



# 植物蛋白磷酸化的检测方法

朱丹, 曹汉威, 李媛, 任东涛\*

中国农业大学生物学院, 植物生理学与生物化学国家重点实验室, 北京 100193

**摘要** 蛋白磷酸化是一种重要的蛋白质翻译后修饰方式, 几乎参与植物所有生命过程的调节。蛋白磷酸化过程主要指在蛋白激酶的催化作用下, 将三磷酸腺苷(ATP)上的 $\gamma$ 位磷酸基团转移到底物蛋白特定氨基酸残基上的过程。底物蛋白上被磷酸化的常见氨基酸有丝氨酸、苏氨酸及酪氨酸, 磷酸基团与氨基酸中的羟基通过酯键连接。该文详细描述了几种常用的蛋白质体外及体内磷酸化的检测方法及注意事项。

**关键词** 蛋白磷酸化, 蛋白激酶, 植物

朱丹, 曹汉威, 李媛, 任东涛 (2020). 植物蛋白磷酸化的检测方法. 植物学报 55, 76–82.

蛋白质翻译后修饰(posttranslational modification)是指通过酶促反应将一些化学基团共价连接到底物蛋白质分子上的化学修饰。蛋白质翻译后修饰对多种蛋白质正常行使功能起重要作用。蛋白质翻译后修饰的种类很多, 包括磷酸化、乙酰化、泛素化、糖基化、脂酰化及异戊烯基化等(Blom et al., 2004; Kosako and Nagano, 2011; Frost and Li, 2014; Zhu, 2017)。

研究显示, 真核生物细胞中约有1/3的蛋白被磷酸化修饰, 表明蛋白磷酸化修饰的普遍性和重要性(Hubbard and Cohen, 1993; Ficarro et al., 2002)。蛋白磷酸化由蛋白激酶(protein kinase)催化完成。蛋白激酶将供体ATP (少数情况下用GTP)上的 $\gamma$ 位磷酸基团以酯键的形式连接到底物蛋白的特定氨基酸侧链的羟基上(Fischer and Krebs, 1955; Krupa et al., 2004)。真核生物蛋白被磷酸化的氨基酸主要包括丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。原核生物还可能发生在天冬氨酸、谷氨酸和组氨酸上(Wu et al., 2010)。磷酸化蛋白上的磷酸基团可以由磷酸酶(phosphatase)除去。蛋白的磷酸化与去磷酸化的可逆调控参与诸多生命活动过程(Peck, 2003; Yang et al., 2004; Kim et al., 2016; Chen et al., 2017)。磷酸化修饰通过改变蛋白结构或局部结构进而影响蛋白与特定蛋白间的

互作、蛋白自身的活性和稳定性及蛋白的正常定位等。细胞中蛋白磷酸化水平是动态变化的, 细微变化即可导致细胞代谢及生理状态的变化(Laugesen et al., 2004; Khan et al., 2005; Agrawal and Thelen, 2006; Whiteman et al., 2008; Chao et al., 2014)。研究表明, 植物的生长发育和对各种逆境响应的生理及信号调控过程都有蛋白磷酸化修饰的发生(de la Fuente van Bentem and Hirt, 2007; Prak et al., 2008; Ke et al., 2009; Wang et al., 2018; Yin et al., 2018; Zhang et al., 2019)。因此, 解析关键蛋白磷酸化水平的变化规律, 可从分子水平揭示植物重要性状和代谢途径的调节机制。

磷酸化修饰的检测对于揭示蛋白磷酸化修饰在植物生命活动中的调控机制至关重要。本文介绍几种检测植物蛋白体外、体内磷酸化的实用方法, 并附实验心得, 供使用者参考。

## 1 实验材料

实验材料为纯化的重组蛋白和植物蛋白抽提物。

## 2 实验试剂

- Sigma-Aldrich 试剂: Trizma base (Cat No.

