

基于质谱的磷酸化蛋白质组学： 富集、检测、鉴定和定量*

石文昊^{1,2)} 童梦莎^{1,2)} 李 恺¹⁾ 王钰坤^{1,2)} 丁 琛^{1,3)**}

¹⁾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;

²⁾清华大学生命科学学院, 北京 100084; ³⁾复旦大学生命科学学院, 上海 200438)

摘要 磷酸化是一种调控生命活动的重要翻译后修饰, 调控生物的生长发育、信号转导、以及疾病的发生发展。从上世纪 80 年代开始, 质谱应用于蛋白质磷酸化的检测中, 极大地推动了磷酸化蛋白质组学的发展。质谱检测拥有高灵敏度、高通量的特点, 更重要的是具有位点分辨率, 因此基于质谱的磷酸化蛋白质组检测方法得到不断的发展和推广。常见的磷酸化蛋白质组研究, 首先对磷酸化肽段进行富集, 然后进行串联质谱分析, 最后通过搜索引擎对修饰位点进行鉴定和定量。本文从这个三个基本方面, 对磷酸化蛋白质组研究进行综述, 并对未来研究发展方向进行讨论。

关键词 磷酸化蛋白质组学, 方法, 串联质谱, 修饰位点解析
学科分类号 Q51-3

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0292

蛋白质翻译后修饰 (post-translational modification, PTM) 可以改变蛋白质结构和活性、介导细胞信号转导, 细胞对外界环境刺激的响应往往通过 PTM 实现。PTM 类型众多, 包括磷酸化^[1]、乙酰化^[2]、泛素化和糖基化^[3]等。在众多类型的 PTM 中, 磷酸化是最受关注的^[4]。磷酸化修饰是一种可逆的蛋白质修饰, 通过磷酸化修饰的变化, 可以调控蛋白质活性、影响信号传递过程。磷酸化修饰是细胞健康和疾病的核心调控机制之一, 依靠众多种类激酶和磷酸酶, 细胞可以迅速地增加或减少蛋白质的磷酸化修饰, 实现复杂而精确地调控^[5-7]。真核生物中, 约有 1/3 的蛋白质具有磷酸化修饰, 这也体现了磷酸化修饰的普遍性和重要性。

磷酸化蛋白质组学在过去 20 年间发展迅速, 多种生命过程都用磷酸化蛋白质组进行了描绘。如对细胞周期的磷酸化解析^[8]、不同小鼠组织磷酸化差异谱图^[9]、胰岛素分泌机制^[10]等。此外, 磷酸化蛋白质组研究应用于多种临床问题研究^[11-12], 推动了人们对疾病发病机制的认知, 并提供了一系列临

床疾病治疗靶点和治疗方案。比如通过外泌体中蛋白质磷酸化筛选乳腺癌生物标志物^[13]、通过小鼠脑不同区域 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptor, GPCR) 的激活研究药效和药靶^[14]等。

基于质谱的自下而上 (down-top) 的蛋白质组研究方法是常见的解析磷酸化蛋白质组方法^[15-17], 该方法通过磷酸化肽段富集, 液质联用检测和数据分析, 构建磷酸化蛋白质组数据集 (图 1)^[18]。以下从这三个方面对磷酸化蛋白质组研究进行综述和讨论。

* 国家重点研发计划 (2017YFA0505102)、国家自然科学基金 (31770886, 31770892, 31700682) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 021-31240741, E-mail: chend@fudan.edu.cn

收稿日期: 2018-11-11, 接受日期: 2018-12-11

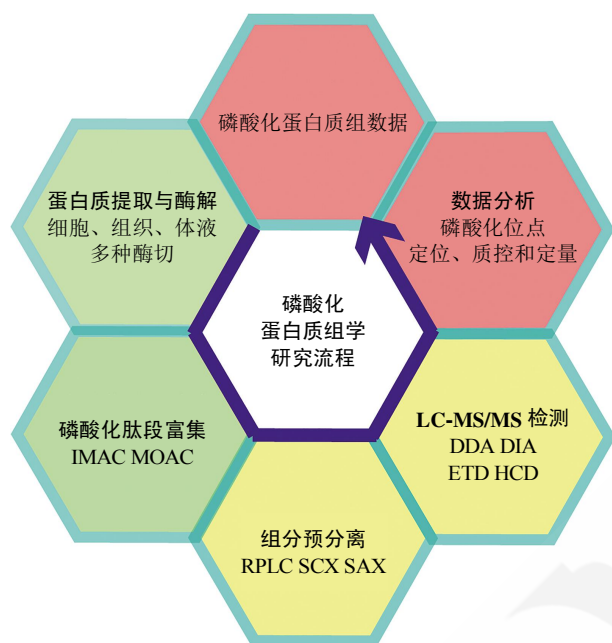


Fig. 1 Workflow for phosphoproteomics

图 1 磷酸化蛋白质组学研究流程

1 磷酸化肽段的富集

磷酸化修饰肽段的丰度相对整体细胞而言是很低的, 直接地全覆盖质谱检测, 非磷酸化的肽段会形成很高的背景信号, 影响磷酸化肽段的检测^[19-20]. 因此磷酸化肽段的检测, 首先需要进行富集. 此外, 对样品进行预分离、分成多个组分, 也是降低复杂程度、提高检测深度的常用方法^[19].

