

学校编码: 10384

分类号__密级__

学号: 20520101151518

UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

基于元素标记策略和纳米颗粒的磷酸化蛋
白质富集和定量分析方法研究

Element Labeling Strategies and Nanoparticles Based
Phosphoprotein Enrichment and Quantification

李 兆 鑫

指导教师姓名: 王秋泉 教授

专业名称: 分析化学

论文提交日期: 2013 年 9 月

论文答辩时间: 2013 年 9 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 9 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
第一章 前 言.....	1
1.1 蛋白质的组成、结构、功能.....	1
1.2 蛋白质的可逆磷酸化.....	3
1.2.1 蛋白质的翻译后修饰.....	3
1.2.2 蛋白质的可逆磷酸化.....	3
1.3 磷酸化蛋白质定量方法.....	6
1.3.1 二维凝胶电泳的磷酸化蛋白质分离与定量方法.....	6
1.3.2 放射性 P 代谢标记磷酸化蛋白质及射线自显影方法.....	6
1.3.3 荧光定量分析磷酸化蛋白质的方法.....	7
1.3.4 分子质谱法.....	8
1.3.4.1 同位素代谢标记 (Metabolic labeling) 策略.....	9
1.3.4.2 通过化学标记引入稳定同位素标签.....	11
1.3.4.3 通过蛋白质酶解引入同位素标签的策略.....	13
1.3.4.4 基于同位素标记的多肽、蛋白质标准品的绝对定量策略.....	13
1.3.5 元素质谱法.....	14
1.3.5.1 ICP-MS 的原理.....	14
1.3.5.2 ICP-MS 在蛋白组学绝对定量中的应用.....	14
1.3.5.3 ICP-MS 定量磷酸化蛋白质.....	15
1.4 磷酸化蛋白质定量分析的难点与解决方法.....	17
1.4.1 磷酸化蛋白质定量分析的难点.....	17
1.4.2 常见的磷酸化蛋白质富集方法.....	18
1.4.2.1 免疫沉淀法.....	18
1.4.2.2 亲和色谱法.....	19
1.4.2.3 化学修饰法.....	20

1.4.2.4 别的富集方法.....	21
1.4 本论文的选题依据及主要研究内容	22
1.5 参考文献	24
第二章 磷酸化蛋白质的稀土标记策略.....	34
2.1 前言	34
2.2 仪器与试剂	35
2.3 PAC 法引入稀土标记	36
2.3.1 PAC 的原理.....	36
2.3.2 多肽链上羧基的封闭.....	37
2.3.3 PAC 产率的提高.....	39
2.3.4 胱胺残基二硫键的还原.....	41
2.3.5 MMA-DOTA-Eu 标记巯基.....	42
2.4 利用 HPLC/SUID-ICP-MS 技术对稀土标记磷酸化多肽进行定量.....	42
2.5 结论	45
2.6 参考文献	46
第三章 Gabpbp 标签对磷酸化蛋白质的特异标记和绝对定量	48
3.1 前言	48
3.2 仪器与试剂	49
3.3 Hbpbp 标签的合成与表征	51
3.3.1 2,6-二(二甲基吡啶胺甲基)-对叔丁基苯酚(Hbpbp)的合成	51
3.3.2 Gabpbp 标签的合成	52
3.4 Gabpbp 标签对磷酸化多肽的标记	53
3.4.1 溶剂和 pH 的影响	53
3.4.2 Gabpbp 标签与磷酸化多肽摩尔比的优化	54
3.4.3 磷酸化位点的选择性标记	56
3.4.4 多磷酸化多肽的标记	57
3.5 HPLC-ICP-MS 定量分析.....	59
3.5.1 HPLC-ICP-MS 分析磷酸化多肽	59
3.5.2 HPLC-ICP-MS 分析磷酸化蛋白质	60

3.6 结论	61
3.7 参考文献	62
第四章 多功能磷酸化蛋白质分析平台的构建.....	63
4.1 前言	63
4.2 试剂与仪器	64
4.3 多功能磷酸化蛋白质分析平台的设计	67
4.3.1 光裂解连接基团的合成	68
4.3.2 HbpbpNH ₂ 标签的合成	71
4.3.3 光裂解 bpbp 标签的合成	74
4.3.4 GabpbpNH ₂ 标记磷酸化多肽.....	75
4.3.4.1 GabpbpNH ₂ 的合成	75
4.3.4.2 GabpbpNH ₂ 标记磷酸化多肽	76
4.4 SiO ₂ 纳米粒子的合成及 MPPAP 的构建	78
4.4.1 SiO ₂ 纳米粒子的合成.....	78
4.4.2 MPPAP 的构建	79
4.4.3 MPPAP 选择性标记磷酸化多肽	80
4.5 HPLC-ICP-MS 定量分析磷酸化多肽.....	81
4.6 结论	84
4.7 参考文献	85
第五章 总结与展望.....	86
5.1 论文总结	86
5.2 展望	87
在校期间已发表和待发表的论文.....	88
致 谢	89

