

质谱技术解析磷酸化蛋白质组*

姜颖^{1,2)} 徐朗莱²⁾ 贺福初¹⁾**

(¹⁾军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850; ²⁾南京农业大学生命科学学院, 南京 210095)

摘要 蛋白质磷酸化是生物体内存在的一种普遍的调节方式, 在细胞信号传递中占有极重要的地位. 质谱已逐渐被人们认为是挑战这一领域的有利工具. 综述了目前利用质谱技术分析磷酸化蛋白质的方法, 包括利用固定化的金属亲和层析柱、抗体和化学标签技术富集目的分子, 肽片段质量图和前体离子扫描 (precursor ion scans) 等技术检测磷酸化肽段, 串联质谱对磷酸化肽段测序鉴定磷酸化位点, 以及引入质量标签对蛋白质的磷酸化水平进行定量等. 虽然现在已经有很多可行的方法用于分析磷酸化蛋白质, 但要达到从少量生物样品中解析其全部磷酸化蛋白质仍需要有很多技术上的突破.

关键词 质谱, 串联质谱, 磷酸化蛋白质组

学科分类号 Q513

许多基因组测序计划的成功及在转录水平上检测基因表达差异技术的不断发展, 使蛋白质组技术研究的主要方向——发展先进的方法鉴定一个基因组所表达的全部蛋白质——也发生了改变. 蛋白质组技术研究的最初目标集中于高效、快速地鉴定大量蛋白质, 随着样品制备和分析手段的不断提高, 现在我们已能够有效地鉴定大量蛋白质并确定蛋白质的相对丰度. 但仅凭蛋白质的丰度不能正确反映其功能, 因为许多蛋白质的活性是通过翻译后的修饰作用进行调节的. 所以目前蛋白质组技术研究的主要目标之一是建立一套能快速、有效、高通量地分析鉴定发生翻译后修饰的蛋白质的方法技术. 众多蛋白质翻译后修饰的方式中蛋白质磷酸化是最常见、最重要的一种蛋白质共价修饰方式. 蛋白质磷酸化和去磷酸化几乎调节着生命活动的所有过程, 包括细胞的增殖、发育和分化, 神经活动, 肌肉收缩, 新陈代谢, 肿瘤发生等. 尤其在细胞应答外界刺激时, 蛋白质磷酸化是目前所知道的最主要的信号传递方式. 生物体内, 能被磷酸化修饰的蛋白质组成磷酸化蛋白质组 (phosphoproteome). 据统计, 哺乳动物细胞内的蛋白质有三分之一以上可以被磷酸化, 真核生物细胞蛋白质中主要的磷酸化氨基酸为酪氨酸、丝氨酸和苏氨酸^[1]. 而通常情况下磷酸化作用调节蛋白质活性时, 蛋白质丰度并不发生变化, 因此蛋白质磷酸化的定量研究在进一步探讨磷酸化蛋白质的功能时尤为重要.

传统的分析蛋白质磷酸化的方法是用放射性同位素³²P 标记到磷酸化的细胞蛋白质上, 带有放射信号的蛋白质可以通过蛋白质的分离, 如二维凝胶

电泳 (2-DE) 和高压液相色谱 (HPLC) 被检测到. 检测到的蛋白质可以通过全部水解确定磷酸化氨基酸的含量. 若需确定磷酸化位点, 还需要通过蛋白水解酶消化放射性标记的蛋白质、分离磷酸化的肽段, 如通过二维肽图 (two-dimensional peptide mapping), 再通过 Edman 降解对肽测序. 这些技术相当复杂, 不仅需要大量的磷酸化蛋白质, 而且用到了大量的放射性同位素, 因而并未成为一个普遍应用的, 能对整个蛋白质组范围内的磷酸化蛋白质进行高通量鉴定的方法. 近年来, 一些新的方法 (如用亲和标签对磷酸化蛋白质进行富集、稳定同位素标记进行定量研究等) 不断涌现, 加上质谱 (mass spectrometry, MS) 技术不断发展, 已经逐渐取代了传统的用于磷酸化蛋白质分析的方法. 本文综述了目前不同的质谱技术用于分析磷酸化蛋白质的方法.