1.1 富集方法分类

磷酸化肽段的富集方法, 是整个实验流程中最多变的部分^[21]. 磷酸基团与金属亲和的方案是最流行的方案, 其中应用最广泛的两种是固相金属离子亲和色谱(immobilized metal affinity chromatograph, IMAC)和金属氧化物亲和色谱(metal oxide affinity chromatography, MOAC)^[21-22]. IMAC 建立时间约有 20 年, 利用过渡态金属阳离子, 如 Fe^{3+} 、 Ga^{3+} 、 Zr^{4+} 等, 作为亲和试剂, 与阴离子结合^[23-25]. Ti^{4+} 离子是该类试剂中新兴的应用^[26]. 这些金属阳离子通过螯合作用, 固定在具有磁性的磁珠或硅颗粒上, 从而在去除非磷酸化肽段的过程中能够保留磷酸化的肽段. MOAC 方法建立约 10 年, 利用氧化金属可以和磷酸根基团中的氧结合的特性进行磷酸化肽段的富集. 氧化钛(TiO_x)是最常用的 MOAC 试剂, 此外 Fe_3O_4 也比较常见^[27-28].

IMAC 和 MOAC 方法都可以对磷酸化肽段或者蛋白质进行富集, 二者都容易受到酸性肽段影响, 比如多羧基集团的肽段会发生非特异性结合^[29]. IMAC 所得样品容易含有金属离子或者金属盐的污染, 需要进行脱盐处理. 并且 IMAC 方法对多磷酸化修饰的肽段具有偏好性, 容易丢失单磷酸化修饰的肽段. 和 IMAC 相比, MOAC 方法灵敏度更高、选择性更好. 由于金属氧化物具有很好的稳定性, 因此 IMAC 方法对 pH 值等环境因素的改变具有更好的耐受.

IMAC 和 MOAC 方法都是针对丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的磷酸化修饰位点(pSer、pThr、pTyr)进行富集的方法. Matheron 等^[30]2014 年比较了两种方法对 HeLa 细胞中的磷酸化富集, 发现只有 40%磷酸化肽段是重合的. 不过, 在肽段长度、位点和模序(motif)等方面, 二者并没有明显的不同. 最重要的是, 生物学的差异, 而不是方法上的差异, 对结果起到最主要的影响.

免疫共沉淀方法, 是专门用于富集酪氨酸磷酸化的主流方法, 结合了基于金属的富集方法和基于抗体的富集方法中的优势^[31-32], 该方法能够高特异性的对酪氨酸磷酸化位点进行富集. 目前, 针对酪氨酸的特异性抗体正在不断涌现^[33-34].

1.2 富集方法的发展

肽段的检测深度依赖于酶解效率、传统的胰酶(trypsin)酶解, 能够在赖氨酸和精氨酸的 C 末端进行剪切^[35]. 但通过对不同酶的比较, 发现两种不同酶的酶切后, 检测到的磷酸化位点只有 1/3 的重合^[36], 这说明不同酶酶切后检测到的位点不同. 利用多种酶共同作用, 可以提高酶切效率, 提升检测的覆盖深度^[37]. 比如利用 LysC 和胰蛋白酶(trypsin)共同酶解, 可以提高 40%的磷酸化检测位点^[38].

预分离也是提高鉴定深度的方法. 反向液相预分离(reversed phase liquid chromatograph, RPLC)是常用的分组分方法, 此外还有强阳离子交换(strong cation exchange, SCX)和强阴离子交换(strong anion exchange, SAX)方法^[21]. Ruprecht 等^[39]在比较不同富集方法时发现, 通过亲水强阴离子交换预分离, 48 h 的检测可以获得 15 000 条磷酸化肽段, 要比 4 h 检测 5 500 条磷酸化肽段的鉴定深度有所提高. 此外, 覆盖度的提升, 使得数据间的相关性明显提升. 强离子交换方法可以和 TiO_x 富集方法结合, 但是还没有和抗体富集方法结合的例子^[40].

Batth 等^[41]在 2014 年比较了 SCX 和 RPLC 分

组分方法, 发现 RPLC 方法能够鉴定到更多的磷酸化肽段, RPLC 方法鉴定到 17 566 条磷酸化肽段, SCX 方法鉴定到 6 215 条肽段. 并且 RPLC 方法实验流程更加简便, 不用额外替换溶液环境.

也有一些亲和方法, 用于富集磷酸化的蛋白质而非肽段. 因为蛋白质常以复合物形式行使功能, 因此该方法能够鉴定细胞中复合物的情况. 如 Hoehenwarter 等^[42]利用 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 富集促细胞分裂剂激活的蛋白激酶. 目前, 该领域还在持续发展过程.

2 基于串联质谱的磷酸化肽段检测

2.1 质谱仪的发展

磷酸化蛋白质组数据的可重复性和可信度依赖于质谱仪的扫描速度和灵敏度, 近年来几乎所有的磷酸化蛋白质组检测都是采用串联质谱(MS/MS), 其中包括 qTOF、LIT-Orbitrap、quadrupole-Orbitrap 和 FTICR 质谱等^[43-46]. 应用较多的 Orbitrap Fusion, 扫描频率达 22 Hz, 快速的扫描能够增加检测深度和检测通量^[47]. Erickson 等^[48]利用 Orbitrap Fusion 和多同位素标记策略, 在 10 种样品中鉴定到 11 000 个磷酸化位点. 扫描速度的提升, 使得样品检测机时大幅减少, 从一周缩短为两天. 另一种仪器类型 Q-Exactive HF, 能够通过分段 4 级杆精确选择母离子, 提升子离子的谱图质量, 对磷酸化修饰的鉴定有所帮助, 不过这需要牺牲一定的扫描速度. Olsen 研究组^[49]报道, 利用 RPLC 和 Q-Exactive HF 能够从 HeLa 细胞样品中鉴定到 7 600 种特异性磷酸化肽段(unique peptide).

