

磷酸化多肽的富集原理及相关富集方法的研究进展

罗垠健¹, 张启伟¹, 肖琛^{1,2}, 郑琦^{1*}

¹光电化学材料与器件教育部重点实验室, 交叉学科研究院, 江汉大学化学与环境工程学院, 湖北 武汉

²中国科学院藻类生物学重点实验室, 湖北 武汉

Email: luoyj@stu.jhun.edu.cn, qizheng@jhun.edu.cn

收稿日期: 2021年4月3日; 录用日期: 2021年4月18日; 发布日期: 2021年4月30日

摘要

磷酸化是生物体内广泛存在的一类蛋白质翻译后修饰, 其参与了绝大多数生命活动的调控。鉴于磷酸化修饰有着重要的生物学意义, 相关研究一直是不少科研工作者们关注的焦点。然而, 因磷酸化蛋白具有分布广泛、相对丰度低、持续动态变化等特征, 导致其分析过程存在复杂性高、效率低、难度大等问题。开发高效且稳定的样品前处理方法是实现高通量磷酸化修饰分析的关键因素之一。除基于金属氧化物亲和色谱法、固定化金属亲和色谱法的经典富集材料之外, 近十年来, 一些通过离子交换、氢键、配体交换、疏水作用等方式分离磷酸化多肽的新型材料也逐渐得到应用。本文简述了这些新兴富集方法的原理及研究进展。

关键词

磷酸化多肽, 富集, 样品前处理

Research Progress on the Enrichment Principle of Phosphorylated Peptides and Related Enrichment Methods

Yinjian Luo¹, Qiwei Zhang¹, Chen Xiao^{1,2}, Qi Zheng^{1*}

¹Key Laboratory of Optoelectronic Chemical Materials and Devices of Ministry of Education, Institute of Interdisciplinary Research, School of Chemical and Environmental Engineering, Jiangnan University, Wuhan Hubei

²Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan Hubei

*通讯作者。

文章引用: 罗垠健, 张启伟, 肖琛, 郑琦. 磷酸化多肽的富集原理及相关富集方法的研究进展[J]. 分析化学进展, 2021, 11(2): 47-59. DOI: 10.12677/aac.2021.112005

Abstract

Phosphorylation is a type of protein post-translational modification widely existing in organisms, and it is involved in the regulation of most life activities. In view of its important biological significance, the relevant research has been the focus of many scientific researchers. However, due to the characteristics of wide distribution, low relative abundance and continuous dynamic changes of phosphorylated proteins, the analysis process is extremely complicated, inefficient and difficult. It is one of the key factors to achieve high-throughput phosphorylation analysis via developing efficient and stable sample preparation methods. In the past decade, in addition to the classic enrichment materials based on metal oxide affinity chromatography and immobilized metal affinity chromatography, several novel ones based on ion exchange, hydrogen bonding, ligand exchange, and/or hydrophobic interaction have been used to separate phosphopeptides. This review briefly describes the enrichment principles as well as the research progress of these emerging methods.

Keywords

Phosphopeptides, Enrichment, Sample Preparation

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

由核酸经转录翻译后形成的前体蛋白质通常是没有活性的，往往需要再经过折叠、修饰等过程才能赋予蛋白质正常的活性及相应的功能。翻译后修饰极大地丰富了蛋白质的多样性，使其功能更完善、调节更精细、作用更专一。现已确认的蛋白质翻译后修饰达几十种，常见的有磷酸化、泛素化、糖基化、甲基化、乙酰化等。其中，磷酸化是真核生物细胞内最普遍、最重要的蛋白质翻译后修饰之一，其几乎参与调节了生物体内所有的生命活动。以哺乳动物为例，超过 1/3 种类的蛋白质可以被磷酸化，主要参与细胞的分化增殖、细胞间的信息传递、细胞信号通路的开关等过程[1] [2] [3] [4]。正因为磷酸化有着复杂且广泛的生物学意义，全面解析磷酸化修饰已成为当今生命科学领域的重要任务之一。

磷酸化修饰主要以 O-磷酸化的形式发生在蛋白质的丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)以及酪氨酸(Tyr)残基上，而近年来也有研究表明，组氨酸(His)、精氨酸(Arg)、赖氨酸(Lys)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)等碱性氨基酸上可以发生 N-磷酸化修饰(图 1) [5] [6]，它们可能调节了蛋白质的信号传导过程[7] [8]。尽管磷酸化修饰在生物体内分布非常广泛，但磷酸化多肽在总酶切多肽中的占比并不高，据推测可能不足 5%。这导致磷酸化肽存在丰度低、检测难度大等问题，在很大程度上制约了蛋白质磷酸化修饰的解读进程。建立高效的富集方法是实现高通量磷酸化修饰分析的关键环节，也是蛋白质组学领域中一项颇具挑战的任务。当前常用的富集方法主要分成三类：免疫印迹法、金属氧化物亲和色谱(Metal Oxide Affinity Chromatography, MOAC)法、固定化金属亲和色谱(Immobilized Metal ion Affinity Chromatography, IMAC)法。免疫印迹法的优点在于可以富集完整的磷酸化蛋白质，技术相对成熟，不过，由于同一蛋白质上可能存

在不同的磷酸化状态,导致其可能出现在二维电泳图不同的位置上,从而降低了蛋白质的浓度[9];另外,低丰度蛋白经常无法被检测到。MOAC法与IMAC法是当前应用最为广泛的高通量磷酸化多肽富集方法,尽管相关材料的商业化程度已经较高,但仍然存在一些缺陷,这促使科研工作者们依然在持续发展新的基质材料与配基、新的技术等[10]。需要注意的是,因受到分析技术的限制,目前的高通量方法一般用于多肽水平而较少用于蛋白质水平上,即需要先将蛋白质酶解成多肽之后再行后续的分析操作。

