

# 蛋白质磷酸化修饰研究进展

梁前进<sup>1,2</sup>,王鹏程<sup>1,3</sup>,白燕荣<sup>1</sup>

1. 北京师范大学生命科学院基因工程药物及生物技术北京市重点实验室,北京 100875
2. 北京师范大学生命科学院细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室,北京 100875
3. 北京师范大学生命科学院抗性基因与分子发育北京市重点实验室,北京 100875

**摘要** 蛋白质磷酸化是由蛋白质激酶催化的磷酸基转移反应,是最常见、最重要的蛋白质翻译后修饰方式之一,是一种普遍的生命活动调节方式,在细胞信号转导过程中起重要作用。本文介绍了蛋白质磷酸化修饰的主要类型与功能、磷酸化蛋白的鉴定及磷酸化位点的预测等方面研究进展,并着重介绍了一些灵敏度高、特异性强的以同位素标记、免疫印迹-化学发光法等作为核心的磷酸化蛋白质分析方案。Western blot 方法被证明是鉴别磷蛋白的灵敏、特异方法,而 NanoPro100/1000 超微量蛋白分析系统等又在此基础上加以改善。蛋白磷酸化分析工具和软件的发展也很迅猛。

**关键词** 蛋白修饰;磷酸化;磷蛋白

**中图分类号** Q5-33

**文献标识码** A

**doi** 10.3981/j.issn.1000-7857.2012.31.011

## Summarization on the Progress in Protein Phosphorylation

LIANG Qianjin<sup>1,2</sup>, WANG Pengcheng<sup>1,3</sup>, BAI Yanrong<sup>1</sup>

1. Beijing Key Laboratory of Gene Engineering Drugs & Biological Technology, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China
2. Key Laboratory of Cell Proliferation and Regulation Biology of Ministry of Education, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China
3. Beijing Key Laboratory of Gene Resource and Molecular Development, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

**Abstract** Phosphorylation is one of the most important post-translational protein modifications, which is related to the regulation of many activities of life. As a sort of reaction catalyzed by protein kinases, it functions significantly in cell signaling. To keep up with the situation that protein phosphorylation analysis and phosphorylated site identification have been a focus of the current proteomic study, and benefit the functional dissection on various protein phosphorylation reactions, this article introduces the progress in the studies of main types and functions of protein phosphorylation, the identification of the phosphopeptides, the determination and prediction of specific phosphorylation sites. As a focal point, protocols based on isotope labeling, chemiluminescence, etc, are elucidated. Western blotting has been proven sensitive and specific in the identification of phosphoproteins, based on which, there have appeared some improved approaches, such as NanoPro100/1000 ultramicro-protein analysis system. Phosphorylation analytic tools and softwares are being swiftly developing. According to numerous researches, protein phosphorylation/dephosphorylation modifications are important with many aspects of meaning. Controlling the cellular endogenous enzymic 'activities', protein phosphorylation/dephosphorylation are more able to rapidly react to external stimulus than enzymic re-synthesis/decomposition. A series of phosphorylation/dephosphorylation reactions in different tissues and with different temporal and spatial characteristics ensure the sustained responses of cells to external signals, and play a role in the cascade amplifying for the external signals. Protein phosphorylation/dephosphorylation study will continue to be a hotspot in the exploration of life activity regulatory mechanism.

**Keywords** protein modification; phosphorylation; phosphoprotein

收稿日期:2012-08-31;修回日期:2012-09-17

基金项目:国家自然科学基金项目(30971470);北京市自然科学基金项目(5122017);细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室开放基金项目(201101);教育部2011年度大学生创新创业训练计划项目;抗性基因与分子发育北京市重点实验室开放基金项目(01102)

作者简介:梁前进,副教授,研究方向为分子细胞遗传及功能基因研究,电子信箱:lqj@bnu.edu.cn

## 0 引言

蛋白质磷酸化 (protein phosphorylation) 指由蛋白质激酶 (kinase) 催化的把 ATP 或 GTP 的  $\gamma$  位磷酸基转移到底物蛋白质的氨基酸残基, 如丝氨酸 (Serine, Ser)、苏氨酸 (Threonine, Thr) 和酪氨酸 (tyrosine, Tyr) 等上的过程 (图 1), 是生物体内一种普通的调节方式, 在细胞信号转导的过程中起重要作用。几乎所有蛋白质在合成过程中或合成后都要经过一定形式的修饰, 而一些不合适的翻译后修饰常与疾病相关, 某些特定的翻译后修饰还被开发为疾病的分子标志或治疗靶标。蛋白质磷酸化是将外界刺激转换为胞内信号的一个主要机制, 是生物界最普遍也是最重要的一种蛋白质翻译后修饰 (Post-Translational Modifications, PTMs)。