2.2 质谱数据获取方法

蛋白质组通常采用的数据获取方式是数据依赖型采集方法(data-dependent acquisition, DDA), 该方法能够自动选择母离子并进行碎裂检测. 通常该方法选择丰度较高的母离子, 忽略了丰度较低的磷酸化肽段. 近年来逐渐发展的数据非依赖采集方案(data-independent acquisition, DIA), 将检测范围设置成不同的质荷比范围(比如 SWATH, sequential windowed acquisition of all theoretical fragment ions), 理论上能够检测所有的离子^[50]. 对 DDA 和 DIA 进行比较, 发现 DIA 方法能够提高检测的灵敏度 5~10 倍^[50]. 不过该方法造成数据量增加, 数据复杂度提高, 谱图解析更加困难. DDA、DIA 和靶向检测方法各有优势, 灵活使用能够更加高效地检测磷酸化肽段^[51-52], 如 2012 年 Narumi 等^[53]在

乳腺癌样本中利用 DDA 进行了全蛋白质检测, 同时利用靶向检测方法鉴定生物标志物.

2.3 碎裂方式的选择

利用质谱进行磷酸化修饰等翻译后修饰的检测, 原因之一是其具有位点分辨率. 但是在实际应用过程中, 因为对位点的评估不能满足可信度要求, 约有 20%~40%的磷酸化肽段数据不可用^[21]. 对磷酸化修饰的质控, 往往是以磷酸化肽段的子离子为核心, 因此母离子碎裂方式在磷酸化位点检测中至关重要.

常用的碰撞活化解离(collisional activation dissociation, CAD)碎裂模式虽然方法简便, 但是容易引起位点重排、N 末端附近修饰位点中性丢失增加等问题^[54-55]. 电子转移解离(electron transfer dissociation, ETD)是逐渐成熟起来的应用于磷酸化蛋白质组检测中的碎裂方法^[55-56]. 该方法可以有效保留肽段骨架信息和磷酸化修饰信息, 不过当母离子电荷低时, 碎裂效率会降低. 2012 年, Heck 实验室^[57-58]提出 EThcD 方法. 这种方法与高能碰撞解离(high energy collision dissociation, HCD)相比, 鉴定的磷酸化肽段数目会有所降低, 但序列覆盖度和位点鉴定比例高于 HCD 和 ETD.

负电模式检测可能是磷酸化蛋白质组的另一个维度. 因为磷酸化修饰上带负电, 使其更易去质子化, 形成阴离子^[59-60]. 因此在碎裂过程中, 对形成的阴离子检测, 或许更能帮助解析高通量的磷酸化蛋白质组问题.

3 磷酸化修饰的鉴定和定量

3.1 磷酸化修饰定量方法

磷酸化蛋白质组的定量, 与普通蛋白质组定量不同. 同一个蛋白质不同位点, 可能具有不同的磷酸化水平, 因此定量是需要直接检测磷酸化肽段、基于位点的定量. 对于肽段的定量方法也有很多种, 根据是否具有同位素标记, 可以分为有标定量和无标定量(表 1).

Table 1 Comparison of different quantitative strategies

表 1 肽段的定量策略

标记类型	定量类型	应用举例
无标	MS1 定量	
代谢标记	MS1 定量	SILAC
化学标记	MS1 定量	二甲基、mTRAQ
等压标记	MS2 定量	TMT、iTRAQ

有标定量是已经活跃了近 20 年的定量方法, 包括氨基酸细胞培养基稳定同位素标记 (stable isotope labeling with amino acids in cell culture, SILAC) 方法^[61]、用于相对和绝对定量的胺修饰标记 (amine-modifying tags for relative and absolute quantification, TRAQ) 方法^[62]以及二甲基标记方法^[63]等. 这些方法可以满足多个样品具有不同标记, 因此样品可以混合成单针进行检测, 节省机时, 降低实验误差. 以上都是一级定量所使用的标记方法, 与此同时, 也有很多成熟的二级定量的标记方法, 如串联质谱标签 (tandem mass tag, TMT)^[64]、相对和绝对定量同位素标记 (isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)^[65], 能够同时定量 6~11 个样品. 不过这种定量方式覆盖深度会受到影响. 有标定量的一个突出的限制是信号压缩效应, 分配到一起的母离子, 比值差异可能会被压缩到不显著.

近年来也不断涌现了很多新的标记方法. 比如 Xue 等^[66]在 2014 年先将肽段全部去掉磷酸化, 然后体外用 ¹⁸O-ATP 作为原料, 在特定激酶作用下肽段发生磷酸化修饰, 修饰位点具有 ¹⁸O 修饰. 该方法可以研究激酶直接的作用底物.

无标定量没有同位素标记, 是一种相对定量方法, 该方法以其费用低、灵活性强、易于实验设计等优点受到欢迎^[67]. 虽然该方法不能将样品混合, 消耗检测机时会更多, 但前期样品准备简单, 易于进行预分离, 仍成为使用最广泛的方法. 无标定量的挑战还是在数据获取后的分析中, Skyline^[68]和 MaxQuant^[69]等已经发展出比较成熟的磷酸化定量

方法. 此外 MaxQuant 提出 match between runs 的思路尝试解决磷酸化检测中常出现的空值问题, 虽然这一方法有可能引入更多的不确定性.

