

参考文献

[1] 杜永成, 许建英, 延峰. 胰酶冷消化刮刷法分离培养气管上皮细胞的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(9): 1286-1288.

[2] 江千里, 王健民, 江汕, 等. 西司他丁钠+亚胺培南消除细胞培养中细菌污染的研究[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(1): 114-115.

[3] 马强, 刘青松, 蔡燕, 等. 外周血淋巴细胞培养及染色体制备的几点体会. 国际检验医学杂志, 2011, 32(14): 1641-1642.

[4] 王恩军, 靳祎, 王亮. 氟康唑去除细胞培养中的真菌污染[J]. 河北职工医学院学报, 2007, 24(4): 7-8.

[5] Fortún J, Ruiz I, Martín-Dávila P, et al. Fungal infection in solid organ recipients[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2012, 30(Suppl 2): 49-56.

[6] 邵荣标, 钱勍虎, 吴巨飞, 等. 细胞培养法真菌污染控制初探[J]. 南通医学院学报, 2002, 22(3): 278-280.

[7] Uphoff CC, Drexler HG. Elimination of mycoplasmas from infected cell lines using antibiotics[J]. Methods Mol Biol, 2011, 88(7): 327-334.

[8] Degeling MH, Maguire CA, Bovenberg MS, et al. Sensitive assay for Mycoplasma detection in Mammalian cell culture[J]. Anal

Chem, 2012, 84(9): 4227-4232.

[9] 刘岚, 陈绍坤, 余红. 贴壁细胞培养过程中支原体污染的几种救治方案疗效比较研究[J]. 现代医药卫生, 2008, 24(8): 1221-1222.

[10] 赵俊, 王兴满, 胡勇. 动物细胞培养物中支原体污染的检测[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(3): 1151-1153.

[11] Charlemroij R, Oplatowska M, Kumpoosiri M, et al. Comparison of techniques to screen and characterize bacteria-specific hybridomas for high-quality monoclonal antibodies selection[J]. Anal Biochem, 2012, 421(1): 26-36.

[12] 敖弟书, 吴中明, 王玉. 一种罕见细胞污染的发现及处理-香味菌污染[J]. 遵义医学院学报, 2007, 30(1): 81-83.

[13] Archambault M, Harel J, Gouré J, et al. Antimicrobial susceptibilities and resistance genes of Canadian isolates of Actinobacillus pleuropneumoniae[J]. Microb Drug Resist, 2012, 18(2): 198-206.

[14] Tang YZ, Liu YH, Chen JX. Pleuromutilin and its derivatives-the lead compounds for novel antibiotics[J]. Mini Rev Med Chem, 2012, 12(1): 53-61.

(收稿日期: 2012-01-09)

• 综 述 •

基于 SISCAPA 技术的疾病标志物的转化医学研究*

王馨悦, 韩 冰 综述, 王立顺[△] 审校

(上海交通大学医学院附属瑞金医院细胞分化与凋亡教育部重点实验室, 上海 200025)

关键词: 质谱分析; 抗肽抗体; 免疫亲和富集; 稳定同位素标记; 转化医学
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 20. 039 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2012)20-2524-03

