

分类号: \_\_\_\_\_ 密级: \_\_\_\_\_

UDC: \_\_\_\_\_ 编号: \_\_\_\_\_

# 学位论文

毛细管高效液相色谱-质谱定量分析中毛细管电加热装置和精  
氨酸标记新方法的研究

**A novel method of capillary electrical heating apparatus and  
arginine labeling in capillary HPLC-MS quantitation**

金祖耀

指导教师姓名 \_\_\_\_\_ 张养军 副研究员

申请学位级别 \_\_\_\_\_ 硕士 \_\_\_\_\_ 专业名称 \_\_\_\_\_ 药物分析学

提交论文日期 \_\_\_\_\_ 2015.03.16 \_\_\_\_\_ 论文答辩日期 \_\_\_\_\_ 2015.05.13

学位授予单位和日期 \_\_\_\_\_ 安徽医科大学 2015年5月

答辩委员会主席 \_\_\_\_\_ 李云峰

评 阅 人 \_\_\_\_\_ 盲审

2015年5月

分类号: \_\_\_\_\_ 密级: \_\_\_\_\_

UDC: \_\_\_\_\_ 编号: \_\_\_\_\_

# 学位论文

毛细管高效液相色谱-质谱定量分析中毛细管电加热装置和精氨酸标记新方法的研究

**A novel method of capillary electrical heating apparatus and arginine labeling in capillary HPLC-MS quantitation**

金祖耀

指导教师姓名 \_\_\_\_\_ 张养军 副研究员

申请学位级别 \_\_\_\_\_ 硕士 \_\_\_\_\_ 专业名称 \_\_\_\_\_ 药物分析学

提交论文日期 \_\_\_\_\_ 2015.03.16 \_\_\_\_\_ 论文答辩日期 \_\_\_\_\_ 2015.05.13

学位授予单位和日期 \_\_\_\_\_ 安徽医科大学 2015年5月

答辩委员会主席 \_\_\_\_\_ 李云峰

评 阅 人 \_\_\_\_\_ 盲审

2015年5月

## 学位论文独创性声明

本人所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已 在论文中作了明确说明并表示谢意。

学位论文作者签名：金祖耀 日期：2015.5.18

## 学位论文使用授权声明

本人完全了解安徽医科大学有关保留、使用学位论文的规定：学校有权保留学位论文并向国家主管部门或其指定机构送交论文的电子版和纸质版，有权允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。愿意将本人的学位论文提交《中国博士学位论文全文数据库》、《中国优秀硕士学位论文全文数据库》和《中国学位论文全文数据库》中全文发表，并可以以电子、网络及其他数字媒体形式公开出版，并同意编入 CNKI《中国知识资源总库》，在《中国博硕士学位论文评价数据库》中使用和在互联网上传播。保密的学位论文在解密后适用本规定。

学位论文作者签名：金祖耀

日期：2015.5.18

导师签名：张磊

日期：2015.5.18

## 目 录

中文摘要.....	1
Abstract.....	3
第一章 前言.....	5
1 定量蛋白质组学.....	5
2 毛细管高效液相色谱-质谱联用在蛋白质组定量方法中的色谱技术 .....	6
3 毛细管高效液相色谱-质谱联用在蛋白组定量方法中的化学标记 方法.....	9
4 药物代谢酶及其绝对含量测定的意义.....	12
5 本论文研究内容.....	13
第二章 一种简单的毛细管色谱柱电加热装置的制作方法及其性能评 价.....	14
1 实验部分.....	14
2 结果与讨论.....	18
3 结论.....	30
第三章 基于点击化学的精氨酸标记新方法研究.....	31
1 实验部分.....	31
2 结果讨论.....	35
3 结论.....	51
参考文献.....	52

附录.....	59
在学期间发表的论文.....	59
致谢.....	60
综述.....	61

## 中文摘要

随着蛋白质组学研究的不断深入和技术的不断发展，蛋白质组学的重点从蛋白质鉴定、翻译后修饰和相互作用的定性研究，向不同生理和病理状态蛋白质表达的差异变化及对关键的目标蛋白质含量测定转变，因此，定量蛋白质组学已经成为目前蛋白质组学的热点及难点。因此，本论文首先是针对定量蛋白质组学研究中面临的问题，即对复杂生物样本进行高效分离，以实现低丰度蛋白质进行深度定性鉴定和定量分析中采用更长的毛细管色谱柱或采用装填更小粒径填料的毛细管色谱柱时容易引起毛细管色谱柱柱压显著升高，从而引发液相色谱仪中不同连接部位漏液问题，制备了一种简单的电加热装置，并对其性能进行了评价。其次针对目前复杂生物样本中蛋白质或目标定量蛋白质组定量过程中定量方法存在的缺陷，即准确度和灵敏度不高的问题，发展了基于精氨酸化学标记新方法。

本论文由三章组成。第一章首先概述了定量蛋白质组学的研究现状、高效液相色谱分离的重要性、现状及存在问题。其次概述了标记定量在蛋白质组学中的应用现状、药物代谢酶及其绝对含量测定的意义等内容。

第二章介绍了一种简单的毛细管色谱柱电加热装置制作方法，并将该毛细管色谱柱电加热装置安装于液质联用系统，用牛血清蛋白酶切肽段混合物和酵母蛋白酶切肽段混合物从柱压和柱效二方面来对该装置的性能进行了评价。实验结果表明：我们制作的毛细管柱电加热装置用于装填粒径为 3  $\mu\text{m}$  反相色谱填料的毛细管柱后，在最佳电流（100 mA）下对牛血清蛋白酶切肽段混合物进行分离时的柱压比不加电流分离时的柱压降低了 61%，覆盖率增加了 20%；在该最佳电流下对酵母蛋白酶切肽段混合物进行分离时，柱压降低了 50%，而柱效略有升高。这说明我们制作的毛细管色谱柱电加热装置能显著降低柱压，这为在较低的柱压条件下选择更小颗粒色谱填料的毛细管色谱柱提供了一种有效途径。

第三章介绍了基于点击化学的精氨酸化学标记新方法的研究。基于琥珀酰亚

胺基团与肽段 N-末段的反应以及施陶丁格反应的原理，将精氨酸作为标签加到肽段的 N-末段，建立了精氨酸化学标记新方法。实验结果表明：精氨酸化学标记能够实现肽段的高效的标记，满足了标记定量的要求；考察了随意选择的两种同位素的标记肽段的色谱保留行为，保留时间完全一致，使得不同来源的同一肽段可同时在质谱碰撞池碎裂和质谱分析，保证了定量结果的准确度。该方法的建立为复杂生物样本中蛋白质或目标蛋白质组的定量分析提供了一种新的方法学选择。

**关键词：**定量蛋白质组学 毛细管高效液相色谱-质谱联用 精氨酸标记 毛细管色谱柱电加热装置

## Abstract

With comprehensive proteomics research and the development of proteomics technologies, the proteomics focus has turned from qualitative research such as protein identification, post-translational modification and protein-protein interaction to quantitative studies including differential proteomes between different biological states or healthy and pathological states as well as the absolute determination of some key proteins. Accurate quantitation methods for a target proteome have become the current research hot point and their development faces many challenges. To address the problems in quantitative proteomics, such as highly efficient separation of a complex biological sample and deep coverage of proteins with low abundance identified and quantified, a longer capillary chromatographic column or a column packed with packing materials with smaller particle size is employed, but the column back pressure rises notably which often causes liquid leak at connective components. Therefore, in my thesis, a simple electrical heating apparatus was first designed and made, and its performance evaluated. Then, in order to determine the absolute quantities of proteins in a biological sample with high accuracy and sensitivity, a novel absolute quantitation method using arginine labeling combined with multiple reaction monitoring mass spectrometry (MRM MS) was developed.

This thesis consists of three chapters. In the first chapter, an introduction to recent quantitative proteomics, the importance of HPLC separation and its present progress and problems were first described. Then, the current advance of labeling quantitation in proteomics, and the significance of the absolute quantitation of drug metabolizing enzymes were also reviewed.

In the second chapter, a simple method of making an electrical heating apparatus for raising the temperature of capillary columns and its application to LC-MS system was proposed, and its performance was evaluated with bovine serum albumin (BSA) tryptic digest and the tryptic digest of yeast proteins in terms of column pressure and column efficiency. The results showed that at the optimum current, our electric heating apparatus could reduce the column pressure of a capillary column packed with 3  $\mu\text{m}$  packing materials by at least 50% compared with the pressure without electric current applied in the apparatus during the separation of BSA tryptic digest and yeast tryptic digest, and the column efficiency increased slightly. This suggests that the electrical heating apparatus can significantly reduce the column back pressure, which provides us a practical way to use a capillary chromatographic column packed with packing materials with smaller particle size at a lower pressure.

In the third chapter, a novel method of arginine labeling combined with MRM MS was established in which arginine was attached to the N-termini of the peptides by Staudinger reaction and the reaction between N-succinimidyl group and the N-termini. The results showed that arginine labeling is highly efficient and meets the demand of the establishment of a quantitation method. Both isotope labeled peptides had the same chromatographic retention times and appeared in pairs with the nearly same peak intensity. The foundation of this method offers an alternative choice for protein and proteome quantitation in complex samples.

**Key words** quantitative proteomics/capillary high performance liquid chromatography-mass spectrometry/arginine labeling/electric heating apparatus for capillary chromatographic columns

# 第一章 前言

## 1. 定量蛋白质组学

1994年,澳大利亚的科学家 Wilkins 首先提出蛋白质组概念<sup>[1]</sup>,1995年,蛋白质组概念第一次在《Electrophoresis》杂志出现<sup>[2]</sup>。蛋白质组是指基因、细胞或组织所表达的全部蛋白质。随着蛋白质组学研究的深入和技术的不断发展,蛋白质组学研究的重点已经从蛋白质组鉴定、翻译后修饰和相互作用的定性研究,向不同生理和病理状态下蛋白质组表达的差异变化及对关键的目标蛋白质组含量测定转变。蛋白质组定量俨然成为了解生命体活动的过程,实现对关键功能蛋白、蛋白标志物及药物靶标验证的重要策略,因此蛋白质组学定量已经成为目前蛋白质组学研究的热点和难点<sup>[3]</sup>。

根据蛋白质组定量目的不同,定量蛋白质组学分为相对定量和绝对定量研究<sup>[4,5]</sup>。相对定量是指通过对不同生理和病理状态下的细胞、组织或者体液表达的蛋白量进行相互比较,发现差异蛋白的分析方法。绝对定量是指对细胞、组织或者体液中某一状态下蛋白绝对含量或者浓度的测定,从而实现选定生物标志物、药物靶标或者功能蛋白的验证。

基于生物质谱技术的蛋白质组定量是目前蛋白质组量的主要研究方法,主要包括“鸟枪法”和多反应检测(multiple reaction monitoring, MRM)法。基于“鸟枪法”的蛋白质组定量方法是先对不同状态生物样品中的蛋白质组进行酶解和标记,然后将这些肽段混合物进行色谱分离,最后进行串联质谱分析(MS/MS)分析以及对质谱图中不同肽段碎片的离子强度进行比较,确定出差异蛋白质组。该方法的优点是分析通量高,一次可定量上千个蛋白,但无法对多肽信号进行选择,因此主要用于蛋白质组的相对定量,且受基质及其它组分干扰,灵敏度低<sup>[6]</sup>。MRM方法是指根据目标蛋白质的氨基酸序列,预测并选择质谱信号强度高且可以唯一确定目标蛋白的肽段作为特异性肽段,并将其对应的信号强度高的肽段离子和

子离子对作为定量离子，即在三级四级杆质谱中通过设置 Q1 对母离子进行选择，Q2 对选择的母离子进行碎裂，Q3 对子离子进行选择扫描。通过这样的质量过滤和离子检测，可以有效地去除干扰离子，提高定量方法的灵敏度<sup>[7]</sup>。

虽然上述方法具有高灵敏度及线性范围广等特点，但由于其低的质量分辨，难以去除太过复杂的基质干扰，同时由于其监测的离子对数量有限，难以满足蛋白质组学高通量的要求，因此这成为定量蛋白质组学的困境。近年来，陆续出现了一些新的技术，如同步母离子选择（Synchronous precursor selection, SPS）技术、平行反应监测（Parallel reaction monitoring, PRM）技术以及 SWATH（sequential window acquisition of all theoretical fragmentation spectra）技术等。SPS 技术是用多频凹波的隔离波形（MultiNotch）在离子阱中实现一次选择获得多个肽段离子的碎片离子，将这一技术与 MS3 联用时可以通过离子的累积提高信号响应<sup>[8]</sup>。PRM 用 Orbitrap 替代了 MRM 中的 Q3，进而对 Q2 碎裂的子离子进行高分辨率和精确质量的分辨全扫描。与 MRM 相比，提高了灵敏度、线性范围达到 5-6 个数量级。但是，PRM 最多只能检测 15 个母离子，分析通量比 MRM 低<sup>[9]</sup>。SWATH 技术是在快速、高分辨率的 Q-TOF 质谱仪器上开发的一种高通量和高灵敏度的定量技术。采用该方法时，首先将母离子的质荷比范围分成不同的质荷比区间，然后对不同质荷比区间的母离子进行裂解和全扫描，根据这些碎片离子谱图来识别特定的肽段，并通过碎片的离子强度对相应的肽段进行相对或绝对定量。Gillet 等<sup>[10]</sup>通过实验验证该方法的动态范围超过 4 个数量级。

另外，根据是否对蛋白或者肽段进行标记，蛋白组定量方法主要包括标记定量和非标记定量。由于标记定量既可用于相对定量又可以用于绝对定量<sup>[11]</sup>。因此，基于标记结合毛细管高效液相色谱-质谱联用的定量方法已经成为蛋白质组定量研究的首选方法。

## 2. 毛细管高效液相色谱-质谱联用在蛋白质组定量方法中的色谱技术

随着蛋白质组学研究的深入,毛细管高效液相色谱-质谱联用技术已经成为蛋白质、蛋白质组定性鉴定和定量分析的常用分析方法<sup>[12]</sup>。由于生物样品如组织和细胞中的蛋白质种类繁多,动态范围宽,难于实现蛋白质组的深度覆盖,特别是难于实现对低丰度蛋白质的深度定性覆盖以及对其进行定量分析,而疾病相关的蛋白质标志物通常以低丰度的形式存在,因此,发展高灵敏度和高通量的液质联用方法显得非常迫切。另外,蛋白样品在质谱鉴定和定量前一般需要进行酶切,产生更复杂的多肽混合物,而这样极端复杂的样品不仅会导致蛋白质鉴定结果的低覆盖率和假阳性率,也会使定量的准确度降低。降低生物样品复杂程度最有效的方法之一是采用高效液相色谱分离方法对其进行分离,如果不能有效分离排除基质的干扰,定量结果将会受到很大的影响,产生“压缩效应”。因此,建立高效的液相分离技术对蛋白质组的定性和定量都显得尤为重要<sup>[13, 14]</sup>。

目前为了实现对复杂生物样品的高效分离,常采用更长的毛细管色谱柱<sup>[15, 16]</sup>或采用更小颗粒填料<sup>[17-19]</sup>已经成为解决这些问题的重要手段之一。例如, Marto 等<sup>[15]</sup>人用内径 3 $\mu\text{m}$  填料填充 100 cm 长的毛细管反相色谱柱实现了对小鼠胚胎干细胞的 11352 个蛋白进行分离鉴定,并对鉴定蛋白中的 70% 进行定量; Carr 等<sup>[19]</sup>人用内径 1.8  $\mu\text{m}$  填料填充 30 cm 长毛细管反相色谱柱,使定量方法的灵敏度提高了 2 倍。但是,在使用更长毛细管色谱柱或采用更小颗粒填料会造成色谱柱的柱压显著升高,这又成了制约其应用的瓶颈问题。虽然现在已有商品化的超高效微升和纳升级毛细管色谱仪可以提供高的流动相输出压力,有效地解决毛细管色谱柱柱压高的问题,但在超高压色谱柱条件下运行时,在毛细管色谱仪的不同连接部位常常出现漏液现象,因而造成分析进程的中断及样品的浪费。因此,降低毛细管色谱柱的反向柱压就成为目前毛细管高效液相色谱-质谱联用于蛋白质、蛋白质组定性鉴定和定量分析的主要问题之一。

为了有效解决采用长毛细管色谱柱和装填更小颗粒填料,如亚 2 微米反相色谱填料毛细管色谱柱时反向柱压太高的问题,提高色谱柱的使用温度是一种可行的手段。温度升高,流动相的粘度降低,不仅降低了溶质在流动相和固定相之间

的传质阻力,提高色谱柱分离的柱效,而且系统的压力会随着温度的升高而降低<sup>[20, 21]</sup>。早在 20 世纪 80 年代,高温液相色谱技术就得到研究人员的高度重视<sup>[22]</sup>。1987 年 Warren 等<sup>[23]</sup>验证了温度对反相液相色谱柱柱效的影响。1988 年, Horvath 等<sup>[24]</sup>通过对高效液相色谱分离过程中溶质输运特征的分析认为提高色谱柱的柱温是提高其分离能力的有效途径之一。Yan 等<sup>[25]</sup>提出了一种新型液相系统,在研究高温快速分离的同时考察了系统压力随着温度的变化情况,证实随着温度的升高,系统的压力会逐渐降低。Yang 等<sup>[26]</sup>探讨了温度对塔板高度的影响,并且建立了温度与塔板高度之间的数学关系。成洪达等<sup>[27]</sup>就温度对高效液相色谱分离性能的影响进行了全面的总结。2011 年, Røgeberg 等<sup>[28]</sup>对 C18-硅胶杂化整体柱用于蛋白酶解液的 cLC 分离时温度对分离效率影响进行了考察。将温度从 20 °C 升到 120 °C,实验表明硅胶整体柱可以通过升高温度来提高分离效率。以上研究人员的工作都表明一定范围内提高色谱柱温度有利于提高色谱柱的分离性能。

对于电喷雾离子化源质谱的电喷雾离子化源外毛细管色谱柱可采用毛细管色谱仪自带的柱温箱实现加热。为了减小毛细管色谱柱的柱后效应,提高色谱分离度和电喷雾离子源的雾化效率,在大多数液质联用系统的电喷雾离子化源内中,选用并安装带直喷头的毛细管色谱柱(直喷毛细管色谱柱),并通过联通件(如四通、三通或二通等)将其与色谱系统和高压电极连接。但由此带来的问题是不易实现对直喷毛细管色谱柱的加热。虽然也有带加热套并已经商业化的直喷毛细管色谱柱,但是一次性的,不能重复使用,使其使用成本显著升高。这使得发展可以重复使用的对直喷毛细管色谱柱进行加热的装置显得非常迫切。

由于在分析型高效液相色谱仪上配置柱温箱是采取电加热方式,因此采用电加热是一种可行的选择,而在毛细管色谱柱外面再套上毛细管不影响其正常使用。基于此,我们发展了一种简单的毛细管色谱柱电加热装置的制作方法,该制作方法的步骤为:首先选取一种内径大于毛细管色谱柱的毛细管,在其外表面缠绕直径为 0.1-0.2 mm 的镍铬电阻丝,然后在缠绕电阻丝毛细管的外表面外套另一种内径大于缠绕电阻丝的毛细管,用绝缘胶布固定毛细管两端并留出一定长度的电阻

丝，通过两根连接线分别将电阻丝的两端与可调直流电源的正负极连接，在 24 V 安全电压条件下采用调节电流方式调节电加热装置的温度进而实现加热毛细管色谱柱，以达到降低毛细管色谱柱柱压和增加柱效的目的。该装置可以直接安装在毛细管直喷柱的外面，可方便在电喷雾源内实现对毛细管色谱柱的加热，以达到降低毛细管色谱柱柱压和增加柱效的目的。由于在分析型高效液相色谱仪上配置的大多数柱温箱是采用电加热方式，因此采用电加热是一种可行的选择，而在毛细管色谱柱外面再套上毛细管不影响其正常使用。我们所研发的电加热装置，制作简单，价格低廉，操作方便，适用于毛细管液相色谱与不同类型电喷雾源质谱联用时毛细管色谱柱的加热，在基于液质联用的蛋白质和蛋白质组研究和应用中具有广阔的应用前景。

