

· 药学前沿 ·

基于生物质谱的蛋白质定量技术及其在药代动力学研究中的应用

吴梦秋, 陆高远, 邵 畅, 王单单, 孙 迪, 郝海平, 王广基*, 叶 慧**

(中国药科大学药物代谢动力学重点实验室, 南京 210009)

摘 要 蛋白质定量技术是指对细胞、组织以至整体生物体内的蛋白质表达水平进行全谱定量分析的手段, 其在生物过程机制的探索、生物标志物和药物作用靶标的发现及验证等过程中发挥着重要作用。新兴生物质谱技术和数据采集方法的发展为蛋白质定量提供了先进的技术平台, 促使了蛋白质研究逐渐从简单定性转变为精确定量。本文综述了基于生物质谱的蛋白分子定量策略及方法, 评述了不同方法的特点和适用范围, 并阐述了其在药物代谢动力学研究领域, 如药物转运体、药物代谢酶的定量和多肽及蛋白类药物的药代动力学研究等方面的应用, 为传统的药代动力学研究提供了新的思路与方法。

关键词 生物质谱; 蛋白质定量技术; 药物转运体; 代谢酶; 蛋白与多肽类药物

中图分类号 Q51 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)02-0129-12

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150201

Mass spectrometry-based protein quantification and its application in pharmacokinetic research

WU Mengqiu, LU Gaoyuan, SHAO Chang, WANG Dandan, SUN Di, HAO Haiping, WANG Guangji*, YE Hui**

Key Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Quantitative proteomics is a mass spectrometry-based toolkit used to analyze and quantify entire proteins contained in whole cells, tissues or organisms. It has become an increasingly important element in exploring the mechanism of various biological processes such as discovering novel biomarkers and unknown drug targets. Emerging advances in biological mass spectrometry instrumentation and data acquisition methodologies have provided a state-of-the-art platform for protein quantification, prompting the research of proteomics evolving from the simple qualitative to the accurate quantitative approach. This review aims to introduce the most recent advancements in mass spectrometry instrumentation and methodologies of data acquisition, focusing on their characteristics and applying fields. It also highlights several significant applications of biological mass spectrometry in pharmaceutical research such as quantification of drug transporters and metabolizing enzymes, and pharmacokinetic study of therapeutic peptides and proteins.

Key words biological mass spectrometry; protein quantification; drug transporters; metabolizing enzymes; therapeutic peptides and proteins

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81403005 and 81273589); and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20140667)

相对于基因和信使 RNA, 蛋白质是在生物体细胞内直接发挥作用的生物大分子。其分布、表达

水平、翻译后修饰和蛋白-蛋白相互作用直接调控着生物体的各种生理病理现象。近年来, 基于生物

收稿日期 2015-03-05 通信作者 * Tel:025-83271128 E-mail: guangjiwang@hotmail.com

** Tel:025-83271192 E-mail: cpuyehui@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 81403005, No. 81273589); 江苏省自然科学基金资助项目 (No. BK20140667)

质谱技术的蛋白定量研究,通过精确测定在不同状态下生物体内的蛋白质表达及其翻译后修饰水平,在探索蛋白质生物功能、发现疾病生物标志物、寻找药物作用靶标、揭示药物作用机制等研究中发挥了重要作用。纵观蛋白研究领域,生物质谱的飞速进步是蛋白定量技术得以发展的核心。因此,本文将基于高分辨质谱仪的发展及生物质谱的定量采集方法这两个方面介绍新兴的蛋白定量技术,并介绍其在药学,尤其是药代动力学领域的最新应用。这既是对新兴蛋白定量技术应用范围的拓展,更为传统的药学研究提供了新的方法和思路。

1 新兴蛋白定量技术概述

1.1 生物质谱的发展

20 世纪 80 年代末发展的质谱软电离方式即电喷雾电离 (electrospray ionization, ESI) 和基质辅助激光解析离子化 (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) 开拓了质谱应用的崭新领域——生物质谱。这两种技术的高灵敏度和宽泛的质量检测范围解决了蛋白质和多肽等大分子的离子化和检测问题,使得蛋白质分子的定性和定量成为可能^[1]。ESI 源通过高压电场作用于样品喷雾,使得分析物从溶液中雾化并电离;而 MALDI 则能够使待测物从干燥的基质中气化并带电,基质可以保护待测物免受破坏。由于 ESI 源可与液相色谱分离的洗脱物在线连接,因此在蛋白质定量研究中运用更为广泛;而 MALDI-MS 在质谱原位成像技术方面应用较多,其灵敏度高、特异性强,是一种从组织样品中进行原位蛋白鉴定、定位和定量的有力工具^[2]。如本课题组 Ye 等^[3]结合基质辅助激光解析电离质谱成像技术 (MALDI-MS) 与自上而下全蛋白质谱表征技术 (top-down MS) 揭示了地草西平造模的神经发育障碍大鼠脑蛋白中的生物标志物,确认了神经发育障碍致病机制中起调控作用的信号通路,为治愈此类疾病提供了新的线索与可能。

质量分析器是质谱中除电离源外的另一核心组成部分,是决定质谱仪的灵敏度、分辨率和质量准确度的重要部件。目前用于蛋白质组学研究的质谱分析器主要有 5 类,即离子阱质量分析器 (ion trap, IT)、四级杆 (quadrupole, Q)、飞行时间分析器 (time-of-flight, TOF)、傅里叶变换离子回旋共振

(fourier transform ion cyclotron resonance, FTICR) 和轨道阱质谱分析仪 (Orbitrap)。

以上质量分析器的性能不尽相同,各自有其优缺点。现阶段在蛋白的质谱定量工作中使用的质谱仪通常使用多级质谱串联方式,以充分发挥不同质量分析器的优点,弥补单独使用时的不足。例如, MALDI 与两级 TOF 相连构成的 MALDI-TOF/TOF 是一种新型的质谱仪。MALDI-TOF/TOF 首先通过第一级 TOF 获得肽段的精确分子质量,同时选择部分离子在碰撞池中裂解,再由第二级 TOF 扫描碎片离子质量。其扫描速度快、灵敏度和质量准确度高,适宜于对蛋白进行鉴定和相对定量。代表性研究如 Melvin 等^[4]运用 MALDI-TOF/TOF 对肠球菌膜表面的 13 种多肽和蛋白进行了鉴定和原位成像; Hanrieder 等^[5]基于 MALDI-TOF/TOF 成像平台发现 L-多巴胺导致的大鼠运动障碍模型伴随着脑纹状体局部强啡肽的上调; Elsner 等^[6]运用 MALDI-TOF/TOF 成像技术揭示了 COX7A2, TAGLN2, S100-A100 3 种蛋白为 Barrett's 腺癌的预诊标记物。

Q-TOF 是采用四极杆质量分析器和 TOF 串联的质谱仪,它采用四极杆为质量过滤器,以 TOF 为质量分析器,分辨率和质量精密度明显优于三重四极杆质谱。Q-TOF 能在宽质量范围内实现高分辨并具有高灵敏度的 MS/MS 功能,同时完成母离子和子离子的精确测定。Q-TOF 可以与 ESI 源连接,也可以和 MALDI 离子源连接。Q-TOF 广泛应用于生物样品的测定中,如 Kang 等^[7]基于 HPLC-Q-TOF 建立了支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中脂质组的测定方法,揭示了血脂水平与哮喘的关系; Pom-pach 等^[8]利用亲水色谱与反相色谱结合的二维分离耦合 Q-TOF 质谱仪,对肝脏疾病触珠蛋白的糖型进行鉴定,并发现肝癌组织中特定糖型 Lewis Y 的升高。