1 磷酸化成份的富集

蛋白质组中只有一小部分蛋白质发生磷酸化. 磷酸化肽在蛋白质水解产物中又常表现为低丰度, 质谱对磷酸化肽的响应常会被高丰度的非磷酸化肽所干扰. 所以当所得到的蛋白质含量极为有限时, 用质谱技术分析磷酸化肽还是一个技术上的挑战. 只有当一些非磷酸化肽的含量降低 (或磷酸化的肽

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (001CB510204, G1998051213) 和国家自然科学基金资助项目 (3990600).

** 通讯联系人.

Tel: 010-66931246, E-mail: hefc@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2002-11-19, 接受日期: 2003-02-28

被富集)后,分析磷酸化的肽才会变得容易些.一些相应的用于质谱分析前磷酸化肽或磷酸化蛋白质的富集方法和技术已发展,这些富集技术常会与不同的分析方法共同用于蛋白质磷酸化鉴定.

1.1 固定化的金属亲和层析

最广泛地用来从混合物中选择性富集磷酸化肽的方法是固定化的金属亲和层析(immobilized metal affinity chromatography, IMAC).在此技术中,金属离子(通常是 Fe^{3+} 或 Ga^{3+} ,也有人用 Cu^{2+})被螯合到固相支持物中.带有负电荷的磷酸基团会与带正电荷的金属离子结合而被富集,用高pH洗脱液或磷酸盐缓冲液可将结合到柱上的磷酸化肽洗脱下来.洗脱下来的溶液经脱盐处理后可直接用于MS分析.IMAC通常可富集到磷酸化的酪氨酸、丝氨酸和苏氨酸残基.但这种方法的局限性在于:可能会丢失掉一些低丰度的没有结合到IMAC柱上的磷酸化肽段;具有多磷酸化位点的肽由于其较强的亲和力很难被洗脱下来;某些酸性基团(如天冬氨酸和谷氨酸)、电子供体(如组氨酸)也会结合到柱上,造成非磷酸化肽的污染.所以用IMAC方法富集磷酸化肽的效果如何,绝大部分依赖于所选择的金属离子、填充柱的材料、及洗脱的程序.而且目前还没有实验证明IMAC能用来富集磷酸化蛋白质,所以它只适用于磷酸化肽的富集与纯化.IMAC已成功以离线或在线的形式与质谱技术相联合检测磷酸化肽.一个成功的例子是将拟南芥的完整类囊体膜用胰蛋白酶消化后,用 Fe^{3+} 和 Ga^{3+} 的IMAC富集磷酸化肽,作者在5个不同的磷酸化蛋白质上共发现了8个不同的磷酸化位点^[2].最近,Ficarro等^[3]在用IMAC富集前将肽的酸性残基进行酯化处理,使其特异性大大提高.他们用这种方法从全酵母蛋白质提取物中共测定了216个肽序列,确定了383个磷酸化位点.随着技术水平的不断提高,该技术将最有希望用于高通量分析蛋白质的磷酸化作用.

1.2 抗体

用抗体对磷酸化蛋白质或磷酸化肽进行富集和检测也是分析磷酸化蛋白质的一项常用手段.检测酪氨酸磷酸化蛋白质的单克隆抗体是已知的较好的检测磷酸化蛋白质的抗体,它具有较强的亲和力,可以有效地免疫沉淀酪氨酸磷酸化的蛋白质,所以以前用免疫沉淀方法进行磷酸化蛋白质或肽的富集时只限于酪氨酸磷酸化的蛋白质或肽.用两种检测酪氨酸磷酸化蛋白质的单克隆抗体混合物,免疫沉

