

# 定量蛋白质组同位素标记技术及应用

龙晓辉 张耀洲\*

(浙江大学生命科学学院, 杭州 310029; <sup>1</sup>浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018)

**摘要** 定量蛋白质组学是对蛋白质组进行精确的定量和鉴定的学科, 突破了传统蛋白质组研究集中于对蛋白质的分离和鉴定, 着重于定性定量解析细胞蛋白质的动态变化信息, 更真实地反映了细胞功能、过程机制等综合信息。以同位素为内标的质谱分析新技术的提出, 显示出可同时自动鉴定和精确定量的能力, 代表了目前定量蛋白质组研究的主要发展方向。对近年来定量蛋白质组学同位素标记技术和应用研究所取得的重要进展以及最新的发展动态进行了综述。

**关键词** 定量蛋白质组学; 同位素标记; 质谱

蛋白质组学是以细胞蛋白质为基础的整体生物学研究方法, 是继基因组学后生命科学领域最具前景的新兴学科之一<sup>[1]</sup>。蛋白质组研究最初的目标是找到方法以大规模分离并鉴定蛋白质, 摆脱以往只能研究单个或少数蛋白质状态, 已形成相对成熟的技术和有效蛋白质研究手段。

然而, 目前大量的研究旨在解释细胞的蛋白质功能和调控等过程变化信息, 在对细胞蛋白质组结构鉴定同时, 其动态变化研究显得更为重要。所谓定量蛋白质组学(quantitative proteomics), 即对一个基因组表达的全部蛋白质或一个复杂的混合物体系中所有蛋白质进行精确的定量和鉴定学科的诞生<sup>[2]</sup>, 标志蛋白质组研究已从静态的定性分析过渡到动态变化的定量研究上来。作为蛋白质组学基本战略组分, 近年来有关各种技术的建立、数据的连续扩充, 显示其变得越来越重要, 促进了人们对细胞蛋白质功能和过程机制理解, 使预测和解决目前生物领域许多挑战变为可能。

目前定量蛋白质组研究建立和发展的技术平台主要有双向电泳-质谱技术(two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry, 2DE/MS)<sup>[3]</sup>、蛋白质芯片<sup>[4]</sup>及基于同位素标记的质谱分析技术<sup>[2]</sup>等。2DE-MS 是比较成熟的早期技术, 近年来取得的改进和最近荧光双向差示电泳和丙烯酰胺标记技术的提出使重复性和精确度进一步改善, 但由于技术本身局限性并没实现真正意义的全蛋白质分析; 蛋白质芯片由于具有高通量、微型化及自动化等优点已逐渐引入到定量蛋白质组研究上来, 但目前其标准化、适用范围等方面还存在许多不足, 如何保持蛋

白质天然活性等尚需技术更大的发展; 而以同位素为内标的 MS 直接定量分析新技术的提出, 突破了前两种技术局限性并显示出可同时精确定量和鉴定的能力, 成为当今定量蛋白质组研究技术的主要发展方向。

## 1 稳定同位素标记技术

质谱是很好的蛋白质鉴定工具, 但不同的蛋白质或多肽在质谱中有不同的离子化效率, 所以不能从质谱图中对蛋白质(肽)进行定量分析。以稳定同位素为内标, 将物理化学性质相同、质量不同的同位素掺入两种样品, 混合后不同状态的相同蛋白质(肽)因质量差异在质谱图中表现为一对峰, 通过比较质谱峰强弱, 精确定量出蛋白质不同状态下表达量的变化。

目前采用两种不同标记技术路线, 以同位素元素或氨基酸形式在培养细胞中引入标属生物掺入标记(biological incorporation labeling); 用化学试剂在蛋白质提取后的酶解前、中、后攻击蛋白质(肽)特殊残基位点引进标记属化学衍生标记(chemical derivation labeling)。

### 1.1 生物掺入标记

该方法最早由 Oda 提出并对酵母细胞作了初步尝试研究<sup>[5]</sup>。在这个过程中, 将不同状态下的酵母细胞在两种不同的培养基(富含重质 <sup>15</sup>N 或正常 <sup>14</sup>N 元素)中单独培养, 然后等量混合两种酵母细胞, 提取蛋白质, 2DE 分离, 最后将感兴趣的蛋白质胰酶消

