

## · 综述 ·

杨福全 博士，中国科学院生物物理研究所研究员、博士生导师、课题组长、蛋白质科学研究平台蛋白质组学技术实验室主任。1987年于郑州大学获得学士学位，1992年于中国科学院兰州化学物理研究所获得博士学位。1992–1995年于日本国立环境研究所做博士后。2000–2004年于美国国家卫生研究院国立心、肺与血液研究所做访问学者，2006年于美国 Scripps 研究所做高级访问学者，2004年至今在中国科学院生物物理研究所工作。主要从事质谱和蛋白质组学等新技术和新方法研究与应用。在 *Molecular & Cellular Proteomics*、*Analytical Chemistry*、*Journal of Proteome Research*、*Journal of Extracellular Vesicles*、*Theranostics*、*Scientific Reports*、*iScience* 等国际学术期刊发表论文 150 余篇。



# 磷酸化蛋白质组学研究中磷酸化肽段富集与分离方法研究进展

李佳然<sup>1,2</sup>，陈秀兰<sup>1,2</sup>，杨福全<sup>1,2</sup>

1 中国科学院生物物理研究所，北京 100101

2 中国科学院大学，北京 100049

李佳然, 陈秀兰, 杨福全. 磷酸化蛋白质组学研究中磷酸化肽段富集与分离方法研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(10): 3648-3658.

LI JR, CHEN XL, YANG FQ. Advances in the methods of phosphopeptide enrichment and separation in phosphoproteomic research. Chin J Biotech, 2022, 38(10): 3648-3658.

**摘要:** 对磷酸化蛋白质组 (phosphoproteome) 进行系统深入的研究依赖于高重复性和特异性的磷酸化肽段富集与分离方法。目前发展了多种不同原理的磷酸化肽段富集方法，它们往往具有不同的选择性和特异性，因此，根据不同的研究目的选择最适合的富集方法显得尤为重要。本文综述了基于亲和色谱法 (affinity chromatography)、免疫沉淀法 (immunoprecipitation)、化学衍生法 (chemical derivatization)、色谱法 (chromatography) 和其他新发展方法的磷酸化肽段富集方法，详细介绍了各自的优缺点及相关的优化与改进策略。此外，还简单介绍了磷酸化肽段富集与预分方法的不同组合的研究进展。

**关键词:** 磷酸化蛋白质组学；磷酸化肽段；磷酸化肽段富集；磷酸化肽段预分

**Received:** July 29, 2022; **Accepted:** September 6, 2022

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (2018YFA0507801)

**Corresponding authors:** CHEN Xiulan. E-mail: chenxiulan@ibp.ac.cn

YANG Fuquan. E-mail: fqyang@ibp.ac.cn

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2018YFA0507801)

# Advances in the methods of phosphopeptide enrichment and separation in phosphoproteomic research

LI Jiaran<sup>1,2</sup>, CHEN Xiulan<sup>1,2</sup>, YANG Fuquan<sup>1,2</sup>

1 Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** The systematic and in-depth study of phosphoproteome rely on highly reproducible and specific phosphopeptide enrichment methods. At present, a variety of enrichment methods have been developed based on different principles, and these methods often display different selectivity and specificity. It is therefore very important to select the most suitable enrichment method according to different research purposes. This review summarized the phosphopeptide enrichment based on affinity chromatography, immunoprecipitation, chemical derivatization, chromatography and other newly developed methods. The advantages and disadvantages of these methods, as well as the related optimization and improvement strategies, were discussed in detail. In addition, we also briefly summarized the progress of the combination of phosphopeptide enrichment and fractionation methods developed in recent years.

**Keywords:** phosphoproteomics; phosphopeptide; phosphopeptide enrichment; phosphopeptide fractionation

磷酸化是细胞内最常见和最重要的蛋白质翻译后修饰之一。蛋白质的磷酸化和去磷酸化作为一种“分子开关”<sup>[1]</sup>, 通过影响蛋白质的结构、定位和功能, 在细胞的信号转导、转录翻译、代谢和发育等生命过程中发挥着重要作用<sup>[2]</sup>。在真核细胞中, 大约 1/3 的蛋白质会被磷酸化<sup>[3]</sup>, 磷酸化主要发生在丝氨酸 (Ser, S)、苏氨酸 (Thr, T) 和酪氨酸 (Tyr, Y) 的侧链羟基上, 称为 O-磷酸化, 这也是磷酸化研究的常见类型。尽管磷酸化蛋白的数目相对较多, 但是磷酸化蛋白在细胞内是低丰度和亚化学计量的<sup>[4]</sup>, 大量非磷酸化蛋白的存在会对磷酸化蛋白的鉴定造成一定的挑战。为了提高磷酸化蛋白组的覆盖范围, 发展高重复性和特异性的富集方法显得尤为重要。近年来不断有各种磷酸化富集方

法的报道, 使得磷酸化蛋白质和磷酸化位点的鉴定数目有了大幅度的提高。本文将综述亲和色谱法、免疫沉淀法、化学衍生法、基于色谱的方法和其他新发展方法等磷酸化肽段富集方法 (图 1A), 介绍不同磷酸化肽段富集方法的原理、优缺点、选择性 (指富集材料对不同肽段的富集选择性, 如对磷酸化肽段和非磷酸化肽段的选择性, 对单磷酸化肽段和多磷酸化肽段的选择性, 对丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸磷酸化肽段的选择性) 及一些优化与改进策略, 随后介绍磷酸化肽段富集和预分方法的不同组合策略。

