

五、磷酸化蛋白质组学常用分析和定量方法

蛋白质的磷酸化修饰是生物体内重要的共价修饰方式之一。蛋白质的磷酸化和去磷酸化这一可逆过程几乎调节着包括细胞的增殖、发育、分化、信号转导、细胞凋亡、神经活动、肌肉收缩及肿瘤发生等过程在内的所有生命活动。目前已知有许多人类疾病是由于某些异常的磷酸化修饰所引起，而有些磷酸化修饰却是某种疾病所导致的后果。在哺乳动物细胞生命周期中，大约有1/3的蛋白质发生过磷酸化修饰；在脊椎动物基因组中，有5%的基因编码的蛋白质是参与磷酸化和去磷酸化过程的蛋白激酶和磷酸（酯）酶。磷酸化修饰本身所具有的简单、灵活、可逆的特性以及磷酸基团的供体ATP的易得性，使得磷酸化修饰被真核细胞所选择接受而成为一种最普遍的调控手段。鉴于磷酸化修饰在生命活动中所具有的重要意义，探索磷酸化修饰过程的奥秘及其对细胞功能的影响已成为众多生物化学家及蛋白组学家所关心的内容。用蛋白质组学的理念和分析方法研究蛋白质磷酸化修饰，可以从整体上观察细胞或组织中磷酸化修饰的状态及其变化，这对以某一种或几种激酶及其产物为研究对象的经典分析方法是一个重要的补充，同时提供了一个全新的研究视角，并由此派生出磷酸化蛋白质组学（**phosphoproteomics**）这一新概念。在蛋白质组学水平进行磷酸化蛋白质的分析定量研究已引起人们广泛关注，各种技术也相应地发展起来^[60, 61]。

1. 磷酸化蛋白质和磷酸肽的富集^[62]

1.1 免疫亲和色谱

富集磷酸化蛋白质最简单的方法就是用识别磷酸化氨基酸残基的特异抗体进行免疫共沉淀，从复杂混合物中免疫沉淀出目标蛋白质。目前，仅有酪氨酸磷酸化蛋白质的单克隆抗体可以用来进行有效的免疫共沉淀。这是因为该抗体具有较强的亲和力和特异性，可以有效地免疫沉淀酪氨酸磷酸化的蛋白质。Imam-Sghiouar等人从B-淋巴细胞中通过免疫沉淀获得酪氨酸磷酸化的蛋白质，然后再用二维电泳分离技术并结合质谱分析方法，从而鉴定出多个与斯科特综合症相关的酪氨酸磷酸化的蛋白质。由于抗磷酸化丝氨酸和苏氨酸抗体的抗原决定簇较小，所以令抗原抗体的结合位点存在空间障碍，特异性较差。因此，目前采用磷酸化丝氨酸/苏氨酸的抗体来富集磷酸化蛋白质的研究相对较少。

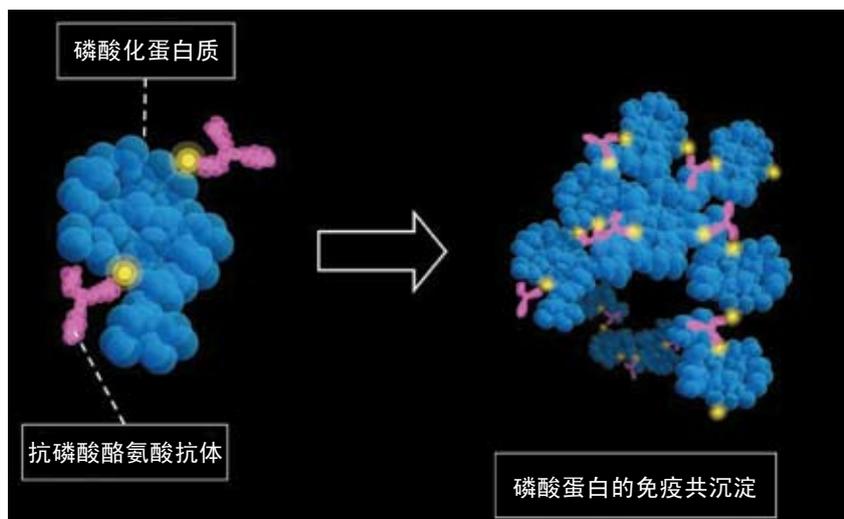


图14 免疫共沉淀法纯化磷酸化蛋白质。

图片来源：<http://en.wikipedia.org/wiki/Phosphoproteomics>

1.2 固相金属亲和色谱 (IMAC)