收稿日期: 2004-10-12 接受日期: 2005-01-14

\*通讯作者。Tel: 0571-86843190, E-mail: yaozhou@chinagene.com

化, MS 根据峰对强度定量, 串联质谱(MS/MS) 分析鉴定(其流程见图 1A), 该实验不但定量了蛋白质相对丰度还定量了磷酸化位点。随后方法发展为结合二维色谱(liquid chromatogram, LC)分离; 以  $^{13}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$  等代替  $^{15}\text{N}$  标记以及同位素排除法(即培养基中重同位素丰度远低于其天然丰度)分析也见报道<sup>[6]</sup>。

但以同位素元素形式掺入培养基可能影响细胞生长条件且昂贵, 用于高等生物(如哺乳动物)则显得力不从心, 最近生物掺入标记的进展是以同位素氨基酸如氘代(或氘)Leu(Arg 等)形式引入, 提供了定量分析哺乳动物培养细胞的机会, 研究显示这些特定氨基酸能 100% 掺入, 不影响生长条件, 并可用于翻译后修饰研究<sup>[7]</sup>。

## 1.2 同位素亲和标签(isotope-coded affinity tag, ICAT)

Gygi 等<sup>[8]</sup>开发的 ICAT 是目前应用最广泛并已商品化的化学衍生标记试剂, 它由 3 部分组成: 活性反应基团(碘乙酰胺), 可与细胞蛋白质的半胱氨酸(Cys)反应; 连接子(含 8 个氘或氘称为重或轻试剂)可引入稳定同位素; 亲和标签(生物素)用来分离含 Cys 的多肽, 结构式见图 1B。这个方法流程包括以下 4 步: (a)提取不同细胞样品的蛋白质, 分别与重或轻试剂反应; (b)混合并酶解; (c)亲和 LC 分离; (d)在线 LC/MS(MS/MS)定量和鉴定分离的肽, 见图 1A。因胰酶消化后含 Cys 的多肽覆盖了绝大多数蛋白质, 如人 26.6% 含 Cys 的多肽代表了 96.1% 蛋白质, 酵母 10% 的含 Cys 肽代表 80% 的蛋白质, 况且许多化学物可攻击 Cys, 所以针对 Cys 标记提

供了减小复杂性的好的靶点; 亲和 LC 选择性分离含 Cys 肽, 理论上一种独特的肽被鉴定就可知道其母蛋白质, 只分析含 Cys 肽从而简化了分析过程。

近年来 ICAT 技术本身又取得许多进展, 形成了 ICAT 系列技术。第二代可剪切 ICAT<sup>[9]</sup>(cleavable ICAT, cICAT)在连接子和亲和素间引入酸剪切位点, MS 分析前移去亲和标签, 分析灵敏度提高了数倍; 而固相 ICAT 将亲和素连接于固相介质并引入光剪切位点, 一步完成标记、分离步骤并耐受强烈洗脱条件; Sebastiano 等<sup>[10]</sup>以乙烯基吡啶代替碘乙酰胺活性基团, 使修饰效率得以改善(能 100% 与 Cys 反应)且不影响其他功能团; Olsen 等<sup>[11]</sup>合成了一种称为 Hys 的试剂, 以 His 亲和和标签代替生物素, 6 个  $^{13}\text{C}$  代替 8 个氘(同位素导致峰的复杂性及结果不可靠性主要出现在氘化的肽,  $^{13}\text{C}$  代替氘质量相对较小, LC 分离时有相同的延迟时间), 连接子上有一胰酶切位点, 降低了复杂性及提高了检测限, 并可扩展到不同的多肽。