## 1 磷酸化肽段富集方法

### 1.1 亲和色谱法

近年来, 基于亲和色谱的固定化金属离子

亲和色谱 (immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC) 和金属氧化物亲和色谱 (metal oxide affinity chromatography, MOAC) 的方法快速发展。亲和色谱富集磷酸化肽段的过程主要涉及 3 个步骤 (图 1B): (1) 孵育: 磷酸化蛋白质/肽段上带负电的磷酸基团与金属离子或者金属氧化物结合; (2) 清洗: 除去结合的非磷酸化肽段; (3) 洗脱: 释放与金属材料结合的磷酸化肽段。

IMAC 利用固定化的带正电荷的金属阳离子与带负电荷的磷酸基团之间的亲和力富集磷酸化肽段, 这些金属离子通过螯合配体以非共价相互作用固定在支持基质 (如磁珠) 上。传统的螯合配体, 如次氮基三乙酸 (nitrilotriacetic acid, NTA) 或亚氨基二乙酸 (iminodiacetic

acid, IDA), 与金属离子之间的特异性不高, 因为每种金属离子只能与 1 个 NTA 或 IDA 配体配位, 这可能会导致富集时磷酸化肽段丢失。Zhou 等<sup>[5-6]</sup>报道了一种基于磷酸盐的新型高效螯合配体, 与 NTA 或 IDA 不同, 每个金属离子可以与多个磷酸盐基团结合, 从而显著增加特异性富集磷酸化肽段的能力。固定化的金属离子也会影响 IMAC 的选择性, Jiang 等<sup>[7]</sup>系统比较了 IMAC 中常用的 8 种不同金属离子富集磷酸化肽段的能力, 发现高价金属离子  $\text{Nb}^{5+}$ 、 $\text{Ti}^{4+}$  和  $\text{Zr}^{4+}$  对磷酸化肽段表现出更好的选择性, 因为它们与磷酸盐和羧酸基团的配位能力更强。其中,  $\text{Ti}^{4+}$ -IMAC 因其优越的性能已成为一种流行的磷酸化肽段富集方法, Yao 等<sup>[8]</sup>将单分散  $\text{Ti}^{4+}$ -IMAC 微球用于 HeLa 细胞磷酸化肽段

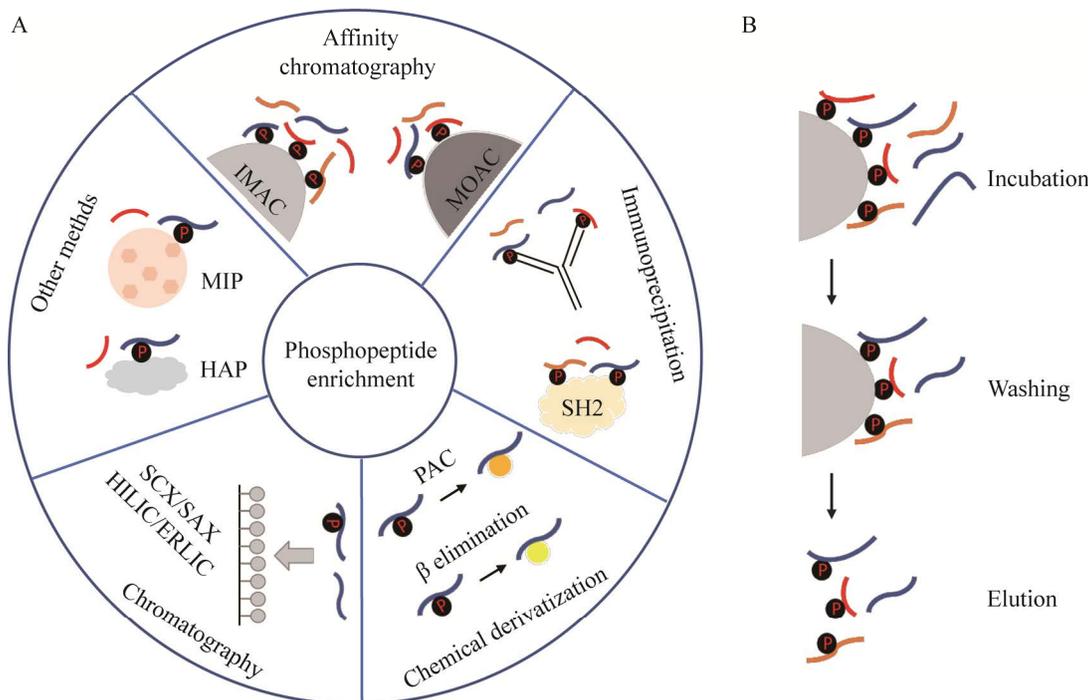


图 1 磷酸化肽段富集策略 A: 磷酸化肽段富集方法; B: 基于亲和色谱的磷酸化肽段富集方法的主要步骤

Figure 1 Strategies for enrichment of phosphopeptides. (A) Phosphopeptide enrichment methods. (B) Main steps for affinity-based phosphopeptide enrichment methods.

富集, 最终鉴定出超过 4 700 种磷酸化肽段, 特异性高达 99%。然而, IMAC 的性能容易受到生物样品中的许多分子, 包括盐、去垢剂和其他小分子化合物的影响<sup>[9]</sup>。除了固体基质载体, Iliuk 等<sup>[10]</sup>还开发了一种名为 PolyMAC (polymer-based metal ion affinity capture) 的金属离子 ( $\text{Ti}^{4+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$ ) 可溶性纳米聚合物, 它由金属离子和醛两种侧基组成, 可用于富集磷酸化肽段。PolyMAC-磷酸化肽段复合物可以通过共价偶联固体支持物, 如琼脂糖凝胶, 从溶液中分离出来。与固相 IMAC 相比, PolyMAC 可以在均相水溶液中富集磷酸化肽段, 从而克服了固相结合的异质性, 具有螯合时间快、可重复性高的特点。

