

# 双反相色谱串联平行反应监测靶向定量蛋白质组方法的建立

李恺<sup>1,2</sup>, 宋雷<sup>2</sup>, 石文昊<sup>2</sup>, 田喜凤<sup>1,3</sup>

1 华北理工大学 基础医学院病原生物学学科, 河北 唐山 063009

2 军事医学科学院放射与辐射医学研究所 国家蛋白质科学中心·北京 北京蛋白质组研究中心 蛋白质组学国家重点实验室, 北京 102206

3 河北省慢性疾病重点实验室 唐山市慢性病临床基础研究重点实验室, 河北 唐山 063000

李恺, 宋雷, 石文昊, 等. 双反相色谱串联平行反应监测靶向定量蛋白质组方法的建立. 生物工程学报, 2017, 33(11): 1859–1868.

Li K, Song L, Shi WH, et al. Establishment of Dual Reverse Phase Chromatography combined Parallel Reaction Monitoring for targeted quantitative proteomics. Chin J Biotech, 2017, 33(11): 1859–1868.

**摘要:** 近年来质谱技术的持续进步促进了靶向蛋白质组的发展, 在多反应监测 (Multiple reaction monitoring, MRM) 靶向蛋白质组定量方法的基础上衍生出平行反应监测 (Parallel reaction monitoring, PRM) 技术。该技术靶向定量灵敏度和通量更高, 重现性也更好, 但其对于高复杂性样本在定量速度和深度上均存在一定的局限性。改善 PRM 定量的色谱方法包括: 色谱柱的优化, 增加色谱柱内径、降低柱长; 色谱洗脱条件的优化, 提高液相洗脱流速、缩短洗脱时间; 最终建立了一种简单高效的双反相色谱串联 PRM 靶向蛋白质组定量平台。该平台使用 150  $\mu\text{m}$  内径和 8 cm 长的短色谱柱, 在 800 nL/min 的高流速下和 35 min 有效洗脱梯度内, 可实现对 293T 全细胞裂解液蛋白样本中多达 400 条低丰度肽段的快速定量。该研究优化了 PRM 靶向定量方法, 将有利于 PRM 技术的推广, 尤其为低丰度蛋白的精准定量提供了一种技术选择。

**关键词:** 双反相色谱, 平行反应监测, 靶向定量

**Received:** February 8, 2017; **Accepted:** March 28, 2017

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31471954).

**Corresponding author:** Xifeng Tian. Tel: +86-315-8805722; E-mail: tstianxifeng@163.com

国家自然科学基金 (No. 31471954) 资助。

# Establishment of dual reverse phase chromatography combined parallel reaction monitoring for targeted quantitative proteomics

Kai Li<sup>1,2</sup>, Lei Song<sup>2</sup>, Wenhao Shi<sup>2</sup>, and Xifeng Tian<sup>1,3</sup>

*1 Department of Pathogen Biology, School of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063009, Hebei, China*

*2 State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences (The PHOENIX center, Beijing), Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 102206, China*

*3 Hebei Key Laboratory for Chronic Diseases, Tangshan Key Laboratory for Preclinical and Basic Research on Chronic Diseases, Tangshan 063000, Hebei, China*

**Abstract:** Steady improvement in mass spectrometers technology has transformed the targeted proteome analysis into a new stage. Parallel reaction monitoring (PRM) technology has evolved from the basic multiple reaction monitoring (MRM) targeted proteomics methods in recent years. PRM performs with a higher sensitivity, throughput and reproducibility in targeted quantification, however its limitations in effectiveness and accurate quantification of samples with higher complexity still remain unsolved. In this study through improving the chromatographic conditions of PRM we established a simple and robust platform for targeted proteomic quantification. The newly established PRM system is equipped with columns with increased inner diameter (150  $\mu\text{m}$ ) and decreased total length (8 cm); faster liquid phase elution rate (800 nL/min) and shortened elution gradient (35 min). These modifications enable PRM platform to combine with dual reverse phase chromatography, to quantify up to 400 low abundance peptides in human 293T cells whole cell extract. Our findings would benefit the promotion of PRM technology, especially providing a technical option for accurate quantification of low abundance proteins.

**Keywords:** dual reverse phase chromatography, parallel reaction monitoring (PRM), targeted quantification

近年来随着质谱技术的快速发展,蛋白质组学越来越多地应用于各个领域。数据依赖性采集方法 (Data dependent acquisition, DDA) 是蛋白质组学无标定的常用技术手段,该方法采用的是基于一级色谱峰的定量方式,定量的深度不足,尤其是对低丰度蛋白定量准确性差。Ding 等<sup>[1]</sup>通过结合双反相色谱正交法,即 pH 10 的反相色谱降低样本复杂程度<sup>[2]</sup>后利用 pH 3 的反相色谱串联高精度质谱仪进行样本鉴定<sup>[3]</sup>,通过缩短洗脱梯度等提升了质谱检测深度,使得质谱检测效率大大提高。