固相金属亲和色谱 (immobilized metal affinity chromatography, IMAC) 是一项较为成熟的磷酸化多肽分离富集技术。它是利用磷酸基团与固相化的 Fe^{3+} 、 Ga^{2+} 和 Cu^{2+} 等金属离子的高亲和力来富集磷酸肽。目前发展的高通量磷酸化蛋白质组分析途径主要采用IMAC亲和色谱-反相液相色谱-串联质谱-数据库检索联用的方法。Ficarro等人最先将IMAC富集技术应用到细胞系大规模磷酸化蛋白质组学的分析中, 并从啤酒酵母中鉴定出了216个磷酸化肽段和383个磷酸化位点。该方法的优点在于对每个可溶磷酸肽, 不管其长度如何, 都有富集作用, 而且IMAC柱洗脱下的样品可直接用于RP-HPLC分析, 但有可能丢失一些与IMAC柱结合能力较弱的磷酸肽或某些因有多个磷酸化位点而难以洗脱的磷酸肽。另外, 那些富含酸性氨基酸的非磷酸化肽段与固相金属离子也有结合能力, 也可能被富集。为了解决IMAC柱的非特异性吸附的问题, 可以采用对羧基进行酯化反应以及改变洗脱液的体系等方法来提高IMAC柱的特异性。此外, 自动化IMAC-capillary RP HPLC-ESI MS/MS技术平台的研究开发, 使磷酸肽的富集、反相分离和质谱检测都能自动在线进行, 为IMAC在蛋白质组学中的高通量应用开辟了道路。

1.3 TiO_2 色谱

近期金属氧化物亲和富集技术得到了人们极大的关注。2004年, Pinkse等人将二氧化钛 (TiO_2) 技术引进磷酸化蛋白质组学领域, 利用 TiO_2 与磷酸肽上磷酸基团的亲和能力实现对磷酸肽的相对富集, 并建立了通过 TiO_2 作为预分离的2D-NanoLCESI-MS/MS技术平台。虽然该技术在磷酸化肽段富集时的选择性和灵敏度方面都优于IMAC技术, 但仍然存在非特异性吸附等问题。后来, 人们又利用纳米材料比表面积大的特点, 对 TiO_2 纳米级材料进行了开发研究, 从而进一步增强了该技术对磷酸化肽段富集的巨大潜力。但是, 目前纳米级的 TiO_2 富集磷酸化肽段技术还只能适于MALDI源的质谱仪, 在ESI源质谱仪中的应用还有待进一步研究。

1.4 离子交换色谱

离子交换色谱是利用物质的带电部分与具有相反电荷的离子交换剂的相互作用不同来达到分离纯化的目的。Beausoleil等人发现大部分磷酸化肽在PH2.7的溶液中所带净电荷是1+, 而非磷酸化肽所带净电荷大部分为2+, 因此, 利用强阳离子交换 (strong cation exchange, SCE) 技术就可以将磷酸化肽与非磷酸化肽分离开来。磷酸化肽最先被洗脱下来, 实现相对富集。有人曾利用这一方法分离出了人HeLa细胞核蛋白的磷酸化肽。但该法也有不足之处, 因为有一些磷酸化肽所带电荷也是2+, 甚至带有更多的电荷, 这种情况下就会造成部分磷酸化肽的丢失。

