



基于 Ti^{4+} -IMAC 富集的分枝菌酸小杆菌深度覆盖磷酸化蛋白质组研究

蒙书红^{1,2}, 常蕾², 柳峰松^{1*}, 徐平^{2*}, 张瑶^{2*}

1 河北大学生命科学学院, 河北 保定 071002

2 军事科学院军事医学研究院生命组学研究所, 中国医学科学院蛋白质组学与药物研发新技术创新单元, 国家蛋白质科学中心(北京), 北京蛋白质组研究中心, 蛋白质组学国家重点实验室, 北京 102206

蒙书红, 常蕾, 柳峰松, 徐平, 张瑶. 基于 Ti^{4+} -IMAC 富集的分枝菌酸小杆菌深度覆盖磷酸化蛋白质组研究. 微生物学报, 2022, 62(10): 3768–3783.

Meng Shuhong, Chang Lei, Liu Fengsong, Xu Ping, Zhang Yao. In-depth characterization of *Mycolicibacterium smegmatis* MC²155 phosphoproteome based on the Ti^{4+} -IMAC enrichment strategy. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(10): 3768–3783.

摘要: 【目的】本研究以分枝菌酸小杆菌(*Mycolicibacterium smegmatis*)为研究对象, 探索适于原核微生物理想的磷酸化富集方法。【方法】我们比较了二氧化钛(TiO_2)、 Fe^{3+} -NTA 和 Ti^{4+} 螯合在磷酸酯修饰的固相微球(Ti^{4+} -IMAC) 3 种不同富集方法磷酸化肽段的富集效率, 并用不同分辨率的质谱仪评估富集稳定性。【结果】 Ti^{4+} -IMAC 富集效率最高, 磷酸化位点数是 TiO_2 或 Fe^{3+} -NTA 方法的 7 倍以上; TiO_2 和 Fe^{3+} -NTA 方法富集到的磷酸化位点数相差不大, 与已报道的用 TiO_2 方法富集的磷酸化位点数目接近。 Ti^{4+} -IMAC 富集结果稳定性很好, 高分辨率 Lumos 质谱仪鉴定到的磷酸化位点数是 Velos 的 2.6 倍。【结论】本研究较高效地实现了分枝菌酸小杆菌磷酸化事件的鉴定, 共鉴定到 2 280 个磷酸化蛋白、10 880 个磷酸化肽段及 4 433 个可信磷酸化位点, 有望用于其他微生物的磷酸化蛋白质组学研究。

关键词: 分枝菌酸小杆菌; 磷酸化蛋白质组; TiO_2 ; Fe^{3+} -NTA; Ti^{4+} -IMAC

基金项目: 国家自然科学基金(32141003, 31901037); 京津冀基础研究合作专项(J200001)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (32141003, 31901037) and by the Beijing-Tianjin-Hebei Basic Research Cooperation Project (J200001)

*Corresponding authors. Tel: +86-10-61777119; E-mail: ZHANG Yao, zhangyaowsw@163.com, XU Ping, xuping_bprc@126.com, LIU Fengsong, liufengsong@hbu.edu.cn

Received: 8 February 2022; Revised: 22 June 2022; Published online: 14 July 2022

In-depth characterization of *Mycolicibacterium smegmatis* MC²155 phosphoproteome based on the Ti⁴⁺-IMAC enrichment strategy

MENG Shuhong^{1,2}, CHANG Lei², LIU Fengsong^{1*}, XU Ping^{2*}, ZHANG Yao^{2*}

1 College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, Hebei, China

2 State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences Beijing, Research Unit of Proteomics & Research and Development of New Drug of Chinese Academy of Medical Sciences, Institute of Lifeomics, Academy of Military Medical Sciences of Academy of Military Science, Beijing 102206, China

Abstract: [Objective] *Mycolicibacterium smegmatis* was used to explore more efficient strategies for enriching phosphorylated peptides in prokaryotes. [Methods] We evaluated the efficiency of three different methods, TiO₂, Fe³⁺-NTA and Ti⁴⁺-IMAC, for the enrichment of phosphopeptides. Further, we employed two mass spectrometers with different resolutions, Orbitrap Velos and Orbitrap Fusion Lumos, to assess the enrichment stability. [Results] Ti⁴⁺-IMAC was the optimum enrichment method, with the number of phosphopeptides and sites enriched seven-fold that of TiO₂ or Fe³⁺-NTA. TiO₂ and Fe³⁺-NTA showed no significant difference in the number of phosphorylation sites enriched, which was similar to the results of the published works about TiO₂. In addition, the detection results of two different mass spectrometers showed that Ti⁴⁺-IMAC enrichment was stable in two biological duplicate samples. The average phosphorylation sites detected by Lumos was 2.6-fold that by Velos. [Conclusion] Ti⁴⁺-IMAC technique can efficiently accomplish high enrichment of phosphorylation events in *M. smegmatis*. We identified a total of 2 280 phosphorylated proteins, 10 880 phosphorylated peptides and 4 433 credible phosphorylation sites. Ti⁴⁺-IMAC method can be widely used in the phosphoproteomics of other microorganisms.

Keywords: *Mycolicibacterium smegmatis*; phosphoproteomics; TiO₂; Fe³⁺-NTA; Ti⁴⁺-IMAC

蛋白质磷酸化是在蛋白激酶的催化下, 将 ATP 或 GTP 上的 γ -磷酸基团转移到靶蛋白特定的氨基酸残基上, 如丝氨酸(Ser, S)、苏氨酸(Thr, T)和酪氨酸(Tyr, Y)等, 以改变蛋白质的理化性质, 进而改变蛋白质功能。蛋白质磷酸化修饰是生命体中最普遍、可逆、短暂的翻译后修饰类型之一, 调节着包括细胞生长、增殖、分化、发育、信号传导、凋亡和代谢等几乎所有的生命活动过程, 而异常的磷酸化修饰会影响这些过程甚至会导致疾病的发生发展^[1-5]。因此, 探究动态的磷酸化蛋白质组有助于我们

充分理解生命过程。

近十多年来, 随着富集策略和质谱技术的发展, 研究者已实现了真核生物中磷酸化事件的大规模精准鉴定。真核细胞中已认识的磷酸化独立事件远超过十万个^[1], 而原核生物中已报道的 S/T/Y 磷酸化事件却少得多^[6-11]。2018年前, 主要依赖的富集手段是 TiO₂ 方法, 发现的微生物磷酸化事件不超过 520 个, 如鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)中 137 个^[12], 结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)中 512 个^[13], 分枝菌酸小杆菌(*Mycolicibacterium*

smegmatis) 中 205 个, 天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 中 289 个, 恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 中 109 个。2019 年来, 研究者发现 Fe^{3+} -IMAC 方法可进一步提高原核微生物磷酸化位点的鉴定, 如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中 1 883 个^[14], 金黄葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 中 3 800 个^[15]。与真核生物相比, 意味着原核微生物中磷酸化蛋白质组还有较大的研究空间。

固相金属亲和色谱法 (immobilized metal affinity chromatography, IMAC) 是在酸性条件下, 通过肽段上带负电荷的磷酸化基团与固定相上的 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 或 Ga^{2+} 等金属离子结合来富集磷酸化肽段, 固定相富集材料主要由金属离子、螯合剂和基质载体 3 部分组成^[16-17]。本研究中所用的 Ti^{4+} -IMAC 是中国科学院大连化学物理研究所叶明亮研究员研发的新一代磷酸化肽段的富集材料。与 TiO_2 相比, Ti^{4+} -IMAC 应用于真核细胞中后, 磷酸化事件的鉴定量提高了约 30%, 富集特异性高达 95%^[18], 显示着 Ti^{4+} -IMAC 方法在磷酸化肽段富集中更具有优势^[19-21]。尽管 Ti^{4+} -IMAC 在真核细胞磷酸化肽段的富集中具有较高的富集效率, 但其在原核生物中的磷酸化富集效率尚未有报道。

研究发现, S/T/Y 位点发生磷酸化修饰在调控微生物的生命周期 (如细胞分裂和细胞壁合成) 和致病 (如调控毒力基因表达、促进宿主粘附、生物膜形成、免疫逃逸、抗生素耐药和宿主滞留) 等生物学过程中发挥了重要的作用^[7,22-25]。分枝菌酸小杆菌属于快生长菌, 无致病性, 与分枝杆菌属的其他分枝杆菌亲缘关系比较近。因与结核分枝杆菌以及麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*) 共享多数同源染色体, 常被用于这 2 种病原菌的基本遗传特征^[26-27]、毒力^[28-29]、调控网络^[30] 和免疫原性^[31] 等功能研

