

学校编码: 10384

分类号____密级____

学 号: 200325015

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

有机汞作为标签的蛋白质绝对定量分析策略
Strategy for Absolute Quantification of Proteins Using Organic
Mercurial as an MS-Tag

郭 逸 飞

指导教师姓名: 王秋泉 教授

专业名称: 分析化学

论文提交日期: 2010年2月

论文答辩时间: 2010年2月

学位授予日期: 2010年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010年2月

有机汞作为标签的蛋白质绝对定量分析策略

郭逸飞

指导教师 王秋泉教授

厦门大学

**Strategy for Absolute Quantification of Proteins Using
Organic Mercurial as an MS-Tag**

A Thesis Presented

By

Yifei Guo

Supervisor: Professor Qiuquan Wang

Submitted to the Graduated School of Xiamen University for the Degree

of

Master of Science

Feb, 2010

Department of Chemistry, Xiamen University

廈門大學博碩

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密 (), 在 年解密后适用本授权书。
2. 不保密 ()

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名: 日期: 年 月 日

导师签名: 日期: 年 月 日

厦门大学博硕

摘要.....	i
Abstract.....	iii
第一章 前言.....	1
1.1 蛋白质组学向定量发展的新趋势.....	1
1.2 基于双向凝胶电泳的蛋白质组学定量技术.....	2
1.3 基于质谱的蛋白质组学定量技术.....	3
1.3.1 分子质谱在定量蛋白质组学中所采用的定量策略和方法.....	3
1.3.1.1 通过代谢标记引入稳定同位素标签.....	4
1.3.1.2 通过酶解标记引入稳定同位素标签.....	5
1.3.1.3 通过化学标记引入稳定同位素标签.....	6
1.3.1.4 基于质谱的非标记定量技术.....	7
1.3.2 元素质谱在定量蛋白质组学所采用的定量策略和方法.....	8
1.3.2.1 基于金属元素的蛋白质定量技术.....	9
1.3.2.2 基于硒元素的蛋白质定量技术.....	9
1.3.2.3 基于硫元素的蛋白质定量技术.....	11
1.3.2.4 基于磷元素的蛋白质定量技术.....	12
1.3.2.5 基于标记稀土金属的蛋白质定量技术.....	13
1.4 实验依据与主要工作内容.....	15
1.5 参考文献.....	16
第二章 生物分子中自由巯基及二硫键的有机汞标签标记和计数策略.....	24
2.1 引言.....	24
2.2 实验部分.....	26
2.2.1 仪器.....	26
2.2.2 试剂.....	26

2.2.3 有机汞离子标记多肽、蛋白质.....	27
2.2.4 HPLC/ESI-MS 检测有机汞标记的多肽和蛋白.....	27
2.3 结果与讨论.....	28
2.3.1 以有机汞离子为标签直接计数多肽中自由巯基的数目.....	28
2.3.2 以有机汞离子为标签直接计数蛋白中二硫键的数目.....	30
2.3.3 以有机汞离子为标签分别计数蛋白中巯基和二硫键各自的数目.....	34
2.4 结论.....	34
2.5 参考文献.....	35
第三章 以 CH₃Hg⁺ 为标签的蛋白质绝对定量分析方法学研究.....	39
3.1 引言.....	39
3.2 实验.....	40
3.2.1 仪器.....	40
3.2.2 化学试剂.....	41
3.2.3 甲基汞标记蛋白.....	42
3.2.4 CH ₃ HgCl 外标物的配制.....	42
3.3 结果与讨论.....	42
3.3.1 HPLC/ESI-MS 检测蛋白标记后甲基汞与巯基的化学计量比.....	42
3.3.2 ICP-MS 中 Hg 信号强度与其化学结构的非相关性.....	45
3.3.3 HPLC/ICP-MS 对以甲基汞为标签的蛋白进行定量.....	46
3.4 结论.....	47
3.5 参考文献.....	48
第四章 总结与展望.....	53
4.1 总结.....	53
4.2 展望.....	53
在校期间发表的论文.....	55
致谢.....	56

