

## 磷蛋白组的研究技术及其进展

杨 珺<sup>1\*</sup> 邹全明<sup>1</sup> 蔡绍哲<sup>2</sup> 郭 刚<sup>1</sup> 朱永红<sup>1</sup>

<sup>1</sup>( 第三军医大学临床微生物教研室 重庆 400038 )

<sup>2</sup>( 重庆大学生物工程学院 重庆 400044 )

**摘 要** 真核细胞中蛋白质磷酸化是一个重要事件。真核细胞利用可逆的蛋白磷酸化来控制许多细胞过程包括信号转换、基因表达、细胞周期等。磷蛋白组的研究涉及磷蛋白的分离和鉴定、磷酸化残基定位和定量分析。由于蛋白质磷酸化是一个动态过程,在细胞中磷蛋白含量低,磷酸化位点可变,且磷酸肽的质谱信号常常会受到抑制,所以磷蛋白的分析存在更多的困难。本文介绍了国内外在磷酸蛋白的分离鉴定及定量分析方面的研究技术以及进展情况。目前,质谱仍然是核心的鉴定技术,寻找更好富集方法是最大的挑战。定量蛋白组学是对蛋白质的差异表达进行精确的定量分析。目前还不存在一种独立的方法可以完成磷蛋白的分离、鉴定,以及磷酸位点的定位和定量分析。随着样品分离技术和相关仪器的发展,磷酸蛋白快速、准确、全面分析鉴定将能够实现。

**关键词** 磷蛋白组学 二维电泳 多维液相 固定金属亲和层析 质谱 定量蛋白组学 稳定同位素标记

**中图分类号** Q513.3, Q25 **文献标识码** C **文章编号** 1000-3061(2003)02-0244-05

### 1 磷酸蛋白研究背景

多学科的相互渗透和研究技术手段的高速发展,生命科学在 20 世纪取得了巨大的进步。特别是在基因组研究方面已取得了许多的成果,包括人类基因组在内的多种生物的基因组全序列测定已陆续完成,面对庞大的遗传信息,人们开始关注这些序列信息与生命活动之间的直接或间接的联系。基因的功能是什么?它们又是如何发挥这些功能的?

基因是遗传信息的携带者,蛋白质才是生命活动的执行者,在蛋白质水平上揭示生命现象的本质和活动规律是后基因组——蛋白组研究的重点。蛋白组具有时空性和可调节性。在不同组织和细胞中蛋白质的表达是不同的。机体处在不同的环境、不同的发育阶段其蛋白质的表达也是不同的。蛋白质表达的复杂性,体现了生命活动的复杂性。而高等生物具有基因剪切、蛋白质翻译后修饰和自我剪切等特性,遗传信息的表现规律就更加复杂。蛋白质的翻译后修饰包括糖基化、磷酸化、蛋白质降解、S-硝基化、精氨酸甲基化、ADP 核糖基化等等,是蛋白质行使正常生理功能所必需的。

真核细胞中的蛋白质磷酸化作用主要发生在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基上,机体利用可逆的蛋白磷酸化来控制许多细胞过程包括信号转换、基因表达、细胞周期等<sup>[1,2]</sup>。研究表明,在真核细胞中随时有 1/3 的蛋白质处于磷酸化状态,

这些蛋白质的磷酸化能通过改变自身三维构象来调节其活性<sup>[3,4]</sup>。特别是在真核细胞的信号转换中,蛋白质的磷酸化有着举足轻重的地位。如在中枢神经系统中,几乎所有的兴奋性神经递质信号受体调控的方式都是磷酸化与去磷酸化<sup>[5]</sup>。丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸残基上的磷酸化是非常重要的蛋白质功能调节器,因此正确鉴定磷蛋白的结构以及磷酸化位置是研究磷蛋白功能的主要任务之一。而蛋白质磷酸化在机体内是一个动态的过程,在不同条件下蛋白质磷酸化的定量分析是研究蛋白质差异表达的内容<sup>[6-8]</sup>。

蛋白质磷酸化的全面分析,又称磷蛋白组学(Phosphoproteomics),包括磷蛋白和磷酸肽的鉴定,确定磷酸化定位和定量。磷蛋白组学的全面分析主要面临几方面的挑战:其一,通常细胞中磷酸化蛋白质的拷贝数相当低。其二,蛋白质磷酸化的位点是可变的,一种蛋白质可能有多种磷酸化形式。其三,多数研究蛋白质磷酸化的分析技术有一个限定的动态范围,意味着主要的磷酸化位点能够定位,次要的磷酸化位点的鉴定就十分困难。最后,磷酸酶能水解磷酸残基,在分离和纯化过程中必须抑制它的活性。