1.5 亲/疏水作用色谱

磷酸肽按照其疏水性不同而采用RP-HPLC进行分离。RP-HPLC分离是减少混合肽中的复杂成分的一个十分重要的方法。该方法重现性好、简单且不需要特别的设备。极少量的磷酸化肽也可以在低流速下用毛细管柱分离。需要注意的是, 高亲水性的磷酸肽可能并未被吸附在柱上而直接流过色谱柱, 而高疏水性的肽则会到最高梯度时才会被洗脱甚至可能不被洗脱, 因此在样本中有些磷酸多肽无法被检测到。再者, 磷酸多肽吸附于金属表面上, 如果使用金属注射器则可能发生显著的样品丢失。尽管如此, RP-HPLC仍在磷酸多肽分析中得到广泛的应用, 这是因为它容易与质谱联用, 并且即使分析物没有同位素标记, 也可以在样本混合物中发现和描述磷酸化肽。

1.6 磷酸基团的化学修饰

近来,有人将肽或蛋白混合物置于碱性硫代二乙醇溶液中,通过 β 消除从磷酸化丝氨酸或苏氨酸中去除磷酸基团 H_3PO_4 ,形成的双键受到硫代二乙醇的作用,巯基取代磷酸基团,生物素与巯基相连,被标记的肽或蛋白质上样于固定有亲和素的层析柱,通过生物素与亲和素的高亲和力作用而达到磷酸化肽或蛋白质富集的目的。这一方法的主要缺点在于它不能富集酪氨酸磷酸化的蛋白质和肽。Zhou等人用另外一种方法修饰磷酸化肽,用碳二亚胺浓缩反应将半胱氨酸加在磷酸基团部分,修饰过的肽段以共价键与碘乙酰胺树脂结合,酸洗涤释放。此方法既可用于富集磷酸化酪氨酸,可用于富集磷酸化丝氨酸和磷酸化苏氨酸,但需要多步化学反应和柱纯化过程。化学修饰方法最大的缺点在于整个过程需要大量蛋白,不利于低丰度蛋白的检测。

2. 生物质谱分析磷酸化位点^[62]

用于蛋白质鉴定的质谱依电离源的不同分为两种:基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser-desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)和电喷雾电离质谱(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)。前者利用基质吸收激光的能量使固相的多肽样品离子化,后者则在喷射过程中利用电场使液相的多肽样品离子化。离子化的肽段进入质量分析器,因质量电荷比(m/z)差异发生分离,通过测量肽段离子的相关参数,可获得肽质量指纹图(peptide mass fingerprint, PMF)、肽序列标签(peptide sequence tag, PST)或部分氨基酸序列。最后,应用适当的软件搜寻基因组和蛋白质组数据库,从而实现了对蛋白质的定性鉴定及功能分析。

2.1 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)

MALDI-TOF-MS由于操作简单、灵敏性强、价格低廉而广泛应用于蛋白质鉴定工作。不过,将其应用于蛋白质磷酸化研究就遇到了问题。磷酸化肽段带负电荷,而生物质谱常用正离子模式,导致离子化程度低;大量非磷酸化肽段的信号抑制了磷酸化肽段的信号并且在肽质量指纹图中缺少标志性离子。因而, MALDI-TOF-MS通过与碱性磷酸酶的去磷酸化作用或与氢氟酸相结合来鉴定磷酸化肽段。丝氨酸和苏氨酸磷酸化肽段会丢失磷酸基团(-98u),而酪氨酸磷酸化肽段会去磷酸化(-80u)。MALDI-TOF的另一特征可以进行亚稳态裂解分析,即源后衰变(post source decay, PSD)。前离子从离子源内解析电离过程中获得的内能在无场漂移区内飞行过程中通过发生断裂而释放其能量,这个过程称为源后衰变。由此得到的碎片离子与前离子有相同的飞行速度但能量不同,在反射器内穿越的深度不一,可被反射器按其质量大小(即能量大小)从小到大依次反射,并到达检测器检测。

2.2 串联质谱(MS/MS)

生物质谱的质量分析器有不同的选择,如三级四级杆、离子阱、飞行时间、傅立叶回旋共振等质量分析器。将两个质谱仪的质量分析器串联,第一个质量分析器将预测组分与其它组分分离,第二个质量分析器对其进行扫描,产生该组分的质谱图即为串连质谱。利用三级四级杆、四级杆-飞行时间、四级杆-离子阱进行前体离子扫描或中性丢失扫描,可鉴定磷酸化位点。

