

## 植物蛋白质磷酸化的研究技术

魏鑫, 李海霞, 陈卫卫, 陈镇, 曾汉来\*

华中农业大学农业部华中作物生理生态与栽培重点开放实验室, 武汉 430070

### Technique for Research of Protein Phosphorylation in Plant

WEI Xin, LI Hai-Xia, CHEN Wei-Wei, CHEN Zhen, ZENG Han-Lai\*

Key Laboratory of Huazhong Crop Physiology, Ecology and Production, Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**摘要:** 本文介绍植物蛋白质磷酸化研究的技术及其应用情况, 并对这些技术的应用前景作了展望。

**关键词:** 蛋白质磷酸化; 磷酸化蛋白质富集; 磷酸化检测

蛋白质磷酸化是生物体内普遍存在的一种蛋白质翻译后修饰过程, 在细胞信号传导、酶活性调节中起分子开关的作用, 是原核和真核生物代谢调控的关键环节(De la Fuente van Bentem 和 Hirt 2007)。蛋白质磷酸化与去磷酸化的可逆调控机制几乎参与生命活动的所有过程, 包括细胞的增殖、发育和分化等。有研究表明, 在哺乳动物细胞活动的任何时期都至少有1/3以上的蛋白质是经过磷酸化修饰的(Zolnierowicz 和 Bollen 2000)。

蛋白质的磷酸化过程是通过蛋白质磷酸化激酶将 ATP 的磷酸基转移到蛋白质的特定位点如苏氨酸、丝氨酸、酪氨酸等残基上实现的, 在原核生物中还发现组氨酸、谷氨酸和天冬氨酸残基可以被磷酸化。在拟南芥中现已发现了1003种激酶, 占其所有蛋白质比例的4%, 大致是哺乳动物激酶数量的2倍(Manning 等 2002)。Sugiyama 等(2008)报导在拟南芥中, 丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸残基发生磷酸化的比例约是 85:10.7:4.4, 和人的蛋白质磷酸化特征非常接近(Molina 等 2007)。

植物在地球上的分布范围比动物更广, 能适应动物所不能适应的各种环境。植物对各种环境信号刺激, 如光照、辐射、温度、水分、营养缺失、病虫害的反应等, 都伴随着蛋白质磷酸化的发生(Krsten 等 2006), 因此在植物发育过程中, 蛋白质的磷酸化是最重要的调节方式(De la Fuente van Bentem 等 2008)。大量实验表明, 改变植物的生长环境, 可诱导细胞内蛋白质磷酸化现象大量发生, 从而导致细胞内蛋白质的组成和特性发生变化, 最终导致植物的生理状态发生改变。弄清关键蛋白的磷酸化水平变化规律, 可从分子水平上揭示植物重

要性状的代谢途径和调节机制、鉴定重要基因功能。

功能蛋白质的磷酸化调节是一种精细的代谢调节过程, 其发生的时空关系复杂, 同一蛋白可由不同的激酶对其进行多个位点的磷酸化和去磷酸化, 从而改变其结构和功能(Temporini 等 2008)。在任意时刻同一个细胞中的各种蛋白质磷酸化水平都不尽相同, 其细微差异可导致代谢上的较大差异, 由于磷酸化蛋白含量较低, 存在分离、检测和分析上的困难, 蛋白质磷酸化研究是生物学研究中的热点同时也是难点。因此, 在较长一段时间内蛋白质磷酸化研究取得的成果并不是很多(Reinders 和 Sickmann 2005)。第1篇关于植物蛋白质磷酸化的文献发表于20年前(Michel 等 1988), 到现在也只找到为数不多的蛋白质磷酸化位点。

随着物理、化学和生物技术的发展、融合与更新, 近年来蛋白质磷酸化的研究中发展了很多收集和富集磷酸化蛋白质的新方法, 大幅度提高了磷酸化蛋白质的富集丰度, 为蛋白质磷酸化的高通量研究打下了基础。由于双向电泳、质谱和蛋白质芯片技术的精度提高, 蛋白质的磷酸化和对应的激酶进行准确分析成为可能(Benschop 等 2007)。本文介绍近年来植物蛋白质磷酸化研究领域中的应用较多的分离、富集和检测蛋白质磷酸化的技术与方法, 以及这些方法在植物蛋白质磷酸化领域中的应用。

收稿 2009-03-11 修定 2009-08-12

资助 国家自然科学基金(30671273)和“973”前期研究项目(2008CB117006)。

\* 通讯作者(E-mail: zenghl@mail.hzau.edu.cn; Tel: 027-87280685)。

## 1 磷酸化蛋白质的富集技术

在蛋白质组中,蛋白质发生磷酸化的程度较低,磷酸化多肽在蛋白质水解产物中也表现为很低的丰度,在检测中容易受高丰度的非磷酸化蛋白质和多肽干扰。所以,蛋白质磷酸化水平研究中非常重要的内容就是采用高效的富集策略,对磷酸化蛋白或者磷酸化多肽进行富集,提高磷酸化蛋白质和多肽的相对含量。近年来,随着磷酸化蛋白质和磷酸化多肽的富集技术的重点研究,发展出了很多极具应用价值的富集技术,如固相金属离子亲和色谱、强阳离子交换色谱和二氧化钛柱层析等技术。

