

## 蛋白质亚硝基化检测和鉴定方法的研究进展

汪达丽\*, 张双双\*, 刘建中\*\*

浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江金华321004

**摘要:** 蛋白的亚硝基化是近期发现的一种类似于磷酸化、可逆的、不依赖于环磷酸鸟苷(cGMP)的一氧化氮修饰和调节蛋白功能的新途径。一经发现, 有关亚硝基化的研究呈指数级递增。亚硝基化参与从生长发育到抗病、抗逆等多个生理和病理过程。已有大量综述对亚硝基化调控蛋白功能从而影响某一生理生化及病理过程进行了总结。但迄今为止, 对检测蛋白亚硝基化的手段和鉴定亚硝基化位点的方法进行总结的文献综述仍屈指可数。据此, 我们对蛋白亚硝基化检测手段的发明、改进提高、亚硝基化位点的结构特点以及亚硝基化位点预测软件的开发等进行综述, 旨在为该领域内科研工作者提供方便。

**关键词:** 亚硝基化; 一氧化氮; 生物素置换法; 翻译后修饰; LC-MS/MS

## Advances in Methodologies for Detection and Identification of the *S*-nitrosylated Proteins

WANG Da-Li\*, ZHANG Shuang-Shuang\*, LIU Jian-Zhong\*\*

College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004, China

**Abstract:** Similar to phosphorylation, *S*-nitrosylation is a newly identified protein modification in which nitric oxide (NO) moiety covalently attached to thiol group. *S*-nitrosylation is a reversible process and it can result in the alteration of protein functions in guanosine 3', 5'-cyclic phosphate (cGMP) independent manner. It has been shown that *S*-nitrosylation plays important regulatory roles in various physiological and pathological processes from growth and development to biotic and abiotic stress responses. The research publications in this field have grown exponentially since its discovery. Up to date, numerous review articles have been published on how *S*-nitrosylation exerts its influences on protein functions. However, review articles that summarize the detection of *S*-nitrosylated proteins and the identification of the sites of this modification are rare. Thus, we reviewed the development, evolution and current status of the methodologies for protein *S*-nitrosylation studies.

**Key words:** *S*-nitrosylation; nitric oxide (NO); biotin switch assay (BSA); post-translational modification; LC-MS/MS

一氧化氮(nitric oxide, NO)是一个小型气体信号分子, 极易通过扩散作用进行跨膜运输。NO因具有自由基的特性, 决定了它可以与细胞内不同的生物靶标以依赖于浓度和氧化还原状态的方式进行广泛的互动, 从而影响众多生物学过程。在植物中, NO影响开花时间(He等2004)、种子萌发(Wendehenne等2001)、光形态学建成(Wendehenne等2001)、气孔的关闭(Neill等2002; Guo等2003)、果实成熟和叶片衰老(Wendehenne等2001; Guo和Crawford 2005)等生长发育过程。它同时在非生物胁迫(肖强和郑海雷2004; Xuan等2010; Fan和Liu 2012; He等2012)和防御反应(Delledonne等1998; Durner等1998; Wendehenne等2001)中也发挥着至关重要的作用, 例如在激活防御基因、调控程序

性细胞死亡中都起着关键作用。

亚硝基化(*S*-nitrosylation)是近年来新发现的一种不依赖于环磷酸鸟苷(guanosine 3', 5'-cyclic phosphate, cGMP)的NO信号传导途径, 即NO可逆地共价结合到蛋白质半胱氨酸巯基(Cys-SH)上形成亚硝基硫醇(RCys-SNO)的过程。蛋白质的亚硝基化可以改变蛋白质的功能, 包括增强或抑制蛋白酶的活性、改变蛋白质在细胞内的转运和亚细胞定位等(Stamler 1997)。亚硝基化是继磷酸化

收稿 2014-03-25 修定 2014-05-16

资助 国家自然科学基金(31371407)、浙江省钱江人才计划(2013R10074)和浙江省自然科学基金(LY12C14001)。

\* 同等贡献。

\*\* 通讯作者(E-mail: jzliu@zjnu.cn; Tel: 0579-82288053)。

(phosphorylation)、泛素化(ubiquitination)和乙酰化(acetylation)等之后又一种新的蛋白质翻译后修饰方式。自Stamler (1994)首次发现蛋白质的亚硝基化途径后,有关亚硝基化的研究成指数级增加,证明其在不同的生理和病理过程中发挥着广泛的作用(Hess和Stamler 2012)。

亚硝基化可由四种不同的发生方式:氧化途径、自由基介导的途径、金属催化途径以及转亚硝基化途径(*trans*-nitrosylation) (Kovacs和Lindermeyer 2013)。细胞内绝大多数的蛋白质亚硝基化是以转亚硝基化的方式进行的(Dahm等2006)。在转亚硝基化途径中,NO首先与小分子物质上的半胱氨酸结合生成亚硝基硫醇,其中NO与Cys直接结合生成的亚硝基谷胱甘肽(*S*-nitrosoglutathione, GSNO)是细胞内主要的NO供体。GSNO作为NO在细胞内的临时储蓄库,可以将NO反式转移到蛋白质半胱氨酸巯基(Cys-SH)上,即发生转亚硝基化作用(*trans*-nitrosylation) (Foissner等2000; Moreau等2010; Fröhlich和Durner 2011)。因此,细胞内GSNO的浓度可以间接反映蛋白质亚硝基化的程度(Liu等2004; Feechan等2005; Dahm等2006)。亚硝基化是一个由细胞内NO或GSNO浓度和氧化还原状态共同决定的可逆过程(Liu等2004; Feechan等2005; Tada等2008)。亚硝基化的蛋白在细胞内GSNO浓度降低或还原性增强的情况下可发生去亚硝基化作用(*de*-nitrosylation)。去亚硝基化有酶促反应和非酶促反应两个途径。亚硝基谷胱甘肽还原酶(*S*-nitrosoglutathione, GSNO) (Liu等2004; Feechan等2005)和硫氧还原蛋白(thioredoxin, TRX) (Stoyanovsky等2005; Sengupta等2007; Benhar等2008; Tada等2008)是去亚硝基化的两个关键酶。NO是通过亚硝基化某一生理过程中起关键作用的蛋白来发挥作用。因此,鉴定出亚硝基化的靶蛋白及其靶位点对揭示NO调控某一生理过程的机理具有重要意义;同时,对创制不能被亚硝基化修饰和调控的突变体蛋白进而通过基因工程手段改良某一性状和进行基因治疗等方面也具有重要意义。因此,鉴定亚硝基化靶蛋白和靶位点的方法对促进该领域的研究起着关键作用。

