

# 基于生物质谱的蛋白质组学绝对定量方法研究进展

曹 冬, 张养军, 钱小红

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京蛋白质组研究中心, 北京 102206)

**摘要:**蛋白质组学定量方法包括相对定量和绝对定量两部分。相对定量蛋白质组学(也称比较蛋白质组学)是指对不同生理病理状态下细胞、组织或体液蛋白质表达量的相对变化进行比较分析;绝对定量蛋白质组学是测定细胞、组织或体液蛋白质组中每种蛋白质的绝对量或浓度。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绝对定量方法和基于质谱数据统计分析的非标记方法。蛋白质组学定量的信息可以帮助了解蛋白质在相互作用网络中所起的作用;通过对临床生物标记物绝对量的分析,可以帮助直观地判断疾病的发生和发展过程,这对于临床诊断和疾病治疗都具有现实的指导意义。

**关键词:**定量蛋白质组;绝对定量;同位素标记法;非标记定量法;生物质谱

**中图分类号:** O 657. 63; Q 1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2008)03-185-07

## Development of Absolute Quantification of Proteomics Based on Bio-Mass Spectrum

CAO Dong, ZHANG Yang-jun, QIAN Xiao-hong

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing Proteome Research Center, Beijing 102206)

**Abstract:** The quantitative methods of proteomics include the relative quantitation and absolute quantitation of proteins. Relative quantitation of proteomics is the analysis of the relative changes of the expressed proteins in the samples originated from different physiological and pathological situations. The absolute quantitation of proteomics is to determine the absolute amount or concentration of each protein in a biological sample, such as cells, tissue or body fluid. Currently, the main strategies of absolute quantitation of proteomics are composed of the quantitative methods based on internal standard strategy and the label-free technique with the statistic analysis of MS data. The quantitative information of the proteome can help us understand the biological function of proteins in the interaction network. With the determination of the absolute quantitation of the biomarker, we can directly judge the status of a disease, which will benefit the clinical diagnosis and the treatment of the disease.

收稿日期: 2007-04-28; 修回日期: 2007-07-23

基金项目: 国家重点基础研究规划项目(2001CB510201, 2004CB520802); 国家科技计划课题“蛋白质科学计划 973 基地项目”(2006CB910803); 国家自然科学基金(30321003, 20405017, 20505018, 20505019); 北京市科委重大项目(H030230280190)资助

作者简介: 曹 冬(1980~), 男(汉族), 河北唐山人, 博士研究生, 从事蛋白质组学研究。E-mail: cao.dong1980@163.com

通信作者: 钱小红(1953~), 女(汉族), 江苏人, 研究员, 从事蛋白质组学研究。E-mail: qianxh@nic.bmi.ac.cn

**Key words:** quantitative proteomics; absolute quantitation; isotopic labeled method; label-free quantitation; bio-mass spectrum

人类基因组计划的完成,必然促使科学家对其功能(即功能基因组)进行研究<sup>[1-2]</sup>。由于仅仅从基因组学的角度无法完全正确预测基因转录过程中发生的剪切、拼接以及在翻译时开放阅读框架密码子的起始、终止位置和翻译后的各种修饰情况,科学家们先后启动了以不同研究对象为目标的蛋白质组研究计划,如人类血浆蛋白质组研究计划、人类肝脏蛋白质组研究计划、人脑蛋白质组研究计划等,以解决与人类健康密切相关的基础科学问题和实践问题。自从 20 世纪 90 年代蛋白质组名词首次出现以来<sup>[3]</sup>,经过 10 多年的发展,蛋白质组学的研究已经取得了巨大的进展。蛋白质组学的技术进步主要包括:不同机理和模式的分离技术(如各种电泳技术、色谱技术)的有效组合<sup>[4-5]</sup>,以获得对蛋白质或多肽混合物的高效分离;不同离子源、不同类型质量分析器的优化组合以及与多维、多模式分离技术的联用<sup>[6-7]</sup>,为分离分析复杂生物体系中蛋白质混合物奠定了基础;另外越来越多的生物物种基因组测序工作的完成和生物信息学工具的发展,为规模化、通量化进行蛋白质组的鉴定和数据分析提供了保障。随着蛋白质组研究的不断深入,蛋白质组学研究中仅能提供蛋白质种类和修饰信息的定性分析技术已经不能满足目前研究工作的需要,因此,定量蛋白质组学技术和方法的研究正逐渐成为领域方法学研究的热点。蛋白质组学定量方法分为相对定量和绝对定量两部分:相对定量蛋白质组学(也称比较蛋白质组学)是指对不同生理病理状态下,细胞、组织或体液蛋白质表达量进行的相对比较分析,如基于二维凝胶电泳(2-DE)技术直接对处于不同状态下蛋白质表达变化的比较分析<sup>[8]</sup>、荧光胶内差示电泳技术(differential in-gel electrophoresis, DIGE)<sup>[9]</sup>以及基于同位素亲和标签(isotope coded affinity tags, ICAT)与质谱分析结合的相对定量技术<sup>[10-11]</sup>、等量标签相对定量方法(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)<sup>[12]</sup>和金属元素络合物标签结合质谱相对定量方法<sup>[13]</sup>等;绝对定量蛋白质组学是测定蛋白质组中每种蛋白质的绝对量或浓度。在有机体中,蛋白质的相互作用是非常复杂的,在真核生物蛋白质组中,每 4 个蛋白质中就有一个蛋