3.2 磷酸化位点的质控

在一次质谱鉴定中能够可靠的鉴定数千种被修饰的肽段, 但是对 PTM 位点的定位识别仍然较为武断, 对于某些修饰位点的鉴定可信度低. 因此在处理 PTM 质谱数据时, 有必要对修饰位点进行错误定位率 (false localization rate, FLR) 的控制^[70].

对于含有两个相同的氨基酸残基的离子碎片, 需要通过特定离子类型的鉴定才能明确的分辨出肽段的具体位点. 该规则在修饰位点的可靠性鉴定上看起来很简单, 但是对于实际谱图来说, 需要考虑的因素非常复杂, 如质谱中的噪音信号、磷酸化修饰中未修饰片段的中性丢失、与修饰后的氨基酸具有相同质荷比的氨基酸的区别等.

常用的质量可靠性算法包含两类^[71]: 第一类是基于概率来对鉴定质量进行打分, 通常使用统计学模型实现; 第二类是基于假阳性率的算法, 通常使用 Target-Decoy^[72]方法实现 (表 2). 对于 PTM 来说, 错误定位率没有较好的实现方法^[73], 通常是通过合成肽段来评估^[74], 对仅包含一个修饰位点的肽段才有较好的效果^[75].

目前绝大多数位点定位软件或者算法所采用的策略主要分为两种^[71]: 一种是试图评估某个给定峰匹配到特定位点的概率, 采用这种策略的包括 A-Score^[76]、PTM Score (MaxQuant / Andromeda)^[69]、the PLS (phosphorylation localization score) in Inspect^[77]、SLoMo^[78]、Phosphinator^[79] 与

Table 2 Quality control strategies of modification sites

表 2 修饰位点定位质量控制的主流工具对比

算法策略	打分软件	峰提取	是否采用高丰度的峰值	输出结果格式
基于峰值匹配概率	A-Score	每 100Th 提取 n 个峰	否	最佳打分位点
基于峰值匹配概率	PTM Score (MaxQuant / Andromeda)	每 100Th 提取 n 个峰	否	所有修饰位点概率打分
基于搜索引擎打分	Mascot Delta Score	每 100Th 提取 n 个峰	否	最佳打分位点
基于搜索引擎打分	the SLIP score in Protein Prospector	20 个密度最高的峰	是	给定阈值内的修饰位点
基于搜索引擎打分	the variable modification localization (VML) score in Spectrum Mill	25 个信噪比最高的峰	是	给定阈值内的修饰位点

PhosphoRS^[80]等；另一种策略是计算两个修饰位点间搜索引擎给出的打分差值，采用这种策略的包括 Mascot Delta Score^[74]、the SLIP score in Protein Prospector^[71]与 the VML (variable modification localization) score in Spectrum Mill [Agilent].

A-Score 与 PTM Score 主要是基于峰值匹配概率的原理。这种算法的核心之处在于先找出定位待评估的两个位点之间的离子，然后分别计算两个修饰位点的离子峰匹配到离子的个数，计算累计二项分布的 p 值和位点的打分值，最后计算两个修饰位点的打分差值从而判断该肽段的修饰位点。

另一种基于搜索引擎打分差值的策略如 Mascot Delta Score，其计算为最高的 Mascot ion scores 与次高的 Mascot ion scores 的差值。Bernhard Kuster 等^[74]的研究工作显示 MD-score 的敏感性与特异性与 A-score 类似。他们评估的位点来源于人工合成的 180 条位点已知的磷酸化肽段。此外，MD-score 在酪氨酸位点的定位控制中准确性优于 A-score。目前 Mascot2.4 版本以上的搜库结果可以直接给出位点质量打分，在 MD-score 计算中不需要另外增加 workflow，且计算原理简单实用，而 A-score 是基于 Sequest 搜库结果计算的。因此如果搜库软件使用 Mascot，可以直接选用 MD-score 打分。

值得注意的是，A-Score 和 MD-score 都只给出打分最高的位点，而忽略打分次高的位点，而 PTM Score (MaxQuant / Andromeda) 则对每一个位点都给出了概率打分。The SLIP score in Protein Prospector 与 the VML score 则给出了符合阈值的所有位点的打分。

4 展望与讨论

翻译后修饰调节对生理病理过程影响巨大，不论是正常生理过程，还是癌症中的异常信号转导^[81]、神经退行性疾病中的细胞毒性蛋白质聚集等，都与蛋白质的翻译后修饰相关^[4-5]。磷酸化是研究最广泛的蛋白质翻译后修饰。常见的磷酸化蛋白质组研究，首先对磷酸化肽段进行富集，然后进行串联质谱分析，最后通过搜索引擎对修饰位点进行鉴定和定量^[21]。基于质谱的蛋白质组学近年来不断发展，已经广泛应用于疾病解析、药物靶点筛选和临床检测等过程^[82]。应用质谱，可以对磷酸化蛋白质组进行高通量、高效率、深度覆盖的检测。

丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的磷酸化是研究最广

泛的磷酸化修饰，这些都是 O-磷酸化修饰。本文也是重点关注上述三种磷酸化修饰。此外，还有 N-磷酸化修饰(赖氨酸、精氨酸和组氨酸)^[83]和 S-磷酸化修饰(半胱氨酸)^[5]。Potel 等^[84]2018 年优化了组氨酸磷酸化修饰方法，利用 Fe³⁺-IMAC 柱富集肽段后检测，在大肠杆菌中鉴定到 240 个具有组氨酸修饰的蛋白质。酪氨酸和组氨酸的磷酸化鉴定数目较少，但是人们发现这些特殊的磷酸化修饰具有重要的生物学功能^[84]，因此对于酪氨酸和组氨酸的磷酸化修饰方法或在未来具有较大突破。