FT-ICR 是一类捕捉式质谱仪,在高真空和强磁场中俘获离子,可以提供超高的准确度 (1~2) 和分辨率 (500 000 FWHM 以上) 的信号,且测定分子量范围宽,可以直接获得相对分子质量高达 45 000 的蛋白的相对分子质量的准确信息,因此 FT-ICR 的产生促使了“Top-down”蛋白质鉴定策略的产生。这一方法颠覆了经典的“Bottom-up”蛋白质鉴定策略。不同于“Bottom-up”法从局部肽段分

析而逐步鉴定整体蛋白,Top-down 技术针对完整蛋白分子进行表征,有利于不同翻译后修饰和亚型的甄别^[9]。但 FT-ICR 存在扫描速度缓慢的局限性,无法用于大规模的蛋白质组学研究。相比于 FT-ICR, Linear quadrupole ion trap/FT-ICR (LTQ-FT) 混合型质谱将线性离子阱质谱与傅里叶变换回旋共振质谱巧妙地结合,实现了高扫描速度、高灵敏度、高准确度及高分辨率质谱的集成。例如 Bildl 等^[10]利用 LTQ-FT/Orbitrap 扩大了非标记法的线性范围(0.1 ~ 1 000 fmol),这在亲和纯化法研究低丰度的蛋白-蛋白相互作用中具有重要意义。

Orbitrap 静电场轨道阱是近年来新兴的一种高分辨率质量分析器。它利用离子在特定静电场中运动频率的不同对阱内离子进行质量分析。2005 年, Thermo Fisher Scientific 公司首次实现了对轨道阱质量分析器的商品化,随后经技术改革与创新,推出了多款基于轨道阱技术的新型质谱仪器。例如, LTQ Orbitrap XL、LTQ Orbitrap Velos、LTQ Orbitrap Elite 将线性离子阱与轨道阱联用,充分利用 LTQ 线性离子阱的离子分离、裂解功能,并通过 Orbitrap 进行高分辨率、高质量准确度的分析;Q Exactive 质谱仪实现了四极杆与轨道阱检测技术的结合;Orbitrap Fusion 质谱仪创新性的结合了四极杆、Orbitrap 和离子阱质谱仪的优点,能够从丰度极低、复杂性极高,或者极难分析的样品中对待测物进行准确定量和透彻的结构分析。此外, Thermo Fisher Scientific 公司还推出了除了碰撞诱导解离技术(collision-induced dissociation, CID)以外的高能碰撞诱导解离(higher-energy C-trap dissociation, HCD)以及电子转移解离(electron transfer dissociation, ETD)裂解技术,可应用于复杂体系目标物的分析。鉴于以上优势,Orbitrap 被广泛应用于生物学研究中,如 Heo 等^[11]利用 LTQ Orbitrap Velos Pro 分析了丰度低、溶解度低的海马跨膜蛋白,大大提高了膜蛋白的鉴定效率。Majovsky 等^[12]基于 LTQ-Orbitrap 进行的靶向蛋白质组学研究揭示了植物信号传导过程中的一些蛋白质的降解现象,是定量蛋白质组学用于植物生理学研究的良好范例。

1.2 生物质谱数据采集方法

信息依赖扫描(Information-dependent acquisition, IDA)是生物质谱定性分析中最常见的数据采

集方法。IDA 数据采集方式通过合理配置质谱扫描模式和参数,高通量地获得生物样品中待测物的一级质荷比、二级碎片及色谱保留时间等多维信息。具体说来,IDA 通过预先定义触发子离子扫描的条件,如分子离子峰的强度、质量数、色谱保留时间等,对符合条件的分子离子峰触发子离子扫描。条件设置可降低基质的干扰,然而当样品复杂或 IDA 设置不合理时,一些重要化合物的子离子扫描不会被触发。

不同于 IDA,多重反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)是针对靶标分子的一种质谱分析技术。该技术采用三重四级杆质谱仪,在一级扫描下根据质荷比选择特定的母离子,再使发生碰撞解离后,在二级扫描中分析预先选定的、特异性碎片离子。MRM 模式的双重质量筛选降低了质谱信号的噪声干扰,从而获取较灵敏和高重现性的定性和定量信息,在目标蛋白质的定量研究中得到了广泛应用并具有较强的发展潜力。如 Wang 等^[13]利用 MRM 技术对人 20 号染色体控制表达的蛋白质在肿瘤组织及相应的细胞系中的表达进行定性和定量分析,并考察了基因转录水平与表达水平的相符性。

SWATH (sequential window acquisition of all theoretical fragment-ion spectra) 技术是近年来出现的介于 IDA 和 MRM 之间的非数据依赖采集方法(data-independent acquisition, DIA)。它依靠连续运行 N 个固定宽度的母离子分离窗口,通过提高碰撞能量使每个窗口内的母离子都发生断裂,再依赖碎片离子谱图库检索,挖掘共碎裂多肽的二级谱中特定多肽产生的特征碎片,进而同时完成对多肽的定性和定量分析^[14]。SWATH 技术的最大优势在于能在一次运行中同时实现蛋白样品的定性和定量,相比传统的 IDA 和 MRM 模式具有更高的分析通量。Liu 等^[15]对比了 SWATH-MS 和 IDA 技术在人血清中 N-糖蛋白进行定量测定中的应用,结果证明与 IDA 方法相比,SWATH 方法定量下限不及 IDA,但测定的蛋白种类大大增加。

1.3 蛋白质的相对定量技术

1.3.1 标记定量技术 稳定同位素标记技术,如¹³C、¹⁵N、²H 等同位素,常应用于蛋白质的标记定量中。含同位素的多肽或蛋白分子的离子化效率和质谱碎裂方式基本相同,只在离子的分子质量上存在差别。因此,在蛋白质的酶解肽段上引入稳定

同位素标记,通过在同一次分析中比较带有不同分子量的同位素所标记的肽段离子的质谱峰强度,以此实现精确的相对定量。标记定量技术的方法繁多,但依据同位素引入方法的不同,可大致分为以下3类:代谢标记法、酶促标记法和化学标记法。

代谢标记法 代谢标记法是通过将含同位素的或同位素元素标记的氨基酸掺入到细胞培养基或动物饲料中,使得细胞和动物在生长代谢过程中完成同位素的掺入,例如最常用的方法 SILAC 法(stable isotope labeling in cell culture)。SILAC 方法是用含稳定同位素标记的必需氨基酸的培养基进行细胞培养,如赖氨酸(K)和精氨酸(R),产生同位素标记的蛋白,因而可在胰蛋白酶解后由含K和R的轻重肽段间的峰高比例计算出轻重标记的细胞中所含蛋白的相对丰度^[16]。目前,SILAC 技术已成功应用于果蝇^[17]、斑马鱼^[18-19]和小鼠^[20-21]的定量蛋白质组学研究中。

近年来发展的培养基衍生同位素标签(culture-derived isotope tags, CDITs)^[22]、同位素标记蛋白质组(stable isotope labeled proteome, SILAP)^[23]和超级 SILAC(Super-SILAC)^[24]等方法将 SILAC 标记的细胞样品作为内标,混合入组织样本,从而实现对组织样本中蛋白质进行全谱定量,拓展了 SILAC 法在组织和临床样本中的应用。如 Mangrum 等^[25]将 SILAC 标记的 HepG2 细胞分泌蛋白与人类血浆以总蛋白量混合,使用 nanoLC 串联 Q-Exactive Orbitrap 质谱系统发现了 60 余种共有的血浆蛋白,其中包括白蛋白、载脂蛋白、凝血因子和转运蛋白等,这一研究拓展了 SILAC 法在临床血液样本中生物标记物测定中的应用。另外,通过给予一定时间的含稳定同位素标记氨基酸的培养基还可以用来研究蛋白的合成和降解速率,这一方法称为 pulsed SILAC 法^[26]。如 Nolte 等^[19]运用 pulsed SILAC 法,通过检测¹³C₆-lysine 的掺入研究斑马鱼鳍损伤修复过程中发挥重要作用的蛋白。同样的方法也可以运用于药物作用后的动物,以研究药物作用机制。