### 2 磷蛋白组的主要分离技术

目前,磷蛋白组的分析鉴定普遍采用多种分离技术结合单极或多极质谱的鉴定方法,技术的关键在于磷酸化蛋白质

收稿日期:2002-09-10,修回日期:2002-12-10。

基金项目:国家高技术 863 计划重点资助项目基金资助(No. 2001AA21516)。

\* 通讯作者:Tel: 86-23-68752316; Fax: 86-23-68752316; E-mail: W8301991@263.net

或磷酸化肽的分离和富集。

### 2.1 凝胶电泳分离技术

早在 1975 年 O'Farrell 就利用二维凝胶电泳(Two-dimensional gel electrophoresis, 2DE)对大肠杆菌总蛋白进行分离,目前 2DE 已成为蛋白组研究的核心技术之一。2DE 利用蛋白质分子之间的等电点和分子量的差异,在相互垂直的方向进行 2 次电泳分离,使蛋白组的分辨率提高了 1~2 数量级。近几年经过多方面的改进提高了 2DE 的分辨率和重复性。特别是 1982 年开发了固定化 pH 梯度介质(Immobilized pH gradient, IPG)克服了两性电解质阴性飘移和 pH 梯度性等缺点。由于可以随意精确设定的稳定 pH 梯度,极大地改善了 2DE 的分辨率和重复性,这是 2DE 技术上的一个重大突破。但当前 2DE 技术还存在以下几个缺陷:(1)极端蛋白质的丢失,包括拷贝数低于 1000 的低丰度蛋白,极酸和极碱蛋白的检出;分子量极大(>200kD)和极小(<10kD)的蛋白;难溶蛋白的检出。(2)2DE 技术的自动化问题。(3)2DE 的载量限制,目前最多能达到 mg 级水平,不能满足高通量分析研究的需要。(4)后修饰蛋白的拖曳现象。虽然 2DE 存在一些局限性,但目前在蛋白组的研究还是一种不可替代的手段<sup>[9-11]</sup>。

### 2.2 层析法分离磷蛋白

常用的磷蛋白分析方法是利用胰蛋白酶消化磷酸蛋白,获得特异的多肽片段,经反相色谱柱分离结合电喷雾质谱进行分析鉴定。Huddleston 等用 HPLC-ESI-MS(高效液相色谱-电喷雾质谱联用技术)鉴定小鼠蛋白激酶 C $\beta$  II 在体内的磷酸化位点,确定该酶的一级结构<sup>[12]</sup>。反相色谱柱在分离磷蛋白混合物的同时可以去掉盐分,但是由于多数磷酸肽具有亲水性,故样品在分离过程中有较大的损失。鉴于磷酸蛋白和磷酸肽的亲水性质,H. Matsumoto 等用分离纯化寡核苷酸 oligo R3 来分离磷酸蛋白<sup>[13]</sup>。E. T. Chin 报道用多孔石墨碳柱(Porous graphitic carbon)来富集磷酸蛋白<sup>[14]</sup>。对于一些复杂的蛋白混合物,以及弥补二维电泳对极端等电点及极端极性的蛋白分离的局限性,发展了多维液相色谱法(Multidimensional liquid chromatography),蛋白混合物先经过强阳离子交换柱或分子筛,再反相柱分离,然后直接进入质谱里得到分离和鉴定。由于二维色谱法分离的原理与 2DE 不同,成为 2DE 互补的分离方法。二维色谱法能弥补 2DE 的缺陷,对极端蛋白的分离没有偏向性,具有放大效应,分离得到较多的蛋白能满足后续的鉴定,与质谱直接连接使自动化程度高、重复性好,避免了 2DE 显色、切胶和消化过程的损失。基于这些优点,随着 LC/LC-MS/MS(二维液相色谱-二级质谱联用技术)的发展和改进,很可能会取代 2DE-MS 在蛋白组研究的地位。

