

^{18}O 标记法在定量蛋白质组学中的应用

谭颖 王玉霞 李晶 葛志强*

(天津大学化工学院制药工程系, 天津 300072)

摘要 基于质谱技术去识别和检测蛋白质表达差异是一个热点, 有助于生物过程和体系的分子机制的研究。近年来各种基于质谱技术的定量蛋白质组学研究方法发展较快, 相对其他方法而言, ^{18}O 标记法是一种较为理想、相对容易实现并且在不断完善的体外标记方法, 最近在定量蛋白质组学研究中应用较多。现对 ^{18}O 标记法原理、特点以及技术方法的优化和应用进展进行综述。

关键词 定量蛋白质组学; ^{18}O 标记法;

蛋白质组学研究初期主要是力求获得生物体的蛋白质表达谱, 而随着蛋白质组技术的不断成熟, 定量蛋白质组学的研究最近已经成为这个学科中的焦点问题。对目前的研究水平而言, 定量蛋白质组学研究主要指的是蛋白质的相对定量。当细胞生理或者外部环境条件改变时, 细胞体内的蛋白质丰度水平会发生相应的变化, 或者通过蛋白质转录后修饰来诱导相关机制的改变。定量蛋白质组学可以分析不同状态下的蛋白质表达谱的相关蛋白质的相对含量, 或者其翻译后修饰的程度等, 从而有利于系统理解蛋白质组的功能, 有助于生物过程和体系的分子机制的研究^[1]。

质谱(mass spectrometry, MS)技术的发展给细胞内蛋白质丰度的检测提供了一个平台, 已成为定量蛋白质组学的核心技术。近年来基于质谱技术的定量蛋白质组学研究方法主要有双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2DE)、稳定同位素标记法和非标记定量法。 ^{18}O 标记法属于体外稳定同位素标记法中的一种。

尽管定量蛋白质组学研究发展很快, 在短短的几年时间里, 由传统的 2DE, 到现在热门的各种各样的稳定同位素标记法, 再到新发展的非标记定量法, 但是丰度差异的检测限(threshold)、定量的线性范围以及准确性一直是定量蛋白质组学亟待解决的问题。此外, 有较为完整的蛋白质覆盖率, 易于操作等也是定量蛋白质组学研究方法需要达到的要求。相对其他方法, ^{18}O 标记法是一种较为理想、容易实现的定量蛋白质组学研究方法。

1 ^{18}O 标记法的原理

^{18}O 标记法的基本操作过程是: 将对照组和实验组的蛋白质样品分别在 ^{16}O 水中和 ^{18}O 水中酶解, 然后将酶解得到的肽段等体积混合上样, 用液相色谱-串联质谱仪(LC-MS/MS)进行肽段的定性检测和相对定量, 从而得到相应的蛋白质的信息。

首先将 ^{18}O 标记法应用到定量蛋白质组的是 Yao 等^[2], 他们用这种方法研究了不同血清型的腺病毒, 证明了该方法的可行性, 发现在高浓度的 ^{18}O 水中(>95%), 被胰蛋白酶酶解得到的肽段会被两个 ^{18}O 原子标记上(传统认为是一个 ^{18}O), 不会发生可逆反应, 这是 ^{18}O 标记法应用于定量蛋白质组学研究的必要条件。并且他们还提出了数据处理中 $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ 的计算方法。随后他们又证明除胰蛋白酶外, Glu-C、Lys-N、胰凝乳蛋白酶也适合于 ^{18}O 标记法, 并且可明显提高标记效率。同时对 ^{18}O 标记的原理也进行了阐述^[3,4], 他们认为这种方法定量的原理是: 蛋白质样品在发生胰蛋白酶酶解反应时, 水中的 O 原子会与肽段 C 末端的两个氧原子发生交换反应(图 1), 这样分别在 ^{16}O 和 ^{18}O 水中酶解得到的不同样品中对应肽段在分子量上会相差 4 Da, 而这种差异不会明显地影响肽段在液相中保留时间的差异, 因此在一级 MS 谱图中相应的标记和非标记肽段会一前一后的出现, 通过比较肽段峰强度或峰面积, 从而实现肽段的相对定量。

Stewart 等^[5]对 ^{18}O 标记法在蛋白质组学中应用

收稿日期: 2006-03-09 接受日期: 2006-07-24

国家自然科学基金资助项目 (No.20236040)