为了更多地鉴定到磷酸化肽段，人们常常对肽段进行预分离。通过不断的实践，人们逐渐认识到，耗费大量的检测时间对覆盖深度的贡献是有限的。随着技术的进步，单针的检测能够达到很深的覆盖度。在数小时的检测中，单针能够鉴定 15 000~20 000 个磷酸化位点。同时，单针检测具有更好的重复性，更短的数据分析时间。因此，磷酸化蛋白质组的检测向单针检测方向发展。

质谱检测技术的发展极大地推动了磷酸化蛋白质组研究的进步。人们通过提高质谱扫描速度，优化数据采集模式、母离子碎裂方式，不断提高磷酸化蛋白质组数据的覆盖度和样品检测效率。不论是蛋白质鉴定、翻译后修饰检测，还是蛋白质组数据集的构建，质谱检测技术都是必不可少的。基于质谱的磷酸化蛋白质组学目前面临的主要问题是数据之间的重复性问题。技术重复之间的磷酸化肽段重合约为 60%~75%。在追求高效、降低数据复杂度的单针检测时代，怎样获得高可重复度的数据是需要解决的主要问题。

翻译后修饰位点质量打分软件的发展与进步，使得磷酸化蛋白质组数据具有更高的一致性与可信度。基于搜索引擎打分的方法充分考虑了肽段质量的准确性且可以直接在搜库过程中获得，因此更加可靠与便捷。目前最常用的打分软件是 MD-score、PTM Score (MaxQuant / Andromeda) 与 A-score^[75]。在选择这些软件的过程中，要综合考虑质谱平台检测的类型，搜库算法和软件的便捷性，从而为后续的分析提供较为可靠的磷酸化位点。近年来人们提出一站式蛋白质组大数据分析平台构想，以磷酸化为代表的翻译后修饰数据的定性和定量，都是这些数据分析平台的重点工作之一^[85-86]。

磷酸化蛋白质组作为逐渐兴起的多组学研究中的重要一环，与蛋白质组、乙酰化、泛素化、甲基化等其他翻译后修饰组学共同整合，从而综合解析

生命活动. 在一些研究中, 蛋白质磷酸化被认为是动植物生命活动核心调控机制, 比如节律调控^[87]、泛素化的调控^[88]和植物的生长发育^[89]等. 相信基于质谱的磷酸化蛋白质组学, 在未来可以解析更多分子机制、致病机理, 发现更多临床应用.