摘 要

由于蛋白质组是一个在空间和时间上动态变化着的整体,因此蛋白质组学研究的核心内容是蛋白质的动态变化和动态行为,并从整体的角度分析其内部蛋白质组成成分、表达水平与修饰状态,从而了解蛋白质之间相互作用与联系,揭示蛋白质功能与细胞生命活动规律。这不仅包括能对整个细胞、组织或完整生物体中所拥有的全部蛋白质进行准确地识别与鉴定,更重要的是能够对蛋白质的表达水平及其存在形式的变化给出定量的描述,毕竟几乎所有重要的生命现象如发育、代谢、信号传导、体内能量转换、神经活动等都关联到众多蛋白质数量或其丰度上的改变。基于以上因素,在蛋白组学研究中蛋白质的定量分析已成为其不可或缺的一部分,重要性日益增加。这一趋势也推动了一系列基于分子质谱的定量方法如 SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino Acid in Cell Culture) 和 ICAT (Isotope-coded Affinity Tag) 等的发展以期能获得可靠的定量数据。这些方法巧妙地解决了蛋白组学在相对定量方面的问题,使研究者能够方便的获得两组对照样品中某些蛋白在量上的改变,但在缺乏合适的内标时上述方法往往无法对蛋白质给出一个直接微观上的量的概念,即不足以解决蛋白质绝对定量方面的问题。为了解决这些问题无机元素质谱尤其是 ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) 被引入蛋白质定量领域。ICP-MS 可通过定量检测蛋白质中的异原子(有别于构成蛋白的 C、H、N、O 等)来实现对蛋白质的精确定量,这些异原子可以是蛋白中已经存在的如 S、P、Se、I 或金属元素,也可以是通过外部标记引入的其它元素。这一思路大大拓展并释放了 ICP-MS 在蛋白质定量领域的应用潜力。

本论文中我们选择有机汞离子作为质谱标签来标记蛋白质,综合运用分子质谱与元素质谱以期对有机汞标记的蛋白质进行绝对定量。全文包含以下几个部分:

第一章主要对定量蛋白质组研究的发展进行综述,阐述蛋白质定量信息的重要性,对各种分析技术进行详细的介绍,并提出了基于有机汞作为标签对蛋白质进行绝对定量的分析策略。

第二章对多种有机汞标签 (RHg^+) 标记多肽、蛋白质中的自由巯基及二硫键的情况进行了研究。由于 Hg 与 S 之间有非常高的亲和性, RHg^+ 与巯基可直接反应且极为高效; 其次配位化学研究表明 RHg^+ 中的中心原子 Hg (II) 为线性配位, 由于 Hg 一端已共价结合了甲基, 这就使 RHg^+ 与 $-\text{SH}$ 的反应严格按照化学计量比 1: 1 进行, 并且有机汞离子不会与蛋白质或多肽中的甲硫氨酸反应形成干扰。以此为基础, 即可利用分子质谱比较标记前后由有机汞离子引起的质量偏移来直接获得蛋白质或多肽中自由巯基的数目; 而且通过蛋白质或多肽经适当还原后释放出的自由巯基数目可推知二硫键的数目。

第三章我们主要验证了利用甲基汞标记蛋白质进行蛋白质绝对定量的可行性。上一章的实验结果显示甲基汞在所选用的有机汞探针中是体积最小, 同蛋白质中巯基结合能力最强的一种。当把蛋白质还原后甲基汞能将所有的巯基严格按照化学计量比 1:1 进行标记, 这可由 ESI-MS (Electrospray Ionization Mass Spectrometry) 毫无疑义地加以确认。在蛋白质中巯基数目已知, 甲基汞与巯基 1:1 结合情况下, 我们可以利用 ICP-MS 通过检测 Hg 的量来获得蛋白质的量。由于在 ICP-MS 中 Hg 的信号强度与其化学形态没有相关性, 我们可以非常方便地用 CH_3HgCl 作为外标物来获得蛋白质中 Hg 的量。我们分别选用了三种含不同数目二硫键的蛋白进行了验证, 即核糖核酸酶 A、溶菌酶、牛胰岛素, 检测限(3σ) 分别为 0.6, 1.2, 和 0.4 pmol。