基于蛋白质组学技术的基础生物研究筛选出了大量蛋白候选标志物, 由于缺乏有效的验证手段, 阻碍了其在疾病诊断、临床处理和疾病预后中的应用。目前, 验证疾病候选标志蛋白主要依赖于免疫学分析方法, 如 ELISA。但对所有候选标志物都开发 ELISA 法, 是不切合实际的, 因为抗体开发费用高昂, 耗时长, 成功率低^[1-3]。这些因素导致大量的蛋白质标志物研究只能滞留在发现阶段而无法进入临床实践。现阶段亟须开发一种低成本、耗时短的“桥梁”技术, 填补生物标志物发现和临床应用之间的空白^[2]。多反应监测-质谱技术(MRM-MS)用于蛋白质标志物验证研究具有其独特的优势, 但是 MRM-MS 的敏感性尚不能满足目前临床常用的标志物检测的需求。近年来, 基于 MRM-MS 和同位素标记的标准肽段的蛋白质定量技术得以建立并迅速发展。Anderson 等^[2]开发了稳定同位素标准和用抗肽抗体提取(SISCAPA)技术。这项技术应用免疫亲和法富集和同位素稀释, 并联合 MRM-MS 技术, 达到候选标志物定量的目的^[2, 4]。SISCAPA 已经被证实具有高特异性、敏感性和准确性^[5-8], 同时保持了研发时间短、成本低的特点, 能有效弥补 MRM-MS 和 ELISA 技术的不足, 在不久的将来, 可能作为一种新型的蛋白质标志物转化医学研

究的手段。

1 SISCAPA 技术的基本原理和特点

SISCAPA 是一种复杂蛋白酶解产物中的多肽定量方法。抗肽抗体富集特定的目标肽段, 并加入与目标肽段有相同序列的稳定同位素标记多肽作为内标; 目标肽段从抗肽抗体上洗脱下来后, 用 MRM-MS 方法定性并定量分析天然和标记形式的目标肽段; 根据测定出的天然和同位素标记的目标肽段的丰度比值, 得知目标肽段含量^[2]。MRM-MS 分析起到类似二抗的作用, 有高度特异性, 大大减少了一抗交叉反应带来的弊端, 也降低了对一抗特异性的要求。

因为血清中许多候选标志蛋白在血清中天然以 ng/mL 甚至 pg/mL 级别存在, 远超出了传统质谱的检测范围。SISCAPA 利用抗肽抗体富集, 能实现血清低丰度目标肽段平均 120 倍富集。Whiteaker 等^[4]用磁珠作为连接抗体的固相支持物, 使目标肽段的质谱检测离子信号增强超过 103 倍, 足够定量分析血清中 ng/mL 范围的生物标志物。

2 SISCAPA 技术研发的关键节点

要开发针对一个蛋白质候选标志物的 SISCAPA-MS 方法, 最关键的是“特征性肽段”^[9]和质谱检测 MRM 离子对的选

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81071668, 31170783); 上海科委科技基金(11QH1401700)。 [△] 通讯作者, E-mail: Jywangls@shsmu.edu.cn。

择。“特征性肽段”将作为抗原免疫动物,获得抗体;并以该序列为模板,制备同位素标记的标准肽段作为定量分析的内标;MRM-MS 模式下,“特征性肽段”作为母离子,与其特定的一个或几个离子碎片作为离子对,根据每对离子对的信号做定量分析。选择离子对时,要选择信号最强,重复性最好的离子碎片,且能唯一代表目标肽段。

2.1 “特征性肽段”的筛选 “特征性肽段”肽段除了必须具备序列唯一性及好的重现性外,也应该是每种蛋白质的质谱检测中响应最高的肽段。首先可以参考蛋白质质谱原始数据,筛选特征性肽段^[5-6]。但这种方法选择的“特征性肽段”在复杂样本中的肽段检测的重现性不好^[10]。也可以在质谱试验数据库中筛选^[11],以及运用计算方法预测得到特征性肽段。

PeptideAtlas, GPM, SBEAMS, 和 PRIDE 等等数据库,近年来随着 MRM-MS 有很大发展而日益完善。PeptideAtlas 数据库能鉴定适合的特征肽段,估测目标肽段的大概保留时间,从而支持靶向蛋白质组学的工作流程如选择反应检测(SRM)/MRM;也为 SRM/MRM 选择高质量的离子对列表。其长远目标是通过彻底的验证表达蛋白完成真核生物基因组的完整注释^[12]。GPM 数据库是 1 个开源式的系统,专为分析、储存和确认串联质谱产生的蛋白质信息而设计。现有版本的 GPM 能有效确认多肽和蛋白质序列。SBEAMS 可以看成是收集、储存和访问数据的框架,允许用户在 ISB 核心设备的网络界面上提出一系列实验要求,储存各种类型的实验^[11],也能从中得到蛋白质特征性肽段的信息。PRIDE 是另一个关于蛋白质识别的免费使用的开源数据库。它与人类蛋白质组学研究组织的蛋白质组学标准先锋(HUPO-PSI)紧密联系,允许使用者运用这套标准来传递数据。这个数据库还包括很多的疾病中蛋白质是发生改变的相关信息。