白质可能参与多个不同的蛋白复合物的组成。由于不能确定一个蛋白是否代表一个复合物的化学计量核心(stoichiometric “core”),而使此蛋白在相互作用网络中的功能难以捉摸,尽管有一些全功能蛋白已经通过免疫亲和的方法得到分离,但还不能确定它们是否具有严格的化学计量,所以为了充分了解蛋白质在相互作用网络中的功能,就必须用量的信息来表征蛋白质<sup>[14]</sup>。绝对定量对于临床疾病的诊断和治疗具有明显的现实意义<sup>[15]</sup>,蛋白质生物标记物量的变化,可以直接反映疾病的发展状况,因此,通过对疾病不同时期生物标记物绝对量的监测,可以直观地判断疾病的发展情况,制定相应的治疗措施。由于蛋白质绝对量在蛋白质相互作用及临床上具有重要意义,所以,相关的方法学研究备受关注,并取得了一定的进展,本工作主要对此方法进行评述。

## 1 基于内标法的蛋白质绝对定量

### 1.1 同位素标记的肽段作为内标的蛋白质组绝对定量

基于同位素标记的肽段作为内标的蛋白质绝对定量的基本策略是:在被定量蛋白质的氨基酸序列中选择一段相对分子质量大小适中(一般为 0.9~2 ku)、质谱信号响应较强的肽段作为模板,用化学合成或细胞培养的方法合成带有一定同位素(如<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N、<sup>2</sup>H)标记的相同肽段(仅相对分子质量有差异)作为内标,通过检测肽段的质谱信号强度之比(峰高或峰面积比)来对相应蛋白质进行绝对定量。应用内标法的前提条件是:1)被绝对定量的蛋白质酶切要充分;2)被选择作为内标肽段模板的肽段和蛋白质间存在一定的定量关系。

Gerber 等<sup>[16]</sup>用化学合成的方法合成了同位素标记亮氨酸的肽段作为待测蛋白质的内标,应用选择反应监测(SRM)质谱法对细胞溶菌产物中提取的蛋白质及相应的磷酸化蛋白进行绝对定量研究。为了评价该方法的可行性,他们将已知浓度系列的标准肌红蛋白加入酵母细胞溶菌产物中,在此背景下,以肌红蛋白的某段肽段(LFTGHPETLEK 和 ALELFR)为模板,化学合成同位素标记的相应肽段(LFTGHPETL \*

