

磷酸化蛋白质组学富集策略进展及其在疾病研究中的应用

武维新^{1,2}, 严佳^{1,2}, 谭喜莹³, 李博^{1,2}, 苏梦翔^{1,2}, 严方^{1,2*}, 狄斌^{1,2**}

(¹中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009; ²中国药科大学药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 210009; ³江苏省中医院临床药学研究室, 南京 210029)

摘要 蛋白质磷酸化是生物体内重要的翻译后修饰, 几乎参与调节着细胞增殖、信号转导、新陈代谢、肿瘤发生等过程在内的所有生命活动。对磷酸化蛋白质组的全面分析可以帮助人们深入了解磷酸化蛋白在生命过程中的作用, 协助发现生物标志物, 辅助疾病的诊疗。然而, 磷酸化蛋白丰度低、信号被非磷酸化肽段所掩盖等问题限制了磷酸化蛋白质组学的发展。因此, 亟需开发高效的富集策略, 如设计新型纳米材料, 合并多种分析方法等, 以提高检测灵敏度、富集特异性, 增大富集容量。本文回顾了近年来磷酸化蛋白质组学研究策略中的富集策略进展及其在疾病研究中的应用。

关键词 磷酸化蛋白质组学; 富集策略; 新材料; 疾病研究

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2016)01-0019-11

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160103

引用本文 武维新, 严佳, 谭喜莹, 等. 磷酸化蛋白质组学富集策略进展及其在疾病研究中的应用[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(1): 19-29.
Cite this article as: WU Weixin, YAN Jia, TAN Xiying, et al. Advances in enrichment strategies for phosphoproteomics and its application in the research of disease[J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 47(1): 19-29.

Advances in enrichment strategies for phosphoproteomics and its application in the research of disease

WU Weixin^{1,2}, YAN Jia^{1,2}, TAN Xiying³, LI Bo^{1,2}, SU Mengxiang^{1,2}, YAN Fang^{1,2*}, DI Bin^{1,2**}

¹Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ²Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance (China Pharmaceutical University), Ministry of Education, Nanjing 210009; ³Research Division of Clinical Pharmacy, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

Abstract Protein phosphorylation is one of the most common post-translational modifications (PTMs) in various organisms, which plays critical roles in the regulation of intracellular biological processes such as cell proliferation, signal transduction, metabolism and tumorigenesis. The understanding of phosphoproteomics is playing a great role in biomarker discovery, auxiliary treatment, as well as biological process exploration. However, the identification and characterization of phosphoproteins remain challenging due to their low abundance and the signal suppression of nonphosphorylated peptides. Thus, extraction of phosphorylated polypeptides from complex mixtures is a critical step in the success of phosphoproteomics experiments. Some strategies have been explored to promote enrichment specificity, detection sensitivity and enrichment capacity, such as design of new nanomaterials or combination of a variety of analytical methods. This review places special emphasis on the recent four-year advances for enrichment strategies that have been used for phosphoproteomics and summarize the application of phosphoproteomics in disease research.

Key words phosphoproteomics; enrichment strategy; new material; disease research

收稿日期 2015-11-24 通信作者 *Tel:025-83271269 E-mail:cpuyanfang@hotmail.com

**Tel:025-83271269 E-mail:cpudibin@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81202500); 江苏省自然科学基金资助项目(No. BK20141356); 药物质量与安全预警教育部重点实验室资助项目(No. DQCP2015MS05)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81202500); the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20141356); and the Open Project Program of MOE Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance(No. DQCP2015MS05)

随着人类基因组计划的成功,1994年 Wilkins 课题组首次提出了蛋白质组(proteome)的概念^[1],即基因组所表达的全部蛋白质。近年来,具有重要功能和生理学意义的蛋白质翻译后修饰已成为蛋白质组学研究的重点之一。它不仅调节着蛋白质本身的活性状态、定位、折叠以及蛋白间的相互作用,在细胞的生物学过程中也起着关键作用,能帮助了解生物体的生命过程,为疾病的预测、诊疗提供依据。目前已报道的翻译后修饰超过200种,常见的有磷酸化、糖基化、甲基化、乙酰化和泛素化修饰等,其中对磷酸化修饰研究较为深入。但蛋白质样品中磷酸化蛋白质/肽丰度低的问题制约了磷酸化蛋白质组学的发展。因此,发展新型高效的富集策略对磷酸化蛋白/肽的分析和磷酸化蛋白质组学的研究具有十分重要的意义。本文综述了近年来磷酸化蛋白质组学研究中的富集策略及其在疾病研究中的应用。

1 磷酸化蛋白质组学

蛋白质的磷酸化修饰是由蛋白质激酶催化,将ATP上的磷酸基转移到蛋白质氨基酸残基上的过程。在哺乳动物细胞整个生命活动中,1/3以上的蛋白质发生了磷酸化修饰,这一可逆过程几乎调节着包括细胞增殖、分化、凋亡、信号转导、新陈代谢、肿瘤发生等过程在内的所有生命活动。异常的磷酸化调节则是导致许多严重的人类疾病的原因或是某些疾病所导致的后果。磷酸化蛋白质组学的研究是从整体上认识蛋白质翻译后磷酸化修饰,为观察细胞、组织或器官中磷酸化修饰状态及变化,提供了一个全面研究视角,是对基于传统分子生物学手段以单个激酶为研究对象的研究方法的重要补充。

目前常用生物质谱技术对蛋白质磷酸化位点进行识别和鉴定,但一个细胞中的蛋白质可多达上万种,它们的动态范围又很宽(血浆中所含蛋白质浓度的动态范围达到 10^{12} 数量级),而磷酸化蛋白质在生物体内表达的含量占蛋白质总量的比例不到10%,故酶切后磷酸化肽段会被大量非磷酸化

肽段所掩盖;其次,磷酸化肽段所具有负电性使其在质谱分析正离子模式下响应很弱;再次,同一个蛋白质可能存在不同类型和位点的磷酸化修饰,且磷酸键较肽键容易断裂,造成这些修饰通常不稳定,这些都使得磷酸化蛋白质/肽的鉴定较为困难。在不经预分离的情况下无法有效地进行低丰度磷酸化蛋白质/肽的鉴定分析,因此,高效分离富集技术的发展对磷酸化蛋白/肽进行有效鉴定具有十分重要作用。

2 磷酸化蛋白质组学的富集策略

目前复杂蛋白质混合物的分析主要采取两种模式,即“top down”和“bottom up”分离模式。“top down”是指在蛋白水平上对混合物进行分离,随后进行酶解和质谱鉴定,“bottom up”则是先将提取的总蛋白酶切后转化为肽段混合物,再进行分离和质谱鉴定。因此,磷酸化蛋白质组学富集可以分为基于蛋白质水平和肽段水平的富集方法。

2.1 磷酸化蛋白质的富集策略

磷酸化蛋白的富集方法原理是基于磷酸基团的化学、物理性质而建立的,目前最常用的是免疫沉淀富集法,即利用抗体特异性的识别磷酸化蛋白并与其结合,从而富集得到磷酸化蛋白;可进一步通过质谱技术进行定量。Zheng等^[2]采用细胞培养中氨基酸稳定同位素标记技术(stable isotope labeling with amino acids in cell cultures, SILAC)方法,用EphrinB1-Fc刺激NG-108标记的细胞,用抗酪氨酸抗体PY99免疫沉淀富集了磷酸化酪氨酸蛋白质,酶切后经LC-MS/MS分析,共鉴定了127个磷酸化酪氨酸蛋白。