代谢标记法的优点是其同位素的掺入发生在样品处理最早阶段,因此可以最大程度的减小标记过程伴随的定量误差。然而代谢标记法仍存在其不足,如耗时长,价格昂贵以及培养过程中稳定同位素标记的精氨酸会向脯氨酸转化等^[27]。因而在

样品处理后期进行稳定同位素标记的方法,如化学标记法和酶促标记法等成为必需。

酶促标记法 目前酶促标记法主要指的是¹⁸O 标记法。在蛋白酶如胰蛋白酶(trypsin)、胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)、多肽内切酶(Lys-C)和 Glu 蛋白酶(Glu-C)的酶解过程中,使用 H₂¹⁸O 可将 C 端的两个¹⁶O 置换为¹⁸O,产生 4 D 的质量位移,其原理如图 1(A)所示^[28]。¹⁸O 标记相比较于其他标记定量技术法其优势在于其操作简单,标记效率高,适用范围广,成本较低^[29-30]。

¹⁸O 标记法经常用于糖蛋白的相对定量分析和糖肽位点的确认,如 Yen 等^[31]基于 Q Exactive MS 平台对乳腺癌细胞糖蛋白质组学进行分析,共鉴定得到 200~300 个糖蛋白,并运用¹⁸O 标记法确定了蛋白糖肽位点。Zhang 等^[32]将¹⁸O 与 SPITC 方法(4-sulphophenyl isothiocyanate)结合,建立了同步定性和定量蛋白质的方法。该方法在蜘蛛毒素中的研究证实了其可靠性。将¹⁸O 与二甲基化标记组合,与等重标记原理相类似,可以实现细胞、组织和血清内蛋白质组的高精确度的相对定量分析^[33]。

鉴于普通酶解反应效率和酶解程度受限,不适于高度复杂生物样本的分析,近年来固定化酶反应器逐渐被用于酶解标记。固定化的酶解反应可以降低标记过程中回交发生的概率,缩短标记时间,适宜于高度复杂样品的高通量分析^[30]。如 Bezstarosti 等^[34]使用两步法实现了对小鼠红白血病细胞核内的 CDK9(cyclin dependent kinase 9)进行酶解和标记,大大提高了标记效率,缩短了反应时间;Qin 等^[35]将胰酶固定在有纤维状聚合物链的磁珠上,高效酶解的同时完成¹⁸O 标记,文章还结合 MRM 方法实现了高温厌氧杆菌中烯醇酶的绝对定量。

化学标记法 除了酶促标记法以外,化学标记法也是一种常用的体外引入同位素的标记技术,根据引入的同位素标签是否有质量差异,我们将化学标记法分为质量差异标记技术和等质量标记技术。前者通过比较轻重标记的样品在一级质谱的峰强度实现目的蛋白的相对定量分析;后者则依据样品的特征性二级碎片离子的峰强度实现蛋白的相对定量分析。其中,代表性的质量差异标记技术有同位素亲和标签法和二甲基化标记法。同位素亲和标签法(isotope coded affinity tags, ICAT)由 Gygi

等^[36]在 1999 年开发,是目前较常见的化学衍生标记试剂。如图 1(B)所示,ICAT 试剂主要由 3 部分构成:活性基团,用来特异性结合半胱氨酸的巯基;连接基团,由聚醚结构组成,用来整合稳定的同位素;(3)亲和标签,用于对 ICAT 标记的多肽进行提纯。ICAT 方法首先将不同状态的细胞裂解,分别加入轻标或重标的 ICAT 试剂,2 种标记试剂的相对分子质量相差 8 D;再将反应后标记有不同 ICAT 试剂的样品等比例混合,进行酶解及后续的 LC-MS 分析,即可实现对不同状态下细胞内特定蛋白的相对定量。但由于 ICAT 标记法只能标记含半胱氨酸的蛋白,大大限制了其应用范围;另外,由于生物素标签分子较大,增加了二级质谱图和肽段鉴定的复杂性;同时,有报道轻、重标的肽段在反相色谱中保留时间不同。针对以上缺点,可剪切、共洗脱标签的应用使得这一方法得到改进^[37-38]。

与 ICAT 相比更为简便、费用低廉的质量差异标记技术为二甲基化标记法。Hsu 等^[39]发展的甲基化标记是利用甲醛和氰基硼氢化钠组合标记肽段的所有活性氨基。不同于 ICAT 法,蛋白需先经过酶解再进行二甲基化标记反应,如图 1(C)。该方法优势在于反应条件温和、快速、无明显副反应、

价格低廉。随后 Boersema 等^[40]建立了 3 种二甲基化标记的标准流程,包括溶液中进行标记、使用预柱进行在线标记和固相萃取柱标记。溶液中标记适宜对微克到毫克的蛋白进行标记,因为可以平行操作,因此在样品数量较多时尤为重要;在线二甲基化标记方法适用于微量(远低于 1 μg)的蛋白定量,样品在预柱上得到纯化、在线标记后直接进行 LC-MS 的分析,大大减少了样品的损失;固相萃取柱标记法则适用于大量蛋白(毫克级别)的标记^[41]。二甲基化标记蛋白定量方法已被用于各种各样的研究中。如 Boersema 等^[42]将磷酸化肽段的免疫亲和吸附与二甲基化标记蛋白定量方法相结合,运用于表皮生长因子 EGF 刺激下 HeLa 细胞内酪氨酸磷酸化位点研究中,提示这种靶向的定量磷酸化蛋白质组学可用于进行信号通路的研究;Sun 等^[43]利用酰肼磁珠富集糖肽再用二甲基化试剂进行标记,实现了糖肽的相对定量,并成功将其应用于正常血清和肿瘤患者血清的糖蛋白组学研究中,与常规的溶液标记法相比,这一反应准确度、灵敏度和回收率更高;Hubner 等^[44]还将这一技术用于研究 DNA-蛋白相互作用中,开拓了质谱定量技术的应用范围。

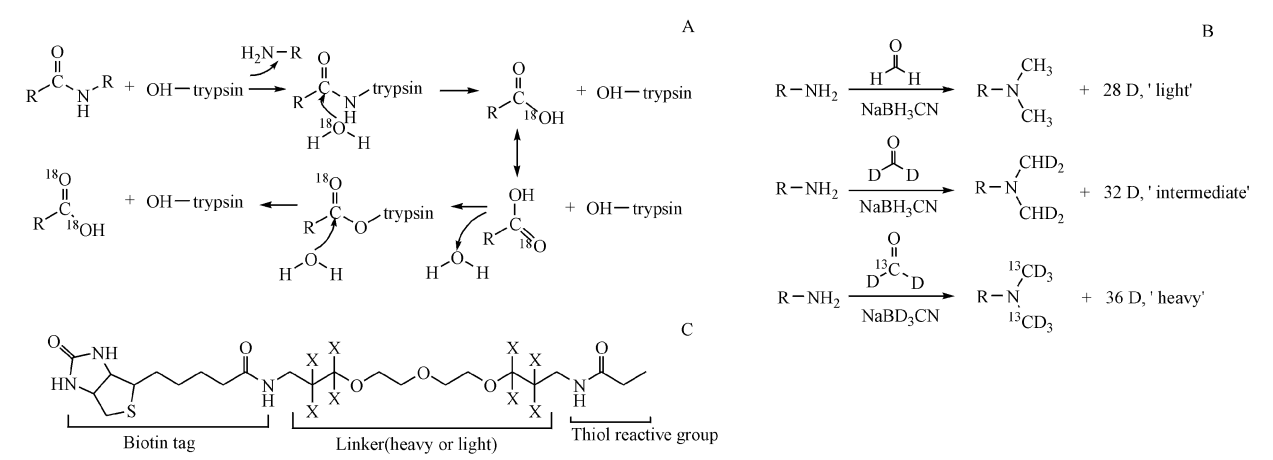


Figure 1 Structure and principle of ¹⁸O labeling, ICAT and dimethyl labeling. (A) Principle of trypsin catalyzed ¹⁸O labeling. Incorporation of two ¹⁸O labels at the C terminus of a tryptic peptide takes place in a two-step reaction. (B) Structure of isotope coded affinity tags (ICAT) reagent. (C) Labeling schemes of triplex stable isotope dimethyl labeling. R:remainder of the peptide