综上所述, 生物掺入标记技术由于不同样品在蛋白质提取前标记并混合, 不需任何体外衍生步骤, 减少了样品处理带来的误差, 是到目前为止最精确的标记方法, 适合任何形式的氨基酸作为标记前体, 但可变性较少(只有 20 种天然氨基酸、5 种元素可获得), 只适合培养细胞系; 而 ICAT 标记策略灵活多变, 可用于非培养细胞, 适合各种类型样品, 包括体液和活体组织, 虽精确性和覆盖率不如前者, 但具有富集且减小复杂性的优势, 且多为结合 LC 分离, 可分析低拷贝和难溶性蛋白质, 但 ICAT 对不含 Cys 或 Cys 存在修饰的蛋白质则不适用。

## 1.3 其他标记策略

鉴于 Cys 的局限性, 非 Cys 氨基酸残基的化学衍生标记策略也陆续开发合成, 包括攻击 Met、Try 等的试剂<sup>[12,13]</sup>; 蛋白质酶解产生的肽其羧基端(C 端)在酶解过程中经过酯化以及氨基端(N 端)在酶解后通过酰基化也可引入标记<sup>[14,15]</sup>; 另外, 在标记技术方面, 还提出了依据不同化学物质掺入的化学编码亲和和标签及依据质量差异的质量标记标签等非同位素标记技术<sup>[16]</sup>。

除此之外, 同位素标记技术也被扩展到探索复杂混合物的功能蛋白质群方面(如磷酸化、糖基化及酶蛋白质等)的分析。例如, 可通过生物掺入标记比较磷酸化和非磷酸化肽对应的  $^{14}\text{N}$  和  $^{15}\text{N}$  峰值强度可用于磷酸肽的定量<sup>[5]</sup>, 而化学衍生的磷酸试剂 PhIAT<sup>[17]</sup>经  $\beta$  消除反应移去磷酸基团并经 Michael 亲

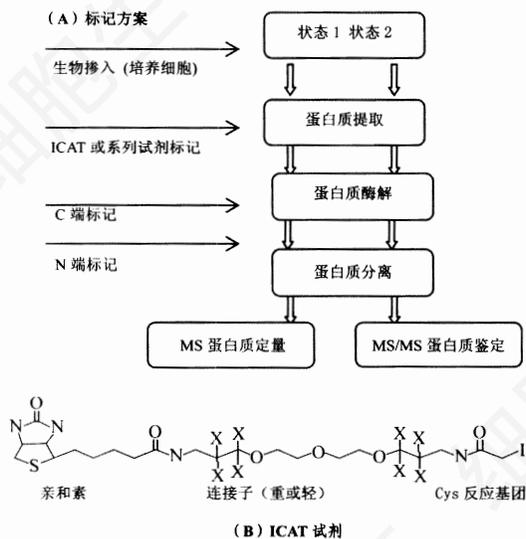


图 1 蛋白质或肽的各种同位素标记策略

样品都是在标记后混合酶解、分离并经 MS (MS/MS) 定量和鉴定蛋白质。

电加成引入标记也可用于磷酸化蛋白质的定量分析；糖基化蛋白质 O-型(糖基与蛋白质的 Thr/Ser 残基结合)可以采用  $\beta$  消除法, N-糖基化(糖基与蛋白质的 Asn 残基结合)可先以探针进行富集, 再进行标记<sup>[18,19]</sup>; 通过合成的试剂以活性依赖方式选择性结合某特殊酶类已用于了磷酸激酶、半胱氨酸蛋白酶等分析<sup>[20]</sup>, 提供了潜在的研究酶的定量途径。这些针对特殊蛋白功能群的标记策略提高了功能蛋白质群的覆盖率也促进了靶蛋白的深度分析。

## 2 定量蛋白质组同位素标记技术的应用

应用同位素标记联合质谱分析技术进行定量蛋白质组研究的发展十分迅速, 包括蛋白质复合物及相互作用的组成动态变化研究、翻译后修饰研究、亚细胞器研究、扰动产生的蛋白质差异分析, 以及疾病靶标和药物开发平台等方面。

