

小鼠饲养过程中蛋白质组的整体重稳定性同位素标记

樊锋旭^{1,2,3*}, 高慧英^{2*}, 徐忠伟^{2,3}, 翟琳辉^{2,3}, 衣泰龙^{2,3}, 张涛^{2,3}, 吴飞林², 崔春萍², 徐平^{1,2,3}

1 安徽医科大学, 安徽 合肥 230032

2 军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850

3 北京蛋白质组研究中心, 北京 102206

樊锋旭, 高慧英, 徐忠伟, 等. 小鼠饲养过程中蛋白质组的整体重稳定性同位素标记. 生物工程学报, 2014, 30(10): 1602-1611.

Fan FX, Gao HY, Xu ZW, et al. Feeding mouse with stable isotope labelled with amino acid. Chin J Biotech, 2014, 30(10): 1602-1611.

摘要: 文中探讨了稳定同位素代谢标记 (SILAC) 定量技术在哺乳动物模型上的应用, 建立了可用于疾病模型比较蛋白质组学研究的定量内标。用含 1% ¹³C₆-Lysine 的 SILAC 鼠粮饲养 C57BL/6J 雌性小鼠, 记为 F0 代, 通过与雄性小鼠交配繁殖出 F1 代, 相同方法繁殖出 F2 代标记小鼠。分离 F2 代小鼠的大脑、肺脏、心脏、胃、小肠、肝脏、脾脏、肾脏和肌肉组织, 提取各组织的全蛋白, 进行蛋白酶 Lys-C 酶切, 利用高效液相色谱串联质谱联用技术 (LC-MS/MS) 进行鉴定和定量分析。对蛋白质定量结果进行高斯拟合确定均值及标准差, 得出不同脏器和小鼠整体的标记效率, 肝脏的标记效率最高, 为 96.34%±0.90%; 大脑标记效率最低, 为 92.62%±1.98%, 小鼠整体标记效率为 95.80%±0.64%, 符合 SILAC 标记效率不低于 95% 的国际标准。成功地将 SILAC 方法从微生物和细胞系水平拓展到哺乳动物模型, 这为基于动物模型研究疾病发生、发展机制提供了有力工具。

关键词: 稳定同位素代谢标记, C57BL/6J 小鼠, 定量蛋白质组学, 标记效率

Received: December 23, 2013; **Accepted:** March 10, 2014

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CB910600), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31070673, 31170780).

Corresponding author: Ping Xu. Tel: +86-10-83147777-1314; Fax: +86-10-80705155; E-mail: xupingghy@gmail.com

Chunping Cui. Tel: +86-10-68158312; Fax: +86-10-68158311; E-mail: cui_chunping2000@yahoo.com.cn

*These authors contributed equally to this study.

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CB910600), 国家自然科学基金 (Nos. 31070673, 31170780) 资助。

Feeding mouse with stable isotope labelled with amino acid

Fengxu Fan^{1,2,3*}, Huiying Gao^{2*}, Zhongwei Xu^{2,3}, Linhui Zhai^{2,3}, Tailong Yi^{2,3}, Tao Zhang^{2,3}, Feilin Wu², Chunping Cui², and Ping Xu^{1,2,3}

1 Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui, China

2 Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

3 Beijing Proteome Research Center, Beijing 102206, China

Abstract: The stable isotope labeling by amino acids in culture (SILAC) based quantitative proteomics serves as a gold standard because of the high accuracy and throughput for protein identifications and quantification. In this study, we discussed the application of SILAC technology in mammal model, and developed quantitative internal standard for comparative proteomics of disease model. The C57BL/6J mice fed by special diet containing the ¹³C₆-Lysine and bred F2 generation. We identified and analyzed total proteins of 9 mice tissues of F2 generation, including brain, lung, heart, stomach, intestine, liver, spleen, kidney, and muscle. Quantitative analysis information could evaluate the mice and different tissues' labeling efficiency. Liver was the most efficient, brain the least, and the labeling efficiency were 96.34%±0.90% and 92.62%±1.98% respectively. The average of the labeling efficiency of F2 generation was 95.80%±0.64%, which met the international standard (95%) for SILAC quantitative proteomics effective study. SILAC technology was successfully extended to mammalian model system, which will provide powerful tools for the mechanism study of the pathophysiology process with mouse model.