Jaffrey等(2001)首次开创性的应用生物素置换法(biotin switch assay, BSA)鉴定亚硝基化的靶

蛋白,为亚硝基化靶蛋白的鉴定奠定了坚实基础。以此方法为基础,又相继衍生出多种鉴定亚硝基化靶蛋白的方法。特别是随着蛋白质组学的高速发展,将BSA结合液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术实现了高通量鉴定亚硝基化靶蛋白及靶位点的目标(Hess和Stamler 2012);近期,应用同位素代码亲和标签(isotope-coded affinity tag, ICAT)技术可同时进行亚硝基化靶蛋白、靶位点的鉴定和比较不同样品中同一蛋白亚硝基化程度的任务(Wu等2010; Kovacs和Lindermeyer 2013; Fares等2014)。根据已鉴定出的靶蛋白和靶位点,总结出了亚硝基化靶位点附近可能的氨基酸组成及结构特点,并由此开发出预测亚硝基化靶位点的程序和软件。现将鉴定亚硝基化方法的演变过程、具体原理和步骤总结如下,旨在为从事该领域的科研工作者提供方便。

### 1 生物素置换法

Jaffrey等(2001)发明了BSA检测亚硝基化靶蛋白(图1)。该方法的创新点是将亚硝基化的半胱氨酸残基替换成生物素化的半胱氨酸残基,然后用生物素抗体进行Western blots,检测生物素化的蛋白。其具体步骤如下:(1)使用巯基特异性试剂MMTS (methyl methanethiosulfonate)将自由的巯基(-SH)封闭,MMTS只能专一性地封闭蛋白中自由的巯基(-SH),使之甲基硫醇化,但不能封闭被亚硝基化的巯基(-SNO),也不能封闭二硫键(-S-S-);(2)巯基封闭后,用抗坏血酸盐将被亚硝基化的巯基(-SNO)还原成自由的巯基(-SH),而最初自由的巯基(-SH)由于被MMTS封闭后形成甲基硫醇而不能被还原;(3)用巯基专一性的生物素标记试剂biotin-HPDP (*N*-[6-(biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide)中的HPDP与新形成的自由巯基(-SH)反应,使其生物素化,这样先前亚硝基化的巯基(-SNO)就被生物素化了。值得注意的是,用biotin-HPDP进行的生物素化反应是可逆的。由于MMTS能够与biotin-HPDP相互竞争巯基,所以在使用抗坏血酸盐之前需要用柱离心或用丙酮沉淀法彻底除去MMTS;(4)生物素化以后,用专一性结合生物素的亲和树脂链霉亲和素-琼脂糖(streptavidin agrose)或抗生素蛋白-琼脂糖(avidin agrose)对生物素化蛋白进行富集和纯化;(5)用生

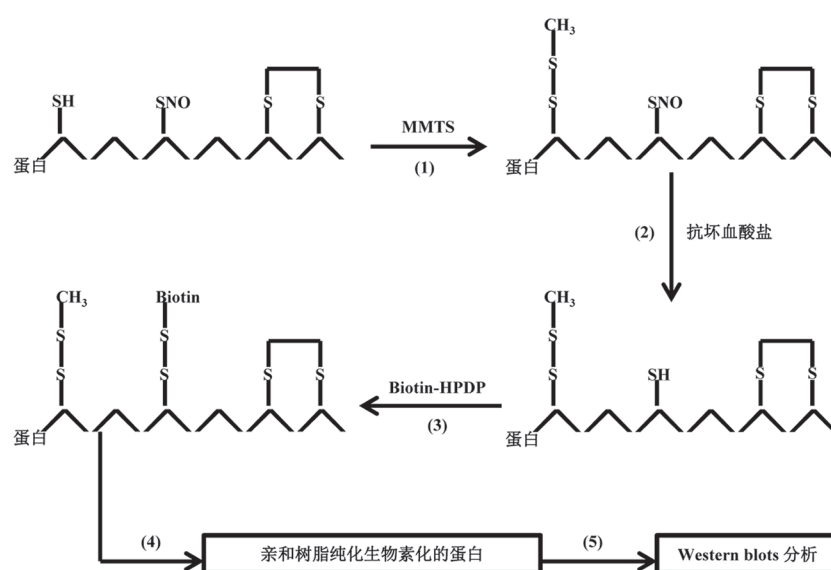


图1 生物素置换法检测亚硝基化蛋白

Fig.1 Detection of *S*-nitrosylated proteins by BSA

参考Jaffrey等(2001)文献修改。

物素抗体对生物素化的蛋白进行Western blots检测。该方法可以在蛋白未经亲和素纯化前做Western blots检测,也可以在纯化后做Western blots检测。经亲和素纯化后,能富集亚硝基化的蛋白,这样可以避免由于杂带的出现而导致背景过高。前者适用于体外表达靶蛋白的检测,而后者则适用于鉴定某一特定组织或器官总蛋白提取液中靶蛋白的亚硝基化水平。经富集和纯化后的蛋白,也可以用某一蛋白的特异性抗体进行Western blots检测(Lindermeyer等2005)。