淀表皮生长因子(EGF)刺激后的HeLa细胞总蛋白质和未处理的HeLa细胞总蛋白质,一维电泳比较差异带,通过MS分析共鉴定出7个已知的EGF激酶底物和一个新的EGF激酶底物^[4].最近才有人尝试用抗体对丝氨酸或苏氨酸磷酸化的蛋白质进行富集.Gronborg等^[5]用6种不同的检测丝氨酸和苏氨酸磷酸化蛋白质的抗体对细胞总蛋白质进行免疫沉淀.结果只有3种抗体可对丝氨酸和苏氨酸发生磷酸化的蛋白质进行免疫沉淀.进一步选择其中两种抗体进行大规模免疫沉淀,最后共鉴定出7个丝氨酸和苏氨酸发生磷酸化的蛋白质,其中5个是已知的丝氨酸和苏氨酸磷酸化的蛋白质,1个是已知蛋白质,但以前并不知道其发生磷酸化,另外一个新蛋白质被命名为Frigg,并被证明为蛋白激酶A的底物.用免疫沉淀对磷酸化的蛋白质先进行富集,大大降低了非磷酸化蛋白质的干扰,提高了检测的正确性,但如果要达到可鉴定水平,它需要大量的抗体和样品,而且鉴定出的蛋白质多为高丰度蛋白质.

虽然用于免疫沉淀的抗体必须与其底物有较高的亲和力,而低亲和力的抗体用于免疫印迹(Western blot)分析中,也可取得很好的效果.因此检测丝氨酸和苏氨酸磷酸化蛋白质的抗体可用于Western blot分析.Soskic等^[6]曾成功地将检测磷酸化丝氨酸和磷酸化酪氨酸蛋白质的单克隆抗体用于蛋白质印迹方法中,检测小鼠纤维原细胞经血小板衍生生长因子(PDGF)刺激后蛋白质磷酸化水平的变化情况.他们共鉴定了300个丝氨酸磷酸化蛋白质和260个酪氨酸磷酸化蛋白质,其中至少有100个蛋白质在磷酸化水平上发生了变化.但用这一方法检测磷酸化蛋白质有其局限性:同一蛋白质可能会因为其不同的磷酸化状态而分布于二维电泳图的不同位置,从而降低了蛋白质的浓度;对感兴趣的蛋白质必须进行胶内酶切用于鉴定;用非序列特异性的抗体检测丝氨酸磷酸化和苏氨酸磷酸化的蛋白质可能会产生假阳性结果;此外,未经抗体富集的磷酸化蛋白质可能与非相关的蛋白质发生共迁移而导致错误的鉴定结论.尽管这一方法有其自身的局限性,但它可用来研究生物体内的任何磷酸化途径.

1.3 化学修饰

最近,有两篇报道分别用两种方法对磷酸基团进行化学修饰,以从混合物中分离磷酸肽或磷酸化蛋白质.Oda等^[7]将肽或蛋白质的混合物与二巯基

乙烷 (ethanedithiol, EDT) 一起置于强碱环境下, 使磷酸化丝氨酸和磷酸化苏氨酸残基通过 β -消除反应丢失磷酸基团. 产生的双键会被 EDT 攻击, 而使原来的磷酸基团被巯基标签取代. 生物素通过其

巯基反应基团连接到巯基标签上. 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的肽或蛋白质富集的目的 (图 1a 和 1b). 这一方法的主要缺点