多反应监测 (Multiple reaction monitoring, MRM) 蛋白靶向定量方法得到广泛关注<sup>[4-5]</sup>,并有取代实验室蛋白定量黄金标准 Western blotting 方法的势头<sup>[6]</sup>。该方法在一定时间窗口内对预设的一系列母离子-子离子对进行定量检测<sup>[7-8]</sup>,检测结果在一定动态范围内拥有较高的准确性。随着蛋白质组学定量分析对通量要求的提升,MRM 的灵敏度和分辨率成为离子对检测通量的限制因素<sup>[9]</sup>。此外,基于三重四极杆的 MRM 方法,在高复杂性样本检测过程中由于分辨率偏低对共洗脱肽段无法进行准确区分,容易造

成目标肽段定量结果的假阳性<sup>[10-12]</sup>。MRM 方法中离子对选择<sup>[13]</sup>、碰撞能量等条件优化过程繁琐,难以满足生物标志物和系统生物学等研究中靶向定量蛋白质组的高通量需求<sup>[14-15]</sup>。

在大规模靶向定量分析的实际应用中,基于 MRM 发展而来的平行反应监测 (Parallel reaction monitoring, PRM) 蛋白靶向定量技术不需筛选碎片离子,利用高分辨的轨道离子阱对所有碎片离子进行检测,降低了干扰离子对结果的影响。PRM 方法能够在高通量的检测过程中保证定量的灵敏度和特异性<sup>[16-17]</sup>。Gallien 等利用 60 min 有效梯度鉴定了酵母全蛋白裂解液中的 770 条肽段<sup>[18]</sup>; Kim 等将 PRM 技术用于酪氨酸激酶的大规模定量分析,最终在 50 min 有效梯度内准确定量了 83 种酪氨酸激酶受体的 308 条肽段<sup>[19]</sup>。在翻译后修饰的研究当中 Tsuchiya 等<sup>[20]</sup>和 Tang 等<sup>[21]</sup>均利用 PRM 技术进行监测和定量。近期在羊绒分子标志物鉴定<sup>[22]</sup>和单克隆抗体药物的表征研究<sup>[23]</sup>中均利用了 PRM 检测技术。总之,PRM 渐渐成为靶向蛋白质组学研究中广泛应用的方法之一。

质谱技术的发展使得仪器灵敏度、分辨率等均有提升,但对于高复杂性样本的鉴定效率无明显提高,Shishkova 等通过对比近年已发表文章的质谱数据,发现色谱条件可能是潜在的制约因素<sup>[24]</sup>。为了提高 PRM 靶向定量检测的通量和深度、准确性以及重复性,我们建立了一种简单高效的双反相色谱串联 PRM 靶向蛋白质组定量平台。相对于传统的定量方法,我们主要优化了 PRM 定量的色谱方法,包括:1) 色谱柱的优化:增加色谱柱内径、降低柱长;2) 色谱洗脱条件的优化;3) 提高液相洗脱流速、缩短洗脱时间。该研究提高了 PRM 蛋白质组靶向

定量的通量和深度,为其更广泛的应用提供了技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器、试剂与材料

UltiMate 3000 纳升级液相色谱仪和 Q Exactive HF 质谱仪 (美国 Thermo Fisher 公司)。质谱级水、乙腈、甲醇 (J.T.Baker 公司), 1.9  $\mu\text{m}$  C18 粉末 (Dr. Maisch HPLC GmbH), 3  $\mu\text{m}$  C18 粉末 (天津博纳艾杰尔科技有限公司), C18 膜 (固相萃取片, 3M 公司), 二硫苏糖醇 (Dithiothreitol, DTT, 纯度 $\geq 99.5\%$ , Sigma-Aldrich 公司), 质谱级甲酸 (Formic acid, FA,  $\sim 98\%$ , SigmaFluka 公司), 脱氧胆酸钠 (Sodium deoxycholate, DOC, 国药集团化学试剂有限公司), 质谱级胰蛋白酶 (Trypsin Gold, Promega 公司), 0.5–20  $\mu\text{L}$  移液吸头 (T-400, Axygen 公司)。

### 1.2 标准液的配制

细胞裂解液为 50 mmol/L 碳酸氢铵, 体积分数 2% 的脱氧胆酸钠, 25 mmol/L 氯化钠, pH 8.5。精确称取一定量的 DTT 配制成 100 mmol/L 的 DTT 溶液, 需现用现配。用水作为溶剂配制 10 mmol/L 的碳酸氢铵 (pH 10)。用水和甲酸配制体积分数为 0.1% 和 1% 的 FA 溶液。利用乙腈和 10 mmol/L 碳酸氢铵配制乙腈体积分数为 6%、9%、12%、15%、18%、21%、25%、30% 和 35% 的反相分离流动相。