Keywords: stable isotope labeling by amino acids in culture (SILAC), C57BL/6J mouse, quantitative proteomics, labeling efficiency

蛋白质组学是继基因组学后出现的一门在整体水平上研究细胞内蛋白质组成及其活动规律的新兴学科^[1-2]。定量蛋白质组学是对细胞、组织或体液等生物样本在某些过程中蛋白质的含量进行比较分析。定量蛋白质组学中最常用的是基于稳定同位素代谢标记 SILAC (Stable isotope labeling with amino acids in cell culture) 方法,使用轻、重稳定性同位素合成的氨基酸标记不同来源的体外培养细胞。由于轻、重稳定性同位素标记肽段具有完全一致的物理化学性质,因此在色谱分离过程中能够被共洗脱出来,同时经离子化而进入质谱被检测,但重稳定性同位素标记蛋白质的肽段与轻标记肽段的离子在质量上会出现偏移,因此可辨识不同处理的样品来源。而这些成对离子在质谱图中的信

号强度与各自的含量相关,因此可用于样品丰度的定量分析^[3-4]。SILAC 方法具有样本需求量少、定量结果准确、重复性好等诸多优点,已经成为定量蛋白质组学研究中的金标准^[5]。然而在体外培养的细胞难于复制机体复杂的内环境,亦无法反映研究模型的生长发育阶段、生理甚至心理状态等要素,使得基于细胞水平的 SILAC 定量蛋白质组学并不能完整阐释生理状态下生物的生长、发育过程和疾病的发生发展过程的蛋白质功能调控及其规律^[6]。因此,基于动物水平 SILAC 标记技术的发展极为重要。

小鼠的生理生化和发育过程与人类相似,并且基因组和人类 90%同源,所以人类疾病的小鼠模型可真实模拟人类疾病的发病过程^[7-8]。但由于技术限制,目前国内尚无整体小鼠

SILAC 标记研究的报道,而国外 SILAC 小鼠购买价格昂贵,动物源性材料引进的风险等诸多因素和限制,使得我国蛋白质组学科学家难于开展 SILAC 小鼠的定量蛋白质组学研究发展。本研究旨在通过评价 SILAC 小鼠制备方法及其标记的心、肝、脾、肺和肾等脏器的标记效率,研究整体小鼠标记过程中蛋白质组水平的标记特性,并通过构建接近完全标记的 SILAC 小鼠,为肿瘤、心血管、代谢疾病以及老年病等定量蛋白质组学研究提供重稳定性同位素标记的蛋白质组学内标样品,促进我国相关疾病发病机制的系统而深入的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 小鼠品系基本情况

SPF 级 C57BL/6J 品系雌性小鼠 4 只,4 周龄,12-14 g;雄性小鼠 2 只,4 周龄,13-15 g,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,许可证号 SCXK-(军)2012-0004,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 小鼠 SILAC 鼠粮

含有 1% $^{13}\text{C}_6$ -Lysine (纯度 98%) 重标鼠

粮购自于 Silantes 公司 (Munich, German 网址: <http://www.silantes.com/>)^[9-10]。鼠粮在 4 °C 保存。

1.1.3 主要试剂与仪器

色谱级乙腈、甲醇、十二烷基硫酸钠 (SDS)、甲叉双丙烯酰胺和丙烯酰胺、碳酸氢铵 (NH_4HCO_3) 均购自 Sigma-Aldrich 公司;质谱级蛋白质酶 Lys-C (Wako 公司);二硫苏糖醇 (DTT) 和碘乙酰胺 (IAA) 为 Amresco 公司产品;蛋白酶抑制剂 Cocktail 购自 Roche 公司;超声破碎仪为宁波新芝生物科技有限公司 JY98-IIIDN 型号的产品;高精度质谱仪 LTQ Orbitrap Velos 为 Thermo Fisher Scientific 公司产品;超高压纳升级高效液相色谱仪 (Ultra-high Performance Liquid Chromatography) 为 Waters 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 小鼠饲养方法

小鼠于屏障级设施内饲养,二级动物饮水标准,每周换水 2-3 次,雌雄小鼠分别喂食含有 1% $^{13}\text{C}_6$ -Lysine 的重稳定性同位素标记的 SILAC 鼠粮和 SPF 级繁殖饲料,每周添料 3-4 次。如图 1 所示,饲养至 8 周龄,将 1 只成熟期雄鼠

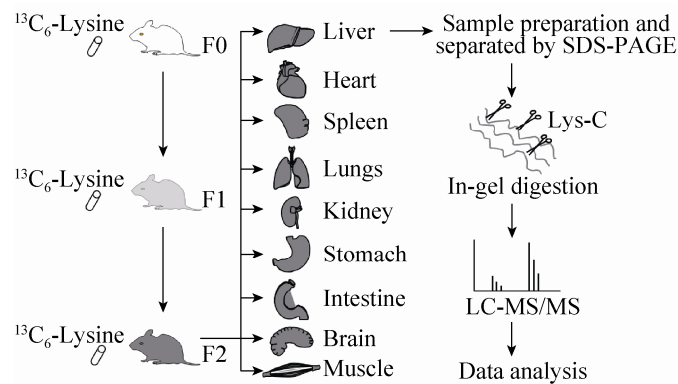


图 1 SILAC 小鼠代谢标记以及标记效率检测流程图

Fig. 1 Overview of the SILAC labeling and labeling efficiency examination workflow.

