

3.3.2 同位素代谢标记技术

^{15}N 标记法 (^{15}N labeling) 是Oda等人最早提出的一种同位素代谢标记技术, 它是在培养基中分别掺入 ^{14}N 和 ^{15}N 来寻找差异表达蛋白的一种方法。虽然该方法非常适用于追踪单个磷酸化位点的动力学变化, 但它仅限于分析那些表达水平相对较高的蛋白质。SILAC (stable isotope labeling by amino acid in cell culture) 技术^[25]出现以后, 很快取代了 ^{15}N 标记法。SILAC技术, 即细胞培养过程中氨基酸的稳定同位素标记, 具有显著的优点(表2), 因而迅速获得认可并在国际著名实验室中广泛使用。已经使用过的稳定同位素标记氨基酸有精氨酸(Arg)、赖氨酸(Lys)、酪氨酸(Tyr)和亮氨酸(Leu)等。

表2 SILAC标记技术具有以下显著优点

蛋白质损失小;
标记效率高、误差低;
可以实现多种样本比较;
肽段覆盖率高, 可以提高定量结果和鉴定结果的可靠性;
实验操作简便。

3.3.3 ^{18}O 标记技术

^{18}O 标记技术是将蛋白质酶切时或酶切后放入 H_2^{18}O 中, 在蛋白酶催化作用下将羧基上的两个氧替换成 ^{18}O 而进行的。除了C端肽之外, 在适宜的条件下, 所有的肽段一般都可以替换上两个 ^{18}O , 使肽段质量数相差4 u。Korbel等人^[29]采取免疫沉淀反应/IDE/LC/MS与 ^{18}O 标记来分析EPO受体依赖的蛋白质, 鉴定并定量了187个磷酸化蛋白, 发现89个蛋白质上的酪氨酸以EPO受体依赖的方式发生变化。 ^{18}O 标记技术是一种操作简单、条件温和、应用广泛(trypsin、chymotrypsin、lys-C和glu-C都能被用来标记酶切肽段的C端), 并且没有副产物的标记技术。它能与多种磷酸化肽段富集方法连用, 适于低丰度磷酸化肽段的定量标记。目前, ^{18}O 标记技术已得到国际上一些大型实验室的青睐。但是, 用 ^{18}O 进行同位素标记经常产生标记一个氧原子和两个氧原子不等的现象, 即产生分子质量+2和+4两种混合的产物。此外, ^{18}O 与 ^{16}O 交换速率也依肽段的大小、氨基酸的类型、酶的类型以及肽段序列而有所变化。所以, 尽管该技术已经得到比较普遍的应用, 但是要得到准确的定量结果还需对其进一步优化。

六、磷酸化蛋白质组学数据库及应用工具

表3~表7列出了部分磷酸化蛋白质组学数据库及应用工具的名称、网址及其特征。

表3 磷酸化数据库

数据库名称	网址	特征描述
Phospho.ELM 8.1 (PhosphoBase)	http://phospho.elm.eu.org/about.html	该数据库包含4,384种实验已确证的磷酸化蛋白。这些蛋白来自不同种属, 带有2,166个酪氨酸位点、13,320个丝氨酸位点及2,766个苏氨酸位点。

(续表)