* 通讯作者。Tel: 86-22-27403888, E-mail: gezhiq@eyou.com

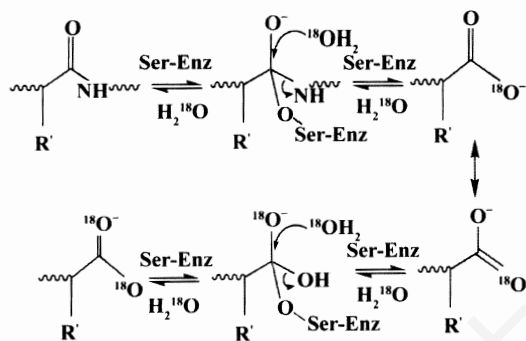


图1 在 Ser-Enz 催化下蛋白质水解反应中 ^{18}O 标记原理^[2]

Ser-Enz 即丝氨酸蛋白水解酶, 包括胰蛋白酶、Glu-C、Lys-C、胰凝乳蛋白酶等。蛋白质在丝氨酸蛋白水解酶的作用下发生水解反应时, H_2^{18}O 水中的 ^{18}O 原子与肽段 C 末端的两个氧原子发生交换反应。该反应为可逆反应。但是在高纯度的 ^{18}O 水中、优化的 pH 下或在特定的酶(如 Lys-N)作用等情况下, 该可逆反应朝结合两个 ^{18}O 原子方向进行。

的可行性做了进一步的确认, 证明标记后的肽段在正常的操作条件下很稳定, 即使在普通水中存放也不会发生可逆反应, 并且对标记过程中的具体步骤进行了完善。

Wang 等^[6]提出了一种反向标记策略(inverse labeling), 即两种相反的 ^{18}O 标记实验同时进行, 一组实验为待测蛋白质样品进行 ^{18}O 标记, 对照样品不标记; 另一组实验为对照样品进行 ^{18}O 标记, 待测样品不标记。这种策略可以检验定量的准确性, 尤其是对那些表达有显著差异的蛋白质的相对定量有验证作用。

2 不同定量蛋白质组学研究方法的比较

目前定量蛋白质组学研究方法很多, 但每种方法都或多或少存在不足。2DE-MALDI-TOF 是研究定量蛋白质组学的传统方法, 但实验重复性差, 不能研究某些疏水性蛋白质如膜蛋白质、等电点极酸或极碱的蛋白质以及分子量极大或极小的蛋白质; 分离效果不佳, 某些蛋白质点包含一种以上的蛋白质; 动态检测范围小, 自动化程度低, 费时费力。尽管双色荧光标记体系在 2DE 中的应用可以解决实验重复性差的问题, 但仍不能解决 2DE 最根本的问题, 因此应用于定量蛋白质组还是勉为其难。

体内稳定同位素标记法有一个显著优点是在样品制备的初期, 蛋白质就被标记上了, 从而减少了样品间由于实验操作造成的差异, 有利于提高定量的准确度。但是对血清等无法在培养基中培养的样

品来说, 这种方法是不适用的。

目前同位素编码亲和标签(isotope-coded affinity tagging, ICAT)是较为成熟的定量蛋白质组学研究方法。它的创新之处在于能够分离纯化含半胱氨酸残基的蛋白质, 从而能够减低蛋白质样品混合物的复杂程度。但是令人遗憾的是, ICAT 方法仅能分析含有半胱氨酸残基的蛋白质的局限性也成为它最大的缺陷。此外, 高昂的试剂费用和 MS 分析之前多步骤的前处理都影响了它的应用。

非标记定量法是最近才提出的应用于定量蛋白质组学研究的新方法。它的提出是因为稳定同位素标记法具有一些共同的缺点, 既试剂昂贵, 致使大规模的蛋白质组学实验无法进行; 此外, 稳定同位素标记法无法满足多样品同时比较的要求。的确, 在目前稳定同位素标记法不经济而且问题颇多时, 非标记定量法具有深入研究的价值, 但是由于目前质谱技术水平的限制, 非标记定量法的灵敏度和准确性都比不上标记定量法, 因为标记定量法将离子抑制效应、背景噪音和仪器条件等系统误差的影响降到了最小^[7]。所以非标记定量法要在定量蛋白质组学研究中得到广泛应用, 还有很漫长的路要走。

相比其他定量蛋白质组学研究方法, ^{18}O 标记法有许多优点:

(1) ^{18}O 标记法属于一种酶标记法, 相对于 ICAT 等化学标记来说, 它标记效率高。

(2)在普通水或者 ^{18}O 水中酶解是很普遍的, 可以标记所有酶解的肽段, 可用于很多不同类型的蛋白质研究(ICAT 局限于对含有半胱氨酸残基的蛋白质的研究), 从而使相对定量所有的蛋白质成为可能。

(3) ^{18}O 标记法不会改变肽段的物理性质, 从而不会有色谱峰的漂移等问题。第一代 ICAT 试剂包含了 8 个 $^1\text{H}/^2\text{H}$, $^1\text{H}/^2\text{H}$ 的同位素效应比较明显, 会导致同种蛋白质在标记后洗脱速度不同, 进而降低了检测的准确度。