与2只喂食SILAC鼠粮的标记小鼠(记为F0代)合笼,隔日以阴道栓检测有无受孕情况。受孕后及时取出雄性小鼠,隔离。雌性受孕小鼠成功受孕后继续饲喂SILAC鼠粮,直到生产仔鼠,为F1代。挑选F1代雌性小鼠,继续以SILAC鼠粮喂养至8周龄,与雄鼠交配后生产,为F2代标记小鼠。

1.2.2 小鼠组织分离及蛋白提取

选取5周龄F2代小鼠,经过眼球摘除法取血,降低血清中高丰度蛋白对于后续实验的影响。如图1所示,眼科剪分离出大脑、肺脏、心脏、胃、小肠、肝脏、脾脏、肾脏和肌肉(臀大肌)组织,磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer solution, PBS)清洗残留血液,滤纸吸干后置于液氮中速冻,然后放入 -80°C 冰箱冻存。

取上述9种组织各0.3 g,置于盛有液氮的研钵中速冻,均匀研磨成粉状,加入500 μL 蛋白质裂解液(8 mol/L 尿素、50 mmol/L NH_4HCO_3 、蛋白酶抑制剂和5 mmol/L IAA),冰浴条件下进行超声破碎细胞,功率300 W,工作1 s,间歇5 s,60个循环。细胞破碎后 4°C 低温 $12\,000\times g$ 离心10 min,收集上清,分装后置于 -80°C 贮存备用。

1.2.3 蛋白质组样品制备

样品制备参考Zhai等^[11]的方法进行,取分装9种组织全蛋白各10 μL ,加入10 mmol/L的DTT, 50°C 恒温水浴5 min,冰浴冷却后加入IAA(终浓度20 mmol/L)避光反应0.5 h。再加入10 μL 2 \times SDS上样缓冲液,均匀混合后,采用10% SDS-PAGE电泳,待样品入分离胶1 cm时停止电泳。再经考马斯亮蓝G250染色、脱色后,将胶条均分成1 mm^3 胶粒,脱色、干燥。为确保每个来自SILAC样品的肽段可用于定

量,我们选用对赖氨酸特异的Lys-C蛋白酶进行酶解、抽提肽段,蒸干后置于 -20°C 保存备用。

1.2.4 LC-MS/MS分析

肽段样品用高效液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)进行检测。液相色谱柱采用柱内径为75 μm 、长15 cm的 C_{18} 反相色谱柱, C_{18} 填料颗粒大小为1.9 μm ,孔径200 \AA 。将样品用适当体积的1%乙腈和1%甲酸的水溶液溶解后,取3 μL 上样。流动相A为2%乙腈和0.1%甲酸的水溶液;流动相B为0.1%甲酸的乙腈溶液。使用60 min的梯度洗脱样品:0–3 min, B相由0%升至3%;3–12 min, B相从3%升至12%;20–55 min, B相从12%升至40%;55–58 min, B相从40%升至80%;58–60 min, B相维持80%,流速0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。洗脱组分经纳升级电喷雾离子源(NSI)接口喷出,进入LTQ Orbitrap Velos分析。质谱采用一级质谱数据依赖的二级质谱扫描模式(Data dependent MS/MS scan)碰撞诱导裂解(CID)模式碎裂一级离子。一级质谱扫描范围(300–1 600 m/z),分辨率设置为30 000;自动增益控制(Automatic gain control, AGC)为 10^6 。依次选取一级信号强度最高的15个离子进行二级碎裂分析,碰撞归一化能量(NCE)为35%;AGC为5 000;最大离子注射时间为25 ms,动态排除为30 $\text{s}^{[12]}$ 。

1.2.5 蛋白质的鉴定和定量分析

使用SorcererTM-SEQUEST[®](version 4.0.4 build, Sage-N Research, Inc.)搜索引擎对质谱产出的数据文件(.raw)进行蛋白质的数据库搜索,数据库采用从NCBI下载的小鼠蛋白序列数据库(Version: 20110718)。搜库参数采用固定修饰为半胱氨酸的烷基化修饰(+57.021 46 Da),Lys-C特异性半酶切, $^{13}\text{C}_6$ -Lysine修饰

(+6.020 13 Da);可变修饰为甲硫氨酸氧化修饰(+15.994 92 Da);母离子质量误差 20 ppm,子离子质量误差 0.5 Da,允许最大漏切位点数目为 2 个,肽段长度 6 个氨基酸,肽段最大修饰数目为 4 种。搜库结果采用 Target-decoy 策略进行过滤,并设定肽段和蛋白质鉴定 FDR 均小于 1%。数据的定量使用实验室内部编写软件,基本策略是提取肽段离子的提取离子色谱图(Extracted ion currents, XICs),计算非标记轻标和 SILAC 标记的重标肽段对 XICs 的信噪比(S/N)比值,进行对数转换,即为轻重离子对的定量值^[12]。