第四章总结了本硕士论文的研究工作, 对其不足进行了检讨, 并对将来进一步研究工作进行了展望。

关键词: 有机汞标签 有机分子质谱 无机元素质谱 蛋白质绝对定量

Abstract

Absolute protein quantification is a hot topic of fast growing interest in the field of quantitative proteomic study. The quantitative profile of proteome is expected to provide new functional insights into biological processes, facilitating the identification of diagnostic or prognostic disease markers. The recognition of the fact that protein analysis must “turn quantitative” has boosted the developing more and more sophisticated analytical methods based on molecular mass spectrometry in the past few years in order to obtain reliable quantitative results. These methods so far resorting to stable isotope labeling techniques such as ICAT and SILAC are elegant for relative quantification but not appropriate for “absolute” quantification. To add a quantitative dimension to proteomics, the idea using element-selective mass spectrometric detection (e.g. ICP-MS) to achieve absolute protein quantification has been realized, and ICP-MS stands now as a new tool in the field of quantitative proteomics. More generally, the accurate quantification of peptides and proteins can be accomplished via a covalently bound ICP-MS detectable heteroatom (any element different from the main constituents of organic matter: C, H, N or O), either already present (such as sulfur, phosphorus, selenium, iodine, or metals) or added as a tag. The ICP-MS determination of these heteroelements is enjoying increased interest for absolute protein quantification.

In this thesis, monofunctional organic mercury ion RHg^+ was chosen as element mass spectrometric tag for labeling proteins to achieve absolute protein quantification by integrating elemental mass spectrometry together with molecular mass spectrometry. It consists of four chapters as below.

In Chapter One, the development of quantitative proteomics was introduced; the analytical techniques for relative quantification and absolute quantification of proteins have also been reviewed. Research proposal was thus made for this thesis, aiming to develop a strategy for the absolute protein quantification using RHg^+ as an MS-tag.

In Chapter Two, the strategy using RHg^+ as an mass-tag was proposed for counting the free sulfhydryl(s) (-SH) and disulfide bond(s) (-S-S-) of a protein. RHg^+ tag can react specifically with free -SH(s) of a protein with high affinity. Using RHg^+ as a tag has the advantages of only reacting with one sulfhydryl group, offering definite mass shift, and stable and characteristic nonradioactive isotopic distribution. Mass spectrometric analysis of derivatized sulfhydryls in peptides/proteins is an alternative for quantitatively counting the number of sulfhydryl groups and disulfide bonds. Here the tags used include methylmercury chloride, ethylmercury chloride, and 4-(hydroxymercuri) benzoic acid. The feasibility of this strategy was demonstrated by counting -SH and -S-S- in model peptides/proteins, i.e. glutathione, phytochelatins and lysozyme, which contain increasing -SH and various -S-S- linkages.

In Chapter Three, we demonstrate a proof of concept for the absolute quantitative analysis of proteins via CH_3Hg^+ labeling and integrated application of molecular and elemental mass spectrometry. The smallest size of CH_3Hg^+ among monoalkyl mercurials and the specific and covalent interaction with -SH in proteins results in forming a simple complex of CH_3Hg^+ : -SH =1:1 when all -SH are exposed, as confirmed by ESI-MS. Based on the known number of -SH per protein, the absolute protein concentration can be obtained via Hg determination using ICP-MS, in which CH_3HgCl could be simply used as an external standard. When insulin, bovine pancreatic ribonuclease A, and lysozyme which have an increasing number of various disulfide linkages in their molecules, were taken as model proteins, their corresponding absolute detection limits (3σ) reached 0.6, 1.2 and 0.4 pmol, respectively. These characteristics may be expected to provide an alternative approach for absolute protein quantification, especially specific biomarker determination, in the near future.

In Chapter Four, a summary of this thesis was concluded and the developing trend was also discussed.

Keywords: monofunctional organic mercury ion RHg^+ ; molecular mass spectrometry; elemental mass spectrometry; absolute protein quantification.