究中。2018 年 2 月以前, 分枝菌酸小杆菌属于分枝杆菌属 (*Mycobacterium*), Gupta 等经保守基因结构分析后, 将其修正为分枝菌酸杆形菌属 (*Mycolicibacterium*)^[32]。本研究以分枝菌酸小杆菌为研究材料, 首先通过比较 TiO_2 、 Fe^{3+} -NTA 和 Ti^{4+} -IMAC 3 种不同富集方法对其磷酸化事件的富集数目; 其次, 用不同批次的菌体样本制备肽段样品并进行 Ti^{4+} -IMAC 富集技术重复, 采用不同分辨率的质谱仪进行鉴定, 有望为分枝菌酸小杆菌及与其近源的人类病原菌 (如结核分枝杆菌) 的蛋白质磷酸化修饰研究提供较好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及试剂

分枝菌酸小杆菌 (*M. smegmatis*) 标准株 MC²155 由中国医学科学院医药生物技术研究所余利岩研究员馈赠。

DifcoTM Middlebrook 7H9 Broth 和 Middlebrook ADC Enrichment 均购于 BD 公司; Ac-Trypsin、Lys-C 蛋白酶为实验室自制^[33-35]; 氨水、分析甲醇、氯化钠、磷酸二氢钠和浓盐酸等均购于国药集团化学试剂有限公司; 二硫苏糖醇、氟化钠、焦磷酸钠均购于阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; 碘乙酰胺、碳酸氢铵、三氟乙酸、 β -甘油磷酸二钠、混合蛋白酶抑制剂 2、混合蛋白酶抑制剂 3 和色谱级甲醇均购于 Sigma 公司; 色谱级乙腈购于 JT. Baker 公司; C_{18} 膜购于 3M 公司; C_{18} 填料购于 Dr.maisch 公司; 磷酸盐缓冲液 PBS 购于 HyClone 公司; 尿素购于 GPC Biotech 公司; TiO_2 磁珠 [Titansphere TiO_2 (100 Å 5 μm)] 购于 GL Sciences 公司; High-SelectTM Fe-NTA 磷酸肽富集试剂盒购于 Thermo Fisher Scientific 公

司; Ti^{4+} -IMAC 材料来自中国科学院大连化学物理研究所。

1.1.2 仪器设备

纯水仪购于 Merck Millipore; 超声破碎仪和 DH-II 旋转混合仪购于宁波新芝仪器技术有限公司; 涡旋振荡器购于 Scientific Industries 公司; 离心机、恒温金属浴、液相色谱 EASY-nLC1000、真空离心浓缩仪、质谱仪 LTQ Orbitrap Velos 和 Orbitrap Fusion Lumos 来自 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 菌体培养及蛋白质组样本制备

将分枝菌酸小杆菌划线于 7H9 固体培养基平板上, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养出单菌落。将单菌落接种于含有 5 mL 7H9 液体培养基的玻璃试管中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 48 h 得到种子悬液。再以起始 $OD_{600}=0.1$ 的接种量分别转接于含有 50 mL 7H9 液体培养基的 250 mL 锥形瓶内(2 个生物学重复), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养。待培养至对数中期时, 测定 OD_{600} 值, 收集菌体, 用预冷的 PBS 清洗 3 次。向菌体中加入适量裂解液 [9.0 mol/L 尿素, 30.0 mmol/L 氯化钠, 10.0 mmol/L Tris (pH 8.0), 50.0 mmol/L 碘乙酰胺, 5.0 mmol/L 焦磷酸钠, 0.1 mol/L 磷酸二氢钠 (pH 8.0), 1.0 mmol/L 氟化钠, 1.0 mmol/L 正钒酸钠, 1.0 mmol/L β -甘油磷酸二钠, 1% 蛋白酶抑制剂 Cocktail, 1% 混合蛋白酶抑制剂 2, 1% 混合蛋白酶抑制剂 3], 重悬菌体后, 置于冰水混合物中进行超声破碎, 功率 30%, 工作 2 s, 冰浴 4 s, 共 10 min。然后进行 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为分枝菌酸小杆菌全蛋白, 将获得的上清液于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用^[36]。

提取好的全细胞蛋白质, 利用 Scion Image 软件进行灰度定量^[37]。取 1 μg 全蛋白用 12% SDS-PAGE 胶分离进行质量检测。

我们首先比较了 TiO_2 、 Fe^{3+} -NTA 和 Ti^{4+} -

IMAC 3 种不同富集方法, 通过 Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪对富集到的磷酸化肽段分别进行检测以比较磷酸化位点鉴定数。其次, 再次通过 Ti^{4+} -IMAC 富集方法按照同样流程进行富集, 然后将得到的磷酸化肽段进行不同分辨率质谱仪检测以比较磷酸化位点鉴定数目的稳定性。所有磷酸化实验各取 2 mg 全细胞蛋白裂解液, 各加入终浓度为 5 mmol/L 的二硫苏糖醇进行还原, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min。待恢复至室温后, 再加入终浓度为 20 mmol/L 的碘乙酰胺进行烷基化, 室温避光反应 30 min。还原、烷基化后的样本置于 10% SDS-PAGE (规格为: 10 孔, 每孔宽 0.6 cm, 高 1 cm), 每孔 1 mg 蛋白进行短胶(0.7 cm)分离^[38]。考马斯亮蓝染色后进行背景脱色(75%双蒸水, 20%甲醇, 5%冰乙酸)。将每孔蛋白胶切割成 1 mm³ 胶粒, 加入脱色液(63%双蒸水, 30%乙腈, 7% 0.5 mmol/L 碳酸氢铵)进行胶粒脱色, 然后加入乙腈进行脱水, 随后进行 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 真空干燥。最后用胰蛋白酶 (trypsin)^[33-34] 和重组赖氨酰肽链内切酶 (LysC)^[35] 2:1 比例的混合酶进行胶内酶解, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜, 随后将每 2 孔胶粒提取的肽段进行合并, 合并后用于后续磷酸化富集实验^[39]。

1.3 磷酸化肽段的富集

TiO_2 方法^[40]: 将上述方法制备的肽段用 500 μL 溶解缓冲液(6%三氟乙酸, 80%乙腈)溶解, 4 600 r/min 离心 15 min。称取 20 mg TiO_2 磁珠于 1.5 mL 离心管中并加入 20 μL 溶解缓冲液, 然后将上述肽段上清溶液转入离心管中, 置于恒温金属浴中进行 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、1 400 r/min 振荡 5 min。4 600 r/min 离心 1 min 去除上清。加入 1 mL 洗涤液(5%三氟乙酸, 60%异丙醇)后涡旋重悬 30 s, 4 600 r/min 离心 30 s 去除上清, 重复 5 次。加入 75 μL 转移溶液(0.1%三氟乙酸, 60%异丙醇)于离心管中, 重悬后转入 C_{18} 反相色谱

柱, 再次加入 75 μL 转移溶液, 将管中剩余磁珠全部转入 C_{18} 反相色谱柱中。4 000 r/min 离心 8–15 min, 直到全部离干, 然后将 C_{18} 反相色谱柱转入新的 1.5 mL 离心管中, 加入 60 μL 洗脱液(20%氨水, 32%乙腈), 4 000 r/min 离心 4 min, 重复 3 次, 所得洗脱液于 45 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥, 备用。

Fe^{3+} -NTA 方法: 按照 High-Select™ Fe -NTA 磷酸肽富集试剂盒说明进行。首先将纯化柱置于 2 mL 离心管中, 2 300 r/min 离心 30 s。加入 200 μL 洗涤液清洗纯化柱, 2 300 r/min 离心 30 s, 重复 1 次。然后向 Fe^{3+} -NTA 磁珠中加入 200 μL 洗脱液, 重悬后转移至 1.5 mL 离心管中。向由 2 mg 全蛋白制备的肽段样品中加入 500 μL 洗涤液, 充分溶解后, 最大转速离心 4 min, 将上清转入含有磁珠的 1.5 mL 离心管, 并置于 DH-II 旋转混合仪中, 15 r/min 室温孵育 30 min。取 2 个过滤柱, 20 μL 洗涤液平衡后置于 1.5 mL 的离心管中, 1 000 r/min 离心 30 s。然后将磷酸化肽段富集后的磁珠溶液转移至过滤柱中, 1 000 r/min 离心 30 s。加入 200 μL 洗涤液, 重悬后, 1 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 重复 5 次。再加入 200 μL 双蒸水, 重悬, 1 000 r/min 离心 2 min, 弃上清, 重复 1 次。然后将过滤柱放置于新的 1.5 mL 离心管中, 加入 200 μL 洗脱液重悬, 1 000 r/min 离心 30 s, 重复 3 次, 所得洗脱液于 45 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥, 备用。