收稿日期: 2019-10-24; 接受日期: 2019-12-31

基金项目: 国家自然科学基金(No.31670248, No.31970276)

\* 通讯作者。E-mail: ren@cau.edu.cn

T6606)、 $\text{MgCl}_2$  (Cat No.M8266)、 $\text{MnCl}_2$  (Cat No.M8530)、 $\text{CaCl}_2$  (Cat No.C1016)、Glycine (Cat No.G7126)、Ammonium sulfate (Cat No.M8266)、Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Cat No.L5750)和Ammonium persulfate (Cat No.A3678)。

- Amersham pharamacia试剂: Adenosine 5'-triphosphate (ATP) (Cat No.27-2056-01)。
- PerkinElmer 试剂:  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  (Cat No.NEG-502A)。
- Invitrogen试剂: Pro-Q Diamond phosphoprotein gel stain (Cat No.P33302)。
- Bio-Rad试剂: Quick start bradford 1× Dye reagent (G-250) (Cat No.#5000205)。
- NARD试剂: Phos-tag Acrylamide (Cat No.AAL-107)。
- 国药集团化学试剂有限公司试剂: 乙酸钠(Cat No.10018818)、乙二醇四乙酸二钠盐(Cat No.10009717)、甲醇(Cat No.10014118)、乙腈(Cat No.80000618)、乙酸(Cat No.10000218)和磷酸(Cat No. 10015418)。

### 3 仪器设备

- 电泳仪: Bio-Rad Mini II蛋白电泳系统, Bio-Rad IEF Protean Cell System, Bio-Rad Protean II XL。
- 转膜仪: Bio-Rad Semi-Dry Transfer Cell。
- X-光片冲洗仪器: KODAK medical X-ray processor 102。
- 干胶仪: Bio-Rad Gel Dryer 583。
- 扫描仪: Typhoon荧光扫描仪9400。

## 4 实验方法

### 4.1 $^{32}\text{P}$ 同位素标记的蛋白质磷酸化分析方法

以放射性同位素 $^{32}\text{P}$ 标记( $\gamma$ -位的磷)的ATP为磷酸基团供体,在激酶催化下,将带有 $^{32}\text{P}$ 标记的磷酸基团转移到底物蛋白上。用十二烷基硫酸钠-聚丙烯凝胶(SDS-PAGE gel)电泳分离反应混合物中的蛋白。对抽干的凝胶,用X-光片放射自显影或用磷储屏检测磷酸化蛋白。该方法是最直接的蛋白体外磷酸化检测方法,具有灵敏度高、测试结果准确等优点,在蛋白质

磷酸化分析实验中广泛使用。

#### 4.1.1 实验流程

(1) 磷酸化反应, 30  $\mu\text{L}$ 反应体系包括: 50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl缓冲液(pH7.5), 0.1  $\mu\text{g}$ 激酶, 1.0  $\mu\text{g}$ 底物, 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ATP, 1  $\mu\text{Ci}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ , 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$  (或 $\text{MnCl}_2$ 、 $\text{CaCl}_2$ 等激酶激活所需的其它离子)。30 $^{\circ}\text{C}$ 反应30分钟后,加入10  $\mu\text{L}$  4× SDS样品缓冲液终止反应。95 $^{\circ}\text{C}$ 反应5分钟使蛋白变性。用SDS-PAGE gel电泳分离反应混合物中的蛋白。

(2) SDS-PAGE gel分离, 参照Laemmli (1970)的方法制备12.5%分离胶和4.0%浓缩胶。取10  $\mu\text{L}$ 制好的样品进行电泳。先用80 V电压使样品在浓缩胶中积层,待溴酚蓝指示剂进入分离胶后,调电压至120 V,使样品在分离胶中分离。直到溴酚蓝刚迁移出分离胶,停止电泳。