在应用BSA时应注意以下几点: (1) MMTS封闭要彻底,如果不能有效地对自由巯基(-SH)进行完全封闭,会降低检测的灵敏度; (2) BSA第2步使用还原剂抗坏血酸盐时会产生假阳性结果(Zhang等2005; Huang和Chen 2006),在避光的条件下可以避免假阳性的发生(Forrester等2007)。

由于用biotin-HPDP进行的置换反应是可逆的,在还原状态下会发生去生物素化反应,所以其检测效率会受到影响。为了改进此方法,后来用与巯基发生不可逆反应的马来酰亚胺-生物素(maleimide-biotin) (Huang和Chen 2010)和碘代乙酰基-生物素(iodoacetyl-biotin)替换biotin-HPDP用于生物素置换反应,大大降低了做Western blots时的背景并提高后续LC-MS/MS的检测效率。Thermal

Scientific公司根据Bomgardner等的方法开发了用于检测亚硝基化蛋白的Western blots试剂盒(<http://www.piercenet.com/product/s-nitrosylation-western-blot-kit>)。

## 2 生物素置换法结合液相色谱-串联质谱法分离、纯化及鉴定被亚硝基化的靶蛋白

以BSA为基础,结合双向电泳及LC-MS/MS法进行亚硝基化靶蛋白的鉴定,是新衍生的一种能有效鉴定亚硝基化蛋白的方法。该方法的样品处理简便快速、特异性强和检测灵敏准确,可满足同时分离、纯化和鉴定亚硝基化蛋白的要求(图2) (Jaffrey等2001; Martínez-Ruiz和Lamas 2004; Gao等2005; Lindermeyer等2005)。该方法前4个步骤与BSA相同, (1)用MMTS将亚硝基化的蛋白进行自由巯基(-SH)封闭; (2)用抗坏血酸盐将亚硝基化的巯基(-SNO)还原成自由巯基(-SH); (3)将亚硝基化的蛋白进行生物素化处理; (4)将生物素化蛋白使用亲和树脂链霉亲和素-琼脂糖(streptavidin agarose)或抗生物素蛋白-琼脂糖(avidin agarose)进行富集纯化; (5)将纯化的蛋白进行SDS-PAGE分离,对凝胶电泳结果进行银染和图像扫描; (6)将电泳条带进行切胶,用胰蛋白酶过夜处理; (7)将酶解所得肽段经2-巯基乙醇(2-mercaptoethanol, 2-ME)洗涤, 2-ME能够将肽段二硫键上的生物素还原成巯基;

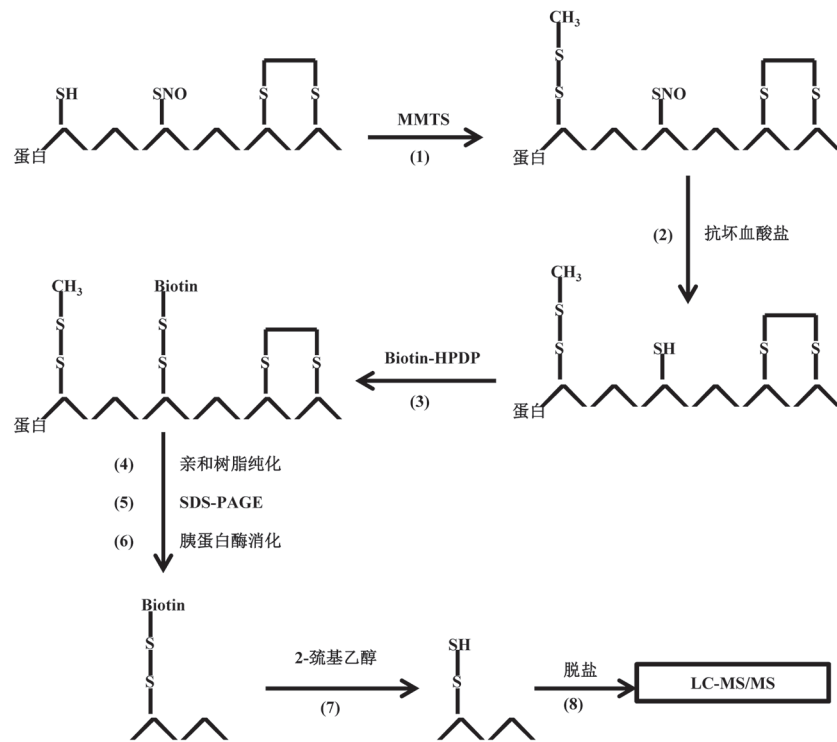


图2 生物素置换法结合液相-串联质谱法检测和蛋白质组学鉴定亚硝基化蛋白

Fig.2 Detection and proteomic identification of S-nitrosylated proteins by combination of BSA and LC-MS/MS

参考Jaffrey等(2001)、Martínez-Ruiz和Lamas (2004)、Gao等(2005)、Lindermayr等(2005)文献修改。

(8)再经低温烘干、脱盐处理后进行LC-MS/MS分析。经液相色谱处理后,不同的多肽可根据在色谱柱中保留时间不同而进行分离,然后使用电喷雾离子化串联质谱进行检测,用串联质谱可获得多肽的质量谱。现在已经有多种方法可以将多肽从头进行解析,其中较早的有Taylor和Johnson (1997)提出的Lutefisk法,较新的则有Dančik等(1999)提出的Sherenga法。Taylor和Johnson (1997)用图论(graph theory)的方法得到可能的多肽序列后,用与Eng等(1994)相似的分析对多肽序列进一步打分排序。对串联质谱多肽序列进行解析的软件有PepMass (<http://onassis7.tripod.com/pepmass.html>),还有蛋白质数据库搜索软件Protein Explorer ([http://www.umass.edu/microbio/chime/pe\\_beta/pe/protexpl/](http://www.umass.edu/microbio/chime/pe_beta/pe/protexpl/)),先用PepMass对一些蛋白质的多肽串联质谱进行分析,再用Protein Explorer进行数据库搜索鉴定蛋白质,从而鉴定出亚硝基化蛋白的种类。