但由于抗体抗原反应的特异性,该法的富集效果和选择性就受到所选抗体的局限。根据磷酸化残基的不同,已经有多种商品化的抗体,其中,抗磷酸酪氨酸抗体具有较好的富集效果,而磷酸化丝氨酸和苏氨酸的抗原由于决定簇较小、空间位阻大而选择性较差,故应用较少。此外,抗体昂贵的价格也限制了其在磷酸化蛋白质组学研究中的广泛应用。

2.2 磷酸化肽段的富集策略

目前磷酸化蛋白质组学研究中多对磷酸化肽段进行富集,不但可以对富集的磷酸化肽段进行定量,还可以鉴定可能的磷酸化位点。该法的富集策略主要从提高磷酸化肽段的富集容量、富集的选择性及灵敏度几个方面进行考虑,包括了基于色谱方法的预分离技术、固定金属离子亲和色谱法(immobilized metal affinity chromatography, IMAC)及金属氧化物亲和色谱法(metal oxide affinity chromatography, MOAC)等多种方法。

2.2.1 基于色谱方法的预分离技术 基于色谱方法的预分离技术原理是液相色谱中,磷酸化肽与固定相产生作用力而被保留,从而与非磷酸化肽段分离,再通过流动相洗脱,即得到磷酸化肽。常见的有强阳离子交换色谱(strong cation exchange chromatography, SCX)、亲水作用色谱(hydrophilic interaction chromatography, HILIC)和静电斥力亲水作用色谱(electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography, ERLIC)。SCX 固定相带负电荷,在酸性流动相体系中,与样品中带正电荷的磷酸化肽组分产生强烈的静电作用从而与非磷酸化肽分离,可通过增加流动相盐(如氯化钠或铵基盐)浓度洗脱。Beausoleil 等^[3]最早将 SCX 应用于磷酸化蛋白的富集,通过质谱鉴定到 HeLa 细胞中 2 002 个磷酸化位点。虽然 SCX 具有良好的分离效果,但是磷酸化肽段洗脱液中含高浓度的不挥发性盐,不能够直接进行质谱分析。而 HILIC 的富集是基于分子与固定相间的氢键作用,无需使用不挥发性缓冲盐体系,可以直接进行质谱分析。该法现可与其他方法联用,降低分析的复杂性,增加对磷酸化肽富集的选择性。Zappacosta 等^[4]联合 HILIC 与 Fe^{3+} -IMAC,分析时间仅为 1 d,即从小鼠肝组织中鉴定到 20 089 个磷酸化肽段,16 000 个磷酸化位点。

2.2.2 固定金属离子亲和色谱富集策略 1986 年 Andersson 等^[5]首次应用 IMAC 在琼脂糖凝胶上修饰了亚氨基二乙酸(IDA)用于鸡卵白蛋白的磷酸化蛋白质组分析。由于该法具有纯化效率高、简单易行、价格低廉等优点,已成为质谱分析磷酸化肽段中广泛采用的富集方法。其原理是在酸性条件下,固体材料表面固定的带正电荷的金属离子与带负电的磷酸基之间发生配位作用,选择性富集磷

酸化肽段。

IMAC 主要由金属离子、螯合剂和基质载体 3 个部分组成。具有富集能力的金属离子包括早期的 Fe^{3+} 、 Ga^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} ,近年来常用的 Ti^{4+} 、 Zr^{4+} 和稀土金属 La^{3+} 、 Ho^{3+} 等。

基质载体与螯合剂或金属离子连接时,常常使用硅烷偶联剂,3-缩水甘油醚丙基三甲氧基硅烷(GLYMO)、3-(三羟基甲硅烷基)丙基甲基磷酸单钠盐、3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)等,是常用的连接臂,可以降低固定金属离子与磷酸化肽段磷酸基团配位时的空间位阻,有利于磷酸化肽的富集。螯合剂包括传统的亚氨基二乙酸(IDA)、次氨基三乙酸(NTA)、新兴的砷酸盐($-\text{AsO}_3\text{H}_2$)、磷酸基团($-\text{PO}_3\text{H}_2$)、三磷酸腺苷(ATP)、多巴胺($\text{C}_8\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N}$)等,它们可以稳定地螯合金属离子。此外,多样的 IMAC 基质载体也不断地被开发,通过优化载体的材料种类及模式继而提高对磷酸化肽的富集能力。

基于液相色谱材料的 IMAC 富集策略

液相柱色谱是 IMAC 早期应用的形式,其中整体柱具有较大的比较面积,不同的金属离子可被固定在整体柱上进行富集。Hou 等^[6]以正硅酸乙酯(TEOS)和 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)为前体,采用溶胶-凝胶法制备整体柱担体,将 Ti^{4+} 离子进一步螯合在组胺基团上,制备出内径 250 μm 的 Ti^{4+} -IMAC 整体毛细管柱,并应用于大鼠线粒体的蛋白质组学研究,共鉴定出 224 个磷酸化肽段,而市售的 Fe^{3+} -IMAC 和 TiO_2 分别鉴定出 28 和 72 个磷酸化肽段。

开管柱传质模式为对流传质,产生的背压低于填充柱和整体柱,常通过烷基化反应在聚(苯乙烯-二乙烯基苯)上引入不同的活性基团,如通过氯甲基化反应或连接结构类似于甲基丙烯酸缩水甘油酯的化合物产生活性基团,再连接 IDA 等螯合剂,最后螯合金属离子。Elldrissi 等^[7]分别在熔融石英毛细管柱内引入聚甲基丙烯酸缩水甘油酯(PGMA)和聚环氧丙基三乙氧基硅烷(PGLYMO),以 IDA 为螯合剂螯合 Fe^{3+} ,制备了 GMA-IDA- Fe^{3+} -IMAC 和 GLYMO-IDA- Fe^{3+} -IMAC 色谱柱。经优化富集条件后,在 α -酪蛋白中鉴别出 7 个磷酸化肽段,且多磷酸化肽段的洗脱时间长于单磷酸化肽段,可通过洗脱过程区别磷酸化程度。

基于聚合物材料的 IMAC 富集策略

聚合物材料由带有活性基团的单体聚合形成, 含有足够多的金属结合位点, 大大提高了磷酸化肽段的富集容量。Saeed 等^[8]以双官能团的缩水甘油醚为单体, 通过热聚合与二乙烯基苯形成 P(GPE/DVB) 凝胶球, 对比多种金属离子后, 选择 La^{3+} 实现了对所有的磷酸化肽段的富集。所构建的 P(GPE/DVB)- La^{3+} 对 β -酪蛋白的检测灵敏度可达到 1 fmol, 回收率高达 87%, 且重现性好; 在蛋黄、牛奶复杂样本中仍能对磷酸化肽段表现出良好的选择性; 对 4 例卵巢癌患者的血清和 3 例健康人血清样本中磷酸化肽段进行富集分析后, 发现仅在卵巢癌患者的血清中出现由纤维蛋白原蛋白 (fibrinogen protein A, FPA) 产生的磷酸化肽段, 有可能成为卵巢癌诊断的标志物。

