

磷酸化蛋白质组学分析和定量技术的研究进展*

隋少卉 王京兰 蔡耘 钱小红**

(军事医学科学院放射医学研究所, 基因组与蛋白质组研究室, 北京蛋白质组中心, 北京 102206)

摘要 蛋白质的磷酸化是一种可逆性的蛋白质翻译后修饰, 在生物体内起着极为重要的作用. 近年来蛋白质翻译后修饰日益成为蛋白质组研究的热点之一. 定量磷酸化蛋白质组学方法和技术的快速发展为研究蛋白质磷酸化时空动态变化, 更好地了解生物学功能调节网络奠定了坚实的基础. 作为蛋白质组学研究的一个重要组成部分, 定量磷酸化蛋白质组学因其磷酸化蛋白质所具有的独特特征, 在技术和方法研究方面将面临更为严峻的挑战. 综述了磷酸化蛋白质组学定量的一些分析技术和方法的发展现状、优缺点以及未来的发展趋势.

关键词 磷酸化蛋白质组学, 方法, 技术, 定量

学科分类号 Q5

在生物体细胞中蛋白质是主要的功能行使者. 出于功能的需要, 许多蛋白质在翻译中或翻译后会在氨基酸链上共价结合各种非肽类基团, 形成翻译后修饰, 常见的如: 磷酸化、糖基化和泛素化等修饰, 其中研究最为详细的是蛋白质磷酸化. 据统计, 哺乳动物细胞内有 1/3 以上的蛋白质可以被磷酸化, 而脊椎动物基因组中有 2% 的基因编码蛋白激酶或磷酸酶^[1]. 蛋白质磷酸化参与调节细胞多种生命活动过程, 包括细胞的增殖、发育和分化、细胞骨架调控、细胞凋亡、神经活动、肌肉收缩、新陈代谢, 肿瘤发生等^[2]. 因此, 磷酸化蛋白及其位点的鉴定对更好地理解机体一些受磷酸化影响的信号通路机制是十分必要的. 而生物体内磷酸化与去磷酸化是一个可逆的动态变化过程, 当细胞中磷酸化蛋白质表达失调以及蛋白质磷酸化功能异常时, 会引发一系列疾病, 如: 老年性痴呆^[3], 肝癌^[4]等. 因而分析蛋白质磷酸化修饰在不同生理病理状态下的相对量的变化, 可进一步发掘与疾病发生发展相关的重要生物标志物, 为揭示其分子机理奠定基础. 传统的方法注重对单一蛋白质研究, 而蛋白质组学注重研究参与特定生理或病理状态的所有蛋白质种类及其与周围环境(分子)的关系. 所以为了满足蛋白质组学的多样性和复杂性的需要, 用蛋白质组技术结合生物信息学分析, 进行高通量地磷酸化蛋白的相对定量分析研究已成为必然趋势.

定量蛋白质组分析的方法和技术原则上都适用于磷酸化蛋白质定量分析, 但由于磷酸化蛋白质自身的一些特点, 使得磷酸化蛋白质组定量分析遇到新的困难. 首先, 磷酸化蛋白质含量少, 化学计量值低, 磷酸化的肽段很容易淹没在大量非磷酸化的肽段中; 其次, 磷酸肽本身所具有的负电性使其在正离子模式的质谱分析中信号受到抑制, 在 MALDI 源的质谱仪中磷酸肽的信号丰度会比其相应未磷酸化肽段的信号强度要低很多; 再次, 磷酸键较肽键容易断裂, 使磷酸化蛋白比非磷酸化蛋白鉴定困难得多. 因此, 在蛋白质组学水平进行磷酸化蛋白质的定量研究, 除了要面临蛋白质组学所特有的挑战外, 其自身的特点也给定量磷酸化蛋白质组学的分析带来了严峻的挑战. 主要的技术挑战是分析灵敏度. 只有当一些非磷酸化肽的含量降低(或磷酸化肽被富集)后, 分析磷酸化肽段才会变得相对容易. 所以, 进行磷酸化蛋白质组相对定量分析, 首先要对磷酸化肽段进行高通量的选择分离和富集, 其次要选择使用适合磷酸化肽段的定量方法,

*北京市科技计划重大项目(H030230280190), 国家自然科学基金资助项目(30321003, 20405017, 20505018, 20505019), 国家重点基础研究发展计划(973)(2004CB518707)和国家自然科学基金重点项目(20635010).