参 考 文 献

- [1] Kosako H, Nagano K. Quantitative phosphoproteomics strategies for understanding protein kinase-mediated signal transduction pathways. *Expert Review of Proteomics*, 2011, **8**(1): 81–94
- [2] Zhu W G. Regulation of p53 acetylation. *Science China Life Science*, 2017, **60**(3): 321–323
- [3] Lu H, Zhang Y, Yang P. Advancements in mass spectrometry-based glycoproteomics and glycomics. *National Science Review*, 2016, **3**(3): 345–364
- [4] Olsen J V, Blagoev B, Gnäd F, *et al.* Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*, 2006, **127**(3): 635–648
- [5] Cohen P. The role of protein phosphorylation in human health and disease. *European Journal of Biochemistry*, 2001, **268** (19): 5001–5010
- [6] Johnson L N. The regulation of protein phosphorylation. *Biochemical Society Transactions*, 2009, **37**(4): 627–641
- [7] Moorhead G B, De Wever V, Templeton G, *et al.* Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *Biochemical Journal*, 2009, **417**(2): 401–409
- [8] Daub H, Olsen J V, Bairlein M, *et al.* Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle. *Molecular Cell*, 2008, **31**(3): 438–448
- [9] Huttlin E L, Jedrychowski M P, Elias J E, *et al.* A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell*, 2010, **143**(7): 1174–1189
- [10] Sacco F, Humphrey S J, Cox J, *et al.* Glucose-regulated and drug-perturbed phosphoproteome reveals molecular mechanisms controlling insulin secretion. *Nature Communications*, 2016, **7**:13250(DOI: 10.1038/comms13250)
- [11] Pierobon M, Wulfskuhle J, Liotta L, *et al.* Application of molecular technologies for phosphoproteomic analysis of clinical samples. *Oncogene*, 2015, **34**(7): 805–814
- [12] Maes E, Tirez K, Baggerman G, *et al.* The use of elemental mass spectrometry in phosphoproteomic applications. *Mass Spectrometry Review*, 2016, **35**(3): 350–360
- [13] Chen I H, Xue L, Hsu C C, *et al.* Phosphoproteins in extracellular vesicles as candidate markers for breast cancer. *Proc Natl Acad Sci*, 2017, **114**(12): 3175–3180
- [14] Liu J J, Sharma K, Zangrandi L, *et al.* *In vivo* brain GPCR signaling elucidated by phosphoproteomics. *Science*, 2018, **360** (6395), pii: eaao4927. doi: 10.1126/science.aao4927
- [15] Macek B, Mann M, Olsen J V. Global and site-specific quantitative phosphoproteomics: principles and applications. *Annu Review of Pharmacology and Toxicology*, 2009, **49**(1):199–221
- [16] Doll S, Burlingame A L. Mass spectrometry-based detection and assignment of protein posttranslational modifications. *ACS Chemical Biology*, 2015, **10**(1): 63–71
- [17] Nilsson C L. Advances in quantitative phosphoproteomics. *Analytical Chemistry*, 2012, **84**(2): 735–746
- [18] Mertins P, Tang L C, Krug K, *et al.* Reproducible workflow for multiplexed deep-scale proteome and phosphoproteome analysis of tumor tissues by liquid chromatography-mass spectrometry. *Nature Protocols*, 2018, **13**(7): 1632–1661
- [19] Kanshin E, Tyers M, Thibault P. Sample collection method bias effects in quantitative phosphoproteomics. *Journal of Proteome Research*, 2015, **14**(7): 2998–3004
- [20] Mertins P, Yang F, Liu T, *et al.* Ischemia in tumors induces early and sustained phosphorylation changes in stress kinase pathways but does not affect global protein levels. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2014:mcp.M113.036392
- [21] Riley N M, Coon J J. Phosphoproteomics in the age of rapid and deep proteome profiling. *Analytical Chemistry*, 2016, **88**(1): 74–94
- [22] Possemato A P, Paulo J A, Mulhern D, *et al.* Multiplexed phosphoproteomic profiling using titanium dioxide and immunoaffinity enrichments reveals complementary phosphorylation events. *Journal of Proteome Research*, 2017, **16**(4): 1506–1514
- [23] Tsai C F, Hsu C C, Hung J N, *et al.* Sequential phosphoproteomic enrichment through complementary metal-directed immobilized metal ion affinity chromatography. *Analytical Chemistry*, 2014, **86**(1): 685–693
- [24] Lai A C Y, Tsai C F, Hsu C C, *et al.* Complementary Fe³⁺- and Ti⁴⁺-immobilized metal ion affinity chromatography for purification of acidic and basic phosphopeptides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2012, **26**(18): 2186–2194
- [25] Abelin J G, Trantham P D, Penny S A, *et al.* Complementary IMAC enrichment methods for HLA-associated phosphopeptide identification by mass spectrometry. *Nature Protocols*, 2015, **10**(9): 1308–1318
- [26] Zhou H, Ye M, Dong J, *et al.* Robust phosphoproteome enrichment using monodisperse microsphere-based immobilized titanium (IV) ion affinity chromatography. *Nature Protocols*, 2013, **8**(3): 461–480
- [27] Kanshin E, Michnick S W, Thibault P. Displacement of N/Q-rich peptides on TiO₂ beads enhances the depth and coverage of yeast phosphoproteome analyses. *Journal of Proteome Research*, 2013, **12**(6): 2905–2913
- [28] Vilasi A, Fiume I, Pace P, *et al.* Enrichment specificity of micro and nano-sized titanium and zirconium dioxides particles in phosphopeptide mapping. *Journal of Mass Spectrometry*, 2013, **48**(11): 1188–1198
- [29] Berard A, Kroeker A, Mcqueen P, *et al.* Methods and approaches to disease mechanisms using systems kinomics. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2017, **3**(1): 34–43
- [30] Matheron L, Van Den Toorn H, Heck A J R, *et al.* Characterization of biases in phosphopeptide enrichment by Ti⁴⁺-immobilized metal affinity chromatography and TiO₂ using a massive synthetic library