近年来以带有磷酸基团的聚合物为基质的富集材料受到关注, 如带磷酸根的螯合配体与四价金属阳离子结合后, 形成有 6 个位点的八面体配位模型结构, 可提供更多位点结合磷酸化肽段的磷酸基团。Wang 等^[9]以磁性纳米粒为核心, 采用溶胶-凝胶反应引入二氧化硅作为过渡层后包裹聚乙烯基磷酸 (PVPA), 形成 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{PVPA-Ce}^{4+}$ 核壳型微球, 对 β -酪蛋白的检测限低至 50 fmol, 在 β -酪蛋白与牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 摩尔比达到 1:100 时仍能有效富集磷酸化肽段, 富集效果明显优于市售 TiO_2 。Ma 等^[10]以磁性纳米晶簇 (MCNC) 为核心, 聚甲基丙烯酸 (PMAA) 为过渡层, 通过两步蒸馏-沉淀聚合反应包裹聚乙烯乙二醇甲基丙烯酸酯磷酸酯 (PEGMP) 外壳, 最终得到 $\text{MCNC} @ \text{PMAA} @ \text{PEGMP-Ti}^{4+}$ 复合微球 (图 1)。借助壳层键合的大量金属离子, 材料选择性极高, 对 β -酪蛋白的检测限低至 50 fmol, 在 β -酪蛋白与 BSA 摩尔比达到 1:500 时, 仍能有效富集磷酸化肽段, 回收率高达 87%。其课题组又开发出回流-沉淀聚合法, 获得了富含磷酸基团、形态均一、单分散的聚乙二醇甲基丙烯酸酯磷酸酯 (PEGMP) 凝胶球, 键合 Ti^{4+} 后, 可在 β -酪蛋白及 BSA, 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP), 肌红蛋白 (myoglobin, MYO) 混合物中高选择性的富集到 β -酪蛋白, 应用于牛奶样品中也能选择性富集到 α -酪蛋白、 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白^[11]。

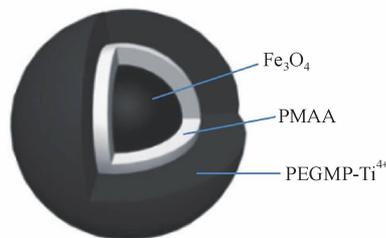


Figure 1 Structure of $\text{MCNC} @ \text{PMAA} @ \text{PEGMP-Ti}^{4+}$ microspheres^[10]

基于新材料的 IMAC 富集策略

近年来, 介孔二氧化硅、石墨烯、壳聚糖等新材料不断涌现, 作为基质载体应用于磷酸化肽段的富集。介孔二氧化硅具有比表面积大、稳定性好、孔道均一的特点, Li 等^[12]以二氯二茂钛为钛源, 通过一步反应直接在介孔二氧化硅上连接 Ti^{4+} , 形成 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{mSiO}_2\text{-Ti}^{4+}$ 。对 β -酪蛋白的检测限低至 10 fmol, 当 β -酪蛋白与 BSA 摩尔比为 1:100 时, 采用质谱分析可明显鉴定到 16 个磷酸位点, 效果优于市售 TiO_2 , 并成功选择性富集了人血清中内源性磷酸化肽段。值得注意的是, 当基质核心外包裹的介孔二氧化硅孔径达到 3.98 nm 时, 与未包裹材料相比, 除比表面积增大外, 还具有分子排阻功能^[30]。但小于 3 nm 的介孔通道则易被引入的长链螯合剂堵塞, 而如果介孔直径过大, 虽然可以改善介孔堵塞的状况, 但是却失去了分子排阻的功能。

石墨烯基本骨架为双面多环芳烃, 具有独特的二维单层结构, 比表面积大, 可提高磷酸化肽段的富集容量。Sun 等^[13]以石墨烯与介孔二氧化硅做为基质, 包裹聚多巴胺 (PD) 层, 改善了富集材料的亲水性和生物相容性, 开发出 Mag graphene @ $\text{mSiO}_2 @ \text{PD-Ti}^{4+}$ (简称为 $\text{Ti}^{4+}\text{-MGMSs}$) (图 2), 对 β -酪蛋白的检测灵敏度低至 0.5 fmol, 当 β -酪蛋白与 BSA 的摩尔比达到 1:500 时仍具有选择性富集的能力, 在人血清和唾液样本中也能检测到磷酸化肽段。

壳聚糖作为一种天然的聚合物, 生物相容性好, 具有稳定的基本骨架结构, 含有丰富的官能团, 易于进行化学修饰, Shen 等^[14]通过磷酸酯化反应对壳聚糖一步引入磷酸基团, 制备出以壳聚糖为基质的固定金属离子亲和色谱, 比传统应用 IDA 等螯合剂及 POCl_3 引入磷酸基团的方法简便易行。

得到的壳聚糖钛超细微粒,在酸性缓冲液中分散性良好,对 α -酪蛋白检测限低至 2 pmol,当 α -酪蛋白与 BSA 摩尔比达 1:200 时可高效检测到 12 个磷酸化肽段,在拟南芥样品中鉴定出 29 个磷酸化蛋白和 40 个磷酸化位点。

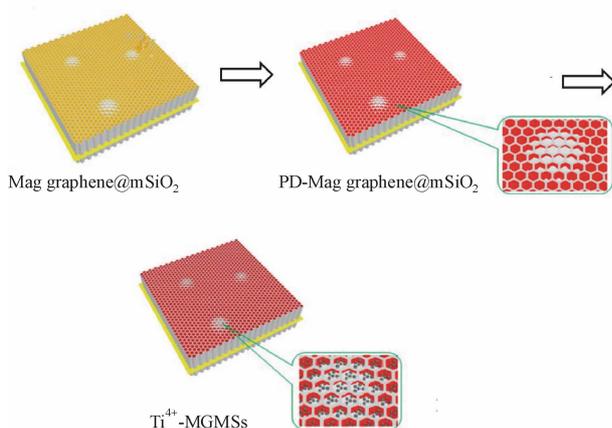


Figure 2 Synthetic procedure for Ti^{4+} -MGMSs^[13]

除开发新型基质载体外,还对基质载体的模式进行改进,如 Shi 等^[15]在 EP 管内壁修饰 PD,固定 Ti^{4+} 后进行磷酸化肽段的富集(图 3),减少了样品损失,降低了非特异性吸附,应用于标准蛋白及人血清样品中显示出选择性富集磷酸化肽段的能力,其对 β -酪蛋白的检测限低至 40 pmol,当 β -酪蛋白与 BSA 摩尔比达 1:500 时,仍能检测到 10 个磷酸化肽段。

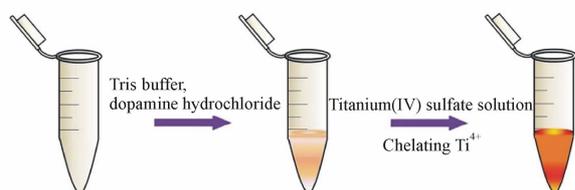


Figure 3 Synthetic procedure for Ti^{4+} -immobilized PDA-modified eppendorf tubes^[15]

2.2.3 金属氧化物亲和和色谱富集策略 MOAC 是一种应用广泛的磷酸化肽段富集技术,其具体机制尚不明确。但普遍认为,金属氧化物具有两性,在酸性条件下呈现路易斯酸,可以与带负电的磷酸基团结合,而在碱性条件下呈现路易斯碱与磷酸基团失去结合力可使磷酸化肽段被洗脱下来。虽然 MOAC 也是以金属原子为亲和位点,但与 IMAC 相比,由于金属原子与氧原子的强作用力而更加稳固,金属原子不易流失。金属氧化物的种类有

NiO 、 ZnO 、 Al_2O_3 、 Fe_2O_3 、 Ga_2O_3 、 TiO_2 、 ZrO_2 、 SnO_2 、 HfO_2 、 Nb_2O_5 、 Ta_2O_5 等。