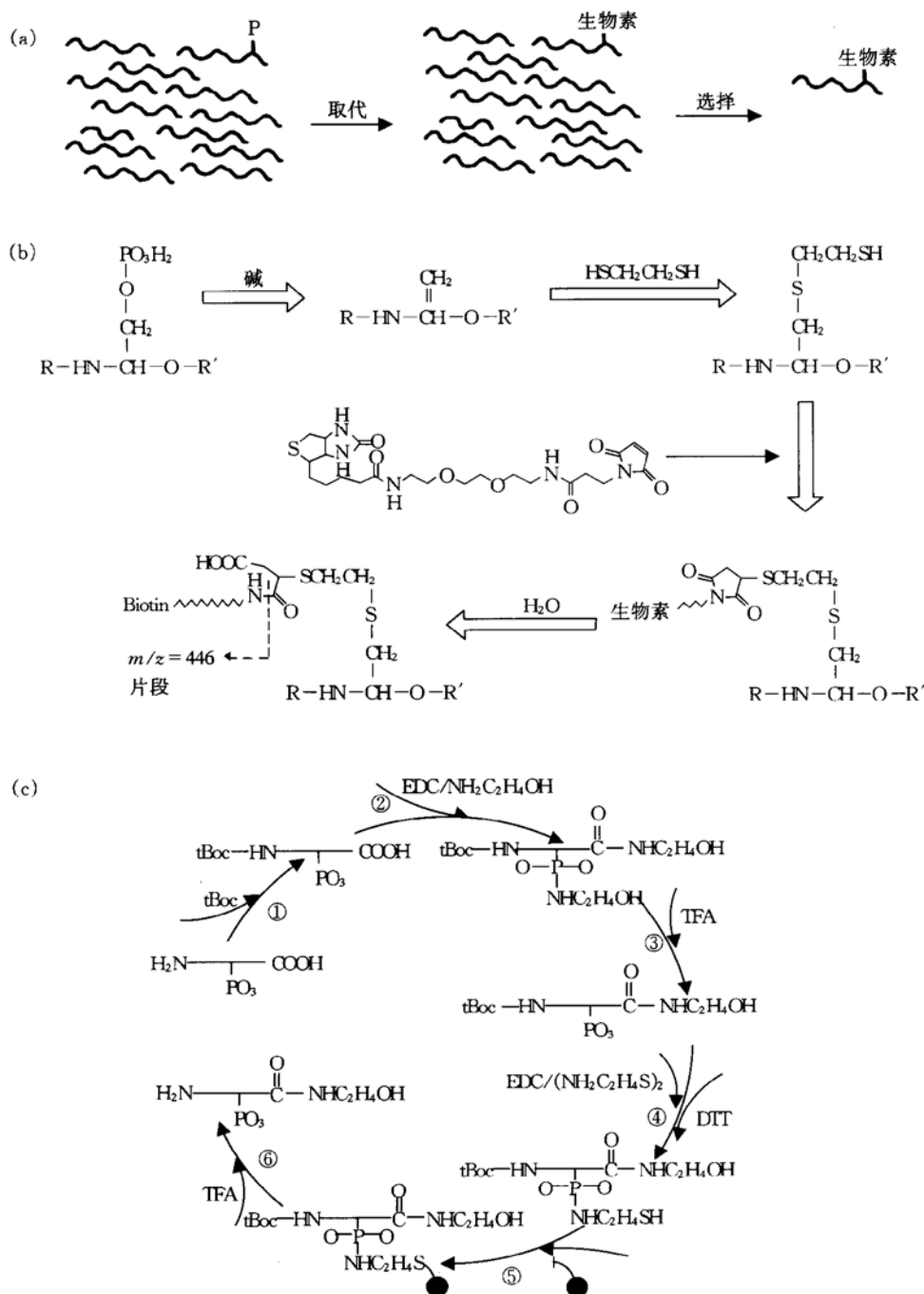


Fig 1 Enrichment strategies using chemical modification^[7,8]

图 1 化学修饰法进行磷酸化成分的富集^[7,8]

(a) 和 (b) 通过化学反应引入生物素亲和和标签用以从复杂混合物中富集磷酸肽^[7]; (c) 选择性地分离磷酸肽时参与的化学反应程序图^[8].

在于它不能富集酪氨酸磷酸化的蛋白质和肽。但这种方法只要通过一个纯化柱就可以完成,与下一个方法相比,操作简单,而且也减少了多步纯化过程中的样品损失。Zhou 等^[8]则应用了另外一种修饰手段,它不仅可以用来研究磷酸化丝氨酸肽段和磷酸化苏氨酸肽段还可以研究磷酸化酪氨酸肽段。这一方法最显著的特点是通过碳化二亚氨的催化作用将胍基加到磷酸基团上,再通过巯基乙胺与碘乙酰胺树脂柱的共价结合使磷酸化肽得以纯化。但肽的 N 端必须首先用 tBoc (tert-butylloxycarbonyl) 保护; C 端则进行酰胺化保护,以避免杂反应产生。磷酸肽的洗脱是通过三氟乙酸切割氨基磷酸键完成的(图 1c)。这种方法在质谱分析前,需要许多步化学反应和柱纯化过程,所以可能会有大量的样品损失,而且这种方法只适用于磷酸肽的富集,目前还没有应用于磷酸化蛋白质的富集。