等质量标记法中,最具代表性的是 TMT(tandem mass tag)和 iTRAQ(isobaric tag for relative and absolute quantitation)两种标记方法。这两种标记试剂都可分为 3 部分:反应基团、平衡基团和报告基团。其中,反应基团质量相等,虽然报告基团和

平衡基团质量数不同,但两者组合使得质量数之和相等,如图 2。反应基团的功能是将 TMT 或 iTRAQ 标签和酶解肽段的 N 端和赖氨酸的侧链相连,因此在一级质谱中,母离子发生碎裂后,可产生不同的子离子峰,并依据相应的报告基团的质谱峰的相

对强度计算出肽段的相对浓度。目前开发的 TMT 试剂最多可以实现同时对 6 个样品中蛋白进行相对定量分析, iTRAQ 试剂最多可以同时分析 8 个样品, 大大提高了工作效率, 为蛋白质高通量定量提供了有利的研究工具。但是, 等质量标记法也存在一定缺陷, 如对低质量范围的信号存在抑制效应, 因此这一方法难以对低丰度蛋白进行精确定量。另外, iTRAQ 和 TMT 试剂盒价格昂贵, 使用受到限制。因此近年来科研工作者开发出了一些新型的廉价易得的等质量标记试剂, 如基于生物素亲和标签的可断裂等重同位素标记试剂 CILAT (cleavable isobaric labeled affinity tag)^[45], 采用 ^2H 原子代替价格昂贵的 ^{13}C 或 ^{15}N 原子进行标记的 DiART 试剂 (deuterium isobaric amine reactive tag)^[46-47], 和基于点击化学发展的等重同位素标记试剂 CITs 试剂 (caltech isobaric tags)^[48]。

李灵军课题组^[49]于 2010 年开发了合成步骤简单、低成本的 DiLeu 试剂 (*N,N*-dimethyl leucine)。与经典的等质量标记试剂相比, 该试剂同样分为 3 部分: 报告基团、平衡基团和反应基团 (三嗪酯), 具体结构如图 2 (C) 中所示。DiLeu 标记反应发生后, 被标肽段的分子质量增加 145.1 D, 而在二级质谱中可产生 4 种不同质核比的报告离子 (m/z 115.1、116.1、117.1 和 118.1)。DiLeu 合成所需要的试剂廉价易得, 合成步骤简单, 如 117, 118 标记只需要一步即可合成, 而 115, 116 只需要两步反应, 大大增加了合成反应的产率, 因此相比 iTRAQ 试剂, 费用大大降低。比较 DiLeu 试剂与 iTRAQ 试剂, 结果显示在对蛋白质的酶解样品进行标记定量时, 两种试剂标记的蛋白质序列覆盖度 (约 43%) 相似, 定量准确性相似 (差别小于 15%), 而 DiLeu 能够增强碎裂, 增加了蛋白质和多肽定性和定量分析的可信度。近期, 通过引入 ^{13}C , ^{15}N , ^2H 3 种同位素元素, DiLeu 试剂可基于高分辨质谱 Orbitrap 平台同时对 12 组样品进行相对定量, 展示了 DiLeu 试剂更大的应用空间^[50]。

1.3.2 非标记定量技术 上述的同位素标记技术通常能够提供更为准确的组间蛋白差异, 但其样品准备较为复杂, 试剂费用较为昂贵; 一些临床来源的样本, 难以在早期进行同位素的掺入标记; 另外, 可利用的同位素种类限制了可同时比对的组别数, 制约了其在高通量定量范围的应用。非标记法则

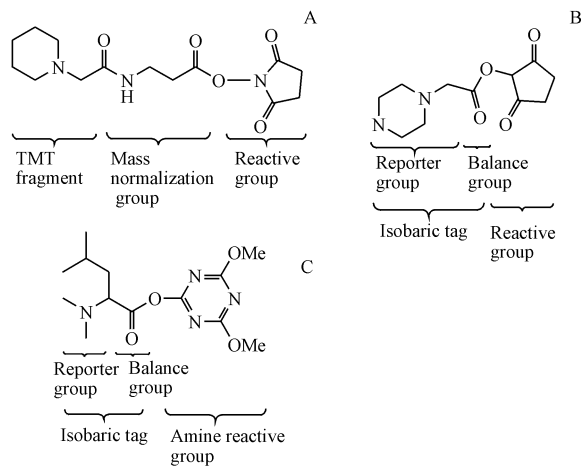


Figure 2 Structures of TMT (A), iTRAQ (B) and DiLeu (C)

不受以上因素的影响。得益于近年来高分辨质谱逐步提升的精确度和重复性, 非标记法在定量蛋白组学研究中得到越来越广泛的应用。常用的非标记定量技术方法主要有两种: 肽段计数法 (spectra counting, SC) 和峰面积法。

SC 法最早于 2004 年由 Liu 等^[51]提出, 肽段的 MS/MS 碎裂次数与肽段的丰度成正比, 因此可以通过计算特定蛋白的肽段碎裂数来进行定量。这一方法直观、快速, 适用于低、中分辨率质谱数据的分析^[52], 如 Zybailov 等^[53]研究发现在线性四极杆质谱仪中, SC 方法的重复性和检测范围优于 XIC 法。但是 SC 法的适用性受肽段本身性质如离子化或碎裂的难易程度等因素影响较大, 不适用于分析低丰度的或难检测的肽段。据此 Colinge 等^[54]将蛋白分为 I 型和 II 型, 其中 II 型蛋白的 SC 数与蛋白丰度线性更好。另外还存在同源肽段的检测干扰, 针对这一问题 Zhang 等^[55]提出了 NSAF 法 (normalized spectral abundance factor), 即依据不同蛋白所检测到的特异肽段数分配同源肽段, 此方法增加了定量的准确性和可重复性; Sardu 等^[56]提出了基于 SC 方法的 SI_N 法 (normalized spectral index), 该方法将肽段数、质谱碎片数和碎片离子强度综合起来, 这就考虑了蛋白长度和特异性肽段数, 此方法较其他方法准确性大大提高。

AUC 法是利用 IDA (information dependent acquisition) 数据中的二级图谱对多肽进行定性, 用一级图谱中多肽对应的峰面积进行定量, 来分析不同来源样品蛋白数量的变化。使用这一计算方法应注意以下几点: 优化色谱分离条件, 保证组间肽

段的可重现性;选用于高分辨质谱仪进行数据采集,如 FT-ICR、新型 TOF 质谱仪和 Orbitrap 质谱仪以保证较高的信噪比^[57];通过设置质谱信号采集模式,实现高 CE 值和低 CE 值的快速切换,以实现同时监测分子离子信号和碎片离子信号,这一方法称作 LC-MS^E^[58]。相比较于 IDA 分析,LC-MS^E 法更适用于低丰度蛋白的检测,如 Blackburn 等^[59]利用此方法对芹菜分泌的抗病毒蛋白甘露醇脱氢酶进行定量分析。

1.4 蛋白质的绝对定量技术

目前蛋白质组学的绝对定量方法主要有基于内标法的蛋白质组学定量方法和基于质谱数据统计分析的非标记法。非标记法主要是基于 SC 法发展的定量模型,对于不同蛋白其模型不同,因而