Ti^{4+} -IMAC 方法: 采用优化的 Ti^{4+} -IMAC 方法^[17,20,41]富集分枝菌酸小杆菌的磷酸化肽段, 将上述方法制备的肽段用 500 μL 溶解缓冲液(5%乙腈, 50 mmol/L 碳酸氢铵)将肽段充分溶解, 加入等体积的结合缓冲液(80%乙腈, 6%三氟乙酸)以降低非特异性肽段的吸附。加入 25 mg Ti^{4+} -IMAC, 利用涡旋振荡器室温振荡

30 min。13 300 r/min 离心 6 min 后, 将上清转移至新的 2 mL 离心管中。然后再次加入 25 mg Ti^{4+} -IMAC, 用涡旋振荡器室温振荡 30 min, 13 300 r/min 离心 6 min, 弃上清。2 次富集后的 Ti^{4+} -IMAC 用 1 800 μL 洗涤液 1 (50%乙腈, 6%三氟乙酸, 200 mmol/L 氯化钠)合并, 室温振荡 30 min, 13 300 r/min 离心 6 min, 弃上清。加入 1 800 μL 洗涤液 2 (30% 乙腈, 0.1% 三氟乙酸) 室温振荡 30 min, 13 300 r/min 离心 6 min, 弃上清, 重复 1 次。加入 1 mL 洗脱液 (10%氨水), 室温振荡 15 min, 然后冰浴超声 15 min, 13 300 r/min 离心 6 min, 将上清转移至新的 1.5 mL 离心管后, 再加入 500 μL 的洗脱液, 室温振荡 15 min, 13 300 r/min 离心 6 min, 将所得上清合并后于 45 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥。

1.4 磷酸化肽段的分级分离

首先自制 C_{18} 反相色谱柱^[39,42], 用平底针头取 C_{18} 膜填充于 200 μL 枪头底部, 用 100 μL 甲醇溶解 C_{18} 填料粉末, 然后将 C_{18} 填料溶液用移液器加入到填有 C_{18} 膜的枪头中, 并用注射器压紧填料, C_{18} 填料在枪头中的高度约为 5 mm。

向 C_{18} 反相色谱柱中加入 40 μL 甲醇活化柱子, 重复 1 次, 加入 40 μL 洗脱液 9 (80%乙腈和 2%氨水)清洗反相色谱柱 2 次, 再用 40 μL 10%氨水平衡反相色谱柱 2 次。用 40 μL 10%氨水充分溶解磷酸化肽段, 然后加入反相色谱柱中。依次加入洗脱液 1 (0%乙腈, 10%氨水)、洗脱液 2 (2%乙腈, 9.8%氨水)、洗脱液 3 (5%乙腈, 9.5%氨水)、洗脱液 4 (8%乙腈, 9.2%氨水)、洗脱液 5 (10%乙腈, 9%氨水)、洗脱液 6 (20%乙腈, 8%氨水)、洗脱液 7 (40%乙腈, 6%氨水)、洗脱液 8 (50%乙腈, 5%氨水)和洗脱液 9 进行梯度洗脱。最后, 将洗脱液 1、4 和 7 合并为一个样品记为 F1, 洗脱液 2、

5 和 8 合并为一个样品记为 F2, 洗脱液 3、6 和 9 合并为一个样品记为 F3。最后将 F1、F2 和 F3 样品于 45 °C 真空干燥, 用于质谱检测。

1.5 磷酸化肽段质谱检测

向蒸干后的磷酸化肽段中加入适量的上样缓冲液(0.1% 甲酸), 充分溶解后, 基于 EASY-nLC 1 000 液相色谱进行分离。基于 TiO₂、Fe³⁺-NTA 和 Ti⁴⁺-IMAC 富集得到的磷酸化肽段 2 个生物学样本首先于 Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪进行检测。Lumos 质谱仪液相分离时间为 78 min, 梯度为 6% B 0 min, 6% B-12% B 8 min, 12% B-30% B 50 min, 30% B-40% B 12 min, 40% B-95% B 1 min, 95% B 7 min (A 相, 0.1% 甲酸, 99.9% 双蒸水; B 相, 0.1% 甲酸, 99.9% 乙腈), 流速为 600 nL/min。质谱数据使用数据依赖性采集 (data-dependent acquisition, DDA) 模式采集, 质谱扫描离子质荷比范围为 300-1 400 (*m/z*), 一级母离子扫描在 Orbitrap 内完成, 分辨率为 120 000, 离子自动增益控制 (automatic gain control, AGC) 为 5×10⁵ 个离子, 最大离子注入时间 (max injection time, MIT) 为 50 ms; 二级谱图采用高能碰撞解离 (high energy collision induced dissociation, HCD) 碎裂模式, 碰撞能量为 35%, 选取丰度最高的前 20 进行二级碎裂, AGC 为 5 000, 动态排除 (dynamic exclusion) 为 20 s。

在 LTQ Orbitrap Velos 和 Lumos 2 种不同分辨率的质谱仪比较中, Velos 质谱仪液相分离时间为 60 min, 梯度为 0% B-10% B 8 min, 10% B-22% B 30 min, 22% B-32% B 17 min, 32% B-80% B 3 min, 80% B 2 min (A 相, 0.1% 甲酸, 2% 乙腈, 97.9% 双蒸水; B 相, 0.1% 甲酸, 99.9% 乙腈), 流速为 800 nL/min。扫描离子质荷比范围为 300-1 600 (*m/z*), 一级

母离子扫描在 Orbitrap 内完成, 分辨率设置为 30 000, AGC 为 1×10⁶ 个离子, MIT 为 150 ms; 二级谱图采用碰撞诱导解离 (collision induced dissociation, CID) 碎裂模式, 归一化碰撞能量为 35%, 选取丰度最高的前 20 进行二级碎裂, AGC 为 1×10⁴, MIT 为 25 ms。最小信号检测阈值 (minimal signal threshold) 为 2 000, 动态排除为 35 s。

1.6 数据库搜索统计分析

Raw 文件用 MaxQuant^[43] (1.6.17.0) 进行非标定量搜索。数据库 Fasta 文件来源于 UniProt (2021-12-26) 及其常见污染库构成。搜库参数设置如下: (1) 酶切方式设置为 Trypsin 和 LysC, 最大允许 2 个漏切位点数; (2) 肽段长度设为不小于 7 个氨基酸; (3) 固定修饰为半胱氨酸的烷基化修饰 Carbamidomethyl [C]; 可变修饰为甲硫氨酸氧化修饰 Oxidation [M] 和 Phospho [STY]; (4) 母离子质量允许误差 (mass tolerance) 为 20 ppm, 子离子质量允许误差为 0.5 Da; (5) 搜库结果采用目标-诱饵库策略进行过滤, 肽段、蛋白质和二级谱图鉴定假阳性率 (false discovery rate, FDR) ≤ 1%^[44]。

1.7 质谱数据上传

质谱数据 Raw 文件以及搜库结果已全部上传至国内的蛋白质谱数据平台^[45] (<https://www.iprox.cn/>), 识别号为 IPX0004058000。

2 结果与分析

2.1 分枝菌酸小杆菌磷酸化蛋白质富集流程

分枝菌酸小杆菌培养至对数中期 (*OD*₆₀₀=2.26) 时收集菌体, 细胞裂解后进行全蛋白的浓度和质量检测。灰度定量结果显示全蛋白浓度约为 20.00 μg/μL, 2 个生物学重复分别取 1 μg 全蛋白进行银染质量检测, 结果显示,

2 个重复样本的蛋白质浓度平衡结果较好, 蛋白质带型几乎一致, 且从低分子量到高分子量处的蛋白条带均清晰可见, 意味着蛋白质提取质量较好, 可用于后续磷酸化肽段的富集(图 1A)。分别取 2 mg 蛋白质为起始量, 每组实验各 2 个生物学重复, 利用 10% SDS-PAGE 进行蛋白质短胶预分离(0.7 cm), Trypsin 和 LysC 组合酶切后, 进行肽段提取, 进而分别用 TiO_2 、 Fe^{3+} -NTA 和 Ti^{4+} -IMAC 不同富集材料, 进行磷酸化肽段富集, 富集后的磷酸化肽段用 C_{18} 反相色谱柱进行分级分离, 质谱检测(图 1B)。质谱搜库结果比较后得到适用于分枝菌酸小杆菌的较高效的磷酸化富集方法, 然后制备不同批次的样本进行技术重复, 并用不同分辨率的质谱仪检测进行富集稳定性评估。