基于多孔材料的 MOAC 富集策略

多孔二氧化硅具有形貌可控、孔道易于调节、亲水性强、便于修饰等优点,Wan 等^[16]采用 TiO_2 修饰泡沫型二氧化硅 (macroporous ordered silica foam, MOSF),制得 Ti-MOSF,其 β -酪蛋白的检测限可达到 17 fmol,对单磷酸化肽段和多磷酸化肽段都有良好的选择性富集能力。

此外,还可直接合成介孔型的金属氧化物,增大富集材料比表面积,兼具分子排阻功能。Bai 等^[17]用一步无模板法制得介孔 SnO_2 纳米球,对 β -酪蛋白的检测限低至 40 fmol,在脱脂牛奶样品中选择性富集了 17 个磷酸化肽段,效果优于非多孔 SnO_2 和市售 TiO_2 。Zhang 等^[18]用溶胶-凝胶法合成了 ZrO_2 多孔气凝胶,比表面积高达 $416.0 \text{ m}^2/\text{g}$,显著高于市售介孔 ZrO_2 ,其对 β -酪蛋白检测限低至 4 pmol,可鉴定出牛奶样本中 17 个磷酸化肽。Zhang 所在课题组合成了多种磁性核壳介孔金属氧化物^[19-21];其中平均孔径 3.4 nm 的 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{mTiO}_2$ -80 的介孔微球,比表面积高达 $603.5 \text{ m}^2/\text{g}$ 且具有分子排阻功能,对 β -酪蛋白检测限为 5 fmol,可在蛇毒中鉴定出 35 个磷酸化肽^[20];此外,该课题组还开发了简便的方法直接合成了介孔 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$,既能对磷酸化肽进行富集又能在外界磁场作用下快速分离富集产物(图 4-A),对 β -酪蛋白的检测限为 50 fmol,回收率高达 89.4%,在牛奶样本中可以鉴定出 11 个磷酸化肽段^[21]。

介孔材料虽然可以提供高的比表面积而增加磷酸化肽富集能力,但是样品在孔道内传输距离长,容易扩散,使用微孔氧化物和其他形态的介孔金属氧化物可以降低扩散。Yan 等^[22]合成了 TiO_2 修饰的微孔/介孔复合型材料 ($\text{HOMMS} @ \text{TiO}_2$) (图 4-B)。对 β -酪蛋白检测限低至 8 fmol,选择性好、富集效率高,在 β -酪蛋白与 BSA 摩尔比达到 1:1 000 时仍可鉴定出磷酸化肽段。Cheng 等^[23]开发出花瓣状多孔磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{fTiO}_2$ (图 4-C),避免了孔道的阴影效应,对 β -酪蛋白检测限约 10 fmol。Li 等^[24]设计了海胆状的核壳介孔磁球 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{TiO}_2$ (图 4-D),可特异性的富集磷酸化肽,且能消除质谱分析中高浓度磷酸胆碱的干扰,利于低丰度内源性物质及代谢物的检出。

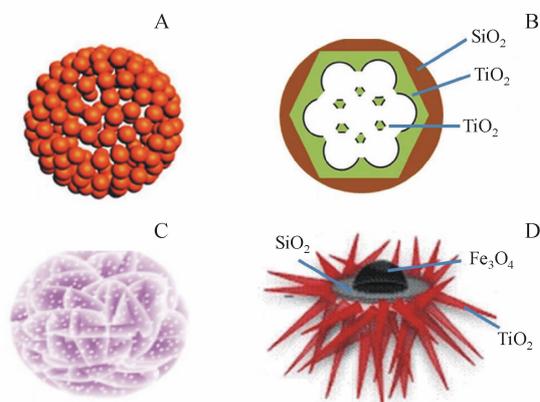


Figure 4 Different forms of mesoporous metal oxide materials for phosphopeptide enrichment

A: Mesoporous γ - Fe_2O_3 nanocrystal clusters^[20]; B: TiO_2 -coated hierarchically ordered macro/mesoporous silica (HOMMS@ TiO_2) HOMMS@ TiO_2 ^[22]; C: Flowerlike Fe_3O_4 @ TiO_2 microspheres^[23]; D: Echinus-like Fe_3O_4 @ TiO_2 core-shell-structured microspheres^[24]

基于杂合材料的 MOAC 富集策略

不同的金属氧化物具有不同的磷酸化肽富集能力,如 TiO_2 对多磷酸化肽富集能力更好,而 ZrO_2 偏向于富集单磷酸化肽。因此将不同的金属杂合在一起可能会获得更加全面的磷酸化肽富集效果, Li 等^[25]率先将 Ti 和 Zr 杂合制备了磁性双金属氧化物 Fe_3O_4 @ TiO_2 - ZrO_2 ,其 β -酪蛋白检测限为 50 fmol,在 β -酪蛋白与 BSA 摩尔比 1:50 的混合物中可以富集多种磷酸化肽,效果优于 Fe_3O_4 @ TiO_2 或 Fe_3O_4 @ ZrO_2 。Li 等^[26]合成了 SnO_2 - $\text{ZnSn}(\text{OH})_6$ 多组分复合探针(图 5),对 β -酪蛋白检测限低至 10 fmol,富集了牛奶中的多种磷酸化肽段,包括 7 个单磷酸化肽和 8 个多磷酸化肽。除不同金属氧化物的杂合材料外,还可通过一步反应将具有富集能力的金属与硅源掺杂形成富集材料。Wang 等^[27]采用简单的溶胶-凝胶法,选取 Si/Ti 摩尔比 8:1 制得 Ti 掺杂的介孔二氧化硅,对 β -酪蛋白检测限 10 fmol,在 α -酪蛋白中鉴定到 15 个磷酸化肽,效果优于市售 TiO_2 ,可在人胎盘线粒体中检测到 298 个磷酸化蛋白。

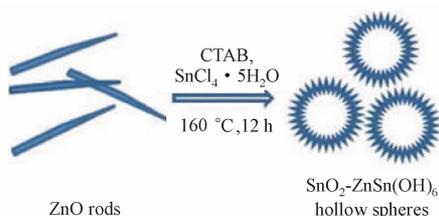


Figure 5 Synthetic route of SnO_2 - $\text{ZnSn}(\text{OH})_6$ ^[26]

基于新材料的 MOAC 富集策略

石墨烯可作为基质,用于 MOAC 富集磷酸化肽段。Huang 等^[28]用简单的溶胶-凝胶和水热处理合成了以还原氧化石墨烯为基质的双金属氧化物复合材料 rGR- TiO_2 - ZrO_2 (rGTZ),在 β -酪蛋白与 BSA 摩尔比达到 1:1 000 仍能特异性地富集到单磷酸化和多磷酸化肽段,在 α -酪蛋白中可以鉴定出 23 个磷酸化位点,富集效果优于以氧化石墨烯为基质的 GR- TiO_2 - ZrO_2 和市售 TiO_2 ;在小鼠脑组织和肝组织样品中分别检测出 1 980 个磷酸化肽段和 577 个磷酸化肽段。胍基也可与磷酸基团的相互作用,将胍基引入石墨烯,仅通过加载缓冲液即可实现多种磷酸化肽段富集,对 β -酪蛋白检测限低至 10 fmol^[29]。磁性石墨烯双金属亲和探针 mag/G/(Ti-Sn) O_4 (图 6)结合石墨烯与两种金属氧化物的特点,对 β -酪蛋白检测线可低至 0.4 fmol,在 β -酪蛋白与 BSA 摩尔比为 1:1 500 时能选择性富集磷酸化肽段,富集能力优于 mag/G/ TiO_2 、mag/G/ SnO_2 单独或简单混合使用的效果^[30]。