1.2.6 标记效率分析及拟合

将蛋白质定量值 ($\text{Log}_2^{\text{Light/Heavy}}$) 采取 Gauss 方程拟合数据分布,正态分布平均值的 95%置信区间表示标记效率的范围^[13]。SPSS 19.0 软件进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

标记效率计算公式:

$$\text{Label efficiency} = \frac{1}{1 + 2^{\log_2 \text{Light/Heavy}}} \times 100\%。$$

2 结果与分析

2.1 SILAC 鼠粮和普通鼠粮饲养小鼠的生长情况比较

喂食 SILAC 鼠粮的小鼠与 SPF 级维持鼠粮的对照组小鼠外观上无明显区别。同样表现为体毛光滑,食欲旺盛,活动有力,反应敏捷,粪便正常呈黑色麦粒状。F0 代小鼠生长至 7 周龄时,喂食 SILAC 小鼠的平均体重为 17.55 g,对照组小鼠的体重为 17.60 g;标记小鼠培养至 F2 代,7 周龄时体重为 15.20 g,小鼠体重有轻微下降的趋势。小鼠合笼交配发现性成熟期延

长。通过记录对照组、F0 代和 F2 代 SILAC 标记小鼠 6、7、10 和 11 周龄的体重,结果如图 2A 所示,进行单因素重复测量方差分析,组间的显著性 $P=0.110$,差异不具有统计学意义,表明 SILAC 鼠粮饲养小鼠对小鼠生长体重的影响不显著。

2.2 小鼠 9 种器官组织全蛋白检测结果

将从 9 种不同组织提取的全蛋白各取 10 μL ,用 10% 的 SDS-PAGE 电泳检测,经考马斯亮蓝 G250 染色和脱色。结果如图 2B 所示,蛋白条带清晰没有弥散现象,说明液氮碾磨裂解和尿素裂解液能较好地防止组织蛋白降解。对比胶

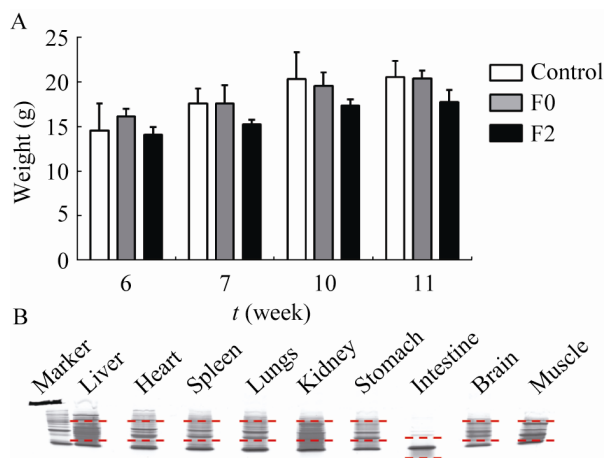


图 2 不同鼠粮饲养小鼠体重对比和 F2 代 SILAC 不同脏器总蛋白图

Fig. 2 Weight variation of control, F0 and F2 generations and separation of proteins extracted from different tissues. (A) Comparison of weight variation of control, F0 and F2 generations at 6, 7, 10 and 11 weeks by repeated measure ANOVA analysis. Every generation has two repeats. (B) The extracted proteins from varied SILAC labeled tissues of F2 generation mouse were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. The gel areas cut and followed by destaining and in-gel digestion were indicated by square marking.

图上蛋白条带的深浅,我们发现相同湿重的器官组织,如肝脏、肾脏和肌肉组织等实质性器官的蛋白含量较高;而心脏、脾脏、肺和脑组织等蛋白质的量较低,我们分析认为是由于这些器官含有较多空腔,造成蛋白的提取效率较低;同样,由于胃和肠道组织因含有部分食物残渣,也会造成提取的蛋白质较少。

2.3 蛋白质鉴定和定量数目情况

将 9 种不同器官样品的蛋白条带从 SDS-PAGE 胶上切下,进行胶内蛋白酶 Lys-C 酶消化后,抽提消化后的肽段,用 LC-MS/MS 进行蛋白质的鉴定和定量。结果如表 1 所示,我们共鉴定 1 889 个蛋白,有定量结果的蛋白数目 1 876 个,定量蛋白数占鉴定蛋白数的 98% 以上,表明我们检测的蛋白质的信号较强。每个组织样品平均鉴定的蛋白质数目为:(531.6±63.3)个,定量为 (521.8±59.3) 个。其中在 9 种组织样品中被共同鉴定和定量的蛋白质有 9 个,分别是:ATP 合成酶 β 亚基 (ATP synthase β subunit); 延长因子 1 α (Elongation factor 1 alpha, eEF1A); 蛋白质二硫键异构酶 A3 (Protein disulfide isomerase A3, PDIA3); 转酮醇酶 (Transketolase); 葡萄糖 6 磷酸异构酶 (Glucose-6-phosphate isomerase, GPI); 蛋白质二硫键异构酶 (Protein disulfide isomerase,