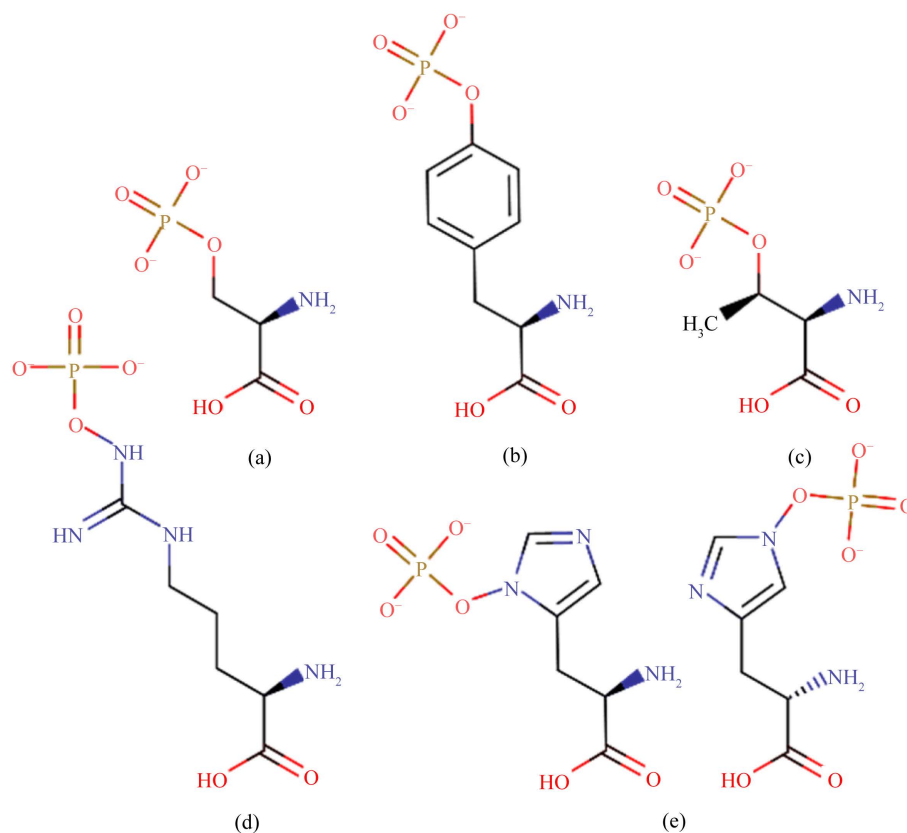


Figure 1. Types of protein phosphorylation [6] [11]. (a) phosphorylated serine; (b) phosphorylated tyrosine; (c) phosphorylated threonine; (d) phosphorylated arginine [12]; (e) phosphorylated histidine, phosphorylation with the phosphoryl group being covalently linked to either (left) the N δ 1 atom or (right) the N ϵ 2 atom of imidazole ring [6] [11]

图 1. 蛋白质磷酸化修饰类型[6] [11]。(a) 磷酸化丝氨酸; (b) 磷酸化酪氨酸; (c) 磷酸化苏氨酸; (d) 磷酸化精氨酸[12]; (e) 磷酸化组氨酸, 磷酸化可以发生在咪唑环的 N δ 1 (左) 或 N ϵ 2 原子上[6] [11]

已有文献综述总结了免疫印迹法、MOAC法、IMAC法的特点[13] [14] [15] [16], 本文不再赘述。除此之外, 近十多年来, 一些基于新型材料的富集方法也逐步被应用到该领域中。本文重点总结这些材料的富集原理及相关方法的研究进展, 期望能为开发磷酸化肽富集技术提供有意义的信息。

2. 磷酸化多肽的富集原理

以富集原理而言, MOAC与IMAC法主要通过金属离子与磷酸基产生相互作用, 从而较为特异性地捕获磷酸化肽; 新型材料则主要依赖于某些官能团, 其可通过离子交换、氢键、配体交换、疏水作用等方式与多肽产生相互作用。如表 1 所示, 近十年来报道了几十种新型富集材料, 其中大部分基于以离子

交换、氢键为核心的静电作用；混合应用多种富集原理的材料则次之。

Table 1. Enrichment effect of different materials for various analytes

表 1. 不同材料对各种分析物的富集效果

Enrichment principle	No.	Materials	Sensitivity (fmol/ μ L)	Selectivity (β -casein: BSA)*	Recyclability	Number of identified phosphopeptides	Ref
Electrostatic interaction with amino groups	1	Amine-Functionalized Sol-Gel	10	1:50	-	25 in nonfat milk	[17]
	2	pY-MIPs	1×10^3	-	-	44 in mouse brain	[18]
	3	PNI-co-ATBA0.2@SiO ₂	-	1:200	-	1257 in HeLa cells	[19]
	4	Fe ₃ O ₄ @PEI	5	1:1000	-	11 in nonfat milk	[20]
	5	Polyethyleneimine-modified magnetic nanoparticles	-	1:100	-	19 in nonfat milk 4 in human serum	[21]
	6	g-C ₃ N ₄ magnetic graphitic carbon nitride	-	1:100	-	2251 in mouse brain 20 in nonfat milk 21 in human serum	[22]
Electrostatic interaction with guanidine group	7	Guanidyl-functionalized graphene	-	-	-	2576 in mouse brain 12 in nonfat milk	[23]
	8	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @GDN	-	1:100	6 cycles	-	[24]
	9	SPIO@COF-Guanidyl	5×10^4	1:1000	5 cycles	63 in human saliva 9 in α -casein	[25]
	10	PA-coated diamond NPs	6×10^6	-	-	4 in β -casein 8 in nonfat milk	[26]
	11	Fe ₃ O ₄ @PDA@PMAA@PAMAM	1	1:500	5 cycles	22 in nonfat milk 17 in human saliva	[27]
	12	Fe ₃ O ₄ /PDA/PAMA-Arg	-	1:500	5 cycles	14 in nonfat milk 1059 in mouse brain	[28]
Anion exchange effect	13	QCCS hybrid microsphere	-	1:100	-	18 in α -casein 15 in nonfat milk	[29]
	14	Quaternized luffa sponge	-	1:100	-	21 in nonfat milk	[30]
Ligand exchange effect	15	nP-ZrO ₂	20	1:200	-	2237 in Jurkat-T cells 17 in nonfat milk	[31]
	16	DZMOF-FDP	40	1:5000	-	1871 in HeLa cells 15 in nonfat milk	[32]
Lewis acid-base effect & hydrophilic effect	17	MNPs-(POM/CYECS)	0.02	-	20 cycles	16 in human saliva 11 in A549 cell lysates	[33]
	18	Hf-1,3,5-tris(4-carboxyphenyl) benzene	0.4	1:1000	-	4 in nonfat milk 19 in human saliva	[34]

Continued

Lewis acid-base effect & Electrostatic interaction with amino groups	19	M-CB[6]@CaTiO ₃	0.2	1:10000	7 cycles	17 in nonfat milk 4 in human serum	[35]
	20	Fe ₃ O ₄ @PDA@UiO-66-NH ₂	0.02	1:500	-	1693 in MOLM-13 cells 4 in human serum	[36]

*蛋白质的摩尔比(molar ratio of proteins)。

3. 基于静电作用的富集材料

经典 IMAC 材料固定的金属离子密度不高, 因而不易实现磷酸化多肽的高效率富集, 并且普遍存在金属离子丢失等问题[37] [38] [39] [40], 于是, 用有正电荷属性的官能团(例如, 氨基、胺基、胍基等)代替金属离子成为不少新型材料的设计思路。一般认为此类官能团与磷酸化肽之间形成了静电作用, 主要涉及离子交换、氢键等作用形式。一方面, 在酸性不是很强的情况下氨基即可被质子化, 而此条件下磷酸基往往仍然呈现负电荷状态, 两者之间存在异性电荷吸引力(图 2) [17] [22]; 另一方面, 磷酸基中含孤对电子的 O 原子可以与胺基形成氢键(图 3) [19] [41]。总之, 通过材料表面的氨基/胺基与磷酸基产生相互作用, 可较为选择性地捕获磷酸化肽。