前体离子扫描是利用丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸磷酸化肽段在碰撞诱导解离(CID)时会发生磷酸基团丢失的原理来实施检测的。这些丢失的磷酸基团可以作为磷酸肽的“报告离子”:在阴离子模式下,第一个四级杆用来进行全谱扫描, CID在第二个四级杆中进行,第三个四级杆只选择通过质荷比为79的离子(即 PO_3^- , m/z 79),用来鉴定磷酸化肽段。一旦磷酸化肽段被鉴定出来后,质谱便转为阳离子扫描模式,进行

肽段的测序。前体离子扫描的另一种方式是直接进行阳离子扫描，immonium离子 (m/z 216.04) 是酪氨酸磷酸化肽段的特征性碎片离子。而丝氨酸、苏氨酸磷酸化肽段涉及到对残基上的磷酸基团进行化学修饰。在脱磷酸基团和发生 β 消除反应后，加入合成的巯基季铵进行加成反应，然后在低能量的CID下，产生特异的小分子碎片 (m/z 122.06)。

中性丢失扫描在质谱检测磷酸化位点中也有重要地位。在阳离子扫描模式下，丝氨酸、苏氨酸磷酸化肽段会失去 H_3PO_4 或 HPO_3 ，从而质量数会减少98u或80u。中性丢失扫描的优点是完全可以在阳离子模式下操作，而不像前体离子扫描那样要变换离子扫描方式，并且此方法在离子阱分析器中也有很好的利用。因为质谱检测到的是质量电荷比而不是质量本身，所以中性丢失扫描时检测到的信号可能有几个数值。例如，在失去 H_3PO_4 的情况下，若离子带单电荷，则检测到98u，若带双电荷或三电荷，则会相应检测到49.0u和32.7 u；在CID时发生 β 消除反应时，失去的有可能是 H_3PO_4 (98u) 也有可能是 HPO_3 (80u)，从而使分析复杂化。

2.3 傅里叶变换离子回旋共振质谱 (FT-ICR MS)

傅里叶离子回旋共振 (Fourier transform ion cyclotron resonance, FT-ICR) 质谱仪是一种相对较新的质谱仪，具有相当高的分辨率和准确性，是几乎现有的生物质谱仪中功能最强大的一种。FT-ICR的碎片模式是电子俘获分裂，其原理是照射一束亚热态的电子到电喷雾所产生的磷酸化肽段或者小分子蛋白本身，使其形成碎片。最重要的是磷酸基团在电子俘获分析 (electron capture dissociation, ECD) 中被保留在碎片分子中，使得直接判断磷酸化位点成为可能。FT-ICR的分辨率极高，是其它生物质谱的10倍。因而，对于小分子蛋白可以不用酶解而可以直接分析其磷酸化状态。这项技术最大的缺点在于，必须是较纯的样品才能进行ECD分析，而且仪器的价格较为昂贵，对操作人员的技术要求也较高。



图15 FT-ICR质谱仪。
图片来源：http://schools-wikipedia.org/wp/m/Mass_spectrometry.htm

2.4 液质联用 (LC-MS)

色谱的优势在于分离，为混合物的分离提供了最有效的选择，但其难以得到物质的结构信息，主要依靠与标准物对比来判断未知物，对无紫外吸收化合物的检测还要通过其它途径进行分析。质谱能够提供物质的结构信息，用样量也非常少，但其分析的样品需要进行纯化，具有一定的纯度之后才可以直接进行分析。因此，人们期望将色谱与质谱联合使用以弥补这两种仪器各自的缺点。采用LC-MS结合SEQUEST运算法则，就可以进一步降低样品的复杂性，从而能够对低丰度磷酸化蛋白质进行鉴定。

3. 定量磷酸化蛋白质组学技术^[62]

3.1 双向凝胶电泳

双向凝胶电泳结合质谱分析仍然是分离和鉴定蛋白质的主要手段。二维电泳 (2-DE) 根据蛋白质的分子量、等电点、可溶性及相对丰度来分离蛋白。2-DE结合敏感银染方法已成功分离和鉴定了TGF- β 和MAPK信号转导通路中的大量分子。该方法首先使用泛抗磷酸化丝/苏氨酸抗体或 (和) 泛抗磷酸化酪氨酸抗体，富集