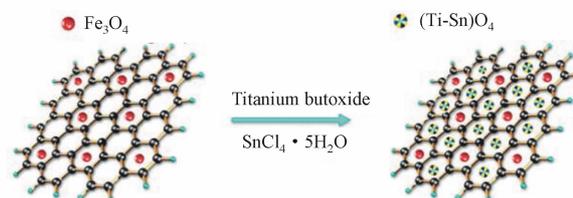


Figure 6 Synthetic approach of Fe_3O_4 /graphene/(Ti-Sn) O_4 composites^[30]

碳纳米管也是碳族成员中应用广泛的材料,尤其适用于贵金属及活泼金属的原位修饰及后期修饰。Yan 等^[31]用溶剂热反应以异丙醇钛为前体合成了纳米 TiO_2 包覆的碳纳米管,比表面积高达 $104 \text{ m}^2/\text{g}$,能选择性富集磷酸化肽,对 β -酪蛋白检测限为 20 fmol,在小鼠脑组织样品中鉴定到 240 个磷酸化位点。

在富集模式上,还可采用整体毛细管柱、多孔尼龙膜等多种材料。Wang 等^[32]用溶胶-凝胶法制备了 SiO_2 - TiO_2 整体毛细管柱,通过管内固相微萃取的方式富集磷酸化肽,He 等^[33]对该法改进后,应用静电纺丝技术制得 SiO_2 - TiO_2 复合纤维,操作简单,对 β -酪蛋白检测限至 10 fmol。Tan 等^[34]则将 TiO_2 修饰在多孔尼龙膜上,利用尼龙膜的亚微米孔径没有传质限制和 TiO_2 纳米粒比表面积大的

优点,提高了磷酸化肽的吸附容量,直径 22 mm 的尼龙膜可以富集 540 nmol 的磷酸化肽,不仅特异性强而且 α 、 β -混合酪蛋白检测限可以达到 5 fmol (图 7)。

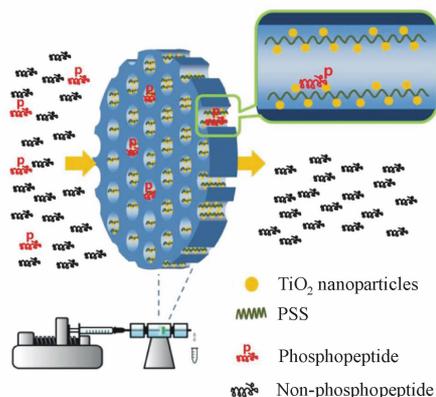


Figure 7 Cartoon membrane containing TiO_2 and application for phosphopeptide enrichment^[34]

稀土元素可以呈现路易斯酸和路易斯碱的性能而与磷酸基团结合。Jabeen 等^[35]设计了镧系元素包裹的磁性核壳型材料,选择性极强,可以在 β -酪蛋白与 BSA 摩尔比达到 1:8 500 时特异性地富集磷酸化肽,对 β -酪蛋白检测限低至 0.001 fmol,并成功的在酪蛋白、牛奶、蛋黄、人血清及 HeLa 细胞提取物中富集鉴定到磷酸化肽。

钛铌酸盐纳米片拥有与石墨烯相似的二维平面结构,能提供大的比表面积,Min 等^[36]以钛铌酸盐纳米片为基底,合成 Fe_3O_4 、 CeO_2 共同修饰的三元纳米复合材料 MC-TiNbNS (图 8),对 β -酪蛋白检测限低至 0.2 fmol,不但仍可在 β -酪蛋白与 BSA 摩尔比为 1:2 000 时高效富集磷酸化肽,还可以直接提供磷酸化位点数量的信息,成功用于标准蛋白、脱脂牛奶及复杂的血清样品中检测单磷酸化肽、多磷酸化肽及磷酸化位点。其中, CeO_2 具有辅助磷酸化肽去磷酸化的作用,通过调节 CeO_2 的覆盖率可以改变富集材料去磷酸化活性,简化了 MALDI-TOF MS 分析中鉴定磷酸化肽的过程。

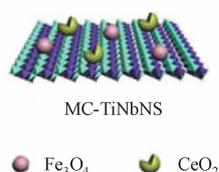


Figure 8 MC-TiNbNS Composite^[36]

2.2.4 SIMAC 富集策略 IMAC 和 MOAC 是目前磷酸化蛋白质组学研究中最常采用的富集方法,具有不同的富集特点。IMAC 富集中多磷酸化肽段与金属离子间的结合力更强,单磷酸化肽段不易保留,故对多磷酸化肽段的富集效率要高于单磷酸化肽段;而 MOAC 对多磷酸化或单磷酸化肽段的富集选择性相同,但由于多磷酸化肽段更难于从 MOAC 上洗脱导致富集效果不明显,对单磷酸化肽段的富集效率要高于多磷酸化肽段,因此这两种富集方法之间有很大的互补性。

Thingholm 等^[37]将两种富集方式创造性的结合起来,建立了 SIMAC (sequential elution from IMAC)富集策略。先用 IMAC 对磷酸化肽段进行富集,过柱后的流出液再用 TiO_2 进行二次富集。该方法共鉴定到 492 个磷酸化肽段,包括 186 个多磷酸化肽段;而仅用 TiO_2 富集,则只鉴定到 286 个磷酸化肽段,包括 54 个多磷酸化肽段。Yu 等^[38]则应用基于 MOAC 的二氧化钛包覆的磁性介孔球 MHMS@TiO_2 和基于 IMAC 的铅盐修饰的磁性纳米颗粒 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-ZrAs}$ 对磷酸化肽段进行连续富集,在人原髓细胞白血病细胞 HL60 中鉴定到 8 281 个磷酸化肽段,11 579 个磷酸化位点。Tape 等^[39]应用 96 孔板、超多孔磁性 TiO_2 和 Ti^{4+} -IMAC 微球,借助于 KingFisher Flex 全自动磁珠提取纯化系统,设计出基于 SIMAC 的自动富集磷酸化肽装置 (图 9),结果表明同一 96 板中“孔-孔”定量结果重现性好,不同板间定量分析在 5 d 内也可重现。这种自动富集方法实现了高通量大规模的磷酸化肽段富集。

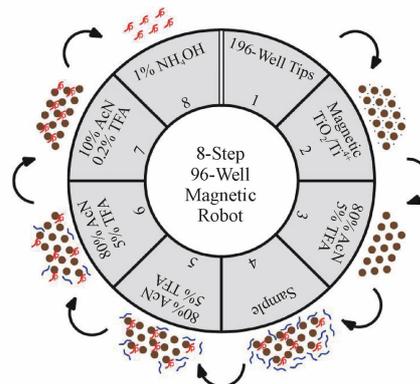


Figure 9 Automated phosphopeptide enrichment^[39]

2.2.5 MALDI 板上富集策略 生物质谱是磷酸化蛋白质组学中常用的分析手段,包括基质辅助激光解吸质谱(MALDI-MS)、表面加强激光吸附/解吸质谱(SELDI-MS)、电喷雾电离质谱(ESI-MS)。其中 MALDI 和 SELDI 需将样品负载于靶板上进行离子化,将富集材料整合在靶板上,则可以实现在富集磷酸化肽段的同时进行在线检测,简化了实验过程,节省了分析时间,避免离线检测导致的样品损失。