(3) 用考马斯亮蓝染色凝胶,脱色后照相或扫描凝胶,用于记录底物蛋白和激酶的上样量。

(4) 将凝胶置于滤纸上,使用干胶仪进行抽干。抽干的凝胶与X-光片进行曝光及显影(图1上)。

(5) 底物蛋白和激酶上样量的检测(步骤(3))也可选用底物和激酶的特异抗体,进行免疫印迹检测(图1中和下分别是底物蛋白和激酶免疫印迹检测结果)。

#### 4.1.2 注意事项

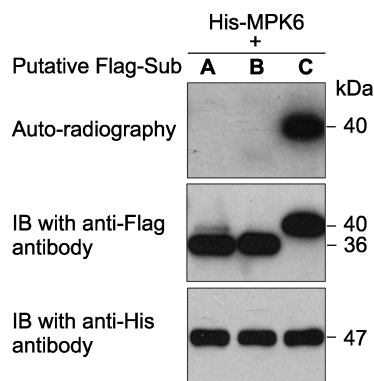
(1) 体外磷酸化反应体系中,激酶与底物蛋白量的比例为1:10。

(2) 选取12.5%分离胶有助于防止分子量较小的底物蛋白随溴酚蓝迁移出胶。也可依据目的蛋白分子量大小选择合适浓度的分离胶。

(3) 体外磷酸化反应体系中,新购买的 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 与非放射性ATP的最适体积比为1:10。随着同位素放射性的衰变(半衰期约14天),可适当增加反应体系中 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 的比例。

(4) 根据所用激酶性质,选取适宜的二价金属离子及离子浓度。建议正式开始实验时,先通过不同浓度梯度的特定离子筛选出最适离子浓度。

(5) 激酶级联反应中涉及2个以上的激酶,反应过程稍微复杂一些,但反应体系与条件不变。例如,激酶A磷酸化激活激酶B,再磷酸化底物蛋白C的反应:第1步反应体系30  $\mu\text{L}$  (50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl缓冲液, pH7.5, 0.1  $\mu\text{g}$ 激酶A, 1.0  $\mu\text{g}$ 激酶B, 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ATP,



**图1** 原核表达的拟南芥激酶MPK6对3个推测底物的体外磷酸化分析

激酶(MPK6)连接有6×His标签、推测的底物蛋白(A、B和C)连接有Flag标签。体外磷酸化反应完成后,反应体系中的蛋白用SDS-PAGE gel分离。然后进行磷酸化底物的放射自显影分析(上图)。底物蛋白(中图)和激酶(下图)的免疫印迹分析显示底物、激酶各自在磷酸化反应中的蛋白使用量基本一致。

**Figure 1** An *in vitro* phosphorylation assay of 3 putative substrate proteins by MPK6 in *Arabidopsis thaliana* MPK6 was fused with the 6×His tag and the 3 putative substrates were fused with the Flag tag. After phosphorylation reaction, the proteins in the mixture were separated on a SDS-PAGE gel. The gel was dried and exposed to X-ray film (top). Immunoblotting with anti-His and anti-Flag antibodies were used to show the levels of the substrate (middle) and kinase (bottom) proteins in the reactions.

10 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>或MnCl<sub>2</sub>或CaCl<sub>2</sub>), 30°C反应30分钟;第2步反应体系30 μL (50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl缓冲液, pH7.5, 0.1 μg第1步反应激活的激酶B, 1.0 μg底物蛋白C, 25 μmol·L<sup>-1</sup> ATP, 1 μCi [γ-<sup>32</sup>P]-ATP, 10 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>或MnCl<sub>2</sub>或CaCl<sub>2</sub>), 30°C反应30分钟。加入10 μL 4× SDS样品缓冲液终止反应, 95°C反应5分钟。制好的样品用于凝胶电泳分离。

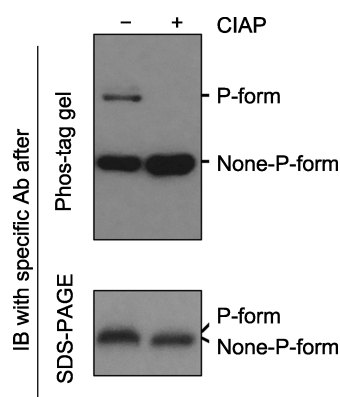
## 4.2 Phos-tag gel电泳-免疫印迹结合的蛋白质磷酸化分析方法

Phos-tag试剂(acrylamide-pendant Phos-tag<sup>TM</sup> ligand)是一种可与Mn<sup>2+</sup>结合后特异性亲和磷酸化蛋白上磷酸基团的化合物(Kinoshita et al., 2007)。在凝胶中添加Mn<sup>2+</sup>-Phos-tag后,磷酸化蛋白与Mn<sup>2+</sup>-Phos-tag形成复合物,进而显著降低磷酸化蛋白的电泳迁移速率,使磷酸化蛋白与非磷酸化蛋白分开(图2)。如果反应体系中含有大量的磷酸化蛋白(如用原核表达的重组蛋白进行体外磷酸化分析时),电泳结束后可

