

蛋白质棕榈酰化修饰的分析方法进展

方彩云 张晓勤 陆豪杰*

(复旦大学化学系和生物医学研究院, 上海 200433)

摘 要 棕榈酰化修饰是蛋白质翻译后脂质修饰的重要形式之一, 在细胞信号传导、代谢、凋亡、疾病的发生、发展等过程中都起着重要的作用。因此, 定性和定量分析蛋白质棕榈酰化修饰对理解其生物学功能具有重要意义。本文综述了近年出现的蛋白质棕榈酰化修饰分析技术和方法及其优缺点, 并对其未来的发展趋势进行了展望。

关键词 棕榈酰化修饰; 质谱技术; 蛋白质组学; 评述

1 引 言

蛋白质翻译后修饰的发生使得蛋白质的结构更复杂、功能更完善, 在生物体内起着极为重要的作用, 脂类修饰便是其中一种非常重要的翻译后修饰形式。棕榈酸盐是丰度最高的脂肪酸, 可被共价修饰到蛋白质上。根据连接方式不同, 棕榈酰化修饰可分为 *N* 型(通过酰胺键连接到 Gly/Cys 残基上)和 *S* 型。蛋白质的 *S* 型棕榈酰化修饰(Palmitoylation)是指饱和的 16 个碳的棕榈酸盐通过硫酯键共价修饰到蛋白质 Cys 的巯基上^[1] (如图 1 所示), 它是一种动态、可逆的翻译后修饰形式, 可在时间和空间上调节蛋白质的功能。许多棕榈酰化修饰的可溶或整合膜蛋白质, 如信号蛋白质(包括在癌症和突触信号中断关键因子)、细胞黏附分子和神经递质受体等, 可调控蛋白质的活性和稳定性, 蛋白-蛋白相互作用, 促进蛋白质定位膜脂筏等, 在细胞信号传导、代谢、凋亡、疾病的发生和癌变中都起着重要的作用^[1, 2]。

深入研究和理解蛋白质棕榈酰化修饰的机制, 定性和定量分析含这种修饰的蛋白质, 以及对棕榈酰化和去棕榈酰化修饰相关酶的理解、动态监控棕榈酰化和去棕榈酰化的周期, 对理解复杂信号通路的空间和时间调节等都具有重要意义。定点突变法是传统的方法。一般是将候选的半胱氨酸 Cys 残基突变为 Ser 或 Ala, 将突变体克隆和野生型分别转染细胞, 并比较两者的功能差异。但这种方法不能直接检测内源蛋白质, 棕榈酰化修饰位点的突变可能会导致附近的 Cys 残基发生异常^[3]。此外, 许多蛋白质棕榈酰化抑制剂及去棕榈酰化的棕榈酰硫酯酶也被广泛使用, 例如 2-溴软脂酸乙烯(2-Bromopalmitate, 2-BP)^[4]、浅蓝菌素(Cerulenin)和衣霉素(Tunicamycin)等都具有较好的效果^[5]。尽管这些方法的应用促进了人们对蛋白质棕榈酰化修饰的认识, 但在没有任何修饰位点信息提示的情况下, 这样的研究过程不但耗时费力, 而且棕榈酰化修饰位点的鉴定比较困难。这是因为: (1) 虽然已知一些蛋白质酰基转移酶在富含半胱氨酸的结构域中有保守的 DHHC motif, 且也已发现几种去酰化酶, 但蛋白质发生 *S*-棕榈酰化修饰和去棕榈酰化修饰的酶学尚不清楚^[6]; (2) 还没有明确的蛋白质棕榈酰化修饰的共识基序(Consensus motif)^[7]; (3) 棕榈酰化修饰通常发生在跨膜蛋白或膜相关的蛋白质^[8], 而膜蛋白的溶解度和丰度低, 长链脂肪酸的加入更进一步增加了其疏水性, 增加了检测难度; (4) 不像磷酸化和糖基化修饰, 它没有亲和基团如棕榈酰化修饰特异的抗体等用于富集低丰度的棕榈酰化修饰蛋白质。因此, 人们