### 3. 毛细管高效液相色谱-质谱联用在蛋白组定量方法中的化学标记方法

基于稳定同位素标记结合液相色谱-质谱的蛋白质组定量方法已经成为生命科学研究中的一种重要支撑技术，已有发展了适应不同生物样本类型的多种方法<sup>[29]</sup>。根据不同标记方法原理，标记方法分为体内代谢标记、酶促<sup>18</sup>O标记和化学标记等。

在代谢标记中最常用的是细胞培养氨基酸稳定同位素标记技术（Stable isotope labeling by amino acids, SILAC），该技术是2002年由Ong等<sup>[30, 31]</sup>在Zhu等<sup>[32]</sup>提出的AAC（Tamimo acid coded mass tagging）的基础上发展而来的，其原理是首先利用重同位素标记的必需氨基酸替换正常的必需氨基酸加入到细胞培养液中，在经过多代的细胞培养和代谢过程后使细胞内新合成蛋白中的必需氨基酸被其重同位素标记的氨基酸替代，然后将含轻、重同位素氨基酸标记的蛋白按照不同比例混合和酶切，经液质联用分析后经过不同同位素氨基酸标记后的同一肽段在一级质谱上的峰就会成对出现，最后通过比较这些峰的强度或者面积来对蛋白进行定量。其优势是标记效率高，标记是在蛋白合成过程中完成，无需加入额外的实验操作；定量准确；根据同位素氨基酸的自由组合，能够实现多重标记。缺点是该方法只

适用于能够进行细胞培养的样品,对于生物医学研究中常用的组织、体液等不适用,而且价格昂贵<sup>[33]</sup>。2010年,Neubert等<sup>[34]</sup>发展了一种Super-SCILAC技术,用SCILAC标记培养细胞,将培养后的细胞酶切后产生的内标肽在质谱分析中作为内标加入到肿瘤组织样本中来对肿瘤组织进行定量,这一技术将SCILAC技术的适用范围增加到了组织。

酶促<sup>18</sup>O标记是肽段在H<sub>2</sub><sup>18</sup>O环境中基于胰蛋白酶的催化作用将肽段C端羧基上的<sup>16</sup>O 置换成<sup>18</sup>O。2001年,Fenselau等<sup>[35]</sup>最先将其用于蛋白质的相对定量研究。该技术的优点是实验操作简单,反应条件温和,价格低廉;缺点是标记有偏性,标记效率因多肽性质不同差异较大且标记的稳定性差,且易发生回交<sup>[36]</sup>。之后,赵焱等<sup>[37]</sup>使用助溶剂Rapigest™ SF和微波辅助来提高肽段的分散度使反应效率有所提高。与此同时,还用高浓度还原剂和烷基化试剂对溶液中残留的胰蛋白酶进行化学方法的彻底灭活,从而阻断了<sup>18</sup>O标记肽段回交的发生,使标记肽段的稳定性增强。但<sup>18</sup>O标记依然存在对肽段有标记歧视、且仅能实现两个样品的定量等问题。宋子凤等<sup>[38]</sup>基于原子转移自由基聚合反应(ATRP)的方法制备了固定化酶硅胶填料和固定化酶磁性纳米颗粒两种固定化酶,并将固定化酶、<sup>18</sup>O标记及质谱多反应监测(MRM)技术结合起来用于目标蛋白质绝对定量,实现了快速酶解,解决了<sup>18</sup>O标记肽段的回标,提高了定量的准确性。

化学标记主要有同位素亲和标签(isotope coded affinity tags, ICAT)、等重同位素标签标记定量法(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)、串联质量标签(tandem mass tag, TMT)等。ICAT试剂是1999年由Gygi等<sup>[39]</sup>提出的,随后Aebersold等<sup>[40]</sup>将该技术与串联质谱结合用于蛋白质组的定量分析中。ICAT试剂主要由反应基团、连接基团和生物素标签三部分组成。其原理是将不同生长状态下的细胞裂解后分别加入不同标记(连接基团部分质量数不同)的ICAT试剂,通过反应基团与蛋白质或肽段的半胱氨酸的巯基发生化学键合反应将不同类别同位素标记上去,一起酶解后利用生物素标签亲和分离将蛋白或者肽段纯化出来再进入质谱分析,按照不同比例混合,最后根据同位素峰的相对强度进行相对定量。

其特点是不仅特异性地标记半胱氨酸的巯基(-SH)，而且在质谱分析前可以将标记-SH的肽段与其他没有标记的肽段进行亲和分离，降低了样本的复杂程度，但也因此只能对含巯基的多肽或蛋白进行标记。

iTRAQ<sup>[41, 42]</sup>试剂包括报告基团、平衡基团和肽反应基团三部分<sup>[1]</sup>。其原理主要是反应基团(PRG)特异地与肽段的N-端氨基和Lys的 $\epsilon$ -氨基结合，平衡基团与不同质量的报告基团组合为肽段质量数加上144 Da，保证iTRAQ标记的同一肽段的质荷比相同，从而在一级质谱图上显示为一个峰。在二级质谱图上，报告基团特异性地断裂，平衡基团发生中性丢失，最后产生的多个报告基团的峰面积比值即为样本间蛋白含量或者浓度的比值。TMT试剂<sup>[43]</sup>与iTRAQ标记试剂的化学反应原理相似，只是化学结构式略有不同。且iTRAQ试剂有8个不同的标记标签，可同时标记并混合8个样品进行定量检测，而TMT仅有6个不同的标记标签，只可同时标记和混合6个样品进行定量检测。它们的特点是都能标记所有的肽段，提高蛋白质标记的覆盖率及定量的准确性，并能实现多重标记定量，提高定量分析的通量。但这类标记试剂昂贵、操作过程繁琐，可选择的定量离子受到限制且在多个平行样品的预处理和酶解操作过程易产生偏差，在进行质谱分析时引入较大误差等问题<sup>[44]</sup>。为此，Liu等<sup>[45]</sup>利用基于恶唑酮反应的精氨酸稳定同位素标记实现C端的快速鉴定和定量。Zhou等<sup>[46]</sup>利用<sup>13</sup>CD<sub>2</sub>O和NaCNBH<sub>3</sub>、CD<sub>2</sub>O和NaCNBD<sub>3</sub>的组合对肽段的N端以及C端赖氨酸侧链氨基二甲基化，实现一级等重标记并用于定量。为进一步解决现存标记试剂存在的不足，Pan等<sup>[47]</sup>利用胰蛋白酶催化的方法将稳定同位素亲和标签连接到肽段的N端，这不仅可用于定量，而且连接上的短序列标签可以提高蛋白质组分析的覆盖率。其原因是精氨酸为碱性氨基酸，可以提高质子化效率，标记肽段的b离子可以提高b离子在质谱中的检测灵敏度，有利于基于b离子的定量分析，但该方法对反应条件要求严格<sup>[48]</sup>。

为了充分发挥精氨酸标记的优势，在邹汉法等<sup>[47]</sup>人工作的基础上，我们利用琥珀酰亚胺基团与肽段N端的反应以及叠氮试剂与有机磷试剂的施陶丁格反应将精氨酸标记到肽段的N端，建立了一种新的化学标记方法。我们的化学标记具有

试剂低廉, 反应条件温和, 标记效率高, 后处理简单等特点。此外通过将不同的精氨酸同位素 ( $^{15}\text{N}_4$ 、 $^{13}\text{C}_6$ 、 $^{15}\text{N}_4^{13}\text{C}_6$ ) 作为标签加到肽段的 N-末段, 可以实现样品肽段的不同标记组合。我们将精氨酸化学标记与液质联用结合用于的目标蛋白质组定量, 对该定量方法进行了方法学考察并将该方法药物代谢酶蛋白的绝对定量分析。

#### 4. 药物代谢酶及其绝对含量测定的意义

药物代谢酶也称药酶, 是肝微粒体混合功能氧化酶, 主要存在于肝脏细胞内质网内, 由血红素蛋白(P450)、黄素蛋白及磷脂组成。1958年, Klingberg和Cofinkle发现了细胞色素P450, 由于它在还原状态下可与一氧化碳结合, 且在450 nm波长处有最大吸收峰, 因此被称为细胞色素P450 (CYP450) [49]。CYP450是机体内药物转化的主要酶系, 参与药物代谢的很多关键步骤, 作为药物代谢的主要途径, 承担超过80%的药物代谢[50]。在临床上, 已经证实90%以上的药物都是经过CYP亚酶如CYP1A2、CYP2A6、CYP2E1 和CYP2C9等的代谢[51], 同时这些蛋白参与各种致癌物的激活, 介导产生毒性物质, 因此有着重要的研究意义[52]。此外, 药物半衰期、药物相互作用肝脏首关效应、清除率和生物利用度等许多药动学特征都和细胞色素P450有关[53]。

目前对CYP450的研究主要是利用蛋白免疫印迹 (Western blotting) [54, 55]、SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis) [56]、化学探针底物法[57, 58]及反转录聚合酶链式反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) [59, 60]对CYP450酶活性及功能等进行研究和鉴定, 但是对酶表达量进行研究的还比较少[61]。然而药物的不良反应, 毒性作用及个体差异在很大程度上与该药物代谢的细胞色素P450的表达量有关, 因此实现对细胞色素P450的定量对于药物安全有效的使用、临床合理的用药、药物不良反应的避免和个体化给药等都具有重要的理论依据和实际应用价值[62]。基于药物代谢酶定量的以上重要

意义，我们将发展的精氨酸化学标记与药物代谢酶含量测定结合到一起，用 QconCAT 中的合成肽段对我们的化学标记结果进行考察。

## 5. 本论文研究内容

在总结以前研究人员工作的基础上，为了有效降低复杂生物样本的复杂程度，实现对其中蛋白质进行准确定量，本论文开展了两部分工作。在第一部分工作中，针对采用长毛细管色谱柱或装填更小颗粒填料时导致的柱压过高问题，发明了一种简单的毛细管色谱柱电加热装置，并将该毛细管色谱柱电加热装置安装于液质联用系统，用牛血清蛋白酶切肽段混合物和酵母蛋白酶切肽段混合物从柱压和柱效二方面来对该装置的性能进行了评价。

在第二部分工作中，为了充分发挥精氨酸标记的优势，在邹汉法等<sup>[47]</sup>人工作的基础上，我们利用琥珀酰亚胺基团与肽段 N 端的反应以及叠氮与有机磷的施陶丁格反应将肽段与精氨酸连接起来，建立了一种新的化学标记方法。该化学标记方法可以将不同的精氨酸同位素（ $^{15}\text{N}_4$ 、 $^{13}\text{C}_6$ 、 $^{15}\text{N}_4^{13}\text{C}_6$ ）作为标签加到肽段的 N-末段，实现样品肽段的标记和不同组合，并对不同的精氨酸稳定同位素的标签的色谱及质谱行为进行了考察。

## 第二章 一种简单的毛细管色谱柱电加热装置的制作方法及其性能评价

由于生物样品中蛋白质种类繁多、动态范围宽,难于实现蛋白质组的深度覆盖,特别是难于实现对低丰度蛋白质的定性鉴定和定量分析。目前解决上述问题的常用方法是采用更长的毛细管色谱柱或采用装填更小粒径填料的毛细管色谱柱。然而这些方法带来的主要问题是容易造成毛细管色谱柱柱压显著升高,引发液相色谱仪中不同连接部位漏液问题。针对在使用超长毛细管色谱柱或采用装填小粒径填料的毛细管色谱柱时造成的色谱柱柱压显著升高的问题,我们发展了一种简单的毛细管色谱柱电加热装置制作方法,并将基于该方法制作的毛细管色谱柱电加热装置安装于液质联用系统,用牛血清蛋白酶切肽段混合物和酵母蛋白酶切肽段混合物从柱压和柱效二方面来对该装置的性能进行了评价。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器与试剂

毛细管高效液相色谱-电喷雾-线性离子阱质谱仪 (HPLC-ESI-LTQ MS,美国 Thermo Fisher Scientific 公司); RIGOL L-3000 高效液相色谱仪 (北京普源精电科技有限公司); Eksigent nanoLC-2D 高效液相色谱仪 (美国 AB SCIEX); 真空冰冻干燥机 (SC100A Speedvac Plus,美国 Thermo Savant 公司); Sartorius BP211d 分析天平 (瑞士 Sartorius 公司); 高速离心机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); JY-II 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); C18 zip tip 脱盐柱、FASP 管 (10 K) 和 Milli2QA10 型纯水仪 (美国 Millipore 公司); 可调直流电源 (EPS 301, Amersham Pharmacia Biotech 公司); 直径 0.1 mm, 电阻为 200  $\Omega$  的镍 (20%) 铬 (80%) 合金电阻丝 (上海靓凡电器有限公司); 内径 530  $\mu\text{m}$ , 外径为 690  $\mu\text{m}$  和内径 1.1 mm, 外径为 2.6 mm 的毛细管 (郑州英诺高科有限公司);

15 cm×75 μm i.d.的直喷头空管柱（美国 New Objective 公司）；直径 3 μm，孔径 10 nm 的 C18 填料（北京金欧亚公司）。

酵母细胞由清华大学戴俊彪实验室赠送；尿素（Urea）购于 Affymetnx 公司；1 M Tris-HCl（pH 8.0）、NP-40 购于 United States Biochemical 公司；乙二胺四乙酸二钠购于国药集团化学试剂有限公司；蛋白酶抑制剂购于罗氏公司；二硫苏糖醇（DTT）、碘乙酰胺（IAA）、碳酸氢铵、乙腈购于美国 Sigma 公司；测序级胰蛋白酶购于美国 Promega 公司；牛血清蛋白购于北京迪拜尔生物技术有限公司；实验用水为超纯水，经 Millipore 纯水系统纯化，电阻率达到 18.2 MΩ·cm。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 毛细管色谱柱电加热装置的制作方法

为了实现对我们实验中使用的 15 cm×75 μm i.d.直喷毛细管色谱柱进行加热，如图 2-1 所示，选取内径 530 μm，外径为 690 μm 的毛细管（内径大于毛细管色谱柱），在其外表面缠绕直径为 0.1 mm 的镍铬电阻丝，然后在缠绕电阻丝毛细管的外表面套上内径 1.1 mm，外径为 2.6 mm 的毛细管，用绝缘胶布固定毛细管两端并留出一定长度的电阻丝，通过两根连接线分别将电阻丝的两端与可调直流电源的正负极连接，在 24 V 安全电压条件下采用调节电流方式，调节电加热装置的温度进而实现加热毛细管色谱柱，以达到降低毛细管色谱柱柱压和增加柱效的目的。

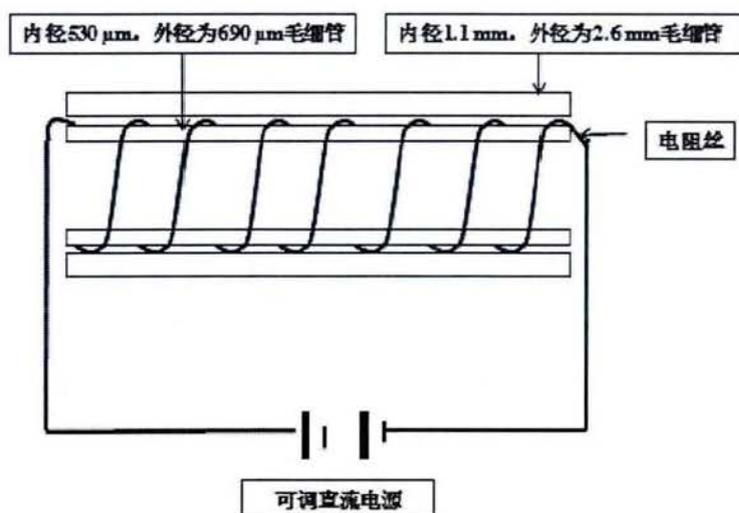


图 2-1 毛细管色谱柱电加热装置的结构示意图

Fig.2-1 A schematic diagram of an electric heating apparatus for heating capillary chromatographic columns

### 1. 2. 2 酵母蛋白的提取及酶切

将酵母细胞在 14000 g 离心 5 min 后弃上清,加入裂解液 NETN(0.5% NP-40, 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA 钠盐)及蛋白酶抑制剂进行超声破碎,破碎后于 14000 g 离心 20 min 取上清。将上清液分装到孔径为 10 K 的 FASP 管中,14000 g 离心 15 min。加入 8 moL/L 尿素,14000 g 离心 15 min(重复一次)。再加入 50 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,在 14000 g 离心 15 min(重复二次)。离心后加入 50 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,加入 DTT(终浓度 10 mmol/L),37 °C 水浴 4 h。再加入 IAA(终浓度 50 mmol/L),避光反应 1 h 后按照酶与蛋白质量比 1:50 加入胰酶后,在 37 °C 环境中酶切 18 h。酶切后在 14000 g 离心 15 min,将所得溶液干燥后用流动相 A 液(2% 乙腈、0.1% 甲酸水溶液)重溶。

### 1. 2. 3 牛血清蛋白蛋白的提取及酶切

称取一定量的牛血清蛋白,用 50 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶解,终浓度 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。加入 DTT(终浓度 10 mmol/L),37 °C 水浴 4 h。再加入 IAA(终浓度 50 mmol/L),避光反应 1 h。1 h 后按照酶与蛋白质量比 1:50 加入胰酶在 37 °C 环境中酶切 18 h,

脱盐，干燥后用流动相 A 液重溶。

#### 1.2.4 RIGOL 液相分析条件

将 Agela Venusil XBP C18 (L) (4.6×250 mm, 5 μm, 150 Å) 色谱柱安装在 RIGOL L-3000 液相色谱仪上。在检测波长为 214 nm、流速为 0.7 mL/min 的条件下,采用流动相 A(2% ACN 和 0.1% FA 的水溶液)和流动相 B(98% ACN 和 0.1% FA 的水溶液)组成的。洗脱梯度为: 0-5 min, 5%-8% B; 5-26 min, 8%-18% B; 26-40 min, 18%-32% B; 40-42 min, 32%-95% B; 42-47 min, 95% B; 47-49 min, 95%-5% B; 49-55 min, 5% B, 对样品进行分离。

#### 1.2.5 HPLC-ESI-LTQ MS 分析条件

毛细管液相色谱仪为 Eksigent nanoLC-2D, 毛细管反相色谱柱实验室自行制备,所用直喷头空管柱(15 cm×75 μm i.d.), C18 填料为 3 μm, 10 nm, 流速为 300 nL/min, 上样体积为 5 μl。流动相 A: 2% ACN 和 0.1% FA 水溶液; 流动相 B: 98% ACN 和 0.1% FA 水溶液; 短洗脱梯度为: 0-5 min, 5%-8% B; 5-30 min, 8%-40% B; 30-35 min, 40%-95% B; 35-40 min, 95% B; 40-42 min, 95%-5% B; 42-52 min, 5% B。长洗脱梯度为: 0-5 min, 5%-8% B; 5-91 min, 8%-40% B; 91-110 min, 40%-90% B; 110-120 min, 90% B; 120-125 min, 95%-5% B, 125-135 min, 5% B。质谱条件: 选用正离子模式采集数据, 质谱扫描范围设为 m/z 400.0-1600.0, 采集时间分别设为 52 min 和 135 min。在采用数据依赖模式 (DDA) 进行串联质谱分析时, 选取一级质谱中 10 个信号最强的离子进行二级质谱分析, 其碰撞能量设为 35 V, 动态排除 (dynamic exclusion) 时间为 30 秒。

#### 1.2.6 质谱数据的数据库搜索

将质谱采集后产生的 raw 文件通过 Thermo Proteome Discoverer 1.3.0.339 的 Mascot 对质谱数据进行检索, 参数设置: 母离子质量偏差 (Precursor Tolerance) 为 0.5 Da; 碎片离子质量偏差 (Fragment Tolerance) 为 0.8 Da; 假阳性率 (FDR) 为 1%; 蛋白质酶解选用胰蛋白酶, 选择 2 个漏切位点; 固定修饰: 半胱氨酸的烷基化修饰; 可变修饰: 甲硫氨酸氧化修饰; 蛋白质数据库分别为牛血清蛋白数据

