扩增、扩增：
鸟枪法蛋白质组学促进了生物标志物的发现

发生疾病或暴露于环境毒物可对血液中的蛋白质产生细微的修饰作用（加合物）。通过临床化验检测血浆或血清中的这些修饰作用，可以确认环境暴露或疾病例如癌症的诊断速度。虽然科学家已经鉴别出大量的可作为候选生物标志物的蛋白质加合物，但找出其中的最优者应用于未来的检测仍是目前一项主要的挑战。作为一种新方法，鸟枪法蛋白质组学承诺，通过鉴定用于探索的最有前途的生物标志物使发现的过程更有效率。

科学家们还提出了探寻生物标志物的系统性“传递通道”的基本原理，范德比尔特大学（Vanderbilt University）医学院生化、药理及生物医学信息学教授丹-莱博尔（Dan Liebler）如此说道。近10年间莱博尔应用蛋白质组学研究了由活性内生性化学物引起的氧化应激或化学毒性导致的蛋白损伤。“我们了解在某种程度上可发展为生物标志物的[反应或变化]，但暴露于环境紧张性刺激的组织或系统中有如此多的候

Getty Images

选变化，我们没有有效的机制来鉴定最有可能进入传递通道的标志物。”莱博尔说道。

在过去的10年中，包含了质谱技术的蛋白质组学技术使快速鉴定发生修饰作用的特定氨基酸位点处的蛋白质以及量化加合物成为可能，因此科学家能更快速地筛选可能的生物标志物。在典型的鸟枪法蛋白质组学方法中，科学家采集生物样本，使用酶将蛋白质消化成多肽，再将多肽分离并使用离子阱质谱仪进行分析。获得光谱后通过比对多肽数据库确定样本中存在哪些蛋白质。

科学家使用鸟枪法蛋白质组学技术发现了很多感兴趣的蛋白质修饰作用。但是必须通过确定哪些生物标志物能在大量的临床样本例如暴露与非暴露人群的血液样本中进行重复测量，从而缩小候选生物标志物的名单。目前对候选生物标志物进行这样的测试需要发展定向免疫试验的方法，这种方法不仅困难而且昂贵，因为科

[在检测候选生物标志物时]真正的挑战是，很可能发现相对于血液蛋白质森林中那些“红杉”——或被称为丰量蛋白质，那些小而贫乏被修饰蛋白质反而携带更多的信息。

——B. Alex Merrick
NIEHS

学家必须找到方法中所使用的针对感兴趣蛋白质的特异抗体。

改进后的质谱技术有改变的潜力。蛋白质组学研究者预测在3至4年内，将出现一种免疫——质谱交联技术，这种技术结合了传统免疫检验和鸟枪法蛋白质组学方法各自的特点，可用于在大量样本中评估候选的生物标志物。

对有机磷的检测

一种常见的鉴定生物标志物的蛋白质组学方法包括将体外系统暴露于损伤来源例如特别的化学物质，然后用质谱法鉴定蛋白质的修饰作用。这就是华盛顿大学基因学助理教授麦克-麦可考斯（Mike MacCoss）与基因学医学教授克莱门特-福隆（Clement Furlong）进行研究时所使用的基本方法。麦可考斯和福隆正寻找暴露于有机磷例如磷酸三甲酚酯后的生物标志物，飞机客舱的空气中可检测到作为飞机引擎润滑剂的磷酸三甲酚酯。当磷酸三甲酚酯被机体吸入后，可通过代谢转变为有毒的环水杨苷磷酸盐。明确鉴定这种化学物的暴露有助于判定这种暴露是否是导致神经病症状例如震颤和记忆丧失的原因，有报道指出航空公司的员工中出现了这些症状。