MOAC 利用金属氧化物与磷酸基团之间的亲和力富集磷酸化肽段, 这些金属氧化物大多数是两性的, 在酸性条件下结合磷酸化肽段, 碱性条件下释放磷酸化肽段。MOAC 基质本身由金属氧化物或氢氧化物组成<sup>[11]</sup>, 不需要螯合基团固定金属离子。二氧化钛 ( $\text{TiO}_2$ ) 是首个用于磷酸化肽段富集的金属氧化物<sup>[12]</sup>, 近年来也发现许多其他的氧化物在一定程度上对磷酸化肽段表现出特异性的亲和能力, 如  $\text{ZrO}_2$ <sup>[13]</sup>、 $\text{SiO}_2$ <sup>[14]</sup>、 $\text{Al}(\text{OH})_3$ <sup>[15]</sup>。Leitner 等<sup>[16]</sup>用不同复杂性的样品, 包括合成肽段混合物到全细胞裂解物, 评估了包含常用的  $\text{TiO}_2$ 、 $\text{ZrO}_2$  等在内的 7 种金属氧化物的磷酸化肽段富集效率, 发现亲和材料的性能主要与氧化物的等电点 (isoelectric point, IEP) 相关, 富集磷酸化肽段数量最多的材料 ( $\text{TiO}_2$ 、 $\text{ZrO}_2$  和  $\text{In}_2\text{O}_3$ ) 的 IEP 约为 6。与 IMAC 相比, MOAC 中的金属阳离子与相邻的氧阴离子可以形成稳定的化学键, 因此, MOAC 对盐、去垢剂和不同溶剂有更强的耐受性, 且具有更好的选择性和灵敏度<sup>[17]</sup>。

虽然 IMAC 和 MOAC 方法富集磷酸化肽段

的特异性较高, 但是 IMAC 和 MOAC 对不同类型的磷酸化肽段的富集具有不同的选择性, IMAC 主要富集多磷酸化肽段, 而 MOAC 主要富集单磷酸化肽段<sup>[18]</sup>。为了富集到更多的单磷酸化肽段和多磷酸化肽段, Thingholm 等<sup>[19]</sup>首次将 IMAC 和 MOAC 结合, 发展了 IMAC 顺序洗脱方法 (sequential elution from IMAC, SIMAC), 通过 SIMAC 方法富集后鉴定到的磷酸化位点数是单独使用  $\text{TiO}_2$  法富集鉴定到的 2 倍。

除 IMAC 和 MOAC 外, Phos-tag (1,3-bis[bis(pyridine-2-ylmethyl)-amino]propan-2-olato dizinc(II)) 也是一种基于亲和相互作用的富集方法。Phos-tag 是一种琼脂糖偶联双核锌复合物<sup>[20]</sup>, 可以在中性条件下富集磷酸化肽段。Phos-tag 与磷酸基团的相互作用类似于 IMAC, 都是基于磷酸基团与金属离子之间的亲和力。Koike 团队<sup>[21-22]</sup>将 Phos-tag 用于 SDS-PAGE, 成功分离到大分子量的磷酸化蛋白。

## 1.2 免疫沉淀法

亲和色谱法对丝氨酸和苏氨酸磷酸化肽段的富集是有效的, 但是酪氨酸磷酸化通常以较低的丰度发生, 大约只占整体磷酸化事件的 0.5%<sup>[23]</sup>, 常规富集方法对磷酸化酪氨酸无特异性, 需要开发基于抗原抗体亲和相互作用的免疫沉淀富集磷酸化肽段的方法。目前市售的抗体对酪氨酸磷酸化的特异性比较高, 对丝氨酸/苏氨酸磷酸化肽段的富集存在结合效率以及特异性的问题, 因为与磷酸化丝氨酸和苏氨酸的脂肪侧链相比, 磷酸化酪氨酸的芳香环更富电子, 因此磷酸化酪氨酸有更多的机会与抗体结合位点结合, 从而产生更强的特异性结合。此外, 由于大多数抗体是磷酸氨基酸特异性的<sup>[11]</sup>, 一种抗体只能结合一种磷酸化的氨基酸, 无法用于大规模的磷酸化蛋白组的研究。一些研究使用了丝氨酸和苏氨酸共有基序产生的抗体<sup>[24-25]</sup>,

但是由于这些抗体不能以相同的效率结合丝氨酸/苏氨酸位点,因此这种方法的产量比较低。此外,高昂的抗体成本进一步限制了其更广泛的使用。

为了解决酪氨酸磷酸化的亲和和特异性问题,SH2 (Src homology) 结构域,一种存在于许多信号蛋白中的约 100 个氨基酸的保守结构域<sup>[26]</sup>,被用来富集酪氨酸磷酸化肽段。SH2 结构域可识别由酪氨酸磷酸化位点后加 3-5 个 C 端残基组成的短磷酸化肽段序列<sup>[27]</sup>,但是天然的 SH2 结构域对酪氨酸磷酸化的亲和力非常有限<sup>[28]</sup>。Kaneko 等<sup>[29]</sup>报道了具有三点突变体 (T8V; S10A; K15L) 的高亲和力 sSH2 (superbinder SH2) 结构域。与天然 SH2 相比,sSH2 对磷酸化肽段的亲和力明显增强。Bian 等<sup>[30]</sup>发展了使用 sSH2 结构域作为亲和试剂,通过亲和纯化质谱鉴定酪氨酸磷酸化蛋白质组的方法,并在 9 种人类细胞系中鉴定到约 20 000 条酪氨酸磷酸化肽段和大于 10 000 个酪氨酸磷酸化位点。这个方法的缺点在于使用 sSH2 亲和试剂进行富集时,需要用竞争性洗脱剂生物素-pYEEI (pTyr-Glu-Glu-Ile) 洗脱磷酸化肽段<sup>[30]</sup>,而-pYEEI 需要在 LC-MS/MS 分析之前被去除以免影响质谱的鉴定,额外的纯化步骤会导致样品的损失<sup>[31]</sup>。本文没有再更多地介绍基于 SH2 超亲体的酪氨酸磷酸化蛋白质组技术的应用,门丽影等<sup>[32]</sup>已经做了很好的综述。总之,这个酪氨酸磷酸化肽段的富集方法还需要进一步的优化。

