- [5] Muñoz C S, Gayón J M M, Alonso J I G, *et al.* Speciation of essential elements in human serum using anion-exchange chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis with double focusing ICP-MS. *J Analytical Atomic Spectrometry*, 2001, **16** (6): 587-592
- [6] Baranov V I, Quinn Z, Bandura D R, *et al.* A sensitive and quantitative element-tagged immunoassay with ICPMS detection. *Anal Chem*, 2002, **74** (7): 1629-1636
- [7] Inagaki K, Mikuriya N, Morita S, *et al.* Speciation of protein-binding zinc and copper in human blood serum by chelating resin pre-treatment and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analyst*, 2000, **125** (1): 197-203
- [8] Wang J, Dreessen D, Wiedner D R, *et al.* Measurement of trace elements in proteins extracted from liver by size exclusion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry with a magnetic sector mass spectrometer. *Anal Biochem*, 2001, **288** (1): 89-96
- [9] Harrington C F, Vidler D S, Watts M J, *et al.* Potential for using isotopically altered metalloproteins in species-specific isotope dilution analysis of proteins by HPLC coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem*, 2005, **77** (13): 4034-4041
- [10] 王 萌, 丰伟悦, 陆文伟, 等. SEC-ICP-MS 结合同位素稀释技术分析金属蛋白. *质谱学报*, 2007, **28** (增刊): 81-82  
Wang M, Feng W Y, Lu W W, *et al.* *J Chin Mass Spectrometry Society*, 2007, **28** (Suppl): 81-82
- [11] Liu Q, Peng Z, Liang X Y. Progress in the detection of selenium-containing trace proteins. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2009, **29** (2): 530-535
- [12] Nyman D W, Suzanne Stratton M, Kopplin M J, *et al.* Selenium and selenomethionine levels in prostate cancer patients. *Cancer Detect Prev*, 2004, **28** (1): 8-16
- [13] Encinar J R, Schaumlöffel D, Ogra Y, *et al.* Determination of selenomethionine and selenocysteine in human serum using speciated isotope dilution-capillary HPLC-inductively coupled plasma collision cell mass spectrometry. *Anal Chem*, 2004, **76** (22): 6635-6642
- [14] Tastet L, Schaumlöffel D, Bouyssiere B, *et al.* Capillary HPLC-ICP MS mapping of selenocompounds in spots obtained from the 2-D gel electrophoresis of the water-soluble protein fraction of selenized yeast. *Anal Bioanal Chem*, 2006, **385** (5): 948-953
- [15] Tastet L, Schaumlöffel D, Bouyssiere B, *et al.* Identification of selenium-containing proteins in selenium-rich yeast aqueous extract

- by 2D gel electrophoresis, nanoHPLC-ICP MS and nanoHPLC-ESI MS/MS. *Talanta*, 2008, **75** (4): 1140–1145
- [16] Wind M, Wegener A, Eisenmenger A, *et al.* Sulfur as the key element for quantitative protein analysis by capillary liquid chromatography coupled to element mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2003, **42** (29): 3425–3427
- [17] Rappel C, Schaumlöffel D. The role of sulfur and sulfur isotope dilution analysis in quantitative protein analysis. *Anal Bioanal Chem*, 2008, **390** (2): 605–615
- [18] Li J, Steen H, Gygi S P. Protein profiling with cleavable isotope-coded affinity tag (cICAT) reagents: the yeast salinity stress response. *Mol Cell Proteomics*, 2003, **2** (11): 1198–1204
- [19] Wiese S, Reidegeld K A, Meyer H E, *et al.* Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics*, 2007, **7** (3): 340–350
- [20] Bechmann I E, Sturup S, Kristensen L V. High resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (HR-ICPMS) determination and multivariate evaluation of 10 trace elements in mussels from 7 sites in Limfjorden, Denmark. *Fresenius J Anal Chem*, 2000, **368** (7): 708–714
- [21] Schaumlöffel D, Giusti P, Preud'Homme H, *et al.* Precolumn isotope dilution analysis in nanoHPLC-ICPMS for absolute quantification of sulfur-containing peptides. *Anal Chem*, 2007, **79** (7): 2859–2868
- [22] Bandura D R, Baranov V I, Tanner S D. Detection of ultratrace phosphorus and sulfur by quadrupole ICPMS with dynamic reaction cell. *Anal Chem*, 2002, **74** (7): 1497–1502
- [23] Pröfrock D, Leonhard P, Prange A. Determination of sulfur and selected trace elements in metallothionein-like proteins using capillary electrophoresis hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry with an octopole reaction cell. *Anal Bioanal Chem*, 2003, **377** (1): 132–139
- [24] Wang M, Feng W, Lu W, *et al.* Quantitative analysis of proteins via sulfur determination by HPLC coupled to isotope dilution ICPMS with a hexapole collision cell. *Anal Chem*, 2007, **79** (23): 9128–9134
- [25] Wind M, Wesch H, Lehmann W D. Protein phosphorylation degree: determination by capillary liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem*, 2001, **73** (13): 3006–3010
- [26] Navaza A P, Encinar J R, Carrascal M, *et al.* Absolute and site-specific quantification of protein phosphorylation using integrated elemental and molecular mass spectrometry: its potential to assess phosphopeptide enrichment procedures. *Anal Chem*, 2008, **80** (5): 1777–1787
- [27] Whetstone P A, Butlin N G, Comeillie T M, *et al.* Element-coded affinity tags for peptides and proteins. *Bioconjug Chem*, 2004, **15** (1): 3–6
- [28] Liu H, Zhang Y, Wang J, *et al.* Method for quantitative proteomics research by using metal element chelated tags coupled with mass spectrometry. *Anal Chem*, 2006, **78** (18): 6614–6621
- [29] Patel P, Jones P, Handy R, *et al.* Isotopic labelling of peptides and isotope ratio analysis using LC-ICP-MS: a preliminary study. *Anal Bioanal Chem*, 2008, **390** (1): 61–65
- [30] Rappel C, Schaumlöffel D. Absolute peptide quantification by lutetium labeling and nanoHPLC-ICPMS with isotope dilution analysis. *Anal Chem*, 2009, **81** (1): 385–393

## Development of Protein Quantification Based on ICP-MS\*

MI Wei, WANG Jing\*\*

(National Institute of Metrology, Department of Biology, Energy and Environment, Beijing 100013, China)

**Abstract** Protein quantitative research has become a hot topic in proteomics and a main approach to discover biological protein functions. The technique based on isotope labeling and biological mass spectrometry analysis is one of the most commonly used strategies for protein quantification. In recent years, with the development of mass spectrometry techniques, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) becomes a powerful tool for research and measurement of elements, and may be enabling new insights and broad application in protein quantification. The advance of ICP-MS based techniques in the research of protein quantification was reviewed.

**Key words** inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), protein quantification, proteomics, rare-earth elemental labeling

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2009.00498

\*This work was supported by grants from The National Key Scientific and Technological Project (2008ZX08012-003) and The National Science and Technology Supporting Plan (2006BAK04A02).

\*\*Corresponding author. Tel: 86-10-64203542, E-mail: wj@nim.ac.cn

Received: August 19, 2009 Accepted: October 12, 2009