### 3 SNO位点鉴定法直接鉴定亚硝基化蛋白半胱氨酸靶位点

通过BSA结合LC-MS/MS可以鉴定出亚硝基

化靶蛋白,但并不能鉴定某一蛋白质氨基酸组成中哪个(些)半胱氨酸残基被亚硝基化修饰了。为此,Hao等(2006)开发的SNO位点鉴定法(SNO site identification, SNOID)可以直接鉴定出某一蛋白中被亚硝基化的半胱氨酸残基。该方法是BSA结合LC-MS/MS的进一步提高和改进。其基本步骤与BSA结合LC-MS/MS相同,但在生物素化处理后不是直接纯化,而是先用胰蛋白酶消化,然后再纯化酶解后的肽段,被纯化肽段中包含Cys的即为亚硝基化的靶位点。

SNOID的具体步骤如图3所示,前三个步骤与BSA基本相同,(1)先用MMTS封闭自由巯基(-SH);(2)使用抗坏血酸盐将亚硝基化的Cys选择性还原成含自由巯基的半胱氨酸(Cys-SH);(3)再用biotin-HPDH进行生物素化处理;(4)接下来并不是直接用亲和树脂链霉亲和素-琼脂糖(streptavidin agrose)或抗生素蛋白-琼脂糖(avidin agrose)对生物素化的蛋白进行亲和纯化,而是将生物素化蛋白先进行SDS-PAGE分离;(5)将电泳分离得到的条带进行彻底的胰蛋白酶处理;(6)利用亲和树脂链霉

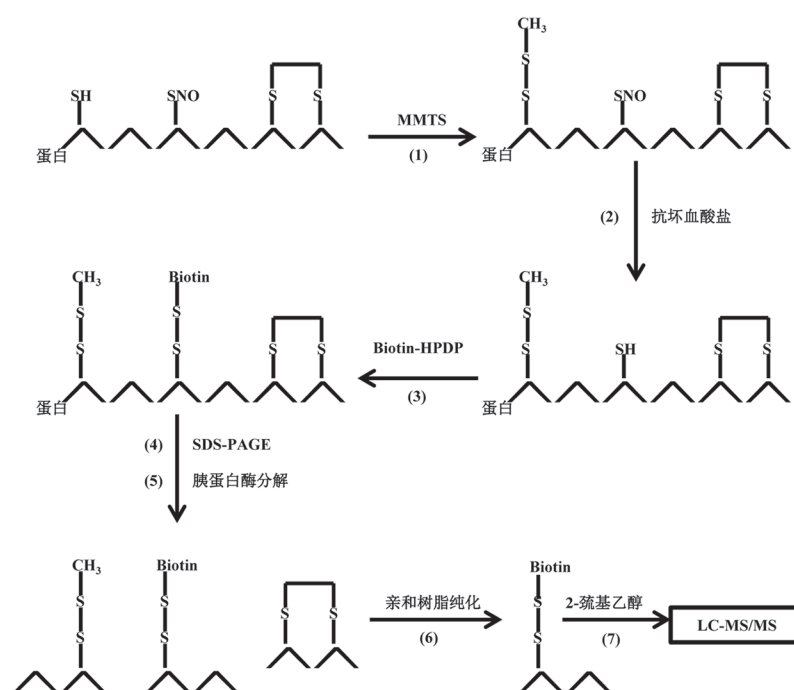


图3 SNOSID法鉴定亚硝基化蛋白半胱氨酸靶位点

Fig.3 The SNOSID method for identifying protein SNO-Cys modification sites

参考Hao等(2006)文献修改。

亲和素-琼脂糖(streptavidin agarose)或抗生物素蛋白-琼脂糖(avidin agarose)对生物素化多肽片段进行纯化; (7)将纯化后的多肽片段经还原剂2-ME处理后, 切断二硫键, 脱掉biotin, 最后再根据LC-MS/MS获得的多肽片段序列信息对蛋白质身份进行鉴定。

Hao等(2006)利用此方法从56种小鼠小脑蛋白中成功鉴定出68个亚硝基化的Cys靶位点, 其中包括 $\alpha$ -微管蛋白、 $\beta$ -微管蛋白和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)等。

后来, Forrester等(2009)对此方法进行了改进: (1)用SNO亲和树脂硫丙基琼脂糖(thiopropyl sepharose)代替硫醇亲和树脂(biotin-HPDP)用以纯化和分离靶蛋白; (2)直接在树脂上进行蛋白酶处理, 该方法不但简化了实验流程, 而且提高了检测的灵敏度。为了避免抗坏血酸盐所造成的假阳性结果, Doulias等(2010)用醋酸苯汞(phenylmercury)替代biotin-HPDP直接与SNO发生反应, 形成相对稳定的硫醇-汞键(thiol-mercury bond), 然后用合成的有机汞树脂(organomercury)进行后续的富集和纯化步骤。

#### 4 同位素代码亲和标签技术结合生物素置换法同时鉴定和定量亚硝基化位点

SNOSID技术虽然能分别鉴定出亚硝基化的靶蛋白和靶位点, 但却不能对蛋白亚硝基化的程度进行精准的相对定量; 而要了解NO在不同生理和病理条件下的作用, 对亚硝基化程度进行相对定量是不可或缺的。

随着定量蛋白质组学技术的日益进步, 在BSA的基础上, 将其与同位素代码亲和标签技术(isotope-coded affinity tag, ICAT)结合可同时完成亚硝基化靶蛋白、靶位点的鉴定和比较不同样品中同一蛋白亚硝基化程度的任务(Wu等2010; Fares等2014)。该方法的另一个优点是省去了繁冗的凝胶电泳步骤, 使分析蛋白亚硝基化的方法在技术上又得到了进一步的改善和提升, 但该方法的缺点是要使用同位素。