PDI); 泛素-60S 核糖体蛋白 L40 (Ubiquitin-60S ribosomal protein L40); 热休克 70 蛋白 8 (Heat shock 70 kDa protein 8, HSPA8) 和 β 5 微管蛋白 (Tubulin beta-5)。

2.4 蛋白质代谢标记分析结果

基于代谢标记的 SILAC 定量策略是根据对蛋白质同一肽段在一级质谱中的轻和重标离子对的强度进行比较,计算的比值就是相对定量的结果^[14]。在本研究中所有组织器官共定量的 9 种蛋白中,对比 Genecard 中 PaxDb 数据库,发现 HSPA8 蛋白在各种小鼠组织中均高表达(数据库含有的肝脏、心脏、脾脏、肺脏、肾脏和大脑 6 种器官组织数据中,表达丰度均为各器官的蛋白丰度 Top 5%),是较好反映不同组织间标记效率差异的蛋白。如图 3 所示,HSPA8 中的一个定量肽段 SINPDEAVAYGAAVQAAILS GDK,根据轻重离子对的比例,计算重离子所占总离子的比例,即被 ¹³C₆-Lysine 标记的肽段占总肽段的比例,就可以计算出代谢标记的蛋白标记效率。分析 HSPA8 的结果显示肝脏标记效率为 98.00%,心脏标记效率为 93.63%,脾脏标记效率为 96.46%,肺标记效率为 96.18%,肾脏标记效率为 97.88%,胃标记效率为 97.02%,肠标记效率为 96.11%,脑组织标记效率为 94.52%,肌肉组织标记效率为 95.16%。

表 1 各组织器官鉴定和定量蛋白数量列表

Table 1 Protein number of identified and quantified on different tissues

	The protein number								
	Liver	Heart	Spleen	Lungs	Kidney	Stomach	Colon	Brain	Muscle
Identified proteins	457	394	662	609	525	509	676	541	411
Quantitated proteins	446	392	657	601	524	499	633	536	408

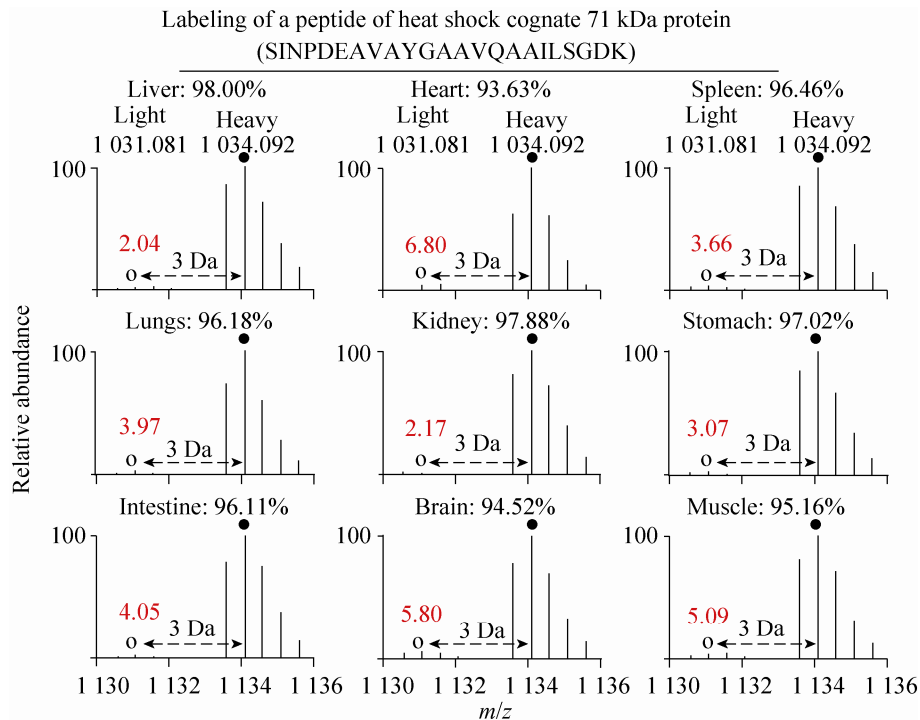


图 3 通过计算 HSPA8 蛋白的特征肽段的轻重离子对的相对峰强度反映不同脏器的标记效率

Fig. 3 Analysis of labeling efficiency by comparing the relative peak intensity between the light and heavy ion pairs. Labeling of a representative peptide across different tissues of F2 generation SILAC mouse was selected. Proteins of nine tissues were extracted, in-gel digested, and analyzed by nanoLC-MS/MS to examine labeling efficiency.

