

体外化学修饰-串联质谱技术在蛋白质磷酸化 定性定量分析中的应用

李 伟

(上海交通大学系统生物医学研究院, 上海 200240)

Application of Chemical Modification-Tandem Mass Spectrometry in Qualitative and Quantitative Protein Phosphorylation Analysis

LI Wei

(Institutes for Systems Biomedicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Protein phosphorylation is one of the most common posttranslational modifications in eukaryotes. The qualification and quantification of phosphorylation sites is very important in elucidating the mechanisms of functional regulation of phosphoproteins. Tandem mass spectrometry becomes the major tool for phosphoproteomic studies. The loss of phosphate moiety from phosphopeptides during even low energy induced dissociation makes identification of phosphorylation sites difficult in most cases. Chemical modification is an effective method in solving this problem. The introduction of stable isotope coded groups onto phosphorylation sites or other sites makes the comparative quantification of phosphopeptides possible. In this review, the application of chemical modification-tandem mass spectrometry in characterization and quantification of phosphopeptides is summarized.

Key words: posttranslational modification; phosphoproteomics; collision induced dissociation (CID); in vitro chemical modification; tandem mass spectrometry

中图分类号: O657.63

文献标识码: A

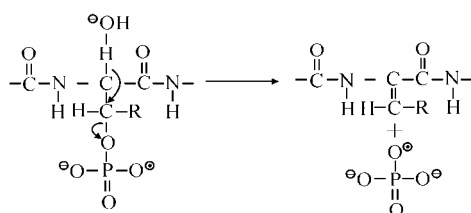
文章编号: 1004-2997 (2007) 增刊-53-05

蛋白质磷酸化是一种十分重要的翻译后修饰。据估计, 细胞内 1/3 的蛋白质在其生命循环的某一时刻会发生磷酸化。由于蛋白质的可逆性磷酸化作为一种开关调节着蛋白质的特定功能, 因此, 确定磷酸化位点及其磷酸化的程度是完全必要的。蛋白质的磷酸化可发生在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸上, 其中前两种氨基酸的磷酸化约占 99% 左右。目前, 确定磷酸化位点在技术上仍有相当的难度。传统的 Edman 降解和二维薄层层析技术虽然成熟有效, 但也存在许多缺陷。除了要使用放射性同位素之外, 这些方法也十分费时费力, 尤其是不能适应高通量磷酸化蛋白组学研究的需要。近年来, 串联质谱已成为研究者优先采用的磷酸化位点分析方法。目前串联质谱中广泛使用碰撞诱导的解离 (collision induced dissociation, CID), 而丝氨酸和苏氨酸上的磷酸化基团易在 CID 过程中发生中性丢失, 这使磷酸化位点的确定变得复杂化, 同一多肽上含有多个磷酸化位点时这一问题更为突出。 β -消除和亲核试剂加成反应 (β -elimination-Michael addition) 可以将磷酸化基团替换成 CID 过程中不发生丢失的稳定基团, 有利于准确确定磷酸化的丝氨酸和苏氨酸位点。研究者们还通过在磷酸化位点或磷酸化位点外引入同位素编码的基团建立了磷酸化多肽的相对定量方法。本工作将介绍用体外化学修饰-串联质谱技术对磷酸化位点进行定性和相对定量分析的方法。