Contents

Abstract(Chinese)	I
Abstract(English)	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 The composition, Structure and Function of Proteins	1
1.2 Reversible Phosphorylation	3
1.2.1 Post-translational modification of proteins	3
1.2.2 Phosphorylation of proteins.....	3
1.3 Phosphoprotein Quantification Methods	6
1.3.1 Phosphoproteins separation and quantification based on 2-DE	6
1.3.2 Radioactive P and autoradiography based methods	6
1.3.3 Fluorescent spectroscopy based methods.....	7
1.3.4 Molecular Mass spectrometry based methods.....	8
1.3.4.1 Metabolic labeling strategy.....	9
1.3.4.2 Stable isotope labeling strategy	11
1.3.4.3 ¹⁸ O-labeling during tryptic digestion	13
1.3.4.4 Absolute protein quantification based on peptide/protein standards	13
1.3.5 Element Mass spectrometry based methods.....	14
1.3.5.1 Principle of ICP-MS	14
1.3.5.2 ICP-MS based quantification of proteins	14
1.3.5.3 ICP-MS based quantification of phosphoproteins.....	15
1.4 Challenge of phosphoprotein quantification and solution	17
1.4.1 Challenge of phosphoprotein quantification	17
1.4.2 Common Enrichment Methods	18
1.4.2.1 Immunoprecipitation.....	18
1.4.2.2 Affinity chromatography.....	19
1.4.2.3 Chemical modification.....	20
1.4.2.4 Some other methods.....	21

1.4 Research Proposal	22
1.5 References	24
Chapter 2 Ln-Tagging Strategies of Phosphoproteins	34
2.1 Introduction	34
2.2 Instruments and reagents	35
2.3 Phosphoramidate chemistry (PAC) based Ln-labeling strategy	36
2.3.1 Principle of PAC.....	36
2.3.2 O-methyl esterification of the carboxylic groups.....	37
2.3.3 Optimization of PAC.....	39
2.3.4 Reduction of cystamine.....	41
2.3.5 MMA-DOTA-Eu labeling on thiols	42
2.4 Phosphopeptide quantification by HPLC/SUID-ICP-MS	42
2.5 Conclusions	45
2.6 References	46
Chapter 3 Sepecific Labeling and Abosultue Quantification of Phosphoproteins	
By Gabpbp	48
3.1 Introduction	48
3.2 Instruments and reagents	49
3.3 Synthesis and characterization of Hbpbp	51
3.3.1 Synthesis of Hbpbp	51
3.3.2 Synthesis of Gabpbp.....	52
3.4 Gabpbp labeling phosphoproteins	53
3.4.1 Optimization of solvent and pH	53
3.4.2 Optimization of molecular ratio	54
3.4.3 Selective tagging of different phosphorylated sites.....	56
3.4.4 Labeling of multiphosphorylated peptides	57
3.5 Quantification by HPLC-ICP-MS	59
3.5.1 Phosphopeptide quantification by HPLC-ICP-MS	59
3.5.2 Phosphoprotein quantification by HPLC-ICP-MS.....	60

3.6 Conclusions	61
3.6 References	62
Chapter 4 Sythesis of Multifunctional Phosphoproteins Assay Platform (MPPAP)	63
4.1 Introduction	63
4.2 Instruments and reagents	64
4.3 Design of MPPAP	67
4.3.1 Synthesis of photocleavable probes	68
4.3.2 Synthesis of HbbpNH ₂	71
4.3.3 Synthesis of photocleavable Ga-chelating probe	74
4.3.4 Labeling phophopeptides with GabbbpNH ₂	75
4.3.4.1 Synthesis of GabbbpNH ₂	75
4.3.4.2 labeling phophopeptides with GabbbpNH ₂	76
4.4 Synthesis of SiO₂ NPs and MPPAP	78
4.4.1 Synthesis of SiO ₂ NPs	78
4.4.2 Synthesis of MPPAP.....	79
4.4.3 Selective labeling phoshopeptides by MPPAP.....	80
4.5 Quantification of phosphopeptides by HPLC-ICP-MS	81
4.6 Conclusions	84
4.7 References	85
Chapter 5 Conclusions and Perspectives	86
5.1 Conclusions	86
5.2 Perspectives	87
Published and Prepared Papers	88
Acknowledgements	89