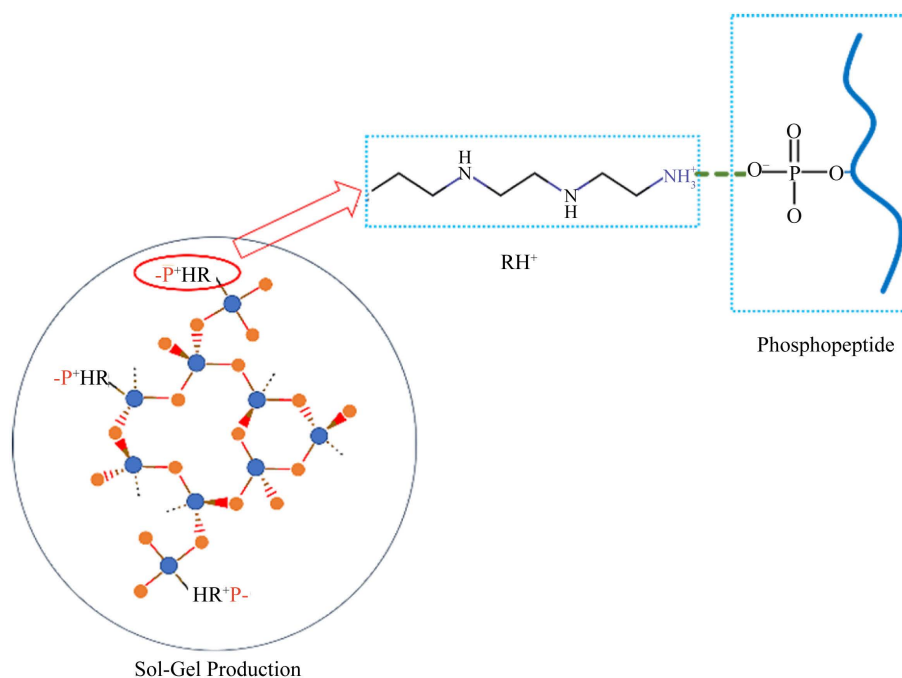


Figure 2. Schematic diagram of enrichment principle for amino-functionalized materials [17]. The phosphopeptide is captured by the amino group at the end of the material due to the interaction between ions

图 2. 氨基功能化材料的富集示意图[17]。材料末端的氨基通过离子之间的相互作用将磷酸肽捕获

3.1. 基于与氨基/胺基的静电作用

利用被氨基/胺基功能化的溶胶-凝胶可从 0.2 pmol 的 β -酪蛋白(β -casein)、10 pmol 的牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)混合酶解物中鉴定 4 条磷酸化多肽, 而在未被富集的样品中几乎检测不到目

标肽[17]。将该材料填充到移液器吸头中制备成固相萃取小柱后,可从 25 μL 的脱脂牛奶(中鉴定 25 条磷酸化多肽[17],初步表明氨基/胺基功能化的材料在复杂生物样品的磷酸化修饰分析方面有重要的开发价值。聚酰胺-胺(poly(amidoamine), PAMAM)是一种富含氨基/胺基的亲水性树枝状分子,可作为有生物相容性的材料发挥作用。被 PAMAM 功能化的复合纳米微球对磷酸化多肽有着良好的选择性(β -casein/BSA = 1:500)以及抗干扰性,使用该材料可从 55 μL 的脱脂牛奶中鉴定 20 条磷酸化多肽;0.5 mL 人唾液中鉴定 17 条内源性磷酸化肽[27]。另外,因溶液的极性与酸度会影响材料的富集效率与选择性,故可以通过调节缓冲液、洗脱液的组成从而实现单磷酸化与多磷酸化肽的分别富集[27]。

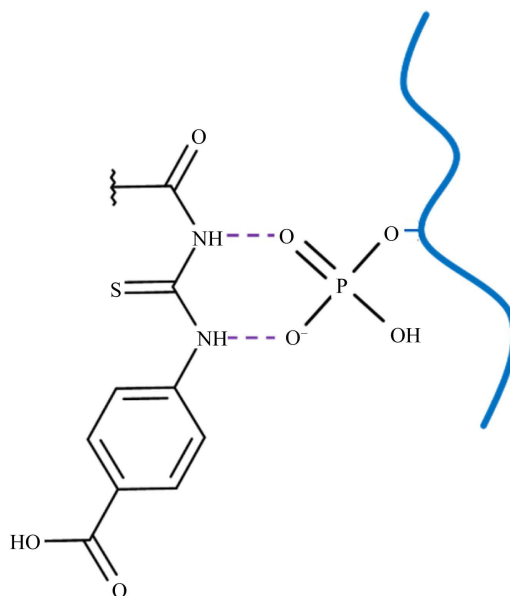


Figure 3. Schematic diagram of enrichment principle for amine-functionalized materials [19]. The amine group on the surface of the material forms a hydrogen bond with the phosphopeptide

图 3. 胺基功能化材料的富集示意图[19]。材料表面的胺基与磷酸肽形成氢键

尽管蛋白质的酪氨酸残基上可以发生磷酸化修饰(图 1),但相对丰度太低,可能仅占总磷酸化位点数量的 0.05% [42],这导致经典 MOAC 方法在富集含磷酸化酪氨酸的多肽(tyrosine-phosphorylated peptides, pY peptides)方面较为乏力。于是,一些研究者将目光转移至其他材料上。使用含有胺基的分子印迹聚合物处理复杂的生物样品(目标肽与小鼠脑组织裂解物的含量比为 1 pmol:0.2 μg),研究者可以鉴定其中全部的 4 条 pY 肽;使用 TiO_2 只能鉴定 3 条且非目标肽较多[18],这一结果初步表明,基于胺基的材料有望被应用于对 pY 肽有更优选择性的富集方法中。

一种含胺基的共聚物,其聚合物链在适宜 pH 条件下可由收缩态转变为溶胀态,由此被暴露出的胺基能够用于捕获磷酸化肽;当 pH 降至 2.0 时,分子间的作用力遭到破坏,磷酸化肽即被释放[19]。特别值得一提的是,该材料对多磷酸化肽有卓越的富集效果,能够从 50 μg 的 HeLa 细胞裂解物中鉴定 1257 条磷酸化肽,其中超过 70% 为多磷酸化;而使用 TiO_2 鉴定到的多磷酸化肽总量少于 15% [41]。而且,因聚合物对磷酸苯酯和磷酸氢盐的结合能力有差异,使得其对 pY 肽、含磷酸化丝氨酸/苏氨酸的多肽有不同的吸附能力,选择性较 IMAC 和 MOAC 材料更加灵活[41]。另外,因含唾液酸修饰的糖基化多肽可通过相似的原理被捕获,故而该材料能够同时富集生物样品中的磷酸化肽与唾液酸化糖肽[19],为开发多层