** 通讯联系人. Tel: 010-80705055, E-mail: qianxhl@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-09-18, 接受日期: 2006-12-31

再次要选用适当的检测方法,最后要有计算机软件自动化分析,辅助磷酸化蛋白质的定量.下面就磷酸化蛋白质的相对定量分析技术的现状及发展趋势从蛋白质组学的角度作一综述.

1 规模化磷酸化蛋白质组分析中常用的分离富集技术

1.1 固相金属亲和色谱

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^{3+} 、 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^[9]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,从啤酒酵母中鉴定了216个磷酸化肽段,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,通过在羧基上进行酯化反应^[6]以及改变洗脱液的体系^[7]等措施被用来提高IMAC的特异性.另外,自动化IMAC-capillary RP HPLC-ESI MS/MS技术平台的研究开发^[8,9],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.

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^[10]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 与磷酸肽上的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-NanoLC-ESI-MS/MS技术平台.虽然该技术在对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^[11].后来人们又利用纳米材料比表面积大的特点,对 TiO_2 纳米级材料进行开发研究^[12],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.

1.2 强阳离子交换色谱富集法

大规模分析磷酸化蛋白质是一个具有挑战性的问题,最近采用各种不同分离模式与LC-MS/MS联用从生物样品中鉴定大量的磷酸化位点的策略已越来越受到重视.Beausoleil结合SDS-PAGE和强阳离子交换色谱(strong cation exchange chromatography, SCX)成功地从HeLa细胞中鉴定了967个磷酸化蛋白,2002个磷酸化位点.这个策略是基于磷酸化肽段与非磷酸化肽段在酸性溶液中所带电荷的不同达到分离的目的.在溶液pH为2.7时,胰蛋白酶的酶切产物大部分肽段带+2电荷,而磷酸化肽段由于含有磷酸基团,带一个负电荷,所以磷酸化肽段在酸性溶液中带+1电荷.这样在强阳离子交换色谱中,单电荷肽段比多电荷肽段流出时间早,因此磷酸化肽段便能被从多电荷复杂的非磷酸肽中分离富集.相同的技术后来又被应用到哺乳动物脑组织的磷酸化蛋白质组分析中,鉴定出了500多个磷酸化位点^[13].尽管这一技术为大规模磷酸化蛋白质的鉴定展现了广阔的前景,但是仍存在一定局限性:a.带有碱性残基(如含有漏切位点,或含有His等)的磷酸化肽段将随着大批后面的非磷酸化肽段一起洗脱;b.该方法只适合Trypsin酶切的肽段,而且还有32%肽段会被忽略掉;c.该方法对样品量要求较大,而且由于要对分离出的每个馏分进行分析,工作量也不小.

目前不同富集方法的联用也越来越被重视.如Trinidad等^[14]将SCX与IMAC结合的策略用于磷酸化蛋白富集,结果比单独用任何一个富集方法得到的磷酸化肽段高至少3倍.最近Olsen^[15]结合SCX- TIO_2 创下了磷酸化肽段富集史上的新纪录更是个很好的例子.有效的大规模磷酸化肽段的富集为磷酸化蛋白质组定量分析的顺利进展提供了保障.

2 磷酸化蛋白质组学定量技术

2.1 ^{32}P 代谢标记和荧光染料染色的磷酸化蛋白质定量分析方法

^{32}P 放射性标记(^{32}P -labeling)可以非常灵敏、直观地检测磷蛋白.早在1991年该技术便在研究磷酸化蛋白质的定量分析中展现了一定的应用前景^[16].但 ^{32}P 高放射性对细胞有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Molecular Probes公司前几年推出的一种磷酸化蛋白质的荧光

染料^[17], 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染色, 无需同位素或特异性抗体, 通过荧光扫描仪检测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量的变化. 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^[18]将 ^{32}P 放射性标记和 Pro-Q 染色两种方法结合来分析中国鼠卵巢细胞的磷酸化蛋白质组, 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不存在很好的相关性. Hopper 等^[19]分别用 2DE-Pro-Q Diamond 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, 并进一步研究发现, ^{32}P 标记比 Pro-Q Diamond 方法更灵敏, 特别是对那些磷酸基团转化速率高的蛋白质, ^{32}P 标记方法能更好地检测. 而 Pro-Q Diamond 对较高丰度但低磷酸基团转化速率的蛋白质具有更高的灵敏度, 但对不同的磷酸化位点, 绝对灵敏度并不是一成不变的.