在试图建立有机磷暴露的试验方法时，麦可考斯和同事将蛋白质生物化学和蛋白组学结合在一起。“以前在蛋白质生物化学中使用的方法是，你了解你所感兴趣的某种行为，或者得到了给定蛋白质的相应抗体，当你提纯你的蛋白质，你使用活性追踪[蛋白质]，然后确定蛋白质序列，”麦可考斯说道。“我们也做相同的事，”他解释道。“只是我们在最后使用质谱测定加速这一过程。”

已知有机磷化合物可抑制被称为羧基酯酶的一类家族蛋白质。为了找到感兴趣的特异蛋白质，麦可考斯和同事首先使用体外血清标本进行了活性试验。在标本中添加了一种有机磷化合物，然后使用传统生物化学活性试验追踪被化合物修饰的蛋白质。科学家们不断的追踪活性并分馏标本，直至将其纯化，最终只剩下一种蛋白质。此时他们并不知道这一蛋白质的特性，但他们知道这一蛋白质具有被有机磷修饰后的活性。

接着研究者使用纯化的标本进行更明确的实验，通过微毛细血管液相色谱接质谱法鉴定感兴趣的蛋白质并测量由先前的有机磷引起的修饰作用。为了完成试验，他们添加了胰岛素等酶类将蛋白质消化成多肽。“这样生成了一系列涵盖了整个蛋白质序列的相互交迭的多肽。”麦可考斯说道。

研究人员能同时鉴定蛋白质和修饰作用的位点，因为修饰作用能引起多肽质量的轻微变化。使用这种方法，麦可考斯及其同事鉴定了三个被有机磷化合物修饰的候选蛋白质，并鉴定了每个蛋白质的修饰位点。现在，麦可考斯和其他类似发现候选生物标志物的科学家们必须通过大量的样本例如暴露人群的组织或血清测试候选的生物标志物。

海底捞针

体内试验检测候选生物标志物面临的巨大挑战是病人样本中被修饰蛋白质的浓度非常低，甚至低于体外试验。“真正的挑战是，很可能发现相对于血液蛋白质森林中那些“红杉”——或被称为丰量蛋白质，那些小而贫乏被修饰蛋白质反而携带更多的信息，”NIEHS呼吸生物学实验室成员，科学家亚列克斯-莫里克（B. Alex Merrick）说道。与鉴定疾病生物标志物相比，发现

很有可能[基于质谱的试验]作为一种可选择的分析平台，在进行标记试验时可代替免疫试验。

——Dan Liebler
范德比尔特大学医学院

Getty Images; Getty Images

特定环境暴露的生物标志物特别困难。“很多时间你被寻找改变时存在的噪音水平所击败，”莫里克说道，“很难证实[暴露引起的修饰作用]。”

麦可考斯尝试解决上述问题，他使用了亲和剂，这样在体外试验时不进行实验室纯化就可增加血清样本中感兴趣蛋白质的含量。“亲和剂能预先将蛋白质一个个结合起来，你能有效地完成这一过程，你感兴趣的蛋白质在混合物总蛋白中的比例就更大，”他说道，“然后我们进行质谱检测，使进程大大加快。”麦可考斯预示他能一次对多个样本同时进行亲和性富集，然后进行质谱检测。

混合试验

现在，据莱博尔所言，质谱法提供了“架桥技术”，能帮助科学家在无需进行高质量试验如免疫试验评估潜在生物标志物的情况下对生物标志物可能性进行排序。但在大量病人样本中评价候选的生物标志物时，仍需对这些特异的生物标志物进行定向免疫试验。“制造用于高质量ELISA试验的优质抗体非常困难而且昂贵，而ELISA试验是免疫试验的标准平台，”莱博尔说道。

但莱博尔预测，基于质谱的检验会发展到代替免疫试验的地位对生物标志物进行评估。“很有可能质谱法作为一种可选择的分析平台，在进行标记试验时可代替免疫试验，”莱博尔说道。

“通过混合的免疫-质谱测定试验，抗体……通过富集混合物中的目标，推进质谱测定，”莱博尔说道。他和其他人在进行研究设定时应用了这样的试验，但莱博尔并没有意识到应用的方法还处于文献发表的阶段。“这些试验现在还未处于最佳的应用时段，”他说道。但他预测在未来的三至四年内，各项研究中会应用这些试验鉴定大量病人样本的生物标志物。