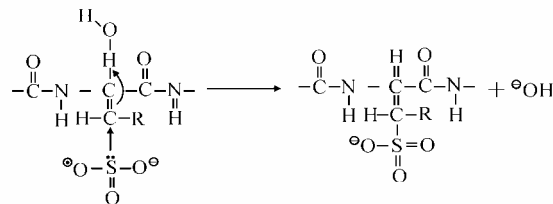
1 磷酸化基团的 β -消除和亲核试剂加成反应原理

β -消除又称 1,2-消除,为处于相邻原子上的两个基团失去后在这两个原子之间生成 π 键的反应。如图 1 所示,在氢氧根(OH^-)存在下,连接在 α 碳原子上的磷酸化基团作为离去基团与 β 碳原子上断裂下来的质子同时以 H_3PO_4 的形式离去, α 碳原子与 β 碳原子之间形成 π 键。由于 π 键在硷性条件下不稳定,亲核试剂(这里以亚硫酸根 SO_3^{2-} 为例)向 β 碳原子发动亲核攻击, π 键电子云向 α 碳原子转移, SO_3^{2-} 在 β 碳原子上发生取代反应的同时, α 碳原子与质子之间形成共价键。目前,磷酸化多肽的 β -消除主要用 NaOH 或 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 进行,亲核试剂主要可分为含自由氨基和自由巯基的试剂。已经使用的含巯基亲核试剂包括:二硫苏糖醇、巯基乙醇、巯基乙烷、二巯基乙烷、2-二甲基胺巯基乙烷、2-苯基巯基乙烷;含氨基亲核试剂包括:乙烯乙二胺、4-氨基甲基哌啶、*N*-2 氨基乙基哌啶、咪唑、2-巯基-1 甲基咪唑和 *p*-溴代乙基苯胺等^[1]。

(1) β -消除



(2) 亲核加成



Thr: $\text{R}=\text{CH}_3$; Ser: $\text{R}=\text{H}$

图 1 β -消除和亲核试剂加成反应原理^[2]

Fig. 1 Principle of β -elimination-nucleophile addition

2 体外化学修饰-串联质谱技术分析蛋白质磷酸化位点的方法

利用质谱进行磷酸化分析通常采用两步法,即先将磷酸化蛋白用胰蛋白酶或其他特异性蛋白酶酶解,然后用质谱分析其中那些多肽是磷酸化的,最后用串联质谱方法确定磷酸化位点。尽管上述方法相对较为简单,但会错过许多磷酸化多肽。这是由于:(1)磷酸化多肽的天然丰度较低;(2)有些多肽不易回收或不易离子化;(3)磷酸化基团的酸性较强,离子化效率较低;(4)如果磷酸化多肽不能与非磷酸化多肽有效分离,其离子化将受到竞争抑制。要分析磷酸化多肽和位点,需要对磷酸化多肽进行分离和富集。目前,较为常用的方法包括:(1)磷酸化抗体免疫沉淀;(2)固定化金属亲和色谱(IMAC, immobilized metal affinity chromatography)。由于磷酸化酪氨酸抗体的特异性较好,而磷酸化丝氨酸和苏氨酸的抗体选择性较差,目前含磷酸化酪氨酸的多肽较多用抗体亲和富集。IMAC 利用 $\text{Fe}(\text{III})$ 或 $\text{Ga}(\text{III})$ 与多肽上带负电荷的区域结合原理富集多肽。

磷酸化多肽在 CID 过程中呈现不同的断裂特征。磷酸化酪氨酸通常会产生质荷比(m/z)为 216.043 的中间离子,使用分辨率足够高的质谱仪器时,磷酸化酪氨酸容易确定。丝氨酸和苏氨酸上的磷酸化基团通常在 CID 过程中发生中性丢失,这一现象经常给多肽上磷酸化位点的确定带来困难。因此,研究者们进行了体外化学修饰置换丝氨酸和苏氨酸上的磷酸基团的研究,建立了适合串联质谱技术分析磷酸化丝氨酸和苏氨酸的方法。