PhosphoSitePlus™	http://www.phosphosite.org/homeAction.do	该数据库是PhosphoSite的新版，它是基于网络的数据库，主要收集的是蛋白修饰位点方面的数据，包括文献和高通量开发过程中发现的蛋白磷酸化位点。目前，该数据库包含66,045个磷酸化位点。
PHOSPHONET	http://phosphonet.ca/Default.aspx?AspxAutoDetectCookieSupport=1	该数据库目前拥有来自5,350人的蛋白上超过26,000个磷酸化位点的数据。这个数据库能够与几种相关的重要数据库相衔接，并将继续发展为磷酸化蛋白质组学的重要资源库。
PHOSIDA	http://www.phosida.com/	该数据库是一个磷酸化位点数据库，整合了几千种可信度较高的体内磷酸化位点的数据，这些数据来自不同种属的质谱测试结果。对于每一个磷酸化位点，PHOSIDA均列出匹配的酶模块，预测二级结构，保守模式以及在刺激作用下的动力学调整，还可以在一定条件下预测非特异性的磷酸化位点。
PhosphoPep version2.0	http://www.phosphopep.org/	该数据库收录了4个物种的质谱磷酸化数据，包括果蝇、人类、线虫以及酵母。
PhosPhAt 2.2	http://phosphat.mpimp-golm.mpg.de/	该数据库收录了拟南芥磷酸化位点的数据。这些数据来自全世界多个研究小组的6,282条磷酸肽的质谱测试结果。
P(3)DB	http://www.p3db.org/	该数据库收录了多种植物的蛋白磷酸化数据，它包含6,382种底物蛋白的14,670个不可逆磷酸化位点。
Swiss-Prot knowledgebase	http://www.expasy.ch/sprot/userman.html	该数据库为每一种蛋白做注解，在“氨基酸修饰”部分收录了蛋白的转录后修饰的信息。
PhosphoPOINT	http://kinase.bioinformatics.tw/	该数据库是一个人类激酶和磷酸化蛋白的综合性数据库，它包含4,195种磷酸化蛋白，带有15,738个磷酸化位点。
NetworKIN	http://networkin.info/search.php	该数据库是预测体内激酶-底物关系的工具，有助于深入了解激酶和磷酸化蛋白。它是发展磷酸化调节网络的重要资源和门户。
phospho3D	http://cbm.bio.uniroma2.it/phospho3d/	该数据库是磷酸化位点的三维结构数据库，储存了来自phospho.ELM数据库的信息，在结构和氨基酸残基水平的信息非常丰富。
PepCyber ^{P-Pep}	http://pepcyber.umn.edu/PPEP/	该数据库是由10类磷酸化蛋白结合域（PPBD）介导的人的蛋白-蛋白相互作用数据库。