2.2 Ti^{4+} -IMAC 策略高效地富集到磷酸化肽段

Ti^{4+} -IMAC、 TiO_2 和 Fe^{3+} -NTA 3 种方法富集的磷酸化肽段样品搜库结果显示, 2 个生物

学重复样本鉴定到的总谱图数、磷酸化蛋白数、肽段数和位点数比较接近, 意味着样本制备过程中(提取、消化、富集、分级分离和质谱检测等)质控较好。 Ti^{4+} -IMAC 的磷酸化位点鉴定率均是其他 2 种方法鉴定量的 7 倍以上, 而 TiO_2 和 Fe^{3+} -NTA 富集方法的磷酸化位点数鉴定量则相当, 约为 130 个, 与文献中已报道的 TiO_2 鉴定数接近^[9-10], 意味着 Ti^{4+} -IMAC 在以分枝菌酸小杆菌为代表的原核生物中富集效率较高(表 1)。

2.3 Ti^{4+} -IMAC 富集策略稳定性较好

为进一步评价 Ti^{4+} -IMAC 富集方法的稳定性, 用重新培养至对数中期的分枝菌酸小杆菌制备肽段样品, 然后进行相同的磷酸化富集和样本分级分离, 并且用 Velos 和 Lumos 2 种不同分辨率的质谱仪进行检测。搜库结果显示, 不同质谱仪对生物学重复样本中的磷酸化事件鉴定比较稳定。Velos 质谱仪平均鉴定到 418 个磷酸化蛋白质, 965 个磷酸化肽段, 711 个磷酸

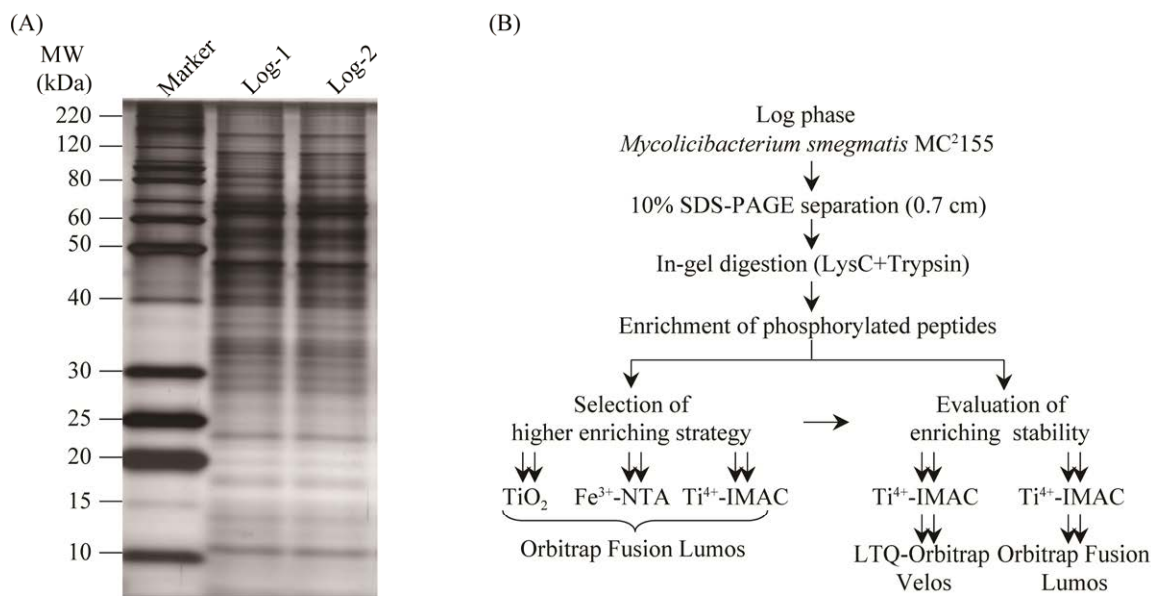


图 1 分枝菌酸小杆菌磷酸化蛋白质组学研究流程

Figure 1 Flowchart for the phosphoproteomic profiling of *Mycolicibacterium smegmatis*. A: protein sample preparation from *M. smegmatis*; B: overview of phosphoproteomic analysis of *M. smegmatis*.

表 1 基于 3 种不同磷酸化富集方法的分枝菌酸小杆菌磷酸化蛋白质组

Table 1 Characterization of the *M. smegmatis* phosphoproteome based on three enrichment methods

Enriching strategy	This study						Published ^[9]
	Ti ⁴⁺ -IMAC		TiO ₂		Fe ³⁺ -NTA		TiO ₂
Biological repetition	1	2	1	2	1	2	1
Initial protein amount/mg	2	2	2	2	2	2	5
MS/MS spectrum submitted	191 929	184 809	297 367	323 553	260 964	258 703	–
MS/MS spectrum identified	5 297	4 373	27 487	28 629	64 909	64 145	–
MS/MS spectrum identified/%	2.8	2.4	9.2	8.8	25	25	–
Identified proteins	973	908	2 551	2 593	3 421	3 433	2 462
Pho-protein groups	613	595	105	120	100	123	–
Identified peptides	1 571	1 389	10 266	10 418	24 558	24 581	16 185
Pho-peptides	1 498	1 388	712	765	584	560	–
Pho-sites	1 425	1 340	156	190	174	197	185
Pho-sites (LP>0.75)	1 042	988	115	145	125	149	106
Mean of Pho-sites (LP>0.75)	1 015		130		137		

LP, Localization probability, LP>0.75 is considered as confident phosphorylation sites^[46-47].

化位点, 其中有 487 个可信度较高的磷酸化位点 (localization probability, LP>0.75)。Lumos 质谱仪平均鉴定到 810 个磷酸化蛋白, 2 170 个磷酸化肽段, 1 735 个磷酸化位点, 其中有 1 301 个可信度较高的磷酸化位点。同样的样本, Lumos 质谱仪鉴定到的磷酸化事件是 Velos 的 2.6 倍(表 2)。2 种质谱仪检测到的磷酸化位点数目均高于已报道的文献中的磷酸化位点数目^[9-10]。且 2 次实验中, Lumos 质谱仪鉴定到

的可信的磷酸化位点数鉴定量均稳定在 1 000 个左右。我们也发现 4 组样品使用 Lumos 质谱仪共同鉴定到的肽段谱图比较相似, 我们挑取了其中 1 条肽段 (TEAYASELPDLSGPVPR), 该肽段 S 位点发生磷酸化修饰, 四组重复的谱图质量均比较好(图 2)。这意味着 Ti⁴⁺-IMAC 富集策略稳定性较好, Ti⁴⁺-IMAC 富集法可提高磷酸化事件的鉴定, 拓宽我们对分枝菌酸小杆菌磷酸化修饰的认识。

表 2 第 2 次基于 Ti⁴⁺-IMAC 富集方法的分枝菌酸小杆菌磷酸化蛋白质组Table 2 The second phosphoproteome of *M. smegmatis* based on Ti⁴⁺-IMAC enrichment method

Biological repetition	Velos			Lumos		
	1	2	Average	1	2	Average
MS/MS submitted	21 022	21 374	21 198	205 217	191 694	198 456
MS/MS identified	4 553	4 166	4 360	23 666	20 453	22 060
MS/MS identified/%	22	19	21	12	11	12
Identified protein groups	1 232	1 123	1 178	1 633	1 619	1 626
Pho-protein groups	426	409	418	799	821	810
Identified peptides	2 786	2 411	2 599	5 546	5 096	5 321
Pho-peptides	937	993	965	2 237	2 103	2 170
Pho-sites	737	685	711	1 744	1 725	1 735
Pho-sites (LP>0.75)	502	472	487	1 317	1 285	1 301