普适性不高。

基于内标法的绝对定量基本策略是:将待测蛋白与已知量的内标混合,结合 MRM 或 MS1 比较质谱信号强度,即可实现复杂生物样本中待测蛋白的定量。蛋白质绝对定量的内标有 3 种:AQUA、定量肽段串联体(quantification concatamers, QconCAT 和 peptide-concatenated standard, PCS)和稳定同位素标记的蛋白(protein standards for absolute quantification, PSAQ)。依据其各自的特性,不同类型的内标各有其优点和缺点,且是在样品处理的不同阶段加入样品中的。内标的选择主要依据对准确度要求的不同,待测蛋白的多少以及是否需要翻译后修饰蛋白进行定量,如表 1 所示。

Table 1 Summary of different IS for absolute quantification of protein abundance with mass spectrometry

| Standard types | Measured values | Spiking time point | Accuracy | Coverage | Applicability to post-translational modification |
|--------------------|-------------------|-------------------------------|----------|----------|--|
| Synthetic peptide | Ratio to standard | Before or after digestion | Low | Low | Applicable |
| Intact protein | Ratio to standard | Just after protein extraction | High | Low | Not |
| Peptide concatemer | Ratio to standard | Prior to digestion | Medium | High | Not |

其中以绝对定量肽段(absolute quantification, AQUA)法最为常用。该方法是以待测蛋白酶解后产生的相对分子量适中,质谱信号强的肽段为模板,用化学合成或细胞培养的方法合成带有稳定同位素标记的相同肽段作为内标,这个内标肽段即为 AQUA。将已知量的 AQUA 作为内标加入酶解后的样品中,结合 MRM 或 MS1 比较质谱信号强度,即可实现复杂生物样本中目标肽段的定量。Brun 等^[60]分别以定量肽段或整体蛋白为内标对金黄色链球菌进行绝对定量,结果发现以定量肽段为内标的定量结果比以整体蛋白为内标所得结果低,这是待测蛋白在分离纯化和酶解过程中的损失导致的。总结以上经验,应用 AQUA 法进行绝对定量的前提条件有:待测蛋白需经充分的酶解;模板肽段应特异性强,且与蛋白质之间存在一定的定量关系。

肽段串联体内标,如 QconCAT 是利用重组 DNA 技术将多种目标蛋白的目标肽段串联构建成新的蛋白质,并将对应的质粒转入到细菌中,在含有同位素的培养液中培养,经纯化即可得到同位素标记的 QconCAT 蛋白^[61]。QconCAT 在酶解前加入待测样本中,经酶解产生等摩尔数的不同定量肽段,从而实现多种蛋白同时定量,避免了加入多种

内标的复杂性和不准确性,但是其定量的准确性仍然受到待测蛋白预处理过程的影响。PSAQ 则是将同位素标记的目标蛋白质全序列作为内标,通常也是借助于细菌代谢进行合成,PSAQ 法特别适合于低丰度蛋白的定量,如 Adrait 等^[62]运用 PSAQ 法,结合 SRM 对败血病患者血清中肠毒素 A 进行了准确定量;同时由于 PSAQ 与待测蛋白相同,因此可观测肽段较多,特别适合于蛋白亚型的鉴定和准确定量;另外,PSAQ 还适用于翻译后修饰蛋白的定量,如 Kaiser 等^[63]运用的 PSAQ 法对细胞内泛素化池进行绝对定量。

2 蛋白定量技术在药代动力学领域中的应用

由于蛋白定量技术是一门较年轻的研究技术,其在药代动力学领域中的运用还处于起步阶段。目前其应用主要集中在对传统小分子药物的代谢、处置等动力学过程中关键酶的定性、定量研究和对新兴的多肽、蛋白类大分子药物的药代动力学行为的研究和探索。

2.1 药物转运体和药物代谢酶的定量

药物在体内的代谢处置过程受药物转运体、I 相代谢酶细胞色素 P450 家族以及 II 相代谢酶尿

苷二磷酸-葡萄糖醛酸转移酶(UDP glucuronosyl-transferases, UGT)、谷胱甘肽硫转移酶(glutathione S-transferases, GST)等的影响^[64]。许多药物可以诱导或抑制药物转运体和代谢酶,影响自身和其他药物的分布、代谢和作用疗效,严重时甚至危及生命。FDA和欧洲药品管理局建议在新药研究中,应尽早进行药物-药物相互作用的考察。因此实现对药物转运体或药物代谢酶的定量对于药物代谢动力学研究,避免药物药物相互作用,实现临床个体化用药等方面具有非常重要的意义^[65]。

过去对药物转运体和代谢酶的定量多依赖于免疫学法,如 Western blot 和酶联免疫吸附测定法,但这些方法存在明显的缺点。如 Western blot 法特异性受到抗体选择性的影响,常常难以区别相同家族不同亚型的蛋白,且 Western blot 法只能实现相对定量,而 ELISA 法虽然灵敏度高,能够实现绝对定量,却也存在特异性差的问题。而基于以上讨论的新兴的基于生物质谱的蛋白质定量方法在药物转运体和代谢酶的定量中开始崭露头角。Seibert 等^[66]基于 nanoLC-Q-TOF 鉴定得到 18 种 CYP 亚型,并通过 MRM 的方法,借助于 AQUA 内标对 CYP2E1 和 CYP1A2 进行了定量。Ohtsuki 等^[67]将此方法扩展到了 UGT 酶和药物转运体,同时测定了 20 种药物代谢酶,包括 P450 酶、UGT 酶和 22 种药物转运体。由于药物转运体和代谢酶亚型的高度同源性,运用 MRM 法对不同亚型的蛋白进行定量,其关键步骤是特异性定量肽段的选择。Fusaro 等^[68]开发了一种计算机筛选方法,用于进行高灵敏度特异性定量肽段的筛选。Kawakami 及其同事^[69-70]成功将其应用到转运体和 CYP 酶的定量中,并运用 nanoLC-MS/MS(4000 QTRAQP)分别对人类肝脏中 11 种 CYP450 酶和小鼠组织中的 34 种转运体进行测定。CYP4F 是近年才发现的一种 CYP450 酶,参与了内源性物质如花生四烯酸,白三烯 B₄,维生素 K₁,维生素 E 以及外源性化合物帕夫拉定(pafuramidine)和芬戈莫德(fingolimod)的代谢消除中,在炎症反应中发挥着重要作用。Michaels 等^[71]通过对 CYP4F 和 CYP3A 的定量,发现 CYP4F 亚型在总 CYP450 酶中含量约 15%,占居第 3,颠覆了过去认为 CYP3A, CYP2C 和 CYP1A2 在肝药酶中所占的主导地位。NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1(NQO1)为体内一种重要的Ⅱ相代谢酶,

在肿瘤组织中高表达,是一个潜在的抗肿瘤作用靶点。本课题组^[72]基于与 AQUA 相似的原理,设计与定量肽段的类似肽段作为非同位素内标实现了对 NQO1 的绝对定量。具体方法是将 NQO1 特异性定量肽段肽段 IQILEGWK 中的亮氨酸(L)改为与其性质相似的丙氨酸(A),保证了非同位素内标与原肽段相似的色谱和质谱行为,非同位素内标法的定量结果与同位素内标法和 Western blot 法相一致,说明了该方法的准确性;同时,该方法相比与同位素内标法大大降低了实验成本。

鉴于 QconCAT 法在对多种蛋白同时定量中的优势,Russell 及其同事^[73]首次设计并合成了同位素标记的用于转运体定量的肽段串联体(TransCAT)和用于药物代谢酶定量的肽段串联体(MetCAT);Achour 等^[74]基于以上方法合成的 QconCAT,利用 nanoLC-MS/MS 平台,采用 SRM 模式实现了人肝微粒体内 13 种 CYP450 酶和 8 种 UGT 酶的同时定量。以上研究都是基于内标法的绝对定量技术的应用;而 MacLeod 等^[75-76]近年来基于 nanoLC-LTQ-Orbitrap 平台,运用 SILAC 技术对小鼠肝内药物代谢酶进行了更为快速、全面的相对定量,最终测定了 68 种 I 相代谢酶和 30 种 II 相代谢酶,是一种实用的研究药物代谢和药物-药物相互作用的方法。