P. Cao 等运用了微型固定金属亲和层析(Immobilized metal affinity chromatography, IMAC)在离线或在线形式下完成质谱检测磷酸肽<sup>[15-17]</sup>。IMAC 利用金属螯合离子( $Fe^{3+}$ 、 $Al^{3+}$  和  $Ca^{3+}$ 、 $Ga^{3+}$  对磷酸基团亲和力的更强),达到选择性分离浓缩磷酸蛋白的目的。IMAC 是基于阴离子磷酸基团的存在,能较好地富集磷酸化丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基肽。

IMAC 主要的问题是金属螯合离子对磷酸基团的亲和力易受到酸性基团(如谷氨酸和天门冬氨酸)和电子供体基团(如组氨酸)的影响。磷酸蛋白的洗脱也受到金属离子的种类、柱的材料和洗脱过程的影响。为消除肽链中酸性基团的影响, Ficarro 等在磷酸蛋白上柱前对酸残基进行酯化作用,获得了更好的特异性<sup>[18]</sup>,并用该法从总酵母蛋白中获得了数百个磷酸蛋白。如果将 IMAC 进一步的改进,有望成为分离磷酸蛋白最好的工具之一。

### 2.3 免疫沉淀

目前,用于富集磷酸化酪氨酸、丝氨酸和苏氨酸蛋白的抗体已商业化,但仅有抗磷酸酪氨酸抗体的效果较好,在富集和鉴定低丰度酪氨酸磷酸化蛋白相当有效。抗体是用于免疫沉淀反应的特殊蛋白,能专一性地从复杂的蛋白混合物将磷酸蛋白中富集出来。K. Marcus 等利用免疫沉淀反应获得并鉴定了人血小板蛋白中的酪氨酸磷酸化蛋白<sup>[19]</sup>。先用 2DE 分离人血小板蛋白的片段,用抗磷酸酪氨酸的抗体免疫印迹识别磷酸蛋白,可疑蛋白点经胰蛋白酶水解在 MALDI-TOF-MS(基质辅助激光解吸离子化-飞行时间质谱)鉴定,确定了几个酪氨酸磷酸化蛋白。A. Pandey 等为了鉴定表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor, EGFR)信号途径的几个组分,运用免疫沉淀方法提取引起 EGF 响应酪氨酸磷酸化蛋白分子,并用一维电泳结合电喷雾串联质谱鉴定了 9 个信号分子,其中 7 个已确认为表皮生长因子受体信号组分。同时鉴定了最近发现的 Vav- $\alpha$ (一种鸟苷酸转换因子),并证实 Vav-2 为 EGFR 的配基,在 EGF 响应时其酪氨酸残基发生了磷酸化。这些提示了该方法可成为鉴定细胞表面受体组分的有效途径<sup>[20]</sup>。

### 2.4 化学修饰法

通过对磷酸盐的化学修饰,也可达到从复杂混合物中富集磷酸肽的目的。磷酸盐的化学修饰有两种化学修饰方法, $\beta$ -消除反应和二亚胺缩合反应<sup>[21,22]</sup>。这两个方法要求大量的样品且仅对高丰度蛋白容易检测,所以实际运用并不多,若能结合其他的分离方法提高对低丰度蛋白的检测率,化学修饰法还是一种有前途的方法。 $\beta$ -消除反应是在强碱性条件下处理磷酸蛋白样品,使磷酸丝氨酸和磷酸苏氨酸残基上发生  $\beta$ -消除反应,形成  $\alpha\beta$  不饱和键。EDT 作为亲核试剂,提供一个硫醇基团与生物素亲和标记连接,可在相应的生物素亲和柱上得到富集。 $\beta$ -消除反应之前样品需用酸处理,使半胱氨酸和蛋氨酸残基氧化,避免与生物素反应。该方法能减少磷酸蛋白混合物因多步纯化带来的损失,但磷酸酪氨酸不易发生  $\beta$ -消除,故受到限制。二亚胺缩合反应适合含有磷酸酪氨酸的蛋白质,但需几个化学反应和多个纯化步骤,因而样品损失也较大。

## 3 磷蛋白组的主要鉴定技术

80 年代末两种软电离技术的发明,使质谱迈入了生物大分子的研究领域,并极大地推动了蛋白组研究进程,和起成为目前蛋白质研究的核心技术。这两种软电离

技术分别是电喷雾离子化(Electrospray ionization, ESI)和基质辅助激光解吸离子化(Matrix-assisted laser-desorption ionization, MALDI),ESI能产生多电荷峰扩大了分子量的测定范围,同时提高了灵敏度和准确性,而且ESI能方便地与分离技术联用,实现蛋白质分离鉴定的自动化。MALDI主要生成单电荷离子,使质谱图中的离子与混合物中的蛋白质或肽有良好的对应关系。质谱的电离技术的突破,解决了生物大分子分子量快速准确的测定问题,结合各种分离技术使蛋白组的研究深入到对蛋白质后修饰分析和高级结构的探索以及蛋白质之间的相互作用水平<sup>[23-25]</sup>。