β -消除和亲核试剂加成反应最早是应用在通过 *N*-端测序确定磷酸化丝氨酸位点上。Jaffe 等首次

将磷酸化丝氨酸和磷酸化苏氨酸残基转化成 *S*-乙基半胱氨酸和 β -甲基-*S*-乙基半胱氨酸, 然后用串联质谱分析人高分子量神经纤维蛋白上的磷酸化位点, 其中 26 个磷酸化位点与以往发现的位点相一致, 另外发现了两个新的磷酸化位点。修饰后的多肽不仅离子化效率明显提高, 而且 CID 后片段离子谱图的质量也有所提高^[3]。Li 等则利用 SO_3^{2-} 作为亲核试剂提高磷酸化苏氨酸残基的转化效率, 证明转化后通过 ESI-MS/MS 容易确定磷酸化位点^[3]。Molloy 等比较了用 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 消除和含 2~8 个碳的不同烷基硫醇加成的效率, 发现碳链较短的烷基硫醇加成反应完成较快并且完全, 但碳链较长的烷基硫醇加成产物在 MALDI 分析时离子化效率较高。他们选择乙硫醇和丙硫醇的加成产物在用 MALDI-TOF 分析时 m/z 相差 14 的特征识别磷酸化多肽, 成功分析了人 HSP22 蛋白的 PKC 体外磷酸化位点^[4]。Rusnak 等利用 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 对含有四个相邻磷酸化丝氨酸的牛 β -酪蛋白酶解大片段进行消除, 进而用氨基乙硫醇加成, 得到接近 90% 的转化效率, 证明该方法可用于含多个相邻磷酸化丝氨酸残基多肽的体外修饰^[5]。Klemm 等人比较了用 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 消除磷酸化基团后, 10 种不同亲核试剂的加成效率, 发现加成效率与亲核试剂的种类和磷酸化多肽的序列有关, 其中 2-苯基乙硫醇、*p*-溴代苯基乙胺和乙二胺的加成产物可明显提高 MALDI 上的离子化效率。用胶内衍生和 MALDI-TOF-TOF 的方法, 成功分析了人 Stat1 的磷酸化位点^[1]。Arrigoni 等用巯基乙硫醇吡啶加成, MALDI-MS/MS 和 ESI-MS/MS 成功分析了人 Akt1 和 PDE3 的磷酸化位点^[6]。Ahn 等则采取在 IMAC 柱上进行部分消除和加成的方法, 在进行质谱分析时, 通过每个磷酸化位点与巯基乙醇加成后的衍生肽之间的 m/z 相差 20 来识别磷酸化多肽, 然后用 MALDI-TOF-TOF 分析磷酸化位点^[7]。各项研究表明, 取代基团在 CID 时不易丢失, 有利于磷酸化多肽的识别和位点确定。

β -消除和亲核试剂加成的原理还被应用于从多肽混合物中富集磷酸化多肽上。Oda 等首先将丝氨酸和苏氨酸上的磷酸基团替换成含两个巯基的乙二硫醇, 之后通过马来酰化将生物素与衍生肽交联, 进而通过耦联有抗生物素蛋白的亲合柱富集磷酸化多肽^[8]。Adamczyk 让乙二硫醇的自由巯基和含生物素基团部分一端的自由巯基形成二硫键, 最后通过 DTT 还原将富集的多肽与生物素部分分离^[9]。上述方法仅能分析磷酸化丝氨酸和苏氨酸位点, Zhou 等报道了适用于包括磷酸化酪氨酸在内的各种蛋白磷酸化的方法, 用固定化的碘乙酰基团捕获磷脂酰胺修饰后的磷酸化多肽^[10]。由于生物素和抗生物素结合蛋白之间的作用非常强, 结合后多肽回收效率较低。Thaler 等用丙二硫醇加成后, 通过与二巯基吡啶树脂上的游离巯基共价交联来富集磷酸化多肽, 最后用 DTT 进行洗脱^[11]。McLachlin 用类似方法富集钙调素 II 依赖性蛋白激酶体外磷酸化的牛 synapsin 水解产物中的磷酸化多肽, 通过串联质谱分析确定了两个磷酸化位点^[12]。

上述富集策略如果使用含不同稳定性同位素的亲核试剂加成, 可进行磷酸化多肽的相对定量分析, 其原理示于图 2。Glinski 等用乙硫醇和含有 5 个氘原子的乙硫醇分别标记 α -酪蛋白, 之后比较了不同量磷酸化蛋白水解后多肽的丰度, 证明该方法的标准定量误差为 11%, 动态范围可覆盖两个数量级, 磷酸化多肽含量在 0%~100% 的范围内定量呈线性^[13]。Amoresano 用 DTT 和含 6 个氘原子的 DTT 标记磷酸化多肽后进行定量比较^[14]。Goshe 等通过在标记反应中引入不同的同位素, 使磷酸化多肽富集后可进行相对定量分析。他们将引入生物素富集多肽的方法称为磷酸化蛋白稳定性同位素编码的亲合标签 (phosphoprotein isotope-coded affinity tag, PhIAT) 技术; 将乙二硫醇加成后直接共价交联到固相介质上的方法称为磷酸化蛋白稳定性同位素编码的固相标签 (phosphoprotein isotope-coded solid-phase tag, PhIST) 技术^[15]。Chowdhury 等在磷酸基团取代反应中分别引入了乙二硫醇和丙二硫醇, 质谱分析时根据质荷比的差异可比较两者的相对丰度^[16]。由此可见, 这些相对定量方法可用于蛋白磷酸化的动态研究。