细胞被刺激前后的丝/苏氨酸或（和）酪氨酸磷酸化蛋白分子，进行2-DE分离；然后比较刺激前后的图谱以获取差异蛋白质点；随后再用质谱技术进行鉴定，最终获得刺激因子介导的信号转导通路中信号分子的磷酸化改变，即信号分子是否活化。

在上述基础上发展起来的更加敏感且能进行定量分析凝胶蛋白质点的新方法叫做荧光差异双向凝胶电泳（fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis, 2D DIGE）。它采用荧光试剂来标记蛋白质并通过荧光成像来获取电泳图像。其优点是可以在同一块凝胶上比较两种处理不同或来源不同的蛋白质组表达，能够比较精确地在较宽的动态范围内使对研究者感兴趣的蛋白质进行定量，特别对包括有多组别和多个生物学重复情况的研究具有其独特的优势。

3.2 荧光染料Pro-Q Diamond dye染色

^{32}P 放射性标记（ ^{32}P -labeling）可以非常灵敏、直观地检测磷酸化蛋白。早在1991年，该技术便在对磷酸化蛋白质的定量分析中表现出了一定的应用前景。但 ^{32}P 高放射性对细胞造成损害并对磷酸化状态有影响，此外还存在不能标记组织样本，有放射性污染等问题。荧光染料染色（Pro-Q Diamond）是MolecularProbes公司前几年推出的一种磷酸化蛋白质的荧光染料，它可以直接对聚丙烯酰胺凝胶中的磷酸化蛋白质进行选择性地染色，无需同位素或特异性抗体，只有通过荧光扫描仪检测就可以直接显示出一维或二维凝胶电泳胶上分离的磷酸化蛋白质，对非磷酸化蛋白质的反应性很低，荧光强度会随着蛋白质磷酸化程度的不同而呈现出一定的变化。这种染料与质谱兼容，胶上的蛋白质点可以通过胶上酶切进行质谱鉴定。Chen等人将 ^{32}P 放射性标记和Pro-Q染色两种方法结合起来分析中国鼠卵巢细胞的磷酸化蛋白质组。结果发现，在定量磷酸化蛋白质时，结果受标记时间的影响，而且放射性标记的磷酸化蛋白质与Pro-Q磷酸化染料所染出的磷酸化蛋白质之间相关性较差。Hopper等人分别用2DE-Pro-QDiamond染料方法和 ^{32}P 放射性标记方法分析了猪心线粒体中的磷酸化蛋白质组，也同样发现二者相关性较差的问题。进一步研究发现， ^{32}P 标记比Pro-Q Diamond方法更灵敏，特别是能更好地检测那些磷酸基团转化速率高的蛋白质。但是，Pro-Q Diamond对丰度较高但磷酸基团转化速率较低的蛋白质具有更高的灵敏度。然而对于不同的磷酸化位点，Pro-Q Diamond的绝对灵敏度也并非一成不变。

3.3 稳定同位素标记

2000年，Weckwerth、Willmitzer和Fiehn等人首次提出稳定同位素标记（stable-isotope labeling, SIL）与LC/MS结合使用来进行蛋白质定量，从而开辟了定量蛋白质组学的一个新技术平台。与传统的定量方法（如2-DE）相比，稳定同位素标记技术在定量准确度和规模化定量分析方面都有很大的应用前景。在磷酸化蛋白质差异定量研究中，目前常用以下几种稳定同位素标记定量方法。