现在来预测这两种方法哪一种更有效,还为时过早。单纯从实验结果来看,Zhou 等的方法更为有效,因为他们报道了酵母提取物中 12 个磷酸化的蛋白质,而 Oda 等只作出了一个。 β -消除反应自身的局限性在于:磷酸化苏氨酸的反应性较弱而对磷酸化酪氨酸则根本不反应,O-糖基化残基的 β -消除则会产生假阳性结果。而 Zhou 等的方法虽然能纯化酪氨酸磷酸化的肽,但用 LC/MS 鉴定时却没能从细胞提取物中检测到酪氨酸磷酸化的蛋白质。而且这两种方法都需要大量的样品,所鉴定出的蛋白质却都是酵母中高表达的蛋白质。因此,两种方法都有待于进一步优化,以鉴定低丰度蛋白质^[9]。

2 磷酸化肽的检测与磷酸化位点的确定

样品制备完成后,需要对磷酸化肽进行检测,并进一步确定蛋白质的磷酸化位点。现在已经有许多 MS 技术可以完成这项任务。

2.1 MALDI-TOF MS 检测磷酸化肽

基质辅助的激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)可以通过肽指纹图谱(PMF)成功地鉴定蛋白质。但由 MALDI-TOF MS 分析蛋白质的磷酸化状态并不象鉴定蛋白质那么容易:a. 由于非磷酸化肽的丰度远远高于磷酸化肽的丰度,加上阳离子模式下,磷酸化肽的弱解吸作用,会使磷酸化肽的信号被非磷酸化肽的信号所掩盖;b. 样品中具有相同质量数的肽可能会干扰分析;c. PMF 并不产生直接的序列信息,给磷酸化位点的确定带来麻烦;d. 如果用这项技术分析蛋白质的磷酸化必

须进行蛋白质或肽的预分离,如一维或二维凝胶电泳分离或 HPLC 分离。

为了解决 MALDI-TOF MS 不能确定蛋白质磷酸化位点的问题,人们将 MALDI-TOF MS 与磷酸酯酶处理相结合。其原理是磷酸酯酶处理后,磷酸化的肽会丢失磷酸基团而产生特定质量数的变化, MALDI-TOF MS 通过检测这种质量数的变化而确定磷酸化位点。后来有研究人员对此方法进行评价,认为用这种方法准确鉴定磷酸化位点,在凝胶的带上或点上应至少有 1 pmol 蛋白质存在^[10],它是用 MALDI-TOF MS 分析蛋白质磷酸化位点时得到高肽片段覆盖率所必需的。阳离子模式下,含有磷酸化丝氨酸或磷酸化苏氨酸的肽片段会丢失一个中性的磷酸(H_3PO_4),产生 98 u 质量数的变化,而酪氨酸通常产生 80 u 质量数的变化(丢失 HPO_3)。因此我们可以用 MALDI-TOF MS 确定磷酸化到底发生在酪氨酸还是丝氨酸或苏氨酸残基上。最近,也有人尝试用 MALDI-TOF MS 的阴离子模式从一些简单的混合物中鉴定磷酸肽。在他们初步的实验中发现阴离子模式下磷酸肽产生的信号会比阳离子模式下强^[11]。