2.2 多肽和抗体药物的药代动力学

生物技术的崛起为蛋白质或多肽类药物的发展提供了契机,近年来获批或处于临床实验阶段的蛋白类药物呈指数增长。蛋白质与多肽分子对维持机体的正常功能起着至关重要的作用,如体内存在的许多天然蛋白和多肽对特定疾病具有确切的治疗效果,一些由于基因突变或缺失造成的病症中补充相应蛋白是基因治疗的一种有效替代疗法^[77-78]。蛋白质或多肽作为药物,由于其结构的复杂性,与小分子药物相比其特异性更强、用药剂量较低、功能更为明确、不良反应小。目前已有大量蛋白多肽类和抗体药物进入市场^[79],如 FDA 最早批准上市的重组蛋白药物重组胰岛素,治疗 B 细胞霍奇金淋巴瘤的 Rituximab 单抗,治疗结肠癌和头颈癌的 Cetuximab 单抗和治疗乳腺癌的 Trastuzumab 单抗等。另外,研究发现一些肽类药物本身不具有药理活性,或药理活性较低,但是可通过促进药物吸收,改善药物运输而增强药物疗效(如

穿膜肽)^[80]。

多肽类药物和抗体药物的分子结构、理化性质及作用机制等与小分子药物有着本质的区别,因此,其在生物体内也有着独特的药代动力学特点。目前,由于蛋白多肽类药物的胃肠道不稳定性,因此大都选用非胃肠道途径给药;且其在设计之初就旨在增强其靶向性,因此多肽类和抗体药物的分布与其靶向性关系密切^[81]。不同于小分子药物,蛋白多肽类药物多是通过与器官组织中的蛋白酶发生水解反应进行降解,降解产生的氨基酸及肽片段大多会进入内源氨基酸库,用于内源性物质的合成,很少以原形药的形式排泄^[81]。

目前,蛋白多肽类药物药代动力学研究的瓶颈主要在于:①蛋白多肽类药物与内源性蛋白多肽结构性性质相同或相似,因而分离、提取和纯化较困难;②蛋白多肽类药物给药剂量小,血药浓度远低于各种内源性蛋白的含量,基质干扰使得对目标分子进行有效提取和准确测量的难度增加;③该类药物可与体内的受体、抗原和内源性结合物等结合,难以区分游离药物、代谢物及结合药物。然而,现阶段基于物质谱技术和蛋白质分析手段的发展,也对此类药物的药物代谢动力学过程进行了初步的探索。

重组人血管内皮抑制素(商品名:恩度),其作用机制是抑制内皮细胞迁移,进而抑制肿瘤新生血管的生成,阻断肿瘤的营养供给,从而达到抑制肿瘤增殖或转移的目的。临床上,重组人血管内皮抑制素联合长春瑞宾、顺铂的化疗方案可用于治疗Ⅲ/Ⅳ期非小细胞肺癌患者。本课题组^[82]建立了一种高灵敏度、快速、便捷和可重复的液质联用定量方法用于重组人血管内皮抑制素的药代动力学研究。在样品制备时用 Ni⁺ 琼脂糖凝胶来分离纯化血浆样品,合成氨基酸替换的类似肽段,使用 LC-MS/MS 的 MRM 模式对特异性肽段进行定量,进而对重组人血管内皮抑制素进行定性和绝对定量,并获得大鼠在不同剂量下重组人血管内皮抑制素的药代动力学参数。

近年来,与小分子药物逐渐在销售市场上形成鼎立趋势的是各类单克隆抗体药物。Zhang 等^[83]建立了一种基于 LC-MRM-MS 的定量单克隆抗体的测定方法,并成功应用到 α PCSK9 单克隆抗体在猕猴体内的 PK 研究中。该方法采用了 SILUMAb

作为内标。SILUMAb 含有与人类 IgG1 重链的恒定区有相同的序列,并且包含 [¹³C, ¹⁵N]-lysine/arginine。基于此方法,Zhang 完成了对不同剂量下猕猴体内 α PCSK9 药时曲线的绘制和药代动力学参数的测定。综上,基于物质谱的定量分析方法,其高效性和准确性的优势可以加快早期生物药研发的进程。

3 展 望

定量蛋白组学技术能够快速监测生物学过程中蛋白质组的变化,从蛋白质组学角度对生物系统获得更深的认识,从中发现特异性生物标志物。这对于研究疾病的发生、发展和药物作用机制起到了重要的推动作用。然而由于生物学过程的复杂性,质谱技术在生物学研究中还面临着巨大的挑战。例如膜蛋白在细胞信号传导、免疫反应等重要过程中起到关键作用,然而由于其镶嵌于生物膜上,其结构中存在的疏水性片段使其难于提取,另外其极低的表达丰度也增加了其检测难度。再如,生命过程中一些重要的分子生物学过程如 DNA 复制、转录和翻译都依赖于蛋白质与其他生物大分子之间的相互作用,要深入研究这些过程,必需关注蛋白质的长时程动力学过程、其翻译后修饰的动态变化及蛋白-蛋白间的相互作用等。未来的质谱仪在扫描速度、质量精度和分辨率等关键性能的不断提升预计将大大推动蛋白质定量技术的持续发展。

与此同时,以蛋白质和多肽为代表的生物药物是近年来药物研发的热点之一。多肽化学、生物有机化学、系统生物学及生物信息学等多学科多领域的交叉和融合,为蛋白质和多肽类药物的发展提供了新的研究思路和契机,带动了蛋白、多肽药物相关技术、设备和工艺的进步,预示着蛋白质和多肽类药物发展的黄金时期的到来。然而不同于小分子药物,蛋白质药物构复杂多变,理化性质多样,杂质成份不确定性高,发生免疫反应的可能性大。为确保药物的安全性和有效性,针对蛋白质药物自身的特点建立全面的蛋白质药物分析方法和药代动力学评价体系具有非常重要的意义。尽管基于物质谱的蛋白定量技术在多肽和抗体药物的定量分析和药代动力学研究领域还处于初步阶段,但将日趋完善的蛋白定量技术应用于大分子药物的药代动力学研究必将成为未来发展的重要趋势。