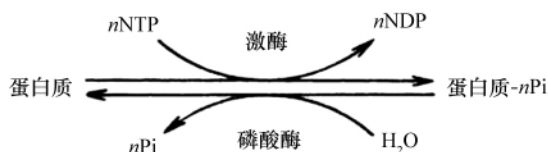


图 1 蛋白质磷酸化反应示意图

Fig. 1 Diagram of protein phosphorylation reaction

蛋白质翻译后修饰在绝大部分蛋白质上都会发生。作为广泛的蛋白修饰方式, 蛋白质磷酸化也是生物中的一种最有效的调控途径。在磷酸化反应中, 由于蛋白质氨基酸侧链加入了一个带有强负电的磷酸基团, 发生酯化作用, 从而改变了构型、活性及其与其他分子相互作用的性能。在许多生物学过程 (如信号传导、基因表达、细胞分裂等) 的调控中起着重要作用。完成编码后的蛋白质只有具有某些特定的氨基酸才会发生磷酸化——在真核生物中主要通过丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸等氨基酸残基的磷酸化, 而在细菌中则主要通过天冬氨酸 (Aspartic acid, D)、谷氨酸 (Glutamic acid, E) 和组氨酸 (Histidine, H) 等残基的磷酸化。有些蛋白质在原核生物和真核生物中均可被磷酸化, 它们的磷酸化位点通常是精氨酸 (Arginine, R)、赖氨酸 (Lysine, K) 和半胱氨酸 (Cysteine, C) 残基<sup>[1]</sup>。可逆的蛋白质磷酸化更是调节着细胞的大部分功能, 如能量储存、形态变化、蛋白合成、基因表达、信号因子释放、肌肉收缩和生化代谢等。因此, 蛋白质磷酸化分析及其位点鉴定已成为目前蛋白质组学的研究焦点之一。反过来, 蛋白质组学的飞速发展也使得磷酸化蛋白质组 (phosphoproteome) 的分析鉴定技术越来越成熟。

## 1 蛋白质磷酸化的主要类型与功能

根据磷酸氨基酸残基的不同, 可将磷酸化蛋白质分为 4 类, 即 O-磷酸盐蛋白质、N-磷酸盐蛋白质、酰基磷酸盐蛋白质和 S-磷酸盐蛋白质。O-磷酸盐蛋白质通过羟氨基酸 (hydroxyl amino acid, 如丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸) 的磷酸化形成, 但羟脯氨酸 (hydroxyproline) 或羟赖氨酸 (hydroxyl

lysine) 的磷酸化情况仍不清楚; N-磷酸盐蛋白质通过精氨酸、赖氨酸或组氨酸的磷酸化形成; 酰基磷酸盐蛋白质通过天冬氨酸或谷氨酸的磷酸化形成; 而 S-磷酸盐蛋白质通过半胱氨酸磷酸化形成<sup>[2]</sup>。因而, 蛋白激酶也种类繁多 (至少 500 种以上), 如 PKA、PKB、PKC 和 MAPK 等。这类能将  $\gamma$ -磷酸基团从磷酸载体分子上转移至底物蛋白的氨基酸受体上的一大类酶主要包括丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr) 蛋白激酶、酪氨酸 (Tyr) 蛋白激酶、组氨酸蛋白激酶 (主要出现于双组分信号系统)、色氨酸蛋白激酶和天冬氨酰基/谷氨酰基蛋白激酶等。

蛋白质磷酸化发挥的功能是多样化的。蛋白质磷酸化可以参与其他重要酶促 (系列) 反应作用 (磷酸化反应生成中间产物, 多为 S 或 N 磷酸盐等), 如属于磷酸烯醇型丙酮酸羧激酶 (Phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK) 依赖的磷酸转移酶 (Phosphotransferase, PTR) 系统的组氨酸蛋白激酶 (Histidine Protein Kinases, HPK); 也可以介导蛋白活性 (蛋白分子通过蛋白激酶发生磷酸化而改变性能), 如蛋白激酶 A (磷酸化丝氨酸和苏氨酸残基) 或各种受体酪氨酸激酶 (磷酸化酪氨酸残基)。蛋白质磷酸化还可以发挥各种独特的生理效应, 如天冬氨酸、谷氨酸和组氨酸磷酸化蛋白在细菌趋化反应的感觉性传导中发生解离<sup>[1-2]</sup>, 某些激素在靶组织中也存在着特异性磷酸化蛋白形式。又如, 酪氨酸激酶 (Tyrosine kinases) 是信号转导机制和控制细胞生长的关键分子, 它们催化的酪氨酸磷酸化和多蛋白复合体的形成构筑了细胞信号转导的基本机制, 以致几乎所有多肽细胞生长因子都通过该途径来激活, 调节细胞的生长。不难理解蛋白激酶在信号转导中两个主要方面的作用: (1) 通过磷酸化调节蛋白活性; (2) 通过蛋白逐级磷酸化使传导信号逐级放大, 进而引起细胞反应 (生理生化活动)。

已有研究表明, 真核细胞有丝分裂细胞周期中 M 期的发生伴随着一系列蛋白质的磷酸化和去磷酸化, 其中一大部分发生在氨基酸序列的 S/TP (丝氨酸或苏氨酸残基) 后随一个脯氨酸残基) 基序, 这些磷酸化的蛋白质能被 M 期特异性磷酸化抗体 (Mitotic Phosphoprotein MAb2, MPM-2) 识别<sup>[3-4]</sup>。通过标记有丝分裂 MPM-2 活性部位 Cdc25C 和非洲爪蟾卵母细胞和卵子提取出的具有 MPM-2 相似活性的激酶, 现已进一步确定了能够被 MPM-2 识别的 TP 基序的 -1 位和 +1 位被疏水性的氨基酸残基包围<sup>[4]</sup>。虽然很多 +2 位含有基本残基和 -2 位有脯氨酸残基的基序在有丝分裂中也可以被 Cdk 和 MAPK 两种有丝分裂相关的主要激酶所磷酸化, 但是同时也发现在二者活性缺失情况下有丝分裂 M 期活性相关的 MPM-2 特异反应的诱导, 这说明了必然有新的有丝分裂相关蛋白磷酸化调控途径和激酶反应类型<sup>[5]</sup>。相关研究表明, MEK1/2 抑制剂 U0126 能显著诱导胰蛋白酶激活的精子迁移, 可识别脯氨酸引导激酶 (如 MAPK) 磷酸化蛋白的 MPM-2 能识别精子鞭毛相关成分, 说明 MPM-2 特异 S/TP 型磷酸化对于细胞迁移也很重要<sup>[6]</sup>。本研究组发现, 中心体功能蛋白 Crp<sup>[46]</sup> 和中心体-