库(2014年12月30号从<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=bsa> 下载)和酵母蛋白数据库(1741650个蛋白,2014年12月26号从<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=yeast> 下载)。

## 2. 结果与讨论

### 2.1 色谱柱温度对色谱柱柱压和柱效影响的考察

当温度升高时,流动相粘度降低,从而降低色谱柱的柱压。另外,由Van Deemter方程 $H=A+B/u+Cu$ ( $u$ 为流动相线速度, $A$ 为径向扩散系数, $B$ 为纵向扩散系数, $C$ 为传质阻力系数)可知,流动相的粘度降低会使流动相和溶质分子扩散增强,既加快了流动相和分析物分子的混合,也增加溶质的传质速度,增加溶质与固定相作用的几率,因而也会增加色谱柱的柱效。尽管从Van Deemter方程可以得到这些结论,但温度对色谱柱柱压和柱效的影响程度没有确切的数据,为了考察增加色谱柱的温度时柱压降低和柱效增加的程度,我们首先在带有易于控制温度的柱温箱的RIGOL L-3000液相色谱仪上,用牛血清蛋白酶切肽段混合物对温度对分析型色谱柱柱压和柱效的影响进行定量考察。分别选定不同温度的空白以及上样量为 $10\mu\text{g}$  BSA酶切肽段进行色谱实验。如图2-2所示,当柱温从 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 升高到 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,色谱柱反向压力从 $1200\text{ Psi}$ 降低到 $650\text{ Psi}$ ,降低了46%。我们统计不同柱温下分离 $10\mu\text{g}$  BSA酶切肽段混合物时的峰容量,由表2-1可以看出,当柱温从 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 升高到 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,分离 $10\mu\text{g}$  BSA酶切肽段混合物的峰容量从63个色谱峰上升到71个色谱峰,增加了8个色谱峰,即柱效随着柱温提高而提高。该实验结果表明升高色谱柱的温度可显著降低柱压,柱效也略有提高。

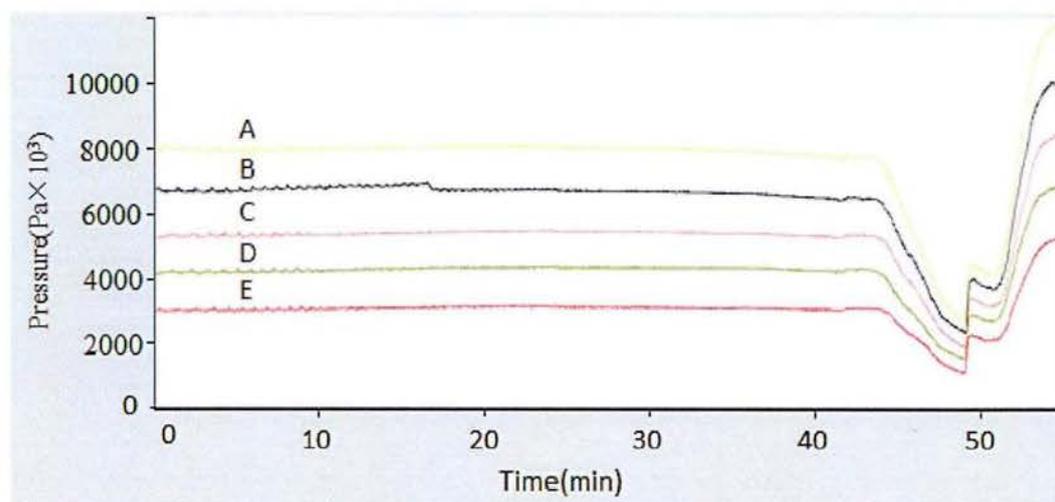


图 2-2 不同温度下空白的柱压随时间变化曲线(A, 25 °C; B, 35 °C; C, 45 °C; D, 55 °C; E, 70 °C)

Fig.2-2 Change traces of the column pressure of a blank sample over time at different temperatures (A, 25 °C; B, 35 °C; C, 45 °C; D, 55 °C; E, 70 °C)

Chromatographic conditions: Agela Venusil XBP C18 (L) column (4.6 250 mm, 5  $\mu$ m, 150  $\text{\AA}$ ). LC conditions were as follows: mobile phase A: 2% ACN, 0.1% FA and 2% water; mobile phase B: 98% ACN, 0.1% FA, and 2% water. Elution gradients were as follows: 0-5 min, 5%-8% B; 5-26 min, 8% -18% B; 26-40 min, 18% -32% B; 40-42 min, 32%-95% B; 42-47 min, 95% B; 47-49 min, 95%-5% B; 49-55 min, 5% B; loading volume: 20  $\mu$ L; flow rate: 0.7 mL/min; wavelength: 214 nm.

表 2-1 不同柱温下分离 10  $\mu$ g BSA 酶切肽段混合物得到的峰容量

Table 2-1 Peak capacity of 10  $\mu$ g BSA digestion separated at different column temperatures

Column temperatures( $^{\circ}$ C)	Peak capacity (n)
25	63
35	68
45	76
55	65
70	71

## 2.2 毛细管色谱柱电加热装置的制作及应用

基于上述色谱柱温度对柱压及柱效影响程度考察结果，我们发展了一种简单毛细管色谱柱电加热装置制作方法，并将该装置与质谱仪、毛细管色谱仪进行连接，构成液质联用系统。如图2-3所示，选取内径530  $\mu\text{m}$ ，外径为690  $\mu\text{m}$ 的毛细管（内径大于毛细管色谱柱），在其外表面缠绕直径为0.1 mm的镍铬电阻丝，然后在缠绕电阻丝毛细管的外表面套上内径1.1 mm，外径为2.6 mm的毛细管（保温与保护作用），用绝缘胶布固定毛细管两端并留出一定长度的电阻丝，通过两根连接线分别将电阻丝的两端与可调直流电源的正负极连接。由于毛细管内部温度不易测定，但根据焦耳定律 $Q=I^2Rt$ ，在电阻恒定的条件下，电流越大，产生的热量越大；时间越长，产生的热量越多。但在对毛细管色谱柱加热过程中流动相会带走产生的热量，达到一定的平衡。因此，在可调直流电源的输出为小于或等于24 V的情况下，通过改变输出电流来调节内径530  $\mu\text{m}$ ，外径为690  $\mu\text{m}$ 的毛细管内部的温度，以达到降低毛细管色谱柱柱压和增加柱效的目的。

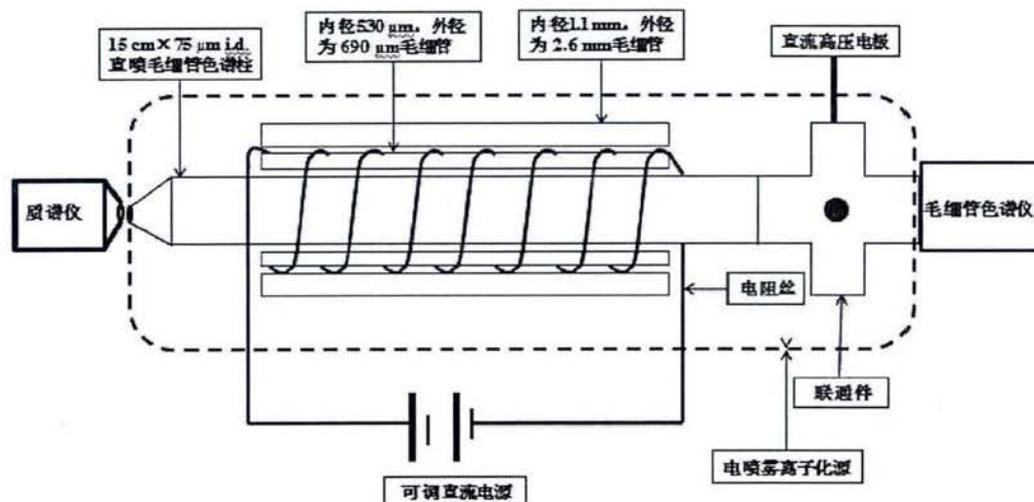


图2-3 毛细管色谱柱电加热装置及在毛细管液相色谱与不同类型电喷雾源质谱联用时使用示意图

Fig.2-3 The schematic diagram of an electric heating apparatus for heating capillary chromatographic columns coupled to different kinds of electrospray ion sources mass spectrometry

### 2.3 毛细管色谱柱电加热装置的性能评价

为了测定毛细管色谱柱温度升高时对柱压及柱效的影响程度，我们采用实验室装填的带喷头的毛细管色谱柱进行实验。在电加热装置上分别施加0 mA、60 mA、80 mA、100 mA、120 mA、140 mA和160 mA电流下对牛血清蛋白酶切肽段混合物进行HPLC-ESI-LTQ MS分析，并对重复一次实验。

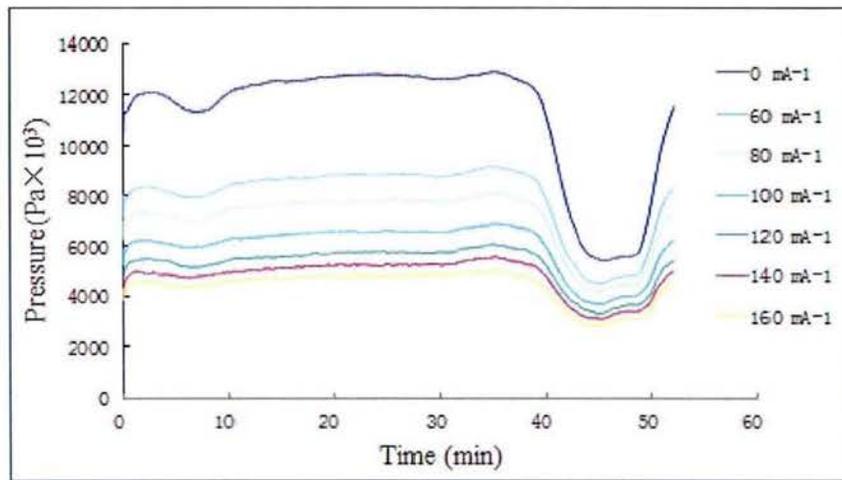


图2-4 在电加热装置上施加不同电流时采用毛细管色谱柱分离BSA酶切肽段混合物的柱压随保留时间变化曲线

Fig.2-4 Chromatographic column back pressure curves to retention time when separating a BSA digest on a capillary chromatographic column heated by the electric heating apparatus at different electric currents

如图2-4所示，由在电加热装置上施加不同电流分离BSA酶切肽段混合物时的柱压随电流变化曲线可以看出，电流从0 mA加到160 mA时，柱压从 $1.24 \times 10^7$  Pa降到 $4.83 \times 10^6$  Pa，降低幅度接近61%。

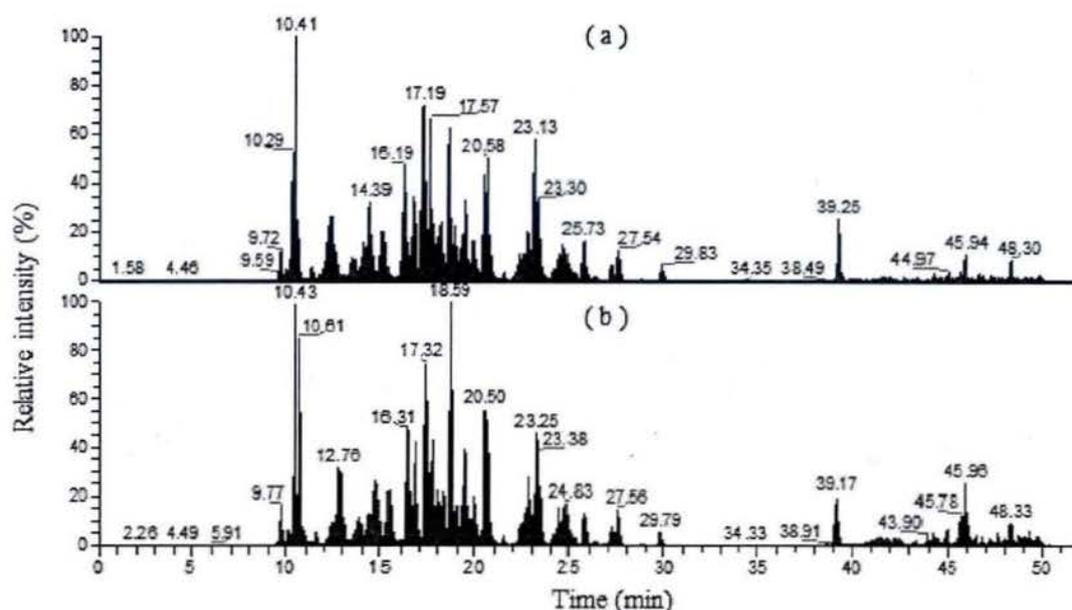


图 2-5 对电加热装置施加 100 mA 电流时分离 BSA 酶切肽段混合物的基峰色谱图

Fig. 2-5 Base peak chromatograms of a BSA digestion separated with the electric heating apparatus at electric currents 100 mA

Chromatographic conditions: C18 column (15 cm×75 μm i.d., 3 μm, 10 nm); mobile phase A: 2% ACN, 0.1% FA and 2% water; mobile phase B: 98% ACN, 0.1% FA and 2% water; Elution gradients: 0-5 min, 5%-8% B; 5-30 min, 8%-40% B; 30-35 min, 40%-95% B; 35-40 min, 95% B; 40-42 min, 95%-5% B; 42-52 min, 5% B; loading volume: 5 μL. flow rate: 0.3 mL/min.

如图2-5所示，进一步通过考察对电加热装置施加100 mA电流分离BSA酶切肽段混合物时二次实验的基峰色谱图，由分离结果看出色谱保留时间基本一致，表明我们制作的电加热装置的性能是稳定的。我们将施加不同电流条件下二次实验结果所得基峰色谱图中的色谱峰峰宽进行统计，取平均值后根据公式

$(P_c=1+[(2.35/4)(t_{保留}/W_{h平均})])$  计算峰容量，结果列于表2-2。由表2-2可以看出，当电流从0 mA升高到100 mA时，分离BSA酶切肽段混合物的峰容量从51个色谱峰上升到68个色谱峰，增加了17个色谱峰，而当电流增加到160 mA时峰容量下降到25个色谱峰，表明在一定电流范围内柱效随着柱温提高而提高。

表2-2 不同电流下分离BSA酶切肽段混合物得到的峰容量

Table 2-2 Peak capacity of BSA digest separated at different electric currents

Electric currents (mA)	Peak capacity (n)
0	51
60	56
80	58
100	68
120	54
140	41
160	25

我们将所得质谱数据经过 Mascot 搜库后统计了不同电流下分离鉴定 BSA 酶切肽段混合物时的肽段数及覆盖率，将二次实验结果取平均值后做折线图，结果如图 2-6 及图 2-7 所示。从图 2-6 及图 2-7 可以看出，电流从 0 mA 升到 100 mA 电流的过程中，肽段数基本维持在 44 个左右，覆盖率在从 72% 增加到 90%。当电流增加到 140 mA 时肽段数略有下降，而当电流增加到 160 mA 时肽段数下降到 20 个，覆盖率降低到 34%。另外，我们提取了部分电流（0 mA、100 mA、160 mA）下的基峰色谱图，如图 2-8 所示，当加上电流，即加热后色谱峰的出峰时间有所提前，但当电流加到 160 mA 时色谱峰过度分散且信号强度降低，可能是流动相因温度过高气化所致，因此，应选择最佳柱温，即最佳电流。

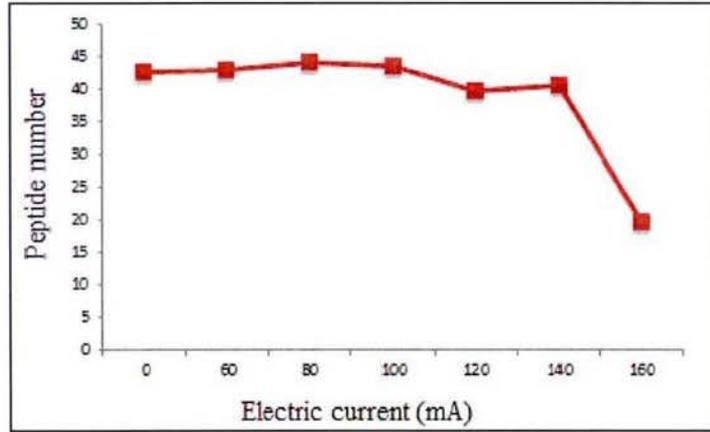


图 2-6 对电加热装置施加不同电流时鉴定的 BSA 酶切肽段混合物中的肽段数

Fig.2-6 Peptide number of identified in a BSA digest with the electric heating apparatus at different electric currents

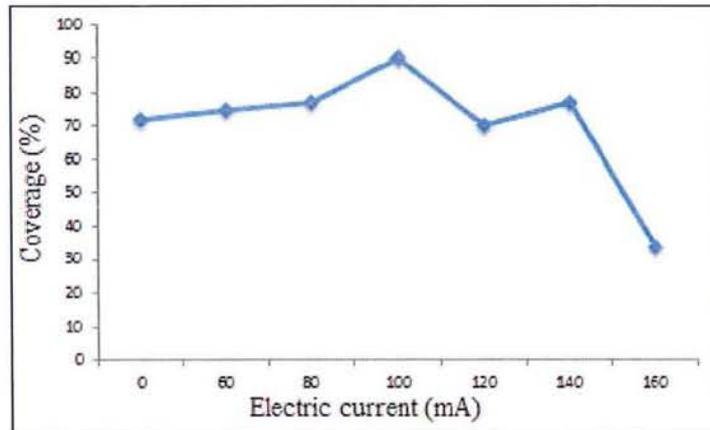


图 2-7 在电加热装置施加不同电流时毛细管高效液相-质谱联用鉴定 BSA 酶切肽段混合物的覆盖率

Fig.2-7 Coverage of a BSA digest analyzed by cHPLC-MS with the electric heating apparatus at different electric currents

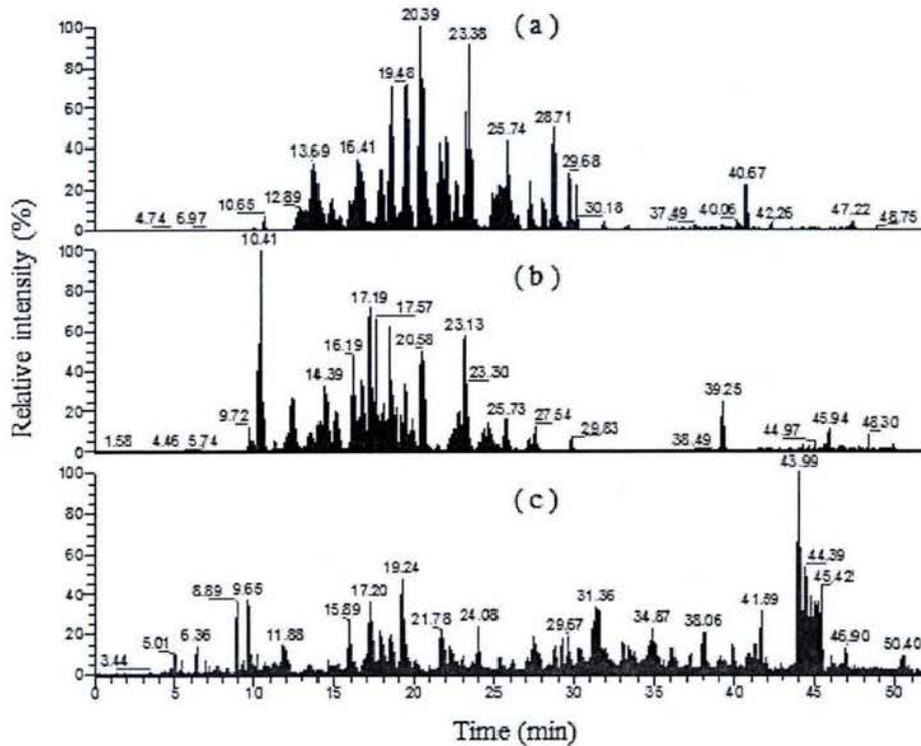


图2-8 对电加热装置分别施加电流0 mA(a)、100 mA(b)和160 mA(c)时分离BSA酶切肽段混合物的基峰色谱图

Fig. 2-8 Base peak chromatograms of a BSA digest separated with the electric heating apparatus at electric currents 0 mA (a), 100 mA (b) and 160 mA(c), respectively

Chromatographic conditions: C18 column (15 cm×75 μm i.d., 3 μm, 10 nm); mobile phase A: 2% ACN, 0.1% FA and 2% water; mobile phase B: 98% ACN, 0.1% FA and 2% water; Elution gradients: 0-5 min, 5%-8% B; 5-30 min, 8%-40% B; 30-35 min, 40%-95% B; 35-40 min, 95% B; 40-42 min, 95%-5% B; 42-52 min, 5% B; loading volume: 5 μL. flow rate: 0.3 mL/min.