### 1.3 化学衍生法

化学衍生法富集磷酸化肽段的基本思想是用另外可以被特异性靶向的化学基团取代磷酸基团,然后基于引入的亲和基团提取衍生后的磷酸化肽段。比较典型的化学衍生法是  $\beta$  消去法和氨基磷酸酯化学法 (phosphoramidate chemistry, PAC)。

$\beta$  消去法通常与 Michael 加成反应相结合。在碱性条件下,磷酸化丝氨酸和苏氨酸去磷酸化并分别转化为脱氢丙氨酸和  $\beta$ -甲基脱氢丙氨酸,通过加入亲核试剂如硫醇试剂,肽段中产生的二硫醇可以作为生物素标签的交联剂<sup>[33]</sup>或用于直接亲和纯化<sup>[34]</sup>。由于酪氨酸的磷酸基团无法在碱性条件下发生消去反应,因此这种方法只能用来富集丝氨酸和苏氨酸磷酸化肽段。此外, $\beta$  消去反应的发生可能会增加未磷酸化的丝氨酸和苏氨酸残基脱水的风险<sup>[34]</sup>,导致副反应的产生而增加样品的复杂性。Nika 等<sup>[35]</sup>在一组合成的磷酸化肽段中研究了  $\beta$  消去法的各种反应条件及实验参数,增加了磷酸化位点的鉴定数目,但这仅限于简单的蛋白样品。

PAC 是另一典型的化学衍生法,在某些条件下,如水溶性碳二亚胺催化,磷酸化氨基酸的磷酸基团与酰胺基团反应生成氨基磷酸酯,经还原后可偶联到碘乙酰修饰的玻璃微珠上<sup>[36-37]</sup>,被富集的磷酸基团在酸性条件下可被释放。与  $\beta$  消去法不同的是该方法也可富集含酪氨酸磷酸化肽段,且富集过程中磷酸基团不会被去除,便于检测确切的磷酸化位点。Zhou 等<sup>[36]</sup>的工作证明了基于 PAC 法富集研究酵母磷酸化的可行性。Tao 等<sup>[37]</sup>将磷酸化肽段与胺功能化的树枝状聚合物偶联,从而可以通过超滤富集磷酸化肽段。但是,该反应过程涉及一系列化学反应,因此一些副反应无法避免,增加了样品损失。

总之,由于上述缺点,目前化学衍生方法较少地被用于磷酸化肽段的富集。

### 1.4 基于色谱的方法

基于色谱的方法也被用于富集磷酸化肽段,如强阳/阴离子交换色谱<sup>[38-39]</sup> (strong cation/anion exchange chromatography, SCX/SAX)、亲水相互作用色谱<sup>[40]</sup> (hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC)、静电排斥液相作

用色谱<sup>[41]</sup> (electrostatic repulsion liquid interaction chromatography, ERLIC)。SCX/SAX 富集磷酸化肽段是基于带有不同电荷的酶切肽段与阴/阳离子固定相之间的相互作用。在使用 SCX 富集磷酸化肽段时, 反应在强酸性条件下进行, 胰蛋白酶切割产生的赖氨酸和精氨酸残基完全质子化, 因此大多数非磷酸化肽段带有 2 个正电荷, 而磷酸基团为去质子化的状态, 只有 1 个磷酸化位点的肽段会带有 1 个正电荷, 具有 2 个磷酸化位点的肽段不带电荷, 所以多磷酸化肽段首先被洗脱, 然后是与固定相作用较弱的单磷酸化肽段, 最后是非磷酸化肽段。而使用 SAX 富集磷酸化肽段时, 反应在中性或碱性条件下进行, 洗脱顺序与 SCX 相反。HILIC 基于亲水性分离肽段, 极性较强的肽段后被洗脱出来, 因此磷酸化肽段在梯度末端被富集, 但是研究表明 HILIC 对多磷酸化肽段的分辨率比单磷酸化肽段要低, 因为多磷酸化肽段在 HILIC 高浓度的有机溶剂情况下溶解性较差<sup>[42-43]</sup>。ERLIC 基于亲水相互作用和静电相互作用富集磷酸化肽段, 是一种混合模式的色谱。Alpert<sup>[41]</sup>发现将 ERLIC 与 SAX 进行比较, ERLIC 更适合从复杂混合物中鉴定胰蛋白酶磷酸化肽段。但是, 这些基于色谱的方法富集磷酸化肽段特异性不高, 现在更多地作为肽段的预分手段, 将复杂的样品初步地分离得到若干个性质较为相似的组分, 以提高后续磷酸化肽段的富集效率和磷酸化肽段的鉴定数目 (后续第 3 节进行了详细介绍)。

### 1.5 其他方法

除了上述方法之外, 分子印迹聚合物 (molecularly imprinted polymers, MIP) 和羟磷灰石层析 (hydroxyapatite chromatography, HAP) 的富集方法不断发展。MIP 是一种由分子印迹技术产生的仿生“合成抗体”或“塑料抗体”, 具