ICAT是Gygi等(1999)发明的新技术。ICAT化学试剂由3部分构成: (1)亲和标签, 如生物素或其他标签, 用来分离ICAT标记的多肽; (2)连接区(linker), 用于同位素标记; (3)活性基团, 用以特异性结合半胱氨酸的巯基(Cys-SH)。目前, 商品化的

ICAT试剂可分为两种,在连接区带8个氢原子(D0)的轻试剂和8个氘原子(D8)的重试剂。由8个氢原子(D0)和8个氘原子(D8)分别标记的ICAT分子量正好相差8。ICAT最初是用来研究不同样品中蛋白表达差异的。用轻、重ICAT试剂分别标记不同样品中相同蛋白的肽段,其总是一前一后相邻的分布在质谱图上,且分子量正好相差8或4 Da(肽段带两个电荷)。通过LC-MS/MS鉴定出该片段属于何种蛋白后,计算、比较二者峰值的差异,就可知这种蛋白在2个不同样品中的相对表达情况。BSA结合ICAT的一般实验步骤是将1个蛋白样品用轻试剂标记,另1个蛋白样品用重试剂标记。ICAT的反应基团会专一性地与蛋白中的Cys共价结合,待充分反应后,将二者等量混合,用胰蛋白酶酶解,然后就可对含生物素化的ICAT酶解多肽片段进行LC-MS/MS分析。本方法对低丰度蛋白的直接捕获测定以

及可靠性都较以往的检测技术有所提高。

ICAT基本步骤如图4所示(Wu等2011; Fares等2014): (1)首先用 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MMTS将提取的组织蛋白进行自由巯基(-SH)封闭; (2)用 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的抗坏血酸盐和 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CuCl}_2$ 室温孵化1 h,目的是还原亚硝基化的半胱氨酸(Cys-SNO),  $\text{CuCl}_2$ 可以增强还原反应的进行; (3)将实验样品用重试剂(ICAT-H)标记,而对照样品用轻试剂(ICAT-L)标记,在平行实验中常可以采用交换标记试剂的方法来检测试剂盒中标记试剂是否存在偏差; (4)用胰蛋白酶按1:50或1:100的比例对以上标记的蛋白进行消化处理,将酶解消化后得到的轻、重多肽在同一离心管中均匀混合,使用C18脱盐柱对已经标记的多肽进行脱盐和清洗,将洗净的多肽进行生物素化,再用亲和树脂链霉亲和素-琼脂糖(streptavidin agrose)或抗生物素蛋白-琼脂糖(avidin agrose)

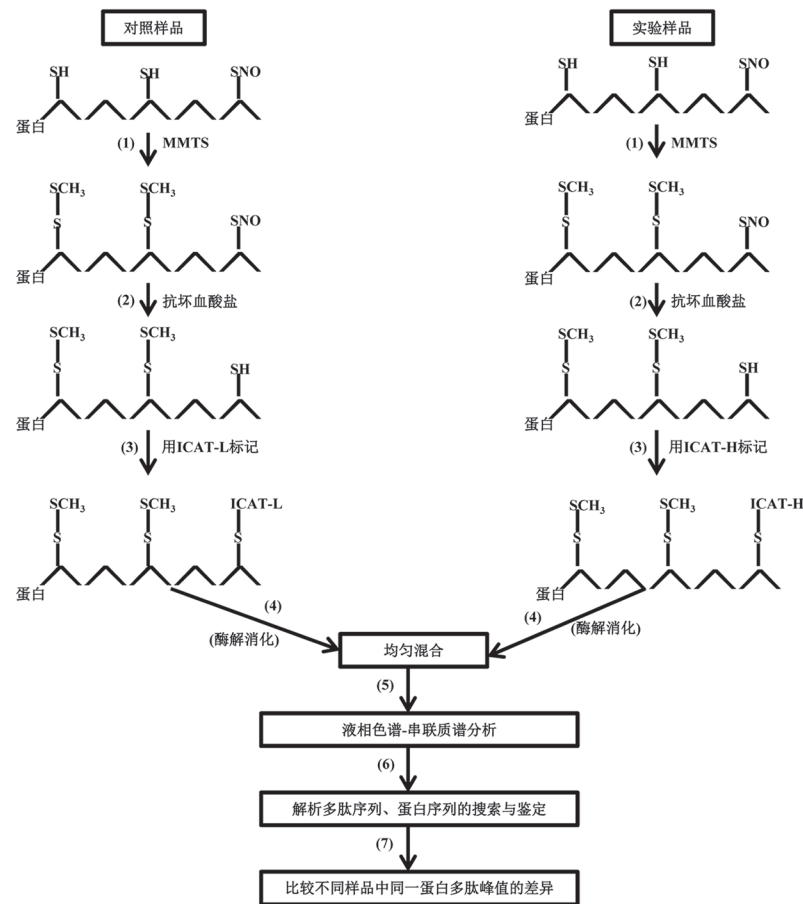


图4 同位素代码亲和和标签技术结合生物素置换法同时鉴定和定量亚硝基化位点

Fig.4 Simultaneous identification and quantification of nitrosylation sites by combination of biotin switch and ICAT labeling

参考Fares等(2014)文献修改。

纯化生物素化的多肽; (5)去除生物素尾巴后, 对同位素标记的多肽进行LC-MS/MS分析; 不同的多肽可根据在色谱柱中保留时间不同而进行分离; (6)用LC-MS/MS得到多肽的质量谱图, 使用PepMass (<http://onassis7.tripod.com/pepmass.html>)等质谱解析软件解析质谱数据, 得到多肽序列; 再使用Protein Explorer ([http://www.umass.edu/microbio/chime/pe\\_beta/pe/protexpl/](http://www.umass.edu/microbio/chime/pe_beta/pe/protexpl/))等软件进行蛋白数据库搜索, 调查蛋白序列并鉴定蛋白种类; (7)根据质谱图上不同ICAT试剂标记的一对肽段离子峰值高低的差异就能对亚硝基化蛋白进行相对定量。