2.2 串联质谱(MS/MS)检测磷酸化肽

2.2.1 串联质谱进行前体离子扫描

这一方法是通过检测磷酸基团产生的特定片段来报告磷酸肽的存在。蛋白质水解产物经碰撞诱导解离(collission-induced dissociation, CID)后会产生许多肽片段。磷酸化肽经 CID 后则会产生磷酸基团的特异性片段,这些特异性的片段在用串联质谱进行前体离子扫描时可作为磷酸肽的“报告离子”。阴离子模式下的三级四极杆串联质谱常用来完成这项任务。经典实验中,蛋白质水解产物脱盐后,在碱性条件下直接注入三级四极杆串联质谱中。第一个四极杆(Q_1)用来进行全谱扫描, CID 在第二个四极杆(Q_2)中进行,第三个四极杆(Q_3)只能选择性地通过质核比为 79⁻(如 PO_3^{--})的离子。因此在 Q_1 扫描中能产生 79⁻的肽片段被确定为磷酸肽。之后相应的磷酸肽的测序则需要改变离子源的极性而且样品需要重新复水,这就意味着这一系统不适用于液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)。尽管它有其自身的缺陷,但因为其高灵敏度和高特异性,而且对磷酸化丝、苏、酪氨酸都适用,所以该方法仍是分析磷酸化作用的有利工具。

前体离子扫描方法也可以在阳离子模式下操作,近来已经被发展用来特异地检测酪氨酸磷酸化

的肽^[12]。这种扫描模式较灵敏,从凝胶上分离出的亚皮摩尔的蛋白质都可以用这种方法成功地鉴定出酪氨酸磷酸化位点。遗憾的是这种方法无法鉴定磷酸化的丝氨酸和苏氨酸,而且也不适用于 LC-MS/MS。

2.2.2 串联质谱进行中性丢失扫描

这种方法是用 MS/MS 检测经 CID 后发生中性丢失 H_3PO_4 (98 u) 的肽段。含有磷酸化丝氨酸或苏氨酸残基的肽经过 CID 后,通常会经过一个气相 β -消减反应,导致中性丢失 H_3PO_4 (98 u) 或 HPO_3 (80 u)。由于 MS 测量的是质荷比,所以带有 2 个和 3 个电荷的离子会分别丢失 49Th 和 32.66Th (Thompson)。而磷酸化的酪氨酸通常不会发生中性丢失。最理想的设备配置是,用三级四极杆质谱进行前体离子扫描检测产生中性丢失的磷酸肽。这一方法的缺点在于有时会产生假阳性信号而且中性丢失扫描目前还没有用来检测未知样品。

2.2.3 LC-MS/MS

用液相色谱分离水解后的肽是一种降低样品复杂性的很好方法。用这种方法,肽首先上样于一个填有 C_{18} 材料的微孔柱 (nanocolumn, 通常内径为 75 μm), 很低的速率进行洗脱 (100~200 nL/min), 洗脱后直接上样于串联质谱,这种方法可以分离并鉴定成百上千个肽。将 LC-MS/MS 用于分析磷酸肽很有好处,因为用 LC 分离肽降低了离子抑制效应,现已有人用这种方法成功地分析了磷酸化位点^[13]。

2.3 傅立叶变换质谱进行电子捕获解离

电子捕获解离 (electron capture dissociation, ECD) 与傅立叶变换离子回旋加速共振 (Fourier transform ion cyclotron resonance, FTICR) 质谱相连是蛋白质、肽测序和研究蛋白质翻译后修饰的一个有力方法。近来,它已被成功地用于鉴定肽片段上发生磷酸化的残基^[14]。ECD 与 CID 相比,对肽的解离能力更强,覆盖的序列范围更广。ECD 的优点之一就是鉴定磷酸化残基的能力比较强,可以直接确定磷酸化发生的位点。但由于 FTMS 的高分辨率 (比其他 MS 高 10 倍),一些大片段肽或蛋白质的分析结果与常用的 MS 结果并不吻合^[15]。有人对此现象进行了研究,认为这种差异在于 FTICR 不象其他的 MS 只对水解后的肽进行分析,而是直接对整个蛋白质进行研究。这就意味着,用 FTICR 研究磷酸化蛋白质组将会提供一张更加复杂的蛋白质磷酸化状况的图谱。这项技术最大的缺点在于,必须较纯的样品才能用于 ECD 分析,而

且仪器的价格较为昂贵,对操作人员的要求也较高。

3 蛋白质磷酸化的定量研究

蛋白质磷酸化定量研究的重要性在于:一个磷酸化蛋白质在不同的信号刺激下可能参与不同的信号传导途径,磷酸化的状况也不尽相同。当对细胞进行不同处理时,细胞蛋白质磷酸化水平的差异可能对它功能极为重要。传统的用于对磷酸化水平进行定量的方法有磷酸氨基酸分析、Edman 降解,近年来 MS 相关的技术也逐渐发展起来。