第一章 前言

1.1 蛋白质组学向定量发展的新趋势

随着人类基因组计划的完成,基因组功能的阐明已经成为生命科学研究中一项极为重要的任务,而仅从基因组序列的角度根本无法完整、准确地揭示生物体的功能。要想真正揭开生命现象的奥秘,需要系统地认识基因组的产物—蛋白质组^[1]。由于蛋白质组是一个在空间和时间上动态变化着的整体,因此蛋白质组学的核心内容是蛋白质的动态变化和动态行为,并从整体的角度分析其内部蛋白质组成成分、表达水平与修饰状态,进而了解蛋白质之间相互作用与联系,揭示蛋白质功能与细胞生命活动规律^[2]。基于以上因素定量蛋白质组学这一概念应运而生^[3],它所要达成的目标不仅包括能对整个细胞、组织或完整生物体中所拥有的全部蛋白质进行准确地识别与鉴定,更重要的是能够对蛋白质的表达水平及其存在状态的变化给出定量的描述,毕竟几乎所有重要的生命现象如发育、代谢、信号传导、体内能量转换、神经活动等都关联到众多蛋白质数量或其丰度上的改变^[4-5]。定量蛋白质组学的出现标志着蛋白质组学技术的不断完善和发展,定量蛋白质组学所提供的信息将为人们理解生命体增值、分化、衰老和凋亡等重大生命活动,生命体众多生理功能的产生以及各种病理性变化提供更加宽广的视角,这必将会广泛而深远地推动整个生命基础科学的研究发展。

图 1-1 为 1998 至 2008 年在定量蛋白组学领域 ISI 文献检索结果(以 quantitative 和 proteomics 为关键词)。这一结果表明该领域正在逐渐成为人们关注的研究热点,尤其在最近几年该领域得到了近乎井喷式的发展,各种对蛋白质进行相对定量及绝对定量的方法策略相继涌现并得以蓬勃发展。这里相对定量指的是通过比较样品之间相关肽段或蛋白的信号强度从而能够对其表达量的相对变化进行比较分析。绝对定量指的是能够真实给出所测蛋白的绝对量或浓度。

目前来说,研究中应用比较成熟的定量策略和方法主要有两种。一种是基于传统双向凝胶电泳及染色基础上的定量方法^[6],另外一种是基于质谱检测技术的定量方法^[7-10]。

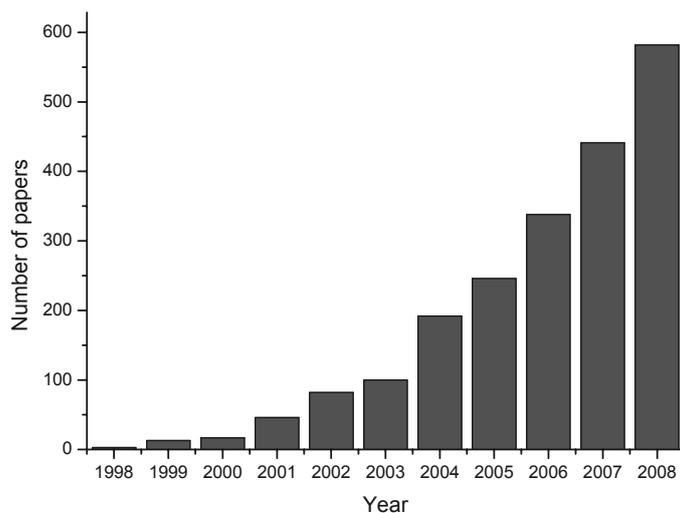


图 1-1 ISI 数据库中有关定量蛋白质组学论文数量在近十年中的检索结果

Fig. 1-1 Number of peer reviewed papers listed in the ISI database over the last ten years on quantitative proteomics (search terms in Title, Abstract, Keywords: quantitative and proteomics).