该标记方法的主要优点是样品在MMTS封闭和纯化前就混合, 降低了不同样品准备和处理过程中造成的误差, 可以提供更加精准的定量结果。

### 5 亚硝基化半胱氨酸位点的结构特点

能否被亚硝基化取决于蛋白半胱氨酸残基两端的氨基酸组成及蛋白形成的空间结构。亚硝基化一般只发生在其靶蛋白的1或2个半胱氨酸残基上, 靶蛋白被亚硝基化后, 蛋白功能就会发生改变(Hess和Stamler 2012)。大多数蛋白氨基酸编码序列里都含有Cys, 但这些Cys对NO基团的亲和力有着显著差异, 并不是每个Cys都可被亚硝基化修饰(Stamler 1994; Hess和Stamler 2012)。通过对不同亚硝基化蛋白线性氨基酸序列的分析比较找到了一个酸-碱氨基酸结构域, 被该结构域包围的Cys更易于被亚硝基化修饰(Stamler 1997)。该酸-碱结构域指的是靶Cys两边由酸性氨基酸残基(D、E)与碱性氨基酸残基(R、H、K)包围形成的[KRHDE]-C-[DE]结构; 后来又找到了一个疏水的GSNO结合域([HKR]-C-[hydrophobic]X[D-E]) (Hess等2005)。虽然利用酸-碱结构域和疏水结构域可以预测一些亚硝基化位点(Lindermeyer等2006), 但其并不适用于所有蛋白(Hao等2006)。随着高通量蛋白质组学方法的应用, 被鉴定出的亚硝基化Cys靶位点越来越多, 使精确分析亚硝基化靶位点周围的微环境成为可能。Liu等(2010)采用位点专一性的高通量蛋白质组学方法从人类乳腺癌细胞中鉴定出一些亚硝基化靶位点, 并从中总结出一个共有的I-C疏水中心, 左右两边由酸性(D/E)和碱性氨基酸残基(R/K)围绕, 该结果为亚硝基化靶位点周围存在酸碱结构域和疏水环境的重要性提供了直接证据

(Hess等2001)。对拟南芥悬浮细胞进行蛋白质组学方法鉴定, 找到了53个内源亚硝基化的靶位点(Fares等2011), 对这些亚硝基化的Cys和其周围的氨基酸残基进行分析表明, 这些靶位点周围并不存在明显的酸-碱结构域, 只有3个非极性残基(Ala、Gly、Ile)富集在被修饰的Cys周围。另一些研究表明, 决定是否亚硝基化靶位点的不仅是其线性氨基酸顺序, 而是形成的三级空间结构(Hao等2006)。根据已经鉴定出的68个亚硝基化的半胱氨酸(Cys-SNO)位点信息, 并不能有效地揭示1个蛋白质的二级结构特点, 表明未知的蛋白质三级结构特点可能决定亚硝基化的特异性(Hao等2006)。因此, 到目前为止还没有一种能够十分准确预测亚硝基化靶位点的方法, 最终一定要通过实验检验才能确证亚硝基化靶位点。

### 6 亚硝基化靶蛋白的数据库和基于算法建立的预测亚硝基化靶位点的软件及网页

对用实验证实的亚硝基化靶蛋白和靶位点已建立了数据库, 这为通过算法(algorithm)开发预测亚硝基化的靶蛋白及靶位点奠定了基础。下面重点介绍几个新建的数据库和新开发的用于预测亚硝基化靶位点的软件和网页。

#### 6.1 GPS-SNO1和GPS-SNO3

Xue等(2010)开发了GPS-SNO1 (group-based prediction system, GSP)的软件, 该软件使用1种新算法, 基于公共数据库中已知的327个蛋白中504个亚硝基化靶位点所开发的; 在GPS-SNO1的基础上, 后来又开发了GPS-SNO3。在设定为低阈值的条件下, GPS-SNO3预测的准确率为75.8%, 敏感性为53.57%, 专一性为80.14%。用GPS-SNO1对485个来自PubMed的蛋白进行预测, 74%的蛋白中至少有一个靶位点。GPS-SNO1软件可以免费从<http://sno.biocuckoo.org>下载。

#### 6.2 SNOsite

Lee等(2011)根据系统信息学的方法研究亚硝基化底物的专一性, 开发了SNOsite (an effective web-based tool for identifying cysteine S-nitrosylation sites)软件, 此系统是基于小鼠表皮细胞中鉴定出的586个亚硝基化靶位点开发的。在开发SNOsite时, 他们同时考虑蛋白的结构因素, 如Cys侧翼氨基酸组成、可接触的表面积和生理生化特性等,

目的是区分亚硝基化和非亚硝基化位点。他们用MDD (maximal dependence decomposition)法获得统计学上显著的保守结构域,将靶位点的聚类序列划分为11个亚组。应用SVM (support vector machine)对每个聚类的结构域建立可预测的模型。根据5倍的交叉验证(cross-validation), MDD聚类的SVM准确度可以达到90%。SNOSite可以免费在<http://csb.cse.yzu.edu.tw/SNOSite/>上使用。

### 6.3 SNObase

SNObase (a database for *S*-nitrosation modification)是中国科学院生物物理所陈畅研究组在已鉴定出的2 561个亚硝基化靶蛋白的基础上建立起来的(Zhang等2012)。SNObase能够提供的详细信息包括靶位点、生物功能模型、与之相关的疾病、亚硝基化趋势和亚硝基化对蛋白功能的影响等信息,但其不能进行靶位点的预测。SNObase可登陆<http://www.nitrosation.org>免费使用。

### 6.4 dbSNO

dbSNO (a database of cysteine *S*-nitrosylation)是在对已鉴定出的3 000多个亚硝基化靶位点进行分析的基础上建立起来的(Lee等2012)。dbSNOSite提供对这些蛋白的结构和功能分析,包括靶位点周围的结构域、溶剂的可接触性、蛋白的二级及三级结构、蛋白的结构域及功能分类等信息,同时dbSNO也可以对任何蛋白进行靶位点的预测。dbSNO可以免费在<http://dbSNO.mbc.nctu.edu.tw>上使用。