纺锤体功能蛋白 INMAP<sup>[7]</sup>在细胞中体结构稳定、复制调节和细胞有丝分裂均衡性调控等方面发挥重要功能,并且其异常表达与细胞癌化等有关,其涉及的不止一种类型激酶(可能包括 Plk1、Cdc2 等)的磷酸化调控作用也正在揭示出重要的信号传导机制。

## 2 蛋白质磷酸化的质谱和免疫印迹-化学发光鉴定法

近年来,对于蛋白质磷酸化修饰的研究愈来愈热,从确定蛋白质发生磷酸化的序列区域<sup>[8]</sup>到具体位点<sup>[9]</sup>,从对植物蛋白磷酸化<sup>[10]</sup>到对高等动物神经细胞蛋白磷酸化<sup>[11]</sup>的研究等,新的研究方法层出不穷,使用最广泛的技术有质谱法(Mass Spectrometry,MS),及同位素标记(Isotope Labeled)结合免疫印迹(immunoblotting,又称蛋白质印迹 Western blotting)-化学发光(Chemiluminescence)的分析鉴定法。

### 2.1 质谱法

1898年,Wien在电场和磁场中做正离子束偏转实验时发现,在电荷相同的情况下,离子的质量越小就偏转得越多,离子的质量越大就偏转得越少<sup>[12]</sup>。1913年,Thomson和Aston用磁偏转仪(magnetic deflection system)证实了氦存在两种同位素形式<sup>[13]</sup>,因此Aston于1919年研制成了一台能分辨1/100质量单位的质谱仪(mass spectrometer),创立了新型的测定同位素相对丰度、鉴定同位素类型的分析装置<sup>[14]</sup>。经过努力,人们证实复杂分子能产生确定的可重复的质谱,因而可用于测定有机物结构,开辟了有机分析新领域。质谱法就是通过电场和磁场将带电荷运动粒子(包括原子、分子,甚至分子结构碎片等)按其质荷比分离后进行物化性质检测分析的方法。核素的准确质量是个多位小数数字,任何两个核素的质量都是不一样的,也不会出现一种核素恰好是另一核素质量的整数倍的情况<sup>[15]</sup>。因此测准了带电粒子(离子)的准确质量,就可以确定相应的化合物组成、结构情况和裂解规律等。目前,由于灵敏度高、可有效处理蛋白质混合物等性能,质谱法从本质上已取代经典的埃德曼降解技术(Edelman degradation technique)在蛋白质化学中的地位<sup>[16]</sup>。

在质谱分析中,先使试样中各组分电离生成不同荷质比的离子,然后经加速电场的作用,生成离子束,进入质量分析器;利用电场和磁场造成相反的速度色散——通过电场的作用,离子束中运动速度较慢的离子发生大的偏转,运动速度较快的则发生较小的偏转;通过磁场的作用,离子发生角速度矢量相反的偏转,结果速度慢的离子依旧发生大的偏转,而速度快的则发生小的偏转。电场、磁场造成的偏转效应相互补偿,使它们的轨道相交至一个点上。不仅如此,磁场还能引起质量分离,结果质荷比相同而速度不同的离子就聚焦到同一点上,不同质荷比的离子聚焦于不同点上,这就可得到一个质谱图(mass spectrum)。

与未经修饰的肽段相比,受一个磷酸基团修饰的肽段在相对分子质量上就会增加79.983;磷酸肽(phosphopeptide)的

生成,意味着产生了一个可用于诊断的片段离子结构,区别于未修饰肽。因此,可以使用质谱技术鉴定蛋白质磷酸化。在进行分析时,通过利用特异序列水解酶(如胰蛋白酶)来水解凝胶分离后的蛋白,使成为不同的肽段。这里需要解释的是,凝胶分离后的整体蛋白难以被洗脱和做质谱分析,并且其分子量也通常不能满足数据库鉴定的需要,肽段则容易从凝胶上被洗脱,而且即使只获得蛋白的一小批肽段也能提取用于鉴定的足够信息<sup>[16]</sup>。

### 2.2 蛋白磷酸化的同位素标记结合免疫印迹-化学发光鉴定法

蛋白磷酸化研究中经常采用的一套灵敏度高、特异性强的优化方案是同位素标记结合免疫印迹-化学发光鉴定法。该方法采用放射性同位素标记、双向电泳(two dimensional electrophoresis)、放射自显影(sautoradiography)等技术建立起蛋白质组图谱(proteome map),再凭借免疫印迹-持久性化学发光技术,对目标蛋白质进行选择性<sup>[17]</sup>鉴定分析。