### 2.1 膜蛋白

鉴于蛋白质组的复杂性, 通常在亚蛋白质组(如某种细胞器/组织)水平上进行研究, 这对进一步了解蛋白质功能线索有重要意义。例如, 膜蛋白(真核生物膜蛋白还可能存在翻译后修饰)在细胞通路和疾病研究中起着重要作用, 但由于膜蛋白溶解性较低, 2DE 不能有效分离, 膜蛋白的研究进展一直较为缓慢。Arnott 等<sup>[21]</sup>应用生物掺入标记方法用抗体选择性地定量检测了前列腺癌膜表面的蛋白质, 被称为“质谱西印记法(Mass-Western)”, 不需胶分离或其他初步纯化步骤; 而 Olsen 等<sup>[11]</sup>用 Hys 试剂标记, 以  $Ni^{2+}$  亲和柱分离, 成功用于小鼠前脑和后脑膜蛋白定量蛋白质组研究, 直接系统地检测鉴定了 355 个膜蛋白, 测定了其中 281 个蛋白质的变化, 显示了其高通量能力; Han 等<sup>[22]</sup>则采用了 ICAT-MS 结合多维 LC 分离, 完成了对人正常和白血病细胞的微粒体多达 5000 个蛋白质分化分析, 其中鉴定了近 500 种膜蛋白并定量了它们在不同刺激下的反应差异, 是到目前为止对膜相关蛋白的最综合的分析。

### 2.2 大分子复合物及相互作用

蛋白质通常不是单独而以复合物形式表现功能, 并形成了相互作用调控网络, 研究复合物组分和含量的动态变化能了解重要生化事件中的调控机制及网络概貌。已有很多关于蛋白质复合物的研究报道, 如对 *S. cerevisiae* 的转录机器多蛋白质复合物的鉴定<sup>[23]</sup>及对线粒体新陈代谢活动关键的丙酮酸脱氢酶复合物<sup>[24]</sup>的组成和丰度分析等。

Ranish 等<sup>[25]</sup>发展了 DNA 启动子亲和纯化法, 分离了酵母细胞不同状态下(野生型和温度敏感突变型)的核蛋白 RNA 聚合酶 II (Pol II) 起始前复合物(包括数 10 种亚单位, 能与 DNA 启动子的 TATA 框结合启动转录), 以 ICAT 结合 LC/MS 分析了该复合物特殊组分及丰度的动态变化。尽管 Pol II 机器一些相关因子已被报道鉴定, 却无法区分被鉴定蛋白质是 Pol II 组分还是与之共纯化的蛋白质, 而酵母双杂交不能在生理条件下研究相互作用, 但定量质谱方法通过对野生型和温度敏感突变型(使转录失活)蛋白质的比较, 49 个蛋白质在温度敏感突变型比野生型低于 1.9 倍(其中有 45 个已知是组分), 因而能从共纯化蛋白质中区分出 Pol II 组分(即使比共纯化的蛋白质丰度低), 为研究者进行复合物纯化及综合分析提供了一个有力的工具; Brand 等<sup>[26]</sup>定量分析了鼠白血病分化期间与转录因子 NF-E2p18/MafK 复合物相互作用的蛋白质及变化。在分化期间, 白细胞的  $\beta$  球蛋白基因调控区与转录因子 NF-E2p18/MafK 结合为  $\beta$  球蛋白表达所必需, 研究结果证实了 MafK 为双功能分子, 与该分子相互作用的蛋白质从 Bach1(共抑制子)转换为 NF-E2p45(共激活子)是从抑止转为活跃的关键的一步, 在终端分化前随着相互作用的变化顺激活  $\beta$  球蛋白的表达, 该工作提供的定量信息增进了复合物及相互作用变化的深度了解。