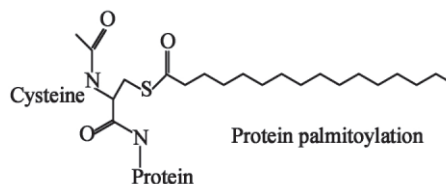


图 1 蛋白质的 *S* 型棕榈酰化修饰, 饱和的 16 个碳的棕榈酸盐通过硫酯键共价修饰到蛋白质 Cys 的巯基上
Fig. 1 Protein *S*-palmitoylation, which consists in the attachment of a saturated C16 acyl chain to protein cysteines via a thioester bond

2013-08-10 收稿; 2013-12-16 接受

本文系国家自然科学基金(No. 21205018 和 21025519), 上海市浦江人才计划(No. 13PJD003) 资助项目

* E-mail: luhaojie@fudan.edu.cn

对它的认识远不及糖基化、磷酸化等其它翻译后修饰。

目前,随着质谱和组学技术的发展,越来越多的棕榈酰化修饰蛋白质及其修饰位点得到了鉴定,极大地促进了人们对蛋白质棕榈酰化修饰的理解。为此,本文就基于质谱和组学手段的棕榈酰化修饰蛋白质/肽段的分析方法及其进展进行了综述。

2 生物信息学预测方法

通过计算方法预测棕榈酰化修饰位点,可为后续的实验验证提供数据基础。在线服务工具 CSS-Palm^[9,10]和 NBA-Palm^[11]可以预测蛋白质的棕榈酰化修饰位点,其中,NBA-Palm(<http://nbapalm.biocuckoo.org/>)是基于 Naive bayesian algorithm (NBA) 方法构建的,其训练数据集包括 105 个蛋白质的 245 个位点;CSS-Palm 是用基于聚类打分策略 Clustering and scoring strategy (CSS) 的算法构建的,最新版本的 CSS-Palm 3.0(<http://csspalm.biocuckoo.org/>)训练数据集为 194 个蛋白质的 439 个棕榈酰化修饰位点。此外,还有 Deng 课题组提出的基于氨基酸对组成(κ -Spaced amino acid pairs, CKSAAP)代表序列片段的预测模型 CKSAAP-Palm^[12](<http://www.aporc.org/doc/wiki/CKSAAP-Palm>)和基于位置权重矩阵(Position weight matrix, PWM)的算法并借助支持向量机(Support vector machine, SVM)作为分类器的预测模型 PPWMs^[13]。

3 质谱法直接检测蛋白质的棕榈酰化修饰位点和脂质基团

质谱分析具有灵敏度高、样品用量少等优点,能准确分析连接到酰化修饰蛋白质甚至是单一酰化修饰位点上的脂肪酸种类。一般是通过层析或免疫沉淀等方法获得目标蛋白质,根据序列的特性选择合适的酶进行蛋白质酶解后,然后比较羟胺处理前后相应酶解肽段的质量会发生变化,从而可通过质谱方法鉴定该酰化修饰基团的分子特性^[14]。Hemagglutinin(HA)是一个主要的包膜糖蛋白调节病毒和细胞膜融合,通过含有一个跨膜域和一个胞质尾的轻 HA₂ 链锚定在病毒包膜上,C 末端区域的 3 个 Cys 残基(一个在跨膜域,两个在胞质尾)是高度保守,且在所有 HA 亚型中都可能棕榈酰化。Kordyukova 等^[15]用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)分析流感病毒蛋白 HA 上脂肪酸的类型时发现,具有两个胞质 Cys 的 Influenza B virus HA 含有棕榈酰化修饰,具有一个跨膜 Cys 的 Influenza C virus HA 发生了硬脂酸酰化修饰,而有一个跨膜和两个胞质 Cys 的 Influenza A virus HA 则同时包含棕榈酸盐和硬脂酸酰化修饰。Serebryakova 等^[16]用 MALDI-TOF MS 分析 A/X-31(H3 subtype),A/Puerto Rico/8/34(H1 subtype)和 A/FPV/Weybridge/34(H7 subtype)病毒中 C-末端 HA₂ 肽段时,发现这些肽段不仅能被棕榈酸盐修饰,还能被硬脂酸修饰,且 3 株病毒中棕榈酸/硬脂酸的比例不同,其中 A/FPV/Weybridge/34 病毒株优先结合硬脂酸。Ozols 等^[17]用溴化氰裂解、Trysin 和 Lys-C 酶解纯化的含 [³H]-palmitate 标记的 α -Tubulin 后进行质谱分析发现,与 C20, C213 和 C305 相比, C376 是主要的棕榈酰化修饰位点。Bizzozero 等^[18]发现棕榈酰化是天然髓鞘蛋白脂质蛋白(PLP)的主要翻译后修饰类型,且在中枢神经系统中大多数的 PLP 和 DM-20 是完全酰化的。