综上所述可以看出，利用毛细管色谱柱电加热装置对 BSA 酶切肽段混合物进行 HPLC-ESI-LTQ 分析时可以有效的降低柱压，在一定程度上可以提高柱效，并且需要选择最佳柱温，即最佳电流。

#### 2.4 装有毛细管色谱柱电加热装置液质联用在复杂样本分析中的应用

为了对毛细管电加热装置的性能进行进一步的评价，我们将其应用到酵母蛋白质组表达谱的分析中，即将酵母细胞提取的蛋白酶切后，直接在装有毛细管电加热管的HPLC-ESI-LTQ 仪器上进行电流为0 mA 和 100 mA 条件下的液质联用分析，并对实验重复一次。图 2-9 是对电加热装置施加 100 mA 电流分离酵母蛋白酶切肽段混合物时二次实验的基峰色谱图，由分离结果看出色谱保留时间基本一致，表明我们制作的电加热装置的性能是稳定的。

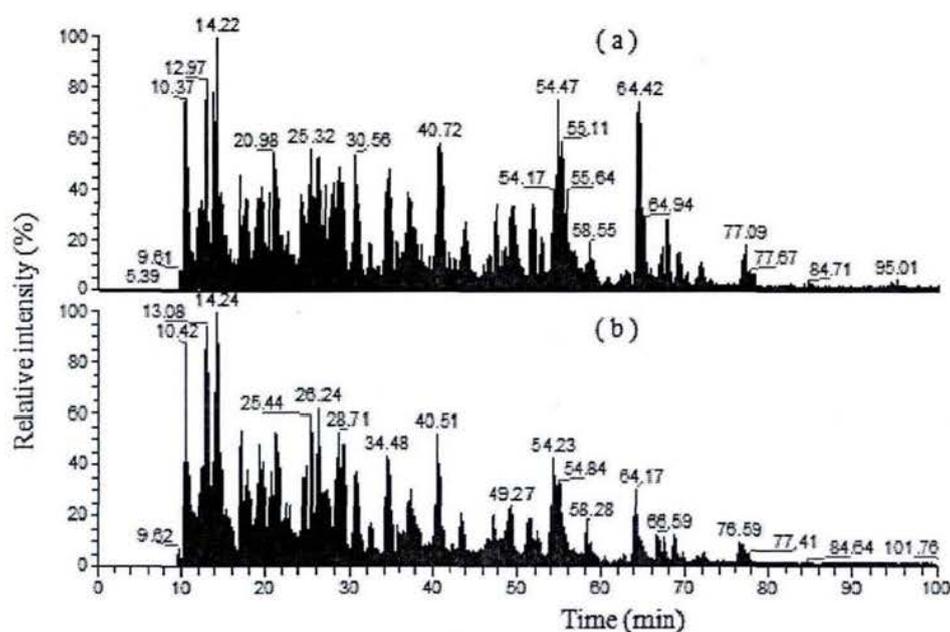


图 2-9 对电加热装置施加 100 mA 电流时，分离 yeast 酶切肽段混合物的基峰色谱图

Fig. 2-9 Base peak chromatograms of a yeast digestion separated with the electric heating apparatus at electric currents 100 mA

Chromatographic conditions: C18 column (15 cm×75 μm i.d., 3 μm, 10 nm); mobile phase A: 2% ACN, 0.1% FA and 2% water; mobile phase B: 98% ACN, 0.1% FA and 2% water; Elution gradients: 0-5 min, 5%-8% B; 5-91 min, 8%-40% B; 91-110 min, 40%-95% B; 110-120 min, 95% B; 120-125 min, 95%-5% B; 125-135 min, 5% B; loading volume: 5 μL. flow rate: 0.3 mL/min.

图 2-10 所示的电流为 0 mA 和 100 mA 条件下分离酵母蛋白酶切肽段混合物时

的柱压随时间变化曲线可以看出, 0 mA 下柱压约为  $1.38 \times 10^7$  Pa, 100 mA 下柱压约为  $6.90 \times 10^6$  Pa, 相比 0 mA 时的柱压降低了 50%。

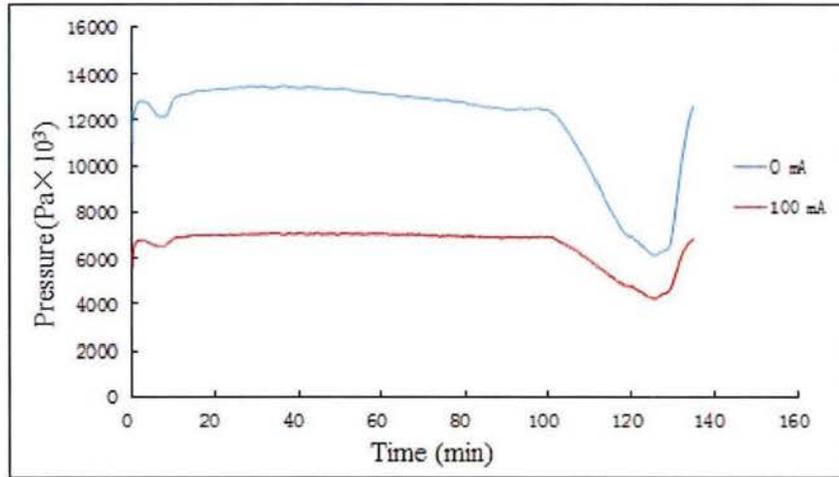


图2-10 对电加热装置分别施加0 mA和100 mA电流时分离酵母蛋白酶切肽段混合物的柱压随保留时间变化曲线

Fig.2-10 Chromatographic column back pressure curves to retention time for separating a yeast protein digest with the electric heating apparatus at the electric currents 0 mA and 100 mA, respectively

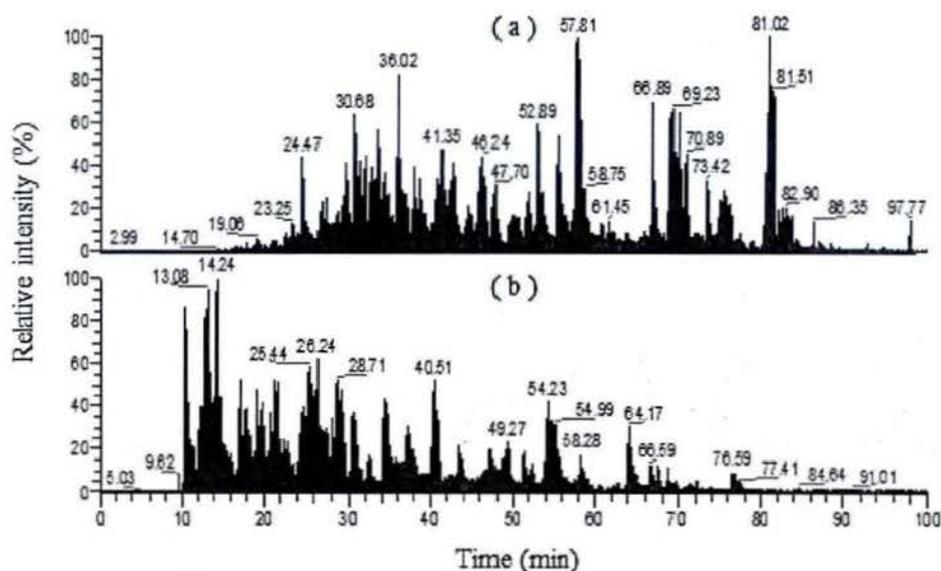


图2-11 对电加热装置分别施加0 mA(a)和100 mA(b)电流时分离酵母酶切肽段混合物的基峰色谱图

Fig.2-11 Base peak chromatograms of a yeast digestion separated with the electric heating apparatus at the electric currents 0 mA (a) and 100 mA (b), respectively

Chromatographic conditions: C18 column (15 cm×75 μm i.d., 3 μm, 10 nm); mobile phase A: 2% ACN, 0.1% FA and 2% water; mobile phase B: 98% ACN, 0.1% FA and 2% water; Elution gradients: 0-5 min, 5%-8% B; 5-91 min, 8%-40% B; 91-110 min, 40%-95% B; 110-120 min, 95% B; 120-125 min, 95%-5% B; 125-135 min, 5% B; loading volume: 5 μL. flow rate: 0.3 mL/min.

表2-3 在0 mA和100 mA电流时分离酵母酶切肽段混合物得到的峰容量

Table 2-3 Peak capacity of yeast digestion separated at the electric currents of 0 mA and 100 mA, respectively

Electric currents (mA)	Peak capacity (n)
0	63
100	81

我们提取了 0 mA 及 100 mA 电流下分离的 yeast 蛋白酶切混合物基峰色谱图（见图 2-11），将二次实验结果所得基峰色谱图中的色谱峰峰宽进行统计，取平均值后根据公式（ $P_c=1+[(2.35/4)(t_{\text{梯度}}/W_{h\text{ 平均值}})]$ ）计算峰容量，结果如表 2-3。由表 2-3 可以看出，当电流从 0 mA 升高到 100 mA 时，分离 yeast 酶切肽段混合物的峰容量从 63 个色谱峰上升到 81 个色谱峰，增加了 18 个色谱峰，表明增加加热电流（即柱温）可使柱效略有增加。

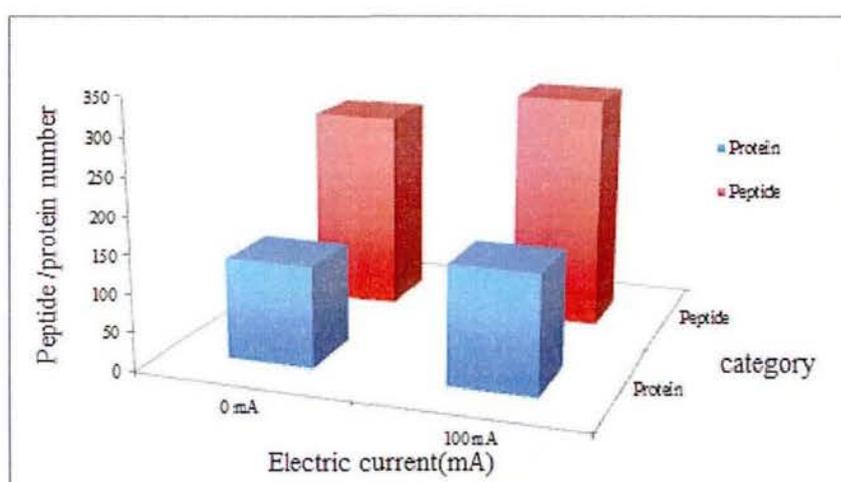


图2-12 对电加热装置分别施加 0 mA(a)和 100 mA(b)电流时鉴定酵母蛋白酶切肽段混合物中的肽段数和蛋白数

Fig.2-12 Peptide number and protein number in a yeast digestion identified with the electric heating apparatus at the electric currents 0 mA (a) and 100 mA (b), respectively

图 2-11 所示结果与前述的牛血清蛋白酶切物分离结果一致，即色谱峰保留时间提前。将所得质谱数据进行 Mascot 搜库，二次实验所得结果取均值后如图 2-12 所示。由图 2-12 可以看出，施加电流后从酵母蛋白酶切肽段混合物中鉴定到的蛋白数从 145 个增加到 154 个，肽段数从 292 个增加到 310 个。无论是蛋白数还是肽段数皆有所增加，而压力显著降低，这与我们分离标准蛋白时评价的结果相同，即进一步证实毛细管色谱柱电加热装置对柱压的降低和柱效提高有作用。这些结

果表明通过我们发展的毛细管色谱柱电加热装置制作方法可为液质联用系统的电喷雾离子化源内直喷毛细管色谱柱加热提供一种简单、可靠的装置，为选择使用更小颗粒色谱填料，如亚 2 微米色谱填料的毛细管色谱柱提供了一种降低柱压的有效手段。

### 3. 结论

本文发展了一种简单的毛细管色谱柱电加热装置的制作方法，并将基于该方法制作的毛细管色谱柱电加热装置与 HPLC-MS 联用，分别用牛血清蛋白酶切肽段混合物和酵母蛋白酶切肽段混合物从柱压和柱效二方面来对该装置进行了性能评价。实验结果表明无论对简单生物样本还是复杂生物样本，我们的毛细管柱电加热管与 3  $\mu\text{m}$  填料的毛细管柱联用可以在最佳 (100 mA) 电流下对酶切肽段进行分离时的柱压比不加电流分离时的柱压降低 50%左右，而且柱效也相应有所增加，这为我们发展在低柱压条件下选择更小颗粒色谱填料的毛细管色谱柱奠定了基础。

### 第三章 基于点击化学的精氨酸标记新方法研究

为了充分发挥精氨酸标记的优势,在邹汉法等<sup>[47]</sup>人工作的基础上,我们利用琥珀酰亚胺基团与肽段 N 端的反应以及叠氮试剂与有机磷试剂的施陶丁格反应将精氨酸标记到肽段的 N 端,发展了一种新的化学标记方法。

#### 1. 实验部分

##### 1.1 仪器与试剂

4800 Proteomics Analyzer 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF-MS, 美国 AB SCIEX 公司); 毛细管高效液相色谱-电喷雾-线性离子阱-傅里叶变换离子回旋共振质谱仪 (HPLC-ESI-LTQ-FT MS, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 纳升级高效液相色谱-电喷雾-三级四级杆-离子阱混合型质谱仪 (NanoLC-ESI-4000Qtrap MS, AB SCIEX, 美国); Eksigent nanoLC-2D (美国 Eksigent 公司); Sartorius BP211d 分析天平(瑞士 Sartorius 公司); Thermo Orion MODEL 818 型 pH 计(美国 Thermo 公司); C18 zip tip 脱盐柱 (Millipore); 高速离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱购自上海浦东荣丰科学仪器有限公司; 真空冰冻干燥机 (SC100ASpeedvac Plus, 美国 ThermoSavant 公司); 0.22  $\mu\text{m}$  孔径的滤膜购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; Milli2QA10 型纯水仪 (美国 Millipore 公司)。

腾冲嗜热菌标准蛋白的合成肽段和 QconCAT 蛋白的合成肽段均购自上海吉尔生化有限公司; 苯丙氨酸 (Phe)、精氨酸 (Arg)、缬氨酸 (Val) 标准物质购自中国计量科学研究院; 苯丙氨酸 ( $^{13}\text{C}_9$ -Phe)、精氨酸 ( $^{13}\text{C}_6$ -Arg)、缬氨酸 ( $^{13}\text{C}_5$ -Val) 购自美国剑桥同位素实验室; 测序级胰蛋白酶购于美国 Promega 公司; 细胞色素 C、马心肌红蛋白、二硫苏糖醇 (DTT)、碘乙酰胺 (IAA)、碳酸氢铵、乙腈、 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA, 纯度 95%) 均购于 Sigma 公司 (美国); 有机磷试剂

NHS-Phosphine 与叠氮试剂 NHS-Azide 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；氧-甲基异脲硫酸盐购于比利时 Acros 公司；三氟乙酸 (TFA) 购自美国 Acros 公司；甲酸 (FA) 购自德国 Fluka 公司；全氟庚酸 (纯度 98%) 购自百灵威科技有限公司；PBS 购于上海立菲生物科技有限公司；实验用水为超纯水，经 Millipore 纯水系统纯化，电阻率达到  $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ；其它试剂均为国产分析纯（国药集团化学试剂有限公司）。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 合成肽段的含量测定

QconCAT 蛋白的合成肽段由上海吉尔生化有限公司合成，用于化学标记定量前需要进行含量测定。肽段含量测定的方法参照王雪颖色谱<sup>[63]</sup>文章及李楠楠的毕业论文<sup>[64]</sup>第三章。

#### 1.2.1.1 溶液的配置

将标准氨基酸 (Phe、Val、Arg) 放置在干燥箱中， $105^\circ\text{C}$  干燥 3 h，转移至干燥皿内，冷却至室温后称量，配成  $1 \text{ mg/ml}$  母液。再将合成肽段标准氨基酸 (Phe、Val、Arg) 及其重标氨基酸分别配制成  $1 \text{ mg/ml}$  母液。再按照下述方法配制溶液 1、溶液 2 及溶液 3。

#### 溶液 1: 合成肽段的溶液配制

1#肽段 (IGSPVLVLSR, 分子量 1141.39)：取浓度  $1 \text{ mg/mL}$  的肽段母液  $141.53 \mu\text{l}$  补充水使其终体积均为  $2.0 \text{ ml}$ ，终浓度  $0.062 \mu\text{mol/mL}$ 。

2#肽段 (GDLPAFHAHR, 分子量 1120.25)：取浓度  $1 \text{ mg/mL}$  的肽段母液  $139.91 \mu\text{l}$  补充水使其终体积均为  $2.0 \text{ ml}$ ，终浓度  $0.062 \mu\text{mol/mL}$ 。

#### 溶液 2: 重标氨基酸溶液配制

1#肽段：分别取浓度  $1 \text{ mg/mL}$  的重标 Val、Arg 母液  $152.52 \mu\text{l}$ 、 $111.60 \mu\text{l}$  于  $15 \text{ ml}$  离心管中，加水到终体积为  $10.0 \text{ ml}$ ，终浓度  $0.062 \mu\text{mol/ml}$ 。

2#肽段：分别取浓度  $1 \text{ mg/mL}$  的重标 Arg、Phe 母液  $111.60 \mu\text{l}$ 、 $107.88 \mu\text{l}$  于  $15 \text{ ml}$  离心管中，加水到终体积为  $10.0 \text{ ml}$ ，终浓度  $0.062 \mu\text{mol/mL}$ 。

### 溶液 3: 标准氨基酸溶液配制

1#肽段: 分别取浓度 1 mg/mL 的标准 Val、Arg 母液 146.43  $\mu$ l、108.00  $\mu$ l 于 15 ml 离心管中, 加水到终体积为 10.0 ml, 终浓度 0.062  $\mu$ mol/mL。

2#肽段: 分别取浓度 1 mg/mL 的标准 Arg、Phe 母液 108.00  $\mu$ l、102.40  $\mu$ l 于 15 ml 离心管中, 加水到终体积为 10.0 ml, 终浓度 0.062  $\mu$ mol/mL。

#### 1.2.1.2 标准曲线的制备

将标准氨基酸溶液(溶液 3)分别取 60.00、120.00、180.00、240.00、360.00、480.00、600.00  $\mu$ l, 各加入 160.00  $\mu$ l 的  $^{13}\text{C}$  标记的氨基酸溶液(溶液 2), 再用流动相 A 液(含 0.8 mmol/L 全氟庚酸)补体积至 1 ml, 稀释成一系列浓度梯度, 混匀后各取出 20.00  $\mu$ l 上样, 进行 HPLC-ESI-4000 Qtrap MS 检测。

#### 1.2.1.3 肽段水解

在 2 mL 安瓿瓶中分别加入 80  $\mu$ l 溶液 1 和 80  $\mu$ l 的溶液 2, 加入 300  $\mu$ l 6 mol/L HCl 溶液, 平行三份, 通入氮气排出氧气后用酒精喷灯封口, 干燥箱中 150  $^{\circ}\text{C}$  水解 5 h, 室温下氮气吹干, 用 500  $\mu$ l 的流动相 A 液(A 液含 0.8 mmol/L 全氟庚酸、0.05% TFA 和 2% ACN 水溶液)复溶, 过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后进行 HPLC-ESI-4000 Qtrap MS 检测, 每个样品重复二次。