次的翻译后修饰多肽富集技术提供了一种新的思路。聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)可在宽 pH 范围内(pH = 3~11)保持带正电荷状态,继而与磷酸基产生以离子交换为主导的相互作用。被 PEI 包覆的纳米粒子对 α -酪蛋白(α -casein)与 β -酪蛋白酶解物的富集灵敏度可达 5 fmol 且选择性非常高(β -casein/BSA = 1:1000) [20]。应用此材料能够从 1.0 mg 的脱脂奶粉中检测到 11 条磷酸化肽且近乎无非磷酸化肽,进一步表明其拥有良好的选择性。被 PEI 功能化的大粒径介孔二氧化硅可被填充到移液器枪头中,制备成固相萃取小柱。此小柱对 β -酪蛋白酶解物的富集灵敏度达到 10 fmol; 使用其能够从 0.05 μ L 的脱脂牛奶中鉴定 19 条磷酸化肽; 从 0.5 mg 的小鼠脑组织裂解物中鉴定 2251 条, 而使用商业化的 TiO₂ 材料仅能鉴定 1520 条[22]。这些结果表明, 以 PEI 为核心的富集材料拥有卓越的灵敏度与选择性, 可能成为替代 MOAC 材料的强有力竞争者。

综合而言, 引入适当密度的氨基/胺基可有效地增强材料对磷酸化多肽(特别是多磷酸化肽)的灵敏度与选择性(表 1 No.1~6), 相关思路应当是富集技术的重要发展方向之一。

3.2. 基于与三嗪类物质的静电作用

以三嗪为基础的材料具有亲和力强、选择性好、稳定性高、开发速度快、成本低等优点, 在蛋白质组学研究中已有较为广泛的应用, 可作为亲和配体用于分离纯化蛋白质[43] [44] [45] [46]。被组胺和苯乙胺修饰的三嗪配体, 在 pH = 3 时能够对单磷酸化肽、多磷酸化肽表现出高结合能力和选择性, 而且, 当配体被固定在磁性纳米粒子上时表现更佳, 可能与粒子形态增加了官能团(主要是胺基)的密度有关[47]。应用此材料, 可以从 α -酪蛋白、 β -酪蛋白、BSA 的混合酶解物中鉴定 9 条磷酸化多肽, 富集效果与常规的 Ti⁴⁺-IMAC 材料相当[47]。

以三嗪环为基本组成单元的石墨相氮化碳(graphitic carbon nitride, g-C₃N₄), 因含氮量高而表现出明显的富电子表面特性, 可被视为一种阴离子交换材料[22]。有研究者使用被 g-C₃N₄ 包覆的磁性二氧化硅微球可从 1.0 μ L 的脱脂牛奶酶解物中鉴定 20 条磷酸化肽; 也可从 0.5 mg 的小鼠脑组织裂解物中鉴定出 2576 条, 在总检测多肽中占比超过 80%, 而使用商业化的 TiO₂ 材料仅能鉴定 1236 条[22]。这些结果充分展现了以 g-C₃N₄ 为核心的材料的高灵敏度与高选择性, 可能成为替代 MOAC 材料的另一个重要选择。值得一提的是, 微球与 TiO₂ 富集结果的重叠率并不高, 这可能意味着, 除材料自身的性质外, 富集原理对可鉴定的磷酸化多肽种类也有显著影响。

3.3. 基于与胍基的静电作用

类相比于氨基/胺基, 胍基可以依据相似的原理富集磷酸化肽。使用被胍基功能化的石墨烯, 能够从 0.4 μ M 的 α -酪蛋白酶解液中富集 3 条单磷酸化肽、11 条多磷酸化肽[23]。该方法对具有连续磷酸化修饰的多肽呈现出高富集能力, 据推测可能与易于形成盐桥效应(Salt bridge)有关。在酸性不是很强的情况下, 多肽含有的连续磷酸基能够与石墨烯表面散布的胍基形成盐桥效应, 从而显著增强了此类多肽被富集的效率[23]。利用共价有机骨架(covalent organic frameworks, COFs)材料的表面积大、孔隙率高、可修饰位点多等特点, 可将胍基高密度地分布于材料表面, 从而实现磷酸化肽的高效率富集。与一种商业化的 MOAC 材料相比, 该 COF 材料对 β -酪蛋白酶解物中的磷酸化肽选择性更高(β -casein/BSA = 1:1000), 检测限更低(0.5 pM) [25]。不仅如此, 应用此材料可从 10 μ L 的人唾液样品中鉴定 63 条内源性磷酸化肽, 其也显现出了优越的抗干扰性[25]。另外, 被胍基功能化的材料甚至可以用于富集完整的磷酸化蛋白质。当非磷酸化蛋白质与 β -酪蛋白或卵清蛋白(ovalbumin, OVA)的质量比小于 40 时, 含有胍基的二氧化硅磁珠均能够提供较高的富集效率(超过 50%); 即便将磁珠用于富集真实生物样品中的 β -酪蛋白、OVA, 目标蛋白的损失量也不大, 展现了其对磷酸化蛋白质的高结合能力与高选择性[24]。

作为合成蛋白质的基本氨基酸之一，精氨酸经常作为有生物相容性的胍基供体。聚精氨酸能够提供连续的胍基，使用其包覆的金刚石纳米粒子可与同一条肽段形成多个相互作用位点，从而对多磷酸化肽有良好的富集效率与选择性。该材料对 α -酪蛋白酶解物的检测限达 1.0 nM；可从 1.0 pmol 的 β -酪蛋白酶解物中仅鉴定出四磷酸化多肽，而使用商品化的 IMAC、MOAC 材料可以同时富集到单磷酸化与多磷酸化多肽，其对后者的选择性并不强[26]。通过羧基将精氨酸固定到复合纳米微球表面后，同时富含胍基与氨基的微球显现出优异的灵敏度(1.0 pM 的 β -酪蛋白)以及良好的选择性(β -casein/BSA = 1:500) [28]。使用此微球可从 0.5 mg 的大鼠脑组织裂解物中鉴定出 1059 条磷酸化多肽，包括近 13% 的多磷酸化肽，表明其在高通量的磷酸化修饰分析方面有着不错的应用潜力[28]。

综合而言，基于静电作用的材料，其富集性能一般优于经典的 IMAC、MOAC 材料，而功能基团的密度与空间分布情况是影响其性能的关键因素。一方面，含高密度基团的材料往往富集性能也相对优越(例如，被 PEI 功能化的材料)；另一方面，含连续正电荷官能团的材料会对多磷酸化肽呈现更高的选择性与灵敏度(例如，含胍基的材料)。不过，当功能基团密度过高时富集性能也会降低，需要考虑材料结构在吸附位点与空间位阻、分子间氢键之间的平衡[27]。