决定能否成为特征性肽段的首要条件就是多肽的理化性质^[9]。将已知肽段的每个氨基酸的理化性质都用数值取代。用 KS 距离和 KL 距离评价各个性质,那些能将特征肽段区分出来的性质,则可作为预测特征肽段的“预报器”。Sanders 等^[13]为特定实验、仪器条件下的蛋白质组数据集建立了分选器。这种有效的新方法,能够精确预测特征肽段被质谱仪检测到的可能性。

2.2 MRM 离子对的选择 MRM 分析之前要经历实验室的发现阶段,根据观察到的肽段在 MS/MS 的表现直接决定 MRM 离子对。这种凭经验的实验方法很有效,但是很主观,又消耗时间和实验资源。现在有商业化的或供应商指定的软件包可供使用,例如 MRMPilot™ 软件(AB SCIEX, Foster City, CA),专门为信号触发的检测和测序技术(MIDAS)工作流程设计理论肽段和相应离子对。根据用户指定的母离子,理论上计算得到相应子离子,之后自动建立 MIDAS 获得方法。联合 Q-TRAP 质谱仪,反复扫描优化,选择合适离子对。MRMaid^[14]是 1 种依据 GAPP 数据库建立的模块工具,提供了基于网络的离子对设计方法,同时预测该离子对的保留时间。与其他软件相比,MRMaid 省去了费时的预实验,不再需要根据已报道试验数据整理候选离子对,而是采取一种特殊的评分算法。TIQAM 工具从 PeptideAtlas 提取数据,根据之前的观察次数,决定候选离子对^[14-15]。如果数据库没有提供数据,只使用理化性质计算理论肽段。TIQAM 与 MRMaid 最根

本的区别是,需要用户用实验获得 MS/MS 数据分离得到合适的候选名单。

Sherwood 等^[16]为三重四级杆质谱仪开发一种软件工具-MaRiMba。MaRiMba 依据下载的或是用户自己建立的谱图文库,能自动化建立 MRM 离子对列表,同时能根据母离子和子离子性质过滤,限制某些蛋白和肽段输出。MaRiMba 也能建立重同位素肽段的相应离子对列表并帮助用户以前所未有的速度设计特定离子对。

2010 年,美国系统生物学研究所与 AB SCIEX 公司合作,使用新一代 Q-TRAP 质谱技术测定了近 20,000 个人体蛋白质,继 PeptideAtlas 之后,又首创全球第一个数据共享的人类多反应监测数据库 MRM Atlas,提供了大量基于质谱的人类蛋白质组信息,使得研究者能够尽可能缩短冗长的开发时间。筛选出的候选离子对,很多不能直接用于定量分析,还需通过 MIDAS 工作流程去检验和优化 MRM 离子对,包括优化每个肽段的 MRM-MS 离子对质谱分析条件,去除不具备特异性的离子对,检验离子对重复性等^[5,15]。但很多筛选出的肽段实际定量过程中不一定适合成为特征性肽段,因此实验室通常针对每种蛋白质评估 3~5 种离子对,确保每个蛋白至少有一个合适的肽段用作定量分析^[5-6]。