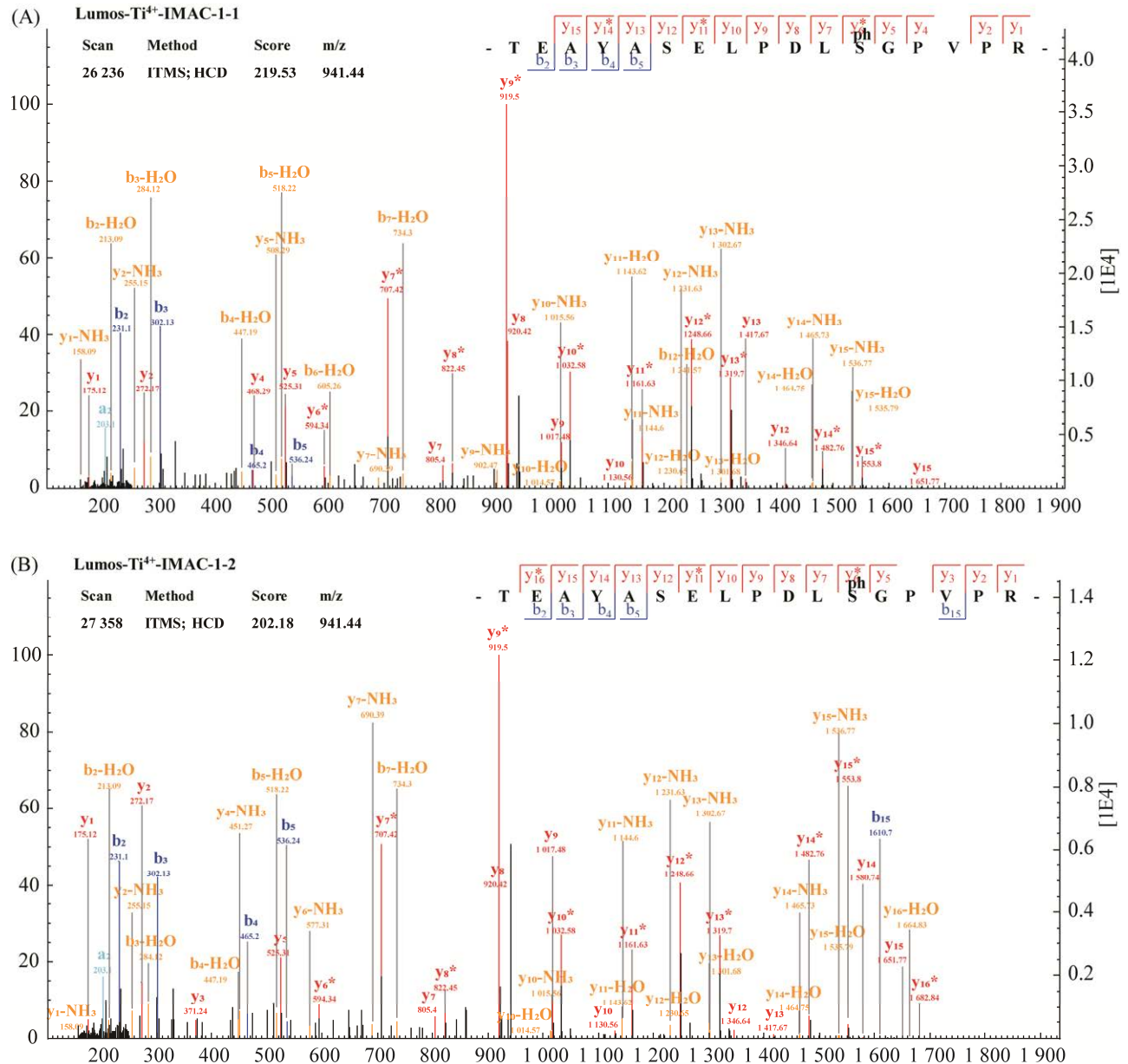
2.4 分枝菌酸小杆菌磷酸化事件实现了深度覆盖

我们比较了分枝菌酸小杆菌中 Ti^{4+} -IMAC、 TiO_2 和 Fe^{3+} -NTA 3 种不同富集方法、不同质谱仪对磷酸化位点鉴定数的影响, 结果显示, Ti^{4+} -IMAC 富集后 Lumos 质谱仪检测鉴定到的磷酸化位点数目最多, 而且随着生物学重复和技术重复的累积, 磷酸化位点数呈线性递增, Velos 质谱仪虽有补充, 但贡献不多, 磷

酸化位点数基本处于平稳, 共鉴定到了 4 433 个可信的磷酸化位点(图 3), 2 280 个磷酸化蛋白, 10 880 个磷酸化肽段, 实现了较深度覆盖的磷酸化位点的鉴定。

2.4.1 S/T/Y 位点发生磷酸化修饰的蛋白质 GO 功能富集分析

S/T/Y 可信磷酸化位点占比统计结果显示, 与真核生物中的磷酸化修饰类似, T 磷酸化修饰最多, 占比在 46.74%–71.30%之间, 其次是 S,



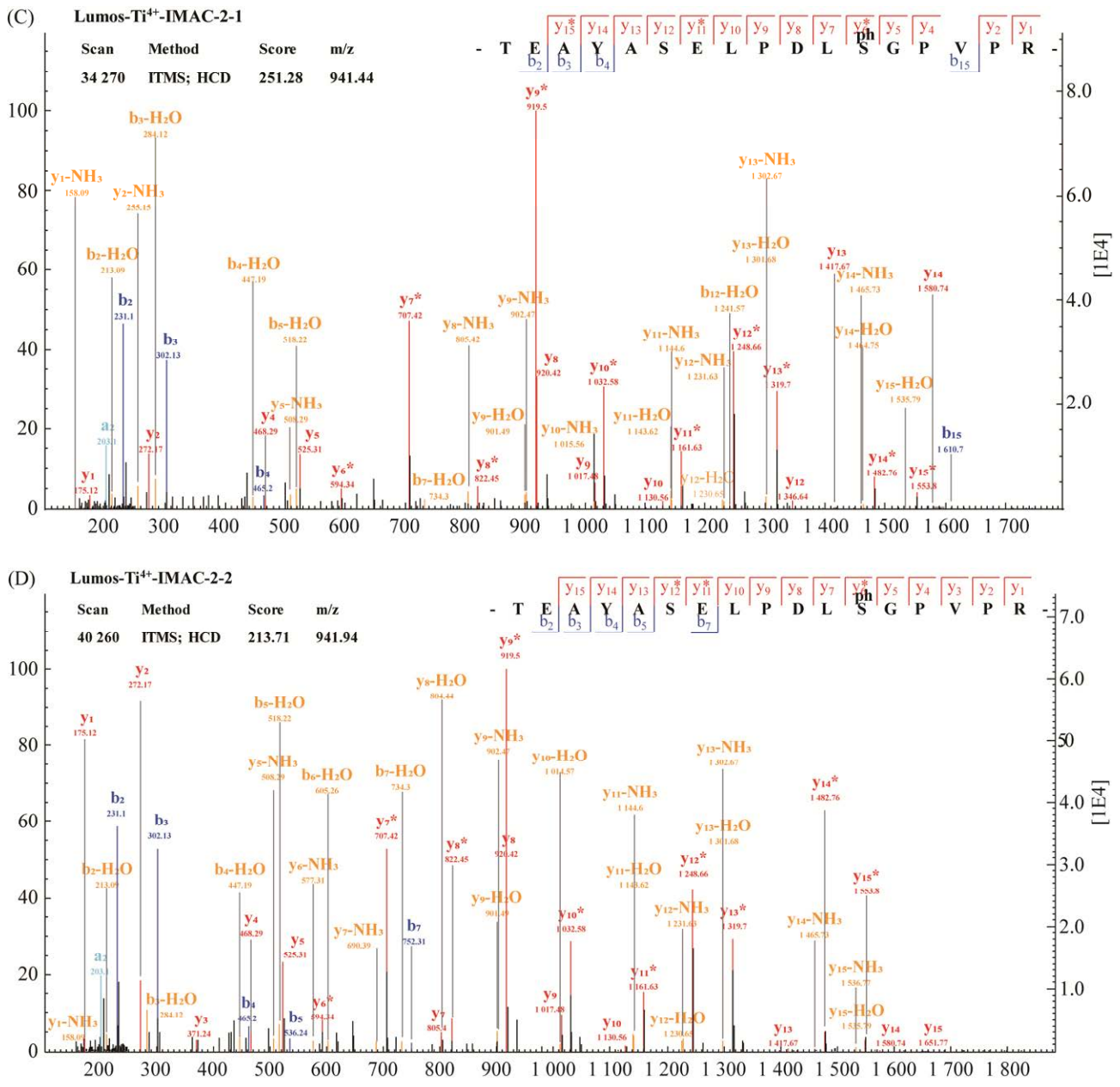


图 2 Ti⁴⁺-IMAC 富集后 Lumos 质谱仪共鉴定到的其中 1 条磷酸化肽段谱图

Figure 2 Lumos-detecting spectra of the representative phosphopeptide consistently identified from two technical repetitions by Ti⁴⁺-IMAC enriching. A–B: MS₂ spectra from two biological repetitions in first technical repetition sample; C–D: MS₂ spectra from two biological repetitions in second technical repetition sample.