气相色谱-质谱联用(GC-MS)被广泛用于复杂组分的分离与鉴定,其具有 GC 的高分辨率和 MS 的高灵敏度,适于低分子化合物尤其是挥发性成分的分析。Sorek 等用 GC-MS 分析了蛋白质 AtROP6^[19]和 CBL1^[20]上的脂质基团;在氧化铂(IV)存在下,通过氢化反应将 S-棕榈酰化修饰蛋白质的硫酯键打断,释放蛋白质上的脂肪酸基团并用纯甲酸和乙醇产生乙基酯化后,用 GC-MS 分析了蛋白质的 S-棕榈酰化修饰,该法能分析低至 1 μ g 的纯化蛋白质,并可实现 S-棕榈酰化水平的相对定量^[21],他们认为,通过氢化反应并结合乙基酯化可得到极性基团的脂肪酸,提高 GC 的分离和鉴定。体外转移甲基和稳定同位素标记法(iFAT)结合 GC-MS 方法可定量比较不同细胞状态下的酰基修饰^[22],iFAT 法适于处理疏水性的膜蛋白质,通过数据库检索和标准脂肪酸甲酯的色谱保留时间可实现酰基的鉴定,稳定同位素标记可用作内标准比较不同细胞状态下酰基修饰。

但许多棕榈酰化修饰的蛋白质是膜蛋白,疏水性较强,不容易得到纯化的蛋白质样品,这在一定程度上限制该方法的应用。

4 以“棕榈酸盐为中心”的分析方法

4.1 放射性棕榈酸盐代谢标记法

最经典的方法是用放射性棕榈酸盐(例如, ^3H -palmitate 和 ^{125}I -palmitate) 代谢标记培养细胞, 通过放射自显影检测同位素标记的程度, 检测棕榈酰化修饰的蛋白质, 其中, ^3H -palmitate 是使用最广泛的放射性标记棕榈酸盐^[23]。但该方法操作繁琐、需很长的曝光时间; 使用较高浓度的放射性同位素, 有害且处理费用高; 只能用于检测活细胞中的棕榈酰化修饰蛋白质; 产生的信号弱, 灵敏度不高, 不能检测丰度较低的棕榈酰化修饰蛋白质; 无法提供棕榈酰化修饰的化学计量信息, 且缺乏直接富集和鉴定放射性标记蛋白质的方法。