1910年,Soddy提出化学元素存在着相对原子质量和放射性不同而其他物理化学性质相同的变种假说<sup>[17]</sup>。由于同一元素的这些变种处于化学元素周期表的同一位置,得名同位素。同位素标记的化合物可以用来追踪物质运行和变化的规律,研究有机反应历程,这就诞生了同位素标记法(同位素示踪法)<sup>[18-19]</sup>。示踪同位素(放射性核素)及其化合物与自然界存在的相应元素及化合物间在化学性质和生物学性质上是相同的,差异在于核物理性质。化学家和生物学家把放射性同位素技术应用在食品检测、水质监控和健康研究等方面。以同位素作为一种标记制成标记食物、标记药物和标记代谢物质等,具有广泛用途。

免疫印迹技术是在凝胶电泳和固相免疫测定技术基础上发展起来的、根据特定抗原-抗体的特异性反应来检测复杂样品中的某种蛋白质的免疫生化分析方法。在进行免疫印迹操作时,首先将混合抗原样品在凝胶板上进行单向的或双向的电泳分离,然后采用一种固定化基质膜与凝胶相贴附的方法,借助印迹介质的自然吸附力、电场驱动力等作用,使凝胶中的抗原组份转移到膜上,产生固相化分离提取样品。最后,借助同位素免疫探针或酶免疫探针等,对固定化抗原进行检测分析<sup>[19-21]</sup>。免疫印迹中一般采用的电泳是聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis),在凝胶中常加入阴离子去污剂十二烷基硫酸钠(Sodium Dodecyl Sulfate, SDS),使蛋白质亚基的迁移率主要取决于分子量而电荷因素可忽略。免疫印迹法具有的高特异性和敏感性,使其成为蛋白分析的最常规技术之一,常用于鉴定蛋白特异性、蛋白定性和半定量分析等。免疫印迹结合化学发光检测手段,可以同时多个样品的同种蛋白表达差异进行比较。当蛋白发生磷酸化时,放射性<sup>32</sup>P的掺入和分子质量变化引起的凝胶迁移(gel shift)使得免疫印迹在分析检测中占据重要地位。

当化学反应产生的能量以光的形式释放出来,称为化学发光。例如,最常用的化学发光试剂之一鲁米诺(luminol)被过

氧化物氧化后,会产生一种激发态产物(aminophthalate)。这种产物衰变至最低能态时,就释放出光子。利用专利添加物提高鲁米诺反应的发光强度和持续时间(稳定性),就产生了增强型化学发光(ECL)试剂。在利用 ECL 的免疫印迹中,化学发光剂在酶和反应底物发生作用时产生可被检测的光,在适当稀释浓度的特异抗体(辣根过氧化物酶标记的抗体)作用下所产生的稳定光信号输出,有助于维持蛋白检测的一致性和灵敏度。需要指出的是,抗体未被足够稀释时常不会获得稳定的光信号输出,反应系统中太多的酶也会快速氧化底物并终止信号。

在信号转导的研究中,抗酪氨酸磷酸化抗体等磷蛋白特异抗体的出现具有重要的意义,因为它使不用放射性同位素实验检测磷酸化反应成为可能。利用磷蛋白抗体,通过免疫印迹或其他免疫学方法就可以检测到磷酸化信号。如果目标蛋白含量低,也可用免疫沉淀(immune precipitation)先富集发生磷酸化的蛋白,再检测蛋白水平。这对于不同条件下细胞内总的蛋白磷酸化水平变化和许多细胞生物现象的研究十分有利。

### 2.3 磷酸化分析的质谱法与同位素法的比较

任何方法技术都是既有利又有弊的。长期以来,人们普遍采用双向凝胶电泳、反相高效液相色谱(reversed phase high performance liquid chromatography)、固相金属离子亲和色谱(immobilized metal ion affinity chromatography)、免疫沉淀及化学修饰等多种分离富集技术,结合单极或多极质谱的鉴定方法进行蛋白磷酸化分析。但是,以质谱为核心的分析局限性很多,例如对蛋白质水解片断的分析极少能全覆盖,大量非磷酸化肽的存在常常影响对磷肽信号的响应;鉴定成本也高,限制了普通实验室的应用<sup>[1]</sup>。

同位素标记-放射自显影分析磷酸化蛋白质的方法有一定风险(同位素辐射),但其灵敏而直观,能获得更多有关磷酸化蛋白质功能的信息;采用高分辨率双向电泳,加上微量分析和制备水平,可很好地适应细胞中的大规模蛋白质精细分析。免疫印迹-持久性化学发光技术具有很高的敏感性、很强的特异性和操作简便、信号稳定且持续时间长等优点,以通过控制曝光时间等获得高信噪比分析结果<sup>[11]</sup>。这些技术与生物信息学分析平台联用,可获得准确、完整的磷酸化蛋白质组图谱<sup>[9]</sup>。

不过,技术间的强-强联合更具魅力。以同位素标记和免疫印迹-化学发光法为核心来分析鉴定磷酸化蛋白质组的配套方案,整合了多种技术优势,体现了高灵敏度、高特异性、高重现性等优点,在或大规模、或超微量、或高精度的分析中发挥了很大作用<sup>[11]</sup>。与以质谱为核心的鉴定技术相比,这种优化方案无需复杂的样品富集、胶内酶切等手续,操作简单快速、直观可信,而且还可以使针对完整磷酸化蛋白质的研究更接近于体内执行生理状况<sup>[9]</sup>。另一方面,合理采用质谱技术,对于进一步确定磷酸化位点或对磷酸化蛋白质进行定量分析来说,又是其他方法难以替代的<sup>[2]</sup>。