1.2 基于双向凝胶电泳的蛋白质组学定量技术

双向凝胶电泳技术 (two-dimensional gel electrophoresis, 2DE) 利用蛋白质的等电点和分子量差别将各种蛋白区分开来, 并通过染色显示出来。染色在显示蛋白存在的同时, 还提供了其表达水平的信息, 并可通过比较不同胶上蛋白质点的染色强度来进行相对定量。现有的染色方法包括考马斯亮蓝染色、银染及荧光染色等。传统的考马斯亮蓝染色灵敏度较低尤其对低丰度蛋白, 银染的灵敏度虽然较高但不适用于蛋白的定量研究, 因为其动态响应范围太窄^[11], 为了克服这些不足, 目前已发展出多种灵敏度高、线性范围宽的荧光染料^[12-13]。Unlu 等利用荧光染料提出利用双向荧光差异凝胶电泳 (Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis, 2D-DIGE) 进行定量蛋白质组学分析的方法^[14]。差异凝胶电泳是对双向凝胶电泳在技术上的改进, 2D-DIGE 结合多重荧光分析的方法, 在同一凝胶上同时分离多个分别由不同荧光标记的样品, 用来检测蛋白在两种样品中表达情况, 并第一次引入了内标的概念^[15]。DIGE 的内标是将试验中所有样品取等量混合, 单独用一种荧光染料标记, 和所有样品一起电泳。这意味着所有样品

中的蛋白质点都会有对应的内标。通过内标可以方便的对胶内不同荧光染料标记的样品和胶间样品进行归一化定量，而且不同凝胶之间的匹配也得以简化。传统双向电泳技术可分别在等电点和分子量两个方向上对蛋白质组进行分离，然而在定量准确性上并不尽如人意。内标在双向电泳中的引入，大大提高了结果的定量准确性，可靠性和重复性，有效降低了系统误差，给双向电泳增加了第三维方向，确保了实验结果的可信度^[16-19]。

尽管双向凝胶电泳是蛋白质组学最经典的技术手段，在蛋白质组学的研究当中始终占据着重要的地位，但是双向凝胶电泳技术本身也存在一些难以克服的缺陷，不利于进行蛋白定量研究。这主要表现在两个方面：在分离方面，双向凝胶电泳对于低丰度蛋白、对于极大蛋白(相对分子质量>200 kDa)、极小蛋白(相对分子质量<8 kDa)、对某些碱性蛋白和疏水性蛋白(膜结合蛋白和跨膜蛋白)都难以进行有效分离分析^[20-26]，而且双向凝胶电泳在定量方面受到灵敏度及重现性较大限制^[27-28]。另一方面，双向凝胶电泳操作费时费力，难以实现和质谱直接联用，不易自动化^[29]。

1.3 基于质谱的蛋白质组学定量技术

1.3.1 分子质谱在定量蛋白质组学中所采用的定量策略和方法

分子质谱如 ESI-MS (electrospray ionization mass spectrometry), MALDI-MS (matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry) 已成为研究蛋白质组学不可或缺的关键工具。但由于 ESI 源和 MALDI 源中复杂的基质效应、化学背景及蛋白自身的物理化学性质差异等影响因素，导致各种蛋白的电离效率有明显的不同，这就使分子质谱所测得的信号强度与蛋白的量之间没有严格的线性关系，不能利用分子质谱直接进行蛋白定量。在分子质谱中更多的是采用稳定同位素标记进行相对定量的策略^[30]。大多数稳定同位素标记技术的基本原理可归结为：样品在酶解前或酶解后用含有某种重质同位素（如 ^2H , ^{13}C , ^{15}N , 和 ^{18}O ）的试剂标记，而对照组的样品则用正常的同种试剂(即其中所有元素的含量皆为天然丰度)标记；两组样品除了在质量上相差确定的几个道尔顿外,其他的物理、化学性质几乎完全相同，在标记后的诸多分离纯化过程中，其行为很相似；由于

质量数的差异,在质谱图上表现为一对峰,峰的间距由样品中所含的重质同位素的个数决定;通过比较各自峰的强度,两组样品的相对丰度得以确定^[31-36]。

目前,各种不同的稳定同位素标记方法应用范围极广,根据其不同的标记方法可分为以下几种。

1.3.1.1 通过代谢标记引入稳定同位素标签

代谢标记技术属于体内标记,体内标记是指细胞或者个体在含有稳定同位素的介质中生长,稳定同位素被掺入合成的蛋白质,从而充当了蛋白质定量的内部标准。代谢标记技术广泛应用于对照培养细胞中蛋白表达的相对定量,最近代谢标记技术正朝着有机体整体标记的方向发展,已经在一些模型物种如 *Caenorhabditis elegans* 和 *Drosophila melanogaster*, 甚至小型哺乳动物 *Rattus norvegicus* 中得以验证^[37-38]。常见的代谢标记方法有 ¹⁵N 体内代谢标记和细胞培养中稳定同位素标记氨基酸 (Stable Isotope Labeling By Amino Acids In Cell Culture, SILAC) 的方法