参考文献

- [1] Cho A, Normile D. Nobel Prize in Chemistry. Mastering macromolecules[J]. *Science*, 2002, **298**(5593):527–528.
- [2] Aichler M, Walch A. MALDI Imaging mass spectrometry: current frontiers and perspectives in pathology research and practice[J]. *Lab Invest*, 2015, DOI:10.1038/labinvest.2014.156.
- [3] Ye H, Mandal R, Catherman A, et al. Top-down proteomics with mass spectrometry imaging: a pilot study towards discovery of biomarkers for neurodevelopmental disorders[J]. *PLoS One*, 2014, **9**(4):e92831.
- [4] M. T. Mb, Aydin B, Carlson RP, et al. Identification and imaging of peptides and proteins on enterococcus faecalis biofilms by matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry[J]. *Analyst*, 2012, **137**(21):5018–5025.
- [5] Hanrieder J, Ljungdahl A, Falth M, et al. L-DOPA-induced dyskinesia is associated with regional increase of striatal dynorphin peptides as elucidated by imaging mass spectrometry[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2011, **10**(10):M111.
- [6] Elsner M, Rauser S, Maier S, et al. MALDI imaging mass spectrometry reveals COX7A2, TAGLN2 and S100-A10 as novel prognostic markers in Barrett's adenocarcinoma[J]. *J Proteomics*, 2012, **75**(15):4693–4704.
- [7] Kang YP, Lee WJ, Hong JY, et al. Novel approach for analysis of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) using HPLC-QTOF-MS-based lipidomics: lipid levels in asthmatics and corticosteroid-treated asthmatic patients[J]. *J Proteome Res*, 2014, **13**(9):3919–3929.
- [8] Pompach P, Brnkova Z, Sanda M, et al. Site-specific glycoforms of haptoglobin in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2013, **12**(5):1281–1293.
- [9] Ge Y, Lawhorn BG, Elnaggar M, et al. Top down characterization of larger proteins (45 kDa) by electron capture dissociation mass spectrometry[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**(4):672–678.
- [10] Bildl W, Haupt A, Muller CS, et al. Extending the dynamic range of label-free mass spectrometric quantification of affinity purifications[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2012, **11**(2):M111.007955.
- [11] Heo S, Spoerk S, Birner-Gruenberger R, et al. Gel-based mass spectrometric analysis of hippocampal transmembrane proteins using high resolution LTQ Orbitrap Velos Pro[J]. *Proteomics*, 2014, **14**(17/18):2084–2088.
- [12] Majovsky P, Naumann C, Lee CW, et al. Targeted proteomics analysis of protein degradation in plant signaling on an LTQ-Orbitrap mass spectrometer[J]. *J Proteome Res*, 2014, **13**(10):4246–4258.
- [13] Wang Q, Wen B, Yan G, et al. Qualitative and quantitative expression status of the human chromosome 20 genes in cancer tissues and the representative cell lines[J]. *J Proteome Res*, 2013, **12**(1):151–161.
- [14] Gillet LC, Navarro P, Tate S, et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2012, **11**(6):O111016717.
- [15] Liu Y, Huttenhain R, Surinova S, et al. Quantitative measurements of N-linked glycoproteins in human plasma by SWATH-MS[J]. *Proteomics*, 2013, **13**(8):1247–1256.
- [16] Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2002, **1**(5):376–386.
- [17] Sury MD, Chen JX, Selbach M. The SILAC fly allows for accurate protein quantification *in vivo*[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2010, **9**(10):2173–2183.
- [18] Westman-Brinkmalm A, Abramsson A, Pannec J, et al. SILAC zebrafish for quantitative analysis of protein turnover and tissue regeneration[J]. *J Proteomics*, 2011, **75**(2):425–434.
- [19] Nolte H HS, Housley MP, Islam S, et al. Dynamics of zebrafish fin regeneration using a pulsed silac approach[J]. *Proteomics*, 2014, DOI:10.1002/pmic.201400316.
- [20] Kruger M, Moser M, Ussar S, et al. SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function[J]. *Cell*, 2008, **134**(2):353–364.
- [21] Zanivan S, Krueger M, Mann M. *In vivo* quantitative proteomics: the SILAC mouse[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, **757**:435–450.
- [22] Ishihama Y, Sato T, Tabata T, et al. Quantitative mouse brain proteomics using culture-derived isotope tags as internal standards[J]. *Nat Biotechnol*, 2005, **23**(5):617–621.
- [23] Yu KH, Barry CG, Austin D, et al. Stable isotope dilution multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry for pancreatic cancer serum biomarker discovery[J]. *J Proteome Res*, 2009, **8**(3):1565–1576.
- [24] Geiger T, Cox J, Ostasiewicz P, et al. Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue[J]. *Nat Methods*, 2010, **7**(5):383–385.
- [25] Mangrum JB, Martin EJ, Brophy DF, et al. Intact stable isotope labeled plasma proteins from the SILAC-labeled HepG2 secretome[J]. *Proteomics*, 2014, DOI:10.1002/pmic.201400369.
- [26] Zhang G, Bowling H, Hom N, et al. In-depth quantitative proteomic analysis of de novo protein synthesis induced by brain-derived neurotrophic factor[J]. *J Proteome Res*, 2014, **13**(12):5707–5714.
- [27] Van Hoof D, Pinkse MW, Oostwaard DW, et al. An experimental correction for arginine-to-proline conversion artifacts in SILAC-based quantitative proteomics[J]. *Nat Methods*, 2007, **4**(9):677–678.
- [28] Miyagi M, Rao KC. Proteolytic ¹⁸O-labeling strategies for quantitative proteomics[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2007, **26**(1):121–136.
- [29] Shetty V, Nickens Z, Shah P, et al. Investigation of sialylation

- aberration in *N*-linked glycopeptides by lectin and tandem labeling (LTL) quantitative proteomics [J]. *Anal Chem*, 2010, **82** (22): 9201 – 9210.
- [30] Yamaguchi H, Miyazaki M. Enzyme-immobilized reactors for rapid and efficient sample preparation in MS-based proteomic studies [J]. *Proteomics*, 2013, **13** (3/4): 457 – 466.
- [31] Yen TY, Dutta SM, Litsakos-Cheung C, *et al.* Overcoming challenges and opening new opportunities in glycoproteomics [J]. *Biomolecules*, 2013, **3** (2): 270 – 286.
- [32] Zhang W, Long J, Zhang C, *et al.* A method combining SPITC and ^{18}O labeling for simultaneous protein identification and relative quantification [J]. *J Mass Spectrom*, 2014, **49** (5): 400 – 408.
- [33] Yang SJ, Nie AY, Zhang L, *et al.* A novel quantitative proteomics workflow by isobaric terminal labeling [J]. *J Proteomics*, 2012, **75** (18): 5797 – 5806.
- [34] Bezstarosti K, Ghamari A, Grosveld FG, *et al.* Differential proteomics based on ^{18}O labeling to determine the cyclin dependent kinase 9 interactome [J]. *J Proteome Res*, 2010, **9** (9): 4464 – 4475.
- [35] Qin W, Song Z, Fan C, *et al.* Trypsin immobilization on hairy polymer chains hybrid magnetic nanoparticles for ultra fast, highly efficient proteome digestion, facile ^{18}O labeling and absolute protein quantification [J]. *Anal Chem*, 2012, **84** (7): 3138 – 3144.
- [36] Gygi SP, Rist B, Gerber SA, *et al.* Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, **17** (10): 994 – 999.
- [37] Li J, Steen H, Gygi SP. Protein profiling with cleavable isotope-coded affinity tag (cICAT) reagents; the yeast salinity stress response [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2003, **2** (11): 1198 – 1204.
- [38] Hansen KC, Schmitt-Ulms G, Chalkley RJ, *et al.* Mass spectrometric analysis of protein mixtures at low levels using cleavable ^{13}C -isotope-coded affinity tag and multidimensional chromatography [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2003, **2** (5): 299 – 314.
- [39] Hsu JL, Huang SY, Chow NH, *et al.* Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics [J]. *Anal Chem*, 2003, **75** (24): 6843 – 6852.
- [40] Boersema PJ, Aye TT, Van Veen TA, *et al.* Triplex protein quantification based on stable isotope labeling by peptide dimethylation applied to cell and tissue lysates [J]. *Proteomics*, 2008, **8** (22): 4624 – 4632.
- [41] Boersema PJ, Raijmakers R, Lemeer S, *et al.* Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics [J]. *Nat Protoc*, 2009, **4** (4): 484 – 494.
- [42] Boersema PJ, Foong LY, Ding VM, *et al.* In-depth qualitative and quantitative profiling of tyrosine phosphorylation using a combination of phosphopeptide immunoaffinity purification and stable isotope dimethyl labeling [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2010, **9** (1): 84 – 99.
- [43] Sun Z, Qin H, Wang F, *et al.* Capture and dimethyl labeling of glycopeptides on hydrazide beads for quantitative glycoproteomics analysis [J]. *Anal Chem*, 2012, **84** (20): 8452 – 8456.
- [44] Hubner NC, Nguyen LN, Hornig NC, *et al.* A quantitative proteomics tool To identify DNA-protein interactions in primary cells or blood [J]. *J Proteome Res*, 2015, **14** (2): 1315 – 1329.
- [45] Li S, Zeng D. CILAT—a new reagent for quantitative proteomics [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2007, **21**: 2181 – 2183.
- [46] Zeng D, Li S. Revival of deuterium-labeled reagents for protein quantitation [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2009, **23**: 3369 – 3371.
- [47] Zhang J, Wang Y, Li S. Deuterium isobaric amine-reactive tags for quantitative proteomics [J]. *Anal Chem*, 2010, **82** (18): 7588 – 7595.
- [48] Sohn CH, Lee JE, Sweredoski MJ, *et al.* Click chemistry facilitates formation of reporter ions and simplified synthesis of amine-reactive multiplexed isobaric tags for protein quantification [J]. *J Am Chem Soc*, 2012, **134** (5): 2672 – 2680.
- [49] Xiang F, Ye H, Chen R, *et al.* *N,N*-dimethyl leucines as novel isobaric tandem mass tags for quantitative proteomics and peptidomics [J]. *Anal Chem*, 2010, **82** (7): 2817 – 2825.
- [50] Frost DC, Greer T, Li L. High-resolution enabled 12-plex DiLeu isobaric tags for quantitative proteomics [J]. *Anal Chem*, 2015, **87** (3): 1646 – 1654.
- [51] Liu H, Sadygov RG, Yates JR, 3rd. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics [J]. *Anal Chem*, 2004, **76** (14): 4193 – 4201.
- [52] Mueller LN, Brusniak MY, Mani DR, *et al.* An assessment of software solutions for the analysis of mass spectrometry based quantitative proteomics data [J]. *J Proteome Res*, 2008, **7** (1): 51 – 61.
- [53] Zybailov B, Coleman MK, Florens L, *et al.* Correlation of relative abundance ratios derived from peptide ion chromatograms and specxum counting for quantitative proteomic analysis using stable isotope labeling [J]. *Anal Chem*, 2005, **77** (19): 6218 – 6224.
- [54] Colinge J, Chiappe D, Lagache S, *et al.* Differential proteomics via probabilistic peptide identification scores [J]. *Anal Chem*, 2005, **77** (2): 596 – 606.
- [55] Zhang Y, Wen Z, Washburn MP, *et al.* Refinements to label free proteome quantitation; how to deal with peptides shared by multiple proteins [J]. *Anal Chem*, 2010, **82** (6): 2272 – 2281.
- [56] Sardu ME, Washburn MP. Enriching quantitative proteomics with SI(N) [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, **28** (1): 40 – 42.
- [57] America AH, Cordewener JH. Comparative LC-MS; a landscape of peaks and valleys [J]. *Proteomics*, 2008, **8** (4): 731 – 749.
- [58] Geromanos SJ, Vissers JP, Silva JC, *et al.* The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS [J]. *Proteomics*, 2009, **9** (6): 1683 – 1695.
- [59] Blackburn K, Cheng FY, Williamson JD, *et al.* Data-independent liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS^E) detection and quantification of the secreted apium graveolens pathogen de-