### 1.3 293T 细胞样本制备

新鲜培养的 293T 细胞 100  $\mu\text{L}$ , 加入 500  $\mu\text{L}$  细胞裂解液混匀并超声。每 50  $\mu\text{L}$  裂解产物加入 1  $\mu\text{L}$  的 100 mmol/L DTT, 95  $^{\circ}\text{C}$  加热 3 min, 恢

复室温后进行两次酶切 (1/50 用量, 6 h 和过夜)。加入 150  $\mu$ L 0.1% FA 离心, 取上清溶液进行真空干燥。自制 C18 反相分离柱, 以 T-400 移液吸头为容器, 双层直径 1 mm 的 C18 膜对吸头封口, 填入耐高 pH 的 3  $\mu$ m 粒径 C18 粉末 3 mg, 利用 0.1% FA 对样品脱盐, 利用反相分离流动相洗脱对酶切产物预分离, 脱盐及预分离的馏分真空干燥后保存在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 待用。

#### 1.4 大肠杆菌样本制备

制备过程同 1.3。

#### 1.5 色谱方法

色谱柱使用实验室自制分析柱 (规格为 1.9  $\mu$ m C18, 120 mm $\times$ 150  $\mu$ m, 80 mm $\times$ 150  $\mu$ m), 流动相 A 为水 (含体积分数为 0.2% 的 FA), 流动相 B 为体积分数 80% 的乙腈 (含体积分数为 0.2% 的 FA)。70 min 有效梯度: 16 min, 9%–14% B; 36 min, 14%–32% B; 15 min, 32%–40% B; 5 min, 40%–95% B 并持续 5 min。35 min 有效梯度: 22 min, 6%–25% B; 12 min, 25%–45% B; 1 min, 45%–95% B 并持续 5 min。样品复溶溶液为体积分数 5% 甲醇水溶液 (含体积分数为 0.2% 的 FA)。

#### 1.6 质谱方法

质谱使用电喷雾离子源 (Electrospray ionization, ESI 源), 正离子采集模式, 离子传输管温度为 320  $^{\circ}\text{C}$ , 喷雾电压 2 000 V。不同检测模式下质谱参数详见表 1。

#### 1.7 数据处理

DDA 采集数据利用 MaxQuant 软件进行数据搜库, 所用蛋白序列数据库来自 NCBI 网站, 更新于 2013 年 7 月 1 日。参数设定为默认参数, 母离子质量精度 10 (Parts per million, ppm), 子离子质量精度 20 ppm。PRM 数据使用 Proteome

Discoverer 1.4 软件进行搜库鉴定, 母离子质量精度: 20 ppm, 子离子质量精度: 50 (Milli-mass units, mmu)。利用 Skyline 软件进行二级定量抽提。母离子电荷数目设定为 2 和 3, 质量偏差设定为 0.05  $m/z$ 。抽提时间窗口设定为 0.2 min。利用 Top 5 的碎片离子面积加和代表肽段定量结果。

表 1 质谱采集参数设置

Table 1 Mass spectrum acquisition parameters

	Data dependent acquisition		Parallel reaction monitoring	
	MS1	MS2	MS1	PRM
Resolution	120 000	15 000	15 000	15 000
AGC target	3e6	2e4	5e5	1e5
Maximum IT	80 ms	40 ms	80 ms	40 ms
Isolation window	–	1.6 $m/z$	–	1 $m/z$
NCE/stepped	–	27	–	27
Dynamic exclusion		12 s		–
Top N		Top 30		20
Time window		–		1.5 min

–Not covered.

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱柱和洗脱梯度条件测试

首先检测了 293T 全细胞提取物样本, 在 70 min 有效梯度内, 8 cm 色谱柱检测蛋白数为 4 295, 肽段数为 23 709, 与 12 cm 色谱柱的 4 455 个蛋白和 24 369 条肽段相比, 基本相当。该结果说明 8 cm 色谱柱能够对复杂生物样品提供足够的分离能力。同时短色谱柱能够承受更高流速, 色谱条件可优化参数范围更广。

质谱检测效率与洗脱梯度时长紧密相关, 缩短洗脱梯度减少了检测时长, 但加重肽段共洗脱情况, 影响质谱检测深度。为了权衡洗脱

梯度与检测深度,我们利用预分离的 293T 样本,分别用 35 min 和 70 min 有效洗脱梯度进行深度覆盖检测。结果表明,前者 210 min 有效检测时长鉴定到 6 916 种蛋白和 52 760 条肽段,与后者 420 min 有效检测时长的 7 126 种蛋白和 56 563 条肽段鉴定结果相比,蛋白水平无差别,肽段水平有一定程度降低(图 1A),这说明色谱梯度缩短并未对蛋白鉴定深度造成明显影响,但缩短洗脱梯度后质谱检测效率在蛋白和肽段水平提升明显(图 1B)。综合上述结果,缩短色谱柱长和洗脱梯度后,能够满足预分离样本的分离能力需求,明显提高质谱的检测效率。