3.1 稳定的同位素标记

在许多生理研究中需要对不同处理的细胞蛋白质的磷酸化水平进行相对定量,这种信息可通过同位素标记来获得。用稳定的同位素如 ^{15}N 标记蛋白质,可通过比较标记肽和非标记肽的混合物中相应的原子强度来测量蛋白质的相对含量,这一方法同样也适用于磷酸化肽的定量。不同处理的细胞蛋白质混合后由蛋白水解酶进行消化、分离磷酸化肽、再经质谱分析,通过比较 ^{14}N 和 ^{15}N 的峰值可确定相应的磷酸化肽的含量,因此它可用于测定磷酸化水平^[16]。但这个方法只提供了磷酸肽的定量,还需要通过 MS/MS 对肽进行测序才能确定确切的发生磷酸化的残基。当然只有稳定同位素能参与代谢进入蛋白质时 (如细胞培养),才能用这种方法。这一方法的另一个限制在于它本身对磷酸化肽并没有富集作用,因此通常这种定量方法会与其它富集方法同时使用,以达到高通量检测。它的主要优点就是操作很简单。

3.2 磷酸化蛋白质同位素标记亲和标签

近年来,用同位素标记的亲和标签 (isotope coded affinity tags, ICAT) 技术已被用来对蛋白质表达水平进行定量,并进一步扩展到对磷酸化水平进行定量。首先将生物素亲和标签分别用两种质量数不同的同位素 (如 1H , 2H) 标记,不同处理的两个样品中的磷酸化蛋白质通过 β -消除反应分别连接到不同同位素标记的生物素亲和标签上,标记后,将样品混合,上样于固定有亲和素的层析柱,通过亲和素与生物素的高亲和力作用对磷酸化蛋白质进行富集。富集到的磷酸化蛋白质,水解后得到的肽片段可直接上样于 MS,来自不同样品中的相同磷酸化的肽会因连接有不同的质量标签而产生一对峰谱,其相对强度可对磷酸化肽进行定量。这种方法叫做磷酸化蛋白质同位素标记的亲和标签

(PhIAT) 技术, 是一种对含有磷酸丝氨酸和磷酸苏氨酸残基的肽进行定量的方法^[17]. 这种方法的缺陷在于化学反应的效率一般较低而且磷酸化也只发生在全蛋白质中的一小部分, 在对全蛋白质的磷酸化定量分析中存在一定难度. 但这种方法对特定蛋白质的磷酸化定量或样品复杂性较低而且样品量足够时的磷酸化蛋白质定量仍具有很大潜力.

4 结 论

现在已经有很多 MS 方法用来检测和鉴定磷酸化蛋白质和磷酸化肽. 要全面了解从有限生物样品中提取的蛋白质磷酸化状况, 仍是一项艰巨的任务. 目前还没有一种单一的分析方法能取代用于鉴定蛋白质磷酸化的其他方法. 决定哪种分析方法更为有效的重要参数包括: 所需样品量; 是否能检测到丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸的磷酸化; 是否能将蛋白质进行纯化或富集; 是否能进行全谱的分析. 尽管 MS 已被认为是研究蛋白质磷酸化的最有利的工具, 但也必须考虑到其本身的局限性. 所以要全面分析复杂样品中的磷酸化蛋白质组, 一些传统的用于研究蛋白质磷酸化的方法如基因突变或³²P 标记的方法也需要与 MS 同时使用. 除了对单个磷酸化蛋白质进行研究外, 发展大规模、高通量的技术方法以研究某一组织或细胞中磷酸化蛋白质组仍十分重要. 这样的高通量技术方法建立后将为我们深入了解细胞内的生理活动提供一个新的窗口. 不可否认的是, 由于样品制备技术和分析仪器水平的不断提高, 今天我们准确鉴定蛋白质磷酸化位点的能力大大提高. 在这个快速发展的领域中, 发展更好的富集手段和磷酸化水平的定量方法将成为下一步工作中的主要挑战. 随着技术水平的不断提高, 大规模、高通量地解析某一生物样品的磷酸化蛋白质组将为期不远.