摘 要

蛋白质可逆磷酸化调控的细胞信号传导在人类疾病尤其是癌症的产生和转移过程中起着主要作用。对磷酸化蛋白质进行系统的定量分析对于疾病的研究和早期和愈后诊断有着重要的意义。目前磷酸化蛋白质定量分析最常用的是分子质谱,通过引入不同的同位素标签从而实现定量。但是这些定量标签都是没有特异性的,它们可以与几乎所有的蛋白发生反应。因而在对磷酸化蛋白质分析之前需要对磷酸化蛋白质进行选择性的富集,而且基于分子质谱的定量方法得到的主要是相对定量的信息。随着生命科学的发展,相对定量已经难以满足研究的需要,发展磷酸化蛋白质绝对定量技术已经迫在眉睫。电感耦合等离子体原子质谱(ICP-MS)具有灵敏度高、线性范围宽、背景干扰小、同一个元素不同形态具有相同的响应信号等优点,已经成为蛋白质绝对定量分析中具有巨大潜力的分析工具。已有的基于检测 ^{31}P 的磷酸化蛋白质绝对定量技术严重受限于 ^{31}P 在等离子体中的低离子化效率和无法避免的多原子离子干扰。另一方面,使用具有多同位素且在ICP中有高电离效率的外源元素对蛋白质进行人工标记的策略已被用于蛋白质的绝对定量研究中,并可通过同位素稀释的方法实现更加精确的定量。本论文基于外源金属元素标记磷酸化蛋白质,发展了可实现磷酸化蛋白质的选择性标记和绝对定量的标记策略,为ICP-MS在生物分析领域的研究提供了新的发展思路。主要的研究工作分为以下五个部分:

第一章对磷酸化蛋白质进行了简要的介绍,并综述了近几年来基于分子质谱和ICP-MS的磷酸化蛋白质定量分析技术和方法。

第二章基于氨基磷酸酯键反应(phosphoramidate chemistry, PAC),建立了磷酸化蛋白质的稀土元素标记策略,并利用HPLC/SUID-ICP-MS对稀土元素进行检测从而实现磷酸化蛋白质的定量。模型磷酸化多肽的标记实验证明了该标记策略的可行性。

第三章基于能与含磷酸的化合物发生选择性反应的双核镓配合物,建立了磷酸化蛋白质的镓标记策略。我们对含有三种磷酸化位点(pS, pT, pY)的模型多肽和模型磷酸化蛋白质成功地进行了标记,并用HPLC-ICP-MS实现了绝对定量,证明了该标记策略的可行性。

第四章将光可裂解镓配体与纳米技术相结合,建立了一种集磷酸化蛋白质的标记、纯化、富集和定量于一体的多功能磷酸化蛋白质分析平台(Multifunctional phosphoprotein assay platform, MPPAP)。初步的研究结果表明, MPPAP 可以实现我们设想的标记、纯化、富集和定量功能。进一步对 MPPAP 的功能进行研究的工作正在进行中。

第五章主要总结了本论文的研究内容和有待深入开展的研究工作,并对 ICP-MS 在这一领域中的进一步应用进行了展望。

关键词: 磷酸化蛋白质; 蛋白质定量; 电感耦合等离子体质谱; 元素标记; 镓配合物标签

Abstract

Cell signaling regulated by reversible protein phosphorylation has a significant role in human diseases, most notably cancer. Quantification of phosphoproteins during pathological process can provide important information for pathogeny, early diagnosis and prognosis of diseases. Molecular mass spectrometry (MMS) has been widely used in quantification of phosphoproteins. However, stable-isotope tags used for quantification of phosphoproteins by MMS have no specificity to phosphoproteins. Today, most phosphoproteomic studies are conducted by MMS in combination with phosphospecific enrichment methods, mostly achieving relative quantification of phosphoproteins. Along with the progress of life science, it urgently calls for absolute quantification methods rather than relative quantification ones. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) with the merits of high sensitive, broad dynamic range, low background and identical signal response of the same element in different chemical forms/species is becoming a promising tool in absolute quantification of proteins. However, nowadays ICP-MS based phosphoprotein quantification methods depend mainly on direct quantification of ^{31}P in phosphoprotein. These ^{31}P based quantification methods are suffered from the poor ionization efficiency of P in Ar-based plasma and unavoidable polyatomic interferences. Exogenous element-tagging strategy, in which the element has multiple isotopes and high ionization efficiency on Ar-based ICP, is desired to be used in absolute quantification of phosphoproteins. In this thesis, we developed element-based labeling strategies for specific labeling and absolute quantification of phosphoproteins, which will provide new ideas for applications of ICP-MS in bioanalysis. The main research presented in my thesis comprises five parts.