## 2.2 洗脱流速测试

Shishkova 等的研究中<sup>[24]</sup>,常用色谱条件为 75  $\mu\text{m}$  内径色谱柱,1.7  $\mu\text{m}$  或 1.9  $\mu\text{m}$  粒径 C18 填料,柱长 10–50 cm,250–350 nL/min 的洗脱流速。为了达到理想分离效果,需使用耐高压设备和色谱柱加热装置等,增加检测平台的搭建难度。本研究通过使用 150  $\mu\text{m}$  内径的毛细管一体柱填充 1.9  $\mu\text{m}$  粒径的 C18 粉末,填充长度为 8 cm,为保证色谱系统在(低于 200 bar)低压力条件下即可达到理想分离效果,我们比较了 400、600、800、1 000 nL/min 四种流速下 293T 预分离后的单一组分样本检测结果。四种流速下有效梯度时长无明显变化,但相对于 1 000 nL/min 的流速条件,其他流速条件下肽段保留时间(Retention time, RT)整体依次延后 4.7 min、2.2 min 和 0.8 min,其中 800 nL/min 的流速使样本更好地分布在洗脱梯度中央(图 2);4 种流速的鉴定结果在蛋白和肽段水平上无明显差别(表 2);鉴定肽段的总离子流(Total ion current, TIC),前两种低流速条件明显提高(图 3A)。为

了探究 TIC 变化的原因,我们对不同流速条件下鉴定肽段进行丰度分布统计。统计结果发现,(e5–e6) 和 (e9–e10) 范围内肽段数目占总数的 0.6%左右,不影响整体结果,高流速条件下低丰度肽段(e6–e7)数目明显增多,而对于中高丰度肽段(e7–e8, e8–e9)数目减少(图 3B)。这说明流速的提高对整体定性结果无明显影响,但对低丰度肽段检测的灵敏度有所提高,这是高流速条件的潜在优势之一。同时考虑到高流速会造成系统压力升高,综合分析后选用 800 nL/min 流速。

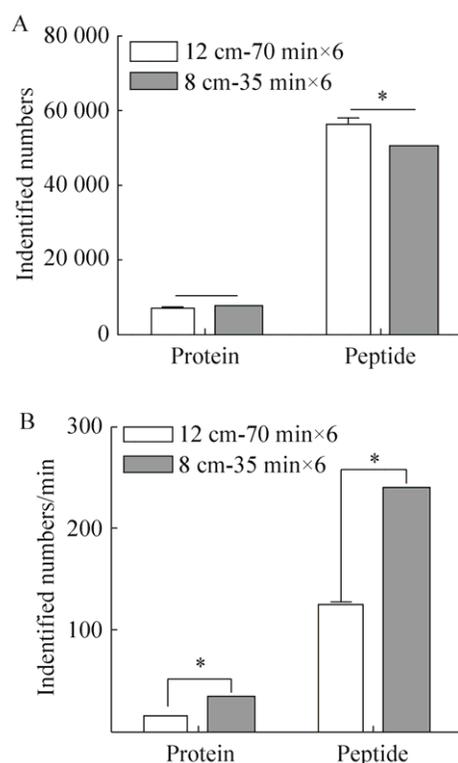


图 1 不同色谱条件下 293T 预分离样本鉴定结果对比 (A) 和检测效率对比 (B)

Fig. 1 Evaluation of different chromatographic conditions. (A) Comparison of qualitative results of 293T pre-separation samples with different chromatographic gradient. (B) Comparison of detection efficiencies with different chromatographic gradient.