磷酸肽的鉴定分析对现有的质谱技术提出了巨大的挑战。理论上,蛋白质的每个磷酸化成分均能被质谱检测,但实际上质谱对蛋白质水解片段的分析极少能有100%的覆盖率。磷酸基团的阴离子电荷妨碍胰蛋白酶的消化,而磷酸蛋白水解所得的肽却不能象非磷酸化肽那样可以直接进行质谱鉴定。首先,在阳离子模式下(蛋白质检测通常使用的模式)非磷酸肽的存在会削弱磷酸肽离子的信号,所以来自磷酸肽的信号通常受到抑制。其次,样品中存在质量数相同而磷酸化位点不同的肽使分析变得复杂。其三,肽质量指纹不能直接产生序列信息,准确的磷酸化残基的鉴定是不容易的。最后,用该法分析磷酸化要求纯度较高的蛋白或肽,需与一维或二维电泳或高效液相色谱纯化。

### 3.1 质谱技术

MALDI-MS已成功用于非磷酸化蛋白质的鉴定分析,通过获得胰蛋白酶水解的肽质量指纹图,与理论水解产物的质量比较从而获得蛋白质的序列信息。A. Stensballe等将MALDI-TOF-MS与磷酸酶消化处理相结合准确鉴定磷酸肽残基位置<sup>[26]</sup>。磷酸酶处理之后,磷酸盐的缺失引起的特有的质量变化。个别情况还可以区分磷酸肽中的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸之间的磷酸化,因为在阳离子模式下,含丝氨酸和苏氨酸的磷酸肽呈质量数为98 D的损失(来自 $H_3PO_4$ ),而含酪氨酸的磷酸肽具有质量数为80 D的损失(来自 $HPO_3$ )。如果先用IMAC纯化富集磷酸肽,质谱的鉴定工作会更有意义。Yuliang Ma等尝试用阴离子模式鉴定样品中的磷酸肽,检测到一些在阳离子模式中较弱的信号<sup>[27]</sup>。Patterson等利用PSD(Postsource decay, 源后衰减技术)-MALDI-MS获得低于pmol的磷蛋白的序列信息和确定的磷酸化位点,但PSD-MALDI-MS对操作人员的技能要求很高,获得一张好的质谱图的困难限制该方法的使用<sup>[28]</sup>。近几年,与MALDI-MS结合的串联质谱也较多地运用于磷蛋白的分析鉴定,如MALDI-Q-TOR(基质辅助激光解吸离子化-四极杆-飞行时间质谱),MALDI-TOF-TOR(基质辅助激光解吸离子化-二级飞行时间质谱),MALDI-ion trap(基质辅助激光解吸离子化-离子阱质谱)等,它们不仅提供快速的磷酸肽鉴定,而且准确确定磷酸化的位置,但是使用这些仪器时,MALDI的一些缺点是不能克服的,而且磷酸肽的分离纯化仍是分析鉴定的关键所在。

### 3.2 先驱离子扫描

由CID(Collision-induced dissociation, 碰撞诱导分裂)所产

生的片段中,磷酸肽不仅产生特殊序列的片段而且一些片段含有特殊的磷酸基团。在串联质谱先驱离子扫描(Precursor-ion scanning)实验中,这些特殊的磷酸片段离子可以作为磷酸化肽的报告离子。S. A. Carr等将1、2mL的未分离的蛋白质消化物在碱性条件下直接注入电喷雾质谱中,流速20~40 nL/min,质荷比为 $79(PO_3^-)$ 的先驱离子扫描给出含有磷酸肽分子离子的质谱图<sup>[29]</sup>。如果蛋白质序列已知,提供的肽分子质量足以鉴定特殊磷酸化序列。如果蛋白质序列未知,用串联的质谱先驱离子扫描同样可提供氨基酸序列和磷酸化位点。该方法有高的选择性和灵敏度,且适合丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基,但由于极性变化而不适合液质联机方法。