4.2 棕榈酸脂类似物代谢标记法

叠氮或炔基脂肪酸探针非常灵敏, 为快速检测和富集细胞脂质修饰蛋白质提供了机会。由于含叠氮或炔基的棕榈酸类似物从结构和功能上来说都与它们的天然产物相似, 因此能通过代谢通路进入到细胞蛋白质中。将含叠氮或炔基的棕榈酸类似物代谢进入细胞蛋白质, 然后通过化学选择性链接如施陶丁格连接^[24]或点击化学^[25]方法, 选择性地将带叠氮或炔基基团的蛋白质连接到生物素或荧光基团上, 从而富集或检测棕榈酰化修饰的蛋白质。与放射性棕榈酸盐代谢标记方法相比, 该法不使用放射性同位素, 检测时间较短, 荧光基团的使用大大提高了方法的灵敏度, 可通过亲和纯化富集或利用荧光探针观察棕榈酰化修饰蛋白质。

4.2.1 以叠氮基团为化学报告基团的方法 有机叠氮是具有高反应活性的功能基团, 易被修饰但在细胞环境中具有代谢惰性。因此, Hang 等^[26]合成了包括 12, 14, 15 和 16 个碳的一系列 ω -叠氮脂肪酸类似物作为非放射性探针, 这些探针能被有效地代谢进入哺乳动物细胞中, 然后利用施陶丁格连接将目标蛋白质结合到生物素化的膜捕获试剂上, 最后用链霉亲和素连接的辣根过氧化物酶检测或是借助于链霉亲和素连接的珠子进行分离, 可用于快速检测哺乳动物细胞中的脂肪酸酰化修饰。他们的研究表明, ω -叠氮脂肪酸能被细胞有效摄入, 且 ω -Azido C-12 (Az-C12) 可选择性地代谢进入 N -豆蔻酰化修饰的蛋白质, 而长链的叠氮脂肪酸如 Az-C15 则主要标记 S -棕榈酰化修饰的蛋白质。Kostiuk 等^[27]以 Az-C14-CoA 为探针, 利用质谱方法从大鼠肝脏线粒体中鉴定了 21 个棕榈酰化修饰的蛋白质如 HMGCS 等。Ching 等^[28]借助叠氮棕榈酸盐研究发现, 与 Wnt 蛋白家族的其它成员不同, WntD 不发生脂质修饰。Martin 等^[29]也用 ω -叠氮脂肪酸类似物生物正交法研究了蛋白质的酰化修饰状态。该法与氘化脂肪酸代谢标记方法相比, 灵敏度甚至可提高 6 个数量级。

4.2.2 以炔基为化学报告基团的方法 虽然叠氮基脂肪酸类似物在检测蛋白质脂肪酸酰化修饰方面取得了很大的进展, 但添加一个叠氮基团到脂肪酸链上, 可能会干扰脂肪酸的疏水性及其进入脂质膜结构的机制。而炔基可保留脂肪酸碳链的疏水性, 减少脂肪酸物理化学性质的变化及其与脂质间的相互作用, 且具有代谢惰性(图 2)。另外, 通过点击化学捕获比施陶丁格连接的效率要高, 因此炔基探针通常要优于叠氮修饰的探针, 具有更高的灵敏度和检测效率^[30]。利用基团荧光检测方法可提供研究动态复杂的生物过程的手段^[31], 定量荧光显微镜方法能用来研究活细胞内 GFP-tagged 棕榈酰化蛋白质的胞内定位和运输^[32, 33]。因此, Hannoush 等^[34]将一系列不同碳链长度的 ω -炔基脂肪酸加到哺乳动物细胞系中, 通过加成反应将目标蛋白质连接到带叠氮基团的生物素或荧光基团上, 然后利用链霉亲和素和素连接的辣根过氧化物酶进行免疫印迹分析, 并

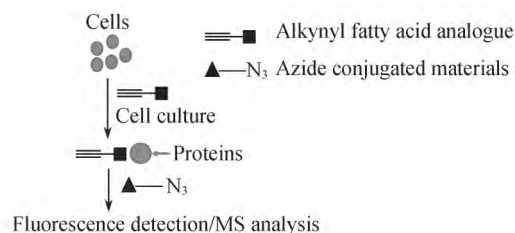


图 2 炔基棕榈酸脂类似物代谢标记法的实验流程图

Fig. 2 Diagrammatic sketch of palmitoylated proteins/peptides labelling with alkynyl fatty acid analogue