SILAC 是由 Ong 等人发明的一种体内标记定量技术 (stable isotope labeling by amino acid in cell culture) ^[39]。这种方法采用在培养介质中加入稳定同位素标记的必需氨基酸,主要用于高等动物细胞中蛋白质的鉴定及定量。因为高等动物细胞的生长中需要一些必需氨基酸,如赖氨酸(Lys)、亮氨酸(Leu)、苯丙氨酸(Phe)等,而它本身无法合成这些必需氨基酸,需要从外界摄入补充。因此,在培养细胞时可以在培养介质中特异的加入用稳定同位素标记的某一种或者几种必需氨基酸,在经过适当的培养时间,细胞中的蛋白质被标记完全后,收获稳定同位素标记的细胞样品。与正常介质中培养收获的的细胞样品混合酶解,质谱鉴定时就可以从质谱图上得到成对出现的肽段信号峰,再通过相应的软件就可以得到蛋白质相对定量信息。相比较而言,用 Lys 来标记明显好于其他的必需氨基酸,因为当用胰蛋白酶(Trypsin)酶切时,保证了含有 Lys 残基的每个肽段都只含有一个标记物,从而避免了未知肽段其他标记所带来的质量变化不清等类似问题,而且有利于蛋白质做 MS/MS 鉴定时质谱图的解析。

SILAC 采用的稳定同位素标记的氨基酸与天然氨基酸化学性质基本相同,对细胞无毒性,因而它所标记的细胞和未标记细胞在生物学行为上几乎没有差异。

与化学标记相比, SILAC 方法蛋白需要量明显减少。标记效率可高达 100%。SILAC 方法为活体标记, 更接近样品真实状态, 但目前只适用于活体培养的细胞, 而对于生物医学研究中常用的组织样品, 体液样品等无法分析。Ishihama 等发明了一种拓展的 SILAC 技术, 称为 culture-derived isotope tags (CDITs), 该技术以稳定同位素标记的细胞样品为内标, 实现了对实际疾病状态下组织样品的定量^[40]。

另一种代谢标记方法是 ^{15}N 体内代谢标记, 它采用富含 ^{15}N 的营养介质来培养酵母、细菌和哺乳类等细胞, ^{15}N 作为唯一的氮来源被掺入合成的蛋白质中, 从而充当其定量的内部标准。蛋白质每掺入一个 ^{15}N , 所在的肽段将比正常 ^{14}N 的相同肽段大一个质量单位, 使得不同培养状态来源的肽段得以区分。肽质谱峰信号成对出现, 根据质谱峰的信号强度可进行相对定量^[37]。但是这种体内标记策略有一个明显的缺点, 对于相同肽段的不同同位素标记形式之间的质量差异依赖于氮原子数目, 因此对未知的蛋白质难以进行定量。

总的来说, 体内标记相对于体外标记方法具有一些自身的优势, 它省去了标记化学反应和分离纯化等步骤, 因而减少了样品的损失。同时, 体内标记也存在一些缺点。首先, 它不能对组织来源的蛋白质进行分析; 其次, 培养细胞在富含稳定同位素的介质中生长, 这些介质可能会影响细胞的繁殖和其他生物进程, 由此改变蛋白质的表达水平^[41]; 第三, 这种方法受到同位素材料成本的限制, 若对整个动物个体进行标记花费高昂; 最后, 对于未知序列肽段, 大多数的体内标记都无法确定标记物与肽段之间量的关系, 从而使得我们难以确认同一肽段在质谱图上成对出现的不同同位素标记形式。