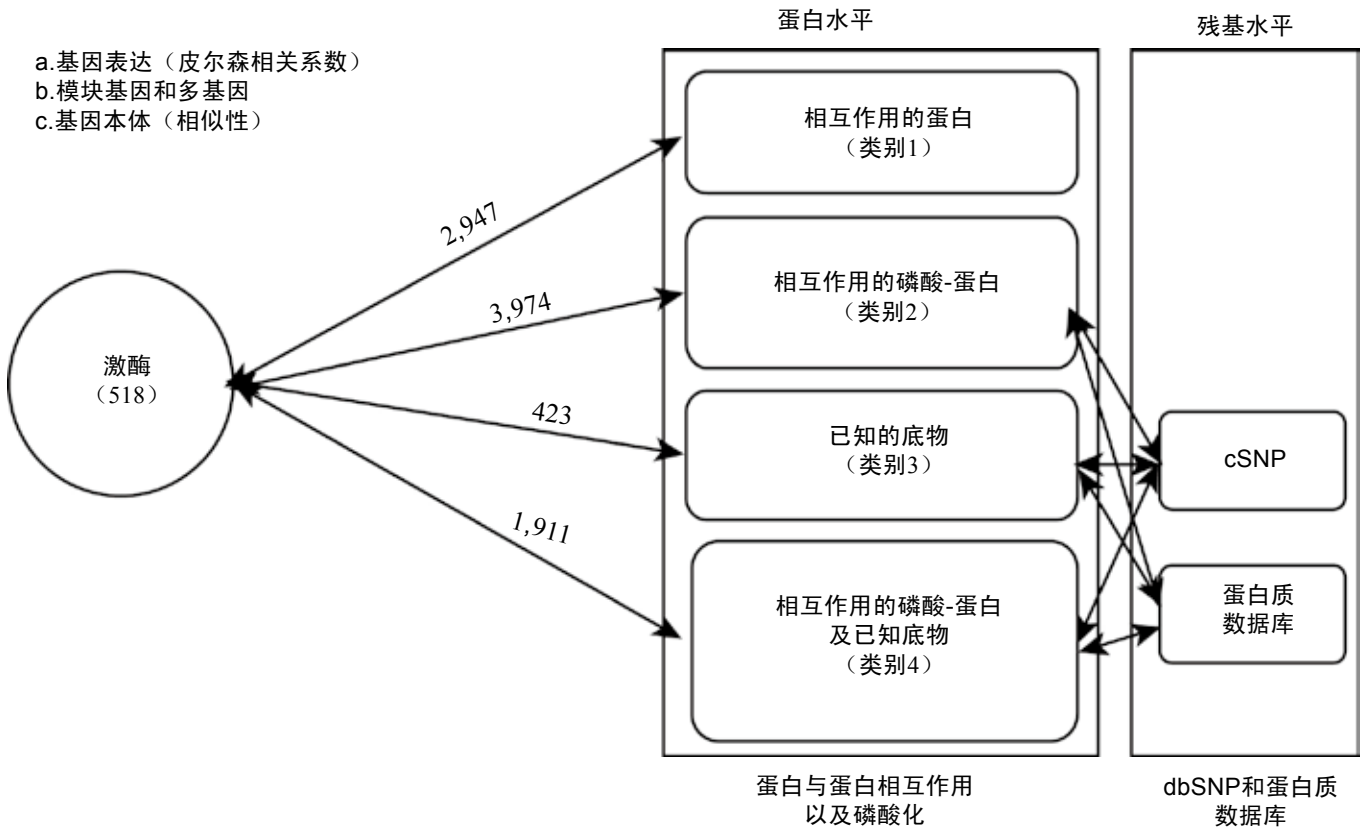


图16 PhosphoPOINT是人类激酶和磷酸化蛋白的综合性数据库。
图片来源: <http://kinase.bioinformatics.tw/introduction.html>

表4 预测非特异性或组织特异性磷酸化位点的工具

数据库名称	网址	特征描述
NetPhos 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/	该工具用于预测真核蛋白在神经网络中的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸磷酸化位点。
CRP ^[63]	http://fasta.bioch.virginia.edu/crp/	该工具用于执行溶解性蛋白裂解，报告预测好的Edman循环，一旦有特定的丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸被磷酸化，就可以观察到相应的放射性现象。
DISPHOS 1.3	http://core.ist.temple.edu/pred/pred.html	该工具采用无序信息提高磷酸化和非磷酸化位点间的分辨率，预测蛋白中丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸的磷酸化位点。
NetPhosYeast 1.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosYeast/	该工具用于预测酵母蛋白丝氨酸和苏氨酸磷酸化位点。
NetPhosBac 1.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosBac-1.0/	该服务器用于预测细菌蛋白丝氨酸和苏氨酸磷酸化位点。

表5 预测激酶特异性磷酸化位点或磷酸结合基序的工具

数据库名称	网址	特征描述
PROSITE	http://www.expasy.ch/prosite/	该工具包含描述蛋白域、家族、功能位点以及鉴定这些信息的模式和图解。
ELM	http://www.elm-tech.com/	该数据库是预测真核蛋白功能位点的数据库。
Minimotif Miner (MnM)	http://mnm.engr.uconn.edu/MNM/SMSSearchServlet	该工具用来分析蛋白的短期功能模块，用以描述蛋白的转录后修饰，与其它蛋白、核酸、小分子蛋白的结合以及蛋白运输过程。
PhosphoMotif Finder	http://www.hprd.org/PhosphoMotif_finder	该工具收录已知激酶/磷酸酶的底物和结合模式信息。
PREDIKIN 1.0 ^[64]	http://florey.biosci.uq.edu.au/kinsub/predikin.htm	该工具在一级序列和酶催化域的基础上预测丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶底物。
Predikin & PredikinDB 2.0	http://predikin.biosci.uq.edu.au/pkr/	该工具包含两个部分：(i) PredikinDB，磷酸化位点数据库；(ii) a Perl modul提供蛋白激酶的分类方法。
ScanSite 2.0 ^[65]	http://scansite.mit.edu/	该工具用于寻找蛋白内最有可能被特定的蛋白激酶磷酸化的位点。
NetPhosK 1.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/	该神经网络用于预测激酶特异性的真核蛋白磷酸化位点。
PredPhospho2	http://phosphovariant.ngri.go.kr/seq_input_predphospho2.htm?PHPSESID=0e390b13ed30d0beaf5a2d42896c993e	该工具被应用于SVM计算法则，能够预测激酶特异性磷酸化位点。
GPS 2.1	http://gps.biocuckoo.org/	该工具是GPS系统的最新版本，能够预测408种人蛋白激酶的特异性磷酸化位点。
PPSP 1.0 ^[66]	http://ppsp.biocuckoo.org/	一种在线工具，用于预测激酶特异性磷酸化位点，目前这种工具已被应用于BDT。
KinasePhos 1.0	http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw/	该工具用于预测现有蛋白序列的激酶特异性磷酸化位点。
KinasePhos 2.0	http://kinasephos2.mbc.nctu.edu.tw/Comparison.html	该工具是KinasePhos的新版本。
PhoScan	http://www.phoscan.ca/	该工具预测激酶特异性磷酸化位点并带有序列特征。
pkaPS	http://mendel.imp.ac.at/sat/pkaPS/	该工具采用简化的激酶结合模型预测PKA磷酸化位点。
CRPhos 0.8	http://www.ptools.ua.ac.be/CRPhos	该工具可预测激酶特异性磷酸化位点，是免费的学术资源，并且能够被Linux/Unix系统所兼容。
AutoMotif 2.0	http://ams2.bioinfo.pl/	该工具可鉴定包括磷酸化在内的转录后修饰位点。
SMALI	http://lilab.uwo.ca/SMALI.htm	该工具可搜索人蛋白中最有可能与SH2结构域结合的短肽配体。