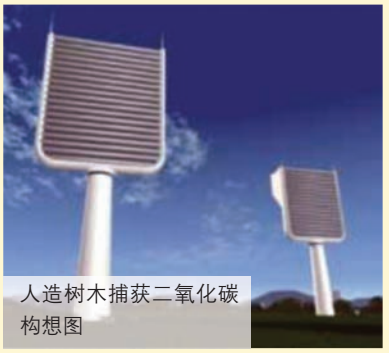
麦可考斯也制作了软件以提高质谱法测定样本中低含量蛋白质的能力。在《蛋白组学研究杂志》（*Journal of Proteome Research*）2009年4月3日发表的一篇文章中，麦可考斯及其同事描述他们使用了一种算法对质谱仪进行编程，可以优先获取低含量多肽的光谱，文中写到，“我们的方法中使用了质谱分析仪的峰值性能测定那些在存在强烈的干涉信号时无法进行正常采样的多肽的特性。”麦可考斯说道，“这并不完美，但是一种进步。在你一小部分样本中含有被修饰的多肽的情况下，你可以有足够的材料反复进行分析。”

在未来应用临床试验鉴定暴露生物标志物时面临的另一个挑战是，蛋白质以及暴露引起的任何修饰，在病人被检测前可能已在机体内降解。“蛋白质一旦降解，我们就无法测定该蛋白质的修饰形式，”麦可考斯说道，“我们所追踪的一些蛋白质生物标志物的生物半衰期非常短。一旦发现就要及时解决。”当前，蛋白组学研究者及其使用的将暴露人群的蛋白质加合物鉴定为生物标志物的混合免疫-质谱测定技术，使我们对环境毒物与疾病的关系有了更接近的了解。

–Angela Spivey

译自 *EHP* 117:A206–A209 (2009)

冷却地球



人造树木捕获二氧化碳构想图

英国机械工程师学会于2009年3月5日宣布了冷却地球（Cooling the Planet）挑战的获奖者。该竞赛目的是为了激发年轻科学家开发工程方法以减少大气中的温室气体水平。在减排方面的获胜者——该获胜者同时也赢得了整项比赛——提议通过一个裂解植物的网络使有机物垃圾从废弃物转化为生物碳；而生物碳可肥沃土壤并且能螯合碳[了解更多关于生物碳的信息，参见*EHP* 117:A70–A73 (2009)；中文版2009年6月刊第34~37页]。地理工程学类获胜者提出了装上化学洗涤器的人造“树木”系统。洗涤器将使用碱液消除周围空气的二氧化碳。氧化钙将消除洗涤器中的二氧化碳，然后可置于地下储存。

–Erin E. Dooley

译自 *EHP* 117:A149 (2009)

参考读物

Hoopmann MR, Merrihew GE, von Haller PD, MacCoss MJ. 2009. Post analysis data acquisition for the iterative MS/MS sampling of proteomics mixtures. J Proteome Res 8(4):1870–1875. doi:10.1021/pr800828p

Liebler DC. 2008. Protein damage by reactive electrophiles: targets and consequences. Chem Res Toxicol 21:117–128. doi:10.1021/tx700235t

Marcotte EM. 2001. Measuring the dynamics of the proteome. Genome Res 11(2):191–193. doi:10.1101/gr.178301

Merrick BA. 2008. The plasma proteome, adductome and idiosyncratic toxicity in toxicoproteomics research. Brief Funct Genomic Proteomic 7:35–49. doi:10.1093/bfgp/eln004

National Cancer Institute. Proteomics Primer. http://proteomics.cancer.gov/library/primer.asp

Pacific Northwest National Laboratory. Biomarkers. http://www.sysbio.org/sysbio/biomarkers

Institution of Mechanical Engineers