2.2 稳定同位素标记技术

2000 年 Weckwerth, Willmitzer 和 Fiehn 等^[20]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. 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:

2.2.1 化学标记技术(chemical modification)

目前该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、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, 导致了大量样本的损失, 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^[21]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, 主要是先用

IMAC 亲和富集磷酸化肽段, 然后用碱性溶液将磷酸化肽段发生 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标记上含有不同同位素的标签. 该方法改进之处在于: a. 消除了 O-糖基化肽段的干扰; b. 用 β 消除反应释放磷酸化肽段减少了反应步骤, 减少了样品的损失, 并排除了 IMAC 柱上的一些非磷酸化肽段的共洗脱. 作者用该方法分析了 cell adhesion protein p120 catenin 和糖胎球蛋白, 从中找到了新的磷酸化位点, 验证了该方法的有效性.

此外, 在肽段的羧基上进行的酯化反应, 既可改善 IMAC 的非特异性又可与稳定同位素标记联合应用, 在磷酸化蛋白质的定量比较方面展现了一定的应用前景. 但该方法所存在的遗憾是如果蛋白质中含有多个羧基, 如含有较多天冬氨酸、谷氨酸, 酯化反应很难进行完全, 而反应的不完全以及该方法剧烈的反应条件导致肽段中的天冬酰胺和谷酰胺发生脱氨基反应, 使结果的分析复杂化^[22]. 关于通过肽段氨基端的乙酰化反应标记上不同的同位素进行定量的化学修饰技术也有报道^[23].

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.

2.2.2 同位素代谢标记技术(metabolic labeling). ^{15}N 标记法(^{15}N labeling)是 Oda 等^[24]最早提出的一种同位素代谢标记技术, 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. 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)、亮氨酸(Leu)等. SILAC 标记技术具有一些显著优点: 蛋白质损失小; 标记效率高, 误差低; 可以实现多种的样本比较; 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. 正是因为拥有这些优点, SILAC 技术才迅速得到认可并在国际著名实验室使用^[15,26]. 最近 Olsen^[15]便是用 L-arginine 和 L-lysine, L-arginine- $\text{U-}^{13}\text{C}_6\text{-}^{14}\text{N}_4$ 和 L-lysine- $^2\text{H}_4$, 或者 L-arginine- $\text{U-}^{13}\text{C}_6\text{-}^{15}\text{N}_4$ 和 L-lysine- $\text{U-}^{13}\text{C}_6\text{-}^{15}\text{N}_2$ 实现 HeLa 细胞在 EGF(epidermal growth factor)刺激后 5

个时间点的标记, 并通过 SCX-TiO₂ 进行磷酸化肽段的富集, 用 LTQ-FT 检测到 2 244 磷酸化蛋白和 6 600 个磷酸化位点. 其中 14% 的磷酸化位点在 EGF 刺激后有 2 倍以上的差异, 揭示了 HeLa 细胞中的磷酸化蛋白受 EGF 影响的一个动态过程, 为探索癌症的发生发展提供了有用信息. 同时也是 SILAC 在细胞水平上研究定量磷酸化蛋白质组学的一个很成功的例子. 虽然 Ishihama 等^[27]已经用细胞系作为内参将该技术用于组织样本的定量分析, 但是方法的实用性还有待研究.

2.2.3 ¹⁸O 标记技术(oxygen-18 labeling)^[28] 该技术是将蛋白质酶切时或酶切后放入 H₂¹⁸O 中, 在蛋白酶催化作用下将羧基上的 2 个氧替换成 ¹⁸O 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 2 个 ¹⁸O, 使肽段质量数相差 +4 u. Korbelt 等^[29]采取免疫沉淀反应 /IDE/LC/MS 与 ¹⁸O 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. ¹⁸O 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), 没有副产物的标记技术, 并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, 已得到国际上一些大型实验室的青睐. 但是用 ¹⁸O 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, 一般选用全扫描的离子色谱面积(EIC)或峰强度定量, EICs 在分辨率上有一定的局限性而且经常会与其他共洗脱的峰重叠, 此外, ¹⁸O 与 ¹⁶O 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行进一步优化.