### 2.4 技术提升获得的蛋白磷酸化分析方法进展举例

由于蛋白磷酸化在生物生命调节中的重要性,其分析技术在不断创新。

#### 2.4.1 NanoPro1000 超微量蛋白分析系统

传统的蛋白分析技术所用的蛋白量往往需要来自成千上万个细胞,所得结果的分辨率及重复性很有限。若干分析法所需样品量如下:质谱仪样品量 100000 个细胞,流式细胞仪样品量 10000 个细胞,蛋白电泳样品量 5000 个细胞,蛋白芯片样品量 1000 个细胞。美国 ProteinSimple 公司推出的 NanoPro1000 超微量蛋白分析系统(ultra trace protein analysis system)为蛋白功能和信号通路研究提供了一个全新的研究方案,每次分析仅需要 25 个细胞。该系统使信号转导相关蛋白特性等方面在原代培养细胞、流式细胞仪(Flow cytometer, FCM)分选细胞、肿瘤穿刺(tumor puncture)细胞、显微解剖组织切片和分离的干细胞群体等各种微量样本中得以研究。该分析系统基于毛细管的超微量免疫检测分析平台,采用等电点聚焦(Isoelectric Focusing, IEF)技术分离处于不同磷酸化状态的信号蛋白,通过固定、免疫杂交和其他相关程序进行检测。这种分析系统在肿瘤蛋白活化、蛋白磷酸化水平异构化、激酶抑制反应等方面,在揭示细胞增殖和凋亡机制的研究中发挥了重要作用。与传统 Western 检测相比, NanoPro1000 超微量蛋白分析系统给出了更加精细的结果。例如,传统 Western 仅能检测出 ERK1 和 ERK2 两个条带,而 NanoPro1000 系统可以检测出 6 个条带,分别是 ERK1 和 ERK2 的双磷酸化、单磷酸化和非磷酸化异构体<sup>[22]</sup>。

#### 2.4.2 Mn<sup>2+</sup>-Phos-tag™ SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

近年来,利用丙烯酰胺铰链 Phos-tag™ 的磷酸亲和和 SDS-PAGE 技术替代放射性同位素实验检测磷酸化蛋白的方法很奏效——通过连接在丙烯酰胺分子上的双核金属(如 Mn<sup>2+</sup>)配合物对磷酸基团的亲和,将电泳结果转移到 PVDF 膜上,用相应蛋白的抗体识别,根据迁移滞留检测蛋白磷酸化(图 2)<sup>[23]</sup>。这里的 Phos-tag 就是指磷酸(基团)标签(Phosphate tag)的意思。这一种磷酸化研究技术可以避免使用放射性 <sup>32</sup>P, 并且实验的程序就是做一次 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE, 胶中含特异的磷酸标签),再进行考马斯亮蓝(Coomassie Brilliant Blue,



图 2 丙烯酰胺铰链 Phos-tag™ 作用原理  
Fig. 2 Mechanism of the action of acrylamide hinge Phos-tag™

CBB)染色。并且电泳的胶还可以用做延伸实验,比如免疫印迹、质谱分析。如果蛋白分子上磷酸化多,电泳时滞留就明显,从迁移距离上可以进行磷酸化位点多寡分析。

利用 Phos-tag SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,有关研究者证明在 M 期内磺肽(Ensa)发生磷酸化(相关磷酸化位点是 S67),这对于 PP2A-B55d 的抑制具有量化调控作用。有丝分裂后期促进复合物 3 (anaphase-promoting complex 3, Apc3)、Cdc25、Wee1 和 Gwl 的磷酸化也都用此技术得以很好地分析<sup>[24]</sup>。

### 3 蛋白质磷酸化分析发展现状及趋势

蛋白质磷酸化分析技术发展很快,总体现状和发展方向涉及计算机软件、磷酸化蛋白辅助定量、特异性标记和识别鉴定等方面的技术指标。

由于蛋白质磷酸化在体内是一种不稳定的动态过程,而且在细胞内的丰度一般也较低,以及磷酸基团很容易在分离过程中丢失,人们仍然体会到对磷酸化蛋白质进行全面详尽分析的重重困难。这些困难包括磷酸化蛋白质标记与分离富集难度,也包括因负电性而对质子化产生的障碍<sup>[2]</sup>。尽管如此,蛋白质磷酸化位点预测的方法还是不断产生,许多高效预测蛋白质磷酸化位点的算法基于磷酸化相关的特异保守序列。人工神经网络(Artificial Neural Network, ANN)<sup>[25]</sup>、隐马尔可夫模型(Hidden Markov Model, HMM)<sup>[26]</sup>和支持向量机(Support Vector Machine, SVM)<sup>[27]</sup>等多种方法,都用在了蛋白质磷酸化及特异位点分析中。其中,SVM 获得的高预测精度就是代表<sup>[28]</sup>。新型的蛋白质磷酸化位点注释数据库 Phospho-ELM 6.0 收集了经过实验校验的 3674 个真核生物蛋白质的 13613 个磷酸化位点(其中丝氨酸 9919 个,苏氨酸位点 1890 个,酪氨酸位点 1804 个)<sup>[29]</sup>,得到了很好的运用。磷酸化蛋白质组在今后一段时间的研究热点仍将集中在高效、高通量分离-富集技术的开发和无损伤、高灵敏检测系统的研制上。