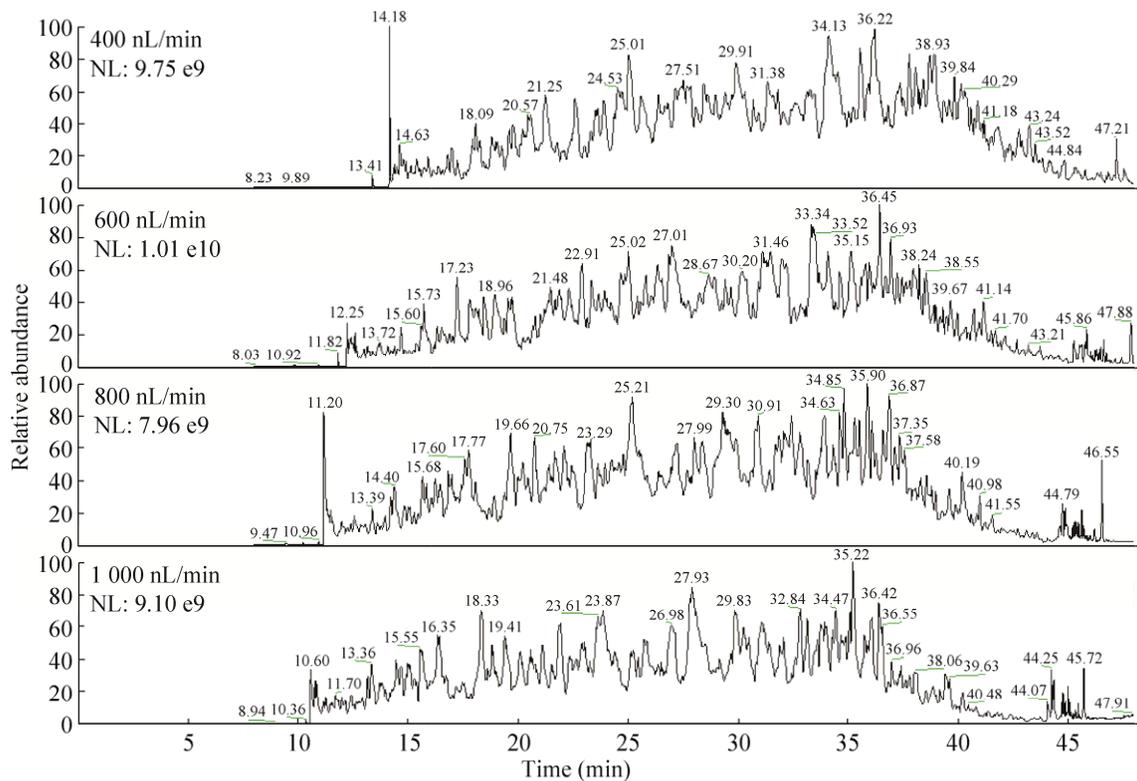


图 2 不同洗脱流速条件时色谱峰分布

Fig. 2 Separation of chromatographic peaks with different flow rates.

表 2 不同流速下鉴定数目

Table 2 Identification number of different flow rates

	400 nL/min	600 nL/min	800 nL/min	1 000 nL/min
Number of identified proteins	3 580/3 764/3 728	3 561/3 692/3 765	3 589/3 665/3 659	3 536/3 624/3 643
Number of identified peptides	8 859/8 666/8 900	8 648/8 989/8 609	8 688/8 600/8 326	8 495/8 598/8 337

### 2.3 PRM 参数优化

PRM 检测涉及的主要参数中,扫描分辨率、自动增益控制 (Automatic gain control, AGC)、目标离子注入时间、扫描周期时间以及目标肽段时间窗口都能够直接影响检测效果。通过调整各项参数,最终确定了相对最优的 PRM 检测参数 (表 1)。

在参数调整过程中发现,当肽段时间窗口放大,肽段检测比例及扫描点数明显减少,而时间

窗口大小直接受肽段 RT 偏移影响。将不同梯度时长的数据进行 RT 偏移分析,利用偏移时间与相应有效梯度时长之比作为标准化后的偏移率 (图 4),结果显示短梯度 (35 min 有效梯度) 相对于长梯度 (70 min 有效梯度) 肽段 RT 偏移率更低且色谱表现更稳定。证明本研究所优化后的色谱体系不仅能够保证色谱分离能力,提高质谱的检测效率,还能够为 PRM 靶向定量检测提供一个更加稳定的色谱条件,有利于提高 PRM 的通量。

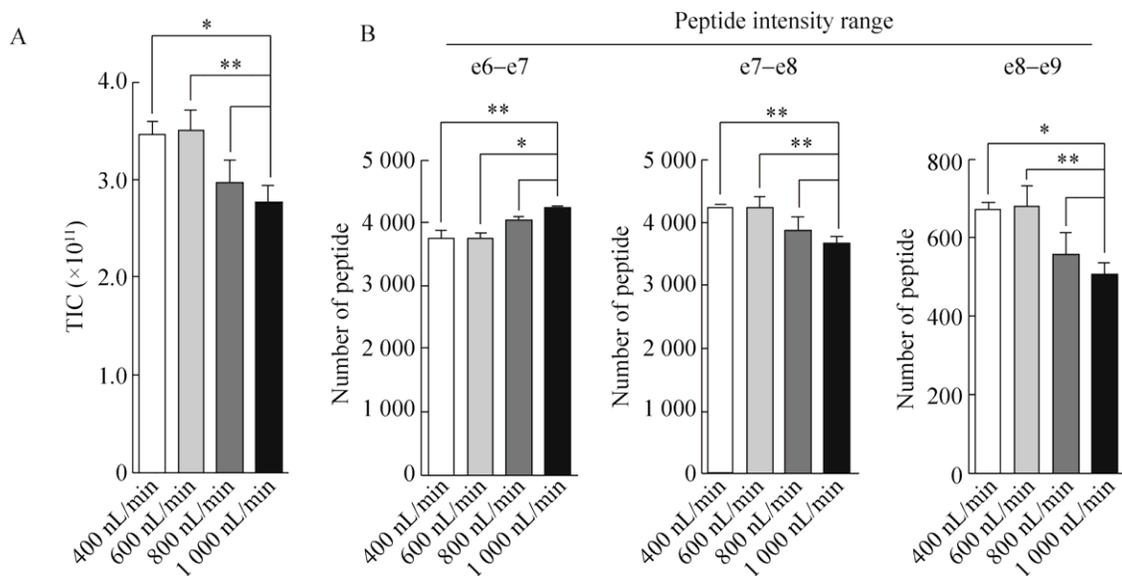


图3 不同流速条件下 TIC 对比 (A) 和肽段丰度分布对比 (B)

Fig. 3 Evaluation of different flow rates. (A) Comparison of total ion current (TIC). (B) Comparison of peptide intensity distribution.