通过凝胶染色显示磷酸化及非磷酸化蛋白;如果反应体系中磷酸化蛋白的含量少(如体内磷酸化蛋白检测时),在电泳结束后通常用特异性抗体进行免疫印迹分析,以检测磷酸化及非磷酸化蛋白。此方法易操作,目前常用于检测体内和体外磷酸化蛋白。

### 4.2.1 实验流程

(1) Phos-tag gel制备:参照SDS-PAGE gel制备方法,配制6.0%分离胶(可根据分离蛋白的大小适当调整浓度),4.0%浓缩胶。在制备分离胶时另加入20–150 μmol·L<sup>-1</sup> Mn<sup>2+</sup>-Phos-tag溶液。



**图2** Phos-tag gel和SDS-PAGE gel电泳后,免疫印迹检测磷酸化蛋白的对比分析

磷酸酶(如Calf intestine alkaline phosphatase, CIAP)可去除磷酸化蛋白上的磷酸基团。同一样品在CIAP处理前(-)、后(+),磷酸化和非磷酸化形式的蛋白经Phos-tag gel (上图)和SDS-PAGE gel (下图)电泳后的免疫印迹分析结果。经Phos-tag gel电泳,未加CIAP的样品中特定蛋白的磷酸化(P-form)和非磷酸化形式(None-P-form)被清晰地分开(上图);加CIAP后磷酸化形式消失而非磷酸化形式条带增强。经SDS-PAGE gel电泳,未加和加CIAP处理的样品中,特定蛋白的磷酸化和非磷酸化形式分开不明显(下图)。

**Figure 2** Immunoblotting detection of phospho-proteins in samples after Phos-tag gel and SDS-PAGE gel separation Phospho-proteins can be dephosphorylated by phosphatases (e.g. Calf intestine alkaline phosphatase, CIAP). Protein samples treated with (+) or without (-) CIAP were separated by Phos-tag (top) and SDS-PAGE (bottom) gels, and the specific protein was further detected by immunoblotting. The P-form and None-P-form of the protein were separated clearly by a Phos-tag gel (top), while the two forms were not separated by a SDS-PAGE gel (bottom). The missing of the upper band and the increasing of the bottom band after Phos-tag gel separation indicated that P-form protein was completely dephosphorylated by CIAP treatment.

(2) 将制备好的SDS样品进行电泳, 电泳电压通常为60 V, 待溴酚蓝迁移出分离胶底部20分钟后停止电泳。电泳完成后可直接对凝胶进行固定、染色, 也可紧接步骤(3)进行免疫印迹检测。

(3) 用去离子水冲洗凝胶后, 浸泡在含有10 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA的转膜缓冲液(49 mL转膜缓冲液加1 mL 0.5 mol·L<sup>-1</sup> EDTA-2Na, pH8.0)中, 轻轻摇动10分钟以去除凝胶中的Mn<sup>2+</sup>。此步骤重复2次。

(4) 用去离子水短暂冲洗凝胶(3–5秒), 然后将凝胶浸泡在不含EDTA的转膜缓冲液中, 轻轻摇动10分钟。

(5) 用半干法将凝胶上的蛋白转移至硝酸纤维素膜, 13 V电压转膜40分钟。转膜缓冲液: 48 mmol·L<sup>-1</sup> Tris, 39 mmol·L<sup>-1</sup> Glycine, 0.04% SDS。

(6) 转膜完成后, 按照常规方法进行封闭和免疫印迹检测。

#### 4.2.2 注意事项

(1) 不同的磷酸化蛋白, Mn<sup>2+</sup>-Phos-tag试剂的最佳使用浓度有一定的差别。建议对未知蛋白进行检测时, 首先尝试在胶中使用50和100 μmol·L<sup>-1</sup> Mn<sup>2+</sup>-Phos-tag试剂。

(2) Phos-tag gel的电泳效果易受EDTA影响。为避免样品中可能含有的EDTA干扰电泳分离, 建议对样品进行预处理。可在样品中加入一定浓度的MnCl<sub>2</sub>(终浓度为1 mmol·L<sup>-1</sup>)。

(3) 其它一些物质也会影响Phos-tag gel电泳效果, 如与磷酸竞争结合Mn<sup>2+</sup>-Phos-tag试剂的钒酸、高浓度无机盐和一些离子型表面活性剂。建议在电泳前对样品进行脱盐、透析、TCA/丙酮沉淀及复溶等处理。