#### 1.2.2 标准蛋白的酶切

取一定量的标准蛋白, 溶于含 50 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  缓冲液中, 蛋白质终浓度为 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 加入终浓度为 10 mmol/L DTT 溶液, 在 95  $^{\circ}\text{C}$  水浴 10 min, 再加入终浓度为 50 mmol/L 的 IAA 溶液, 室温下置于暗处反应 1 h。按照酶与蛋白质量比 1:50 量加入胰蛋白酶混匀, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 16 h。孵育后离心取上清液点靶进行 MALDI-TOF MS 鉴定, 确定溶液酶切的完全程度。

#### 1.2.3 肽段的胍基化修饰

将酶切后肽段或以 K 结尾的合成肽段用水溶解成终浓度 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 加入终浓度 1.5 mmol/L 氧-甲基异脲的氨水溶液(pH 12), 微波辅助反应 10 min 后脱盐, 脱盐后离心取上清液点靶进行 MALDI-TOF MS 鉴定, 剩余的溶液脱盐后干燥备用。

## 1.2.4 肽段的化学标记

### 1.2.4.1 精氨酸与有机磷试剂的反应

称一定量的精氨酸，溶于 PBS (pH 9) 磷酸盐缓冲溶液中，终浓度为 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。在磷酸盐缓冲溶液和乙腈比例为 1:3 体系中，按精氨酸与有机磷试剂 (NHS-Phosphine) 摩尔比 10:1 加入有机磷试剂，37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h，反应后离心取上清液点靶进行 MALDI-TOF MS 鉴定，确定反应完全后干燥备用。

### 1.2.4.2 肽段与叠氮试剂的反应

肽段溶于 PBS (pH 9) 磷酸盐缓冲溶液中，终浓度 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。在磷酸盐缓冲溶液和乙腈比例为 1:3 体系中，按照肽段与叠氮试剂 NHS-Azide 摩尔比 1:35 加入叠氮试剂，37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2-4 h，反应后离心取上清液点靶进行 MALDI-TOF MS 鉴定，确定反应完全后脱盐，脱盐后干燥备用。

### 1.2.4.3 施陶丁格反应

在磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 9) 和乙腈比例为 1:3 的溶液中，按照摩尔比 1:5 将叠氮产物和有机磷产物混合，在 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 3-6 h 后取上清液点靶进行 MALDI-TOF MS 鉴定，确定最佳反应条件，对肽段标记脱盐、干燥备用。

## 1.2.5 MALDI-TOF MS 分析

取 1  $\mu\text{l}$  待分析的样品，点到靶上，室温干燥后，加入 1  $\mu\text{l}$  的 CHCA 基质溶液 (5 mg/mL, 50% ACN, 0.1% TFA)，干燥后进行 MALDI-TOF MS 分析。在进行 MALDI-TOF MS 时，首先用胰蛋白酶酶切的马心肌红蛋白多肽混合物对质谱仪的进行校正，校准至误差  $\leq 10$  ppm。一级质谱数据采集使用 MS-2 KV 反射模式，加速电压设为 20 KV，扫描范围设为 m/z 170-3000，激光能量设为 4500。二级图谱数据采集使用 MS/MS 2 KV 反射模式，从一级谱图中选取质谱峰 (信噪比大于 20 的肽段离子) 进行串联质谱分析，激光能量设置为 6500。所得质谱数据用美国应用生物系统公司的 GPS software 软件进行数据分析。

## 1.2.6 HPLC-ESI-LTQ-FT MS 分析

高效液相色谱分离采用 Agilent 1100 毛细管液相色谱仪，反相色谱柱采用

Magic TM C18 柱 (10 cm×75 μm i.d., 5 μm)。自动进样器上样后通过色谱系统梯度洗脱将样品组分进行色谱分离, 再经 ESI 离子源进行雾化后进入质谱仪进行质谱数据采集。液相色谱条件为: 流动相 A: 2% ACN +0.1% FA ; 流动相 B: 80% ACN+0.1% FA。洗脱梯度为: 0-35 min, 0% B; 35-125 min, 0%-36% B; 125-135 min, 36%-100% B; 135-145 min, 100% B; 145 -146 min, 100%B-0% B; 146-150 min, 100%A 平衡柱子。上样体积为 20 μL, 流动相流速为 300 nL/min。质谱条件: 选用正离子模式采集数据, 质谱扫描范围设为 m/z 375.0-1500.0, 采集时间设为 110 min。仪器参数设置: IonSpray Voltage: 1.5 KV; Spray Current: 0.76 μA; Sheath Gas Flow Rate: 1.48; Aux Gas Flow Rate: 1.15; Sweep Gas Flow Rate: 0.79; Capillary Voltage: 34.94 V; Capillary Temp: 199.99 °C; Tube Lens: 99.79 V; 在采用数据依赖模式 (DDA) 进行串联质谱分析时, 选取一级质谱中 10 个信号强度最高的离子进行二级 MS/MS 质谱分析, 碰撞能量设为 35 V, 活化时间设置为 25 秒, 动态排除 (dynamic exclusion) 时间设置为 10 秒。

### 1. 2. 7 HPLC-ESI-4000 Qtrap MS 分析

液相采用 Agilent 1260: Agilent SB-Aq 色谱柱 (4.6×250 mm, 5 μm); 上样体积 10 μl; 流动相 A: 98%水+2% ACN+0.05% TFA+0.8 mmol/L 全氟庚酸; 流动相 B: 98% ACN+2%水; 流速: 0.5 mL/min; 洗脱梯度: 0-2 min, 0-16%B; 2-7 min, 16%B; 7-12 min, 16%-50%B; 12-15 min, 50%B; 15-16 min, 50%-90%B; 16-20 min, 90%B; 20-21 min, 90%-2%B; 21-30 min, 2%B。质谱分析: 采用微升级电喷雾电离方式, 正离子模式的多反应监测 (MRM)。仪器参数设置如下: 电喷雾电压 (Spray voltage) 为 2000 V; 帘气 (Curtain Gas, GUR) 为 20.00 L/min; 雾化气 (Nebulizer Gas) 为 15.00 L/min; 接口温度 (Interface heater temperature) 为 150 °C; 碰撞气体 (Collision gas, CAD) 设置为中等; 每对离子对的处理时间为 100 ms, 选择目标离子的传输窗口设置为 0.7 Da; 所使用的气体均为氮气。

## 2. 结果讨论

## 2.1 合成肽段定量

选择 F、R、V 氨基酸作为定量的氨基酸测定，在多反应监测扫描模式下，仪器参数如碰撞能量（CE）、去簇电压（DP）、入口电压（EP）和碰撞池出口电压（CXP）等参照王雪颖色谱文章及李楠楠毕业论文，详见表 3-1。

表 3-1 被测氨基酸选择的离子及质谱检测条件

Table 3-1 Transitions used for MRM analysis and optimal parameters of mass spectrometer

Amino acid	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP (V)	CE (V)	EP (V)	CXP (V)
Val	118	72	35	17	10	10
<sup>13</sup> C <sub>5</sub> -Val	118	72	15	17	10	10
Phe	166	120	45	20	7	19
<sup>13</sup> C <sub>9</sub> -Phe	175	128	45	20	7	19
Arg	175	70	55	27	8	9
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -Arg	181	74	55	27	8	9

标准曲线的制作：将二次实验所得的峰面积比取平均值，以标准氨基酸与重标氨基酸的浓度比值为横坐标，峰面积比值为纵坐标，二条肽段的每条被测氨基酸标准曲线分别如图 3-1 和 3-2 所示，线性方程及相关系数见表 3-2。结果表明被测氨基酸的峰面积比与浓度比呈良好的线性关系，线性相关系数  $R^2 \geq 0.98$ 。

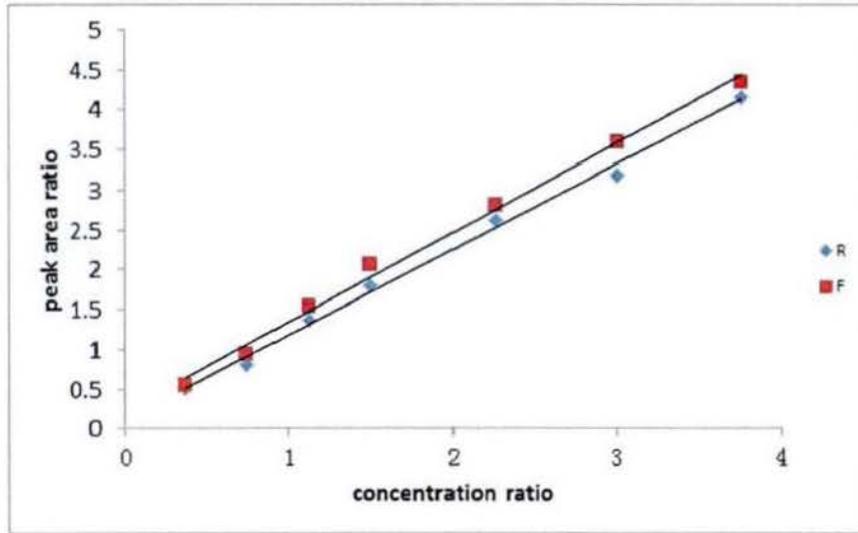


图 3-1 被测 Pro 和 Arg 的定量标准曲线

Fig.3-1 calibration curve by using Pro and Arg

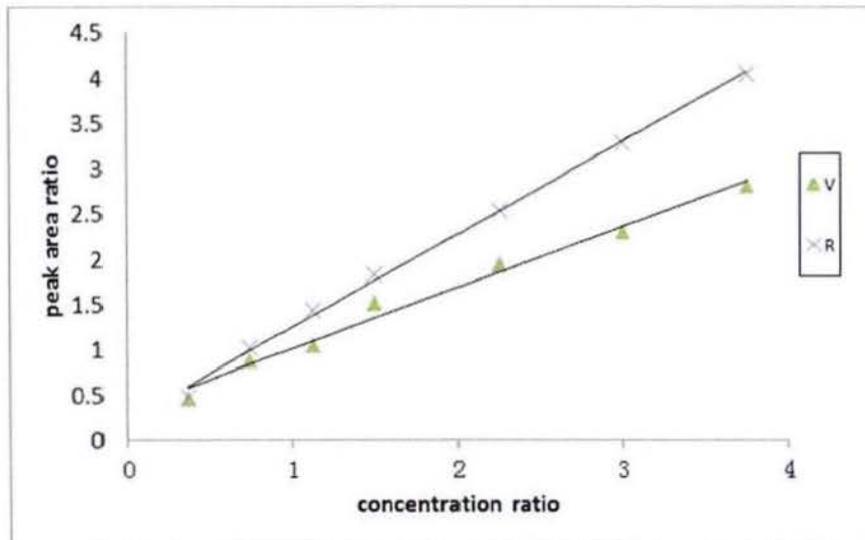


图 3-2 被测 Val 和 Arg 的定量标准曲线

Fig.3-2 calibration curve by using Val and Arg

表 3-2 肽段中被测氨基酸定量的线性方程和相关系数

Table 3-2 The linear equations and correlation coefficients of measured amino acid in peptide

Peptide sequence	Amino acids	Linear equation	R <sup>2</sup>
IGSPVLVLSR	Val	$y = 0.6762x + 0.3362$	0.9864
	Arg	$y = 1.0285x + 0.2191$	0.9976
	Lue	$y = 0.4875x + 0.3353$	0.9828
GDLPAFHAHR	Phe	$y = 1.0701x + 0.1173$	0.9951
	Arg	$y = 1.125x + 0.2127$	0.9940

注: y 值代表标准氨基酸与重标氨基酸的峰面积比值, x 值代表标准氨基酸与重标氨基酸的浓度比值

将肽段水解的三份样品所得数据取平均值,然后将测定的水解肽段氨基酸的峰面积与重标氨基酸峰面积的比值代入线性方程,即可得出每个被测肽段的含量,将二种氨基酸的定量结果去平均值即为该肽段的含量,由表 3-3 及 3-4 可以得出 1# 肽段(IGSPVLVLSR)的含量为 71.08%,即 0.7108  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 2#肽段(GDLPAFHAHR)的含量为 84.98%, 0.8498  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

表 3-3 1#肽段(IGSPVLVLSR)中 Val 和 Arg 的含量

Table 3-3 Contents of Val and Arg in peptide 1#(IGSPVLVLSR)

样品 名称	标准 Arg 峰	测定氨基 酸(Arg)%	均值 (%)	RSD(%)	标准 Val 峰	测定氨 基酸 (Val)%	均值 (%)	RSD(%)
	面积/重标 Arg 峰面积				面积/重标 Val 峰面积			
s1_1	1.017	77.57			0.7738	64.71		
s1_2	0.8853	64.77	74.52	11.59	0.7993	68.48	67.64	3.880
s1_3	1.054	81.22			0.8079	69.76		

表 3-4 2#肽段 (GDLPAFHAHR) 中 Phe 和 Arg 的含量

Table 3-4 Contents of Phe and Arg in peptide 2#(GDLPAFHAHR)

样品 名称	标准 Phe	测定氨基 酸(Phe)%	均值 (%)	RSD(%)	标准 Arg 峰	测定氨基 酸(Arg)%	均值 (%)	RSD(%)
	峰面积/重 标 Phe 峰 面积				面积/重标 Arg 峰面积			
s2_1	1.213	88.91			0.9323	0.7616		
s2_2	1.290	95.72	92.31	7.7268	0.9406	0.7693	77.65	2.510
s2_3	1.380	103.75 (舍弃)			0.9718	0.7985		

## 2.2 精氨酸标记的原理

肽段的精氨酸化学标记由二步组成，首先利用琥珀酰亚胺与氨基的反应分别  
将肽段与叠氮试剂、精氨酸与有机磷试剂连接起来，然后利用叠氮与有机磷的施  
陶丁格反应将精氨酸连接到肽段的 N 端，其实验原理如图 3-3 所示。

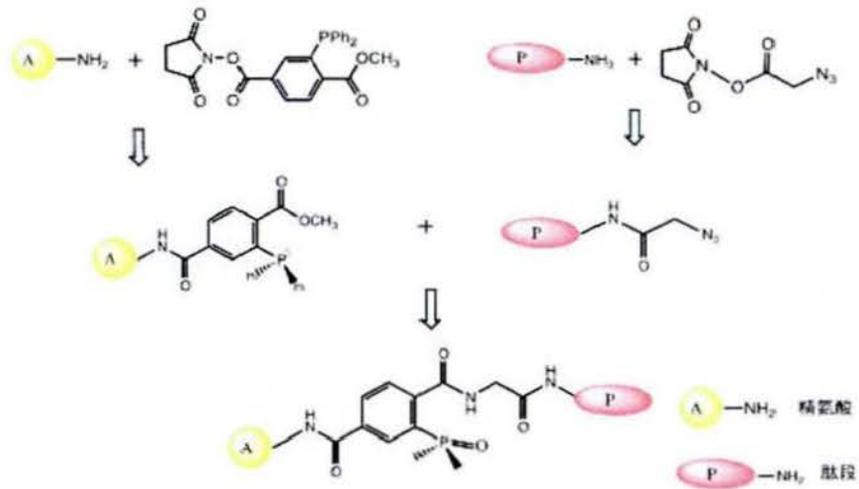


图 3-3 基于点击化学的精氨酸标记原理示意图

Fig. 3-3 A schematic diagram of the principle of arginine labeling by click chemistry

### 2.3 实验条件优化

我们的实验最初的实验设计如图 3-4 所示，将叠氮试剂与精氨酸反应，有机磷试剂与肽段反应，最后利用施陶丁格反应将肽段和精氨酸连接起来。

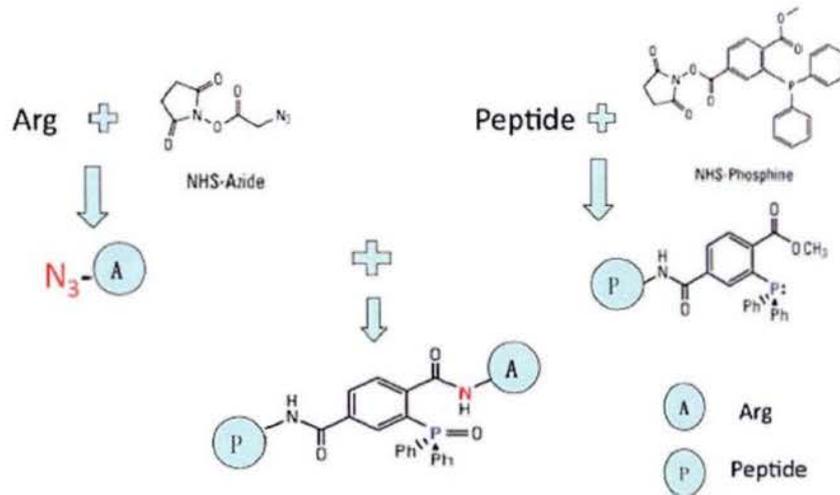


图 3-4 精氨酸标记原理示意图

Fig. 3-4 A schematic diagram for the principle of arginine labeling

我们还从溶剂、反应温度、反应时间、反应物比例四个方面对实验条件进行了考察，得出最佳实验条件如表 3-5。

表 3-5 精氨酸标记最佳反应条件

Table 3-6 Optimal reaction conditions of arginine labeling		
反应体系	反应比例	反应时间
Arg: NHS-Azide=10: 1		
水相: 有机相=1: 3	Peptide: NHS-Phosphine=1: 40	2-4 h
NHS-Azide: NHS-Phosphine=10: 1		

但是在实验中我们发现为了保证肽段反应完全，需要加入过量的有机磷试剂，但反应结束后过量的有机磷试剂需要除去，否则会影响下一步反应。而有机磷试剂通过脱盐无法除去，故我们调整了实验方案，即用叠氮试剂与肽段反应，这样过量的叠氮可以通过脱盐除去，保证后续实验的顺利进行。

### 2.3.1 精氨酸与有机磷试剂的反应效率

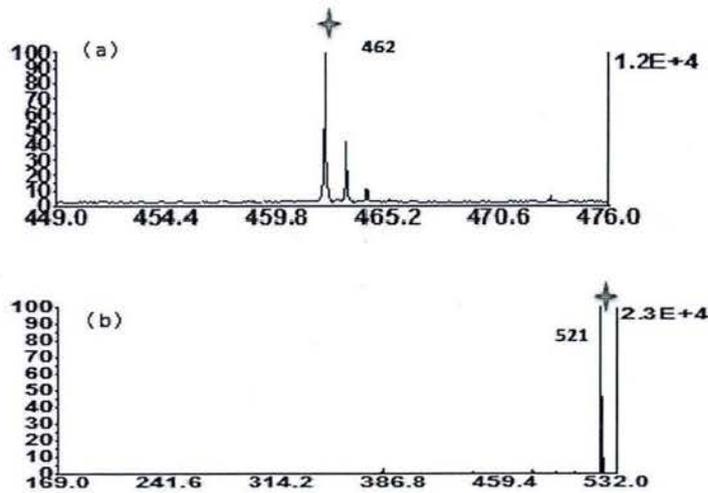


图 3-5 NHS-Phosphine (461Da) 与精氨酸 (174 Da) 反应前 (a)、后 (b) 的 MALDI-TOF MS 质谱图

Fig. 3-5 MALDI-TOF MS spectra of NHS-Phosphine reacted with arginine

如图 3-5 所示,在有机磷试剂与精氨酸反应前后的 MALDI-TOF MS 质谱图中,图 3-5 (a) 是有机磷试剂 NHS-Phosphine (分子量 461 Da) 单独点靶的 MALDI-TOF MS 质谱图,图 3-5 (b) 是精氨酸与有机磷试剂反应后产物 (分子量 520 Da) 的 MALDI-TOF MS 质谱图,由 3-5 可知有机磷试剂反应完全,反应效率达到 100%。