**1.1 固相金属离子亲和色谱富集磷酸化肽段** 固相金属离子亲和色谱(immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC)技术最初只用于组氨酸标记蛋白的亲纯化,现已发展为应用最广泛的磷酸化蛋白和多肽的富集技术(Laugesen 等 2004)。其原理是磷酸化蛋白和多肽与固相化的金属离子通过静电相互作用,可被选择性地吸附在IMAC的硅胶柱上,键合在螯合底物上的金属离子(通常是Fe或Ga)选择性地与磷酸化肽段中的磷酸部分相结合,并且在高pH或磷酸缓冲液中磷酸化肽段可以释放出来。在处理样品时,非磷酸化的杂质会先被洗脱下来,而目标蛋白和多肽则被特定洗脱液洗脱,可以达到较好的富集和分离目的(Feuerstein 等 2005)。此方法的优点在于每一个可溶磷酸化肽段,不管其长度如何都能被富集,而且IMAC柱洗脱下来的样品可直接用于质谱分析。这种方法的局限性在于一些富含酸性氨基酸的蛋白和多肽可能会与柱材料相结合从而引入杂质,另外一些含多个磷酸化位点的蛋白和多肽因结合较紧密则难于被洗脱,会造成部分磷酸化蛋白和多肽的丢失(Stensballe 等 2001)。

通过与各种质谱检测技术联用,IMAC的方法已通过较大改进用来富集磷酸化多肽。Barnouin 等(2005)使用1,1,1,3,3,3-六氟代异丙醇作为固定和冲洗缓冲液在提高富集效率的同时,也能提高基质辅助激光解析电离质谱(matrix assisted laser desorption ionization-mass spectrometry, MALDI-MS)的检测效率。Kokubu 等(2005)发展出了一种更有效利用IMAC的方法,可以减少非特异性的蛋白和多肽的引入。他们将IMAC的珠子包裹在 $C_{18}$ 的材料中,再放置于200  $\mu$ L的枪头中,这样IMAC就可

以和其它富集方法如强阳离子交换(strong cation exchange, SCX)和强阴离子交换(strong anion exchange, SAX)联用(Nuhse 等 2003, 2004)。Nuhse 等(2004)采用SCX和IMAC联用,再用液相色谱质谱(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)检测,成功的在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)膜蛋白中发现了300多个蛋白质磷酸化位点。采用这些改进的IMAC可以高效系统的分析蛋白质的磷酸化水平。

**1.2 二氧化钛柱层析富集磷酸化肽段** 近年来,为了解决非特异性磷酸化多肽对IMAC材料的结合的问题,二氧化钛( $TiO_2$ )柱层析已用于富集磷酸化多肽样品(Pinkse 等 2004)。其原理与IMAC相似,在此方法中,键合在螯合底物上的Ti离子选择性地与磷酸化多肽中的磷酸部分相结合,并且在高pH或磷酸缓冲液中磷酸化多肽可以释放出来。采用该方法,各种磷酸化多肽都可以被成功的富集,但是,也仍然有含多个酸性氨基酸残基的酸性多肽被引入洗脱产物中。Larsen 等(2005)用2,5-二羟基苯甲酸(2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid, DHB)来固定多肽,可以大大减少非特异性磷酸化多肽的结合,同时保持磷酸化多肽的高效结合,有效地对 $TiO_2$ 柱层析进行改进。同时,这种方法可以更快捷、更容易地与MALDI-MS/LC-MS/MS联用。

Jensen 和 Larsen (2007)以12种标准蛋白质为材料,利用胰蛋白酶酶解为大小不一的肽段。分别用IMAC和改进 $TiO_2$ 柱层析富集磷酸化肽段,经质谱检测发现 $TiO_2$ 柱层析比IMAC富集的磷酸化肽段多1/3以上。Prak 等(2008)研究拟南芥细胞膜蛋白的磷酸化的结果显示,与IMAC相比,用改进的 $TiO_2$ 柱层析法富集磷酸化蛋白质,经质谱检测分析,可以多找到6个未报导过的蛋白质磷酸化位点。采用这种改进的 $TiO_2$ 柱层析的方法,可以显著提高富集的效率,有利于蛋白质磷酸化的检测。 $TiO_2$ 柱层析有可能逐步取代IMAC。

**1.3 强阳离子交换色谱分离磷酸化肽段** 强阳离子交换(SCX)色谱可以应用于磷酸化多肽的富集(Ballif 等 2004)。在通常的强阳离子交换条件下(pH 2.7),经胰蛋白酶作用产生的多肽大多带2个正电荷,而由于磷酸基团带1个负电荷,酶切肽段在酸性溶液中所带电荷会依所带磷酸基团的多少减至+1、0或更低。所以,在SCX色谱中,单电荷的