3.4. 其他基于离子交换作用的富集材料

正如前文所述，基于离子交换作用富集磷酸化肽是一种可行的策略。事实上，已有研究者通过引入季铵基等方式发展了以阴离子交换为核心的材料。采用被季铵化的纤维素/壳聚糖微球富集磷酸化肽，其对 β -酪蛋白酶解物的灵敏度达到 10 fmol；可从 25 μ L 的脱脂牛奶中鉴定 15 条磷酸化肽[29]。另一个有趣的研究则是将丝瓜海绵(luffa sponge)季铵化。基于此天然高分子材料的高孔隙率、低密度、多活性基团等特性[48]，可将大量季铵基分布于材料表面，使其呈现出强阴离子交换能力[30]。此被修饰过的丝瓜海绵对 β -酪蛋白酶解物的灵敏度约为 30 fmol；应用其可从脱脂牛奶中鉴定 21 条磷酸化肽，而使用 TiO₂ 仅能鉴定 13 条[30]。不过，相对于被氨基/胺基修饰的材料而言，季铵化材料的富集性能并不突出(表 1 No.13~16)，这可能与其选择性不强有关，有待进一步被优化。

冠醚常作为金属离子的配位剂发挥作用，不过，有研究者将聚(二苯并-18-冠-6)(poly(dibenzo-18-crown-6), PDC)质子化后，发现其也可以依赖于离子间的作用力而捕获磷酸化多肽。使用被质子化的 PDC，能够从 5.0 μ g 的 α -酪蛋白、 β -酪蛋白、OVA 混合物的酶解液中鉴定 19 条磷酸化肽，在鉴定数量与信号强度方面均优于 TiO₂ 材料[49]。考虑到 PDC 是一种易于获得的材料，其可能成为短期内替代 TiO₂ 的不错选择。

4. 基于配体交换作用的富集材料

基于 MOAC 材料的方法，一般是通过金属离子与磷酸基之间的路易斯酸碱作用捕获磷酸化肽。然而，材料表面其实并不均匀，导致各吸附位点对磷酸基的吸附能力存在强弱差异，而且，其对羧基也有较强的吸附能力。于是，有研究者采取逆向思维方式以弱化材料的缺陷。先将 MOAC 材料用磷酸基修饰，然后磷酸化多肽可通过配体交换作用竞争性地与吸附能力弱的位点结合(图 4)，从而使得目标肽在被富集后避免出现难以被洗脱等问题；与此同时，因羧基对磷酸基的交换能力较差，降低了材料对非磷酸化肽的吸附概率，有效地增强了富集过程中的选择性[32] [50]。

利用被磷酸修饰的二氧化锆(1P-ZrO₂)，能够从 1.0 mg 的 Jurkat-T 细胞酶解物中鉴定 2237 条磷酸化肽，在检测到的总多肽中占比超过 75%；而使用 ZrO₂ 仅能鉴定 1002 条，在总多肽中占比不足 15% [50]，由此可见，被磷酸修饰的 MOAC 材料的灵敏度与选择性均得到了显著提升。然后，研究者们进一步发现，通过调整基质与磷酸基供体的类型，可以只增强材料对多磷酸化肽的选择性而忽视包括单磷酸化肽在内

的其他多肽。一种被二磷酸化果糖修饰的有双金属中心的有机骨架材料(diphosphorylated fructose-modified dual-metal-centered zirconium-organic framework, DZMOF-FDP)材料对多磷酸化肽表现出了高特异性的亲和力(图 4), 灵敏度可达 40 fmol (β -酪蛋白酶解物) [32]。使用 DZMOF-FDP 能够从 0.2 mg 的 HeLa 细胞裂解物中鉴定 1871 条多磷酸化肽, 在检测到的总磷酸化肽中占比超过 70%; 而使用未被磷酸基修饰的 DZMOF 仅能鉴定 605 条, 在总磷酸化肽中占比不足 20% [32], 这一对比结果充分展现了以磷酸基为中心的配体交换作用在富集多磷酸化肽方面的巨大应用潜力。

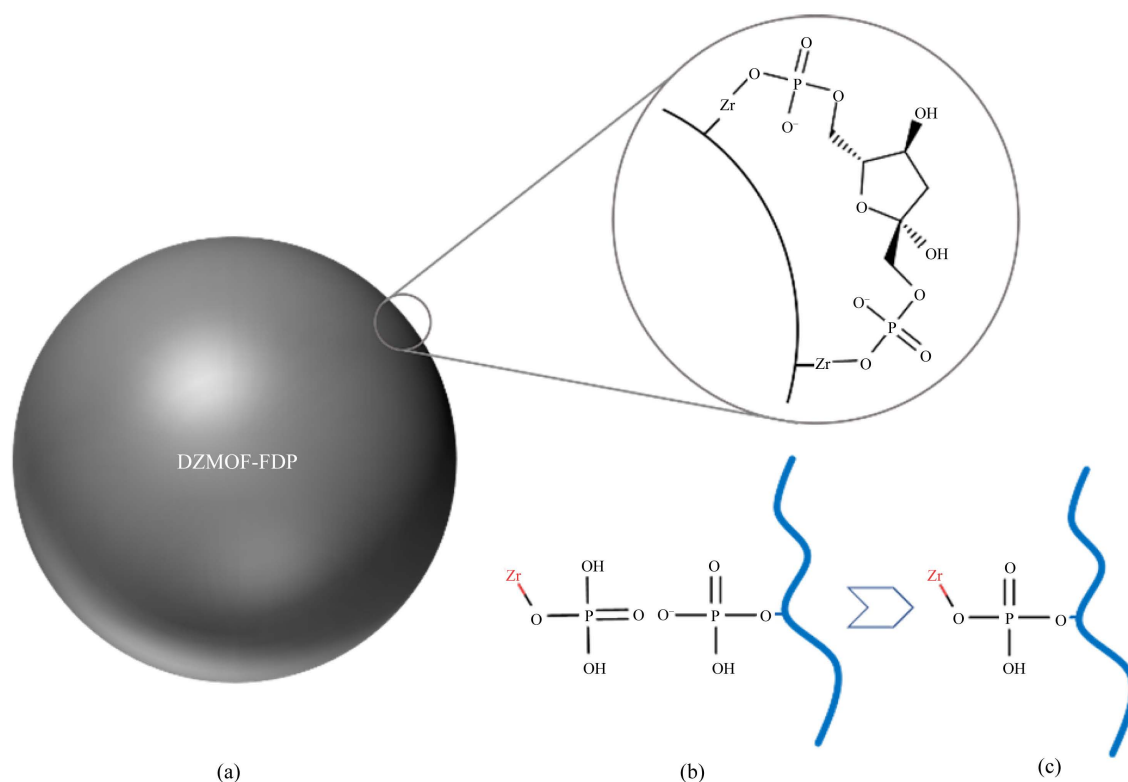


Figure 4. DZMOF-FDP for selective enrichment of phosphopeptides [32]. (a) DZMOF-FDP; (b) before enrichment; (c) the phosphate group on the peptide binding to Zr ions through competitive coordination