前述方法主要在磷酸化位点上进行修饰, 基于磷酸化位点外自由氨基反应的稳定性同位素标记是研究者们在进行磷酸化多肽相对定量的另一种策略。Sachon 等^[17]把 IMAC 富集和 iTRAQ 标记结合在一起进行磷酸化多肽的定量。Munton 等^[18]则用相同方法比较了脑细胞不同亚细胞组分活动依赖性蛋白磷酸化的动态改变。这种分析方法可在进行多个样品平行比较时采用。

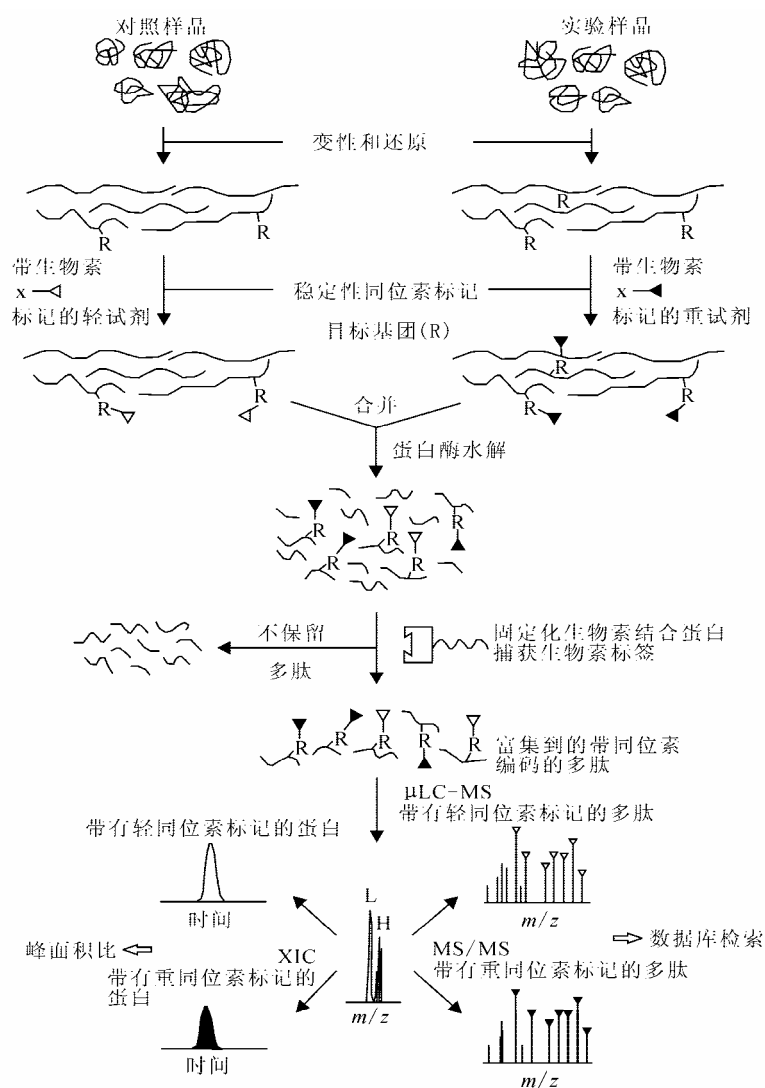


图2 磷酸化蛋白稳定性同位素编码的亲亲和标签技术原理^[15]

Fig. 2 Principle of stable isotope coded affinity tag for relative quantification of phosphoproteins

XIC: 提取的离子强度谱图; μ LC-MS: 微升级液相色谱质谱联用; MS/MS: 串联质谱

m/z : 质量电荷比

3 小结

利用体外化学修饰进行磷酸化多肽的富集、分析以至相对定量的方法学研究进展很快, 为串联质谱技术进行磷酸化蛋白的定性和定量分析开辟了新的途径。鉴于目前蛋白磷酸化的定性和定量分析还没有一种通用性很好的方法, 可把磷酸化多肽直接分析和体外化学修饰技术有机结合起来, 取长补短, 互为验证。总之, 体外化学修饰-串联质谱技术在进行磷酸化位点确定和定量分析上都有一定的应用价值。

参考文献:

- [1] KLEMM C, SCHRODER S, GLUCKMANN M, et al. Evaluation of the titanium dioxide approach for MS analysis of phosphopeptides[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004, 18: 2 697-2 705.