3 磷酸化蛋白质的质谱分析和鉴定

目前, 碰撞诱导解离(CID)和源后裂解(PSD)是应用最为广泛的 MS/MS 裂解方式, 在规模化多肽测序 / 蛋白质鉴定中取得了巨大的成功, 但是随着蛋白质组学研究技术的深入和发展, 这两种裂解方式也暴露出一些弱点, 如序列依赖性等, 使得 CID 和 PSD 在蛋白质组学尤其是翻译后修饰研究中的应用受到限制^[30]. 电子捕获解离(ECD)与傅立叶变换离子回旋加速共振(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. 与 CID 和 PSD 不同, ECD 不存在序列依赖性, 优先断裂二硫键, 优先产生 c、z 离子, 可产生广泛的主链裂解, 更为重要的是许多脆弱的翻译后修饰甚至非共价键维系的二级结构在 ECD 条件下都保持稳定, 因而将生物质谱的“软”电离能力从 MS 延伸到 MSMS, 使得 ECD 成为一种非常有前途的翻译后修饰研究工具. 而 ECD 在某些方面和 CID、PSD 又是互补的, 比如二硫键在后者是稳定的而在前者可被有效地打开, X-P (X 为任一氨基酸残基) 在 CID、PSD 条件下优先断裂, 而在 ECD 条件下是目前发现唯一不能断裂的序列. 当前 ECD 技术存在的不足在于电子捕获引起的电荷中和导致的灵敏度降低. 此外, ECD 技术在除了傅立叶转换离子回旋共振质谱仪(Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, FTICR MS)外的其他类型质谱仪中实现还有困难, 而 FTICR MS 比较昂贵, 这也限制了 ECD 技术的广泛应用. 但由于该技术分辨率超过 140 万, 准确度优于 1.0 ppm, 可实现超高分辨、高准确度和高灵敏度的多级串联质谱功能, 为开展定量磷酸化蛋白质组学分析提供了可能.

虽然 FT-ICR 等高分辨率的质谱仪在磷酸化蛋白质定量中的应用, 为定量磷酸化蛋白质组学展现了一定的可喜前景, 但是, 对于一些低丰度的磷酸化肽段仍很难实现在一级质谱图上进行有效定量, 最近 Jin 等^[23]利用二级质谱图中出现的强中性丢失峰进行定量, 可极大提高方法的灵敏度, 容许相对定量在一级质谱上不容易观察到的低丰度或者低磷酸化水平的磷酸化肽段, 接着发生中性丢失的离子可以通过三级质谱做进一步鉴定, 这一策略最近已被成功地应用到大规模的磷酸化蛋白质鉴定实验中^[31]. 另外, iTRAQ (isobaric tagging technology)^[32]是近年来继 ICAT 化学标记技术后, 最新开发的一种新的蛋白质组学定量研究技术, 可以实现在二级图谱上的定量, 具体原理已有详细报道^[33]. 但目前有关 iTRAQ 在磷酸化蛋白质定量方面的研究报道还很少.

4 辅助定量分析的计算机软件技术

生物信息学(bioinformatics)是一门新兴的交叉学科. 它包含了生物信息的获取、处理、存储、分析、解释和发布等在内的所有方面, 它综合运用数学、计算机科学和生物学等多种工具, 来阐明和展

示大量数据包含的生物学意义. 生物信息学的发展已给蛋白质组学研究提供了更方便有效的计算机分析软件. 定量蛋白质组学需要生物信息学的计算机软件技术来辅助分析庞大数据中所包含的差异信息. ICAT 技术在定量蛋白质组学中的应用已经比较成熟, 相应的软件技术也得到了开发(ABI4700 附带的 GPS2.0 能自动分析 ICAT 数据), 但对于新兴的定量磷酸化蛋白质组学技术, 目前还缺乏自动化分析的软件, 虽然辅助 SILAC 标记定量技术的软件 MS Quant (<http://msquant.sourceforge.net>) 以及辅助 ^{18}O 标记技术的软件 ZoomQuan¹ (<http://proteomics.mcw.edu>)^[24] 可以在相关网站上下载得到, 但对于其在实际分析中的应用, 还有待进一步研究改进.