肽段比多电荷的肽段流出时间早,因此磷酸化肽段便能从多电荷复杂的非磷酸化肽段中得到分离富集。分离富集得到的肽段一般采用反向 LC-MS/MS 进行检测。

采用这种方法, Beausoleil等(2004)从海拉细胞(Hela cell)核中发现了967种蛋白的2 002个磷酸化位点。另外,在小鼠脑细胞中同样也发现了500种蛋白质发生磷酸化(Ballif等2004)。若将 SCX 和 IMAC 联用,最终找到的磷酸化位点数量可达到单独使用其中一种方法的3倍,这说明 SCX 和 IMAC 之间是互补的,可以在蛋白质磷酸化样品制备中联用(Trinidad等2006)。

**1.4 磷酸钙沉淀法富集磷酸化肽段** 磷酸钙[Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>]沉淀法是一种新型的从复杂样品的酶解液中富集磷酸化肽段的方法,该方法与前述的方法结合可以高效的富集磷酸化肽段。一般采用 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 对酶解液的磷酸化肽段沉淀之后再用 IMAC 或者 TiO<sub>2</sub> 法,富集效率可以达到90%。碱性条件下,磷酸化肽段的磷酸基团可以与磷酸钙螯合沉淀,而在酸性条件下,磷酸化肽段可被释放。该方法的优点是迅速快捷,成本低廉,可以对复杂样品进行初步的筛选,降低样品的复杂度。

Zhang等(2007)采用磷酸钙沉淀的方法对水稻胚细胞中的磷酸化蛋白质进行初步富集,再分别与 IMAC 联用,再以 LC-ESI-MS 检测磷酸化位点,共检测到125种蛋白质的242个发生磷酸化位点。还用MALDI-TOF-MS来分别检测了磷酸钙沉淀和上清液中的磷酸化肽段,证明沉淀部分可以富集大部分的磷酸化肽段。说明,在处理复杂样品时用磷酸钙沉淀的方法对磷酸化肽段进行初步的富集,可以降低样品的复杂度,从而让低丰度的磷酸化蛋白更容易检测到,可以应用于研究发生频率较低的蛋白质磷酸化研究。

**1.5 金属氧化物亲和层析** 金属氧化物亲和层析(metal oxide affinity chromatography, MOAC)是最近建立的一种以Al(OH)<sub>3</sub>为基础的富集磷酸化蛋白质和多肽的方法。其原理是利用Al(OH)<sub>3</sub>中Al<sup>3+</sup>与磷酸基团的亲和作用实现磷酸化蛋白质及多肽的富集。这种富集方法适应于生物体内的蛋白质磷酸化的大规模检测,也比现有的一些商业性的磷酸化蛋白质富集试剂盒的效率更高而且更经济。与 IMAC 方法相比,它很大程度上减少了非磷酸化酸

性多肽的结合。

Wolschin 和 Weckwerth (2005)采用 MOAC 富集拟南芥种子中的磷酸化蛋白质。他们将拟南芥种子的裂解液与 Al(OH)<sub>3</sub> 浆液充分混合,离心后去上清液,得到富集的样品基质。用洗脱液洗涤基质,得到磷酸化多肽溶液。再用 LC-MS 检测蛋白质的磷酸化,共发现9个蛋白质的16个位点发生了磷酸化。该方法的成功应用为植物体内的蛋白质磷酸化的检测提供了一种新的选择。

## 2 蛋白质磷酸化检测技术

蛋白质磷酸化的检测主要包括:鉴定蛋白质或者多肽是否发生磷酸化、测定磷酸化的形式和位点、检测磷酸化的程度以及探索磷酸化发生的途径和作用的激酶。相应的检测技术包括凝胶电泳、质谱和蛋白质微阵列等。

**2.1 凝胶电泳检测蛋白质磷酸化** 凝胶电泳是应用最早的一种蛋白质的磷酸化检测技术。富集的磷酸化蛋白或肽段,采用二维凝胶电泳进行分离,可检测丰度较高的磷酸化蛋白。根据蛋白质磷酸化形式不同造成磷酸化蛋白在凝胶中迁移速率的不同可用来鉴定蛋白质磷酸化修饰形式的不同。将切出磷酸化蛋白或肽段的斑点做进一步 MALDI-TOF-MS 鉴定,或者与 LC-MS/MS 联用,可直接鉴定磷酸化蛋白或肽段的种类,并准确定位蛋白质发生磷酸化的位点。

近几年开发出了一种独特的荧光染料 Pro-Q Diamond Phosphoprotein Stain (Pro-Q DPS),用来检测聚丙烯酰胺凝胶中的磷酸化蛋白质。这种染料能直接、特异、高效地结合磷酸化蛋白质中被磷酸化的氨基酸残基。并且这种染色方法还可以和其它蛋白质染料如考马斯亮蓝、银染等一起使用,也适合在染色之后进行质谱检测。该染料也能用来定量分析双向电泳凝胶中的蛋白质磷酸化。Agrawal 和 Thelen (2005)发展了一种改进的 Pro-Q DPS 染色方法,可提高检测单向和双向电泳凝胶中的蛋白质磷酸化分辨效果。与传统方法相比,该方法的实验操作简化,成本降低1/4,实验的可重复性提高。同时这种改进的方法可以提高信噪比,提高对低丰度磷酸化蛋白的识别。另外,Pro-Q DPS 与差异性的双向电泳联用,还可以充分发挥2种方法的优势,以实现蛋白质磷酸化的高度特异、灵敏、精确的定量(Stasyk等2005)。