占比在 17.24%–46.73%之间, Y 相对要少得多, 占比在 3.39%–22.07%之间(图 4)。将 S/T/Y 位点发生磷酸化的蛋白质于在线数据库注释(database for annotation, visualization and

integrated discovery, DAVID)分析平台^[48–49](<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>)进行功能富集分析, S 发生磷酸化的蛋白质主要参与糖酵解、糖异生、缬氨酸生物合成、翻译和异亮氨

酸生物合成等生物学过程，位于细胞质和核糖体中，具有 ATP 结合、rRNA 结合与核糖体结构组分等分子功能。T 发生磷酸化的蛋白质主要参与三羧酸循环和异亮氨酸生物合成生物学过程，位于细胞质和质膜中，具有 ATP 结

合、镁离子结合、GTP 结合及 GTP 酶活性等分子功能。Y 发生磷酸化的蛋白质主要参与三羧酸循环生物学过程，位于细胞质中，具有 ATP 结合、连接酶活性和磷酸化酶活性等分子功能(图 5)。

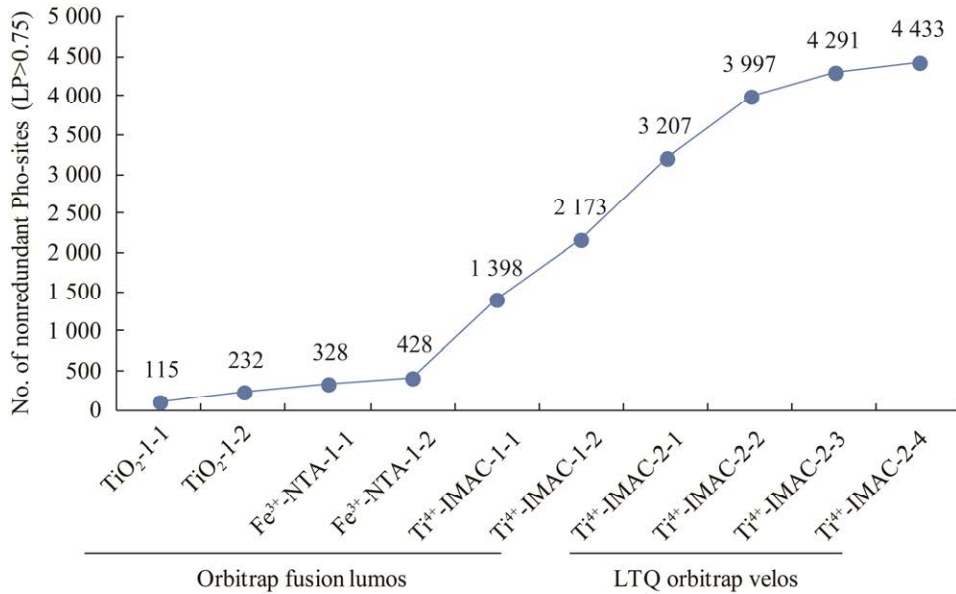


图 3 分枝菌酸小杆菌中磷酸化位点的累积曲线

Figure 3 Cumulative identification of phosphorylation sites in *M. smegmatis*.

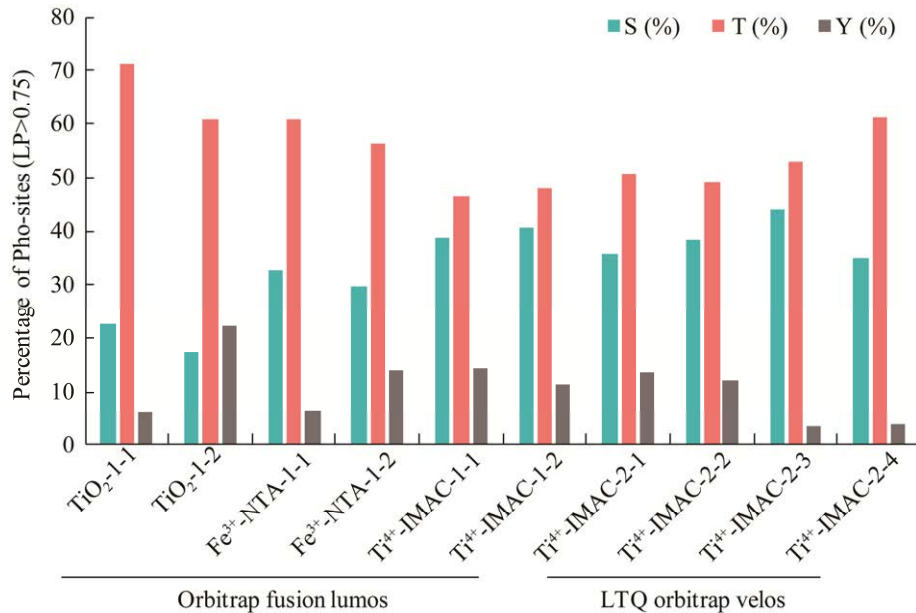


图 4 三种不同磷酸化富集法的分枝菌酸小杆菌磷酸化修饰位点占比

Figure 4 The phosphorylation sites identified percentage of S/T/Y from *M. smegmatis* by three different enrichment methods.

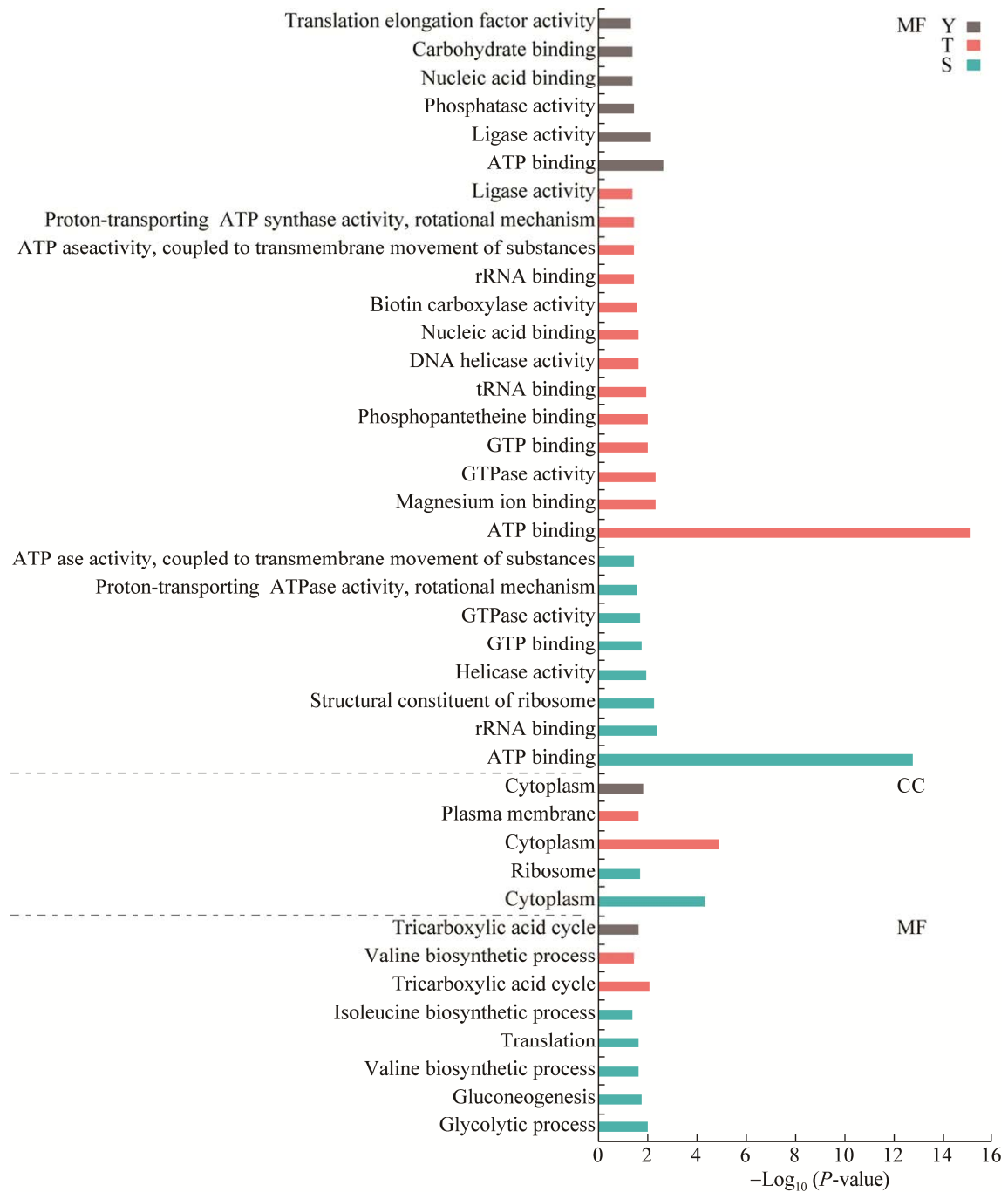


图 5 S/T/Y 位点发生磷酸化修饰的蛋白质功能富集分析

Figure 5 Functional enrichment analysis of phosphorylated proteins at S/T/Y sites.