### 6.5 iSNO-PseAAC

PseAAC (pseudo amino acid composition)是近期开发的另一个用于亚硝基化靶位点预测的系统(Xu等2013),该系统所用的数据库源自于dbSNO。为了降低重复,该系统只选用了dbSNO中438个靶蛋白的731个靶位点用于建立预测模型。这438个靶蛋白中任意2个蛋白之间的氨基酸序列一致性(identity)不高于40%,与其他预测靶位点的软件比较,其交叉验证的成功率高于90%。可登陆<http://app.aporc.org/iSNO-PseAAC/>免费使用。

Kovacs和Lindermyar (2013)选取了10个已证实的拟南芥亚硝基化靶蛋白,分别用GPS-SNO、SNOSite和iSNO-PseAAC预测软件进行比较。结果显示,以上软件均能成功预测出靶位点,但预测

的专一性有较大差异。iSNO-PseAAC和SNOSite的预测专一性较差,而GPS-SNO预测的专一性最高,是最可靠的预测软件。在实验前通过以上软件预测可能的SNO靶位点,将为科研人员在实验设计上提供很大的便利。

## 7 总结与展望

越来越多的研究表明,蛋白的亚硝基化修饰参与调控动植物中众多不同的生物学过程。以上各种检测和鉴定亚硝基化靶蛋白及靶位点的方法,对不同样品或组织器官中亚硝基化水平的相对定量,都对该领域的研究起了巨大的推动作用。建立亚硝基化靶蛋白数据库和开发预测亚硝基化靶位点的软件,为从事该领域的科研工作者提供了较大的便利。未来该领域研究的焦点是要利用这些新技术和新方法鉴定出更多的亚硝基化靶蛋白及靶位点,拟揭示亚硝基化调控各种生理过程的机理及建立亚硝基化调控各种生理过程的信号网络。

## 参考文献

- 肖强, 郑海雷(2004). 一氧化氮与植物胁迫响应. 植物生理学通讯, 40 (3): 379~384
- Benhar M, Forrester MT, Hess DT, Stamler JS (2008). Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. *Science*, 320 (5879): 1050~1054
- Dahm CC, Moore K, Murphy MP (2006). Persistent *S*-nitrosylation of complex I and other mitochondrial membrane proteins by *S*-nitrosothiols but not nitric oxide or peroxynitrite: implications for the interaction of nitric oxide with mitochondria. *J Biol Chem*, 281 (15): 10056~10065
- Dancik V, Addona TA, Clauser KR, Vath JE, Pevzner PA (1999). *De novo* peptide sequencing via tandem mass spectrometry. *J Comput Biol*, 6 (3-4): 327~342
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394 (6693): 585~588
- Doulias PT, Greene JL, Greco TM, Tenopoulou M, Seeholzer SH, Dunbrack RL, Ischiropoulos H (2010). Structural profiling of endogenous *S*-nitrosocysteine residues reveals unique features that accommodate diverse mechanisms for protein *S*-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107 (39): 16958~16963
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95 (17): 10328~10333
- Eng JK, McCormack AL, Yates JR (1994). An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom*, 5 (11): 976~989
- Fan QJ, Liu JH (2012). Nitric oxide is involved in dehydration/drought tolerance in *Poncirus trifoliata* seedlings through regulation of antioxidant systems and stomatal response. *Plant Cell*