Agrawal和Thelen (2006)采用高分辨率的双向电泳,并用特异性强的Pro-Q DPS染色,在不同发育时期的油菜籽粒中共发现了300多个发生磷酸化的蛋白质。用LC-MS/MS检测技术。鉴定出70个蛋白质在油菜籽发育的不同时期都发生了磷酸化,其功能包括参与信号传导、蛋白质合成、抗病、能量代谢、细胞生长分化等。这是第一次成功对植物中蛋白质磷酸化进行大规模高通量的检测。Pro-Q DPS染色法有望在高通量的蛋白质磷酸化研究中得到更广泛的应用。

**2.2 质谱技术鉴定蛋白质磷酸化** 质谱技术广泛应用于低丰度的蛋白质磷酸化的检测,可准确鉴定磷酸化蛋白质的种类,并预测发生磷酸化的位点和形式,其快速发展为蛋白质磷酸化的鉴定提供了强有力的工具。质谱是带电原子、分子或分子碎片按质荷比(或质量)的大小顺序排列的图谱。通过质谱分析,可以获得磷酸化蛋白或多肽的分子量、分子式、分子中同位素构成和分子结构等多方面的信息(Reinders和Sickmann 2005)。迄今,在蛋白质磷酸化研究中应用较多的是MALDI-TOF-MS和LC-MS/MS。近年来,通过一些关键技术环节的改进,质谱技术得到了较大提高。

**2.2.1 电喷雾质谱技术** 电喷雾质谱技术(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)是在毛细管的出口处施加高电压,所产生的高电场使从毛细管流出的液体雾化成细小的带电液滴,随着溶剂蒸发,液滴表面的电荷强度逐渐增大,最后液滴崩解为大量带一个或多个电荷的离子,致使分析物以单电荷或多电荷离子的形式进入气相。电喷雾离子化的特点是产生高电荷离子而不是碎片离子,致使质量电荷比( $m/z$ )降低到多数质量分析仪器都可以检测的范围,因而大大扩展了分子量的分析范围,离子的真实分子质量也可以根据质荷比及电荷数算出。

这技术在应用于磷酸化多肽分析及磷酸化位点鉴定时,主要采用前体离子扫描和中性丢失扫描进行检测。其中前体离子扫描是通过检测磷酸化肽段经碰撞诱导解离(collusion induced dissociation, CID)后产生的磷酸基团特异性片段来报告磷酸化肽段的存在,其优点是可以直接对磷酸化肽段进行序列和磷酸化位点分析,甚至不必预先知道蛋白质的序列。而中性丢失扫描则是用MS/MS检测经CID后发生中性丢失 $H_3PO_4$ 的肽段,其优点是以正

离子模式进行扫描分析,找到磷酸化肽段后可以直接通过诱导解离分析磷酸肽的序列及磷酸化位点。缺点是有时会产生假阳性信号而且目前还没有用来检测未知样品。

电喷雾质谱在磷酸化肽段的检测中,一般要求ESI离子源质谱与高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)系统作为分离工具配合进行,这样可以分析较为复杂的样品。质谱技术与毛细管高效液相色谱法技术结合,大幅度提高了技术的灵敏度和应用范围(Wind等2001)。同时,由于离子源与色谱技术的良好兼容性,多种现代色谱技术与质谱联用,大大推动了质谱本身的发展。可以说,以电喷雾技术为离子源的质谱是蛋白质组学研究的主力,同时也是蛋白质磷酸化研究的重要技术工具。

Whiteman等(2008)研究水稻细胞膜蛋白的磷酸化时,用凝胶电泳法共发现了94种膜蛋白,包括一级、二级信号传导分子、离子通道蛋白、质子泵蛋白家族、 $Ca^{2+}$ 泵蛋白家族等。而用LC-ESI-MS的检测方法他们不但找到已经预测的AMT1;1和PIP2;6这些蛋白质磷酸化位点,还在一些蛋白中找到了一些新的磷酸化位点,如质子泵蛋白。ESI-MS与HPLC联用可准确找到发生磷酸化的蛋白质,并预测磷酸化的位点,是目前应用最广泛的蛋白质磷酸化检测技术。

**2.2.2 基质辅助激光解吸附质谱技术** 基质辅助激光解吸附质谱技术(MALDI)是由德国的Karas和Hillenkamp (1988)发展起来的。其流程是将微量蛋白质与过量的小分子基体的混合液体点到样品靶上,经加热或风吹烘干形成共结晶,放入离子源内。当激光照射到靶点上时,基体吸收了激光的能量跃迁到激发态的蛋白质即电离和汽化,电离的结果通常是基体的质子转移到蛋白质上。然后由高电压将电离的蛋白质从离子源转送到质量分析器内,再经离子检测器和数据处理得到质谱图。MALDI所产生的质谱图多为单电荷离子,因而质谱图中的离子与多肽和蛋白质的质量有一一对应关系。MALDI产生的离子常用飞行时间(time-of-flight, TOF)检测器来检测。TOF质量分析器被认为是与MALDI的最佳搭配,因为二者都是脉冲工作方式,在质量分析过程中离子损失很少,灵敏度很高。所以, MALDI-TOF质谱已普遍用于蛋白质、多肽、