有类似天然酶和抗体的亲和力和特异性, 能够识别并结合特定的目标分子。Emgenbroich 等<sup>[44]</sup>报道了第一个合成的磷酸化酪氨酸选择性印迹聚合物, 能够在大量非磷酸化肽段存在的情况下捕获酪氨酸磷酸化肽段。Helling 等<sup>[45]</sup>对该系统进一步优化和验证, 成功提取了牛胎素消化液中的酪氨酸磷酸化肽段。Helling 等<sup>[45]</sup>对该系统进一步优化和验证, 成功提取了牛胎素消化液中的酪氨酸磷酸化肽段。HAP 是结晶磷酸钙 ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) 的一种形式, 常被用于分离各种蛋白质和核酸。Krenkova 等<sup>[46]</sup>和 Pinto 等<sup>[47]</sup>发现磷酸化蛋白比未磷酸化蛋白更容易与 HAP 结合, 因此提出了将 HAP 用于磷酸化肽段富集。Mamone 等<sup>[48]</sup>用基于 HAP 的富集策略, 成功从标准肽段混合物中富集出磷酸化肽段, 并将单磷酸化肽段和多磷酸化肽段分离。与  $\text{TiO}_2$  相比, HAP 对多磷酸化肽段具有更高的亲和力。

鉴于磷酸化蛋白质组的复杂性以及不同富集方法对不同类型的磷酸化肽段的偏向性, 目前没有一种方法可以富集到所有的磷酸化肽段, 因此组合使用多种磷酸化肽段富集方法可以提高磷酸化肽段的鉴定效率和磷酸化蛋白质组的覆盖率。

## 2 富集方法的优化与改进

在磷酸化肽段富集过程中, 富集特异性会受到多种因素的影响。下述以常用的 IMAC 和 MOAC 富集方法为例阐述磷酸化肽段富集方法的优化与改进。

### 2.1 基于 IMAC 的优化与改进

由于磷酸化肽段与 IMAC 之间的相互作用是路易斯酸碱反应<sup>[49]</sup>, 因此 pH 在富集过程中是重要的考虑因素。磷酸化肽段富集中存在非特异性结合的原因是含有酸性氨基酸 (谷氨酸和天冬氨酸) 的非磷酸化肽段与金属离子材料结合, 主要是氨基酸  $\gamma$ -基团上的羧基与金属离子材料之间的亲和力引起的, 类似于磷酸

盐对金属离子的亲和力<sup>[11]</sup>。为了减少含酸性氨基酸的非磷酸化肽段与 IMAC 非特异性结合,富集时需要使用有机酸,如乙酸<sup>[50]</sup>或三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)<sup>[51]</sup>,调节上样缓冲液 pH 值位于酸性氨基酸和磷酸盐的 pKa 值之间,即 pH 2.0–2.5,此时酸性氨基酸被质子化,羧基的负电荷被掩盖不能再与带正电的金属离子结合<sup>[11]</sup>,而大多数磷酸盐处于非质子化的状态,仍能与金属离子材料结合。除 pH 外, Ye 等<sup>[52]</sup>发现较高浓度的乙腈(acetonitrile, ACN)有利于磷酸盐去质子化和酸性氨基酸质子化,进一步减少了非特异性结合。因此,利用 IMAC 富集磷酸化肽段时,上样缓冲液中含有高浓度的 ACN 和 TFA,如 50% ACN 和 0.1% TFA。

## 2.2 基于 MOAC 的优化与改进

与 IMAC 类似,MOAC 的上样缓冲液需要使用有机酸进行酸化,使酸性氨基酸质子化和磷酸基团去质子化,然而缓冲液酸化不足以降低非磷酸化肽段的非特异性结合。研究发现在上样缓冲液中加入一些含羧酸或羟基官能团的,能够与非磷酸化肽段竞争 TiO<sub>2</sub> 的结合位点的试剂(non-phosphopeptide excluder),如谷氨酸<sup>[53]</sup>、乳酸<sup>[54]</sup>、乙醇酸<sup>[9]</sup>、柠檬酸<sup>[55]</sup>和 2,5-二羟基苯甲酸(2,5-dihydroxybenzoic, DHB)<sup>[56]</sup>,它们可以有效地减少非磷酸化肽段与 TiO<sub>2</sub> 的结合,同时不会对磷酸化肽段的结合造成影响。Larsen 等<sup>[56]</sup>报道 TiO<sub>2</sub> 上最优的磷酸盐结合位点的配位几何结构不同于取代羧酸的最佳结合位点的配位几何结构,羧酸以螯合双齿方式与 TiO<sub>2</sub> 结合,而磷酸盐以桥联双齿的方式与 TiO<sub>2</sub> 结合。我们最近的工作<sup>[57]</sup>系统比较了上样缓冲液中谷氨酸、乳酸、乙醇酸和 DHB 这 4 种常用的 non-phosphopeptide excluders 对 TiO<sub>2</sub> 方法富集磷酸化肽段的影响,发现不同方法的富集特异性不同,含有乳酸的磷酸化肽段富集方法表

现出最好的特异性及选择性,能鉴定到较多数目的磷酸化肽段。此外, TiO<sub>2</sub> 珠子与肽段的比值也会影响富集特异性<sup>[58]</sup>,因此富集方法应该根据不同样品进行调整与优化,以得到最佳的富集效率,富集得到更多的磷酸化肽段。

## 3 磷酸化肽段富集/预分方法研究进展

为了提高磷酸化蛋白组的覆盖深度,往往需要将磷酸化肽段富集和预分相结合。较为传统的策略是先预分再富集(图 2A),即在肽段水平用 SCX/SAX、HILIC 或高 pH 反相色谱(high pH reverse-phase liquid chromatography, HpH-RP)等色谱方法将酶切肽段预分成多个组分<sup>[59]</sup>,然后对单个组分或合并组分分别进行磷酸化肽段富集。这种策略可以显著降低样品复杂程度,有效提高鉴定率。但是这种策略耗时耗力,而且需要较高的样品起始量。此外,由于预分后各个组分肽段含量不一样,很难准确地添加特定富集磷酸化肽段所需的材料。