3 讨论与结论

与真核生物相比，我们对原核微生物磷酸化修饰事件的认识要少得多。尽管 TiO_2 以及

Fe^{3+} -IMAC 方法也较广泛地应用于原核病原微生物的磷酸化肽段富集，但富集到的磷酸化蛋白及其位点数比真核细胞或组织少。本研究中，我们基于 Ti^{4+} -IAMC、 TiO_2 和 Fe^{3+} -NTA

3 种不同方法对分枝菌酸小杆菌的磷酸化肽段进行了富集, 结果表明, Ti^{4+} -IAMC 方法可高效实现磷酸化肽段的富集, 使用 2 种分辨率不同的质谱仪检测均得到一致的结论, Velos 质谱仪磷酸化位点鉴定结果以及 Lumos 质谱仪的磷酸化位点鉴定结果均高于已发表文献, 意味着 Ti^{4+} -IAMC 方法可显著地提高分枝菌酸小杆菌磷酸化位点的鉴定。在分枝菌酸小杆菌中我们共鉴定到 2 280 个磷酸化蛋白质、10 880 个磷酸化肽段、4 433 个可信磷酸化位点, S/T/Y 发生磷酸化事件的平均占比分别为 33.47%、55.76% 和 10.77%。

虽然 Ti^{4+} -IAMC 方法已显著提高了分枝菌酸小杆菌中 S/T/Y 磷酸化位点的鉴定数, 但我们发现 2 次技术重复样本中还存在一些差异, 意味着我们在整个实验中质控环节存在不足, 尚需要进一步优化。此外, 很有可能是复杂的生物学原因所致: (1) 一些磷酸化事件可能不是很稳定, 具有时空特异性, 没有被同时富集到; (2) 因丰度低, 未在不同生物学重复样本中被质谱同时鉴定到; (3) 与真核生物相比, Ti^{4+} -IAMC 方法在原核生物中的富集特异性不高, 在 40%左右, 远低于真核细胞中的 95%以上的特异性, 可能是原核生物磷酸化肽段序列结构或磷酸酯键的酸不稳定性等影响所致。

尽管我们发现 Ti^{4+} -IAMC 可显著提高分枝菌酸小杆菌中 S/T/Y 磷酸化修饰位点的鉴定, 富集特异性也较 TiO_2 有较大的提高, 但与真核生物的富集效率相比, 尚有较大的优化空间。此外, 除研究较深入的 S/T/Y 残基外^[50], 组氨酸(His, H)^[14,51]、精氨酸(Arg, R)^[52-53]和天门冬氨酸(Asp, D)^[54]等残基在原核生物和一些真核生物中也可被磷酸化修饰^[55], 但这些位点发生磷酸化修饰的蛋白质丰度较低, 同样缺少深入的研究, 值得我们进一步关注。

原核生物磷酸化蛋白质的鉴定目前仍然存在很多的挑战, 亟待我们进一步提高磷酸化肽段富集技术以及质谱检测技术等的灵敏性和特异性, 以便更加全面系统地理解原核生物的生命活动机理, 尤其是病原微生物(如结核分枝杆菌)的磷酸化事件的鉴定和功能探究, 为致病机理、诊断和治疗提供新的见解。

参考文献

- [1] Needham EJ, Parker BL, Burykin T, James DE, Humphrey SJ. Illuminating the dark phosphoproteome. *Science Signaling*, 2019, 12(565): eaau8645.
- [2] Dunphy K, Dowling P, Bazou D, O'Gorman P. Current methods of post-translational modification analysis and their applications in blood cancers. *Cancers*, 2021, 13(8): 1930.
- [3] Humphrey SJ, James DE, Mann M. Protein phosphorylation: a major switch mechanism for metabolic regulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2015, 26(12): 676-687.
- [4] Needham EJ, Hingst JR, Parker BL, Morrison KR, Yang G, Onslev J, Kristensen JM, Højlund K, Ling NXY, Oakhill JS, Richter EA, Kiens B, Petersen J, Pehmøller C, James DE, Wojtaszewski JFP, Humphrey SJ. Personalized phosphoproteomics identifies functional signaling. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(4): 576-584.
- [5] Figlia G, Willnow P, Teleman AA. Metabolites regulate cell signaling and growth via covalent modification of proteins. *Developmental Cell*, 2020, 54(2): 156-170.
- [6] Macek B, Forchhammer K, Hardouin J, Weber-Ban E, Grangeasse C, Mijakovic I. Protein post-translational modifications in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(11): 651-664.
- [7] Köhler JB, Jers C, Senissar M, Shi L, Derouiche A, Mijakovic I. Importance of protein Ser/Thr/Tyr phosphorylation for bacterial pathogenesis. *FEBS Letters*, 2020, 594(15): 2339-2369.
- [8] Birk MS, Charpentier E, Frese CK. Automated phosphopeptide enrichment for Gram-positive bacteria. *Journal of Proteome Research*, 2021, 20(10): 4886-4892.
- [9] Nakedi KC, Nel AJM, Garnett S, Blackburn JM, Soares NC. Comparative Ser/Thr/Tyr phosphoproteomics between two mycobacterial species:

- the fast growing *Mycobacterium smegmatis* and the slow growing *Mycobacterium bovis* BCG. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 237.
- [10] Albeldas C, Ganief N, Calder B, Nakedi KC, Garnett S, Nel AJM, Blackburn JM, Soares NC. Global proteome and phosphoproteome dynamics indicate novel mechanisms of vitamin C induced dormancy in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Proteomics*, 2018, 180: 1–10.
- [11] Yagüe P, Gonzalez-Quiñonez N, Fernández-García G, Alonso-Fernández S, Manteca A. Correction: Yagüe, P., et al. Goals and challenges in bacterial phosphoproteomics. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 5678. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(24): 9381.
- [12] Massier S, Robin B, Mégroz M, Wright A, Harper M, Hayes B, Cosette P, Broutin I, Boyce JD, Dé E, Hardouin J. Phosphorylation of extracellular proteins in *Acinetobacter baumannii* in sessile mode of growth. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 738780.
- [13] Verma R, Pinto SM, Patil AH, Advani J, Subba P, Kumar M, Sharma J, Dey G, Ravikumar R, Buggi S, Satishchandra P, Sharma K, Suar M, Tripathy SP, Chauhan DS, Gowda H, Pandey A, Gandotra S, Prasad TSK. Quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis of H37Ra and H37Rv strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Proteome Research*, 2017, 16(4): 1632–1645.
- [14] Potel CM, Lin MH, Heck AJR, Lemeer S. Widespread bacterial protein histidine phosphorylation revealed by mass spectrometry-based proteomics. *Nature Methods*, 2018, 15(3): 187–190.
- [15] Prust N, Van Der Laarse S, Van Den Toorn HWP, Van Sorge NM, Lemeer S. In-depth characterization of the *Staphylococcus aureus* phosphoproteome reveals new targets of Stk1. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2021, 20: 100034.
- [16] Block H, Maertens B, Spriestersbach A, Brinker N, Kubicek J, Fabis R, Labahn J, Schäfer F. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods in Enzymology*, 2009, 463: 439–473.
- [17] Zhou HJ, Ye ML, Dong J, Corradini E, Cristobal A, Heck AJR, Zou HF, Mohammed S. Robust phosphoproteome enrichment using monodisperse microsphere-based immobilized titanium (IV) ion affinity chromatography. *Nature Protocols*, 2013, 8(3): 461–480.
- [18] Yao YT, Dong J, Dong MM, Liu FJ, Wang Y, Mao JW, Ye ML, Zou HF. An immobilized titanium (IV) ion affinity chromatography adsorbent for solid phase extraction of phosphopeptides for phosphoproteome analysis. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1498: 22–28.
- [19] Zhou HJ, Low TY, Hennrich ML, Van Der Toorn H, Schwend T, Zou HF, Mohammed S, Heck AJR. Enhancing the identification of phosphopeptides from putative basophilic kinase substrates using Ti (IV) based IMAC enrichment. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 2011, 10(10): M110.006452.
- [20] Zhou HJ, Ye ML, Dong J, Han GH, Jiang XN, Wu RN, Zou HF. Specific phosphopeptide enrichment with immobilized titanium ion affinity chromatography adsorbent for phosphoproteome analysis. *Journal of Proteome Research*, 2008, 7(9): 3957–3967.
- [21] Bian YY, Song CX, Cheng K, Dong MM, Wang FJ, Huang JF, Sun DG, Wang LM, Ye ML, Zou HF. An enzyme assisted RP-RPLC approach for in-depth analysis of human liver phosphoproteome. *Journal of Proteomics*, 2014, 96: 253–262.
- [22] Jers C, Soufi B, Grangeasse C, Deutscher J, Mijakovic I. Phosphoproteomics in bacteria: towards a systemic understanding of bacterial phosphorylation networks. *Expert Review of Proteomics*, 2008, 5(4): 619–627.
- [23] Kobir A, Shi L, Boskovic A, Grangeasse C, Franjevic D, Mijakovic I. Protein phosphorylation in bacterial signal transduction. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - General Subjects*, 2011, 1810(10): 989–994.
- [24] Dworkin J. Ser/Thr phosphorylation as a regulatory mechanism in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 2015, 24: 47–52.
- [25] Getz LJ, Runte CS, Rainey JK, Thomas NA. Tyrosine phosphorylation as a widespread regulatory mechanism in prokaryotes. *Journal of Bacteriology*, 2019, 201(19): e00205–e00219.
- [26] Syson K, Batey SFD, Schindler S, Kalscheuer R, Bornemann S. A temperature-sensitive *Mycobacterium smegmatis* glgE mutation leads to a loss of GlgE enzyme activity and thermostability and the accumulation of α -maltose-1-phosphate. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - General Subjects*, 2021, 1865(2): 129783.
- [27] Cai XY, Liu L, Qiu CH, Wen CZ, He Y, Cui YX, Li SY, Zhang X, Zhang LH, Tian CL, Bi LJ, Zhou Z, Gong WM. Identification and architecture of a putative secretion tube across mycobacterial outer envelope. *Science Advances*, 2021, 7(34): eabg5656.