进一步对器官组织的所有蛋白的定量信息进行统计学分析可以计算出器官的整体标记效率。为减少因标记导致轻标氨基酸肽段过少或缺失引发的强迫匹配以及由此引起的定量误差，我们对数据进行了过滤，排除了信噪比 $S/N < 10$ 的肽段，并对保留的肽段逐个作了手工检查，最后各组织得到接近 200 个定量蛋白质。用高斯方程对过滤后蛋白质的定量值数据分布进行正态性拟合，如图 4 所示，根据正态分布的均值和标准差，利用标记效率计算公式，计算各种组织的整体标记效率：肝脏为 $96.34\% \pm 0.90\%$ ；心脏为 $94.12\% \pm 1.42\%$ ；脾脏为 $95.96\% \pm 1.19\%$ ；肺脏为 $95.01\% \pm 1.86\%$ ；肾脏为 $95.60\% \pm 0.94\%$ ；胃脏为 $95.71\% \pm 1.22\%$ ；肠为

$95.71\% \pm 1.98\%$ ；大脑为 $92.62\% \pm 1.98\%$ ；肌肉为 $94.16\% \pm 1.41\%$ 。结果显示标记效率最高的是肝脏 $96.34\% \pm 0.90\%$ ，标记效率最低的是心脏 $94.12\% \pm 1.42\%$ 和大脑 $92.62\% \pm 1.98\%$ ，而小鼠整体的标记效率为 $95.80\% \pm 0.64\%$ 。

德国科学家 Krüger 等研究显示^[15]，SILAC 定量蛋白组学稳定和准确的定量结果的前提是作为内标的蛋白质组样本的整体标记效率应满足 95.00%，即在器官/组织中蛋白质含有的 Lysine 至少有 95% 经过代谢替换成 $^{13}\text{C}_6$ -Lysine。本研究中，F2 代的 SILAC 小鼠整体标记效率 $95.80\% \pm 0.64\%$ ，完全符合以上标准，因此可以成为后续研究中的定量内标。

我们分析的结果如图 5 所示，F2 代的 SILAC

小鼠肝脏的标记效率高于整体标记水平，差异具有统计学差异 ($P < 0.05$)；而小鼠心脏和大脑组织低于

整体标记水平，具有统计学差异 ($P < 0.05$)。因此，F2 代 SILAC 小鼠标记效率具有组织特异性。

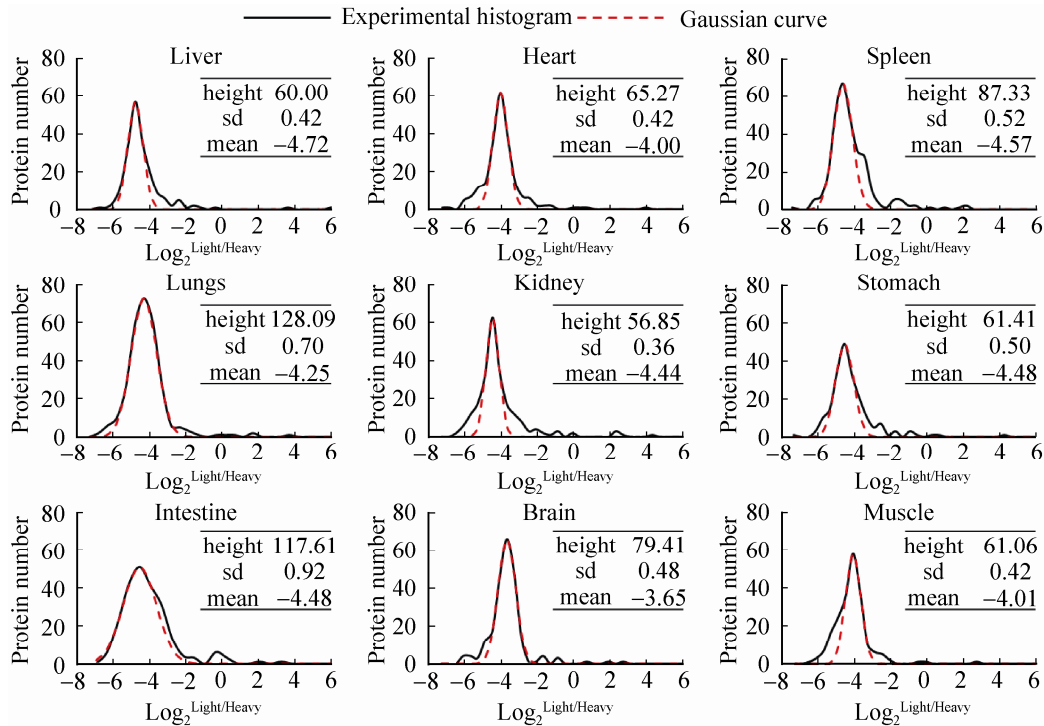


图 4 各组织器官定量蛋白的标记效率定量值的高斯拟合图

Fig. 4 Histograms of $\log_2^{\text{Light/Heavy}}$ using the quantified proteins from different tissues. Labeling efficiencies were analyzed using the population of proteins quantified by the log-transformed ratio of heavy versus light peptides representing protein labeling efficiency.