### 2.3.2 标准肽段标记效率

我们分别选取以 K 和 R 结尾的合成肽段,对其进行标记效率的查考,并重复该实验三次。

首先我们选取了以 R 结尾的嗜热菌蛋白的肽段 (AGYTAIVSHR) 及 QconCAT 蛋白的肽段 (TILDELVQR) 的化学标记结果,分别如图 3-6 和图 3-7 所示,其中图 3-6 (a) 和 3-7 (a) 是肽段的 MALDI-TOF MS 质谱图;图 3-6 (b) 和 3-7 (b) 是相应肽段与叠氮试剂反应的 MALDI-TOF MS 质谱图,图 3-5 (b) 和图 3-6 (b) 中无肽段峰,说明肽段反应完全;图 3-6 (c) 和 3-7 (c) 是叠氮产物与有机磷产物的施陶丁格反应的 MALDI-TOF MS 质谱图。由图 3-6 和图 3-7 可以看出随机选取的肽段与叠氮试剂反应完全,说明化学标记能实现对以 R 结尾的嗜热菌及 QconCAT 合成肽段的高效标记,且标记无偏性。

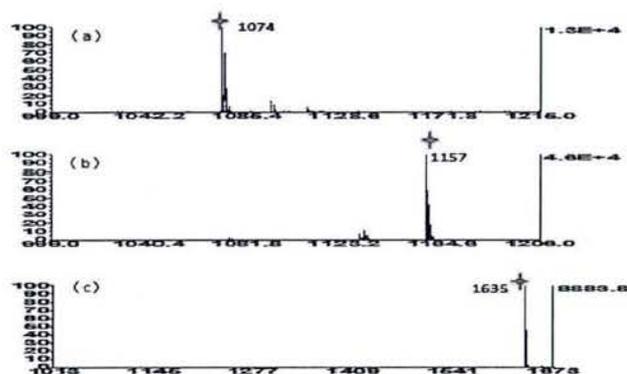


图 3-6 肽段 AGYTAIVSHR (1073 Da) 的 MALDI-TOF MS 质谱图

(a) 未反应肽段 (b) 中间产物 (c) 精氨酸标记终产物

Fig.3-6 MALDI-TOF MS spectra of peptide AGYTAIVSHR labeled with arginine

(a) original peptide (b) intermediate product (c) product

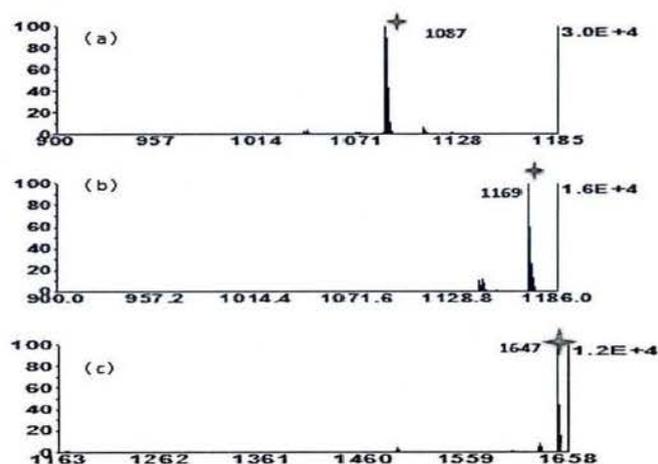


图 3-7 肽段 TILDELVQR (1086 Da) 精氨酸标记的 MALDI-TOF MS 质谱图

(a) 未反应肽段 (b) 中间产物 (c) 精氨酸标记终产物

Fig.3-7 MALDI-TOF MS spectra of peptide TILDELVQR labeled with arginine

(a) original peptide (b) intermediate product (c) product

图 3-8 是以 K 结尾的肽段 (LADLFYQSK) 标记反应结果, 其中图 3-8 (a) 是肽段 LADLFYQSK (分子量 1083 Da) MALDI-TOF MS 质谱图; 图 3-8 (b) 是肽段胍基化反应后的 MALDI-TOF MS 质谱图, 图 3-8 (b) 中已无肽段峰, 说明胍基化反应完全; 图 3-8 (c) 胍基化肽段与叠氮反应的 MALDI-TOF MS, 图 3-8 (c) 中有少量的胍基化肽段, 叠氮标记的效率约为 97%; 图 3-8 (d) 是叠氮产物与有机磷产物施陶丁格反应的 MALDI-TOF MS 质谱图, 由图 3-8 (d) 可以看出叠氮产物完全反应, 由此说明化学标记能实现对以 K 结尾的肽段高效标记, 满足定量分析要求。

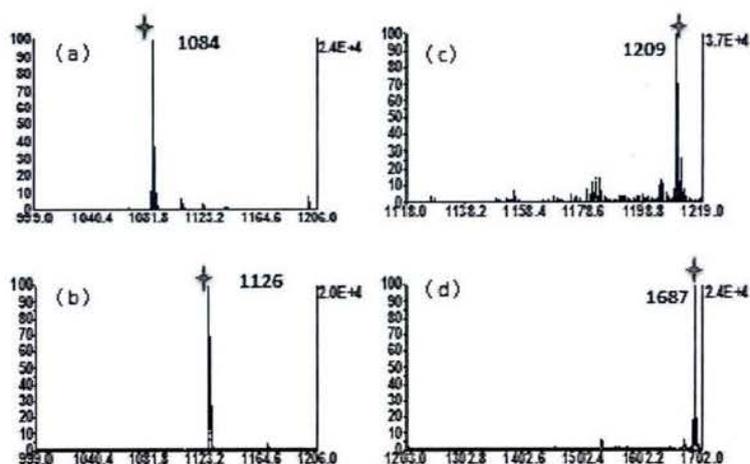


图 3-8 肽段 LADLFYQSK (1083 Da)精氨酸标记的 MALDI-TOF MS 质谱图

(a) 未反应肽段 (b) 胍基化修饰 (c) 中间产物 (d) 精氨酸标记终产物

Fig. 3-8 MALDI-TOF MS spectra of peptide AGYTAIVSHR labeled with arginine

(a) underivatized peptide (b) guanidyl modified (c) intermediate product (d) final product

### 2.3.3 标准蛋白的标记效率

为了在比较复杂的样本中考察标记效率，选择细胞色素 C 为模型蛋白质。图 3-9 是细胞色素 C 酶切、胍基化及施陶丁格反应的结果，其中图 3-9 (a) 是细胞色素 C 酶切肽段的 MALDI-TOF MS 质谱图。图中星号标注的是零漏切的肽段；图 3-9 (b) 是酶切后肽段胍基化的 MALDI-TOF MS 质谱图，图 3-9 (c) 是胍基化后的肽段与叠氮试剂反应的 MALDI-TOF MS 质谱图；图 3-9 (d) 是叠氮产物与有机磷产物的施陶丁格反应的 MALDI-TOF MS 质谱图。我们对肽段的标记效率进行了统计，化学标记对于细胞色素 c 标准蛋白酶切肽段的标记效率均到达 95%以上，满足定量分析的要求。

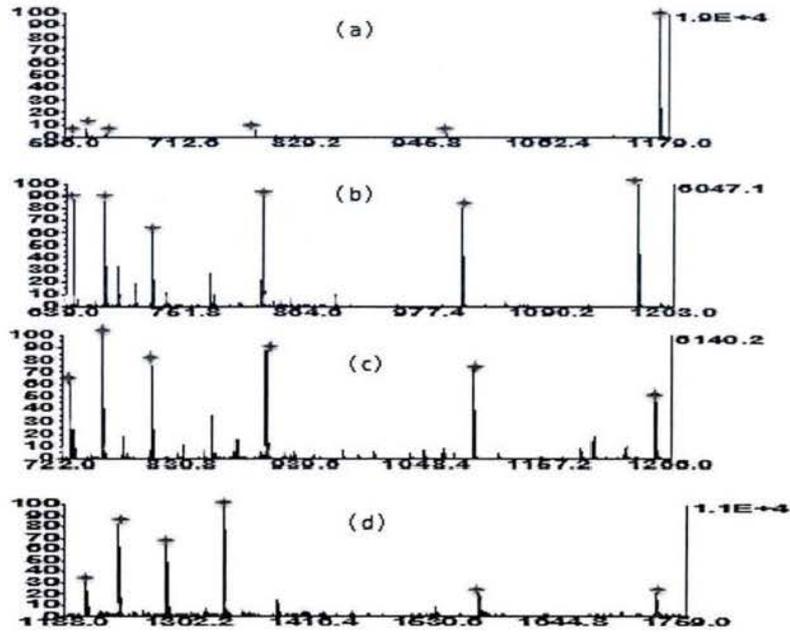


图 3-9 细胞色素 C 酶切肽段精氨酸标记的 MALDI-TOF MS 质谱图

(a) 未反应肽段; (b) 胍基化修饰; (c) 中间产物; (d) 终产物

Fig. 3-9 MALDI-TOF MS spectra of peptides of a cytochrome c labeled with arginine

(a) underivatized peptides; (b) guanidyl modified; (c) intermediate product; (d) final product

另外, 选择马心肌红对标记效率进一步考察。图 3-10 是马心肌红蛋白酶切、胍基化及施陶丁格反应的 MALDI-TOF MS 质谱图, 其中图 3-10 (a) 是马心肌红蛋白酶切的 MALDI-TOF MS 质谱图, 图中星号标注的是零漏切的肽段; 图 3-10 (b) 是酶切后肽段胍基化后的 MALDI-TOF MS 质谱图, 图 3-10 (c) 是胍基化后的肽段与叠氮试剂反应的 MALDI-TOF MS 质谱图; 图 3-10 (d) 是叠氮产物与有机磷产物的施陶丁格反应的 MALDI-TOF MS 质谱图。每一步反应的反应效率及最终的化学标记效率结果的统计结果显示, 标记效率最低的为 95.43%, 最高可到 100%。

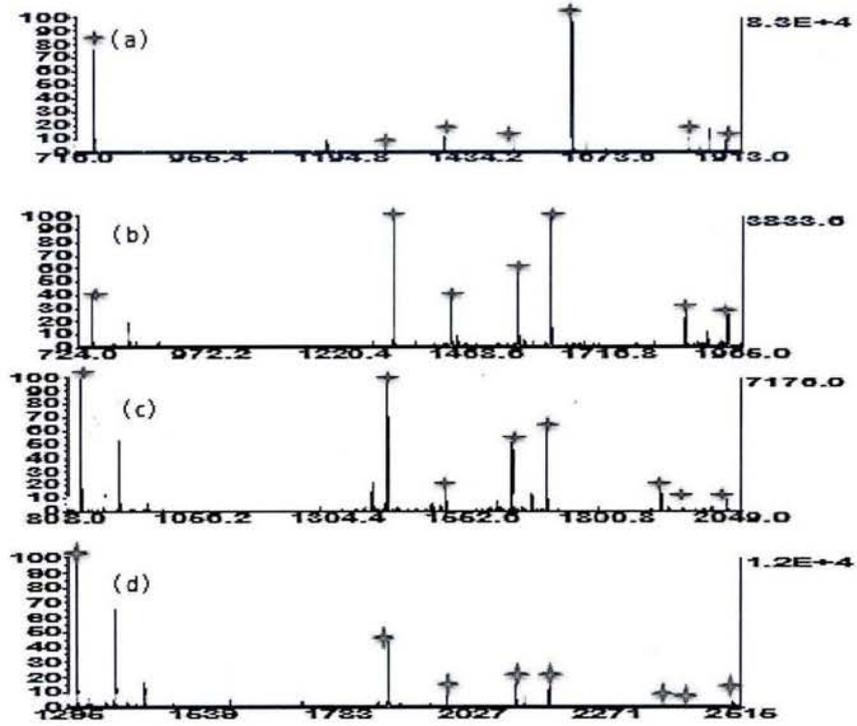


图 3-10 马心肌红蛋白酶切肽段精氨酸标记的 MALDI-TOF MS 质谱图:

(a) 未反应肽段 (b) 胍基化修饰 (c) 中间产物 (d) 终产物

Fig. 3-10 MALDI-TOF MS spectra of peptides of a myoglobin labeled with arginine

(a) underivatized peptide (b) guanidyl modified (c) intermediate product (d) final product

除了对单个的标准蛋白进行酶切标记外，我们还对标准蛋白的混合酶切物进行了化学标记效率的考察。表 3-6 是对混合蛋白中每一步反应的反应效率及最终的化学标记效率结果的列表。由表 3-6 可以看出，化学标记对于标准蛋白混合物酶切肽段的标记效率较高，可以满足定量分析的要求。

表 3-6 马心肌红蛋白与细胞色素 C 混合酶切后肽段的标记效率

Table 3-6 Labeling efficiencies of the peptides of tryptic digested myoglobin and cytochrome c

肽段序列	mixture				标记效率
	M+H(Peptide)	M+H(Guanidination of K)	M+H(NHS-A)	M+H(NHS-P)	
GITWK	547.27	646.32	729.11	1207.42	100.0%
IFVQK	604.34	676.37	759.36	1237.46	100.0%
YIPGK	634.39	720.34	803.34(98.92%)	1281.44	98.70%
ALELFR	678.38		831.40	1309.48	99.43%
MIFAGIK	779.45	821.30	904.42	1382.56	100.0%
EDLIAYLK	964.53	1006.43	1089.47	1567.57	100.0%
TGPNLHGLFGR	1168.62		1251.52	1729.61	98.01%
LFTGHPETLEK	1271.66	1313.59	1396.56	1874.65(96.68%)	100.0%
HGTVVLTALGGILK	1378.84	1420.73	1503.80	1981.82	100.0%
HPGDFGADAQGAMTK	1502.67	1544.53	1627.55	2105.66	100.0%
VEADIAGHGQEVLR	1606.85		1689.69	2167.79	100.0%

注: M+H 处未标明的反应效率均为 100.0%

#### 2.3.4 化学标记肽段的色谱和质谱行为

为了考察化学标记对肽段在色谱和质谱行为上是否有影响,我们对细胞色素 C 蛋白酶切和胍基化修饰后肽段分别进行了+4 Da 和+10 Da 精氨酸标记,并将标记后的肽段按照 1:1 混合,考察其色谱保留时间和质谱响应行为。图 3-11 是提取的细胞色素 C 酶切肽段精氨酸标记+4 Da 和+10 Da (1:1) 混合的 XIC 色谱图,其中图 3-11 (a) 和图 3-10 (b) 是肽段进行精氨酸+4 Da 和+10 Da 不同标记后色谱图,图中二者的保留时间均为 64.09 min,而峰的强度分别为 3.54 E6 和 3.68 E6;图 3-11 (c) 和图 3-10 (d) 是肽段进行精氨酸+4 Da 和+10 Da 不同标记后色谱图,图中

二者的保留时间均为 65.88 min，而峰的强度分别为 6.32 E6 和 7.21 E6。

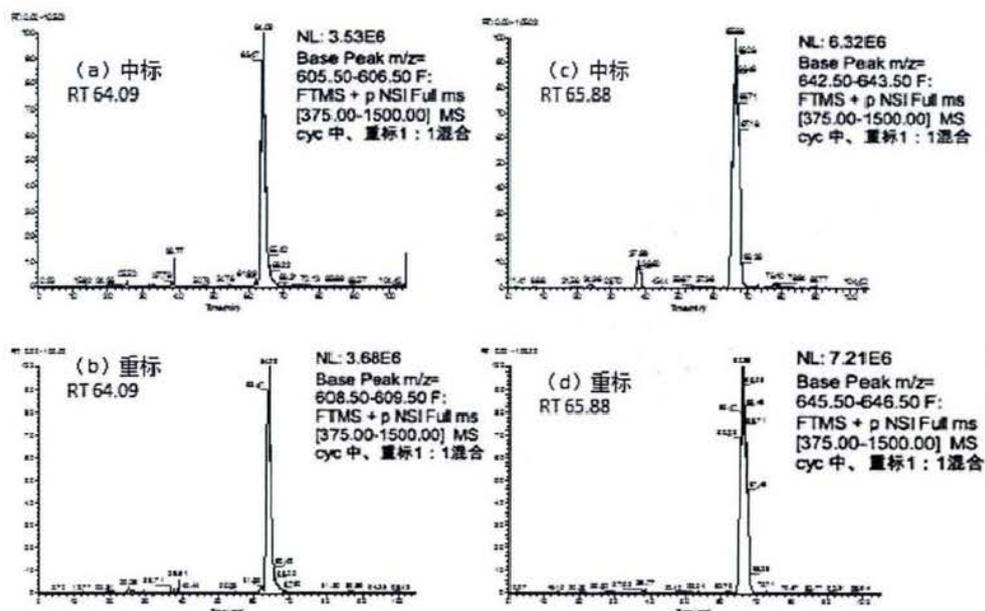


图 3-11 细胞色素 C 酶切肽段精氨酸标记+4 Da 和+10 Da (1:1) 混合的 XIC 色谱图

Fig. 3-11 XIC chromatograms of the peptide mixture of digested cytochrome c labeled by arginine +4 Da and +10 Da (1:1), respectively

图 3-12 是提取的细胞色素 C 酶切肽段精氨酸标记+4 Da 和+10 Da (1:1) 混合的 MALDI-TOF MS 质谱图的一部分，由图可以看出，细胞色素 C 酶切后的肽段用不同的精氨酸稳定同位素进行标记，1:1 混合后的峰面积比基本为 1:1。综上所述可以说明：同一条肽段经不同精氨酸稳定同位素标记后，无论是色谱保留时间还是峰面积都基本相同。这些实验结果证明我们的实验方案可行，可以用于对合成的定量肽段及实际生物样本中蛋白酶切肽段的化学标记。

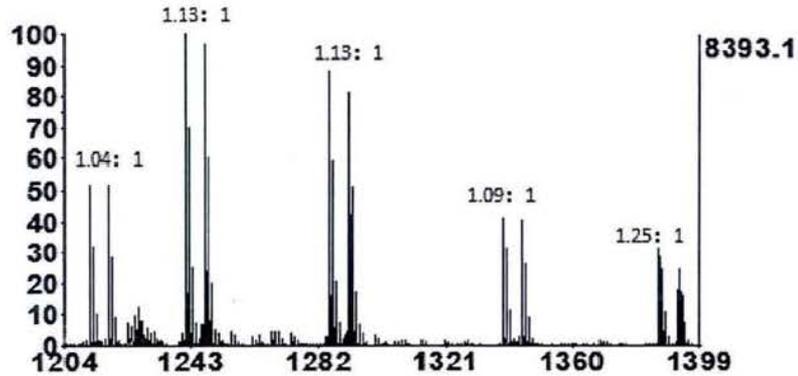


图 3-12 细胞色素 C 酶切肽段精氨酸标记+4 Da 和+10 Da(1: 1)MALDI-TOF MS 质谱图

Fig.3-12 MALDI-TOF spectra of the peptide mixture of digested cytochrome c labeled by arginine +4 Da and +10 Da (1: 1), respectively

### 2. 3. 5 定量肽段的二级碎裂

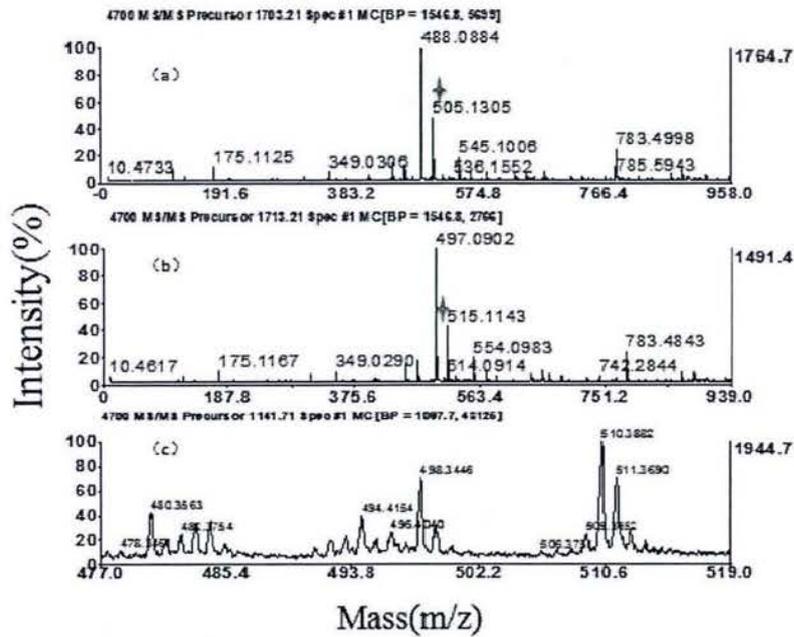


图 3-13 1#(IGSPVLVLSR)肽段精氨酸标记前(c)、后(+0 Da(a)和+10 Da(b))的 MALDI-TOF MS/MS 质谱图

Fig.3-13 MALDI-TOF MS/MS spectra of 1# (IGSPVLVLSR) peptide before (c) and after arginine labeling +0 Da(a) and +10 Da(b), respectively