核酸和多糖等生物大分子的研究(Szpunar 2005)。

MALDI-TOF-MS的常用检测模式为正离子模式,而磷酸化肽段带负电荷,直接采用MALDI-TOF-MS检测磷酸化修饰位点比较困难。通常是采用MALDI-TOF-MS与碱性磷酸酶的去磷酸化作用相结合的方法来鉴定磷酸化肽段。通过检测所得到的肽谱与理论肽谱中是否发生79.983的相对分子质量迁移(即多肽上一个磷酸基团丢失)就能鉴定磷酸化肽段及磷酸化位点的数目。离子飞行时间的缩短和质荷比的降低导致MS谱图发生改变,还可以检测出磷酸化的位点。通常,丝氨酸和苏氨酸磷酸化肽段会丢失磷酸(分子质量数减少98),而酪氨酸磷酸化肽段会丢失磷酸基团(分子质量数减少80)。MALDI-TOF-MS优势是可对混合样品进行直接分析,还可直接与双向凝胶电泳联用,从而有利于蛋白质磷酸化的快速和大规模检测。其局限性是仅适合固体样品的分析,重复性差,不适用于定量分析。

Khan等(2005)采用双向电泳和MALDI-TOF-MS研究了水稻细胞中的蛋白质在激素、低温、高盐等胁迫条件下的磷酸化。将水稻组织细胞裂解后,从中提取蛋白质。再把总蛋白酶解成肽段后进行富集,之后用双向电泳初步分离检测磷酸化蛋白质。最后用MALDI-TOF-MS检测验证发生磷酸化的蛋白质种类。结果表明:不同胁迫条件下,发生磷酸化的蛋白质种类差异很大;相同胁迫条件下,不同组织中可能有相同的蛋白质如胞质中苹果酸脱氢酶发生磷酸化;水稻的级联反应系统、糖酵解途径、Ca<sup>2+</sup>介导的信号途径在应对激素作用和胁迫条件时,蛋白质的磷酸化是重要的目标。这一实验是采用双向电泳与MALDI-TOF-MS联用在植物蛋白质磷酸化检测中一个成功应用的实例。

**2.3 蛋白质微阵列检测蛋白质磷酸化** 蛋白质微阵列技术是沟通基因组学和蛋白质组学的工具和桥梁,具有并行、快速、灵敏、高通量和自动化分析等特点(Loyet等2005)。因为蛋白质微阵列的体积小,样品用量很少,对分析和检测频率较低的蛋白质磷酸化很有帮助(Kreutzberger 2006)。蛋白质微阵列技术的原理是通过微加工、微电子技术等对载玻片表面进行特殊处理,将大量的蛋白质或配基按照预先设计的序列高密度地固定在载玻片上,形成探针蛋白质点阵。根据检测目的不同,选择不

同的蛋白激酶作为探针。实验时,将带有特殊标记(如荧光染料标记)的激酶作为探针与该微阵列进行孵育反应,探针可以捕获样品中的待测蛋白质并与之结合,然后用激光共聚焦显微镜获取数组图像或者采用质谱技术将靶蛋白离子化,最后用专门的计算机软件对结果进行准确、快速的分析,从而实现蛋白质分子的测量与筛选。

Kersten等(2003)制作的第一个拟南芥的蛋白质微阵列是最早将该技术应用于植物领域的。蛋白质微阵列最初应用于磷酸蛋白质组学时,其效果并不理想,只能低通量地检测蛋白质的磷酸化(MacBeath和Schreiber 2000)。现在,采用蛋白质微阵列已经可以高通量地检测拟南芥的磷酸激酶及其作用机制。

Feilner等(2005)采用蛋白质微阵列技术分析了促分裂素原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)在植物中进行信号传导的机制。他们将取自拟南芥分生组织的cDNA文库表达成蛋白,取其中的1690个非重复的蛋白质制作成为蛋白质微阵列。将该阵列和MAPK家族中的MPK3和MPK6以及放射性标记的ATP一起孵化,结果共找到48种蛋白质能与MPK3相互作用,39种能与MPK6相互作用,其中有26种蛋白质是相同的。他们进一步研究发现,这些蛋白质包括信号传导因子、调节因子、剪接因子、受体和组蛋白等,另外还有一些是不参与信号传导过程的蛋白质。该实验向人们提供了一种最快捷的体外寻找能和特异性蛋白激酶作用的蛋白质底物的方法。

De la Fuente van Bentem等(2008)采用多肽阵列技术结合分析特异性的蛋白质磷酸化及其对应的激酶时,先取培养5d的拟南芥根系细胞用4 mmol·L<sup>-1</sup>的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理5 min,提取膜内蛋白(包括核蛋白和细胞质蛋白),再以酶切成肽段后,制成肽段阵列。与富含丝氨酸、精氨酸的蛋白质特异性激酶4 (serine/arginine-rich protein-specific kinase 4, SRPK4)以及MPK3一起孵化后,发现SRPK4可以将一种mRNA的剪接因子SLC30的肽段磷酸化。在不作H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理的2种激酶都可以将SLC30的肽段磷酸化。为了验证SRPK4是否在体内对SLC30进行磷酸化,他们将含SRPK4基因的质粒导入拟南芥根细胞系中培养,再用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理细胞,仍然可以得到相同的结果。这说明H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>能诱导MPK3对SLC30的