(4)可以标记多种不同类型的样品, 如组织、细胞溶解物、血清、尿样等, 没有体内稳定同位素对样品类型的局限性。

(5) ^{18}O 标记法可以和特定蛋白质富集技术联用, 如用于富集含有半胱氨酸残基肽段的共价连接树脂技术^[8]。

(6)肽段在蛋白质水解分裂的同时, 在 C 端标记上了, 避免了人为的化学稳定同位素的标记, 也就避免了 ICAT 方法中标记的繁琐工作以及实验操作带

来的误差。

(7)有较高的准确性。 ^{18}O 标记法的定量准确性不比 ICAT 低^[9]，可以对 1.5 倍以上的蛋白质表达差异做出可信的定量^[10]，而非标记定量只能对 2.5 倍以上的蛋白质表达差异做出可信定量^[7]。

3 ^{18}O 标记法的技术进展及应用进展

提高定量的准确性是所有定量蛋白质组学研究方法都要考虑的问题， ^{18}O 标记法也不例外。在 ^{18}O 标记法中，标记效率的提高(保证分子量差异 4 Da)与标记效率的量化是 ^{18}O 标记法进行相对准确定量的必要条件。这是因为水中的 O 原子与肽段 C 末端的两个氧原子中的羟基 O 发生的交换反应是可逆的，很难保证 100% 的标记上两个 ^{18}O 原子。因此，不断的有研究者来摸索提高标记效率的方法以及其他提高定量准确性的方法。

Zhang 等^[11]采用牛血清白蛋白作为标准品来检验 ^{18}O 标记法标记时的各种条件，认为酶解后标记(蛋白质酶解成肽段后，干燥，再在普通水或者 ^{18}O 水溶解标记)标记效率明显高于酶解时标记(蛋白质在普通水或者 ^{18}O 水中酶解并标记)，并且优化了 ^{18}O 标记法的 pH 和反应时间，证明了在弱酸性条件下(pH=6.75) ^{18}O 标记效率要好于弱碱性条件(在之前的文献报道中， ^{18}O 标记都是在弱碱性条件下进行，因为胰蛋白酶在 pH=8.5 时有最大酶活)。酶解和标记的最佳反应条件不同，酶解后标记可以满足各自的最优化条件，从而提高酶解效率和标记效率，这种酶解后标记的方法已经运用开来了^[12,13]。Zhang 等用酶解后标记的方法研究微量的肿瘤细胞蛋白质样品(10 000 个细胞，约 1~4 μg 蛋白质)，鉴定出 76 个蛋白质并发现某些蛋白质有显著的变化。说明 ^{18}O 标记法灵敏度较高，可适用于微量蛋白质样品的研究。

Rao 等^[14,15]发现，用 Lys-N 酶解蛋白质，可以确定只结合了两个 ^{18}O 原子，大大提高了标记效率。并且，他们用 Lys-N 酶解 ^{18}O 标记法研究了内毒素诱导的人 ARPE-19 细胞的蛋白质组变化，不仅鉴定出了 584 种蛋白质，还完成了 562 种蛋白质的相对定量。表明 Lys-N 酶解的 ^{18}O 标记法在复杂蛋白质样品研究中有很大的运用价值。

鉴于目前质谱技术的水平，定量蛋白质组学研究中样品的复杂程度和定量的准确性是一对相互矛盾的问题，因为质谱在定量的同时需要花时间来鉴

定肽段^[16]。因此，有的科研工作者考虑通过降低样品的复杂程度和提高质谱的分辨率来提高定量结果的可信性。

一些研究者借助传统的 1DE 或者 2DE 方法对蛋白质样品进行预分离来降低样品复杂程度，之后在 ^{18}O 水中酶解标记，再联合 LC-MS/MS 对蛋白质进行鉴定和定量^[12,17]。Chen 等^[12]采用 2DE-MALDI-TOF 及胶内酶解 ^{18}O 标记法研究鼠脂肪细胞的分泌腺蛋白质组，此外他们还采用了固定化的胰蛋白酶，从而提高了胰蛋白酶的利用率，更重要的是避免了 $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ 的可逆反应，也就提高了标记效率。