- Rep, 31 (1): 145~154
- Fares A, Nespoulous C, Rossignol M, Peltier JB (2014). Simultaneous identification and quantification of nitrosylation sites by combination of biotin switch and ICAT labeling. *Methods Mol Biol*, 1072: 609~620
- Fares A, Rossignol M, Peltier JB (2011). Proteomics investigation of endogenous *S*-nitrosylation in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 416 (3-4): 331~336
- Feechan A, Kwon E, Yun BW, Wang Y, Pallas JA, Loake GJ (2005). A central role for *S*-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102 (22): 8054~8059
- Foissner I, Wendehenne D, Langebartels C, Durner J (2000). *In vivo* imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant J*, 23 (6): 817~824
- Forrester MT, Foster MW, Stamler JS (2007). Assessment and application of the biotin switch technique for examining protein *S*-nitrosylation under conditions of pharmacologically induced oxidative stress. *J Biol Chem*, 282 (19): 13977~13983
- Forrester MT, Thompson JW, Foster MW, Nogueira L, Moseley MA, Stamler JS (2009). Proteomic analysis of *S*-nitrosylation and denitrosylation by resin-assisted capture. *Nat Biotechnol*, 27 (6): 557~559
- Fröhlich A, Durner J (2011). The hunt for plant nitric oxide synthase (NOS): is one really needed? *Plant Sci*, 181 (4): 401~404
- Gao C, Guo H, Wei J, Mi Z, Wai PY, Kuo PC (2005). Identification of *S*-nitrosylated proteins in endotoxin-stimulated RAW264.7 murine macrophages. *Nitric Oxide*, 12 (2): 121~126
- Guo FQ, Crawford NM (2005). *Arabidopsis* nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell*, 17 (12): 3436~3450
- Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM (2003). Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science*, 302 (5642): 100~103
- Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol*, 17 (10): 994~999
- Hao G, Derakhshan B, Shi L, Campagne F, Gross SS (2006). SNO-SID, a proteomic method for identification of cysteine *S*-nitrosylation sites in complex protein mixtures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103 (4): 1012~1017
- He H, Zhan J, He L, Gu M (2012). Nitric oxide signaling in aluminum stress in plants. *Protoplasma*, 249 (3): 483~492
- He Y, Tang RH, Hao Y, Stevens RD, Cook CW, Ahn SM, Jing L, Yang Z, Chen L, Guo F et al (2004). Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science*, 305 (5692): 1968~1971
- Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS (2005). Protein *S*-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6 (2): 150~166
- Hess DT, Matsumoto A, Nudelman R, Stamler JS (2001). *S*-nitrosylation: spectrum and specificity. *Nat Cell Biol*, 3 (2): E46~49
- Hess DT, Stamler JS (2012). Regulation by *S*-nitrosylation of protein post-translational modification. *J Biol Chem*, 287 (7): 4411~4418
- Huang B, Chen C (2006). An ascorbate-dependent artifact that interferes with the interpretation of the biotin switch assay. *Free Radic Biol Med*, 41 (4): 562~567
- Huang B, Chen C (2010). Detection of protein *S*-nitrosation using irreversible biotinylation procedures (IBP). *Free Radic Biol Med*, 49 (3): 447~456
- Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH (2001). Protein *S*-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol*, 3 (2): 193~197
- Kovacs I, Lindermayr C (2013). Nitric oxide-based protein modification: formation and site-specificity of protein *S*-nitrosylation. *Front Plant Sci*, 4: 137
- Lee TY, Chen YJ, Lu CT, Ching WC, Teng YC, Huang HD, Chen YJ (2012). dbSNO: a database of cysteine *S*-nitrosylation. *Bioinformatics*, 28 (17): 2293~2295
- Lee TY, Chen YJ, Lu TC, Huang HD, Chen YJ (2011). SNOsite: exploiting maximal dependence decomposition to identify cysteine *S*-nitrosylation with substrate site specificity. *PLoS One*, 6 (7): e21849
- Lindermayr C, Saalbach G, Bahnweg G, Durner J (2006). Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein *S*-nitrosylation. *J Biol Chem*, 281 (7): 4285~4291
- Lindermayr C, Saalbach G, Durner J (2005). Proteomic identification of *S*-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 137 (3): 921~930
- Liu M, Hou J, Huang L, Huang X, Heibeck TH, Zhao R, Pasa-Tolic L, Smith RD, Li Y, Fu K et al (2010). Site-specific proteomics approach for study protein *S*-nitrosylation. *Anal Chem*, 82 (17): 7160~7168
- Liu L, Yan Y, Zeng M, Zhang J, Hanes MA, Ahearn G, McMahon TJ, Dickfeld T, Marshall HE, Que LG et al (2004). Essential roles of *S*-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell*, 116 (4): 617~628
- Martínez-Ruiz A, Lamas S (2004). Detection and proteomic identification of *S*-nitrosylated proteins in endothelial cells. *Arch Biochem Biophys*, 423 (1): 192~199
- Moreau M, Lindermayr C, Durner J, Klessig DF (2010). NO synthesis and signaling in plants--where do we stand? *Physiol Plant*, 138 (4): 372~383
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT (2002). Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol*, 128 (1): 13~16
- Sengupta R, Ryter SW, Zuckerbraun BS, Tzeng E, Billiar TR, Stoyanovsky DA (2007). Thioredoxin catalyzes the denitrosation of low-molecular mass and protein *S*-nitrosothiols. *Biochemistry*, 46 (28): 8472~8483
- Stamler JS (1994). Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, 78 (6): 931~936
- Stamler J (1997). The INTERSALT Study: background, methods, findings, and implications. *Am J Clin Nutr*, 65 (2 Suppl): 626S~642S
- Stoyanovsky DA, Tyurina YY, Tyurin VA, Anand D, Mandavia DN, Gius D, Ivanova J, Pitt B, Billiar TR, Kagan VE (2005). Thioredoxin and lipoic acid catalyze the denitrosation of low molecular weight and protein *S*-nitrosothiols. *J Am Chem Soc*, 127 (45): 15815~15823

- Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, Dong X (2008). Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via *S*-nitrosylation and thioredoxins. *Science*, 321 (5891): 952~956
- Taylor JA, Johnson RS (1997). Sequence database searches via *de novo* peptide sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 11 (9): 1067~1075
- Wendehenne D, Pugin A, Klessig DF, Durner J (2001). Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci*, 6 (4): 177~183
- Wu C, Liu T, Chen W, Oka S, Fu C, Jain MR, Parrott AM, Baykal AT, Sadoshima J, Li H (2010). Redox regulatory mechanism of transnitrosylation by thioredoxin. *Mol Cell Proteomics*, 9 (10): 2262~2275
- Wu C, Parrott AM, Liu T, Jain MR, Yang Y, Sadoshima J, Li H (2011). Distinction of thioredoxin transnitrosylation and denitrosylation target proteins by the ICAT quantitative approach. *J Proteomics*, 74 (11): 2498~2509
- Xuan Y, Zhou S, Wang L, Cheng Y, Zhao L (2010). Nitric oxide functions as a signal and acts upstream of AtCaM3 in thermotolerance in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol*, 153 (4): 1895~1906
- Xue Y, Liu Z, Gao X, Jin C, Wen L, Yao X, Ren J (2010). GPS-SNO: computational prediction of protein *S*-nitrosylation sites with a modified GPS algorithm. *PLoS One*, 5 (6): e11290
- Xu Y, Shao XJ, Wu LY, Deng NY, Chou KC (2013). iSNO-AAPair: incorporating amino acid pair wise coupling into PseAAC for predicting cysteine *S*-nitrosylation sites in proteins. *PeerJ*, 1: e171
- Zhang Q, Alfarra MR, Worsnop DR, Allan JD, Coe H, Canagaratna MR, Jimenez JL (2005). Deconvolution and quantification of hydrocarbon-like and oxygenated organic aerosols based on aerosol mass spectrometry. *Environ Sci Technol*, 39 (13): 4938~4952
- Zhang X, Huang B, Zhang L, Zhang Y, Zhao Y, Guo X, Qiao X, Chen C (2012). SNObase, a database for *S*-nitrosation modification. *Protein Cell*, 3 (12): 929~933