图 4. DZMOF-FDP 用于选择性富集磷酸肽[32]。(a) DZMOF-FDP; (b) 富集前; (c) 多肽上磷酸基团通过竞争配位与 Zr 离子结合

5. 基于混合作用的富集材料

赋予材料多种功能基团以实现几种相互作用的联合应用, 也是一种发展富集材料的思路。类似于 MOAC 材料, 金属氧酸盐(polyoxometalates, POMs)也具有金属氧化物的表面特征, 基于此, 有研究者将其与半胱胺盐酸盐修饰的壳聚糖(cysteamine hydrochloride-modified chitosan), 以层层组装的方式包覆在磁性纳米粒子表面, 从而制备了一种拥有金属氧化物表面特征、正电荷属性且能提供亲水作用的材料[16] [33]。该纳米粒子对 β -酪蛋白酶解物的灵敏度高达 0.02 fmol; 选择性可达 1:5000 (β -casein/BSA), 呈现了目前已报道材料中几乎最好的富集效果。应用此材料能够从 3.0 μ L 的脱脂牛奶中鉴定 15 条磷酸化肽以及 5.0 μ L 的人唾液中鉴定 16 条内源性磷酸化肽, 并且几乎无非磷酸化肽被检测到, 进一步凸显了其高选择性[33]。

在磷酸化多肽富集方面, 钙钛矿可视为一种特殊形式的 MOAC 材料, 几年前已有其应用于该领域的

报道[51]。与经典的 MOAC 材料类似, 钙钛矿对含磷酸化丝氨酸/苏氨酸的多肽有良好的富集性能[51], 但对 pY 肽的捕获能力不强; 葫芦脲(cucurbit[n]uril, CB[n])则对含芳香环的多肽有不错的选择性[52]。有研究者将两种特性结合在一起, 制备了一种复合型材料(M-CB[6]@CaTiO₃), 其中, 钙钛矿部分通过路易斯酸碱作用捕获单磷酸化与多磷酸化肽; 葫芦脲部分则通过其空腔以及羰基与氨基酸间的静电作用较为选择性地富集 pY 肽[35]。该材料对 β -酪蛋白酶解物的灵敏度可达 0.2 fmol, 选择性甚至高达 1:10000 (β -casein/BSA), 表现出特别优异的抗干扰能力; 使用其能够从 0.2 mg 的 MOLM-13 细胞裂解物中鉴定 1693 个磷酸化位点, 包括 6.7% 的酪氨酸位点[35]。正如前文所述, pY 肽相对丰度低且分离难度高, 而此复合材料在捕获主要磷酸化肽的同时也对 pY 肽呈现出良好的富集效果, 或许能够在全局磷酸化修饰分析方面展现应用价值。

有一种被 2-氨基对苯二甲酸修饰的金属有机骨架(metal organic frameworks, MOFs)材料(Fe₃O₄@PDA@UiO-66-NH₂), 在糖基化多肽与磷酸化多肽富集方面均有不错表现, 尤其对后者而言, 选择性可达 1:500 (β -casein/BSA) [36], 这可能得益于金属离子、氨基/胺基与磷酸基团产生了双重作用。即便从磷酸化修饰很稀少的血清样品(2.0 μ L)中, 使用该 MOF 材料依然能鉴定出包括 4 条内源性肽在内的 37 条磷酸化肽, 充分展现了其强抗干扰能力。另有一种二维 MOF 材料(Hf-1,3,5-tris(4-carboxyphenyl)benzene), 同时利用了金属离子对磷酸基的吸附力、配体与多肽间的疏水相互作用。通过配体调节金属离子与多肽间的作用力强度, 从而实现了对单磷酸化肽的选择性富集[34]。此材料对 β -酪蛋白酶解物的选择性达到 1:1000 (β -casein/BSA); 使用其能够从人唾液中鉴定 17 条内源性磷酸化肽。

与其他材料比较而言, 运用混合富集原理的材料, 可能在特定类型的磷酸化多肽富集方面有一定的优势, 有着更高的灵敏度以及选择性(表 1 No.17~20), 是颇有探索价值的发展方向。

6. 结论与展望

以质谱为核心的磷酸化蛋白质组学技术, 是当前在高通量磷酸化修饰分析方面最主要的手段。然而, 因生物体内的磷酸化肽/蛋白具有分布广泛、含量低、持续动态变化等特征, 导致直接的质谱分析往往只能获得有限的信息, 于是, 在质谱分析之前的富集处理成为提高效率的关键因素之一。尽管基于 IMAC 法、MOAC 法的富集材料已在相关领域得到广泛应用, 但它们均存在较为严重的缺陷, 这促使不少科研工作者们不断挑战新的材料。

近十年来, 研究者们已经发展了几十种不同于 IMAC 与 MOAC 原理的材料(表 1), 它们的富集效果普遍优于经典方法, 正逐渐形成磷酸化多肽富集技术的一个新分支, 为磷酸化修饰的生物学意义研究提供了强力支撑。概括而言, 大部分新型材料通过以离子交换、氢键为主导的静电作用参与捕获磷酸化多肽, 其中, 以 PEI、g-C₃N₄ 为代表的拥有高密度氨基/胺基的材料表现良好; 富含胍基的材料、基于配体交换作用的材料在多磷酸化肽的富集方面有重要的应用潜力; 以氢键为主导的材料、基于混合作用的材料在特定类型的多肽分析方面显现优势, 例如, 磷酸化肽与糖基化肽的同时富集、单磷酸化肽与多磷酸化肽的分别富集、强化对包含特定氨基酸类型的磷酸化多肽的富集等。尽管这些新型材料已拥有不俗的表现, 但发展简单快捷的富集技术以及推广新的技术, 仍然是当前磷酸化蛋白质组学领域的重要目标, 也是我们深化对磷酸化修饰认知的必经过程。另外, 当前的材料主要用于富集含磷酸化丝氨酸/苏氨酸的多肽而较少涉及其他类型的磷酸化肽, 相关应用有待进一步被拓展。