- [28] Forrellad MA, Blanco FC, Marrero Diaz De Villegas R, Vázquez CL, Yaneff A, García EA, Gutierrez MG, Durán R, Villarino A, Bigi F. Rv2577 of *Mycobacterium tuberculosis* is a virulence factor with dual phosphatase and phosphodiesterase functions. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 570794.
- [29] Rosa TLSA, Marques MAM, DeBoard Z, Hutchins K, Silva CAA, Montague CR, Yuan TA, Amaral JJ, Atella GC, Rosa PS, Mattos KA, VanderVen BC, Lahiri R, Sampson NS, Brennan PJ, Belisle JT, Pessolani MCV, Berrêdo-Pinho M. Reductive power generated by *Mycobacterium leprae* through cholesterol oxidation contributes to lipid and ATP synthesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 709972.
- [30] Bashiri G, Baker EN. Production of recombinant proteins in *Mycobacterium smegmatis* for structural and functional studies. *Protein Science*, 2015, 24(1): 1–10.
- [31] Yu ZX, Zhang CH, Zhou ML, Li QM, Li H, Duan W, Li X, Feng YH, Xie JP. *Mycobacterium tuberculosis* PPE44 (Rv2770c) is involved in response to multiple stresses and promotes the macrophage expression of IL-12 p40 and IL-6 via the p38, ERK, and NF- κ B signaling axis. *International Immunopharmacology*, 2017, 50: 319–329.
- [32] Gupta RS, Lo B, Son J. Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 67.
- [33] Wu FL, Zhao MZ, Zhang Y, Su N, Xiong Z, Xu P. Recombinant acetylated trypsin demonstrates superior stability and higher activity than commercial products in quantitative proteomics studies. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 2016, 30(8): 1059–1066.
- [34] Zhao MZ, Wu FL, Xu P. Development of a rapid high-efficiency scalable process for acetylated *Sus scrofa* cationic trypsin production from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*, 2015, 116: 120–126.
- [35] Zhao MZ, Cai M, Wu FL, Zhang Y, Xiong Z, Xu P. Recombinant expression, refolding, purification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* protease IV in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2016, 126: 69–76.
- [36] Peng XH, Xu F, Liu S, Li SZ, Huang QB, Chang L, Wang L, Ma X, He FC, Xu P. Identification of missing proteins in the phosphoproteome of kidney cancer. *Journal of Proteome Research*, 2017, 16(12): 4364–4373.
- [37] Xu P, Duong DM, Peng JM. Systematical optimization of reverse-phase chromatography for shotgun proteomics. *Journal of Proteome Research*, 2009, 8(8): 3944–3950.
- [38] Wang H, Wan L, Shi JH, Zhang T, Zhu HM, Jiang SH, Meng SH, Wu SJ, Sun JS, Chang L, Zhang LQ, Wan KL, Yang JQ, Zhao XQ, Liu HC, Zhang Y, Dai EH, Xu P. Quantitative proteomics reveals that dormancy-related proteins mediate the attenuation in *Mycobacterium* strains. *Virulence*, 2021, 12(1): 2228–2246.
- [39] Zhai LH, Chang C, Li N, Duong DM, Chen H, Deng ZX, Yang J, Hong XC, Zhu YP, Xu P. Systematic research on the pretreatment of peptides for quantitative proteomics using a C18 microcolumn. *Proteomics*, 2013, 13(15): 2229–2237.
- [40] Humphrey SJ, Karayel O, James DE, Mann M. High-throughput and high-sensitivity phosphoproteomics with the EasyPhos platform. *Nature Protocols*, 2018, 13(9): 1897–1916.
- [41] Xu F, Yu L, Peng XH, Zhang JL, Li SZ, Liu S, Yin YN, An ZW, Wang FQ, Fu Y, Xu P. Unambiguous phosphosite localization through the combination of trypsin and LysargiNase mirror spectra in a large-scale phosphoproteome study. *Journal of Proteome Research*, 2020, 19(6): 2185–2194.
- [42] Rappsilber J, Ishihama Y, Mann M. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(3): 663–670.
- [43] Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(12): 1367–1372.
- [44] Chi H, Liu C, Yang H, Zeng WF, Wu L, Zhou WJ, Wang RM, Niu XN, Ding YH, Zhang Y, Wang ZW, Chen ZL, Sun RX, Liu T, Tan GM, Dong MQ, Xu P, Zhang PH, He SM. Comprehensive identification of peptides in tandem mass spectra using an efficient open search engine. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(11): 1059–1061.
- [45] Ma J, Chen T, Wu SF, Yang CY, Bai MZ, Shu KX, Li KL, Zhang GQ, Jin Z, He FC, Hermjakob H, Zhu YP. iProX: an integrated proteome resource. *Nucleic Acids*

- Research*, 2019, 47(D1): D1211–D1217.
- [46] Tanzer MC, Bludau I, Stafford CA, Hornung V, Mann M. Phosphoproteome profiling uncovers a key role for CDKs in TNF signaling. *Nature Communications*, 2021, 12: 6053.
- [47] Sacco F, Humphrey SJ, Cox J, Mischnik M, Schulte A, Klabunde T, Schäfer M, Mann M. Glucose-regulated and drug-perturbed phosphoproteome reveals molecular mechanisms controlling insulin secretion. *Nature Communications*, 2016, 7: 13250.
- [48] Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 2009, 4(1): 44–57.
- [49] Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*, 2008, 37(1): 1v13.
- [50] Macek B, Gnad F, Soufi B, Kumar C, Olsen JV, Mijakovic I, Mann M. Phosphoproteome analysis of *E. coli* reveals evolutionary conservation of bacterial Ser/Thr/Tyr phosphorylation. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 2008, 7(2): 299–307.
- [51] Adam K, Hunter T. Histidine kinases and the missing phosphoproteome from prokaryotes to eukaryotes. *Laboratory Investigation*, 2018, 98(2): 233–247.
- [52] Schmidt A, Trentini DB, Spiess S, Fuhrmann J, Ammerer G, Mechtler K, Clausen T. Quantitative phosphoproteomics reveals the role of protein arginine phosphorylation in the bacterial stress response. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2014, 13(2): 537–550.
- [53] Trentini DB, Suskiewicz MJ, Heuck A, Kurzbauer R, Deszcz L, Mechtler K, Clausen T. Arginine phosphorylation marks proteins for degradation by a Clp protease. *Nature*, 2016, 539(7627): 48–53.
- [54] Lai SJ, Tu IF, Wu WL, Yang JT, Luk LYP, Lai MC, Tsai YH, Wu SH. Site-specific His/Asp phosphoproteomic analysis of prokaryotes reveals putative targets for drug resistance. *BMC Microbiology*, 2017, 17(1): 123.
- [55] Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2005, 44(45): 7342–7372.