### 2.3 扰动诱导发现细胞新通路机制

细胞可对体内及环境变化作出反应, 引起调控网络通路的改变和重建。为研究表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)通路, Schulze 等<sup>[27]</sup>用了一种合成肽方法, 只合成 EGFR 的 Src 蛋白 SH3 域, 以 SH3 的 Tyr 磷酸化和非磷酸化形式做“诱饵”, 在培养细胞中用氘(或氢)Leu 标记检验了与配体蛋白质 Grb2 相互作用过程, 结果和来自 Src 依赖 SH3 域对肌动蛋白修饰、内吞的信号事件一致, 证实了 SH3 功能域对信号通路是非常重要的; 无独有偶, Blagoev 等<sup>[28]</sup>对鼠细胞经 EGFR 刺激和未刺激不同状态进行了代谢标记, 以配体蛋白 Grb2 的 SH2 域(可结合磷酸化 EGFR)亲和纯化了 EGFR, LC/MS/MS 高灵敏度定量分析并鉴定了 228 个蛋白质, 发现许多相关蛋白质的变化, 其中 28 个在刺激后表达提高, 包括组蛋白 H3、菌丝蛋白及凋零素等, 并发现了两个新蛋白质。

Ong 等<sup>[7]</sup>以 Leu(氘或氢)掺入标记研究了鼠肌肉细胞分化模型的蛋白质表达变化, 发现上调的蛋白质包括甘油醛-3-磷酸脱氢酶和丙酮酸激酶  $M_2$  等,

并与阵列数据进行了对比证实了其可靠性; Conrads 等<sup>[29]</sup>定量分析了无机磷酸盐诱导的鼠造骨细胞蛋白质的变化, 用 iCAT 结合质谱鉴定了 2501 个蛋白质的 7227 个肽, 同时选择细胞周期蛋白 D1(为磷酸化蛋白质)经传统的 Western 方法确认, 在 ICAT-MS 分析的变化是 1.76 倍, Western 是 2.01 倍, 表明了一次实验能实现哺乳动物细胞数千种蛋白质诱导变化研究的可操作性。

## 2.4 翻译后修饰

许多生物过程及功能是靠翻译后包括磷酸化、糖基化、泛素化等修饰调节的, 而且修饰是普遍的和动态的, 甚至一个蛋白质有许多修饰位点。如磷酸化修饰, 一般发生在蛋白质的 Ser/Thr/Tyr 等位点, 从蛋白质组范围内鉴定磷酸化位点和定量磷酸化水平的改变是必需也是困难的, 况且磷酸化蛋白质的低丰度使情况更复杂化。早期定量研究是用放射性 <sup>32</sup>P 标记和 2DE 分离, 但蛋白质量需求很大并有放射性危害; 或是用免疫印迹提纯并定量分析鉴定磷酸化蛋白, 但磷酸特异性抗体尚不能识别所有磷酸化蛋白, 难以适用高通量的磷酸化蛋白研究。

Oda 等<sup>[5]</sup>用 <sup>15</sup>N(或 <sup>14</sup>N)富集介质和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)对感兴趣的酵母磷酸蛋白进行肽指纹图谱分析, 定量了磷酸化位点, 结果显示灵敏度可高达 pmol 到亚 pmol 水平; 也有人进行了 Ste20 蛋白的鉴定及位点的定量; 也许迄今最完全的磷酸化蛋白质组鉴定是 Ficarro 等<sup>[30]</sup>的工作, 鉴定了超过 1000 个磷酸位点, 并可扩展为定量分析。今后磷酸化蛋白分析的一个重要方向是大规模细胞膜磷酸化蛋白质的分析。

糖基化蛋白质对细胞黏附和识别等有重要功能, 也是重要的疾病靶标, 但目前蛋白质数据库只有 172 个被实验证实的人糖基化蛋白质(<http://pir.georgetown.edu/pirwww/search/textpsd.shtml>)。最近报道了两项有关 N- 型糖蛋白研究的重要工作<sup>[18,19]</sup>: 前者定量了线虫 250 个糖肽的变化并鉴定了 400 个位点, 后者分析了人血浆和血清糖蛋白并发现了异常先天性糖基缺陷造成糖基化通路缺失。方法上两者都首先用固相柱捕获糖蛋白, 以 N- 型糖苷酶 PNGaseF 释放糖蛋白, 同位素标记糖肽并 MS/MS 分析; 两者不同之处在于捕获方法及同位素标记路线有所区别, 前者是固相凝集素柱介导的亲和捕获糖蛋白, 在氘化(或氘)水中消化时掺入标记; 后者是糖蛋白先与固相介质上的酰肼共价结合、洗去非糖蛋白、PNGaseF 酶解后洗去未结合肽、然后氘(或氘)琥珀