基金项目

本文由国家自然科学基金项目(No.21976069)资助。

参考文献

- [1] Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., *et al.* (2004) Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome. *Cell*, **117**, 699-711. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.018>
- [2] Cohen, P. (2002) The Origins of Protein Phosphorylation. *Nature Cell Biology*, **4**, E127-E130. <https://doi.org/10.1038/ncb0502-e127>
- [3] 姜铮, 王芳, 何湘, 刘大伟, 陈宣男, 赵红庆, 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.
- [4] 隋少卉, 王京兰, 蔡耘, 钱小红. 磷酸化蛋白质组学分析和定量技术的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(3): 240-245.
- [5] Hardman, G., Perkins, S., Brownridge, P.J., Clarke, C.J., Byrne, D.P., Campbell, A.E., *et al.* (2019) Strong Anion Exchange-Mediated Phosphoproteomics Reveals Extensive Human Non-Canonical Phosphorylation. *The EMBO Journal*, **38**, e100847. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100847>
- [6] 胡晔晨, 江波, 张丽华, 张玉奎. N-磷酸化修饰蛋白质的富集和鉴定方法[J]. 色谱, 2020, 38(3): 278-286.
- [7] Besant, P.G. and Attwood, P.V. (2012) Histone H4 Histidine Phosphorylation: Kinases, Phosphatases, Liver Regeneration and Cancer. *Biochemical Society Transactions*, **40**, 290-293. <https://doi.org/10.1042/BST20110605>
- [8] Frączyk, T., Ruman, T., Wilk, P., Palmowski, P., Rogowska-Wrzesinska, A., Cieśla, J., *et al.* (2015) Properties of Phosphorylated Thymidylate Synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, **1854**, 1922-1934. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.08.007>
- [9] 梁雪芳, 赵吉, 查金苗, 王子健. 磷酸化蛋白质组学技术的发展及其在环境毒理研究中的应用[J]. 环境科学学报, 2016, 36(2): 398-412.
- [10] 赵群, 张丽华, 张玉奎. 蛋白质组学技术前沿进展[J]. 应用化学, 2018, 35(9): 977-983.
- [11] Puttick, J., Baker, E.N. and Delbaere, L.T. (2008) Histidine Phosphorylation in Biological Systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, **1784**, 100-105. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.07.008>
- [12] Jung, H., Choi, Y., Lee, D., Seo, J.K. and Kee, J.-M. (2019) Distinct Phosphorylation and Dephosphorylation Dynamics of Protein Arginine Kinases Revealed by Fluorescent Activity Probes. *Chemical Communications*, **55**, 7482-7485. <https://doi.org/10.1039/C9CC03285A>
- [13] 梁前进, 王鹏程, 白燕荣. 蛋白质磷酸化修饰研究进展[J]. 科技导报, 2012, 30(31): 73-79.
- [14] 邱碧霞, 许亚丽, 翟颖红, 周蓓, 苏宇杰. 金属氧化物富集磷酸肽的研究进展[J]. 现代食品, 2016, 3(5): 9-10.
- [15] 侯恒磊, 池伟亚, 安宁, 公丕胜, 靳海波, 齐莉, 等. 固定化金属亲和层析介质在蛋白纯化中的应用进展[J]. 当代化工研究, 2020(3): 1-4.
- [16] 熊芳芳, 江丹丹, 贾琼. 功能化磁性纳米材料在磷酸化肽富集中的应用[J]. 色谱, 2020, 38(1): 60-65.
- [17] Atakay, M., Celikbiçak, O. and Salih, B. (2012) Amine-Functionalized Sol-Gel-Based Lab-in-a-Pipet-Tip Approach for the Fast Enrichment and Specific Purification of Phosphopeptides in MALDI-MS Applications. *Analytical Chemistry*, **84**, 2713-2720. <https://doi.org/10.1021/ac203008u>
- [18] Chen, J., Shinde, S., Subedi, P., Wierzbicka, C., Sellergren, B., Helling, S., *et al.* (2016) Validation of Molecularly Imprinted Polymers for Side Chain Selective Phosphopeptide Enrichment. *Journal of Chromatography A*, **1471**, 45-50. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.018>
- [19] Lu, Q., Chen, C., Xiong, Y., Li, G., Zhang, X., Zhang, Y., *et al.* (2020) High-Efficiency Phosphopeptide and Glycopeptide Simultaneous Enrichment by Hydrogen Bond-based Bifunctional Smart Polymer. *Analytical Chemistry*, **92**, 6269-6277. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02643>
- [20] Chen, C.T., Wang, L.Y. and Ho, Y.P. (2011) Use of Polyethylenimine-Modified Magnetic Nanoparticles for Highly Specific Enrichment of Phosphopeptides for Mass Spectrometric Analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **399**, 2795-2806. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4623-6>
- [21] Zhu, G.T., He, X.M., He, S., Chen, X., Zhu, S.-K. and Feng, Y.-Q. (2016) Synthesis of Polyethylenimine Functionalized Mesoporous Silica for In-Pipet-Tip Phosphopeptide Enrichment. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **8**, 32182-32188. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b10948>
- [22] Zhu, G.T., He, X.M., Chen, X., Hussain, D., Ding, J. and Feng, Y.-Q. (2016) Magnetic Graphitic Carbon Nitride Anion Exchanger for Specific Enrichment of Phosphopeptides. *Journal of Chromatography A*, **1437**, 137-144. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.080>
- [23] Xu, L.N., Li, L.P., Jin, L., Bai, Y. and Liu, H.-W. (2014) Guanidyl-Functionalized Graphene as a Bifunctional Adsorbent for Selective Enrichment of Phosphopeptides. *Chemical Communications*, **50**, 10963-10966. <https://doi.org/10.1039/C4CC04327H>