Chapter 1 briefly introduces the background knowledge of phosphoproteins, and critically reviewed the reported phosphoprotein quantification strategies based on MMS and ICP-MS so far.

Chapter 2 presents a Ln-tagging strategy towards phosphoproteins that we

developed. This phosphoramidate chemistry (PAC) based tagging strategy was validated by several model phosphopeptides, in which the model phosphopeptides were labeled with MMA-DOTA-Eu under the optimized conditions and subsequently quantified using HPLC/SUID-ICP-MS. The results obtained indicated that ICP-MS is feasible to quantify the Ln-labeled phosphoproteins.

In Chapter 3, a Ga-labeling strategy towards phosphoproteins is described based on the specificity between di-Gallium 2,6-Bis{[bis(2-pyridylmethyl)amino]methyl}-4-tert-butylphenol (bpbp) complex and phosphopeptides. The phosphopeptides with different phosphorylated sites (pS, pT, pY) and multiple phosphorylated sites as well as phosphoproteins are specifically and quantitatively labeled with Ga³⁺-bpbp, achieving the absolute quantification of them using HPLC/SUID-ICP-MS. The results indicated the feasibility of absolute quantification of phosphoproteins by Ga-labeling strategy.

In Chapter 4, we designed and synthesized a Ga-Complexing ligand that contains a photocleavable group and a phosphospecific Ga-bpbp moiety. It was further conjugated to SiO₂-NPs to construct a multifunctional phosphoprotein assay platform (MPPAP). The preliminary results indicated the feasibility of labeling, purification, enrichment and quantification of phosphoproteins by MPPAP. Further application of MPPAP is still ongoing in our lab.

In Chapter 5, we concluded the achievements of this thesis and prospected the ongoing research. We also gave perspective view of the future applications of ICP-MS in this area.

Key words: Phosphoproteins; protein quantification; inductively coupled plasma mass spectrometry; element-based labeling; Ga-complexing probe

第一章 前言

1.1 蛋白质的组成、结构、功能

蛋白质 (protein) 是以 L- α -氨基酸为基本单位构成的生物链状大分子。主要包括 20 种基因编码天然氨基酸, 它们分别是: 赖氨酸 (lysine, Lys, K)、色氨酸 (tryptophan, Trp, W)、苯丙氨酸 (phenylalanine, Phe, F)、蛋氨酸 (methionine, Met, M)、苏氨酸 (threonine, Thr, T)、异亮氨酸 (isoleucine, Ile, I)、亮氨酸 (leucine, Leu, L)、缬氨酸 (valine, Val, V)、甘氨酸 (glycine, Gly, G)、丙氨酸 (alanine, Ala, A)、脯氨酸 (proline, Pro, P)、丝氨酸 (serine, Ser, S)、酪氨酸 (tyrosine, Tyr, T)、半胱氨酸 (cysteine, Cys, C)、天冬酰胺 (asparagine, Asn, N)、谷氨酰胺 (glutamine, Gln, Q)、天冬氨酸 (aspartic acid, Asp, D)、谷氨酸 (glutamic acid, Glu, E)、精氨酸 (arginine, Arg, R) 和组氨酸 (histidine, His, H); 其中前八种为人体自身不能合成的必需氨基酸, 必须从食物中摄取。

目前除了这 20 种主要基因编码天然氨基酸外, 越来越多的基因编码天然氨基酸被发现。硒代半胱氨酸 (Selenocysteine, Sec, U) ^[1-2] 被称为第 21 种基因编码氨基酸。2002 年人们又发现了由终止密码子 UAG 有意义编码的第 22 种基因编码天然氨基酸吡咯赖氨酸 (Pyrrolysine, Pyl, O) ^[3-4]。随着分析检测技术的不断提高, 可能会有更多的新氨基酸被发现。

氨基酸的氨基和羧基通过共价结合形成多肽, 在生物体中, 核糖体以 mRNA 的为模板, 将 mRNA 分子中碱基排列顺序转变为蛋白质或多肽链中的氨基酸排列顺序, 最后组装成目标多肽链。这些氨基酸之间的共价键、氢键、疏水作用、离子键、二硫键等作用力, 形成了蛋白质的一级、二级、三级、四级结构, 最终呈现出蛋白质特有的空间构象和生物功能。蛋白质只有形成正确的空间三维结构才能使其行使正常的生化功能。