(4) Phos-tag gel电泳时, 电压不宜过高。长时间电泳会导致凝胶的温度升高, 从而造成样品弥散。建议在16°C条件下进行电泳(可在层析柜或冷室中进行)。

(5) Phos-tag gel电泳结束后, 根据凝胶厚度调整EDTA缓冲液的洗胶时间, 尽量去除凝胶中的Mn<sup>2+</sup>。

(6) 通常Phos-tag试剂说明书中建议用湿转法转膜。但我们利用4.2.1节步骤(5)中改进的转膜缓冲液进行半干转膜, 不仅节省时间, 效果也很好。在检测高分子量蛋白时, 转膜过程所需的转膜缓冲液不加甲醇; 在检测低分子量蛋白时需加入5%–10%的甲醇。

(7) Phos-tag gel检测时, 预染蛋白Marker不能用于推断目的蛋白的分子量, 只能指示转膜效率。

### 4.3 磷酸化蛋白特异的荧光染色分析法

Pro-Q Diamond是一种能够与蛋白质的磷酸化残基特异结合的荧光染料(Agrawal and Thelen, 2005)。

经Pro-Q Diamond染色的凝胶还能再进行考马斯亮蓝染色或银染。Pro-Q Diamond染色不影响其后的蛋白胶内酶解及质谱鉴定结果。通常是先利用单向或双向凝胶电泳对体外磷酸化反应后的蛋白样品、植物材料的总蛋白样品进行分离, 然后用Pro-Q Diamond染色液染色(图3)。

#### 4.3.1 实验流程

根据凝胶的体积按比例调整以下各步骤中溶液用量。我们对长20 cm、宽18 cm、厚0.1 cm的凝胶进行Pro-Q Diamond染色的实验流程如下。

(1) 用500 mL固定液(含50%甲醇和10%乙酸的水溶液)对凝胶进行3次固定, 每次30分钟。

(2) 用500 mL去离子水清洗凝胶2次, 每次15分钟。

(3) 使用250 mL Pro-Q Diamond染液对凝胶中的磷酸化蛋白进行染色, 室温避光条件下轻轻摇动染色2小时。

(4) 用250 mL脱色液(含20%乙腈的50 mmol·L<sup>-1</sup>醋酸钠, pH4.0)对凝胶进行4次脱色, 每次30分钟。

(5) 用去离子水清洗凝胶2次, 每次10分钟。

(6) 用Typhoon 9410荧光扫描仪对凝胶进行扫描成像。

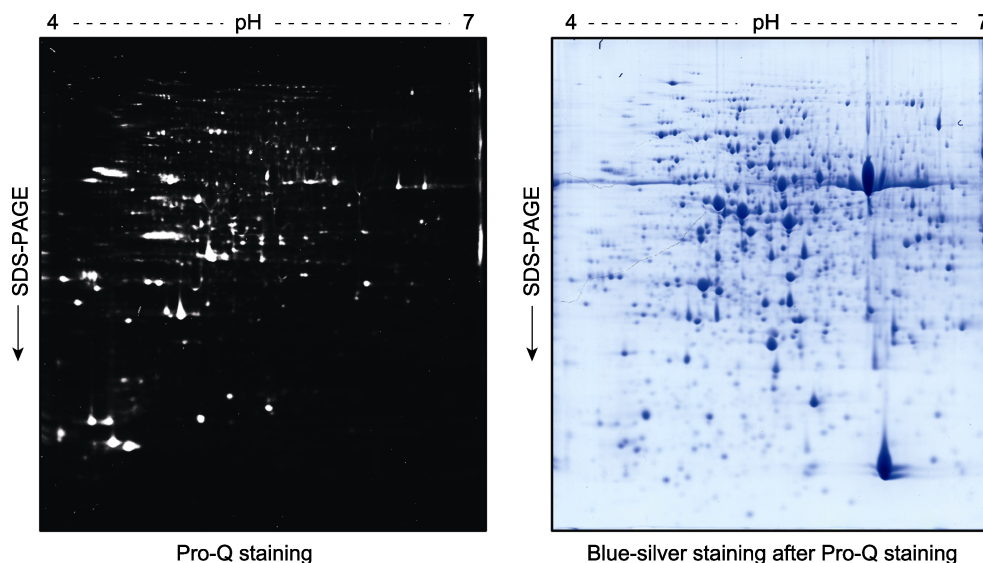
(7) 如果Pro-Q Diamond染色的凝胶在荧光扫描完成后需要检测胶内的总蛋白(包括磷酸化和非磷酸化蛋白), 则再采用blue-silver染色法(含0.12% CBB G250、10%硫酸铵、10%磷酸和20%甲醇的水溶液)对凝胶中所有蛋白进行染色, 具体参见Candiano等(2004)的方法。