酸酐标记, 仅一个简单的分析就完成了位点、丰度检测及鉴定, 有趣的是, 该研究表明白蛋白(最丰富的血清蛋白)不包含任何 N- 糖位点, 提取白蛋白后, 这种方法在定量分析血清低拷贝 N- 糖蛋白的有效性。

泛素在真核生物细胞蛋白质降解中充当了信号分子, 可与靶蛋白质 Lys 的  $\epsilon$ - 氨基共价结合, 胰酶切后的肽在泛素位点包含两个标签 Gly 可被质谱检测到。Peng 等<sup>[31]</sup>用 His 标记的泛素从酵母细胞捕获泛素化肽, 鉴定了 1075 个泛素蛋白质和 110 个泛素位点, 如结合标记技术, 将开辟定量研究泛素及类泛素修饰蛋白质的先河。

## 2.5 疾病研究与药物筛选

在疾病研究方面, Xiong 等<sup>[32]</sup>进行了药物干扰的犬类淋巴瘤细胞研究, 用凝集素选择了带有  $\alpha$ -L- 岩藻糖的糖肽, 结合标记技术, 发现在化疗过程中患者血液中岩藻甾醇蛋白浓度降低了超过 2 倍, 并鉴定了两种蛋白质 CD44 和 E 黏合分子, 已知与细胞黏合和癌细胞迁移有关, 这种方法适合于与疾病相关糖蛋白质变化差异监测, 为寻找异常糖基化靶蛋白打下了良好基础; Nirmalan 等<sup>[33]</sup>用 Ileu 代谢标记监测了一种人致死性的疟原虫在药物四环素作用过程中的发展和变化, 观察到了一系列可能的靶蛋白的不同效应, 发现了磷酸果糖激酶 N- 转甲基酶和肌动蛋白 1 等在周期中的不同变化, 这些蛋白质在疾病中的角色正在研究中。

在药物筛选方面, 为实现高通量筛选候选药物靶标, Oda 等<sup>[34]</sup>建立了一个系统的新战略: (1)固定在介质上的不同化学药物与蛋白质作用; (2)标记与药物结合的蛋白质、酶解、LC/MS 分离、鉴定与定量标记肽; (3)转录阵列方法选择候选肽; (4)表面等离子共振证实激活结构与候选蛋白间的相互作用。对一种新类型抗癌试剂 E7070 的研究显示了这种系统方法有利于混合物中大量尚未证实靶蛋白的发现, 其规模是以前不可能达到的, 为加速药物筛选和治疗诊断提供了一个极具潜力的平台。

## 3 小结与展望

定量蛋白质组学是一个快速发展的领域。以同位素为内标的质谱技术的发展和其已经发展成为成熟的技术, 并能介入众多的生物和临床的研究, 在诠释生命基本规律和在生物医学应用方面显示了巨大的潜能。

在现有研究基础上, 该技术分析及应用未来的

发展将主要集中于以下几个方面：定量和鉴别能力的提高，通用标记技术的开发，自动化高通量技术平台的构建，具有重大生物意义蛋白质的定量研究以及蛋白质组代谢的动态监测等。

目前人们已开始进行这些前沿性研究。在定量能力方面，绝对的定量很难，但并不是不可能的，Bottari 等<sup>[35]</sup>的工作证实了绝对定量的可行性。在技术平台方面，Belov 等<sup>[36]</sup>开发出完全自动化、高通量的双电喷雾离子源/四级杆傅立叶离子回旋共振质谱分析系统，改善了具重大意义蛋白质组的研究。在细胞蛋白质代谢监测应用研究方面，Cargile 等<sup>[37]</sup>初步尝试了实时监测蛋白质的代谢动态周转，为阐明蛋白质合成/降解调控和信号机制提供了新线索。