目前常用的磷酸化蛋白富集方法包括免疫亲和色谱(immunoaffinity chromatography)、固相金属亲和色谱(Immobilized Metal Affinity Chromatograph, IMAC)、二氧化钛色谱(TiO<sub>2</sub> chromatography)、离子交换色谱(Ion Exchange Chromatography, IEC)、亲/疏水作用色谱(hydrophilic/hydrophobic interaction chromatography)和磷酸基团化学修饰(phosphate group chemical modification)等<sup>[30]</sup>;常用的磷酸化位点质谱分析法包括基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)、串联质谱(MS/MS)、傅里叶变换离子回旋共振质谱(FI-ICR MS)和液质联用(LC-MS)等<sup>[30]</sup>。常用的定量磷酸化蛋白质组学支撑性技术包括双向凝胶电泳、荧光染色、稳定同位素标记等。其中稳定同位素标记又包括化学标记、同位素代谢标记和 <sup>18</sup>O 标记等<sup>[30]</sup>。还有 Phospho-ELM (PhosphoBase)<sup>[31]</sup>、P(3)DB<sup>[32]</sup>、PepCyberP-Pep<sup>[33]</sup>等磷酸化蛋白质组学数据库,NetPhos 2.0<sup>[34]</sup>、DisPhos 1.3<sup>[35]</sup>等非特异性或组织特异性磷酸化位点预测工具,ScanSite 2.0<sup>[36]</sup>、CRPhos 0.8<sup>[37]</sup>等

激酶特异性磷酸化位点或磷酸结合基序预测工具,以及 PhosphoScore<sup>[38]</sup>等潜在磷酸化位点检测工具。

### 4 蛋白质磷酸化分析理论及实践意义

蛋白质的磷酸化反应在细胞信号的传递过程中占有极其重要的地位。根据陆续研究,已经发现的人体内存在多达 2000 余个蛋白质激酶和约 1000 个蛋白质磷酸酶基因<sup>[25]</sup>。蛋白质的磷酸化逆转过程是由蛋白质磷酸酶催化的蛋白质去磷酸化(dephosphorylation)。在磷酸化修饰现象的研究已经取得公认成果的同时,去磷酸化的研究也受到了越来越多的关注。例如,无论是在细胞周期运行还是细胞分裂相关事件(如中心粒的形成及复制)的调控中,去磷酸化的作用都十分重要,它像磷酸化一样,是细胞自身的一种主动性调节方式<sup>[39]</sup>。对蛋白质磷酸化和去磷酸化的双向协同关系的探讨拓宽了影响重要细胞生理活动的蛋白修饰调控方面的研究。

蛋白质磷酸化修饰的意义是多方面的。蛋白磷酸化在细胞内介导胞外信号时,发挥了专一应答的特点。与信号传递有关的蛋白激酶类主要受控于胞内信使,如 cAMP、Ca<sup>2+</sup>、二酰甘油(Diacyl Glycerol, DG)等的作用,作为共价修饰调节方式,它比变构调节(allosteric regulation)受胞内代谢产物的影响更小;由于蛋白质磷酸化/去磷酸化控制的是细胞的内源酶“活性”,比起酶的重新合成及分解,更能对外界刺激做出迅速的反应;一系列、不同组织和时空特性的蛋白质磷酸化/去磷酸化反应保证了细胞对外界信号的持续反应性,并对外界信号起到了级联放大(cascade amplifying)作用。细胞内众多的生物学过程都受到包括磷酸化在内的蛋白质翻译后修饰的调控作用,在漫长的生物进化过程中,蛋白质磷酸化修饰位点发生了有规律的变异,这些位点、变异及其与蛋白质功能关系的研究,有助于在合理归类的基础上探讨蛋白质翻译后修饰调控的精细机制。

### 5 展望

探索磷酸化修饰的奥秘,已成为众多生物学家关注的内容。用蛋白质组学、功能基因组学理念和方法研究蛋白质磷酸化,又从整体上把握了细胞或组织中磷酸化修饰的状态及其变化,提供了新视角,形成了重大课题<sup>[40]</sup>。例如,与蛋白质组学结合,蛋白激酶抑制剂在心血管病防治等研究中已经取得令人鼓舞的成果,临床试验正在证明其功效;近年来的研究表明,许多癌症的发生和各类激酶的突变有关,所以结合可逆的蛋白磷酸化规律的相关综合研究已成为信号传递中非常活跃的领域<sup>[41]</sup>。可以看出,在基因组、蛋白质组,特别是功能基因组、功能蛋白质组层次,研究蛋白磷酸化问题还是大趋势。另一方面,人们对蛋白磷酸化问题的研究也将越来越与其他相关分子调控研究紧密结合,以更好地解决细胞生理调控机制问题。例如将磷酸化与去磷酸化结合,磷酸化与蛋白质分子互作结合,磷酸化与细胞结构、形态变化或增殖、分化

状态改变结合等。与此相关,解析特征磷酸化位点和激酶,寻找一定规律下细胞生命活动某方面整体变化机制也是一个趋势,例如对大规模发生在有丝分裂期的被抗体 MPM-2 识别的蛋白磷酸化位点及反应规律的研究<sup>[42]</sup>,对包含 25 个成员、既可以酪氨酸也可以苏氨酸/丝氨酸为底物的双特异磷酸酶 (Dual-Specificity Phosphatases, DUSP) 家族所调控的激酶靶位反应规律的研究<sup>[43]</sup>等。总的来说,以“组合拳”的方式进行蛋白磷酸化修饰等蛋白质修饰问题研究是个潮流。