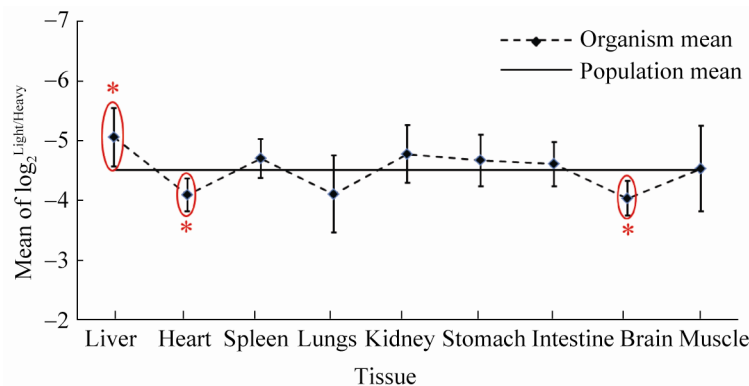


图 5 各组织器官整体标记效率

Fig. 5 Comparison of SILAC labeling efficiencies in different tissues. The labeling efficiency of liver was higher than whole labeling efficiency of mouse, and the labeling efficiencies of heart and brain were lower. The differences were statistically significant ($P < 0.05$).

3 讨论

目前基于稳定同位素代谢标记的 SILAC 定量蛋白质组学技术已经成为了蛋白质组学发展的重要方向。SILAC 定量方法在不同样品的细胞或者蛋白质层面进行混样,使得后续的生物学处理组和重标对照组样品的处理过程完全保持一致,可有效排除后续样品的纯化、预分离、蛋白质消化、肽段抽提等一系列蛋白质组学样品制备过程各步骤可能引入的误差,有效提高定量蛋白质组学研究的准确性^[3]。

由于标记技术的限制和标记成本的昂贵, SILAC 技术主要应用在微生物以及细胞等的定量研究中,难以拓展到对动物模型的代谢标记。在诸多的模式生物中,小鼠具有与人类高度同源等优点,是当前研究中的重要动物模型。稳定同位素代谢标记的模式小鼠能为各种疾病小鼠模型、基因敲除小鼠模型和微生物感染小鼠模型的研究提供定量内标。这为研究基因或蛋白质的功能、代谢或信号通路提供了强有力的技术支撑^[16-18]。

本研究在国内首次发展了用于小鼠模型的 SILAC 标记方法,利用含有重稳定性同位素标记赖氨酸 ($^{13}\text{C}_6\text{-Lysine}$) 的 SILAC 鼠粮饲养 C57BL/6J 小鼠,结合 LC-MS/MS 对不同器官组织进行了定量标记分析,证明 F2 代小鼠的整体标记效率达到 95% 以上。由于不完全标记时作为定量内标的 SILAC 重标小鼠中掺杂有未被代谢标记的轻标蛋白,在与需要比较的样品混合后,残留的轻标蛋白与样品蛋白难以区分,会对依据轻重标记的离子对定量的结果带来干扰,难以实现高精度的准确定量比较。因此基于目前定量蛋白质组学研究中内标应用的标准,95% 的标记效率是代谢标记的基本要求^[15]。通过不断地方法改进提高标记效率是值得继续探

索的课题。然而标记效率不能无限提升至 100%, 因为标记效率一方面受到稳定同位素的纯度的限制 (目前使用的 $^{13}\text{C}_6\text{-Lysine}$ 的纯度为 98.00%); 另一方面跟器官/组织细胞的代谢效率和增殖速度有关。

不同的器官组织存在着不同的标记效率。肝脏是机体代谢的核心器官,拥有肝动脉和门静脉双重血液供应。肠道吸收的 $^{13}\text{C}_6\text{-Lysine}$ 经过门静脉进入肝脏为其提供了充足的标记物质。肝脏细胞是可再生细胞,这使得肝脏具有良好的自我增殖能力,在应对物质损伤凋亡后能迅速完成修补,因此肝脏的蛋白质更新较快,整体代谢标记效果好。大脑组织作为神经系统与心脏组织的心肌细胞相似,均是终末分化细胞,因此这两个组织的标记效率低于整体水平。这些与 Zanivan 等^[17]报道结果一致。在 Mann 等^[14]关于小鼠蛋白质代谢动力学的研究中,以 MRPL12 蛋白 (Mitochondrial 39S ribosomal protein L12) 为例,肝脏更新速率为 0.205/d, 心脏更新速率为 0.065/d。标记一半的 MRPL12, 肝脏只需要 3.4 d, 而心脏需要 10.6 d。对肝脏和心脏定量的 242 种蛋白进行分析,肝脏的蛋白质平均更新速率为 0.16/d, 心脏的蛋白质平均更新速率为 0.04/d^[19]。肝脏蛋白质更新速率明显高于心脏,这使得在相同时间内,肝脏更容易被 SILAC 标记,而心脏标记效率较低。通过延长饲养时间或者对其子代小鼠进行标记可以提高大脑和心脏等不易于代谢标记组织器官的完全标记。