一级结构, 是指蛋白质中氨基酸残基的排列顺序以及二硫键的位置; 二级结构则是指多肽链沿一定方向盘绕和折叠的方式, 主要有 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角、自由回转以及 B-折叠; 三级结构则是指整个肽链的折叠情况, 包括侧链的排列,

是在二级结构的基础上进行次级键卷曲折叠而成的空间三维构象；四级结构是指多亚基蛋白质分子中具有三级结构的多肽链聚合形成的结构。

从元素组成来看，蛋白质主要是由碳（C，50%）、氢（H，7%）、氧（O，23%）、氮（N，16%）、硫（S，2%），以及部分蛋白中含有的微量元素硒（Se）等组成。翻译后修饰的过程会将磷（P）元素引入到蛋白质。此外，还有一些金属元素会通过配位作用结合到蛋白质中，并对生命活动起到重要作用，如（Na、K、Ca、Mg、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn等）。

基因→mRNA→蛋白质，这是传统的中心法则。现在已经证明，一个基因并不只对应于一个蛋白质，可能会有几个，甚至几十个。虽然人类基因的数量只有20,000–25,000个，已经远远少于早期的估计，但是这些基因编码出来的蛋白质种类却远远多于这个数量，而且蛋白质在生命过程中会发生修饰，这更增加了蛋白质的种类和复杂程度。据估计，人体内可以产生 10^{10} 种抗体，每一种都可以与对应的抗原特异性结合，可见蛋白的复杂^[5]。基因虽然是遗传信息的源头，而生命体的功能却是由蛋白质执行。基因组计划的实现为未来生命科学研究奠定了坚实的基础，但是它并不能在分子层面上直接提供认识各种生命活动的信息，因此必须研究生命活动的执行者“蛋白质”这一必不可少的环节。

蛋白质有着极其重要的生物功能，如催化新陈代谢（酶）、调节蛋白质的生理功能、储存氨基酸、组成有机体、运输功能、接受和传递信息、调节细胞生长、分化以及遗传信息的表达等。生物体在生长过程中蛋白质的表达是动态变化的，研究生理及病理状态下蛋白的不同表达，发现生物体内的关键调控分子及与疾病相关的蛋白标志物，便可以为疾病的早期诊治提供分子标志。特别是与恶性肿瘤相关的蛋白质，对疾病的预防、早期诊断及临床治疗具有重要的意义。

1.2 蛋白质的可逆磷酸化

1.2.1 蛋白质的翻译后修饰

翻译后修饰 (Post-translational modification, PTM) 是蛋白质生物合成的重要过程。常见的翻译后修饰有磷酸化、糖基化、乙酰化、泛素化等。发生翻译后修饰后,蛋白质的疏水性、极性、构象和电荷等特征发生了变化,从而导致蛋白质的生物功能发生变化。翻译后修饰广泛发生在蛋白质上,且在蛋白质的生物功能中起着很大的作用,所以对于翻译后修饰的研究一直是蛋白组学中的一个热点。

1.2.2 蛋白质的可逆磷酸化

可逆磷酸化 (reversible phosphorylation) 是蛋白质翻译后修饰中一种非常重要的形式。早在 1906 年, Levene 和 Alsberg 就在 vitellin 蛋白质中首次发现了蛋白质的磷酸化^[6], 并在将近 30 年后鉴定出这个蛋白质的磷酸化发生在丝氨酸位点上^[7]。1954 年 Burnett 等人^[8]首次提出蛋白质磷酸化是由酶催化控制的, 而不是随机发生的。1979 年 Tony Hunter 首次发现了酪氨酸位点也可以发生磷酸化。^[9]20 世纪 80 年代, 针对丝氨酸、苏氨酸位点的磷酸激酶 (kinase) 和磷酸酶 (phosphatase) 的发现揭示了蛋白质可逆磷酸化的过程^[10-12]。

磷酸化主要表现为蛋白质的氨基酸侧链上的-OH 和-NH-上连接上一个磷酸基团。磷酸激酶会使蛋白质磷酸化, 而磷酸酶则会使磷酸化蛋白质去磷酸化, 这两种酶的存在共同调节着生命体系内蛋白质的可逆磷酸化。蛋白质的磷酸化主要有两种形式, 一种是发生在 O 端位点的磷酸化, 包括丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸位点, 另一种是发生在 N 端的磷酸化, 包括组氨酸、精氨酸和赖氨酸位点。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库