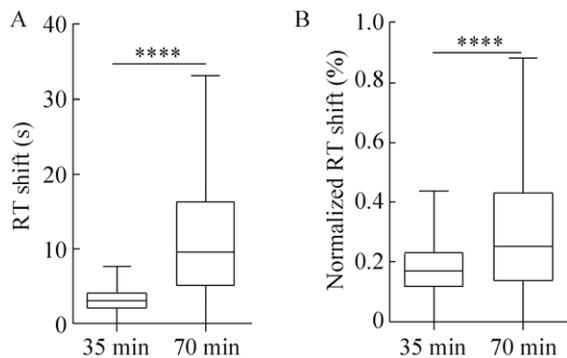


图4 不同色谱条件下 RT 偏移情况对比。(A) RT 偏移情况 (B) 标准化的 RT 偏移

Fig. 4 Evaluation of RT shift with different chromatographic conditions. (A) Distribution of RT shift; (B) Normalized RT shift.

## 2.4 PRM 检测

首先,我们对 293T 预分离样本采用 35 min 有效梯度进行深度覆盖检测;其次,在深度覆盖鉴定到的 6 870 蛋白结果中,保留拥有 2 条以上特异性肽段的蛋白,按照蛋白丰度进行排序,选取丰度最低的 1 000 种蛋白作为靶向定量的目标蛋白;最后,我们筛选各组分中对应目标

蛋白的肽段进行 PRM 定量分析。肽段筛选条件包括:无修饰,无漏切,肽段长度 8–25 个氨基酸,图谱评分 (Ion score) 不低于 20,所带电荷数目为 2 或 3 等条件。各组分最终分别筛选出 337、305、283、335、323 和 330 条目的肽段。最终 PRM 定量结果中对目的肽段的鉴定率均在 93% 以上,个别组分高达 99%。如果放宽肽段筛选条件,我们在第 6 个组分中共筛选出了 501 条目标肽段,其鉴定率为 97%。

随后对 PRM 定量结果进行了评估,包括对低丰度肽段定量的准确性 (定义二级碎片离子对应点数大于 7 为可定量肽段) 与稳定性 (重复检测的变异系数, Coefficient of variation, CV)。碎片离子对应点数=肽段峰宽 (通过 Skyline 软件抽提获得)/扫描周期时长 (通过计算相邻一级谱图时间之差获得)。计算后,扫描周期在 1.35 s 左右,抽提点数中位数在 10 个点, CV 中位数在 10% 以内 (表 3)。说明优化过后的 PRM 检测

体系能够在 35 min 有效梯度内对高达 400 条低丰度肽段进行快速准确定量。

对 150 种低丰度目标蛋白 (400 条肽段) 的结果进行分析发现: 1) 修饰肽段的检测比例 42%, 远低于无修饰肽段的检测比例 95%, 挑选肽段应优先挑选非修饰肽段; 2) 肽段所带电荷数目为 2 (占比 60%) 或 3 (占比 40%), 检测比例无明显差别; 3) 目标肽段长度在 7–15 个氨基酸 (占比 57%)、16–25 个氨基酸 (占比 36%) 和 26–34 个氨基酸 (占比 7%), 三者被检测比例相当, 均为 92%, 氨基酸序列长短对检测效率无明显影响; 4) 对全部目标肽段的 RT 分布情况进行观察, 发现在洗脱时间内肽段分布均匀; 5) 在 Skyline 抽提结果中, Top 5 的碎片离子以 y 离子居多, 占碎片离子总数的 80% 左右, 这种结果

应该与 PRM 检测时选用高能碰撞破碎 (High-energy collision-induced dissociation, HCD) 模式有关, 最终出现 y 离子的偏向性。

为了进一步验证本研究所优化的 PRM 检测体系的准确性与稳定性, 我们进行了倍比稀释定量实验。选取 293T 双反相预分离后的单一组分样本, 按照 1:3 稀释后用大肠杆菌蛋白作为背景补齐总量。配合实验室先前研究中所创建的肽段线性情况评分数据库筛选出 300 条目标肽段, 覆盖高中低各丰度蛋白。通过比较 DDA 和 PRM 的定量结果, 发现 PRM 定量结果中, 定量倍数结果以 3 倍为中心呈正态分布, 且 77% 的肽段倍数在 2.5–3.5 倍之间; 而 DDA 定量结果中偏离 3 倍的肽段数量明显偏高 (图 5A)。这说明优化后的 PRM 检测体系在定量上更加准确。

表 3 293T 低丰度蛋白目标肽段 PRM 检测结果

Table 3 PRM targeted peptides quantification results of 293T low abundance proteins