Eriksson 等^[40]将 TiO₂ 修饰在靶板上,利用 MALDI-TOF 分析 2 型腺病毒结构蛋白 pⅢa 的磷酸化,鉴定到 3 个新的磷酸位点,并且首次检测到了 pⅢa 中的多磷酸化肽。Tsougeni 等^[41]在 2 mm 厚的聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)靶板上用等离子体刻蚀出 32 条平行微孔通道,通过液相沉积,将 TiO₂-ZrO₂ 整合到微孔通道中,构建了 MOAC 亲和色谱微柱。靶板的容量大于 1.4 mg,可分析低于 0.1 mL 的微量样品。Tang 等^[42]将 TiO₂ 纳米球和石墨烯结合到靶板上,不使用常规基质即可实现磷酸化肽段的富集和检测,对 β-酪蛋白检测限可以低至 0.005 fmol,在 β-酪蛋白与 BSA 摩尔比为 1:100 的样品中可以特异性地富集到磷酸化肽,在 HeLa 细胞中鉴定出 967 个磷酸化肽。比表面积大,独特的管状结构具有较高的传质效率,并提供足够的空间结合磷酸基团。此外,还有研究在靶板上整合 TiO₂ 纳米阵列管,且该材料已成功在复杂生物样品中实现磷酸化肽段富集^[43]。

2.2.6 其他富集策略 在磷酸化肽段富集方法快速发展的形势下,除 IMAC、MOAC 等高效的富集方法,羟基磷灰石(hydroxyapatite, HAP)色谱法、化学衍生化等方法也可用于磷酸化肽段的富集。

HAP 是一种自然矿化物,其分子式为 Ca₅(PO₄)₃(OH),具有优良的生物相容性和生物活性,可应用于分离蛋白质和核酸,其因表面钙离子可与磷酸根结合而适用于富集磷酸化肽。该法可以较全面的富集到单/多磷酸化肽,但是实验过程繁琐,且缺乏在复杂样品中进行验证。Vormbrock 等^[44]首次将 HAP 作为色谱固定相用于磷酸化肽段的富集,在 α-酪蛋白与 BSA 摩尔比为 1:50 的样品中 HAP 色谱法可以达到与市售 TiO₂ 相同的检测效果。Yu 等^[45]以 HAP 包裹磁核,其对 β-酪蛋白检测限可以低至 50 fmol,在 β-酪蛋白与

BSA 摩尔比为 1:50 的样品中可以特异性地富集到磷酸化肽,并可检测到人血清中的内源性磷酸化肽信号。

化学衍生化法是在富集前对磷酸基团进行化学修饰,以避免质谱分析中磷酸根的中性丢失、降低肽段电荷,提高质谱离子化效率和检测灵敏度。常用的化学衍生方法有甲酯化、β-消除/Michael 加成、氨乙基半胱氨酸转化法和氨基磷酸酯衍生法等。Xu 等^[46]将酸性残基甲酯化后进行 MALDI-TOF 分析,成功地在酪蛋白中鉴定出 12 个磷酸化肽 22 个磷酸化位点。但是化学衍生化法操作繁琐,存在副反应,且易损失样品,因此在近年有效富集手段不断开发的情况下,化学衍生化法不再常用。

3 磷酸化蛋白质组学在疾病研究中的应用

蛋白质磷酸化是一种重要的翻译后修饰,许多疾病的发生发展都与异常的蛋白质磷酸化修饰有关,而且疾病的发生也会导致一些蛋白的异常磷酸化修饰。同时,细胞外的信号变化通常也与蛋白翻译后修饰相关,信号通路广泛的交织在一起。对多个信号节点全面了解能够帮助分析其涉及的体内变化过程,还能提供疾病诊断的生物标志物信息。因此,了解蛋白的磷酸化修饰过程及机制对于疾病的预测、诊断及治疗具有重要的意义,不同的磷酸化蛋白/肽富集策略被广泛应用于与疾病相关的磷酸化蛋白质组学研究中。

de Graaf 等^[47]应用 Ti⁴⁺-IMAC 磷酸化肽富集方法提供了高效而简单的无标记的磷酸化蛋白质组学分析策略。以前列腺素(paracrine prostaglandin E₂, PGE₂)刺激人外周血白血病 T 细胞 Jurkat T 细胞,在 6 个不同的时间点进行监测,共鉴定到 108 个磷酸化肽段,12 799 个磷酸化位点。在已知报道中,PGE₂ 可以使环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)的水平增高,继而激活蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA);但 de Graaf 在研究中发现许多磷酸化肽不单由 PKA 催化,还与其他激酶有关,这就说明在 PGE₂ 刺激后,细胞内会同时激活多条信号通路;进一步深入的分析后,发现 Jurkat T 细胞内磷酸化的修饰过程与钙调蛋白依赖性蛋白激酶(camodulin-dependent kinase, CAMK)、p21 活化激酶 1(p21-activated kinase1, PAK1)、蛋

白激酶 C (protein kinase C, PKC)、细胞分裂周期蛋白激酶 1 (cell division cycle2-like protein kinase 1, CLK1) 等蛋白激酶相关,为调节体内磷酸化过程提供了潜在靶点的有用信息。中性粒细胞颗粒的胞吐作用与炎症反应密切相关,已知参与调节中性粒细胞胞吐作用的蛋白激酶包括 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen activated protein kinase, p38 MAPK)、非受体酪氨酸蛋白激酶 (hemopoietic cell kinase, Hck) 等,但作用机制尚不明确。Luerman 等^[48]使用 TiO₂ 亲和色谱及质谱技术,对未处理及 *N*-甲酰-甲硫氨酰-亮氨酰-苯丙氨酸 (*N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, fMLF) 刺激的中性粒细胞进行磷酸化蛋白质组学分析。从未处理的中性粒细胞中鉴定到 79 个磷酸化蛋白,使用 fMLF 刺激 2 min 后,可鉴定到磷酸化蛋白增至 118 个。通过分析,磷酸化的 G-蛋白偶联受体激酶 5 (p-GRK5) 可能是调节中性粒细胞颗粒胞吐作用信号通路中的作用靶点。

很多疾病没有明确的临床和病理指标来预测或判断疾病的发展状况,但肿瘤细胞会分泌胞外蛋白进入循环系统,磷酸化后会引起信号通路的变化,这些磷酸化的胞外蛋白可能成为诊疗过程中合适的生物标志物。Zawadzka 等^[49]在研究中应用 HILIC-TiO₂ 富集磷酸化肽段,比较了 5 个 L (luminal) 型和 5 个 B (basal) 型乳腺癌细胞的磷酸化蛋白质组差异。在血清中发现的 1 756 个磷酸化蛋白和 5 000 多个磷酸化位点,其中干扰素调节因子 4 结合蛋白 3 (interferon regulatory factor-4 binding protein 3, IBP3)、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)、卵泡抑素相关蛋白 3 (follistatin-related protein 3, FSTL3)、层粘连蛋白 β -1 (Laminin subunit beta-1, LAMB1) 修饰后的磷酸化蛋白可以作为 B 型乳腺癌的生物标志物,线粒体中细胞色素 C 蛋白 (cytochrome C, CYTC)、干扰素调节因子 4 结合蛋白 5 (interferon regulatory factor-4 binding protein 5, IBP5) 修饰后的磷酸化蛋白可以作为 L 型乳腺癌的生物标志物;通过这些磷酸化的分泌蛋白可以推测癌变组织产生的可能性以及了解疾病的进展情况和亚型分类。

磷酸化蛋白质组学不但能够寻找疾病研究中的生物标志物、监测疾病的发展状况,还能够为发现药物的新靶点和阐明药物的作用机制提供依据。小分子的 c-Met 激酶抑制剂 PF-04217903 在胃癌