### 3.3 ECD-FTICR-MS技术

S. D. Shi等已成功地应用ECD(Electron capture dissociation, 电子捕获分裂)和FTICR-MS(Fourier transform ion cyclotron resonance-mass spectrometry, 傅立叶离子变换回旋加速共振质谱)结合技术进行肽中磷酸化残基的准确定位,预示这方法已成为蛋白质和肽序列分析及其后修饰研究强大的方法<sup>[30]</sup>。分子量为24kD异种来源牛酪蛋白, ECD碰撞分裂FTICR鉴定出第15位丝氨酸发生磷酸化具有同源性。ECD能比CID诱导产生更多的肽的碎片,而且肽或肽碎片没有磷酸( $H_3PO_4$ 和 $HPO_3$ )的损失,这就允许不需要任何蛋白质的降解处理,直接进行磷酸位点的确定。由于FTICR-MS极高分辨力(比其他质谱高出十倍以上),一些常用质谱不能分析的大肽和蛋白质也能在FTICR-MS得到很好的鉴定,而且FTICR可以研究一个完整的蛋白质,可提供更多的蛋白磷酸化的信息。但是该技术要求纯的样品和熟练的人员,且仪器昂贵。

## 4 蛋白磷酸化定量分析

蛋白质发生不同的磷酸化,可能处于不同的信号途径。在不同的生理条件下,一些已知的位点可能根本没有磷酸化,或少数分子发生了磷酸化,只有极端情况下,所有蛋白质分子都发生了磷酸化,故细胞内蛋白磷酸化的程度对了解信号传导及相应的响应机制是研究蛋白质功能的关键之一。对于非同步细胞的分析,我们关注非磷酸化、弱磷酸化和高磷酸化肽差异的检测,同样一个蛋白质在多个残基上的磷酸化比例对其功能的影响也是至关重要的。定量蛋白组学(Quantitative proteomics)就是对蛋白质的差异表达进行准确的定量分析,已逐渐成为蛋白组研究的新前沿<sup>[31]</sup>。

传统的磷酸化定量方法仍是磷酸氨基酸分析和Edman降解,要求富集蛋白样品,依赖于细胞中相关激酶和磷酸酶的活性,这种定量具有潜在偏差结果<sup>[32]</sup>。Y. Oda等报道了全细胞稳定同位素标记研究磷酸肽的准确定量和磷酸化位点的测量<sup>[33]</sup>。两组酵母细胞分别在富含 $^{14}N$ (99.6%)和富含 $^{15}N$ (>96%)两种基质中平行培养,获得两种标记的蛋白,等量混合再经电泳分离酶解, MALDI/TOF/MS分析。因为 $^{15}N$ 标记肽的质量数大于 $^{14}N$ 标记的肽,在质谱上产生一对峰,加上肽链上磷酸基团的质量数差异,可以测定蛋白相对数量和磷

酸化位点。该方法的灵敏度很高,仅适用于稳定同位素能结合到蛋白上的情况(如细胞培养),且同位素培养基质可能会影响细胞的生长和蛋白质的后修饰。最近,同位素亲和和标签(Isotope coded affinity tags, ICAT)的使用进一步拓展磷酸化的定量分析方法<sup>[34]</sup>。使用 $\beta$ -消除反应引入两种不同分子量的生物素亲和和标签开辟了量化磷酸丝氨酸和苏氨酸肽的一种途径。ICAT是一种人工合成的化学试剂,分子量约为500D,由生物素、含有8个可标记氢的 linker 和 Cys 专一性结合基团三个部分组成。如果 Linker 用氘标记, ICAT 质量数会提高8D。两种 ICAT 分别与蛋白质反应,酶解后用生物素亲和和层析分离,通过质谱鉴定分析不同来源的蛋白质的表达差异。Weckwerth 等用 $\beta$ -消除反应用乙硫醇取代了磷酸丝氨酸、苏氨酸肽中的磷酸部分,硫醇基团连接上生物素亲和和标记,可在相应的柱上得到富集<sup>[35]</sup>。虽乐观地认为该定量法将变成磷酸化分析的中坚力量,但化学修饰方法的缺陷限制这种方法作为蛋白组定量分析的主要途径,因为化学反应的产量低,磷酸化蛋白种类仅总蛋白的少数。然而用于特殊蛋白的研究,该方法有巨大潜力。