蛋白质磷酸化研究的热度还将一直持续,在生命活动调控机制的解释中不断取得新进展。

### 参考文献 (References)

- [1] Ozlu N, Akten B, Timm W, et al. Phosphoproteomics [J]. *Wiley Interdiscip Rev-Syst Biol*, 2010, 2(3): 255-276.
- [2] 张倩,杨振,安学丽,等.蛋白质的磷酸化修饰及其研究方法 [J].首都师范大学学报:自然科学版,2006,27(6):43-47.  
Zhang Qian, Yang Zhen, An Xueli, et al. *Journal of Capital Normal University: Natural Science Edition*, 2006, 27(6): 43-47.
- [3] Dephoure N, Zhou C, Villén J, et al. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation[J]. *PNAS*, 2008, 105(31): 10762-10767.
- [4] Wu C F, Wang R, Liang Q, et al. Dissecting the M phase-specific phosphorylation of serine-proline or threonine-proline motifs[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2010, 21(9): 1470-1481.
- [5] Miyata H, Thaler C D, Haimo L T, et al. Protease activation and the signal transduction pathway regulating motility in sperm from the water strider *Aquarius remigis*[J]. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2012, 69(4): 207-220.
- [6] Wei Y, Shen E Z, Zhao N, et al. Identification of a novel centrosomal protein CrpF46 involved in cell cycle progression and mitosis [J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314(8): 1693-1707.
- [7] Shen E Z, Lei Y, Liu Q, Zheng Y B, et al. Identification and characterization of INMAP, a novel interphase nucleus and mitotic apparatus protein that is involved in spindle formation and cell cycle progression[J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315(7): 1100-1116.
- [8] Wu R, Haas W, Dephoure N, et al. A large-scale method to measure absolute protein phosphorylation stoichiometries [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(8): 677-683.
- [9] Ubersax J A, Ferrell J E. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8(8): 530-541.
- [10] 梁宇,荆玉祥,沈世华.植物蛋白质组学研究进展 [J].植物生态学报,2004,28(5):114-125.  
Liang Yu, Jing Yuxiang, Shen Shihua. *Acta Phytocologica Sinica*, 2004, 28(5): 114-125.
- [11] 姚富丽,李洪,尹康,等.同位素标记结合免疫印迹-化学发光法鉴定小鼠神经元磷酸化蛋白质组 [J].生物医学工程学杂志,2007,24(4):898-901.  
Yao Fuli, Li Hong, Yin Kang, et al. *Journal of Biomedical Engineering*, 2007, 24(4): 898-901.
- [12] Wien W. Wikisource: Ueber die Fragen, welche die translatorische Bewegung des Lichtäthers betreffen [J]. *Annalen der Physik*, 1898, 301(3): 1-18.
- [13] Thomson J J. Rays of positive electricity [J]. *Proceedings of the Royal Society*, 1913, A(89): 1-20.
- [14] Aston F W. A positive ray spectrograph [J]. *Philosophical Magazine*, 1919, 38: 707-714.
- [15] 姜铮,王芳,何湘,等.蛋白质磷酸化修饰的研究进展[J].生物技术通讯,2009,20(2):233-237.  
Jiang Zheng, Wang Fang, He Xiang, et al. *Letters in Biotechnology*, 2009, 20(2): 233-237.
- [16] 孟凡臣,张艳贞,胡英考,等.生物质谱及其在蛋白质组学研究中的应用[J].生物技术通讯,2006,17(3):468-470.  
Meng Fanchen, Zhang Yanzen, Hu Yingkao, et al. *Letters in Biotechnology*, 2006, 17(3): 468-470.
- [17] Nagel M C. Frederick Soddy: From alchemy to isotopes [J]. *Journal of Chemical Education*, 1982, 59(9): 739-740.
- [18] 张爱宏,刘国庆.放射性同位素标记法检测脂蛋白脂肪酶活性及其应用[J].中国动脉硬化杂志,2003,11(6):573-576.  
Zhang Aihong, Liu Guoqing. *Chinese Journal of Arterial Lerosis*, 2003, 11(6): 573-576.
- [19] 王文杰,林木非同化器官 CO<sub>2</sub> 通量的测定方法及对结果的影响[J].生态学报,2004,24(9):2056-2067.  
Wang Wenjie. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(9): 2056-2067.
- [20] 韩晓峰,刘孙琴.免疫印迹技术在老年人梅毒螺旋体抗体阳性标本中的临床应用[J].医学检验与临床,2012,23(1):29-30,41.  
Han Xiaofeng, Liu Sunqin. *Medical Laboratory Science and Clinics*, 2012, 23(1): 29-30, 41.
- [21] 张莉芸,李小峰,胡学芳,等.间接免疫荧光法和免疫印迹法联合检测抗聚角蛋白微丝蛋白抗体对类风湿关节炎的诊断价值 [J].中华风湿病学杂志,2004,8(6):338-341.  
Zhang Liyun, Li Xiaofeng, Hu Xuefang, et al. *Chin J Rheumatol*, 2004, 8(6): 338-341.
- [22] 北京市拓普生物科技有限公司.蛋白磷酸化检测系统[EB/OL]. [2012-08-01]. [http://www.topbiotech.com/\\_d274371483.htm](http://www.topbiotech.com/_d274371483.htm).  
Beijing TOP Biotech. Protein phosphorylation detection system[EB/OL]. [2012-08-01]. [http://www.topbiotech.com/\\_d274371483.htm](http://www.topbiotech.com/_d274371483.htm).
- [23] Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Takiyama K, et al. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins [M]//*Molecular & Cellular Proteomics* 5.4. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2006: 749-757.
- [24] Mochida S, Maslen S L, Skehel M, et al. Greatwall phosphorylates an inhibitor of protein phosphatase 2A that is essential for mitosis [J]. *Science*, 2010, 330: 1670-1673.
- [25] Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites1 [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 294: 1351-1362.
- [26] Huang H D, Lee T Y, Tzeng S W, et al. Incorporating hidden Markov models for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2005, 26: 1032-1041.
- [27] Kim J H, Lee J, Oh B, et al. Prediction of phosphorylation sites using SVMs[J]. *Bioinformatics*, 2004, 20: 3179-3184.
- [28] 赵凌志,刘颖,覃征. Weighted SVM 在蛋白质磷酸化位点预测中的应用[J].计算机工程与应用,2006,42(3):155-157,167.  
Zhao Lingzhi, Liu Ying, Qin Zheng. *Computer Engineering and Applications*, 2006, 42(3): 155-157, 167.
- [29] Dinkel H, Chica C, Via A, et al. ELM: A database of phosphorylation sites-update 2011[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39: D261-D267.
- [30] Paradelo A, Albar J P. Advances in the analysis of protein phosphorylation [J]. *J Proteome Res*, 2008, 7: 1809-1818.