细胞系 GTL-16 中产生耐药现象是阻碍胃癌治疗的重要因素, Dillon 等^[50]借助线性离子阱-轨道阱质谱仪 (LTQ Orbitrap) 及 HILIC 等技术,对原代胃癌细胞及耐药细胞 PF-04217903 resistant (R3) 进行磷酸化蛋白质组学分析,发现耐药细胞中磷酸化的 B-Raf、MEK2、MAP1 显著上调,通过对 Ras/Raf/MEK/ERK 通路分析表明, B-Raf 基因的融合伴侣 SND-1 (staphylococcal nuclease domain-containing protein 1) 可能成为治疗对 c-Met 激酶抑制剂耐药的治疗靶点。Yang 等^[51]采用 SCX 及同位素标记相对和绝对定量 (isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ) 法研究人骨髓瘤细胞耐药机制。研究表明,与敏感细胞 RPMI 8226-S 相比,耐药细胞 RPMI 8226-R5 中的肉豆蔻酰化富含丙氨酸的 C-激酶底物 (myristoylated alanine-rich C-kinase substrate, MARCKS) 过表达。通过抑制 MARCKS 的磷酸化或基因敲除,可以显著增强人骨髓瘤细胞对硼替佐米和其他抗肿瘤药的敏感性,预示着 MARCKS 可以作为人多发性骨髓瘤耐药治疗的新靶点。

4 展 望

由于蛋白质组的复杂性和多样性,对于低丰度磷酸化蛋白/肽的分离和富集目前仍然是磷酸化蛋白质组学研究需要解决的问题之一。持续发展简化而高效的富集分析策略是磷酸化蛋白质组学发展的需求。在过去的几十年里,各种各样的材料被设计开发出来用于富集、辅助分析磷酸化蛋白/肽。虽然取得了重大的进展,但是这些材料和方法还处于实验室阶段和小规模的应用,且他们的富集能力大多是通过标准磷酸化蛋白来评价的,仅应用于血清和脱脂牛奶等简单的混合物或小规模的复杂生物样本富集分析,而应用于大规模复杂样本尚需要进行更全面的考察。此外,大多数富集材料的富集机制尚不明确,也制约了磷酸化蛋白质组学的发展。因此,为了更好地了解生命过程,诊断和治疗疾病,发现药物治疗的新靶点,阐明药物的作用机制,需要开发高通量全面的富集策略用于磷酸化蛋白质组学的研究。无论应用新的富集材料或优化分析方法,都是为了能够建立高容量、高灵敏度、高选择性的磷酸化蛋白/肽的富集和分析策略,从而全面深入地研究磷酸化蛋白质组学。

參考文獻

- [1] Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, *et al.* Progress with gene-product mapping of the Mollicutes; *Mycoplasma genitalium* [J]. *Electrophoresis*, 1995, **16**(7):1090-1094.
- [2] Zheng H, Hu P, Quinn DF, *et al.* Phosphotyrosine proteomic study of interferon signaling pathway using a combination of immunoprecipitation and immobilized metal affinity chromatography [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2005, **4**(6):721-730.
- [3] Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, *et al.* Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, **101**(33):12130-12135.
- [4] Zappacosta F, Scott GF, Huddleston MJ, *et al.* An optimized platform for hydrophilic interaction chromatography-immobilized metal affinity chromatography enables deep coverage of the rat liver phosphoproteome [J]. *J Proteome Res*, 2015, **14**(2):997-1009.
- [5] Andersson L, Porath J. Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe^{3+}) affinity chromatography [J]. *Anal Biochem*, 1986, **154**(1):250-254.
- [6] Hou C, Ma J, Tao D, *et al.* Organic-inorganic hybrid silica monolith based immobilized titanium ion affinity chromatography column for analysis of mitochondrial phosphoproteome [J]. *J Proteome Res*, 2010, **9**(8):4093-4101.
- [7] Elldrissi K, Eddarir S, Tokarski C, *et al.* Immobilized metal affinity chromatography using open tubular capillary for phosphoprotein analysis; comparison between polymer brush coating and surface functionalization [J]. *J Chromatogr B*, 2011, **879**(27):2852-2859.
- [8] Saeed A, Najam-ul-Haq M, Jabeen F, *et al.* High affinity phosphopeptides enrichment and desalting of biological materials on newly engineered poly (glycidyl propargyl ether/divinyl benzene) [J]. *Anal Chem*, 2013, **85**(19):8979-8986.
- [9] Wang ZG, Cheng G, Liu YL, *et al.* Novel core-shell Cerium (IV)-immobilized magnetic polymeric microspheres for selective enrichment and rapid separation of phosphopeptides [J]. *J Colloid Interf Sci*, 2014, **417**:217-226.
- [10] Ma W, Zhang Y, Li L, *et al.* Ti^{4+} -immobilized magnetic composite microspheres for highly selective enrichment of phosphopeptides [J]. *Adv Funct Mater*, 2013, **23**(1):107-115.
- [11] Wang F, Zhang Y, Yang P, *et al.* Fabrication of polymeric microgels using reflux-precipitation polymerization and its application for phosphoprotein enrichment [J]. *J Mater Chem B*, 2014, **2**(17):2575-2582.
- [12] Li XS, Pan YN, Zhao Y, *et al.* Preparation of titanium-grafted magnetic mesoporous silica for the enrichment of endogenous serum phosphopeptides [J]. *J Chromatogr A*, 2013, **1315**:61-69.
- [13] Sun N, Deng C, Li Y, *et al.* Size-exclusive magnetic graphene/mesoporous silica composites with Titanium (IV)-immobilized pore walls for selective enrichment of endogenous phosphorylated peptides [J]. *ACS Appl Mater Inter*, 2014, **6**(14):11799-11804.
- [14] Shen F, Hu Y, Guan P, *et al.* Facile preparation of titanium phosphate-modified chitosan for selective capture of phosphopeptides [J]. *J Sep Sci*, 2013, **36**(3):540-547.
- [15] Shi C, Deng C, Zou SE, *et al.* Polydopamine-coated eppendorf tubes for Ti^{4+} immobilization for selective enrichment of phosphopeptides [J]. *Talanta*, 2014, **127**:88-93.
- [16] Wan J, Qian K, Qiao L, *et al.* TiO_2 -modified macroporous silica foams for advanced enrichment of multi-phosphorylated peptides [J]. *Chem Eur J*, 2009, **15**(11):2504-2508.
- [17] Bai Y, Qi L, Xu L, *et al.* Template-free synthesis of uniform mesoporous SnO_2 nanospheres for efficient phosphopeptide enrichment [J]. *J Mater Chem B*, 2014, **2**(9):1121-1124.
- [18] Zhang L, Xu J, Sun L, *et al.* Zirconium oxide aerogel for effective enrichment of phosphopeptides with high binding capacity [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, **399**(10):3399-3405.
- [19] Ma WF, Zhang Y, Li LL, *et al.* Tailor-made magnetic Fe_3O_4 @ mTiO_2 microspheres with a tunable mesoporous anatase shell for highly selective and effective enrichment of phosphopeptides [J]. *ACS Nano*, 2012, **6**(4):3179-3188.
- [20] Zhang Y, Ma W, Zhang C, *et al.* Titania composite microspheres endowed with a size-exclusive effect toward the highly specific revelation of phosphopeptides [J]. *ACS Appl Mater Inter*, 2014, **6**(9):6290-6299.
- [21] Zhang Y, Li L, Ma W, *et al.* Two-in-one strategy for effective enrichment of phosphopeptides using magnetic mesoporous $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanocrystal clusters [J]. *ACS Appl Mater Inter*, 2013, **5**(3):614-621.
- [22] Yan Y, Zhang X, Deng C. Designed synthesis of titania nanoparticles coated hierarchially ordered macro/mesoporous silica for selective enrichment of phosphopeptides [J]. *ACS Appl Mater Inter*, 2014, **6**(8):5467-5471.
- [23] Cheng G, Wang ZG, Liu YL, *et al.* Magnetic affinity microspheres with meso/macroporous shells for selective enrichment and fast separation of phosphorylated biomolecules [J]. *ACS Appl Mater Inter*, 2013, **5**(8):3182-3190.
- [24] Li H, Shi X, Qiao L, *et al.* Synthesis of a new type of echinus-like Fe_3O_4 @ TiO_2 core-shell-structured microspheres and their applications in selectively enriching phosphopeptides and removing phospholipids [J]. *J Chromatogr A*, 2013, **1275**:9-16.
- [25] Li W, Deng Q, Fang G, *et al.* Facile synthesis of Fe_3O_4 @ TiO_2 - ZrO_2 and its application in phosphopeptide enrichment [J]. *J Mater Chem B*, 2013, **1**(14):1947-1961.
- [26] Li LP, Zheng T, Xu LN, *et al.* SnO_2 - $\text{ZnSn}(\text{OH})_6$: a novel binary affinity probe for global phosphopeptide detection [J]. *Chem Commun*, 2013, **49**(17):1762-1764.
- [27] Wang F, Shi Z, Hu F, *et al.* Tuning of Ti-doped mesoporous silica