最近几年,另外一种先富集后预分的策略慢慢发展成熟(图 2B)。这种策略先利用 TiO<sub>2</sub> 或者 IMAC 方法从复杂样品中富集磷酸化肽段,再利用 HILIC 或者 HpH-RP 等色谱方法将富集到的磷酸化肽段预分成多个组分。Yue 等<sup>[60]</sup>和 Engholm-Keller 等<sup>[43]</sup>用这种方式,采用 HILIC 方法预分磷酸化肽段,大大提高了磷酸化肽段的鉴定数目,而且大大减少了样品处理时间和样品损失。这种先富集后预分的策略对样品起始量要求低,而且过程更简单,但是有可能因为样品复杂程度的问题导致富集的特异性降低。我们最近的工作<sup>[57]</sup>综合评价了不同的磷酸化肽段富集和分离方法,采取先富集磷酸化肽段再预分的策略,即以乳酸作为 non-phosphopeptide excluder 进行 TiO<sub>2</sub> 富集磷酸化肽段后,用三乙胺(triethylamine, TEA)或氨水(NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O)作

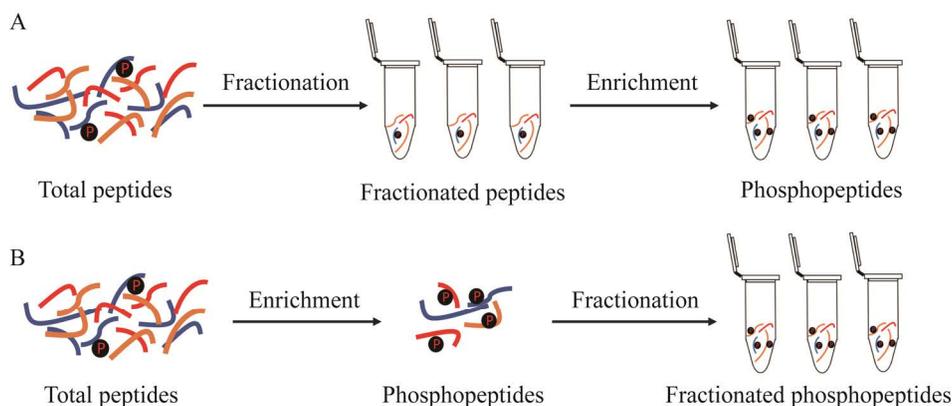


图2 磷酸化肽段先预分后富集 (A) 和先富集后预分 (B) 流程

Figure 2 Workflow for the strategy of “fractionation before enrichment” (A) and “fractionation after enrichment” (B).

为 HpH-RP 预分的分离试剂, 使用 StageTip 进行 HpH-RP 预分, 结果显示基于 TEA 的 HpH-RP 预分策略鉴定到的总磷酸化肽段数目多于基于氨水的 HpH-RP 预分策略, 且基于 TEA 的方法在鉴定多磷酸化肽段 (包括双磷酸化肽段和三磷酸化肽段) 时具有明显的优势。最终采用基于 TEA 的 HpH-RP 预分方法, 在 1 mg 293T 细胞的肽段中鉴定到超过 30 000 条磷酸化肽段和约 20 000 个磷酸化位点。该研究为选择合适的磷酸化肽段富集方法提供了依据, 并提供了一个高效可重复的大规模磷酸化蛋白质组学分析工作流程。

除了上述先预分后富集和先富集后预分的策略, Ren 等<sup>[61]</sup>进行了富集和预分一体化的尝试, 报道了一种  $\text{TiO}_2$  串联分离 ( $\text{TiO}_2$  with tandem fractionation, TAFT) 的方法, 将用于  $\text{TiO}_2$  富集的 StageTip 和 HpH-RP 的 StageTip 串联, 能够在 3 h 内完成磷酸化蛋白组样品的制备。他们利用该方法富集 HeLa 细胞和 HepG2.2.15 细胞中的磷酸化肽段, 分别在 1 mg 起始量蛋白中鉴定到超过 14 000 条磷酸化肽段。该方法具有较高的特异性和重现性, 能够以低成本的高通量方式进行快速深入的磷酸化蛋白组分析。

## 4 总结

总之, 随着近年来磷酸化肽段富集技术的不断发展和质谱仪器分辨率灵敏度的不断提高, 极大地消除了磷酸化蛋白组研究的瓶颈, 但是截至目前, 没有一种磷酸化富集方法能够完全描绘磷酸化蛋白组<sup>[18]</sup>。因此, 尚不清楚现有富集方法获得的磷酸化肽段是否反映了生物体的真实情况。为了得到更为可靠的分析结果, 最好能够得到覆盖深度更高的磷酸化肽段。此外, 这些磷酸化肽段富集技术具有不同的特异性, 为了克服因方法选择偏差造成的结果偏倚, 最好根据具体的研究问题选择最适的富集策略, 或者结合不同的富集方法, 以提高磷酸化蛋白质组的覆盖范围。

## REFERENCES

- [1] Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, et al. Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*, 2006, 127(3): 635-648.
- [2] Hunter T. Signaling—2000 and beyond. *Cell*, 2000, 100(1): 113-127.
- [3] Mann M, Ong SE, Grønborg M, et al. Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol*,