## 5 磷蛋白组研究展望

目前还不存在一种独立的方法可以完成磷蛋白的分离、鉴定,以及磷酸位点的定位和定量分析。决定磷蛋白鉴定分析的重要参数是目标蛋白的数量,所以富集磷酸肽或蛋白可以提高鉴定成功的可能性。虽然质谱是目前磷酸蛋白检测和测序的理所当然的选择,但它的局限性始终存在并影响着磷酸蛋白的鉴定分析。这意味着磷蛋白的全面分析仍要求借助于一些传统的方法,如<sup>32</sup>P 标记法等。不过,随着样品分离技术和相关仪器的发展,快速准确的磷酸蛋白鉴定和磷酸化位点确定将能够实现。

## REFERENCES(参考文献)

[ 1 ] Hunter T. The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos Trans R Soc London B Biol Sci*, 1998, **353**: 583 - 605

[ 2 ] Yan J X, Nicolle H, Packer A *et al.* Protein phosphorylation: technologies for the identification of phosphoamino acids. *J Chromatog A*, 1998, **808**: 23 - 41

[ 3 ] Zolnierowicz S, Bollen M. Protein phosphorylation and protein phosphatases. *EMBO J*, 2000, **19**: 483 - 488

[ 4 ] Yaffe M B, Elia A E. Phosphoserine/threonine-binding domains. *Curr Opin Cell Bio*, 2001, **13**: 131 - 138

[ 5 ] Kaetzmarck L, Kassut M, Kramka J. Glutamate receptors in cortical plasticity molecular and cellular biology. *Physiol Rev*, 1997, **7**: 217 - 255

[ 6 ] Quadroni M, James P. Phosphopeptide analysis. *Proteomics in Functional Genomics*, 2000, **88**: 199 - 213

[ 7 ] McLachlin D T, Chait B T. Analysis of phosphorylated proteins and peptides by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Bio*, 2001, **5**: 591 - 602

[ 8 ] Sickmann A, Meyer H E. Phosphoamino acid analysis. *Proteomics*,

2001, **1**: 200 - 206

[ 9 ] Gygi S P, Corthals G L, Zhang Y *et al.* Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, **97**: 9390 - 9395

[ 10 ] Shevchenko A, Jensen O N, Podtelejnikov A V *et al.* Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, **93**: 14440 - 14445

[ 11 ] Link A J, Eng J, Schieltz D M *et al.* Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**: 676 - 682

[ 12 ] Huddleston M J, Annan R S, Bean M F *et al.* Selective detection of phosphopeptides in complex mixtures by electrospray liquid chromatography/mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1993, **4**: 710 - 717

[ 13 ] Matsumoto H, Kahn E S, Komori N *et al.* Separation of phosphopeptides from their nonphosphorylated forms by reversed-phase POROS perfusion chromatography at alkaline pH. *Anal Biochem*, 1997, **251**: 116 - 119

[ 14 ] Chin E T, Papac D I. The use of a porous graphitic carbon column for desalting hydrophilic peptides prior to matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Biochem*, 1999, **273**: 179 - 185

[ 15 ] Washburn M P, Wolters D, Yates J R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 242 - 247

[ 16 ] Cao P, Stults J T. Mapping the phosphorylation sites of proteins using on-line immobilized metal affinity chromatography/capillary electrophoresis/electrospray ionization multiple stage tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2000, **14**: 1600 - 1606

[ 17 ] Nuwaysir L, Stults J T. ESI mass spectrometry of phosphopeptides isolated by on-line immobilized metal affinity chromatography. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1993, **4**: 662 - 669

[ 18 ] Ficarro S B, McClelland Mark L, Stukenberg P Todd *et al.* Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol*, 2002, **20**: 301 - 305

[ 19 ] Marcus K, Immler D, Sternberger J *et al.* Identification of platelet proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis and analyzed by matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry and detection of tyrosine-phosphorylated proteins. *Electrophoresis*, 2000, **21**: 2622 - 2636

[ 20 ] Pandey A, Podtelejnikov A V, Blagoev B *et al.* Analysis of receptor signaling pathways by mass spectrometry: identification of Vav-2 as a substrate of the epidermal and platelet-derived growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, **97**: 179 - 184

[ 21 ] Oda Y, Nagasu T, Chait B T *et al.* Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 379 - 382