- and human cell digests. *Analytical Chemistry*, 2014, **86** (16): 8312–8320
- [31] Kettenbach A N, Gerber S A. Rapid and reproducible single-stage phosphopeptide enrichment of complex peptide mixtures: application to general and phosphotyrosine-specific phosphoproteomics experiments. *Analytical Chemistry*, 2011, **83**(20): 7635–7644
- [32] Di Palma S, Zoumaro-Djajoon A, Peng M, *et al.* Finding the same needles in the haystack? A comparison of phosphotyrosine peptides enriched by immuno-affinity precipitation and metal-based affinity chromatography. *Journal of Proteomics*, 2013, **91**: 331–337 (DOI: 10.1016/prot.2013.07.024)
- [33] Van Der Mijl J C, Labots M, Piersma S R, *et al.* Evaluation of different phospho-tyrosine antibodies for label-free phosphoproteomics. *Journal of Proteomics*, 2015, **127**(B): 259–263
- [34] Du J, Bernasconi P, Clauser K R, *et al.* Bead-based profiling of tyrosine kinase phosphorylation identifies SRC as a potential target for glioblastoma therapy. *Nature Biotechnology*, 2008, **27** (1): 77–83
- [35] Dickhut C, Feldmann I, Lambert J, *et al.* Impact of digestion conditions on phosphoproteomics. *Journal of Proteome Research*, 2014, **13**(6): 2761–2770
- [36] Giansanti P, Aye T T, Van Den Toorn H, *et al.* An augmented multiple-protease-based human phosphopeptide atlas. *Cell Reports*, 2015, **11**(11): 1834–1843
- [37] Bian Y, Ye M, Song C, *et al.* Improve the coverage for the analysis of phosphoproteome of HeLa cells by a tandem digestion approach. *Journal of Proteome Research*, 2012, **11**(5): 2828–2837
- [38] Glatter T, Ludwig C, Ahm e E, *et al.* Large-scale quantitative assessment of different in-solution protein digestion protocols reveals superior cleavage efficiency of tandem Lys-C/trypsin proteolysis over trypsin digestion. *Journal of Proteome Research*, 2012, **11**(11): 5145–5156
- [39] Ruprecht B, Koch H, Medard G, *et al.* Comprehensive and reproducible phosphopeptide enrichment using iron immobilized metal ion affinity chromatography (Fe-IMAC) columns. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2015, **14**(1): 205–215
- [40] Lombardi B, Rendell N, Edwards M, *et al.* Evaluation of phosphopeptide enrichment strategies for quantitative TMT analysis of complex network dynamics in cancer-associated cell signalling. *EuPA Open Proteomics*, 2015, **6**(C): 10–15
- [41] Batth T S, Francavilla C, Olsen J V. Off-line high-pH reversed-phase fractionation for in-depth phosphoproteomics. *Journal of Proteome Research*, 2014, **13**(12): 6176–6186
- [42] Hoehenwarter W, Thomas M, Nukarinen E, *et al.* Identification of novel *in vivo* MAP kinase substrates in *Arabidopsis thaliana* through use of tandem metal oxide affinity chromatography. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013, **12**(2): 369–380
- [43] Zhang Y, Fonslow B R, Shan B, *et al.* Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chemical Reviews*, 2013, **113**(4): 2343–2394
- [44] Syka J E P, Marto J A, Bai D L, *et al.* Novel linear quadrupole ion trap/FT mass spectrometer: performance characterization and use in the comparative analysis of histone H3 post-translational modifications. *Journal of Proteome Research*, 2004, **3**(3): 621–626
- [45] Michalski A, Damoc E, Hauschild J-P, *et al.* Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole orbitrap mass spectrometer. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2011: mcp.M111.011015
- [46] Michalski A, Damoc E, Lange O, *et al.* Ultra high resolution linear ion trap orbitrap mass spectrometer (Orbitrap Elite) facilitates top down LC MS/MS and versatile peptide fragmentation modes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012, **11**(3): O111.013698
- [47] Senko M W, Remes P M, Canterbury J D, *et al.* Novel parallelized quadrupole/linear ion trap/orbitrap tribrid mass spectrometer improving proteome coverage and peptide identification rates. *Analytical Chemistry*, 2013, **85**(24): 11710–11714
- [48] Erickson B K, Jedrychowski M P, Mcalister G C, *et al.* Evaluating multiplexed quantitative phosphopeptide analysis on a hybrid quadrupole mass filter/linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, 2015, **87**(2): 1241–1249
- [49] Kelstrup C D, Jersie-Christensen R R, Batth T S, *et al.* Rapid and deep proteomes by faster sequencing on a benchtop quadrupole ultra-high-field orbitrap mass spectrometer. *Journal of Proteome Research*, 2014, **13**(12): 6187–6195
- [50] Law K P, Lim Y P. Recent advances in mass spectrometry: data independent analysis and hyper reaction monitoring. *Expert Review of Proteomics*, 2013, **10**(6): 551–566
- [51] Graumann J, Scheltema R A, Zhang Y, *et al.* A framework for intelligent data acquisition and real-time database searching for shotgun proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012, **11**(3): M111.013185
- [52] Bailey D J, Mcdevitt M T, Westphall M S, *et al.* Intelligent data acquisition blends targeted and discovery methods. *Journal of Proteome Research*, 2014, **13**(4): 2152–2161
- [53] Narumi R, Murakami T, Kuga T, *et al.* A strategy for large-scale phosphoproteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples. *Journal of Proteome Research*, 2012, **11**(11): 5311–5322
- [54] Cui L, Reid G E. Examining factors that influence erroneous phosphorylation site localization via competing fragmentation and rearrangement reactions during ion trap CID-MS/MS and MS3. *Proteomics*, 2013, **13**(6): 964–973
- [55] Syka J E, Coon J J, Schroeder M J, *et al.* Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, **101**(26): 9528–9533
- [56] Sarbu M, Ghiulai R M, Zamfir A D. Recent developments and applications of electron transfer dissociation mass spectrometry in proteomics. *Amino Acids*, 2014, **46**(7): 1625–1634
- [57] Frese C K, Altelaar A M, Van Den Toorn H, *et al.* Toward full peptide sequence coverage by dual fragmentation combining electron-transfer and higher-energy collision dissociation tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2012, **84**(22): 9668–9673
- [58] Frese C K, Zhou H, Taus T, *et al.* Unambiguous phosphosite