- 2002, 20(6): 261-268.
- [4] Aebersold R, Goodlett DR. Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev*, 2001, 101(2): 269-295.
- [5] Zhou HJ, Xu SY, Ye ML, et al. Zirconium phosphonate-modified porous silicon for highly specific capture of phosphopeptides and MALDI-TOF MS analysis. *J Proteome Res*, 2006, 5(9): 2431-2437.
- [6] Zhou H, Ye M, Dong J, et al. Robust phosphoproteome enrichment using monodisperse microsphere-based immobilized titanium (IV) ion affinity chromatography. *Nat Protoc*, 2013, 8(3): 461-480.
- [7] Jiang JB, Sun XN, Li Y, et al. Facile synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA core-shell microspheres functionalized with various metal ions: a systematic comparison of commonly-used metal ions for IMAC enrichment. *Talanta*, 2018, 178: 600-607.
- [8] Yao YT, Dong J, Dong MM, et al. An immobilized titanium (IV) ion affinity chromatography adsorbent for solid phase extraction of phosphopeptides for phosphoproteome analysis. *J Chromatogr A*, 2017, 1498: 22-28.
- [9] Jensen SS, Larsen MR. Evaluation of the impact of some experimental procedures on different phosphopeptide enrichment techniques. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(22): 3635-3645.
- [10] Iliuk AB, Martin VA, Alicie BM, et al. In-depth analyses of kinase-dependent tyrosine phosphoproteomes based on metal ion-functionalized soluble nanopolymers. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9(10): 2162-2172.
- [11] Fila J, Honys D. Enrichment techniques employed in phosphoproteomics. *Amino Acids*, 2012, 43(3): 1025-1047.
- [12] Pinkse MWH, Uitto PM, Hilhorst MJ, et al. Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns. *Anal Chem*, 2004, 76(14): 3935-3943.
- [13] Wang XM, Guo ZY, Zhang Y, et al. ZrO<sub>2</sub> doped magnetic mesoporous polyimide for the efficient enrichment of phosphopeptides. *Talanta*, 2018, 188: 385-392.
- [14] Xiao RL, Pan YN, Li J, et al. Layer-by-layer assembled magnetic bimetallic metal-organic framework composite for global phosphopeptide enrichment. *J Chromatogr A*, 2019, 1601: 45-52.
- [15] Wolschin F, Wienkoop S, Weckwerth W. Enrichment of phosphorylated proteins and peptides from complex mixtures using metal oxide/hydroxide affinity chromatography (MOAC). *Proteomics*, 2005, 5(17): 4389-4397.
- [16] Leitner A, Sakeye M, Zimmerli CE, et al. Insights into chemoselectivity principles in metal oxide affinity chromatography using tailored nanocast metal oxide microspheres and mass spectrometry-based phosphoproteomics. *Analyst*, 2017, 142(11): 1993-2003.
- [17] Aryal UK, Ross ARS. Enrichment and analysis of phosphopeptides under different experimental conditions using titanium dioxide affinity chromatography and mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24(2): 219-231.
- [18] Bodenmiller B, Mueller LN, Mueller M, et al. Reproducible isolation of distinct, overlapping segments of the phosphoproteome. *Nat Methods*, 2007, 4(3): 231-237.
- [19] Thingholm TE, Jensen ON, Robinson PJ, et al. SIMAC (sequential elution from IMAC), a phosphoproteomics strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides. *Mol Cell Proteomics*, 2008, 7(4): 661-671.
- [20] Kinoshita E, Yamada A, Takeda H, et al. Novel immobilized zinc(II) affinity chromatography for phosphopeptides and phosphorylated proteins. *J Sep Sci*, 2005, 28(2): 155-162.
- [21] Kinoshita-Kikuta E, Aoki Y, Kinoshita E, et al. Label-free kinase profiling using phosphate affinity polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6(2): 356-366.
- [22] Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T. Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nat Protoc*, 2009, 4(10): 1513-1521.
- [23] Hunter T, Sefton BM. Transforming gene product of *Rous sarcoma* virus phosphorylates tyrosine. *PNAS*, 1980, 77(3): 1311-1315.
- [24] Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*, 2007, 316(5828): 1160-1166.
- [25] Grønborg M, Kristiansen TZ, 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.
- [26] Waksman G. Binding of a high affinity phosphotyrosyl