表6 其它相关计算工具

数据库名称	网址	特征描述
Motif-X	http://motif-x.med.harvard.edu/	该工具是一种用于提取任何序列数据组中过度反应模式的软件工具。
PhosphoBlast ^[67]	http://phospho.elm.eu.org/pELMBlastSearch.html	有了该工具，用户可以查询目的蛋白相关的磷酸化短肽。
RLIMS-P	http://pir.georgetown.edu/pirwww/iprolink/rlimsp.shtml	该工具用于提取蛋白磷酸化相关的蛋白激酶、底物和磷酸化位点相关的信息。
KEA	http://www.nzdl.org/Kea/	该工具可用于激酶富集分析。
DOG 1.0	http://dog.biocuckoo.org/software.php	该工具是一种绘制蛋白结构域图片的工具，图片质量可以达到公开发表的水平。

表7 通过质谱数据检测潜在磷酸化位点的工具

数据库名称	网址	特征描述
PhosphoScore	http://dir.nhlbi.nih.gov/papers/lkem/phosphoscore/	该工具是一种磷酸化分配程序，能够与所有级别的串联质谱兼容。这个程序采用费用函数将匹配度和正常化的丰度与理论值相比较。
Ascore ^[68]	http://ascore.med.harvard.edu/	该工具能够测量正确的磷酸化位点定位的概率。
DeBunker ^[69]	http://fields.scripps.edu/download.php	该工具一种SVM软件，能够自动验证串联质谱得到的磷酸化多肽的数据。
APIVASE 2.2	http://bioanalysis.dicp.ac.cn/proteomics/software/APIVASE.html	该工具通过整合多级质谱数据从而验证多肽磷酸化情况。
InsPecT ^[70]	http://proteomics.ucsd.edu/LiveSearch/	该工具可用于验证磷酸化短肽串联质谱的数据，而无须手动验证。

七、展望

蛋白质的磷酸化修饰是生物体内重要的共价修饰方式之一。磷酸化修饰本身所具有的简单、灵活、可逆的特性以及磷酸基团的供体ATP的易得性，使得磷酸化修饰被真核细胞所选择接受成为一种最普遍的调控手段。蛋白质的磷酸化和去磷酸化这一可逆过程，几乎调节着包括细胞的增殖、发育、分化、细胞骨架调控、细胞凋亡、神经活动、肌肉收缩、新陈代谢及肿瘤发生等生命活动的所有过程，并且可逆的蛋白质磷酸化是目前所知道的最主要的信号转导方式。用蛋白质组学方法研究蛋白质磷酸化，对研究高等真核生物的调控机制非常重要，对于生命科学领域的影响也将是非常远大的。同时，用蛋白质组学方法研究蛋白质磷酸化也处于蛋白质组学和信号转导领域的前沿。

目前已知有许多人类疾病是由于异常的磷酸化修饰所引起，而有些磷酸化修饰却是某种疾病所导致的结果。在心血管系统中，部分蛋白激酶通过与AT II、ET-1、PDGF等多种血管活性物质的相互调控，影响血管平滑肌细胞和内皮细胞的功能和结构，直接参与心血管疾病的发展。用蛋白磷酸化酶抑制剂防治动脉粥样硬化、高血压、冠脉痉挛和心肌缺血等疾病的研究得到了显著效果。蛋白磷酸化酶抑制剂防治心血管病研究的初步成果令人鼓舞，但是还需要更多的临床试验证实这些发现。作为一类全新的药物，蛋白磷酸化酶抑制剂很有希望为心血管疾病的防治开辟一条新的途径。