- [24] Deng, Q., Wu, J., Chen, Y., Zhang, Z., Wang, Y., Fang, G., *et al.* (2014) Guanidinium Functionalized Superparamagnetic Silica Spheres for Selective Enrichment of Phosphopeptides and Intact Phosphopeptides from Complex Mixtures. *Journal of Materials Chemistry B*, **2**, 1048-1058. <https://doi.org/10.1039/C3TB21540G>
- [25] Luo, B., Yu, L., He, J., Li, Z.Y., Lan, F. and Wu, Y. (2020) Design of Guanidyl-Functionalized Magnetic Covalent Organic Framework for Highly Selective Capture of Endogenous Phosphopeptides. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **1145**, Article ID: 122080. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122080>
- [26] Chang, C.K., Wu, C.C., Wang, Y.S. and Chang, H.-C. (2008) Selective Extraction and Enrichment of Multiphosphorylated Peptides Using Polyarginine-Coated Diamond Nanoparticles. *Analytical Chemistry*, **80**, 3791-3797. <https://doi.org/10.1021/ac702618h>
- [27] Yu, L., Luo, B., Li, Z., He, J., Lan, F. and Wu, Y. (2020) PAMAM-PMAA Brush-Functionalized Magnetic Composite Nanospheres: A Smart Nanoprobe with Tunable Selectivity for Effective Enrichment of Mono-, Multi-, or Global Phosphopeptides. *Journal of Materials Chemistry B*, **8**, 1266-1276. <https://doi.org/10.1039/C9TB02577D>
- [28] Luo, B., Zhou, X., Jiang, P., Yi, Q., Lan, F. and Wu, Y. (2018) PAMA-Arg Brush-Functionalized Magnetic Composite Nanospheres for Highly Effective Enrichment of Phosphorylated Biomolecules. *Journal of Materials Chemistry B*, **6**, 3969-3978. <https://doi.org/10.1039/C8TB00705E>
- [29] Dai, L., Jin, S., Fan, M. and Zhou, P. (2017) Preparation of Quaternized Cellulose/Chitosan Microspheres for Selective Enrichment of Phosphopeptides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **409**, 3309-3317. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0273-2>
- [30] Dai, L., Sun, Z. and Zhou, P. (2019) Modification of Luffa Sponge for Enrichment of Phosphopeptides. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, Article No. 101. <https://doi.org/10.3390/ijms21010101>
- [31] Lu, J., Li, Y. and Deng, C. (2011) Facile Synthesis of Zirconium Phosphonate-Functionalized Magnetic Mesoporous Silica Microspheres Designed for Highly Selective Enrichment of Phosphopeptides. *Nanoscale*, **3**, 1225-1233. <https://doi.org/10.1039/c0nr00896f>
- [32] Peng, J., Niu, H., Zhang, H., Yao, Y., Zhao, X., Zhou, X., *et al.* (2018) Highly Specific Enrichment of Multi-Phosphopeptides by the Diphosphorylated Fructose-Modified Dual-Metal-Centered Zirconium-Organic Framework. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **10**, 32613-32621. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b11138>
- [33] Jiang, D., Li, Z. and Jia, Q. (2019) A Sensitive and Selective Phosphopeptide Enrichment Strategy by Combining Polyoxometalates and Cysteamine Hydrochloride-Modified chitosan through Layer-by-Layer Assembly. *Analytica Chimica Acta*, **1066**, 58-68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.04.001>
- [34] Xiao, J., Yang, S.S., Wu, J.X., Wang, H., Yu, X., Shang, W., *et al.* (2019) Highly Selective Capture of Monophosphopeptides by Two-Dimensional Metal-Organic Framework Nanosheets. *Analytical Chemistry*, **91**, 9093-9101. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01581>
- [35] Zheng, H. and Jia, Q. (2019) A Polymer Monolith Composed of a Perovskite and Cucurbit Uril Hybrid for Highly Selective Enrichment of Phosphopeptides Prior to Mass Spectrometric Analysis. *Microchimica Acta*, **187**, Article No. 68. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-4054-9>
- [36] Xie, Y. and Deng, C. (2017) Designed Synthesis of a "One for Two" Hydrophilic Magnetic Amino-Functionalized Metal-Organic Framework for Highly Efficient Enrichment of Glycopeptides and Phosphopeptides. *Scientific Reports*, **7**, Article No. 1162. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01341-y>
- [37] 韩彬. 固定化金属离子亲和和色谱研究进展[J]. 科技导报, 2017, 35(22): 92-100.
- [38] Zhou, H., Xu, S., Ye, M., Feng, S., Pan, C., Jiang, X., *et al.* (2006) Zirconium Phosphonate-Modified Porous Silicon for Highly Specific Capture of Phosphopeptides and MALDI-TOF MS Analysis. *Journal of Proteome Research*, **5**, 2431-2437. <https://doi.org/10.1021/pr060162f>
- [39] Xiong, Z., Zhang, L., Fang, C., Zhang, Q., Ji, Y., Zhang, Z., *et al.* (2014) Ti⁴⁺-Immobilized Multilayer Polysaccharide Coated Magnetic Nanoparticles for Highly Selective Enrichment of Phosphopeptides. *Journal of Materials Chemistry B*, **2**, 4473-4480. <https://doi.org/10.1039/C4TB00479E>
- [40] Wei, J., Zhang, Y., Wang, J., Tan, F., Liu, J., Cai, Y., *et al.* (2008) Highly Efficient Enrichment of Phosphopeptides by Magnetic Nanoparticles Coated with Zirconium Phosphonate for Phosphoproteome Analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **22**, 1069-1080. <https://doi.org/10.1002/rcm.3485>
- [41] Qing, G., Lu, Q., Li, X., Liu, J., Ye, M., Liang, X., *et al.* (2017) Hydrogen Bond Based Smart Polymer for Highly Selective and Tunable Capture of Multiply Phosphorylated Peptides. *Nature Communications*, **8**, Article No. 461. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00464-0>
- [42] Machida, K., Mayer, B.J. and Nollau, P. (2003) Profiling the Global Tyrosine Phosphorylation State. *Molecular & Cellular Proteomics*, **2**, 215-233. <https://doi.org/10.1074/mcp.R300002-MCP200>
- [43] Ruiu, L., Roque, A.C., Taipa, M.A. and Lowe, C. (2006) *De Novo* Design, Synthesis and Screening of a Combinatorial

- Library of Complementary Ligands Directed towards the Surface of Cutinase from *Fusarium solani pisi*. *Journal of Molecular Recognition*, **19**, 372-378. <https://doi.org/10.1002/jmr.782>
- [44] Roque, A.C., Taipa, M.A. and Lowe, C.R. (2005) Synthesis and Screening of a Rationally Designed Combinatorial Library of Affinity Ligands Mimicking Protein L from *Peptostreptococcus magnus*. *Journal of Molecular Recognition*, **18**, 213-224. <https://doi.org/10.1002/jmr.733>
- [45] Roque, A.C., Taipa, M.A. and Lowe, C.R. (2005) An Artificial Protein L for the Purification of Immunoglobulins and Fab Fragments by Affinity Chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1064**, 157-167. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.11.102>
- [46] Roque, A.C. and Lowe, C.R. (2006) Advances and Applications of De Novo Designed Affinity Ligands in Proteomics. *Biotechnology Advances*, **24**, 17-26. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.05.001>
- [47] Batalha, I.L., Zhou, H., Lilley, K., Lowe, C.R. and Roque, A.C.A. (2016) Mimicking Nature: Phosphopeptide Enrichment Using Combinatorial Libraries of Affinity Ligands. *Journal of Chromatography A*, **1457**, 76-87. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.032>
- [48] Saeed, A. and Iqbal, M. (2013) Loofa (*Luffa cylindrica*) Sponge: Review of Development of the Biomatrix as a Tool for Biotechnological Applications. *Biotechnology Progress*, **29**, 573-600. <https://doi.org/10.1002/btpr.1702>
- [49] Mirza, M.R., Rainer, M., Duran, S., Moin, S.T., Choudhary, M.I. and Bonn, G.K. (2019) Highly Selective Enrichment of Phosphopeptides Using Poly(dibenzo-18-crown-6) as a Solid-Phase Extraction material. *Biomedical Chromatography*, **33**, e4567. <https://doi.org/10.1002/bmc.4567>
- [50] Li, X.-S., Chen, X., Yuan, B.F. and Feng, Y.-Q. (2015) Perovskite-Modified Metal Oxides for the Highly Selective Enrichment of Phosphopeptides. *RSC Advances*, **5**, 7832-7841. <https://doi.org/10.1039/C4RA13878C>
- [51] Li, X.S., Chen, X., Sun, H., Yuan, B.-F. and Feng, Y.-Q. (2015) Perovskite for the Highly Selective Enrichment of Phosphopeptides. *Journal of Chromatography A*, **1376**, 143-148. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.036>
- [52] Rekharsky, M.V., Yamamura, H., Ko, Y.H., Selvapalam, N., Kim, K. and Inoue, Y. (2008) Sequence Recognition and Self-Sorting of a Dipeptide by Cucurbit[6]Urils and Cucurbit[7]Urils. *Chemical Communications*, **19**, 2236-2238. <https://doi.org/10.1039/b719902c>