- for highly efficient enrichment of phosphopeptides in human placenta mitochondria[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, **405**(5): 1683 – 1693.
- [28] Huang X, Wang J, Liu C, *et al.* A novel rGR-TiO₂-ZrO₂ composite nanosheet for capturing phosphopeptides from biosamples [J]. *J Mater Chem B*, 2015, **3**(12): 2505 – 2515.
- [29] Xu LN, Li LP, Jin L, *et al.* Guanidyl-functionalized graphene as a bifunctional adsorbent for selective enrichment of phosphopeptides [J]. *Chem Commun*, 2014, **50**(75): 10963 – 10966.
- [30] Wang M, Deng C, Li Y, *et al.* Magnetic binary metal oxides affinity probe for highly selective enrichment of phosphopeptides [J]. *ACS Appl Mater Inter*, 2014, **6**(14): 11775 – 11782.
- [31] Yan Y, Lu J, Deng C, *et al.* Facile synthesis of titania nanoparticles coated carbon nanotubes for selective enrichment of phosphopeptides for mass spectrometry analysis [J]. *Talanta*, 2013, **107**: 30 – 35.
- [32] Wang ST, Wang MY, Su X, *et al.* Facile preparation of SiO₂/TiO₂ composite monolithic capillary column and its application in enrichment of phosphopeptides [J]. *Anal Chem*, 2012, **84**(18): 7763 – 7770.
- [33] He XM, Zhu GT, Li XS, *et al.* Rapid enrichment of phosphopeptides by SiO₂-TiO₂ composite fibers [J]. *Analyst*, 2013, **138**(18): 5495 – 5502.
- [34] Tan YJ, Sui D, Wang WH, *et al.* Phosphopeptide enrichment with TiO₂-modified membranes and investigation of tau protein phosphorylation [J]. *Anal Chem*, 2013, **85**(12): 5699 – 5706.
- [35] Jabeen F, Najam-ul-Haq M, Rainer M, *et al.* Newly fabricated magnetic lanthanide oxides core-shell nanoparticles in phosphoproteomics [J]. *Anal Chem*, 2015, **87**(9): 4726 – 4732.
- [36] Min Q, Li S, Chen X, *et al.* Magnetite/ceria-codecorated titanoniobate nanosheet: a 2D catalytic nanoprobe for efficient enrichment and programmed dephosphorylation of phosphopeptides [J]. *ACS Appl Mater Inter*, 2015, **7**(18): 9563 – 9572.
- [37] 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 [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2008, **7**(4): 661 – 671.
- [38] Yu QW, Li XS, Xiao Y, *et al.* Sequential enrichment with titania-coated magnetic mesoporous hollow silica microspheres and zirconium arsenate-modified magnetic nanoparticles for the study of phosphoproteome of HL60 cells [J]. *J Chromatogr A*, 2014, **1365**: 54 – 60.
- [39] Tape CJ, Worboys JD, Sinclair J, *et al.* Reproducible automated phosphopeptide enrichment using magnetic TiO₂ and Ti-IMAC [J]. *Anal Chem*, 2014, **86**(20): 10296 – 10302.
- [40] Eriksson AI, Bartsch M, Bergquist J, *et al.* On-target titanium dioxide-based enrichment for characterization of phosphorylations in the Adenovirus pIIIa protein [J]. *J Chromatogr A*, 2013, **1317**: 105 – 109.
- [41] Tsougeni K, Zerefos P, Tserepi A, *et al.* TiO₂-ZrO₂ affinity chromatography polymeric microchip for phosphopeptide enrichment and separation [J]. *Lab Chip*, 2011, **11**(18): 3113 – 3120.
- [42] Tang LA, Wang J, Lim TK, *et al.* High-performance graphene-titania platform for detection of phosphopeptides in cancer cells [J]. *Anal Chem*, 2012, **84**(15): 6693 – 6700.
- [43] Min Q, Chen X, Zhang X, *et al.* Tailoring of a TiO₂ nanotube array-integrated portable microdevice for efficient on-chip enrichment and isotope labeling of serum phosphopeptides [J]. *Lab Chip*, 2013, **13**(19): 3853 – 3861.
- [44] Vormbrock I, Kaber G, Hartwig S, *et al.* Targeting phosphoprotein profiling by combination of hydroxyapatite-based phosphoprotein enrichment and SELDI-TOF MS [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2010, **116**(4/5): 181 – 187.
- [45] Yu Q, Li XS, Yuan BF, *et al.* Preparation of magnetic hydroxyapatite clusters and their application in the enrichment of phosphopeptides [J]. *J Sep Sci*, 2014, **37**(5): 580 – 586.
- [46] Xu CF, Lu Y, Ma J, *et al.* Identification of phosphopeptides by MALDI Q-TOF MS in positive and negative ion modes after methyl esterification [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2005, **4**(6): 809 – 818.
- [47] de Graaf EL, Giansanti P, Altalear AF, *et al.* Single-step enrichment by Ti⁴⁺-IMAC and label-free quantitation enables in-depth monitoring of phosphorylation dynamics with high reproducibility and temporal resolution [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2014, **13**(9): 2426 – 2434.
- [48] Luerman GC, Powell DW, Uriarte SM, *et al.* Identification of phosphoproteins associated with human neutrophil granules following chemotactic peptide stimulation [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2011, **10**(3): M110. 001552.
- [49] Zawadzka AM, Schilling B, Cusack MP, *et al.* Phosphoprotein secretome of tumor cells as a source of candidates for breast cancer biomarkers in plasma [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2014, **13**(4): 1034 – 1049.
- [50] Dillon R, Nilsson CL, Shi SD, *et al.* Discovery of a novel B-Raf fusion protein related to c-Met drug resistance [J]. *J Proteome Res*, 2011, **10**(11): 5084 – 5094.
- [51] Yang Y, Chen Y, Saha MN, *et al.* Targeting phospho-MARCKS overcomes drug-resistance and induces antitumor activity in preclinical models of multiple myeloma [J]. *Leukemia*, 2015, **29**(3): 715 – 726.