EK 和 ALEL \* FR, 其中 L \* 代表亮氨酸被同位素标记)作为内标,应用 SRM 质谱法检测肌红蛋白的绝对量,并与已知加入的量进行对比。

Beynon 等<sup>[17]</sup>采用人工基因表达合成特定蛋白质的方法对 20 种鸡骨骼肌蛋白质进行绝对定量,其基本策略是:首先找到每种待定量蛋白质的标签肽段(Q-肽段),然后找到相应的表达这些标签肽段的基因片断,用人工方法将这些基因片断转载到大肠杆菌中进行复制和表达,所得到的蛋白质(QCAT-蛋白质)中包含了上述的所有标签肽段,同时这些肽段的所有氮元素被相应的<sup>15</sup>N 同位素替换(在蛋白表达介质中以<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl作为唯一氮源);将已知量的 QCAT-蛋白质与待测蛋白样品进行混合,胰酶酶切后,进行质谱分析,被<sup>15</sup>N 标记的 Q-肽段和相应的未被标记的 Q-肽段在质谱上被区分开来,根据各自的质谱信号强度和 QCAT-蛋白已知加入量可以绝对定量样品中的待测蛋白质。但此方法存在的局限性有:1)所选肽段相对分子质量要在 1 000~2 000 以内(以保证在质谱上有较强的信号响应),不能含半胱氨酸(防止 QCAT-蛋白形成复杂的分子内或分子间的二硫键),且在整个 QCAT-蛋白中每个肽段都是唯一的;2)QCAT-蛋白质相对分子质量不能太大,如果超过 150 ku, QCAT-蛋白的合成将比较困难。

除了上述方法外, Havlis 等<sup>[18]</sup>应用<sup>18</sup>O 标记的肽段作为内标,比较了在溶液中和经胶上酶切两种方法处理的蛋白质绝对定量的可行性。结果表明,在溶液中<sup>18</sup>O 标记的绝对定量方法是精确的。经胶上酶切分离后,蛋白质的绝对定量会出现较大误差,其主要原因是选择作为内标的肽段胶上回收率很低;另一种原因是不同的肽段在胶上的回收率也是不同的。Mayya 等<sup>[19]</sup>应用同位素标记和液相色谱选择反应检测(LC-SRM)技术对细胞周期转化和凋亡过程中的 4 个磷酸化调节蛋白进行绝对定量分析,以研究蛋白质的磷酸化作用对细胞周期转化和凋亡的调节作用。

### 1.2 同位素标记的氨基酸作为内标的蛋白质组绝对定量

此方法的策略是:将待测定的蛋白质在强酸条件下,进行完全的水解,全部形成氨基酸混合物,然后加入已知量的同位素标记的氨基酸作为内标,经 MALDI-TOF-MS 质谱检测一对氨基酸的质谱峰强度以实现氨基酸的浓度测定,再根据此氨基酸在蛋白中的含量,计算出蛋白的

量。Mirgorodskaya 等<sup>[20]</sup>采用酸水解法将已知序列的蛋白质水解成氨基酸,加入同位素标记的氨基酸后,用标记和未标记的氨基酸的质谱峰强度比值和蛋白质中所含此氨基酸数目来计算该蛋白质的绝对量。此方法简便、灵敏、测定的动态范围宽,但是存在如下不足:1)需要预先知道要定量的蛋白质的氨基酸序列组成;2)采用 MALDI 源时,基质会对某些氨基酸的质谱峰产生干扰;3)较难应用于复杂蛋白混合物中蛋白质的绝对定量。

### 1.3 基于电感耦合等离子体质谱测定元素的蛋白质绝对定量

电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)法是测定化合物中某一元素的方法,主要应用在环境中微量元素的分析和检测。它在蛋白质组定量中的应用主要是对蛋白或肽段中所含的磷或硫元素进行精确测定,从而根据磷或硫元素在蛋白或肽段中的含量来计算该蛋白或肽段的绝对量。Navaza 等<sup>[21]</sup>应用此方法对蛋白质组中的磷酸化蛋白进行了定量研究,其基本策略是:在酶切后的磷酸化肽段混合物中加入一适当的磷酸化合物 BNPP 作为内标,经  $\mu$ HPLC 分离后,在 ICP-MS 中检测磷元素的质谱峰强度,同时在同样的色谱条件下用 ESI-MS 进行定性鉴定肽段的氨基酸序列,通过内标的峰强度和已知的加入量,以及每个肽段含磷酸残基的个数,就可以计算出含磷酸肽段的绝对量。虽然 ICP-MS 检测磷元素受其他元素的干扰较小,但是用含磷的化合物 BNPP 作为内标,在质谱上的响应与肽段的响应还是会出现细微的差别,从而给该方法的定量带来误差。