[ 22 ] Goshe M B, Conrads T P, Panisko E A *et al.* Phosphoprotein isotope-coded affinity tag approach for isolating and quantitating phosphopeptides in proteome-wide analyses. *Anal Chem*, 2001, **73**: 2578

- [ 23 ] Yates J R. Mass spectrometry. From genomics to proteomics. *Trends Genet*, 2000, **16** : 5 – 8
- [ 24 ] Aebersold R, Goodlett D R. Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev*, 2001, **101** : 269 – 295
- [ 25 ] Zhou H, Watts J D, Aebersold R. A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation. *Nat Biotechnol*, 2001, **19** : 375 – 378
- [ 26 ] Stensballe A, Jensen O N, Olsen J V *et al.* Electron capture dissociation of singly and multiply phosphorylated peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2000, **14** : 1793 – 1800
- [ 27 ] Ma Y, Lu Y, Zeng H *et al.* Characterization of phosphopeptides from protein digests using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and nano-electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 2001, **15** : 1693 – 1700
- [ 28 ] Patterson S D, Thomas D, Bradshaw R A *et al.* Application of combined mass spectrometry and partial amino acid sequence to the identification of gel-separated proteins. *Electrophoresis*, 1996, **17** : 877 – 891
- [ 29 ] Carr S A, Huddleston M J, Annan R S *et al.* Selective detection and sequencing of phosphopeptides at the femtomole level by mass spectrometry. *Anal Biochem*, 1996, **239** : 180 – 192
- [ 30 ] Shi S D, Hemling M E, Carr S A *et al.* Phosphopeptide/phosphoprotein mapping by electron capture dissociation mass spectrometry. *Anal Chem*, 2001, **73** : 19 – 22
- [ 31 ] Mann M. Quantitative proteomics. *Nat biotechnol*, 1991, **17** : 954 – 955
- [ 32 ] Resing K A, Ahn N G. Protein phosphorylation analysis by electrospray ionization-mass spectrometry. *Methods Enzymol*, 1997, **283** : 29 – 44
- [ 33 ] Oda Y, Huang K, Cross F R *et al.* Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, **96** : 6591 – 6596
- [ 34 ] Gygi S P, Rist B, Gerber S A *et al.* Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol*, 1999, **17** : 994 – 999
- [ 35 ] Weckwerth W, Willmitzer L, Fiehn O *et al.* Comparative quantification and identification of phosphoproteins using stable isotope labeling and liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2000, **14** : 1677 – 1681

## Advances in Analysis Techniques of Phosphoproteome

YANG Jun<sup>1\*</sup> ZOU Quan-Ming<sup>1</sup> CAI Shao-Xi<sup>2</sup> GUO Gang<sup>1</sup> ZHU Yong-Hong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(Department of Clinical Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

<sup>2</sup>(Institute of Biology Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

**Abstract** In eukaryotes protein phosphorylation is a key event. By reversible protein phosphorylation eukaryotes control many cellular processes including signal transduction, gene expression, the cell cycle etc. Phosphoproteomics involves identification of phosphoproteins and phosphopeptides, localization of the exact residues that are phosphorylated and quantitation of phosphorylation. Because protein phosphorylation is a dynamic process, and it is present at low abundance within cells, and the phosphorylated sites on proteins might vary, and mass spectrometry (MS) signals from phosphopeptides are usually suppressed etc., so phosphoprotein analysis have more difficulties than nonphosphoprotein. In this article, we outline several analysis techniques for separation, identification and quantitation of phosphorylated proteins and peptides, and discuss the progress in these techniques. At present, MS is still an essential core identification technology for phosphoproteomic studies, To search better enrichment strategies are the main challenges in this rapidly evolving field. A major goal of quantitative proteomics is precise quantification and identification of proteins in complex mixtures. A common method for quantitative proteome analysis is the stable isotope labeling method. Today there is no single method that supersedes all others techniques for Phosphoproteomic studies. With continued development of sample preparation techniques and instrumentation, it should be possible to perform a global analysis of protein phosphorylation.

**Key words** phosphoproteomics, two-dimensional gel electrophoresis, multidimensional liquid chromatography, immobilized metal affinity chromatography, mass spectrometry, quantitative proteomics, stable isotope labeling

Received : 09-10-2002

This work was supported by Grant from The state 863 High Technology R&D Project of China( No.2001AA21516 ).

\* Corresponding author. Tel :86-23-68752316 ;Fax :86-23-68752316 ;E-mail :W8301991@263.net