5 结 语

在蛋白质组学水平进行磷酸化蛋白质的分析定量研究已经引起人们强烈的关注, 各种技术也相应地迅速发展起来, 为研究蛋白质磷酸化介导的细胞生物功能分析提供有用信息. 但由于磷酸化蛋白质组学自身的一些特点, 使得现有的技术还不能很好地满足研究的需要, 许多技术在应用的同时被取代或淘汰, 稳定同位素标记技术应是未来发展的一个方向, 但要很好地在磷酸化蛋白质组学领域应用, 还需进一步完善, 还需更特异地富集磷酸化蛋白质和磷酸化肽的分析方法来为蛋白质定量的顺利开展提供保障, 还需更稳定更成熟的标记技术来确保定量的准确性, 还需要研究发展一些能与大规模富集磷酸化肽段的技术相兼容的定量技术方法, 还需要更有效的鉴定技术和计算机软件进行辅助定量. 相信随着蛋白质组学研究的不断深入和发展, 磷酸化蛋白质组学定量技术必将得到突飞猛进的发展, 为全面和深入地认识生命的复杂活动提供可能.

参 考 文 献

- Alonso A, Sasin J, Bottini N, *et al.* Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*, 2004, **117** (6): 699~711
- Cohen P. The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol*, 2002, **4** (5): E127~130
- Hoe H S, Freeman J, Rebeck G W. Apolipoprotein E decreases tau kinases and phospho-tau levels in primary neurons. *Mol Neurodegener*, 2006, **1**: 18~25
- Yang Z, Yi J, Li X, *et al.* Correlation between loss of PTEN expression and PKB/AKT phosphorylation in hepatocellular carcinoma. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2005, **25** (1): 45~47
- 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
- Moser K, White F M. Phosphoproteomic analysis of rat liver by high capacity IMAC and LC-MS/MS. *J Proteome Res*, 2006, **5** (1): 98~104
- Kokubu M, Ishihama Y, Sato T, *et al.* Specificity of immobilized metal affinity-based IMAC/C18 Tip enrichment of phosphopeptides for protein phosphorylation analysis. *Anal Chem*, 2005, **77** (16): 5144~5154
- Wang J, Zhang Y, Jiang H, *et al.* Phosphopeptide detection using automated online IMAC-capillary LC-ESI-MS/MS. *Proteomics*, 2006, **6** (2): 404~411
- Ficarro S B, Salomon A R, Brill L M, *et al.* Automated immobilized metal affinity chromatography/nano-liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry platform for profiling protein phosphorylation sites. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, **19** (1): 57~71
- Pinkse M W, Uitto P M, Hilhorst M J, *et al.* Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-nanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide. *Anal Chem*, 2004, **76** (14): 3935~3943
- Rinalducci S, Larsen M R, Mohammed S, *et al.* Novel protein phosphorylation site identification in spinach stroma membranes by titanium dioxide microcolumns and tandem mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 2006, **5** (4): 973~982
- Liang S S, Makamba H, Huang S Y, *et al.* Nano-titanium dioxide composites for the enrichment of phosphopeptides. *J Chromatogr A*, 2006, **1116** (1~2): 38~45
- Ballif B A, Villen J, Beausoleil S A, *et al.* Phosphoproteomic analysis of the developing mouse brain. *Mol Cell Proteomics*, 2004, **3** (11): 1093~1101
- Trinidad J C, Specht C G, Thalhhammer A, *et al.* Comprehensive identification of phosphorylation sites in postsynaptic density preparations. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2006, **5** (5): 914~922
- Olsen J V, Blagoev B, Gnadt F, *et al.* Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*, 2006, **127** (3): 635~648
- Arrigo A P, Michel M R. Decreased heat and tumor necrosis factor-mediated hsp28 phosphorylation in thermotolerant HeLa cells. *FEBS Lett*, 1991, **282** (1): 152~156
- Steinberg T H, Agnew B J, Gee K R, *et al.* Global quantitative phosphoprotein analysis using multiplexed proteomics technology. *Proteomics*, 2003, **3** (7): 1128~1144
- Chen Z, Southwick K, Thulin C D. Initial analysis of the phosphoproteome of chinese hamster ovary cells using electrophoresis. *Journal of Biomolecular Techniques*, 2004, **15** (4): 249~256
- Hopper R K, Carroll S, Aponte A M, *et al.* Mitochondrial matrix phosphoproteome: effect of extra mitochondrial calcium.