- [2] LI W, BOYKINS R A, BACKLUND P S, et al. Identification of phosphoserine and phosphothreonine as cysteic acid and beta-methylcysteic acid residues in peptides by tandem mass spectrometric sequencing[J]. *Anal Chem*, 2002, 74(22): 5 701-5 710.
- [3] JAFFE H, VEERANNA, PANT H C, et al. Characterization of serine and threonine phosphorylation sites in beta-elimination/ethanethiol addition-modified proteins by electrospray tandem mass spectrometry and database searching[J]. *Biochemistry*, 1998, 37: 16 211-16 224.
- [4] MOLLOY M P, ANDREWS P C. Phosphopeptide derivatization signatures to identify serine and threonine phosphorylated peptides by mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2001, 73: 5 387-5 394.
- [5] RUSNACK F, ZHOU J, HATHAWAY G M, et al. Reaction of phosphorylated and O-glycosylated peptides by chemically targeted identification at ambient temperature[J]. *J Biomol Tech*, 2004, 15: 296-304.
- [6] ARRIGONI G, RESJO S, LEVANDER F, et al. Chemical derivatization of phosphoserine and phosphothreonine containing peptides to increase sensitivity for MALDI-based analysis and for selectivity of MS/MS analysis[J]. *Proteomics*, 2006, 6: 757-766.
- [7] AHN Y H, PARK E J, CHO K, et al. Dynamic identification of phosphopeptides using immobilized metal ion affinity chromatography enrichment, subsequent partial beta-elimination/chemical tagging and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004, 18: 2 495-2 501.
- [8] ODA Y, NAGASU T, CHAIT B T, et al. Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome[J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 379-382.
- [9] ADAMCZYK M, GABLER J C, WU J, et al. Selective analysis of phosphopeptides within a protein mixture by chemical modification, reversible biotinylation and mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2001, 15(16): 1 481-1 488.
- [10] ZHOU H, WATTS J D, AEBERSOLD R, et al. A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation[J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 375-378.
- [11] THALER F, VALSASINA B, BALDI R, et al. A new approach to phosphoserine and phosphothreonine analysis in peptides and proteins: chemical modification, enrichment via solid-phase reversible binding, and analysis by mass spectrometry[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2003, 376: 366-373.
- [12] MCLACHLIN D T, CHAIT B T. Improved beta-elimination-based affinity purification strategy for enrichment of phosphopeptides[J]. *Anal Chem*, 2003, 75: 6 826-6 836.
- [13] GLINSKI M, ROMEIS T, WITTE C, et al. Stable isotope labeling of phosphopeptides for multiparallel kinase target analysis and identification of phosphorylation sites[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17: 1 579-1 584.
- [14] AMORESANO A, MARINO G, CIRULLI C, et al. Mapping phosphorylation sites: a new strategy based on the use of isotopically labelled DTT and mass spectrometry[J]. *Eur J Mass Spectrom*, 2004, 10: 401-412.
- [15] GOSHE M B, SMITH R D. Stable isotope-coded proteomic mass spectrometry[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14: 101-109.
- [16] CHOWDHURY S M, MUNSKE G R, SIEMS W F, et al. A new maleimide-bound acid-cleavable solid-support reagent for profiling phosphorylation[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19: 899-909.
- [17] Sachon E, MOHAMMED S, BACHE N, et al. Phosphopeptide quantitation using amine-reactive isobaric tagging reagents and tandem mass spectrometry: application to proteins isolated by gel electrophoresis[J]. *Rapid Commun Spectrom*, 2006, 20(7): 1 127-1 134.
- [18] MUNTUN R P, TWEEDIE-CULLEN R, LIVINGSTONE-ZATCHEJ M, et al. Qualitative and quantitative analyses of protein phosphorylation in naive and stimulated mouse synaptosomal preparations[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6(2): 283-293.