参 考 文 献

- Huang C, Ma W Y, Young M R, *et al.* Shortage of mitogen-activated protein kinase is responsible for resistance to AP-1 transactivation and transformation in mouse JB6 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (1): 156~161
- Vener A V, Harms A, Sussman M R, *et al.* Mass spectrometric resolution of reversible protein phosphorylation in photosynthetic membranes of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 2001, **276** (10): 6959~6966
- Ficarro S B, McClelland M L, Stukenberg P T, *et al.* Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol*, 2002, **20** (3): 301~305
- 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 USA*, 2000, **97** (1): 179~184
- Gronborg M, Kristiansen T Z, Stensballe A, *et al.* A mass spectrometry-based proteomic approach for identification of Serine/threonine phosphorylated proteins by enrichment with phospho-specific antibodies: identification of a novel protein, frigg, as a protein kinase A substrate. *Mol Cell Proteomics*, 2002, **1** (7): 517~527
- Soskic V, Gorlach M, Poznanovic S, *et al.* Functional proteomics analysis of signal transduction pathways of the platelet-derived growth factor beta receptor. *Biochemistry*, 1999, **38** (6): 1757~1764
- Oda Y, Nagasu T, Chait B T. Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome. *Nat Biotechnol*, 2001, **19** (4): 379~382
- Zhou H, Watts J D, Aebersold R. A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation. *Nat Biotechnol*, 2001, **9** (4): 375~378
- Ahn N G, Resing K A. Toward the phosphoproteome. *Nat Biotechnol*, 2001, **19** (4): 317~318
- Larsen M R, Sorensen G L, Fey S J, *et al.* Phosphoproteomics: evaluation of the use of enzymatic dephosphorylation and differential mass spectrometric peptide mass mapping for site specific phosphorylation assignment in proteins separated by gel electrophoresis. *Proteomics*, 2001, **1** (2): 223~238
- 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 nanoelectrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2001, **15** (18): 1693~1700
- Steen H, Kuster B, Fernandez M, *et al.* Detection of tyrosine phosphorylated peptides by precursor ion scanning quadrupole TOF mass spectrometry in positive ion mode. *Anal Chem*, 2001, **73** (7): 1440~1448
- Zhang X, Herring C J, Romano P R, *et al.* Identification of phosphorylation sites in proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Chem*, 1998, **70** (10): 2050~2059
- 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** (19): 1793~1800
- Jensen P K, Pasa-Tolic L, Anderson G A, *et al.* Probing proteomes using capillary isoelectric focusing-electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal Chem*, 1999, **71** (11): 2076~2084
- Oda Y, Huang K, Cross F R, *et al.* Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (12): 6591~6596
- 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** (11): 2578~2586

Deciphering The Phosphoproteome Using Mass Spectrometry^{*}

JIANG Ying^{1,2)}, XU Lang-Lai²⁾, HE Fu-Chu¹⁾**

¹⁾ *Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;*

²⁾ *College of Life Science, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)*

Abstract Protein phosphorylation is a universal regulatory way in organism, and it is a key event in cell signal transduction. Mass spectrometry has emerged as an increasingly viable tool for this task. The methodologies currently available for the analysis of phosphoproteins by mass spectrometry were summarized, including enrichment of compounds of interest using immobilized metal affinity chromatography, antibody and chemical tagging techniques, detection of phosphopeptides using mass mapping and precursor ion sequencing, localization of phosphorylation sites by peptide sequencing, and quantitation of phosphorylation by the introduction of mass tags. Despite the variety of powerful analytical methods that are now available, complete characterization of the phosphorylation state of a protein isolated in small quantities from a biological sample remains far from routine.

Key words mass spectrometry, tandem mass spectrometry, phosphoproteome

^{*} This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (001CB510204 and G1998051213), The National Natural Sciences Foundation of China (3990600).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-10-66931246, E-mail: hefc@nic.bmi.ac.cn

Received: November 19, 2002 Accepted: February 28, 2003