Smith 等^[18]提出精确质量时间标签(accurate mass and time tags, AMTs) 两步策略。该方法的优势在于 LC-FTICR 分辨率很高，能够区分 $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 标记的肽段间 4 Da 的质量差异，减少肽段峰的交叠，从而使准确定量成为可能；在 AMTs 策略中，由于第二步不需要 MS/MS，扫描周期缩短，扫描次数增多，这样可以检测出更多的肽段，有利于高通量的肽段分析。Smith 课题组用该方法联合酶解后 ^{18}O 标记法研究了人乳腺上皮细胞^[8]，鉴定和定量了 603 个蛋白质；用以研究人血浆时^[13]，共有 429 个血浆蛋白质被鉴定和定量，体内药物作用后，血浆中有 25 个蛋白质丰度水平有显著变化。此外，他们还发现标记后的肽段样品煮沸 10 min，马上置于冰上，可以使蛋白酶失活，从而阻止 $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ 可逆反应的发生。

4 小结

总的来说， ^{18}O 标记法是一种较为理想、容易实现的定量蛋白质组学研究方法。但是由于目前质谱技术水平的限制， ^{18}O 标记法在定量蛋白质组学的应用中，最大的问题还在于标记后的蛋白质样品过于复杂。 ^{18}O 标记法与其他方法，如与 1DE 或者 2DE 方法，AMTs 策略等联用，可以解决这一问题。因此，我们完全有理由相信在未来定量蛋白质组学研究的热潮中， ^{18}O 标记法将会扮演十分重要的角色。

参考文献 (References)

- [1] Yan W et al. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2005, 4: 27
- [2] Yao X et al. *Anal Chem*, 2001, 73: 2836
- [3] Reynolds KJ et al. *J Proteome Res*, 2002, 1: 27
- [4] Yao X et al. *J Proteome Res*, 2003, 2: 147
- [5] Stewart II et al. *Rapid Comm Mass Spectrom*, 2001, 15: 2456
- [6] Wang YK et al. *Anal Chem*, 2001, 73: 3742

- [7] Old WM *et al. Mol Cell Proteomics*, 2005, **4**: 1487
[8] Liu T *et al. Anal Chem*, 2004, **76**: 5345
[9] Sakai J *et al. Proteomics*, 2005, **5**: 16
[10] Hicks WA *et al. J Am Soc Mass Spectrom*, 2005, **16**: 916
[11] Zang L *et al. J Proteome Res*, 2004, **3**: 604
[12] Chen X *et al. J Proteome Res*, 2005, **4**: 570
[13] Qian WJ *et al. Mol Cell Proteomics*, 2005, **4**: 700
[14] Rao KC *et al. J Proteome Res*, 2005, **4**: 507
[15] Rao KC *et al. Mol Cell Proteomics*, 2005, **4**: 1550
[16] MacCoss MJ *et al. Anal Chem*, 2005, **77**: 294A
[17] Korbel S *et al. Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, **19**: 2259
[18] Smith RD *et al. Proteomics*, 2002, **2**: 513

^{18}O Labeling and Its Application in Quantitative Proteomics

Ying Tan, Yu-Xia Wang, Jing Li, Zhi-Qiang Ge*

(Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology,
Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract Quantitative analysis of global protein levels, termed 'quantitative proteomics', is important for the system-based understanding of the molecular function of each protein component and is expected to provide insights into molecular mechanisms of various biological processes and systems. Recently the mass spectrometry based quantitative strategies in proteomics research are developing rapidly. ^{18}O labeling quantitative method is one of the relatively practical and feasible methods, which has been widely used in recent years. The characteristics of ^{18}O labeling and its development in quantitative proteomics will be reviewed in this article.

Key words quantitative proteomics; ^{18}O labeling

Received: March 9, 2006 Accepted: July 24, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.20236040)

*Corresponding author. Tel: 86-22-27403888, E-mail: gezhiq@eyou.com

中华医学会生殖医学分会和中国动物学会生殖生物学分会

2007(联合)年会征文通知

由中华医学会生殖医学分会和中国动物学会生殖生物学分会联合主办的 2007(联合)年会, 定于 2007 年 4 月在浙江省杭州市召开。此次会议由浙江大学主办, 复旦大学、南京医科大学、上海交通大学协办。现将会议征文通知如下: (1) 征文内容包括生殖生物学基础研究; 男性生殖医学的基础和临床研究; 女性生殖医学的基础和临床研究; 男、女性生殖内分泌学; 生殖医学的伦理和心理; 生殖医学的法规和政策管理等。(2) 征文要求: 论文全文(限 4 000 字以内)及 800 字以内论文摘要, 论文题目要求中英文。具体可登陆会议网站(www.csrmeeting.org)注册后通过“网上征文”项录入。(3) 截止日期: 2006 年 12 月 31 日。(4) 参加会议者可授予国家继续教育 I 类学分。(5) 会务秘书处联系方式: 地址: 浙江省杭州市学士路 2 号浙江大学医学院附属妇产科医院, 邮政编码: 310006。联系人: 张艳玲。电话: 0571-87061501-1812。传真: 0571-87061878。E-mail: ylzn@zju.edu.cn。