(8) 染色后, 用UMAX-2000扫描仪对凝胶进行扫描, 获得总蛋白分析图像。

#### 4.3.2 注意事项

(1) 我们发现, 3倍稀释的Pro-Q Diamond染料染色灵敏度与不稀释的染料几乎无差别, 但用稀释后的Pro-Q Diamond染料染色后, 凝胶背景干净、更易脱色。既减少消耗试剂, 又可使结果更清晰。

(2) 在使用Pro-Q Diamond染料过程中必须严格避光。



**图3** 拟南芥幼苗总蛋白双向凝胶电泳后的磷酸化蛋白Pro-Q Diamond染色检测分析

2周龄拟南芥幼苗总蛋白提取液经双向凝胶电泳分离后, 用Pro-Q Diamond试剂对磷酸化蛋白进行染色(左图)。荧光扫描后的凝胶再进行考马斯亮蓝染色(blue-silver staining) (右图)。

**Figure 3** Pro-Q staining assay of the phospho-proteins in total proteins extracted from *Arabidopsis thaliana* seedlings and separated by a 2D gel

Two-week-old *Arabidopsis thaliana* seedlings were used for total protein extraction. The total proteins were separated by a 2D gel and the phospho-proteins were stained by Pro-Q (left). The gel was scanned with a Typhoon 9410 fluorescence scanner, and then stained with blue-silver to visualize the proteins (right).

## 参考文献

- Agrawal GK, Thelen JJ (2005). Development of a simplified, economical polyacrylamide gel staining protocol for phosphoproteins. *Proteomics* **5**, 4684–4688.
- Agrawal GK, Thelen JJ (2006). Large scale identification and quantitative profiling of phosphoproteins expressed during seed filling in oilseed rape. *Mol Cell Proteomics* **5**, 2044–2059.
- Blom N, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* **4**, 1633–1649.
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**, 1327–1333.
- Chao Q, Liu XY, Mei YC, Gao ZF, Chen YB, Qian CR, Hao YB, Wang BC (2014). Light-regulated phosphorylation of maize phosphoenolpyruvate carboxykinase plays a vital role in its activity. *Plant Mol Biol* **85**, 95–105.
- Chen MJ, Dixon JE, Manning G (2017). Genomics and evolution of protein phosphatases. *Sci Signal* **10**, eaag1796.
- de la Fuente van Bentem S, Hirt H (2007). Using phosphoproteomics to reveal signaling dynamics in plants. *Trends Plant Sci* **12**, 404–411.
- Ficarro SB, McClelland ML, Stukenberg PT, Burke DJ, Ross MM, Shabanowitz J, Hunt DF, White FM (2002). Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* **20**, 301–305.
- Fischer EH, Krebs EG (1955). Conversion of phosphorylase B to phosphorylase A in muscle extracts. *J Biol Chem* **216**, 121–132.
- Frost DC, Li LJ (2014). Recent advances in mass spectrometry-based glycoproteomics. *Adv Protein Chem Struct Biol* **95**, 71–123.
- Hubbard MJ, Cohen P (1993). On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci* **18**, 172–177.
- Ke YQ, Han GQ, He HQ, Li JX (2009). Differential regulation of proteins and phosphoproteins in rice under drought stress. *Biochem Biophys Res Commun* **379**, 133–138.