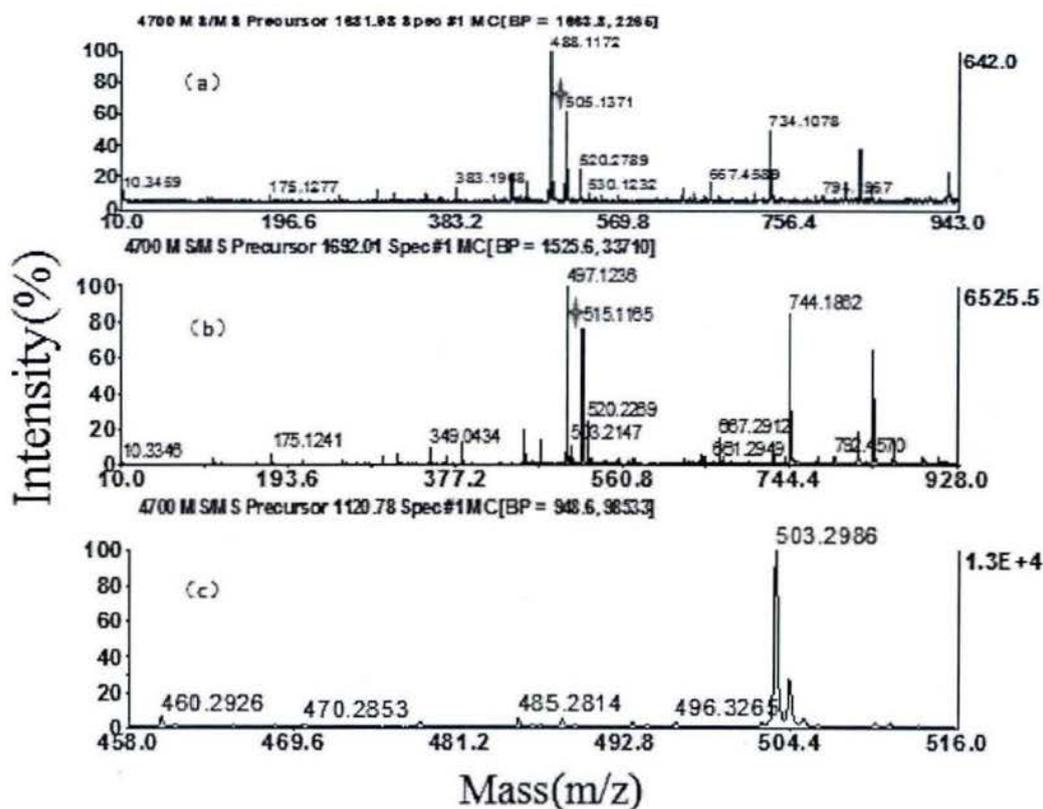


图 3-14 2#(GDLPAFHAHR)肽段精氨酸标记前(c)、后(+0 Da(a)和+10 Da(b))的 MALDI-TOF MS/MS 质谱图

Fig.3-14 MALDI-TOF MS/MS spectra of 2# (GDLPAFHAHR) peptide before (c) and after arginine labeling +0 Da(a) and +10 Da(b), respectively

我们将含量测定后的肽段分别进行了精氨酸(+10 Da)和(+0 Da)化学标记,并用 MADIL 进行二级碎裂。图 3-13 (a)和图 3-14 (a)分别是 1#、2#肽段精氨酸(+0 Da)标记的 MALDI-TOF MS/MS 质谱图,图 3-13 (b)和图 3-14 (b)分别是 1#、2#肽段精氨酸(+10 Da)标记的 MALDI-TOF MS/MS 质谱图,图 3-13 (c)和图 3-14 (c)分别是 1#、2#肽段本身的 MALDI-TOF MS/MS 质谱图。从图中可以看出,二条肽段虽然不同,但其精氨酸+0 Da 的标记总会产生 505 峰,而精氨酸+10 Da 标记皆会产生 515 峰,且肽段本身的碎裂均无这些峰。因此,这些碎片峰皆来自标记到肽段上的标签,可以用于肽段的定量。

### 3. 结论

本章首先根据氨基酸-稳定同位素稀释质谱法对合成肽段的含量进行测定，再根据羟基琥珀酰亚胺与氨基的反应及施陶丁格反应将精氨酸稳定同位素标记到合成肽段上，对精氨酸化学标记的效率等进行了考察。实验结果表明：我们的精氨酸化学标记效率无论是对于腾冲嗜热菌蛋白的合成肽段还是 QconCAT 蛋白的合成肽段均高于 95%，能够实现对对肽段的高效标记且标记物偏性；两种同位素标记的肽段在色谱和质谱中的行为完全一致，说明我们的精氨酸标记可以用于液质联用中。同时，我们的精氨酸标记在二级碎裂时，对任何一条肽段进行相同的精氨酸标记时，产生相同的碎片峰，该碎片峰可以用于定量。

## 参考文献

- [1] Wilkins M R, Sanchez J C, Gooley A A, Appel R D, Humphery-Smith I, Hochstrasser D F, Williams K L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*[J], 1996, 13: 19-50.
- [2] Wasinger V C, Cordwell S J, Cerpa-poljak A, Yan J X, Gooley A A, Wili-k-in M R, Duncan M W, Haris R, Wiliams K L, Humphery-Smith I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*[J], 1995, 16(7): 1090-1094.
- [3] Jungblut P R. The proteomics quantification dilemma. *J Proteomics*[J], 2014, 31: 98-102.
- [4] Unwin R D, Evans C A, Whetton A D. Relative quantification in proteomics new approaches for biochemistry. *Trends Biochem Sci*[J], 2006, 31(8): 473-84.
- [5] Bronstrup M. Absolute quantification strategies in proteomics based on mass spectrometry. *Expert Rev Proteomics*[J], 2004, 1(4): 503-12.
- [6] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*[J], 2003, 422(6928): 198-207.
- [7] Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol*[J], 2008, 4: 222.
- [8] McAlister G C, Nusinow D P, Jedrychowski M P, Wuhr M, Huttlin E L, Erickson BK, Rad R, Haas W, Gygi S P. MultiNotch MS3 enables accurate, sensitive, and multiplexed detection of differential expression across cancer cellline proteomes. *Anal Chem*[J], 2014, 86(14): 7150-7158.
- [9] Perterson A C, Russell J D, Bailey D J, Westphall M S, Coon J J. Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics. *Mol Cell Proteomics*[J], 2012, 11(11): 1475-1488.

- [10] Gillet LC, Navarro P, Tate S, Röst H, Selevsek N, Reiter L, Bonner R, Aebersold R. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics*[J], 2012, 11(6): O111.016717.
- [11] 钱小红. 定量蛋白质组学研究方法. 色谱[J], 2013, 31(8): 719.
- [12] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*[J], 2003, 422(6928): 198-207.
- [13] Lenz C, Urlaub H. Separation methodology to improve proteome coverage depth. *Expert review of proteomics*[J], 2014, 11(4): 409-414.
- [14] Huuang J F, Wang F J, Ye M L, Zou H F. Enrichment and separation techniques for large-scale proteomics analysis of the proteinpost-translational modifications. *J Chromatogr A*[J], 2014, 1372C: 1-17.
- [15] Zhou F, LuY, Ficarro S B, Adelmant G, Jiang W, Luckey C J, Marto J A. Genome-scale proteome quantification by DEEP SEQ mass spectrometry. *Nat Commun*[J], 2013, 4: 2171.
- [16] Wang H, Yang Y, Li Y, Bai B, Wang X, Tan H, Liu T, Beach TG, Peng J, Wu Z. Systematic optimization of long gradient chromatography mass spectrometry for deep analysis of brain proteome. *J Proteome Res*[J], 2015, 14(2): 829-838.
- [17] Bruns S, Frabklin E G, Grinias J P, Godinho J M, Jorgenson J W, Tallarek U. Slurry concentration effects on the bed morphology and separation efficiency of capillaries packed with sub-2  $\mu\text{m}$  particles. *J Chromatogr A*[J], 2013, 1318: 189-197.
- [18] D Orazio G, Rocco A, Fanali S. Fast-liquid chromatography using columns of different internal diameters packed with sub-2  $\mu\text{m}$  silica particles. *J Chromatogr A*[J], 2012, 1228: 213-220.
- [19] Burgess M W, Keshishian H, Mani D R, Gillette M A, Carr SA. Simplified and

- efficient quantification of low-abundance proteins at very high multiplex via targeted mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*[J], 2014, 13(4): 1137-1149.
- [20] Scott Kephart T, Dasgupta PK. Superheated water eluent capillary liquid chromatography. *Talanta*[J], 2002, 56(6): 977-987.
- [21] 刘光会. 色谱分析的新领域-高温液相色谱. *天然气化工*[J], 2000, 25(6): 46-52.
- [22] 富玉, 陈能武. 高温液相色谱的原理及研究进展. *中国测试技术*[J], 2007, 33(3): 36-30.
- [23] Vincent Warren. F. Influence of Temperature on Column Efficiency in Reversed Phase Liquid Chromatography. *Anal Chem*[J], 1988, 60(24): 2821-2824.
- [24] Anita F. D, Horvath C, HPLC at elevated temperature. *Chromatogr*[J], 1988, 435(1): 1-15.
- [25] Bingwen Yan, Jianhong Zhao. High-Temperature Ultrafast Liquid Chromatography. *Anal Chem*[J], 2000, 72: 1253-1262
- [26] Yu Yang, A model for temperature effect on column efficiency in high-temperature liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* [J], 2005, 11:4-7
- [27] 成洪达, 李彤, 张维冰. 高温对高效液相色谱分离性能的影响. *中国科技期刊研究*[J], 2006, 5: 74-78.
- [28] Rogeterg M, Wilson S R, Malerod H, Lundanes E, Tanaka N, Greibrokk T. High efficiency, high temperature separations on silica based monolithic columns. *Chromatogr A*[J], 2011, 1218(41): 7281-7288.
- [29] 周愿, 单亦初, 张丽华, 张玉奎. 基于稳定同位素标记的蛋白质组学定量方法研究进展. *色谱*[J], 2013, 31(6): 496-502
- [30] Qng S E, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen D B, Steen H, Pandey A, Mann M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SIL-AC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*[J], 2002, 1(5), 376-386.

- [31] Ong S E, Mann M. A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc*[J], 2006, 1(6): 2650-60.
- [32] Zhu H, Pan S, Gu S, Bradbury E M, Chen X. Amino acid residue specific stable isotope labeling for quantitative proteomics. *Rapid Commun Mass Spectrom*[J], 2002, 16(22): 2115-2123.
- [33] 朱金蕾, 张锴, 何锡文, 张玉奎. 基于质谱技术蛋白质定量方法的研究进展分析化学[J], 2010, 38(3): 434-441.
- [34] Neuber T A, Tempst P. Super-SILAC for tumors and tissues. *Nat Methods*[J], 2010, 7(5): 361-362.
- [35] Yao X, Freas A, Ramirez J, Demirev P A, Fenselau C. Proteolytic <sup>18</sup>O labeling for comparative proteomics: model studies with two serotypes of a-denovirus. *Anal Chem* [J], 2001, 73(13), 2836-2842.
- [36] Liu H, Zhang Y, Meng L, Qin P, Wei J, Jia W, Li X, Cai Y, Qian X. *Anal Chem* [J], 2007, 79(20): 7700-7707
- [37] Zhao Y, Jia W, Sun W, Jin W, Qian X. Combination of improved (<sup>18</sup>O) incorporation and multiple reaction monitoring: a universal strategy for absolute quantitative verification of serum candidate biomarkers of liver cancer. *Journal of proteome research* [J], 2010, 9 (6), 3319-3327.
- [38] Qin W, Song Z, Fan C, Zhang W, Cai Y, Zhang Y, Qian X. Trypsin immobilization on hairy polymer chains hybrid magnetic nanoparticles for ultra fast, highly efficient proteome digestion, facile <sup>18</sup>O labeling and absolute protein quantification. *Anal Chem* [J], 2012, 84(7): 3138-3144.
- [39] Gygi S P, Rist B, Gerber S A, Turecek F, Gelb M H, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol*[J], 1999, 17(10): 994-999.
- [40] Shio Y, Aebersold R. Quantitative proteome analysis using isotope-coded affinity

- tags and mass spectrometry. *NatProtoc [J]*, 2006, 1(1): 139-145.
- [41] Ross P L, Huang Y N, Marchese J N, Williamson B, Parker K, Hattan S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlet-Jones M, He F, Jacobson A Pappin Dj. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics[J]*, 2004, 3(12): 1154-1169.
- [42] Griffin T J, Xie H, Bandhakavi S, Popok J, Mohan A, Carlis J V, Higgins L. i-TRAQ reagent-based quantitative proteomic analysis on a linear ion trap mass spectrometer. *J Proteome Res[J]*, 2007, 6(11): 4200-4209.
- [43] Thompson A , Schafer J , Kuhn K, Kienle S, Schwarz J, Schmidt G, Neu-mann T, Johnstone R, Mohammed A K, Hamon C. Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal Chem[J]*, 2003, 75(8): 1895-1904.
- [44] 张莹, 杨芃原, 陆豪杰. 基于多级质谱的蛋白质组定量新方法新技术进展. *色谱[J]*, 2013, 31(6): 503-509
- [45] Liu M, Zhang L, Zhang L, Yao J, Yang P, Lu H. Approach for identification and quantification of C-terminal peptides: incorporation of isotopic arginine labeling based on oxazolone chemistry. *Anal Chem[J]*, 2013, 85(22): 10745- 10753.
- [46] Zhou Y, Shan Y C, Wu Q, Zhang S, Zhang L, Zhang Y. Mass defect-based pseudo-isobaric dimethyl labeling for proteome quantification. *Anal Chem[J]*, 2013, 85(22): 10658-10663.
- [47] Pan Y, Ye M, Zheng H, Cheng K, Sun Z, Liu F, Liu J, Wang K, Zou H. Trypsin catalyzed N-terminal labeling of peptides with stable isotope-coded affinity tags for proteome analysis. *Anal Chem[J]*, 2014, 86(2): 1170-1177.
- [48] Sun F, Liu R, Zong W, Tian Y, Wang M, Zhang P. A unique approach to the mobile proton model: influence of charge distribution on peptide fragmentation. *Phys*

- Chem B[J], 2010, 114(19): 6350 -6353.
- [49] 李晓宇, 刘皋林. CYP450酶特性及其应用研究进展. 中国临床理学与治疗[J], 2008; 13(8): 942-946.
- [50] 魏春燕, 吴逢波, 徐珽. CYP450与药物相互作用. 中国药业[J], 2014; 23(6): 17-20.
- [51] Lynch T, Price A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interaction, and adverse effects. Am Fam Physician[J], 2007, 76 (3): 391-396.
- [52] Guengerich F P. Cytochromes P450, drugs, and diseases. Mol Interv[J], 2003, 3(4): 194-204.
- [53] 王宇光, 高月, 柴彪新, 陈鹏, 谭洪玲, 赵永红, 肖成荣, 孙圆媛, 朱力军. 人参、藜芦合用对大鼠肝P450酶活性及mRNA 表达的调控作用. 中国中药杂志 [J], 2004, 29(4): 366-370.
- [54] Rasmussen M K, Ekstrand B, Zamaratskaia G. Comparison of cytochrome P450 concentrations and metabolic activities in porcine hepatic microsomes prepared with two different methods. Toxicol in Vitro[J], 2011, 25(1): 343-346.
- [55] Serron S C, Dwivedi N, Backes W L. Ethylbenzene induces microsomal oxygen free radical generation: antibody-directed characterization of the responsible cytochrome P450 enzymes. Toxicol Appl Pharmacol [J], 2000, 164(3): 305-311.
- [56] Lane C S, Wang Y, Betts R, Griffiths W J, Patterson L H. Comparative cytochrome P450 proteomics in the livers of immunodeficient mice using <sup>18</sup>O stable isotope labeling. Mol Cell Proteomics[J], 2007, 6(6): 953-962.
- [57] Rhodes S P, Otten, G P Hingorani, D P Hartley, R B Franklin. Simultaneous assessment of cytochrome P450 activity in cultured human hepatocytes for compound-mediated induction of CYP3A4, CYP2B6, and CYP1A2. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods[J], 2011, 63(3): 223-226.
- [58] Yuan R, S Madani, X-X Wei, K Reynolds, S-M Huang. Evaluation of cytochrome

- P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study in vitro drug interactions. *Drug Metabolism and Disposition*[J],2002,30:1311-1319.
- [59] Caron E, Rioux N, Nicolas O, Lebel-Talbot H, Hamelin B A. Quantification of the expression and inducibility of 12 rat cytochrome P450 isoforms by quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* [J], 2005,19(6): 368-378.
- [60] Rodríguez-Antona C, Jover R, Gómez-Lechón M J, Castell J. Quantitative RT-PCR Measurement of Human Cytochrome P450s: Application to Drug Induction Studies. *Arch of Biochem and Biophys* [J], 2000, 316(1): 109-116.
- [61] 刘喜东. 硕士学位论文. 吉林大学. 药物代谢酶的生物质谱绝对定量方法发展及应用研究, 2014.
- [62] 施畅, 吴纯启, 曹安民, 廖明阳. Bay41-4109对大鼠肝脏P450酶系诱导作用的研究. *中国新药杂志*[J], 2007, 16( 20): 1666-1669.
- [63] 王雪颖, 秦伟捷, 钱小红, 张养军. 氨基酸-稳定同位素稀释质谱法测定合成肽段准确含量. *色谱*[J], 2012. 33(3): 239-244.

## 附录

### 个人简历

姓名：金祖耀

性别：女

出生年月：1990年3月

籍贯：安徽省舒城县

专业：药物分析

研究方向：蛋白质组学与分析化学

主要学习及工作经历：

2001.9~2004.7 安徽省舒茶中学

2004.9~2007.7 安徽省舒城中学

2007.9~2008.7 六安市毛毯厂中学

2008.9~2012.7 安徽中医药大学药学专业，本科

2012.9~2015.7 安徽医科大学药物分析专业，硕士研究生

### 在学期间发表的论文

1. 金祖耀,吕雅瑶,周珊珊,郝斐然,张养军,钱小红等.一种简单的毛细管电加热装置的制作方法及其在液质联用系统的应用,色谱(已接受)
2. 翟睿,焦丰龙,金祖耀,张养军,钱小红等.金属有机框架材料的研究进展.色谱.2014,32(2):107-116.
3. Rui Zhai, Fenlong Jiao, Feiran Hao, Zuyao Jin, Yangjun Zhang, Xiaohong Qian. Preparation of mixed lanthanides-immobilized magnetic nanoparticles for selective enrichment and identification of phosphopeptides by mass spectrometry. ELECTROPHORESIS. 2014,35(24):3470-3478.
4. Jiabin Li, Lianqi Zhou, Huanhuan Wang, Zuyao Jin, Fang Tian, Bo Peng, Yangjun Zhang, Xiaohong Qian. A New Sample Preparation Method for the Absolute Quantitation of a Target Proteome using <sup>18</sup>O Labeling Combined with Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry. Analyst. 2015,140(4):1281-1290.