在研究中,课题组成功地将 SILAC 方法从微生物和细胞系水平拓展到哺乳动物模型,在国内首先建立了用于各种动物模型研究的蛋白质组学定量内标^[11-13-20]。SILAC 小鼠能用于各种组织器官的定量蛋白质组学或比较蛋白质组学研

究领域, 将研究水平从培养的细胞层面, 提升到整体动物的组织/器官层面, 并且能够研究某种干预对于机体的不同器官的影响, 阐释不同器官间的内在联系。这为定量蛋白组学研究疾病发生、发展机制提供了有力工具。

致 谢: 感谢张瑶在英文修改中提供的支持。

REFERENCES

- [1] Rappsilber J, Mann M. Is mass spectrometry ready for proteome-wide protein expression analysis. *Genome Biol*, 2002, 3(8): comment2008.1–2008.5.
- [2] Cox J, Mann M. Is proteomics the new genomics? *Cell*, 2007, 130(3): 395–398.
- [3] Ong SE, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat Chem Biol*, 2005, 1(5): 252–262.
- [4] Robles MS, Cox J, Mann M. *In-vivo* quantitative proteomics reveals a key contribution of post-transcriptional mechanisms to the circadian regulation of liver metabolism. *PLoS Genet*, 2014, 10(1): e1004047.
- [5] Mann M. Proteomics for biomedicine: a half-completed journey. *EMBO Mol Med* 2012, 4(2): 75–77.
- [6] Geiger T, Velic A, Macek B, et al. Initial quantitative proteomic map of 28 mouse tissues using the SILAC mouse. *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12(6): 1709–1722.
- [7] Rossant J, Nagy A. Genome engineering: the new mouse genetics. *Nat Med*, 1995, 1(6): 592–594.
- [8] Almodovar AJO, Luther RJ, Stonebrook CL, et al. Genomic structure and genetic drift in C57BL/6 congenic metabolic mutant mice. *Mol Genet Metab*, 2013, 110(3): 396–400.
- [9] Zanivan S, Krueger M, Mann M. *In vivo* quantitative proteomics: the SILAC mouse. *Methods Mol Biol*. Humana Press, 2012: 435–450.
- [10] Krüger M, Moser M, Ussar S, et al. SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function. *Cell*, 2008, 134(2): 353–364.
- [11] Zhai L, Chang C, Li N, et al. Systematic research on the pre-treatment of peptides for quantitative proteomics using a C₁₈ microcolumn. *Proteomics*, 2013, 13(15): 2229–2237.
- [12] Xu P, Duong DM, Seyfried NT, et al. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell*, 2009, 137(1): 133–145.
- [13] Xu P, Tan H, Duong DM, et al. Stable isotope labeling with amino acids in *Drosophila* for quantifying proteins and modifications. *J Proteome Res*, 2012, 11(9): 4403–4412.
- [14] Mann M. Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(12): 952–958.
- [15] Krüger M, Moser M, Ussar S, et al. SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function. *Cell*, 2008, 134(2): 353–364.
- [16] Walther DM, Mann M. Accurate quantification of more than 4000 mouse tissue proteins reveals minimal proteome changes during aging. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10(2): M110. 004523.
- [17] Zanivan S, Meves A, Behrendt K, et al. *In vivo* SILAC-based proteomics reveals phosphoproteome changes during mouse skin carcinogenesis. *Cell Rep*, 2013, 3(2): 552–566.
- [18] Ostasiewicz P, Zielinska DF, Mann M, et al. Proteome, phosphoproteome, and N-glycoproteome are quantitatively preserved in formalin-fixed paraffin-embedded tissue and analyzable by high-resolution mass spectrometry. *J Proteome Res*, 2010, 9(7): 3688–3700.
- [19] Kim TY, Wang D, Kim AK, et al. Metabolic labeling reveals proteome dynamics of mouse mitochondria. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11(12): 1586–1594.
- [20] Ping L, Zhang H, Zhai L, et al. Quantitative proteomics reveals significant changes in cell shape and an energy shift after IPTG induction via an optimized SILAC approach for *Escherichia coli*. *J Proteome Res*, 2013, 12(12): 5978–5988.

(本文责编 陈宏宇)