Fraction	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F6-More
Number of target peptides	337	305	283	335	323	330	501
Number of identified peptides	329 (97%)	303 (99%)	278 (98%)	313 (93%)	319 (99%)	327 (99%)	487 (97%)
Number of quantitative peptides (points>7)	314 (93%)	278 (91%)	260 (92%)	299 (89%)	305 (94%)	315 (95%)	445 (89%)
Median CV	9%	9%	6%	8%	5%	9%	

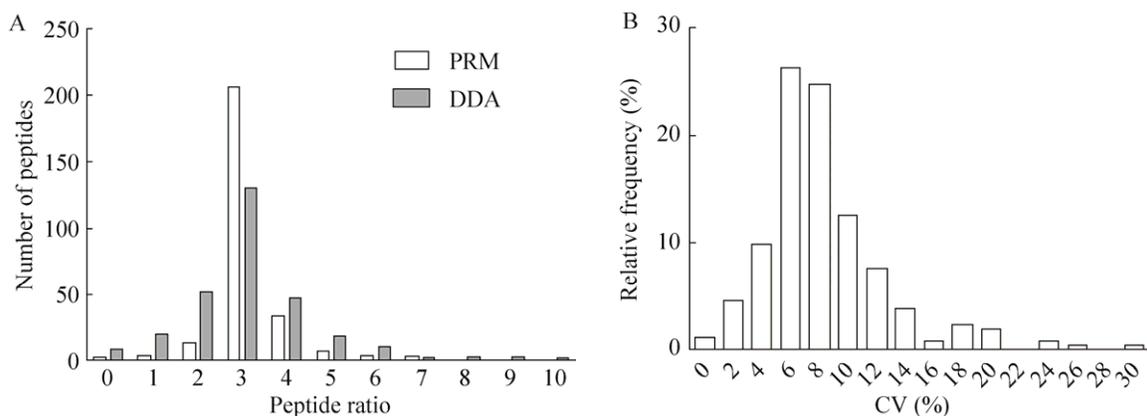


图 5 倍数稀释实验目标肽段 PRM 定量结果 (A: PRM 与 DDA 定量比例分布情况对比; B: PRM 重复定量 CV 值)

Fig. 5 PRM targeted peptide quantification results of rate dilution test. (A) Comparison of peptide ratio distribution from PRM and DDA quantification. (B) CV of PRM quantitative repeatability.

随后对定量肽段的 CV 值进行了统计。300 条肽段中 95% 的肽段 CV 稳定在 20% 以内, 且以 7% 为中心呈正态分布 (图 5B)。定量稳定性的确定, 需根据具体实验情况进行 CV 选取, 若肽段丰度高可以选取 5%, 若丰度极低或通量高, 选择 20% 的情况也会存在<sup>[25-26]</sup>。说明本实验肽段鉴定稳定性在可接受范围。

综上所述, 本研究通过双反相高效液相色谱串联 PRM 靶向定量技术, 能够在 35 min 有效梯度内对 150 种低丰度目标蛋白 (400 条肽段) 进行快速准确定量, 对于不同丰度的蛋白同样能够在单一检测中实现快速准确定量。

### 3 结论

通过质谱参数的优化能够实现 PRM 检测灵敏度的提升, 但高复杂性样本中共洗脱肽段的干扰是质谱靶向定量检测时的主要限制因素, 因此 PRM 技术需要更加高效稳定的色谱系统, 这也是该研究的初衷。本研究所创建的双反相高效液相色谱串联 PRM 靶向定量检测系统, 通过降低色谱柱柱长、提高液相洗脱流速、缩短色谱洗脱梯度等方法, 提高了色谱系统的稳定性, 能够在 35 min 有效梯度内完成高达 400 条低丰度肽段的快速准确定量。同时, 该系统在相对较低的液相压力条件下也具有理想分离效果, 避免了耐高压设备以及色谱柱加热装置等苛刻条件, 使检测平台更易搭建。相信更高效、更精准的蛋白质组靶向定量平台的建立, 将为进一步推动蛋白质组学从基础研究走向临床转化奠定基础。