2.3 同位素标记肽段 一般,可以直接以特征肽段序列为模板,人工合成含有稳定同位素标记的肽段。也可以使用稳定同位素标记试剂标记目标肽段,常用的稳定同位素方法包括体内通过代谢标记和体外通过化学反应标记两种。体内通过代谢的稳定同位素标记定量方法常用的如细胞培养氨基酸稳定同位素标记(SILAC)^[17]。直接在含有稳定同位素标记的氨基酸的培养基中培养细胞,细胞在生长过程中细胞内的蛋白质被标记。这种方法不适用于分析组织和体液等生物样品。体外化学标记技术可以标记在蛋白质或多肽的特殊氨基酸上。如同位素标记亲和标签技术(ICAT)^[18],即用稳定同位素标记含有半胱氨酸的多肽或蛋白质。但 ICAT 不适用于少数不含半胱氨酸的蛋白质。为了应用更广泛的稳定同位素标记应在多肽 N 端或 C 端。AB SCIEX 公司开发了同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)试剂可以同时标记 4 个多肽,能弥补 ICAT 技术的不足^[19],具有很好的精确性和重复性。近年,AB 公司又推出的 mTRAQ 试剂,能同时标记 8 个样品。

由于稳定同位素标记方法耗费较高,且需要额外步骤将稳定同位素引入样品,非标记定量分析法近来迅速兴起,获得广泛关注。该方法直接利用蛋白质鉴定中产生的数据进行研究。有两类非标记定量方法:基于多肽串联质谱计数的定量方法和基于多肽质谱峰离子强度的定量方法^[20]。一般情况下两种方法结果基本一致,比较而言,前者灵敏性更好,后者定量更准确。

3 SISCAPA 技术的应用及展望

人白细胞介素-33(IL-33)是 1 种新兴的心血管疾病的潜在标志物,由于血清中含量较低,目前尚缺乏适当的免疫学检验方法。Kuhn 等^[21]运用 SISCAPA 策略,同时用 13C5V 或 13C6L 同位素标记选择的序列作为内标肽。检成功检测了血清中低丰度的 IL-33,线性范围为 1.5~5 000 μg/L, CV<13%,结果相关性良好($r=0.89$)。

甲状腺球蛋白是甲状腺癌的肿瘤标志物,由于患者自身抗

体和异嗜性抗原影响,其免疫学检测一直很不理想,影响了其临床应用。Hoofnagle 等^[22]用多克隆抗体发展了第一个基于临床实验室的 SISCAPA 技术,分离血清中的肿瘤标志甲状腺球蛋白,定量限(LOQ)达到 $\mu\text{g/L}$ 级的水平, $\text{CV}<20\%$ 。

蛋白质的异常糖基化可以作为癌症的生物标志物,如金属蛋白酶组织抑制因子 1(TIMP-1)的异常糖基化见于很多肿瘤细胞,但一直缺乏有效分析手段。Ahn 等^[23]根据糖基化蛋白 N 端多聚糖 β -1,6-GlcNAc 尾部,能够被白细胞凝集素(L-PHA)富集,建立了基于 MRM-MS 的 SISCAPA 技术,可检测到 $0.8 \mu\text{g/L}$ 的异常糖基化的 TIMP-1。

就目前而言,基于 MRM-MS 的 SISCAPA 技术拥有充分的敏感性、精确性、高效性和重现性,通量高,能有效弥补 MRM-MS 和 ELISA 技术的不足,填补生物标志物从发现到临床应用之间的鸿沟,对生物标志物的转化医学研究有重要的借鉴意义。新时代要求转化医学的核心任务之一是建立低成本、高通量、重复性高的技术体系,以患者的需求为导向,开展医学实践,在实验室与临床间建立起双向、开放的模式,更精准的预警、诊断和治疗疾病,提高人民的健康水平和生活质量。在今后的研究中,SISCAPA 技术的发展可能突破生物标志物在发现、验证和确认过程中存在的瓶颈,真正使基础研究成果以工业化的规模实现临床验证和确认,推动研究成果从实验室及论文走向企业的生产车间,走进临床和千家万户,为转化医学的发展带来根本性改变。