为了弥补这方面的不足, Schaumlöffel 等<sup>[22]</sup>采用柱前同位素稀释质谱法对含硫的蛋白或肽段进行了定量的方法学研究,将不与含硫的肽段有作用同位素<sup>34</sup>S 直接加入到色谱的流动相中,以<sup>34</sup>S 作为内标存在于整个样品分离和质谱鉴定过程的始终,以消除不同肽段间其他元素在质谱中的干扰,从而使该方法更具可行性。电感耦合等离子体质谱法测定特定元素的蛋白质绝对定量方法的优点是元素专一性强,受化合物本身的性质影响较小,可以进行多元素多同位素检测。但也存在一些缺点:1)流动相中的有机相含量影响 MS 信号检测;2)需要保证流动相流速的稳定性;3)被定量的肽段与其他被定量的肽段要能被分开;4)同时需要其他质谱方法对其序列进行鉴定方可定量。

#### 1.4 基于同位素标签标记的肽段用于蛋白质组的绝对定量

此方法的基本策略是:用一对同位素标签分别结合到待测样品的肽段和合成的氨基酸序列相同的肽段上,这样就形成了物理化学性质相同而相对分子量不同的同位素标签化合物标记的一对肽段,经质谱检测即可测定样品中的蛋白或肽段的绝对量。iTRAQ(Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation)试剂的绝对定量方法是此类的典型代表。Ross 等<sup>[23]</sup>合成了 iTRAQ 试剂,并同时将其应用到蛋白质组的相对定量和绝对定量中。iTRAQ 试剂由报告基团,平衡基团和氨基专一反应试剂(NHS)三部分组成。报告基团由不同的<sup>13</sup>C 标记而产生相对分子质量为 114、115、116、117 的差异,为了保证在一级质谱上能产生相同的相对分子质量,用不同个数的<sup>13</sup>C 和<sup>18</sup>O 来平衡报告基团的相对分子质量差异,使得报告基团和平衡基团的总相对分子质量保持 145 不变。经氨基专一反应试剂部分与肽段的 N 末端氨基和赖氨酸的 ε-氨基反应后,在一级质谱上被不同报告基团的 iTRAQ 试剂标记的相同肽段,由于总相对分子质量不存在差异而出现在同一质荷比位置;而在二级质谱上,由于中性离子(CO)丢失,报告基团断裂下来,分别形成 114、115、116、117 的相对分子量差异。根据报告基团的质谱峰强度或峰面积来相对定量不同状态的样品,如果合成一个内标肽段,同时用 iTRAQ 试剂标记,即可通过加入合成肽段作为内标肽段和待测肽段报告基团的峰强度比值测定出相应肽段或蛋白的绝对量。

#### 1.5 非同位素标记的肽段用于蛋白质组的绝对定量

除了上述同位素标记的肽段或氨基酸作为内标的方法外,也可以选择与被定量肽段性质非常相近的非同位素标记的肽段作为内标,对相应肽段或蛋白进行绝对定量。Mayr 等<sup>[24]</sup>采用马肌红蛋白作为内标蛋白,经胰酶酶切后,选择其中的一段肽段作为内标而对人血清中的人肌红蛋白进行绝对定量研究;由于马肌红蛋白和人肌红蛋白的高度同源性,肽段氨基酸序列几乎一样,只是在 N 端存在一个氨基酸的差异,这使得它们物理化学性质非常相近,这就保证了内标和待测定的肽段在反相色谱中能共洗脱,且在质谱中有非常相似的响应信号,从而保证了该定量方法的可行性。为了考察该方法的准确性,选择一个含有已知量人肌红蛋白的人血清样本作为实

际样本,通过向此样本中加入不同浓度的标准人肌红蛋白绘制标准曲线,曲线的反向延长线与横坐标交点的相应横坐标值即为此方法测定的上述实际样本中人肌红蛋白的绝对浓度。经过真实值和测定值的比较,发现该方法测定的人肌红蛋白的量与真实值一致。

#### 2 无标记(label-free)蛋白质组绝对定量

对质谱数据的分析发现,通过对不同浓度下蛋白质检测到的肽段数目、鉴定的概率得分、被鉴定肽段的离子数、色谱保留时间等研究,蛋白质的浓度经一些相应的数学变换后(如指数变换)会与质谱数据的某些参数呈现一定的线性关系。这一发现,可以根据肽段的质谱数据,间接的估计蛋白混合物中单一蛋白的绝对量。