定量蛋白质组最终目标远不是简单的比较的表达，而是去阐明和证实细胞代谢和信号网络动态机制以及优化预测细胞功能；更关键的是，寻求懂得这些网络在疾病中的异常，为人类最终药物治疗和健康维护而服务。定量蛋白质组学同位素标记技术的发展和无疑将加快这一宏大目标的实现。

### 参考文献 (References)

- [1] Fields S. *Science*, 2001, **291**: 1221
- [2] Mann M. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**: 954
- [3] Lilley KS *et al. Curr Opin Chem Biol*, 2002, **6**: 46
- [4] Zhou H *et al. Genome Biol*, 2004, **5**: R28
- [5] Oda Y *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 6591
- [6] Martinovic S *et al. J Mass Spectrom*, 2002, **37**: 99
- [7] Ong SE *et al. Mol Cell Proteomics*, 2002, **1**: 376
- [8] Gygi SP *et al. Nat Biotechnol*, 1999, **17**: 994
- [9] Qiu Y *et al. Anal Chem*, 2002, **74**: 4969
- [10] Sebastiano R *et al. Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, **17**: 2380
- [11] Olsen JV *et al. Mol Cell Proteomics*, 2004, **3**: 82
- [12] Gevaert K *et al. Mol Cell Proteomics*, 2002, **1**: 896
- [13] Kuyama H *et al. Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, **17**: 1642
- [14] Gu S *et al. Anal Chem*, 2002, **74**: 5774
- [15] Yao X *et al. Anal Chem* 2001, **73**: 2836
- [16] Watt SA *et al. J Biotechnol*, 2003, **106**: 287
- [17] Oda Y *et al. Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 379
- [18] Kaji H *et al. Nat Biotechnol*, 2003, **21**: 667
- [19] Zhang H *et al. Nat Biotechnol*, 2003, **21**: 660
- [20] Adam GC *et al. Nat Biotechnol*, 2002, **20**: 805
- [21] Arnott D *et al. Mol Cell Proteomics*, 2002, **1**: 148
- [22] Han DK *et al. Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 946
- [23] Ho Y *et al. Nature*, 2002, **415**: 180
- [24] Murray J *et al. FEBS Lett*, 2002, **529**: 173
- [25] Ranish JA *et al. Nat Genet*, 2003, **33**: 349
- [26] Brand M *et al. Nat Struct Mol Biol*, 2004, **11**: 73
- [27] Schulze WX *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 10756
- [28] Blagoev B *et al. Nat Biotechnol*, 2003, **21**: 315
- [29] Conrads KA *et al. Electrophoresis*, 2004, **25**: 1342
- [30] Ficarro SB *et al. Nat Biotechnol*, 2002, **20**: 301
- [31] Peng J *et al. Nat Biotechnol*, 2003, **21**: 921
- [32] Xiong L *et al. J Proteome Res*, 2003, **2**: 618
- [33] Nirmalan N *et al. Mol Microbiol*, 2004, **52**: 1187
- [34] Oda Y *et al. Anal Chem*, 2003, **75**: 2159
- [35] Bottari P *et al. Bioconjug Chem*, 2004, **15**: 380
- [36] Below ME *et al. J Am Soc Mass Spectrom*, 2004, **15**: 212
- [37] Cargile BJ *et al. Anal Chem*, 2004, **76**: 86

## Quantitative Proteomics Using Isotope Labeling Techniques and Its Recent Application

Xiao-Hui Long, Yao-Zhou Zhang<sup>1\*</sup>

(College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

<sup>1</sup>College of Life Science, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310018, China )

**Abstract** Quantitative proteomics is defined as the systematic identification and the determination of quantitative change in the complete proteome. Quantitative proteomics focus on the information of dynamical changes of proteins of complex samples, and is expected to provide new functional insights into the processes of biological systems. The use of stable isotopes as internal standards in mass spectrometry has opened a new era for quantitative proteomics and has the potential for studying on proteins by identifying and quantifying automatically and simultaneously. Advance in isotope labeling techniques and recent biological applications are reviewed, further development based on quantitative proteomics is discussed.

**Key words** quantitative proteomics; isotope labeling technique; mass spectrometry