- localization using electron-transfer/higher-energy collision dissociation (ETHD). *Journal of Proteome Research*, 2013, **12**(3): 1520–1525
- [59] Gunawardena H P, Emory J F, Mcluckey S A. Phosphopeptide anion characterization via sequential charge inversion and electron-transfer dissociation. *Analytical Chemistry*, 2006, **78**(11): 3788–3793
- [60] Robinson M R, Moore K L, Brodbelt J S. Direct identification of tyrosine sulfation by using ultraviolet photodissociation mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2014, **25**(8): 1461–1471
- [61] Zanivan S, Meves A, Behrendt K, *et al.* *In vivo* SILAC-based proteomics reveals phosphoproteome changes during mouse skin carcinogenesis. *Cell Reports*, 2013, **3**(2): 552–566
- [62] Oppermann F S, Klammer M, Bobe C, *et al.* Comparison of SILAC and mTRAQ quantification for phosphoproteomics on a quadrupole orbitrap mass spectrometer. *Journal of Proteome Research*, 2013, **12**(9): 4089–4100
- [63] Wilson-Grady J T, Haas W, Gygi S P. Quantitative comparison of the fasted and re-fed mouse liver phosphoproteomes using lower pH reductive dimethylation. *Methods*, 2013, **61**(3): 277–286
- [64] Mcalister G C, Huttlin E L, Haas W, *et al.* Increasing the multiplexing capacity of TMTs using reporter ion isotopologues with isobaric masses. *Analytical Chemistry*, 2012, **84** (17): 7469–7478
- [65] Mertins P, Udeshi N D, Clauser K R, *et al.* iTRAQ labeling is superior to mTRAQ for quantitative global proteomics and phosphoproteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012, **11**(6): M111. 014423
- [66] Xue L, Wang P, Cao P, *et al.* Identification of ERK1 direct substrates using stable isotope labeled kinase assay-linked phosphoproteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2014, mcp. O114. 038588
- [67] Neilson K A, Ali N A, Muralidharan S, *et al.* Less label, more free: approaches in label - free quantitative mass spectrometry. *Proteomics*, 2011, **11**(4): 535–553
- [68] Schilling B, Rardin M J, Maclean B X, *et al.* Platform-independent and label-free quantitation of proteomic data using MS1 extracted ion chromatograms in skyline: application to protein acetylation and phosphorylation. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012, **11**(5): 202–214
- [69] Tyanova S, Temu T, Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature Protocols*, 2016, **11**(12): 2301
- [70] Eng J K, Searle B C, Clauser K R, *et al.* A face in the crowd: recognizing peptides through database search. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2011, **10**(11): R111.009522
- [71] Chalkley R J, Clauser K R. Modification site localization scoring: strategies and performance. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012, **11**(5): 3–14
- [72] Elias J E, Gygi S P. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nature Methods*, 2007, **4**(3): 207–214
- [73] Fermin D, Walmsley S J, Gingras A-C, *et al.* LuciPHOR: algorithm for phosphorylation site localization with false localization rate estimation using target-decoy approach. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013, mcp. M113. 028928
- [74] Savitski M M, Lemeer S, Boesche M, *et al.* Confident phosphorylation site localization using the Mascot Delta Score. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2011, **10**(2): M110. 003830
- [75] Baker P R, Trinidad J C, Chalkley R J. Modification site localization scoring integrated into a search engine. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2011, mcp. M111. 008078
- [76] Beausoleil S A, Villé n J, Gerber S A, *et al.* A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization. *Nature Biotechnology*, 2006, **24**(10): 1285–1292
- [77] Tanner S, Shu H, Frank A, *et al.* InsPecT: identification of posttranslationally modified peptides from tandem mass spectra. *Analytical Chemistry*, 2005, **77**(14): 4626–4639
- [78] Bailey C M, Sweet S M, Cunningham D L, *et al.* SLoMo: automated site localization of modifications from ETD/ECD mass spectra. *Journal of Proteome Research*, 2009, **8**(4): 1965–1971
- [79] Phanstiel D H, Brumbaugh J, Wenger C D, *et al.* Proteomic and phosphoproteomic comparison of human ES and iPS cells. *Nature Methods*, 2011, **8**(10): 821–827
- [80] Taus T, Kocher T, Pichler P, *et al.* Universal and confident phosphorylation site localization using phosphoRS. *Journal of Proteome Research*, 2011, **10**(12): 5354–5362
- [81] Shi Q, Chen Y G. Interplay between TGF-beta signaling and receptor tyrosine kinases in tumor development. *Science China Life Science*, 2017, **60**(10): 1133–1141
- [82] Li X, Wang W, Chen J. Recent progress in mass spectrometry proteomics for biomedical research. *Science China Life Science*, 2017, **60**(10): 1093–1113
- [83] Strahl B, Allis C. The language of covalent histone. *Nature*, 2000, **403**(6765): 41–45
- [84] Potel C M, Lin M H, Heck A J R, *et al.* Widespread bacterial protein histidine phosphorylation revealed by mass spectrometry-based proteomics. *Nature Methods*, 2018, **15** (3): 187–190
- [85] Zhu Y, Guo T. Towards a one-stop solution for large-scale proteomics data analysis. *Science China Life Science*, 2018, **61**(3): 351–354
- [86] Feng J, Ding C, Qiu N, *et al.* Firmiana: towards a one-stop proteomic cloud platform for data processing and analysis. *Nature Biotechnology*, 2017, **35**(5): 409–412
- [87] Robles M S, Humphrey S J, Mann M. Phosphorylation is a central mechanism for circadian control of metabolism and physiology. *Cell Metabolism*, 2017, **25**(1): 118–127
- [88] Hunter T. The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Molecular Cell*, 2007, **28**(5): 730–738
- [89] Zhou J M, Yang W C. Receptor-like kinases take center stage in plant biology. *Science China Life Science*, 2016, **59**(9): 863–866

Phosphoproteomics Based on Mass Spectrometry (MS): Enrichment, Detection, Assignment and Quantification*

SHI Wen-Hao^{1,2}, TONG Meng-Sha^{1,2}, LI Kai¹, WANG Yu-Shen^{1,2}, DING Chen^{1,3}**

¹State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center,

National Center for Protein Sciences (The PHOENIX Center, Beijing), Beijing 102206, China;

²School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China;

³School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Protein phosphorylation is one of post-translational modifications (PTM), which plays a role in regulation of development, signal transduction, and processes of diseases. Because of high sensitivity, considerable throughput, and residue resolution, mass spectrometry (MS) has been the most popular tool for phosphorylation modification analysis. Common MS-centric phosphoproteomics workflow includes phosphorylation modified peptides sampling, LC-MS/MS detection, phosphorylation sites assignment and quantification. We summarized and discussed these workflow parts in this review.

Key words phosphoproteomics, methodology, LC-MS/MS, confident phosphosite assignment

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0292

* This work was supported by grants from National Key R&D Program of China (2017YFA0505102) and The National Natural Science Foundation of China (31770886, 31770892, 31700682).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-31240741, E-mail: chend@fudan.edu.cn

Received: November 11, 2018 Accepted: December 11, 2018