Nakamura 等<sup>[25]</sup>研究发现,一个蛋白质在一级 MS 中被鉴定到的所有肽段质谱峰强度的平均值与该蛋白质在混合物中的量存在一定的对应关系。由于不同肽段离子化效率的差异,单个肽段的 MS 峰强度很难直接反映该肽段或对应蛋白的量,但是,当理想数目的肽段被检测到时,就可以将所有肽段的峰强度进行标准化,肽段的离子化能力也相当于被均一化,则平均的质谱峰强度将可能与蛋白的量呈现一定的相关性。根据这一理论,利用 LC-FT-MS 获得高准确度的肽段相对分子量来作为鉴定蛋白的质量标签,将匹配的每个蛋白质所有标签肽的峰强度进行标准化,用标准化的峰强度比值反映蛋白质在混合物中的相对含量。标准蛋白和简单的实际样本验证表明,此方法是可行的,且有望应用于较复杂的实际样本中。

Silva 等<sup>[26]</sup>发现随着蛋白浓度的降低,被质谱检测到的肽段数目依次减少。通过研究蛋白质酶切肽段的质谱响应信号强度的规律及其与该蛋白质绝对量的关系,建立了一种无标记的蛋白质组绝对定量方法。其基本策略是:将 6 种标准蛋白酶切后,进行质谱分析,分别在每个蛋白的酶切肽段中选择前 3 个峰强度最高的肽段,取这 3 个肽段峰强度的平均值,对该蛋白在样品中的物质的量浓度作关系曲线,发现每个蛋白浓度与其 3 个肽段峰强度平均值成较好的线性关系,以乙醇脱氢酶为标准物质来确定通用信号响应因子(universal signal response factor),根据此响应因子和相应的其他蛋白的肽段的质谱信号响应强度来计算此蛋白的绝对量。

Ishihams 等<sup>[27]</sup>采用指数化修正的蛋白丰度索引法,应用每个蛋白质所监测到肽段数目来估计蛋白质的绝对量。通过对 nano-LC/ESI-MS/MS 所得到的质谱数据进行细致分析和数学计算变换,发现随着蛋白质浓度的升高,得到的相应肽段的数目增多,峰面积增强,且肽段数目与蛋白浓度的对数呈较好的线性关系,将参数经进一步的指数变换和整理,发现线性关系得到进一步改进、偏差进一步降低。通过将此方法应用于标准蛋白和实际样本中验证,发现此方法计算得到蛋白的绝对量的误差与相应 mRNA 在 DNA 微阵中表达测定的蛋白质质量的误差相近,表明该方法可行的。

Liu 等<sup>[28]</sup>发现蛋白质的量与其被质谱鉴定到的肽段数呈正相关,初步建立了基于 spectral count 的蛋白质组定量模型,并将此模型运用于相对简单的标准蛋白质样品,验证了该模型的可行性,该方法的动态范围达到 2 个数量级以上。Lu 等<sup>[29]</sup>建立了一种蛋白质表达绝对定量的模型(APEX),该模型是基于蛋白质被质谱检测的 spectral counts 和肽段鉴定概率,通过该模型对酵母和大肠杆菌蛋白质组进行定量分析,其结果与 western blotting、2-DE、mRNA 结果一致。State 等<sup>[30]</sup>基于蛋白质已知浓度与检测肽段数之间的对数关系,提出了近似公式进行蛋白质绝对浓度预测。

### 3 结 语

随着生物质谱技术、多维色谱分离技术和 2-DE 等技术的不断发展,以及对蛋白质组表达谱、修饰谱和蛋白质组相关新技术、新方法研究的不断深入,蛋白质组学研究已经取得了较大的发展。其中,定量蛋白质组学作为目前蛋白质组学研究的热点之一备受关注,且主要以同位素标记的相对定量为主,但是目前发展的蛋白质绝对定量方法主要是针对一个或几个感兴趣的蛋白进行绝对定量,这对于蛋白质组学而言是远远不够的。要全面了解所有蛋白质在功能网络中的作用,就必须对所有的蛋白质提供绝对量的信息,所以发展大规模的绝对定量方法是非常必要的。但目前,除了基于质谱数据统计分析的非标记定量外,其他的绝对定量方法均无法实现大规模的绝对定量。这是因为不同的肽段在质谱上的响应信号不同,在色谱上的保留行为不同等因素制约着大规模定量方法的发展,虽然在理论上