3.3.1 化学标记技术

目前，化学标记技术发展的基本化学原理主要有针对肽段上磷酸基团的 β 消除-马氏加成反应和在羧基端的酯化反应以及氨基端的酰化反应。其中， β 消除-马氏加成反应用得最为广泛，其基本原理是使磷酸化肽段的磷酸基团在碱性环境下发生 β 消除形成双键，同时用标有不同同位素的亲核试剂与双键发生加成反应以取代磷酸基团。该技术是专门针对磷酸化肽段而建立的，但较多的化学修饰以及纯化步骤，造成了大量样本的损失，而且在没有预分离和处理的情况下，该反应对O-糖基化肽段也起反应，所以在结果中将导致两种类型肽段的混淆。Thompson等人将IMAC技术与 β 消除-马氏加成反应结合来分析定量磷酸化蛋白质。他们首先用IMAC亲和和富集磷酸化肽段，然后用碱性溶液令磷酸化肽段发生 β 消除，与此同时磷酸化肽段也被洗脱下来，接着进行马氏加成反应从而标记上含有不同同位素的标签。

各种各样的化学修饰技术为磷酸化蛋白质的定量带来了可喜的前景，但这些化学修饰方法本身固有的反应效率、副产物等问题以及在大规模磷酸化蛋白质定量研究中的应用还有待进一步研究。

3.3.2 同位素代谢标记技术

^{15}N 标记法 (^{15}N labeling) 是Oda等人最早提出的一种同位素代谢标记技术, 它是在培养基中分别掺入 ^{14}N 和 ^{15}N 来寻找差异表达蛋白的一种方法。虽然该方法非常适用于追踪单个磷酸化位点的动力学变化, 但它仅限于分析那些表达水平相对较高的蛋白质。SILAC (stable isotope labeling by amino acid in cell culture) 技术^[25]出现以后, 很快取代了 ^{15}N 标记法。SILAC技术, 即细胞培养过程中氨基酸的稳定同位素标记, 具有显著的优点(表2), 因而迅速获得认可并在国际著名实验室中广泛使用。已经使用过的稳定同位素标记氨基酸有精氨酸(Arg)、赖氨酸(Lys)、酪氨酸(Tyr)和亮氨酸(Leu)等。

表2 SILAC标记技术具有以下显著优点

蛋白质损失小;
标记效率高、误差低;
可以实现多种样本比较;
肽段覆盖率高, 可以提高定量结果和鉴定结果的可靠性;
实验操作简便。

3.3.3 ^{18}O 标记技术

^{18}O 标记技术是将蛋白质酶切时或酶切后放入 H_2^{18}O 中, 在蛋白酶催化作用下将羧基上的两个氧替换成 ^{18}O 而进行的。除了C端肽之外, 在适宜的条件下, 所有的肽段一般都可以替换上两个 ^{18}O , 使肽段质量数相差4 u。Korbel等人^[29]采取免疫沉淀反应/IDE/LC/MS与 ^{18}O 标记来分析EPO受体依赖的蛋白质, 鉴定并定量了187个磷酸化蛋白, 发现89个蛋白质上的酪氨酸以EPO受体依赖的方式发生变化。 ^{18}O 标记技术是一种操作简单、条件温和、应用广泛(trypsin、chymotrypsin、lys-C和glu-C都能被用来标记酶切肽段的C端), 并且没有副产物的标记技术。它能与多种磷酸化肽段富集方法连用, 适于低丰度磷酸化肽段的定量标记。目前, ^{18}O 标记技术已得到国际上一些大型实验室的青睐。但是, 用 ^{18}O 进行同位素标记经常产生标记一个氧原子和两个氧原子不等的现象, 即产生分子质量+2和+4两种混合的产物。此外, ^{18}O 与 ^{16}O 交换速率也依肽段的大小、氨基酸的类型、酶的类型以及肽段序列而有所变化。所以, 尽管该技术已经得到比较普遍的应用, 但是要得到准确的定量结果还需对其进一步优化。

六、磷酸化蛋白质组学数据库及应用工具

表3~表7列出了部分磷酸化蛋白质组学数据库及应用工具的名称、网址及其特征。

表3 磷酸化数据库

数据库名称	网址	特征描述
Phospho.ELM 8.1 (PhosphoBase)	http://phospho.elm.eu.org/about.html	该数据库包含4,384种实验已确证的磷酸化蛋白。这些蛋白来自不同种属, 带有2,166个酪氨酸位点、13,320个丝氨酸位点及2,766个苏氨酸位点。