- Khan M, Takasaki H, Komatsu S** (2005). Comprehensive phosphoproteome analysis in rice and identification of phosphoproteins responsive to different hormones/stresses. *J Proteome Res* **4**, 1592–1599.
- Kim HS, Fernandes G, Lee CW** (2016). Protein phosphatases involved in regulating mitosis: facts and hypotheses. *Mol Cell* **39**, 654–662.
- Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T** (2007). Specific recognition and detection of phosphorylated proteins using characteristics of metal ion. *Yakugaku Zasshi* **127**, 1897–1913.
- Kosako H, Nagano K** (2011). Quantitative phosphoproteomics strategies for understanding protein kinase-mediated signal transduction pathways. *Expert Rev Proteomics* **8**, 81–94.
- Krupa A, Preethi G, Srinivasan N** (2004). Structural modes of stabilization of permissive phosphorylation sites in protein kinases: distinct strategies in Ser/Thr and Tyr kinases. *J Mol Biol* **339**, 1025–1039.
- Laemmli UK** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Laugesen S, Bergoin A, Rossignol M** (2004). Deciphering the plant phosphoproteome: tools and strategies for a challenging task. *Plant Physiol Biochem* **42**, 929–936.
- Peck SC** (2003). Early phosphorylation events in biotic stress. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 334–338.
- Prak S, Hem S, Boudet J, Viennois G, Sommerer N, Rossignol M, Maurel C, Santoni V** (2008). Multiple phosphorylations in the C-terminal tail of plant plasma membrane aquaporins: role in subcellular trafficking of AtPIP2;1 in response to salt stress. *Mol Cell Proteomics* **7**, 1019–1030.
- Wang PC, Zhao Y, Li ZP, Hsu CC, Liu X, Fu LW, Hou YJ, Du YY, Xie SJ, Zhang CG, Gao JH, Cao MJ, Huang XS, Zhu YF, Tang K, Wang XG, Tao WA, Xiong Y, Zhu JK** (2018). Reciprocal regulation of the TOR kinase and ABA receptor balances plant growth and stress response. *Mol Cell* **69**, 100–112.
- Whiteman SA, Nühse TS, Ashford DA, Sanders D, Maathuis FJ** (2008). A proteomic and phosphoproteomic analysis of *Oryza sativa* plasma membrane and vacuolar membrane. *Plant J* **56**, 146–156.
- Wu CF, Wang RN, Liang QJ, Liang JJ, Li WK, Jung SY, Qin J, Lin SH, Kuang J** (2010). Dissecting the M phase-specific phosphorylation of serine-proline or threonine-proline motifs. *Mol Biol Cell* **21**, 1470–1481.
- Yang C, Wang ZG, Zhu PF** (2004). Recent advances of protein phosphorylation in proteome. *Prog Physiol Sci* **35**, 119–124.
- Yin XJ, Wang X, Komatsu S** (2018). Phosphoproteomics: protein phosphorylation in regulation of seed germination and plant growth. *Curr Protein Pept Sci* **19**, 401–412.
- Zhang X, Cui YN, Yu M, Su BD, Gong W, Baluška F, Komis G, Samaj J, Shan XY, Lin JX** (2019). Phosphorylation-mediated dynamics of nitrate transceptor NRT1.1 regulate auxin flux and nitrate signaling in lateral root growth. *Plant Physiol* **181**, 480–498.
- Zhu WG** (2017). Regulation of p53 acetylation. *Sci China Life Sci* **60**, 321–323.

## Protocols for Analyzing Plant Phospho-proteins

Dan Zhu, Hanwei Cao, Yuan Li, Dongtao Ren\*

*State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, College of Biological Sciences, China  
Agricultural University, Beijing 100193, China*

**Abstract** Protein phosphorylation is one of the important protein posttranslational modifications that is involved in the regulation of most cellular processes in plants. Protein kinases catalyze the phosphorylation by transferring the phosphate group in ATP to the substrate proteins. The phosphate is usually covalently linked to the hydroxyl group of specific amino acid residues in the substrates by an ester bond. The mostly studied phosphorylation sites are serine, threonine, and tyrosine residues. Here, we present protocols and related tips for the *in vitro* and *in vivo* protein phosphorylation assays.

**Key words** protein phosphorylation, protein kinase, plant

**Zhu D, Cao HW, Li Y, Ren DT** (2020). Protocols for analyzing plant phospho-proteins. *Chin Bull Bot* **55**, 76–82.

---

\* Author for correspondence. E-mail: ren@cau.edu.cn

(责任编辑: 白羽红)