同位素标记方法能解决上述问题,但对于每个蛋白质都合成相应的同位素标记的内标肽段是不现实的。因此,绝对定量蛋白质组学今后发展的方向之一是在提供操作简便、价格低廉、更灵敏、更准确、与质谱兼容性好的稳定同位素标记的定量方法基础上,注重以大规模蛋白质的绝对定量为目标,尽可能发展大规模高通量的绝对定量方法。

### 参考文献:

- [1] VENTER J C, ADAMS M D, MYERS E W, et al. The sequence of human genome[J]. Science, 2001, 291(5 507): 1 304-1 351.
- [2] LANDER E S, LINTON L M, BIRREN B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome[J]. Nature, 2001, 409(6 822): 860-921.
- [3] WASINGER V C, CORDWELL S J, CERPA-POLJAK A, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes; Mycoplasma genitalium[J]. Electrophoresis, 1995, 16:1 090-1 094.
- [4] LIU H, LIN D, YATES J R. Multidimensional separations for protein/peptide analysis in the post-genomic era [J]. Biotechniques, 2002, 32 (4): 898-902.
- [5] WASHBURN M P, WOLTERS D, YATES J R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology[J]. Nat Biotech, 2001, 19: 242-247.
- [6] JONSSON A P. Mass spectrometry for protein and peptide characterization[J]. Cell Mol Life Sci, 2001, 58: 868-884.
- [7] YERGEY A L, COORSEN J R, BACKLUND P S, et al. De novo sequencing of peptides using MALDI/TOF-TOF[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2002, 13(7): 748-791.
- [8] LILLEY K S, RAZZAQ A, DUPREE P. Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2002, 6 (1): 46-50.
- [9] ALBAN A, DAVID S O, BJORKESTEN L, et al. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard[J]. Proteomics, 2003, 3 (1): 36-44.
- [10] GYGI S P, RIST B, GERBER S A, et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures u-

- sing isotope-coded affinity tags[J]. *Nature biotechnology*, 1999, 17(10): 994-999.
- [11] 孟庆芳, 张养军, 蔡 耘, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱用于蛋白质相对定量方法的研究[J]. *分析化学*, 2006, 34(7): 899-904.
- [12] CHONG P K, GAN C S, PHAM T K, et al. Isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) reproducibility: Implication of multiple injections [J]. *Journal of Proteome Research*, 2006, 5(5): 1 232-1 240.
- [13] LIU H, ZHANG Y, WANG J, et al. Method for quantitative proteomics research by using metal element chelated tags coupled with mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2006, 78(18): 6 614-6 621.
- [14] HAVLIS J, SHEVCHENKO A. Absolute quantification of proteins in solutions and in polyacrylamide gels by mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2004, 76(11): 3 029-3 036.
- [15] BARNIDGE D R, GOODMANSON M K, KLEE G G, et al. Absolute quantification of the model biomarker prostate-specific antigen in serum by LC-MS/MS using protein cleavage and isotope dilution mass spectrometry [J]. *Journal of Proteome Research*, 2004, 3(3): 644-652.
- [16] GERBER S A, RUSH J, STEMMAN O, et al. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS [J]. *PNAS*, 2003, 100(12): 6 940-6 945.
- [17] BEYNON R J, DOHERTY M K, PRATT J M, et al. Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides [J]. *Nature Methods*, 2005, 2 (8): 587-589.
- [18] HAVLIS J, SHEVCHENKO A. Absolute quantification of proteins in solutions and in polyacrylamide gels by mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2004, 76 (11): 3 029-3 036.
- [19] MAYYA V, REZUAL K, WU L, et al. Absolute quantification of multisite phosphorylation by selective reaction monitoring mass spectrometry [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2006, 5: 1 146-1 157.
- [20] MIRGORODSKAYA O A, KOLMER R, NOVIKOV A, et al. Absolute quantitation of proteins by a combination of acid hydrolysis and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2004, 76 (13): 3 569-3 575.
- [21] NAVAZA A P, ENCINAR J R, SANZ-MEDEL A. Absolute and accurate quantification of protein phosphorylation by using an elemental phosphorus standard and element mass spectrometry [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46 (4): 569-571.
- [22] SCHAUMLOFFEL D, GIUSTI P, PREUD'HOMME H, et al. Precolumn isotope dilution analysis in nanoHPLC-ICPMS for absolute quantification of sulfur-containing peptides [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(7): 2 859-2 868.
- [23] ROSS P L, HUANG Y N, MARCHESE J N, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2004, 3: 1 154-1 169.
- [24] MAYR B M, KOHLBACHER O, REINERT K, et al. Absolute myoglobin quantitation in serum by combining two-dimensional liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and novel data analysis algorithms [J]. *Journal of Proteome Research*, 2006, 5: 414-421.
- [25] NAKAMURA T, DOHMAE N, TAKIO K. Characterization of a digested protein complex with quantitative aspects: An approach based on accurate mass chromatographic analysis with Fourier transform-ion cyclotron resonance mass spectrometry [J]. *Proteomics*, 2004, 4 (9): 2 558-2 566.
- [26] SILVA J C, GORENSTEIN M V, LI G Z, et al. Absolute Quantification of Proteins by LC-MSE [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2006, 5: 144-156.
- [27] ISHIHAMS Y, ODA Y, TABATA T, et al. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein [J]. *Molecular & Cellular Proteomic*, 2005, 4: 1 265-1 272.
- [28] LIU H, SADYGOV R G, YATES J R. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics [J]. *Anal Chem*, 2004, 76(14): 4 193-4 201.
- [29] LU P, VOGEL C, WANG R, et al. Absolute protein expression profiling estimates the relative