## 致谢

时光如梭，转眼间三年的硕士研究生涯即将过去。非常感谢钱小红研究员和张养军导师给予我在国家重点实验室北京蛋白质组研究中心学习的机会，使我能够在顶尖的蛋白质组学实验室完成硕士阶段科研工作。

本研究论文是在张养军研究员的指导下完成的，在论文的完成过程中，张老师给予了细心的指导，帮助我解决科研中出现的问题，使我顺利完成硕士期间的科研任务。张老师严谨的工作态度、创新的学术思维、无私奉献精神为我树立了科研工作者典范。

感谢蔡耘、应万涛、秦伟捷老师和赵炎、郝斐然、翟睿、焦丰龙、王欢欢、吕雅瑶、周珊珊、张万军、冯端、沈丙权、时照梅、郑斐、王明超、赵清、张曼丽以及蔚文峰、陈硕、付斌等实验室的同窗好友们给予我的帮助和支持。

最后，深深的感谢我的父母，感谢他们 24 年来的养育之恩及对我多年学业上的支持，给我无私的爱让我体会到亲情的伟大，使我树立正确的人生观价值观。

## 综述

# 基于生物质谱的蛋白质组学及其标记定量方法新进展

## 中文摘要

随着蛋白质组学研究的深入和技术的不断发展，蛋白质组学研究的重点从蛋白质鉴定、翻译后修饰和相互作用的定性研究，向不同生理和病理状态蛋白质表达的差异变化及对关键的目标蛋白质含量测定转变，因此，定量蛋白质组学已经成为目前蛋白质组学研究的热点及难点。本文首介绍了定量蛋白质组学的研究方法及其定量蛋白质组学中标记方法的研究进展。

**关键词：**生物质谱 定量蛋白质组学 化学标记

## **New progress of proteomics based on bio-mass spectrometry and its labeling quantitation method**

### **Abstract**

With comprehensive proteomics research and the development of proteomics technologies, the proteomics focus has turned from qualitative research such as protein identification, post-translational modification and protein-protein interaction to quantitative studies including differential proteomes between different biological states or healthy and pathological states as well as the absolute determination of some key proteins. This paper mainly introduces the progress research methods of quantitative proteomics and quantitative proteomics in labeling method.

**Key words** Proteomics/Mass spectrometry/Chemical labeling

在《Electrophoresis》杂志出现<sup>[1]</sup>。蛋白质组是指基因、细胞或组织所表达的全部蛋白质。随着蛋白质组学研究的深入和技术的不断发展，蛋白质组学研究的重点已经从蛋白质组鉴定、翻译后修饰和相互作用的定性研究，向不同生理和病理状态下蛋白质组表达的差异变化及对关键的目标蛋白质组含量测定转变。蛋白质组定量俨然成为了解生命体活动的过程，实现对关键功能蛋白、蛋白标志物及药物靶标验证的重要策略，因此蛋白质组学定量已经成为目前蛋白质组学研究的热点和难点<sup>[3]</sup>。

根据蛋白质组定量目的不同，定量蛋白质组学分为相对定量和绝对定量研究<sup>[4, 5]</sup>。相对定量是指通过对不同生理和病理状态下的细胞、组织或者体液表达的蛋白量进行相互比较，发现差异蛋白的分析方法。绝对定量是指对细胞、组织或者体液中某一状态下蛋白绝对含量或者浓度的测定，从而实现对选定的生物标志物、药物靶标或者功能蛋白的验证。

基于生物质谱技术的蛋白质组定量是目前蛋白质组量的主要研究方法，主要包括“鸟枪法”和多反应检测（multiple reaction monitoring, MRM）法。基于“鸟枪法”的蛋白质组定量方法是先对不同状态生物样品中的蛋白质组进行酶解和标记，然后将这些肽段混合物进行色谱分离，最后进行串联质谱分析（MS/MS）分析以及对质谱图中不同肽段碎片的离子强度进行比较，确定出差异蛋白质组。该方法的优点是分析通量高，一次可定量上千个蛋白，但无法对多肽信号进行选择，因此主要用于蛋白质组的相对定量，且受基质及其它组分干扰，灵敏度低<sup>[6]</sup>。MRM方法是指根据目标蛋白质的氨基酸序列，预测并选择质谱信号强度高且可以唯一确定目标蛋白的肽段作为特异性肽段，并将其对应的信号强度高的的肽段离子和子离子对作为定量离子，即在三级四级杆质谱中通过设置 Q1 对母离子进行选择，Q2 对选择的母离子进行碎裂，Q3 对子离子进行选择扫描。通过这样的质量过

滤和离子检测，可以有效地去除干扰离子，提高定量方法的灵敏度<sup>[7]</sup>。

虽然上述方法具有高灵敏度及线性范围广等特点，但由于其低的质量分辨，难以去除太过复杂的基质干扰，同时由于其监测的离子对数量有限，难以满足蛋白质组学高通量的要求，因此这成为定量蛋白质组学的困境。近年来，陆续出现了一些新的技术，如同步母离子选择（Synchronous precursor selection, SPS）技术、平行反应监测（Parallel reaction monitoring, PRM）技术以及 SWATH（sequential window acquisition of all theoretical fragmentation spectra）技术等。SPS 技术是用多频凹波的隔离波形（MultiNotch）在离子阱中实现一次选择获得多个肽段离子的碎片离子，将这一技术与 MS3 联用时可以通过离子的累积提高信号响应<sup>[8]</sup>。PRM 用 Orbitrap 替代了 MRM 中的 Q3，进而对 Q2 碎裂的子离子进行高分辨率和精确质量的分辨全扫描。与 MRM 相比，提高了灵敏度、线性范围达到 5-6 个数量级。但是，PRM 最多只能检测 15 个母离子，分析通量比 MRM 低<sup>[9]</sup>。SWATH 技术是在快速、高分辨率的 Q-TOF 质谱仪器上开发的一种高通量和高灵敏度的定量技术。采用该方法时，首先将母离子的质荷比范围分成不同的质荷比区间，然后对不同质荷比区间的母离子进行裂解和全扫描，从这些碎片离子谱图来识别特定的肽段，并通过碎片的离子强度对相应的肽段进行相对或绝对定量。Gillet 等<sup>[10]</sup>通过实验验证该方法的动态范围超过 4 个数量级。

另外，根据是否对蛋白或者肽段进行标记，蛋白组定量方法主要包括标记定量和非标记定量。由于标记定量既可用于相对定量又可以用于绝对定量<sup>[11]</sup>。因此，基于标记结合毛细管高效液相色谱-质谱联用的定量方法已经成为蛋白质组定量研究的首选方法。而在标记定量中，基于稳定同位素标记结合液相色谱-质谱的蛋白质组定量方法已经成为生命科学研究中的一种重要支撑技术<sup>[12]</sup>，已有发展了适应不同生物样本类型的多种方法。根据不同标记方法原理，标记方法分为体内代谢标记、酶促 <sup>18</sup>O 标记和化学标记等。

在代谢标记中最常用的是细胞培养氨基酸稳定同位素标记技术（Stable isotope labeling by amino acids, SILAC），该技术是 2002 年由 Ong 等<sup>[13, 14]</sup>在 Zhu 等<sup>[15]</sup>提出

的AACT (amino acid coded mass tagging) 的基础上发展而来的, 其原理是首先利用重同位素标记的必需氨基酸替换正常的必需氨基酸加入到细胞培养液中, 在经过多代的细胞培养和代谢过程后使细胞内新合成蛋白中的必需氨基酸被其重同位素标记的氨基酸替代, 然后将含轻、重同位素氨基酸标记的蛋白按照不同比例混合和酶切, 经液质联用分析后经过不同同位素氨基酸标记后的同一肽段在一级质谱上的峰就会成对出现, 最后通过比较这些峰的强度或者面积来对蛋白进行定量。其优势是标记效率高, 标记是在蛋白合成过程中完成, 无需加入额外的实验操作; 定量准确: 根据同位素氨基酸的自由组合, 能够实现多重标记。缺点是该方法只适用于能够进行细胞培养的样品, 对于生物医学研究中常用的组织、体液等不适用, 而且价格昂贵<sup>[16]</sup>。2010年, Neubert等<sup>[17]</sup>发展了一种Super-SCILAC技术, 用SCILAC标记培养细胞, 将培养后的细胞酶切后产生的内标肽在质谱分析中作为内标加入到肿瘤组织样本中来对肿瘤组织进行定量, 这一技术将SCILAC技术的适用范围增加到了组织。

酶促<sup>18</sup>O标记是肽段在H<sub>2</sub><sup>18</sup>O环境中基于胰蛋白酶的催化作用将肽段C端羧基上的<sup>16</sup>O 置换成<sup>18</sup>O。2001年, Fenselau等<sup>[18]</sup>最先将其用于蛋白质的相对定量研究。该技术的优点是实验操作简单, 反应条件温和, 价格低廉; 缺点是标记有偏性, 标记效率因多肽性质不同差异较大且标记的稳定性差, 且易发生回交<sup>[19]</sup>。之后, 赵焱等<sup>[20]</sup>使用助溶剂RapigestTM SF和微波辅助来提高肽段的分散度使反应效率有所提高。与此同时, 还用高浓度还原剂和烷基化试剂对溶液中残留的胰蛋白酶进行化学方法的彻底灭活, 从而阻断了<sup>18</sup>O标记肽段回交的发生, 使标记肽段的稳定性增强。但<sup>18</sup>O标记依然存在对肽段有标记歧视、且仅能实现两个样品的定量等问题。宋子凤等<sup>[21]</sup>基于原子转移自由基聚合反应(ATRP)的方法制备了固定化酶硅胶填料和固定化酶磁性纳米颗粒两种固定化酶, 并将固定化酶、<sup>18</sup>O标记及质谱多反应监测(MRM)技术结合起来用于目标蛋白质绝对定量, 实现了快速酶解, 解决了<sup>18</sup>O标记肽段的回标, 提高了定量的准确性。近日, Pan<sup>[22, 23]</sup>等利用酶促反应对肽段标记后再冻干将体系转换成含有少量水的乙醇体系中, 在胰蛋白酶的催化

下成功将精氨酸稳定同位素连接到肽段N端。该方法的优点是反应条件温和、引入的精氨酸标签质量差大，可以有效地避免同位素峰的重叠。

化学标记主要有同位素亲和标签 (isotope coded affinity tags, ICAT)、等重同位素标签标记定量法 (isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)、串联质量标签 (tandem mass tag, TMT) 等。ICAT试剂是1999年由Gygi等<sup>[24]</sup>提出的, 随后Aebersold等<sup>[25]</sup>将该技术与串联质谱结合用于蛋白质组的定量分析中。ICAT试剂主要由反应基团、连接基团和生物素标签三部分组成。其原理是将不同生长状态下的细胞裂解后分别加入不同标记 (连接基团部分质量数不同) 的 ICAT试剂, 通过反应基团与蛋白质或肽段的半胱氨酸的巯基发生化学键合反应将不同类别同位素标记上去, 一起酶解后利用生物素标签亲和分离将蛋白或者肽段纯化出来再进入质谱分析, 按照不同比例混合, 最后根据同位素峰的相对强度进行相对定量。其特点是不仅特异性地标记半胱氨酸的巯基 (-SH), 而且在质谱分析前可以将标记-SH 的肽段与其他没有标记的肽段进行亲和分离, 降低了样本的复杂程度, 但也因此只能对含巯基的多肽或蛋白进行标记。

iTRAQ<sup>[26,27]</sup> 试剂包括报告基团、平衡基团和肽反应基团三部分。其原理主要是反应基团 (PRG) 特异地与肽段的N-端氨基和Lys的 $\epsilon$ -氨基结合, 平衡基团与不同质量的报告基团组合为肽段质量数加上144 Da, 保证iTRAQ标记的同一肽段的质荷比相同, 从而在一级质谱图上显示为一个峰。在二级质谱图上, 报告基团特异性地断裂, 平衡基团发生中性丢失, 最后产生的多个报告基团的峰面积比值即为样本间蛋白含量或者浓度的比值。TMT<sup>[28]</sup>与iTRAQ标记试剂的化学反应原理相似, 只是化学结构式略有不同。且iTRAQ试剂有8个不同的标记标签, 可同时标记并混合8个样品进行定量检测, 而TMT仅有6个不同的标记标签, 只可同时标记和混合6个样品进行定量检测。他们的特点是都能标记所有的肽段, 提高蛋白质标记的覆盖率及定量的准确性, 并能实现多重标记定量, 提高定量分析的通量。但这类标记试剂昂贵、操作过程繁琐, 可选择的定量离子受到限制且在多个平行样品的预处理和酶解操作过程易产生偏差, 在进行质谱分析时引入较大误差等问题<sup>[29]</sup>。为此,

Liu等<sup>[30]</sup>利用基于恶唑酮反应的精氨酸稳定同位素标记实现C端的快速鉴定和定量。Zhou等<sup>[31]</sup>利用<sup>13</sup>CD<sub>2</sub>O和NaCNBH<sub>3</sub>、CD<sub>2</sub>O和NaCNBD<sub>3</sub>的组合对肽段的N端以及C端赖氨酸侧链氨基二甲基化，实现一级等重标记并用于定量。为了进一步解决现存标记试存在的不足，Pan等<sup>[32]</sup>利用胰蛋白酶催化的方法将稳定同位素亲和标签连接到肽段的N端，这不仅可用于定量，而且连接上的短序列标签可以提高蛋白质组分析的覆盖率。其原因是精氨酸为碱性氨基酸，可以提高质子化效率，标记肽段的b离子可以提高b离子在质谱中的检测灵敏度，有利于基于b离子的定量分析<sup>[33]</sup>，但该方法对反应条件要求严格。

## 参考文献

- [1] Wilkins M R, Sanchez J C, Gooley A A, Appel R D, Humphery-Smith I, Hochstrasser D F, Williams K L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*[J]. 1996, 13: 19-50.
- [2] Wasinger V C, Cordwell S J, Cerpa-poljak A, Yan J X, Gooley A A, Wilikin M R, Duncan M W, Haris R, Wiliams K L, Humphery-Smith I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*[J], 1995, 16(7): 1090-1094.
- [3] Jungblut P R. The proteomics quantification dilemma. *J Proteomics*[J], 2014, 31: 98-102.
- [4] Unwin R D, Evans C A, Whetton A D. Relative quantification in proteomics new approaches for biochemistry. *Trends Biochem Sci*[J], 2006, 31(8): 473-84.
- [5] Bronstrup M. Absolute quantification strategies in proteomics based on mass spectrometry. *Expert Rev Proteomics*[J], 2004, 1(4): 503-12.
- [6] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*[J], 2003, 422(6928): 198-207.
- [7] Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol*[J], 2008, 4: 222.
- [8] McAlister G C, Nusinow D P, Jedrychowski M P, Wuhr M, Huttlin E L, Erickson BK, Rad R, Haas W, Gygi S P. MultiNotch MS3 enables accurate, sensitive, and multiplexed detection of differential expression across cancer cellline proteomes. *Anal Chem*[J], 2014, 86(14): 7150-7158.
- [9] Perterson A C, Russell J D, Bailey D J, Westphall M S, Coon J J. Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics. *Mol Cell Proteomics*[J], 2012, 11(11): 1475-1488.

- [10] Gillet LC, Navarro P, Tate S, Röst H, Selevsek N, Reiter L, Bonner R, Aebersold R. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics*[J], 2012, 11(6): O111.016717.
- [11] 钱小红. 定量蛋白质组学研究方法. *色谱*[J], 2013, 31(8): 719.
- [12] 周愿, 单亦初, 张丽华, 张玉奎. 基于稳定同位素标记的蛋白质组学定量方法研究进展. *色谱*[J], 2013, 31(6): 496-502
- [13] Ong S E, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen D B, Steen H, Pandey A, Mann M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SIL-AC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*[J], 2002, 1(5), 376-386.
- [14] Ong S E, Mann M. A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc*[J]., 2006, 1(6): 2650-60.
- [15] Zhu H, Pan S, Gu S, Bradbury E M, Chen X. Amino acid residue specific stable isotope labeling for quantitative proteomics. *Rapid Commun Mass Spectrom*[J], 2002, 16(22): 2115-2123.
- [16] 朱金蕾, 张锴, 何锡文, 张玉奎. 基于质谱技术蛋白质定量方法的研究进展分析化学[J], 2010, 38(3): 434-441.
- [17] Neuber T A, Tempst P. Super-SILAC for tumors and tissues. *Nat Methods*[J], 2010, 7(5): 361-362.
- [18] Yao X, Freas A, Ramirez J, Demirev PA, Fenselau C. Proteolytic  $^{18}\text{O}$  labeling for comparative proteomics: model studies with two serotypes of a-denovirus. *Anal Chem* [J], 2001, 73(13), 2836-2842.
- [19] Liu H, Zhang Y, Meng L, Qin P, Wei J, Jia W, Li X, Cai Y, Qian X. *Anal Chem* [J], 2007, 79(20): 7700-7707
- [20] Zhao Y, Jia W, Sun W, Jin W. Qian X. Combination of improved  $(^{18}\text{O})$

- in-corporation and multiple reaction monitoring: a universal strategy for absolute quantitative verification of serum candidate biomarkers of liver cancer. *Journal of proteome research* [J], 2010, 9 (6), 3319-3327.
- [21] Qin W, Song Z, Fan C, Zhang W, Cai Y, Zhang Y, Qian X. Trypsin immobilization on hairy polymer chains hybrid magnetic nanoparticles for ultra fast, highly efficient proteome digestion, facile <sup>18</sup>O labeling and absolute protein quantification. *Anal Chem* [J], 2012, 84(7): 3138-3144.
- [22] Pan Y B, Ye M L, Zheng H, et al. Trypsin catalyzed N-terminal labeling of peptides with stable isotope-coded affinity tags for proteome analysis. *Anal Chem*[J], 2014, 86: 1170-11777.
- [23] Pan Y B, Ye M L, Zhao L, et al. N-terminal labeling of peptides by trypsin catalyzed for quantitative proteomics. *Anal Chem Int E* [J], 2013, 52: 9205-9209.
- [24] Gygi S P, Rist B, Gerber S A, Turecek F, Gelb M H, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity-tags. *Nat Biotechnol*[J], 1999, 17(10): 994-999.
- [25] Shii Y, Aebersold R. Quantitative proteome analysis using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nat Protoc* [J], 2006, 1(1): 139-145.
- [26] Ross P L, Huang Y N, Marchese J N, Williamson B, Parker K, Hattan S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlett-Jones M, He F, Jacobson A Pappin D. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics*[J], 2004, 3(12): 1154-1169.
- [27] Griffin T J, Xie H, Bandhakavi S, Popok J, Mohan A, Carlis J V, Higgins L. i-TRAQ reagent-based quantitative proteomic analysis on a linear ion trap mass spectrometer. *J Proteome Res*[J], 2007, 6(11): 4200-4209.
- [28] Thompson A, Schafer J, Kuhn K, Kienle S, Schwarz J, Schmidt G, Neumann T,

- Johnstone R, Mohammed A K, Hamon C. Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal Chem*[J], 2003, 75(8): 1895-1904.
- [29] 张莹, 杨芃原, 陆豪杰. 基于多级质谱的蛋白质组定量新方法新技术进展. *色谱*[J]. 2013, 31(6): 503-509
- [30] Liu M, Zhang L, Zhang L, Yao J, Yang P, Lu H. Approach for identification and quantification of C-terminal peptides: incorporation of isotopic arginine labeling based on oxazolone chemistry. *Anal Chem*[J], 2013, 85(22): 10745- 10753.
- [31] Zhou Y, Shan Y C, Wu Q, Zhang S, Zhang L, Zhang Y. Mass defect-based pseudo-isobaric dimethyl labeling for proteome quantification. *Anal Chem*[J], 2013, 85(22): 10658-10663.
- [32] Pan Y, Ye M, Zheng H, Cheng K, Sun Z, Liu F, Liu J, Wang K, Zou H. Trypsin catalyzed N-terminal labeling of peptides with stable isotope-coded affinity tags for proteome analysis. *Anal Chem*[J], 2014, 86(2): 1170-1177.
- [33] Sun F, Liu R, Zong W, Tian Y, Wang M, Zhang P. A unique approach to the mobile proton model: influence of charge distribution on peptide fragmentation. *Phys Chem B*[J], 2010, 114(19): 6350 -6353.