- [31] Dinkel H, Chical C, Via A, *et al.* Phospho.ELM: A database of phosphorylation sites—update 2011 [J]. *Nucl Acids Res*, 2010, 39(S1): D261.
- [32] Gao J J, Agrawal G K, Thelen J T, *et al.* P3DB: A plant protein phosphorylation database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(Database issue): D960–D962.
- [33] Gong W, Zhou D, Ren Y, *et al.* PepCyber: P~PEP: A database of human protein protein interactions mediated by phosphoprotein -binding domains[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36: D679–D683.
- [34] Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 294(5): 1351–1362.
- [35] Iakoucheva L M, Radivojac P, Brown C J, *et al.* The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(3): 1037–1049.
- [36] Obenauer J C, Cantley L C, Yaffe M B. Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(13): 3635–3641.
- [37] Dang T H, Van Leemput K, Verschoren A. Prediction of kinase-specific phosphorylation sites using conditional random fields[J]. *Bioinformatics*, 2008, 24(24): 2857–2864.
- [38] Ruttenberg B E, Pisitkun T, Knepper M A, *et al.* PhosphoScore: An open-source phosphorylation site assignment tool for MSn data [J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(7): 3054–3049.
- [39] Domingo-Sananes M R, Kapuy O, Hunt T, *et al.* Switches and latches: A biochemical tug-of-war between the kinases and phosphatases that control mitosis [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 2011, 366(1584): 3584–3594.
- [40] 刘婷, 王文礼, 姜丽丽. 磷酸化蛋白质组学研究现状 [J]. 内蒙古医学院学报, 2007, 29(4): 302–304.  
Liu Ting, Wang Wenli, Jiang Lili. *Acta Academiae Medicinae Neimongol*, 2007, 29(4): 302–304.
- [41] 谢灿, 张劲松, 陈受宜. 蛋白磷酸化与两组分信号系统 [J]. 生物工程进展, 2001, 21(6): 9–14.  
Xie Can, Zhang Jinsong, Chen Shouyi. *Progress in Biotechnology*, 2001, 21(6): 9–14.
- [42] Wu C F, Wang R, Liang Q, *et al.* Dissecting the M Phase-specific Phosphorylation of Serine-Proline or Threonine-Proline Motifs [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2010, 21(9): 1470–1481.
- [43] Huang C Y, Tan T H. DUSPs, to MAP kinases and beyond [J]. *Cell Biosci*. 2012, 2(1): 24.

(责任编辑 刘志远)

·学术动态·



## “第八届全国仿真器学术年会”征文

中国系统仿真学会仿真器专业委员会与中国航空学会自控分会仿真器专业委员会拟于2013年8月中上旬在昆明联合召开“第八届全国仿真器学术年会”,同时召开专业委员会全体会议。

征稿范围:(1) 仿真系统体系结构;(2) 仿真系统建模理论与方法;(3) 仿真系统环境(包括视景、运动、仪表、声音等)仿真技术;(4) 仿真系统控制技术;(5) 仿真系统支持环境;(6) 仿真系统标准及规范;(7) 仿真系统的应用及维护;(8) 仿真系统的可信度研究;(9) 半实物仿真技术;(10) 嵌入式仿真技术;(11) 自然环境(SNE)仿真技术;(12) 虚拟现实、可视化技术;(13) 仿真支撑平台技术;(14) 仿真模拟训练系统相关技术;(15) 体系对抗仿真及评估技术;(16) 作战仿真系统及应用;(17) 仿真标准化技术;(18) 其他。

摘要提交日期:2013年4月15日

论文提交日期:2013年5月15日

联系电话:13552328963

电子邮箱:fzqhy2013@126.com

大会网站:<http://www.china-simulation.com/xueshudongtai/huiyizhengwen/2012-05-30/364.html>