### REFERENCES

- [1] Ding C, Jiang J, Wei JY, et al. A fast workflow for identification and quantification of proteomes. *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12(8): 2370–2380.
- [2] Wiczling P, Markuszewski MJ, Kaliszan M, et al. pH/organic solvent double-gradient reversed-phase HPLC. *Anal Chem*, 2005, 77(2): 449–458.
- [3] Delmotte N, Lasaosa M, Tholey A, et al. Two-dimensional reversed-phase  $\times$  ion-pair reversed-phase HPLC: an alternative approach to high-resolution peptide separation for shotgun proteome analysis. *J Proteome Res*, 2007, 6(11): 4363–4373.
- [4] Wang JF, Zhao XY, Zhao Y, et al. Influence of overalkylation in enzymatic digestion on the qualitative and quantitative analysis of proteins. *Chin J Chromatogr*, 2013, 31(10): 927–933 (in Chinese).  
王继峰, 赵新元, 赵焱, 等. 酶切过程中肽段过烷基化对蛋白质定性和定量分析的影响. *色谱*, 2013, 31(10): 927–933.
- [5] Mao XL, Wei JY, Niu M, et al. Establishment of retention time-dependent intelligent selected reaction monitoring mass spectrometric method and its application. *Chin J Chromatogr*, 2012, 30(2): 170–177 (in Chinese).  
毛心丽, 卫军营, 牛明, 等. 依赖色谱保留时间的智能化选择反应监测质谱方法的建立及其初步应用. *色谱*, 2012, 30(2): 170–177.
- [6] Aebersold R, Burlingame AL, Bradshaw RA. Western blots versus selected reaction monitoring assays: time to turn the tables? *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12(9): 2381–2382.
- [7] Lange V, Picotti P, Domon B, et al. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol*, 2008, 4: 222.
- [8] Gallien S, Duriez E, Domon B. Selected reaction monitoring applied to proteomics. *J Mass Spectrom*, 2011, 46(3): 298–312.
- [9] Kiyonami R, Schoen A, Prakash A, et al. Increased selectivity, analytical precision, and throughput in targeted proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10(2): M110.002931.
- [10] Gallien S, Duriez E, Demeure K, et al. Selectivity of LC-MS/MS analysis: implication for proteomics

- experiments. *J Proteomics*, 2013, 81: 148–158.
- [11] Abbatiello SE, Mani DR, Keshishian H, et al. Automated detection of inaccurate and imprecise transitions in peptide quantification by multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Clin Chem*, 2010, 56(2): 291–305.
- [12] Sherman J, McKay MJ, Ashman K, et al. How specific is my SRM?: the issue of precursor and product ion redundancy. *Proteomics*, 2009, 9(5): 1120–1123.
- [13] Karlsson C, Malmström L, Aebersold R, et al. Proteome-wide selected reaction monitoring assays for the human pathogen *Streptococcus pyogenes*. *Nat Commun*, 2012, 3: 1301.
- [14] Picotti P, Bodenmiller B, Mueller LN, et al. Full dynamic range proteome analysis of *S. cerevisiae* by targeted proteomics. *Cell*, 2009, 138(4): 795–806.
- [15] Cima I, Schiess R, Wild P, et al. Cancer genetics-guided discovery of serum biomarker signatures for diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(8): 3342–3347.
- [16] Peterson AC, Russell JD, Bailey DJ, et al. Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11(11): 1475–1488.
- [17] Schiffmann C, Hansen R, Baumann S, et al. Comparison of targeted peptide quantification assays for reductive dehalogenases by selective reaction monitoring (SRM) and precursor reaction monitoring (PRM). *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(1): 283–291.
- [18] Gallien S, Duriez E, Crone C, et al. Targeted proteomic quantification on quadrupole-orbitrap mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11(12): 1709–1723.
- [19] Kim HJ, Lin D, Li M, et al. Quantitative profiling of protein tyrosine kinases in human cancer cell lines by multiplexed parallel reaction monitoring assays. *Mol Cell Proteomics*, 2015, 14(12): 218–224.
- [20] Tsuchiya H, Tanaka K, Saeki Y. The parallel reaction monitoring method contributes to an highly sensitive polyubiquitin chain quantification. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 436(2): 223–229.
- [21] Tang H, Fang HS, Yin E, et al. Multiplexed parallel reaction monitoring targeting histone modifications on the QExactive mass spectrometer. *Anal Chem*, 2014, 86(11): 5526–5534.
- [22] Yang AF, Li SS, Zhang Y, et al. Developing targeted proteomic technique for identification and quantification of cashmere fibers. *China Science Pap*, 2016, 11(6): 663–669 (in Chinese).  
杨阿芳, 李珊珊, 张勇, 等. 基于发展靶向蛋白质组技术的羊绒纤维组成鉴定及含量分析. *中国科技论文*, 2016, 11(6): 663–669.
- [23] Cong YT. Method development for the analysis of therapeutic monoclonal antibody and its glycosylation by mass spectrometry[D]. Changchun: Jilin University, 2016 (in Chinese).  
丛宇婷. 单克隆抗体药物及其糖基化修饰的质谱分析方法研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [24] Shishkova E, Hebert AS, Coon JJ. Now, more than ever, proteomics needs better chromatography. *Cell Syst*, 2016, 3(4): 321–324.
- [25] Zhou JT, Liu HY, Liu Y, et al. Development and evaluation of a parallel reaction monitoring strategy for large-scale targeted metabolomics quantification. *Anal Chem*, 2016, 88(8): 4478–4486.
- [26] Bourmaud A, Gallien S, Domon B. Parallel reaction monitoring using quadrupole-orbitrap mass spectrometer: principle and applications. *Proteomics*, 2016, 16(15/16): 2146–2159.

(本文责编 陈宏宇)