- Biochemistry, 2006, **45** (8): 2524~2536
- 20 Weckwerth W, Willmitzer L, Fiehn O. Comparative quantification and identification of phosphoproteins using stable isotope labeling and liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Comm Mass Spectrom*, 2000, **14** (18): 1677~1681
 - 21 Thompson A J, Hart S R, Franz C, *et al.* Characterization of protein phosphorylation by mass spectrometry using immobilized metal ion affinity chromatography with on-resin beta-elimination and michael addition. *Anal Chem*, 2003, **75** (13): 3232~3243
 - 22 Ji C, Li L. Quantitative proteome analysis using differential stable isotopic labeling and microbore LC-MALDI MS and MS/MS. *Journal of Proteome Research*, 2005, **4** (3): 734~742
 - 23 Jin M, Bateup H, Padovan J C, *et al.* Quantitative analysis of protein phosphorylation in mouse brain by hypothesis-driven multistage mass spectrometry. *Anal Chem*, 2005, **77** (24): 7845~7851
 - 24 Oda Y, Huang K, Cross F R, *et al.* Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc Acad Natl Sci USA*, 1999, **96** (12): 6591~6596
 - 25 Ong S E, Blagoev B, Kratchmarova I, *et al.* Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular Cell Proteomics*, 2002, **1** (5): 376~386
 - 26 Amanchy R, Kalume D E, Pandey A. Stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) for studying dynamics of protein abundance and post-translational modifications. *Science's STKE*, 2005, **2005** (267): 12
 - 27 Ishihama Y, Sato T, Tabata T, *et al.* Quantitative mouse brain proteomics using culture- derived isotope tags as internal standards. *Nature biotechnology*, 2005, **23** (5): 617~621
 - 28 Sharon N, Grisaro V, Neumann H. Pepsin-catalyzed exchange of oxygen atoms between water and carboxylic acids. *Arch Biochem Biophys*, 1962, **97**: 219~221
 - 29 Korbel S, Schumann M, Bittorf T, *et al.* Relative quantification of erythropoietin receptor- dependent phosphoproteins using in-gel ¹⁸O-labeling and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, **19** (16): 2259~2271
 - 30 Wysocki V H, Tsapralis G, Smith LL, *et al.* Mobile and localized protons. *J Mass Spectrom*, 2000, **35** (12): 1399~1406
 - 31 Venable J D, Dong M Q, Wohlschlegel J, *et al.* Automated approach for quantitative analysis of complex peptide mixtures from tandem mass spectra. *Natue Methods*, 2004, **1** (1): 39~45
 - 32 Jones A M, Bennett M H, Mansfield J W, *et al.* Analysis of the defence phosphoproteome of Arabidopsis thaliana using differential mass tagging. *Proteomics*, 2006, **6** (14): 4155~4165
 - 33 Luo Z W, Zhu L, Xie W F. Advances in isobar ic tags for rela tive and absolute quantitation techn iques research. *China Biotechnology*, 2006, **26** (10): 83~87
 - 34 Halligan B D, Slyper R Y, Twigger S N, *et al.* ZoomQuant: an application for the quantitation of stable isotope labeled peptides. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2005, **16** (3): 302~306

Progress of Technology and Methodology in Qauntitative Phosphoproteomics*

SUI Shao-Hui, WANG Jing-Lan, CAI Yun, QIAN Xiao-Hong**

(Department of Genomics and Proteomics, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing Proteome Research Center, Beijing 102206, China)

Abstract Protein phosphorylation is one of the most important post-translational modifications. Reversible protein phosphorylation plays an essential role in regulation of cellular actions. Recently, phosphoproteomics is becoming a hotspot. Quantitative phosphoproteomics provides the possibilities to study temporal-spatial dynamics of protein phosphorylation and to better understand the regulatory networks of key processes in cells. As a part of proteomics, the quantitative phosphoproteomics faces more severe challenges since protein phosphorylation occupies high dynamics and extreme complexity. Advantages and disadvantages of several newly developed methods and technology were discussed, and the progress in quantitative phosphoproteome research realm was summarized.

Key words phosphoproteomics, methodology, technology, quantitation

*This work was supported by grants from The Beijing Municipal Program for Science & Technology (H030230280190), The National Natural Science Foundation of China (30321003, 20405017, 20505018, 20505019), National Basic Research Program of China (2004CB518707) and National Natural Science Key Program of China (20635010).

**Corresponding author. Tel: 86-10-80705055, E-mail: qianxh1@yahoo.com.cn

Received: September 18, 2006 Accepted: December 31, 2006