1.3.1.2 通过酶解标记引入稳定同位素标签

将稳定同位素 ^{18}O 引入肽段可通过在 H_2^{18}O 中酶解这一简单方法实现, 而对照组则在普通的 H_2^{16}O 中酶解。在 H_2^{18}O 中酶解时, 在蛋白酶的催化作用下, 碳端羧基上的 2 个氧被置换成 ^{18}O 。总的来说所有丝氨酸蛋白酶如胰酶、胰凝乳蛋白酶和 GluC 酶都可在酶解中将 ^{18}O 引入肽段。图 1-2 给出了反应原理。虽然上述方法简单易行, 但是由于 ^{18}O 标记水价格十分昂贵, ^{18}O 标记过程不能保证将羧基的两个氧都置换掉, 且 ^{18}O 标记后质量差值较小 (2 或 4 Da) 可能导致同位

素峰和对照峰在质谱图上产生重叠，这些都限制了这一方法的应用^[42-45]。

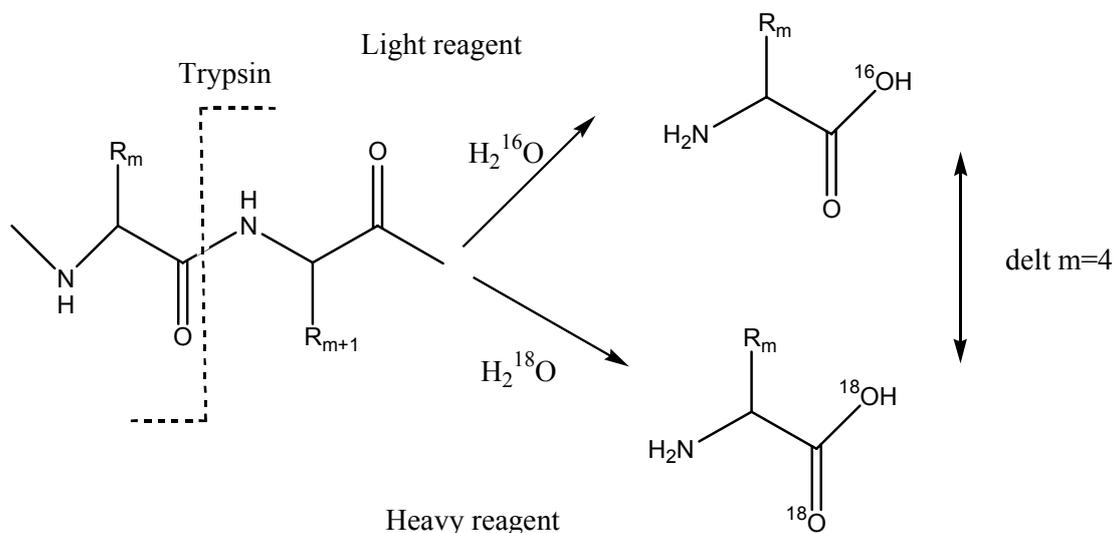


图1-2 ^{18}O 通过酶解标记引入肽段的原理。

Fig. 1-2 Reaction scheme of the ^{18}O water labeling approach based on the application of serine proteases.

1.3.1.3 通过化学标记引入稳定同位素标签

化学标记是指通过化学衍生的方法将稳定同位素 (2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O) 修饰的基团标记到蛋白中特定的氨基酸残基。衍生反应常通过琥珀酰亚胺或者异硫氰酸酯作为桥接基团特定标记蛋白中的赖氨酸残基，另一个常用的衍生位点是蛋白质半胱氨酸残基中的自由巯基 ($-SH$)，通常用马来酰亚胺或碘乙酰胺作为桥接基团以便与 $-SH$ 形成共价连接。目前这一方法已被大规模地应用于蛋白质组学的相对定量研究。

Gygi 等人用化学方法合成一种能和半胱氨酸反应的亲和试剂，称为稳定同位素编码的亲和标签 (isotope-coded affinity tag, ICAT)^[46]，其结构主要由 3 部分构成：头部是和巯基反应的基团，使试剂共价结合在蛋白质侧链上；中间的连接部分是同位素标记接头，分为轻链和重链(稳定重同位素)两种形式：一种带 8

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