磷酸化, 而 SRPK4 则不受  $H_2O_2$  影响。这个实验为实时动态研究激酶对底物蛋白质的磷酸化提供了新的可行方法。

### 3 蛋白质磷酸化的生物信息学分析

蛋白质磷酸化研究离不开生物信息学的分析方法, 甚至可以说没有生物信息学的支持就无法开展蛋白质磷酸化研究。质谱鉴定得到的蛋白质信息都需要利用生物信息学的手段进一步查找相关的信息, 如蛋白质的种类、磷酸化位点、所属物种和对应的激酶等。拟南芥是一种模式生物, 也是植物磷酸蛋白质组学研究得最多的材料。最近, 有人建立了一个拟南芥的磷酸化位点测定和预测的数据库网站(<http://phosphat.mpimp-golm.mpg.de/>), 它所包含的拟南芥磷酸化蛋白质数据是所有关于植物磷酸化蛋白质组学网站中最多最全的(Heazlewood等 2008)。另外, 在 <http://promex.mpimp-golm.mpg.de/home.html> 上还可以看到很多拟南芥磷酸化蛋白质的原始质谱分析图(Hummel 等 2007), 在 <http://plantsp.genomics.purdue.edu> 上已找到 1 000 多种拟南芥蛋白激酶和磷酸酶的 DNA 序列(Gribskov 等 2001)。随着蛋白质磷酸化研究的发展, 这样的数据库(网站)会越来越多, 植物蛋白质磷酸化的分析也会更容易。

尽管植物蛋白质磷酸化研究的技术已经取得了长足的进步, 但是通过各种方法富集检测得到的蛋白质磷酸化仍然都有各自的倾向性(Bodenmiller 等 2007)。网站 <http://phosphat.mpimp-golm.mpg.de/> 曾提供了预测拟南芥蛋白质磷酸化的方法。这是一种无倾向性的、可信度高的方法。例如, 它根据拟南芥基因组信息预测在拟南芥中有 31 921 个蛋白质磷酸化位点是丝氨酸。其中有 17 035 个蛋白质已经实验证明是高度可信的(Heazlewood 等 2008)。但是这个预测方法的局限性是其只能用于拟南芥, 不能用于其他植物, 还有待进一步改进。

磷酸化和去磷酸化普遍存在于细胞中, 是最重要的信号传导方式, 磷酸化激酶和其催化的磷酸化蛋白质形成了很多网络。在植物中, 已经有一些磷酸化网络被研究得比较透彻, 例如拟南芥的 MAPK 信号通路。只有构建完整的磷酸化网络, 才能利用计算机的预测磷酸化位点和其所对应的激酶。根据激酶与底物蛋白质作用的结构域的不同, 可以将激酶与其作用的底物蛋白质种类对应起来。这样,

单纯依靠序列信息就可以推断出磷酸化位点和催化它的蛋白激酶(Blom 等 2004)。如果在通过结构域配对的原则基础上, 再把其它一些如蛋白质相互作用、细胞内的共定位和共表达等信息考虑进去, 可以增加预测结果的准确性(Linding 等 2007)。在网站 <http://networkin.info/> 上已经可以找到很多磷酸化网络的信息, 且这些信息还在不断完善。相信随着这些信息的增加, 在不久的将来, 人们可以准确地利用计算机预测蛋白质磷酸化的位点和形式。

### 4 结语

最近几年, 植物蛋白质磷酸化研究技术有了快速的发展, 已经从简单的双向电泳和质谱检测, 发展到现在的多种高效磷酸化蛋白质富集技术联用, 如 Pro-DPS 染色的高分辨率双向电泳、高灵敏度质谱、蛋白质微阵列、生物信息学分析等等。在这些新技术的支持下, 植物蛋白质磷酸化的研究内容从小规模检测鉴定磷酸化蛋白质已发展成为高通量大规模测定磷酸化蛋白质和磷酸化位点, 构建蛋白质磷酸化图谱, 利用生物信息学预测磷酸化位点以及运用蛋白质微阵列寻找特异性蛋白激酶和信号传导途径等诸多方面。

但蛋白质磷酸化的研究也存在着先天性的困难, 如细胞中磷酸化蛋白质的拷贝数相当低和蛋白质磷酸化的位点有可变性。随着技术的进步, 这些困难会逐渐得到克服, 事实上, 现在已经取得了一系列显著了成果。越来越多的植物磷酸化蛋白质和其磷酸化的位点被鉴定出来, 蛋白质磷酸化的过程也正在被揭示。