contributions of transcriptional and translational regulation[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25 (1) : 117-124.

[30] STATE D J S, OMENN G S, BLACKWELL T W, et al. Challenges in deriving high-confidence protein identifications from data gathered by a HUPO plasma proteome collaborative study[J]. Nature Biotechnology, 2006, 24(3): 333-338.

=====

## 欢迎订阅 2008 年《中国组织工程研究与临床康复》

《中国组织工程研究与临床康复》杂志是美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘》(EM)、美国《剑桥科学文摘》(CSA)、中国科技论文统计源期刊、中国中文(临床医学类)核心期刊、中国科学引文数据库等收录期刊。

《中国组织工程研究与临床康复》为周刊,每周二出版,2008 年出版重点为:生物材料、组织工程支架材料、口腔生物材料;组织工程产品研制以及组织构建;骨科植入体、脊柱植入体、心/脑/外周血管及血管植入物、人工假体、人工器官;成体干细胞、胚胎干细胞、脐血干细胞、羊膜干细胞、肿瘤干细胞基础及临床研究;器官/组织/细胞移植;康复工程等组织工程方面的研究。

咨询电邮:CRTERtgb@sina.com  
电 话 024-23389106 024-23384352 传 真 024-23388105  
投稿电邮 kf23385083@sina.com kf22838105@sina.com  
国内邮发代号:8-584  
本社订阅:辽宁省沈阳 1200 邮政信箱 邮 编:110004 定 价:12 元/册。  
更多信息见 www.zglckf.com

## 欢迎订阅《中国神经再生研究(英文版)》(NRR)杂志

NRR 杂志由卫生部主管、中国康复医学会主办,全球公开发行。CN 11-5422/R,ISSN 1673-5374,月刊。NRR 具有良好的国际影响力及学科专业影响力,被下列国际及国内的数据库收录:美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘》(EM)、中国英文版科技期刊数据库(统计源期刊)、中国科学引文数据库核心库(CSCD)、中文学术期刊全文数据库(CNKI)、《中国学术期刊文摘(英文版)CSAC》。

2008 年出版重点:神经发育、神经可塑性、神经信号转导研究;突触发育及可塑性、突触信号、突触生理学研究;神经环路发育、神经环路与动物行为研究;树突发育与神经环路形成、神经网络功能研究;视知觉机制、视觉神经生理学研究;感觉系统、感觉整合和行为研究;基底神经核发育及其退行性疾病研究;以及神经系统疾病的神经生物学研究。

重点推出:神经干细胞研究、神经组织工程研究、中医药干预后神经元变化的分子生物学研究、神经再生的相关因子研究。

咨询电邮:sjzs100@163.com 电话:024-23381085 传真:024-23394178  
投稿电邮:sjzs101@163.com; sjzs102@163.com  
国内邮发代号:8-585  
本社订阅:辽宁省沈阳 1234 邮政信箱 邮 编:110004 定 价:15 元/册。  
更多信息详见 www.sjzsyj.com.