- fense protein mannitol dehydrogenase[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, **24**(7):1009–1016.
- [60] Brun V, Dupuis A, Adrait A, *et al.* Isotope-labeled protein standards; toward absolute quantitative proteomics[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2007, **6**(12):2139–2149.
- [61] Kito K, Ito T. Mass spectrometry-based approaches toward absolute quantitative proteomics[J]. *Curr Genomics*, 2008, **9**(4):263–274.
- [62] Adrait A, Lebert D, Trauchessec M, *et al.* Development of a protein standard absolute quantification (PSAQ) assay for the quantification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in serum[J]. *J Proteomics*, 2012, **75**(10):3041–3049.
- [63] Kaiser SE, Riley BE, Shaler TA, *et al.* Protein standard absolute quantification (PSAQ) method for the measurement of cellular ubiquitin pools[J]. *Nat Methods*, 2011, **8**(8):691–696.
- [64] Keogh JP. Membrane transporters in drug development[J]. *Adv Pharmacol*, 2012, **63**:1–42.
- [65] Liu X, Hu L, Ge G, *et al.* Quantitative analysis of cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes by the combination of proteomics and chemical probe-based assay[J]. *Proteomics*, 2014, **14**(16):1943–1951.
- [66] Seibert C, Davidson BR, Fuller BJ, *et al.* Multiple approaches to the identification and quantification of cytochromes P450 in human liver tissue by mass spectrometry[J]. *J Proteome Res*, 2009, **8**(4):1672–1681.
- [67] Ohtsuki S, Schaefer O, Kawakami H, *et al.* Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver; comparison with mRNA levels and activities[J]. *Drug Metab Dispos*, 2012, **40**(1):83–92.
- [68] Fusaro VA, Mani DR, Mesirov JP, *et al.* Prediction of high-responder peptides for targeted protein assays by mass spectrometry[J]. *Nat Biotechnol*, 2009, **27**(2):190–198.
- [69] Kawakami H, Ohtsuki S, Kamiie J, *et al.* Simultaneous absolute quantification of 11 cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes by liquid chromatography tandem mass spectrometry with in silico target peptide selection[J]. *J Pharm Sci*, 2011, **100**(1):341–352.
- [70] Kamiie J, Ohtsuki S, Iwase R, *et al.* Quantitative atlas of membrane transporter proteins; development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel in silico peptide selection criteria[J]. *Pharm Res*, 2008, **25**(6):1469–1483.
- [71] Michaels S, Wang MZ. The revised human liver cytochrome P450 "Pie": absolute protein quantification of CYP4F and CYP3A enzymes using targeted quantitative proteomics[J]. *Drug Metab Dispos*, 2014, **42**(8):1241–1251.
- [72] Tang Z, Wu M, Li Y, *et al.* Absolute quantification of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in human tumor cell lines and tissues by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry using both isotopic and non-isotopic internal standards[J]. *Anal Chim Acta*, 2013, **772**:59–67.
- [73] Russell MR, Achour B, McKenzie EA, *et al.* Alternative fusion protein strategies to express recalcitrant QconCAT proteins for quantitative proteomics of human drug metabolizing enzymes and transporters[J]. *J Proteome Res*, 2013, **12**(12):5934–5942.
- [74] Achour B, Russell MR, Barber J, *et al.* Simultaneous quantification of the abundance of several cytochrome P450 and uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase enzymes in human liver microsomes using multiplexed targeted proteomics[J]. *Drug Metab Dispos*, 2014, **42**(4):500–510.
- [75] Macleod AK, Zang T, Riches Z, *et al.* A targeted in vivo SILAC approach for quantification of drug metabolism enzymes; regulation by the constitutive androstane receptor[J]. *J Proteome Res*, 2014, **13**(2):866–874.
- [76] Macleod AK, Fallon PG, Sharp S, *et al.* An enhanced in vivo SILAC model for quantification of drug metabolism enzymes[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2015, DOI:10.1074/mcp.M114.043661
- [77] Richter B, Neises G. 'Human' insulin versus animal insulin in people with diabetes mellitus[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2005, **1**:CD003816.
- [78] Kemp SF, Fowlkes JL, Thrall KM. Efficacy and safety of mecasermin rinfabate[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2006, **6**(5):533–538.
- [79] Leader B, Baca QJ, Golan DE. Protein therapeutics; a summary and pharmacological classification[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, **7**(1):21–39.
- [80] Shin MC, Zhang J, Min KA, *et al.* Cell-penetrating peptides: achievements and challenges in application for cancer treatment[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2014, **102**(2):575–587.
- [81] Liu CX, Cai YM, Fan HR. Thinking on pharmacokinetic studies of therapeutic antibody drugs[J]. *Chin Pharm J* (中国药杂志), 2014, **49**(4):257.
- [82] Li YC, Liang Y, Tang ZY, *et al.* Quantification of endostar in rat plasma by LC-MS/MS and its application in a pharmacokinetic study[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, **70**:505–511.
- [83] Zhang Q, Spellman DS, Song Y, *et al.* Generic automated method for liquid chromatography-multiple reaction monitoring mass spectrometry based monoclonal antibody quantitation for preclinical pharmacokinetic studies[J]. *Anal Chem*, 2014, **86**(17):8776–8784.