植物蛋白质磷酸化研究的方法还有待改进和发展。如双向电泳和质谱技术的分辨率尚需进一步提高, 也只有这样, 丰度更低的蛋白质磷酸化才能得到和鉴定。生物信息学的发展可以帮助我们构建出更加完善的磷酸化蛋白质数据库和磷酸化蛋白质功能网络。采用生物信息学手段将蛋白质磷酸化修饰与其他类型的翻译后修饰联系起来研究, 可以更全面掌握蛋白质的成熟过程, 了解细胞对外界环境变化的响应。此外, 应用于蛋白质磷酸化研究的技术还有反向蛋白微阵列, 这一问题是如何获得高特异性的抗磷酸化蛋白质抗体, 尤其是大量获得抗丝氨酸磷酸化和苏氨酸磷酸化的抗体。

总之, 随着植物蛋白质磷酸化研究技术的进步, 人们将可以逐步了解到越来越多的信号通路的信

息, 掌握蛋白质的瞬时磷酸化状态, 并构建出蛋白质磷酸化的网络。最终, 每一个磷酸化位点在生物学功能中的作用以及许多植物的代谢过程都会得到揭示, 并加以利用。

### 参考文献

- Agrawal GK, Thelen JJ (2005). Development of a simplified, economical polyacrylamide gel staining protocol for phosphoproteins. *Proteomics*, 5: 4684~4688
- Agrawal GK, Thelen JJ (2006). Large-scale identification and quantitative profiling of phosphoproteins expressed during seed filling in oilseed rape. *Mol Cell Proteomics*, 5: 2044~2059
- Ballif BA, Villen J, Beausoleil SA, Schwartz D, Gygi SP (2004). Phosphoproteomic analysis of the developing mouse brain. *Mol Cell Proteomics*, 2: 1234~1243
- Barnouin KN, Hart SR, Thompson AJ, Okuyama M, Waterfield M, Cramer R (2005). Enhanced phosphopeptide isolation by Fe (III)-IMAC using 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol. *Proteomics*, 5: 4376~4388
- Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, Elias JE, Villen J, Li JX, Cohn MA, Cantley LC, Gygi SP (2004). Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 12130~12135
- Benschop JJ, Mohammed S, O'Flaherty M, Heck AJ, Slijper M, Menke FL (2007). Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Mol Cell Proteomics*, 6: 1198~1214
- Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S (2004). Prediction of posttranslational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4: 1633~1649
- Bodenmiller B, Mueller LN, Mueller M, Domon B, Aebersold R (2007). Reproducible isolation of distinct, overlapping segments of the phosphoproteome. *Nat Methods*, 4: 231~237
- De la Fuente van Bentem S, Anrather D, Dohnal I, Roitinger E, Csaszar E, Joore J, Buijnink J, Carreri A, Forzani C, Lorkovic ZJ et al (2008). Site-specific phosphorylation profiling of *Arabidopsis* proteins by mass spectrometry and peptide chip analysis. *J Proteome Res*, 7: 2458~2470
- De la Fuente van Bentem S, Hirt H (2007). Using phosphoproteomics to reveal signalling dynamics in plants. *Trends Plant Sci*, 12: 404~411
- Feilner T, Hultschig C, Lee J, Meyer S, Immink RG, Koenig A, Possling A, Seitz H, Beveridge A, Scheel D et al (2005). High throughput identification of potential *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases substrates. *Mol Cell Proteomics*, 4: 1558~1568
- Feuerstein I, Morandell S, Stecher G, Huck CW, Stasyk T, Huang HL, Teis D, Huber LA, Bonn GK (2005). Phosphoproteomic analysis using immobilized metal ion affinity chromatography on the basis of cellulose powder. *Proteomics*, 5: 46~54
- Gribskov M, Fana F, Harper J, Hope DA, Harmon AC, Smith DW, Tax FE, Zhang G (2001). PlantsP: a functional genomics database for plant phosphorylation. *Nucl Acids Res*, 29: 111~113
- Heazlewood JL, Durek P, Hummel J, Selbig J, Weckwerth W, Walther D, Schulze WX (2008). PhosphAt: a database of phosphorylation sites in *Arabidopsis thaliana* and a plant-specific phosphorylation site predictor. *Nucl Acids Res*, 36: D1015~D1021
- Hummel J, Niemann M, Wienkoop S, Schulze W, Steinhauser D, Selbig J, Walther D, Weckwerth W (2007). ProMEX: a mass spectral reference database for proteins and protein phosphorylation sites. *BMC Bioinform*, 8: 216
- Jensen SS, Larsen MR (2007). Evaluation of the impact of some experimental procedures on different phosphopeptide enrichment techniques. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 21: 3635~3645
- Karas M, Hillenkamp F (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*, 60: 2299~2301
- Kersten B, Feilner T, Kramer A, Wehrmeyer S, Possling A, Witt I, Zanor MI, Stracke R, Lueking A, Kreutzberger J et al (2003). Generation of *Arabidopsis* protein chips for antibody and serum screening. *Plant Mol Biol*, 52: 999~1010
- Khan M, Takasak H, Komatsu S (2005). Comprehensive phosphoproteome analysis in rice and identification of phosphoproteins responsive to different hormones/stresses. *J Proteome Res*, 4: 1592~1599
- Kokubu M, Ishihama Y, Sato T, Nagasu T, Oda Y (2005). Specificity of immobilized metal affinity-based IMAC/C18 tip enrichment of phosphopeptides for protein phosphorylation analysis. *Anal Chem*, 77: 5144~5154
- Kreutzberger J (2006). Protein microarrays: a chance to study microorganisms? *Appl Microbiol Biotechnol*, 70: 383~390
- Krsten B, Agrawal GK, Iwahashi H, Rakwal R (2006). Plant phosphoproteomics: a long road ahead. *Proteomics*, 6: 5517~5528
- Larsen MR, Thingholm TE, Jensen ON, Roepstorff P, Jorgensen TJD (2005). Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol Cell Proteomics*, 4: 873~886
- Laugesen S, Bergoin A, Rossignol M (2004). Deciphering the plant phosphoproteome: tools and strategies for a challenging task. *Plant Physiol Biochem*, 42: 929~936
- Linding R, Jensen LJ, Ostheimer GJ, van Vugt MA, Jorgensen C, Miron IM, Diella F, Colwill K, Taylor L, Elder K et al (2007). Systematic discovery of *in vivo* phosphorylation networks. *Cell*, 129: 1415~1426
- Loyet KM, Stults JT, Arnott D (2005). Mass spectrometric contributions to the practice of phosphorylation site mapping through 2003: a literature review. *Mol Cell Proteomics*, 4: 235~245
- MacBeath G, Schreiber SL (2000). Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*, 289: 1760~1763
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002). The protein kinase complement of the human