参考文献

- [1] Ackermann BL, Berna MJ. Coupling immunoaffinity techniques with MS for quantitative analysis of low-abundance protein biomarkers[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2007, 4(2): 175-186.
- [2] Anderson NL, Anderson NG, Haines LR, et al. Mass spectrometric quantitation of peptides and proteins using Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies (SISCAPA) [J]. *J Proteome Res*, 2004, 3(2): 235-244.
- [3] Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1(11): 845-867.
- [4] Whiteaker JR, Zhao L, Zhang HY, et al. Antibody-based enrichment of peptides on magnetic beads for mass-spectrometry-based quantification of serum biomarkers[J]. *Anal Biochem*, 2007, 362(1): 44-54.
- [5] Keshishian H, Addona T, Burgess M, et al. Quantitative, multiplexed assays for low abundance proteins in plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6(12): 2212-2229.
- [6] Anderson L, Hunter CL. Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5(4): 573-588.
- [7] Kuhn E, Wu J, Karl J, et al. Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and ^{13}C -labeled peptide standards[J]. *Proteomics*, 2004, 4(4): 1175-1186.
- [8] Bondar OP, Barnidge DR, Klee EW, et al. LC-MS/MS quantification of Zn-alpha2 glycoprotein: a potential serum biomarker for prostate cancer[J]. *Clin Chem*, 2007, 53(4): 673-678.
- [9] Mallick P, Schirle M, Chen SS, et al. Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics[J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(1): 125-131.
- [10] Malmstrom J, Lee H, Aebersold R. Advances in proteomic workflows for systems biology[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18(4): 378-384.
- [11] Craig R, Cortens JP, Beavis RC. Open source system for analyzing, validating, and storing protein identification data[J]. *J Proteome Res*, 2004, 3(6): 1234-1242.
- [12] Deutsch EW, Lam H, Aebersold R. PeptideAtlas: a resource for target selection for emerging targeted proteomics workflows[J]. *EMBO Rep*, 2008, 9(5): 429-434.
- [13] Sanders WS, Bridges SM, McCarthy FM, et al. Prediction of peptides observable by mass spectrometry applied at the experimental set level[J]. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8 Suppl 7: S23.
- [14] Mead JA, Bianco L, Ottone V, et al. MRMAid, the web-based tool for designing multiple reaction monitoring(MRM) transitions[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8(4): 696-705.
- [15] Lange V, Malmstrom JA, Didion J, et al. Targeted quantitative analysis of *Streptococcus pyogenes* virulence factors by multiple reaction monitoring[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2008, 7(8): 1489-1500.
- [16] Sherwood CA, Eastham A, Lee LW, et al. MaRiMba: a software application for spectral library-based MRM transition list assembly[J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(10): 4396-4405.
- [17] Ong SE, Foster LJ, Mann M. Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics[J]. *Methods*, 2003, 29(2): 124-130.
- [18] 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.
- [19] Ross PL, Huang YN, Marchese JN, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3(12): 1154-1169.
- [20] Old WM, Meyer-Arendt K, Aveline-Wolf L, et al. Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4(10): 1487-1502.
- [21] Kuhn E, Addona T, Keshishian H, et al. Developing multiplexed assays for troponin I and interleukin-33 in plasma by peptide immunoaffinity enrichment and targeted mass spectrometry[J]. *Clin Chem*, 2009, 55(6): 1108-1117.
- [22] Hoofnagle AN, Becker JO, Wener MH, et al. Quantification of thyroglobulin, a low-abundance serum protein, by immunoaffinity peptide enrichment and tandem mass spectrometry [J]. *Clin Chem*, 2008, 54(11): 1796-1804.
- [23] Ahn YH, Lee JY, Kim YS, et al. Quantitative analysis of an aberrant glycoform of TIMP1 from colon cancer serum by L-PHA-enrichment and SISCAPA with MRM mass spectrometry[J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(9): 4216-4224.