- peptide to the Src SH<sub>2</sub> domain: crystal structures of the complexed and peptide-free forms. *Cell*, 1993, 72(5): 779-790.
- [27] Low TY, Mohtar MA, Lee PY, et al. Widening the bottleneck of phosphoproteomics: evolving strategies for phosphopeptide enrichment. *Mass Spectrom Rev*, 2021, 40(4): 309-333.
- [28] Ladbury JE, Arold ST. Energetics of Src homology domain interactions in receptor tyrosine kinase-mediated signaling. *Methods Enzymol*, 2011, 488: 147-183.
- [29] Kaneko T, Huang HM, Cao X, et al. Superbinder SH<sub>2</sub> domains act as antagonists of cell signaling. *Sci Signal*, 2012, 5(243): ra68.
- [30] Bian YY, Li L, Dong MM, et al. Ultra-deep tyrosine phosphoproteomics enabled by a phosphotyrosine superbinder. *Nat Chem Biol*, 2016, 12(11): 959-966.
- [31] Dong MM, Bian YY, Wang Y, et al. Sensitive, robust, and cost-effective approach for tyrosine phosphoproteome analysis. *Anal Chem*, 2017, 89(17): 9307-9314.
- [32] 门丽影, 徐锋, 徐平. 基于SH<sub>2</sub>超亲体的微量样品酪氨酸磷酸化蛋白质组学技术研究进展及应用. *生物工程学报*, 2021, 37(7): 2334-2341.  
Men LY, Xu F, Xu P. Advances and application of enrichment technology in SH<sub>2</sub> superbinder-based tyrosine phosphoproteomics. *Chin J Biotech*, 2021, 37(7): 2334-2341 (in Chinese).
- [33] Oda Y, Nagasu T, Chait BT. Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(4): 379-382.
- [34] McLachlin DT, Chait BT. Improved beta-elimination-based affinity purification strategy for enrichment of phosphopeptides. *Anal Chem*, 2003, 75(24): 6826-6836.
- [35] Nika H, Lee J, Willis IM, et al. Phosphopeptide characterization by mass spectrometry using reversed-phase supports for solid-phase  $\beta$ -elimination/Michael addition. *J Biomol Tech*, 2012, 23(2): 51-68.
- [36] Zhou H, Watts JD, Aebersold R. A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(4): 375-378.
- [37] Tao WA, Wollscheid B, O'Brien R, et al. Quantitative phosphoproteome analysis using a dendrimer conjugation chemistry and tandem mass spectrometry. *Nat Methods*, 2005, 2(8): 591-598.
- [38] Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, et al. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *PNAS*, 2004, 101(33): 12130-12135.
- [39] Zhang KL. From purification of large amounts of phospho-compounds (nucleotides) to enrichment of phospho-peptides using anion-exchanging resin. *Anal Biochem*, 2006, 357(2): 225-231.
- [40] McNulty DE, Annan RS. Hydrophilic interaction chromatography reduces the complexity of the phosphoproteome and improves global phosphopeptide isolation and detection. *Mol Cell Proteomics*, 2008, 7(5): 971-980.
- [41] Alpert AJ. Electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography for isocratic separation of charged solutes and selective isolation of phosphopeptides. *Anal Chem*, 2008, 80(1): 62-76.
- [42] Engholm-Keller K, Hansen TA, Palmisano G, et al. Multidimensional strategy for sensitive phosphoproteomics incorporating protein prefractionation combined with SIMAC, HILIC, and TiO<sub>2</sub>(2) chromatography applied to proximal EGF signaling. *J Proteome Res*, 2011, 10(12): 5383-5397.
- [43] Engholm-Keller K, Birck P, Størling J, et al. TiSH—a robust and sensitive global phosphoproteomics strategy employing a combination of TiO<sub>2</sub>, SIMAC, and HILIC. *J Proteom*, 2012, 75(18): 5749-5761.
- [44] Emgenbroich M, Borrelli C, Shinde S, et al. A phosphotyrosine-imprinted polymer receptor for the recognition of tyrosine phosphorylated peptides. *Chemistry*, 2008, 14(31): 9516-9529.
- [45] Helling S, Shinde S, Brosseron F, et al. Ultratrace enrichment of tyrosine phosphorylated peptides on an imprinted polymer. *Anal Chem*, 2011, 83(5): 1862-1865.
- [46] Krenkova J, Lacher NA, Svec F. Control of selectivity *via* nanochemistry: monolithic capillary column containing hydroxyapatite nanoparticles for separation of proteins and enrichment of phosphopeptides. *Anal Chem*, 2010, 82(19): 8335-8341.
- [47] Pinto G, Caira S, Cuollo M, et al. Hydroxyapatite as a concentrating probe for phosphoproteomic analyses. *J Chromatogr B*, 2010, 878(28): 2669-2678.
- [48] Mamone G, Picariello G, Ferranti P, et al. Hydroxyapatite affinity chromatography for the highly selective enrichment of mono- and multi-phosphorylated peptides in phosphoproteome analysis. *Proteomics*, 2010, 10(3): 380-393.
- [49] Qiu W, Evans CA, Landels A, et al. Phosphopeptide enrichment for phosphoproteomic analysis—a tutorial

- and review of novel materials. *Anal Chim Acta*, 2020, 1129: 158-180.
- [50] Posewitz MC, Tempst P. Immobilized gallium(III) affinity chromatography of phosphopeptides. *Anal Chem*, 1999, 71(14): 2883-2892.
- [51] 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.
- [52] Ye JY, Zhang XM, Young C, et al. Optimized IMAC-IMAC protocol for phosphopeptide recovery from complex biological samples. *J Proteome Res*, 2010, 9(7): 3561-3573.
- [53] Wu J, Shakey Q, Liu W, et al. Global profiling of phosphopeptides by titania affinity enrichment. *J Proteome Res*, 2007, 6(12): 4684-4689.
- [54] Sugiyama N, Masuda T, Shinoda K, et al. Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6(6): 1103-1109.
- [55] Winter D, Seidler J, Ziv Y, et al. Citrate boosts the performance of phosphopeptide analysis by UPLC-ESI-MS/MS. *J Proteome Res*, 2009, 8(1): 418-424.
- [56] Larsen MR, Thingholm TE, Jensen ON, et al. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4(7): 873-886.
- [57] Li JR, Wang JF, Yan YM, et al. Comprehensive evaluation of different TiO<sub>2</sub>-based phosphopeptide enrichment and fractionation methods for phosphoproteomics. *Cells*, 2022, 11(13): 2047.
- [58] Li QR, Ning ZB, Tang JS, et al. Effect of peptide-to-TiO<sub>2</sub> beads ratio on phosphopeptide enrichment selectivity. *J Proteome Res*, 2009, 8(11): 5375-5381.
- [59] Zarei M, Sprenger A, Metzger F, et al. Comparison of ERLIC-TiO<sub>2</sub>, HILIC-TiO<sub>2</sub>, and SCX-TiO<sub>2</sub> for global phosphoproteomics approaches. *J Proteome Res*, 2011, 10(8): 3474-3483.
- [60] Yue XS, Hummon AB. Combination of multistep IMAC enrichment with high-pH reverse phase separation for in-depth phosphoproteomic profiling. *J Proteome Res*, 2013, 12(9): 4176-4186.
- [61] Ren L, Li CY, Shao WL, et al. TiO<sub>2</sub> with tandem fractionation (TAFT): an approach for rapid, deep, reproducible, and high-throughput phosphoproteome analysis. *J Proteome Res*, 2018, 17(1): 710-721.

(本文责编 陈宏宇)