- genome. *Science*, 298: 1912~1934
- Michel H, Hunt DF, Shabanowitz J (1988). Tandem mass spectrometry reveals that three photosystem II proteins of spinach chloroplasts contain *N*-acetyl-*O*-phosphothreonine at their NH<sub>2</sub> termini. *J Biol Chem*, 263: 1123~1130
- Molina H, Horn DM, Tang N, Mathivanan S, Pandey A (2007). Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 2199~2204
- Nuhse TS, Stensballe A, Jensen ON, Peck SC (2003). Large-scale analysis of *in vivo* phosphorylated membrane proteins by immobilized metal ion affinity chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 2: 1234~1243
- Nuhse TS, Stensballe A, Jensen ON, Peck SC (2004). Phosphoproteomics of the *Arabidopsis* plasma membrane and a new phosphorylation site database. *Plant Cell*, 16: 2394~1405
- Pinkse MWH, Uitto PM, Hilhorst MJ, Ooms B, Heck AJR (2004). Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns. *Anal Chem*, 76: 3935~3943
- Prak S, Hem S, Boudet J, Viennois G, Sommerer N, Rossignol M, Maurel C, Santoni V (2008). Multiple phosphorylations in the C-terminal tail of plant plasma membrane aquaporins. *Mol Cell Proteomics*, 7: 1019~1030
- Reinders J, Sickmann A (2005). State-of-the-art in phosphoproteomics. *Proteomics*, 5: 4052~4061
- Stasyk T, Morandell S, Bakry R, Feuerstein I, Huck CW, Stecher G, Bonn GK, Huber LA (2005). Quantitative detection of phosphoproteins by combination of two-dimensional difference gel electrophoresis and phosphospecific fluorescent staining. *Electrophoresis*, 26: 2850~2854
- Stensballe A, Andersen S, Jensen ON (2001). Characterization of phosphoproteins from electrophoretic gels by nanoscale Fe (III) affinity chromatography with off-line mass spectrometry analysis. *Proteomics*, 1: 207~222
- Sugiyama N, Nakagami H, Mochida K, Daudi A, Tomita M, Shirasu K, Ishihama Y (2008). Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in *Arabidopsis*. *Mol Sys Biol*, 4: 1~7
- Szpunar J (2005). Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. *Analyst*, 130: 442~65
- Temporini C, Calleri E, Massolini G, Caccialanza G (2008). Integrated analytical strategies for the study of phosphorylation and glycosylation in proteins. *Mass Spectrom Rev*, 27: 207~236
- Trinidad JC, Specht CG, Thalhammer A, Schoepfer R, Burlingame AL (2006). Comprehensive identification of phosphorylation sites in postsynaptic density preparations. *Mol Cell Proteomics*, 5: 914~922
- Whiteman SA, Nuhse S, Ashford DA, Sanders D, Maathuis FJM (2008). A proteomic and phosphoproteomic analysis of *Oryza sativa* plasma membrane and vacuolar membrane. *Plant J*, 56: 146~156
- Wind M, Edler M, Jakubowski N, Linscheid M, Wesch H, Lehmann WD (2001). Analysis of protein phosphorylation by capillary liquid chromatography coupled to element mass spectrometry with 31p detection and to electrospray mass spectrometry. *Anal Chem*, 73: 29~35
- Wolschin F, Weckwerth W (2005). Combining metal oxide affinity chromatography (MOAC) and selective mass spectrometry for robust identification of *in vivo* protein phosphorylation sites. *Plant Methods*, 1: 9~14
- Zhang X, Ye JY, Jensen ON, Roepstorff P (2007). Highly efficient phosphopeptide enrichment by calcium phosphate precipitation combined with subsequent IMAC enrichment. *Mol Cell Proteomics*, 6: 2032~2042
- Zolnierowicz S, Bollen M (2000). Protein phosphorylation and proteinphosphatases. *EMBO J*, 19: 483~488