将炔基棕榈酸脂类似物代谢标记进入细胞中, 然后加入叠氮基团的试剂进行荧光检测或者分离纯化, 再进行质谱分析鉴定蛋白质的修饰位点。

Alkynyl fatty acid analogue was incorporated into endogenous sites of palmitoylation via metabolic labelling during cell culture. After sufficient labelling, the cells were lysed, coupled with azide-conjugated materials by click chemistry and then detected by fluorescence detecting or LC-MS analysis.

通过高分辨的共聚焦显微镜分析了含 ω -酰基脂肪酸蛋白质的亚细胞分布以及脂质修饰蛋白质在细胞分化不同阶段的分布情况。Zhang等^[35]利用串联标记和检测的方法同时监控动态的S-棕榈酰化修饰和蛋白质的更新,他们同时用两种不同的化学报告基团进行代谢标记,一种用于检测动态的S-棕榈酰化修饰,另一个则用来监控蛋白质的周转率,随后用正交荧光标签依次地进行点击化学反应,从而有效地分析细胞中棕榈酸盐的循环周期。他们也发现,较短的脂肪酸类似物(az-12和alk-12)优先标记N-myristoylated蛋白质,而较长的脂肪酸衍生物(az-15和alk-16)则会进入S-棕榈酰化修饰的蛋白质中^[36]。Yount等^[37]用alk-16^[38]为化学报告基团,分析了鼠树突状细胞系中棕榈酰化修饰蛋白质组,共鉴定到157个具有不同细胞功能的脂质修饰蛋白质(其中60个和97个被分别为高可信度和中可信度),他们的研究发现,IFITM3的抗病毒活性受到S-棕榈酰化修饰的调控。Yap等^[39]将 ω -酰基棕榈酸盐类似物代谢进入GAPDH或线粒体3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA合成酶,通过点击化学与叠氮的生物素探针或荧光探针3-azido-7-hydroxycoumarin反应快速检测棕榈酰化修饰。Martin等^[40]用商品化的17-Octadecynoic acid(17-ODYA)作为生物正交、点击化学探针进行原位标记,从永生的Jurkat T细胞中共鉴定了125个高可信度和大约200个中间可信度的棕榈酰化修饰蛋白质,包括G蛋白、受体和一些质膜定位依赖于棕榈酰化修饰的水解酶等。这是首个哺乳动物细胞棕榈酰化蛋白质组的分析。随后,又将17-ODYA代谢标记和SILAC(Stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture)法相结合,在小鼠T-细胞杂交瘤细胞中定性和定量了400多个棕榈酰化修饰蛋白质,并用17-ODYA代谢脉冲追踪标记方法分辨稳定的和更新较快的棕榈酰化修饰蛋白质^[41]。

综上,虽然“以棕榈酸盐为中心”方法有其优点,但也存在不足之处:需将放射性或化学修饰的棕榈酸脂类似物代谢标记到细胞内,故不能分析组织样品和体液,且较难用于癌细胞,因为癌细胞中脂肪酸合成酶的过度表达和过度活跃会极大地降低外源性长链脂肪酸的摄入^[42];与相对稳定的棕榈酰化修饰蛋白质相比,该法可能会更加偏向棕榈酸盐更新较快的蛋白质;只能分析特定的S-酰化修饰,若引入棕榈酸脂类似物,则只能分析棕榈酰化修饰,不能分析其它更短、更长或不饱和脂肪酸修饰的蛋白质;来自于天然脂肪酸和放射性标记的脂肪酸类似物之间的结构差异带来的生理影响还不清楚,真核细胞中代谢途径非常复杂,棕榈酸脂类似物可能会以不同的代谢途径进入,导致无法预测的生物学效应。

5 “以半胱氨酸为中心”的方法

以半胱氨酸为中心”的方法如图3所示。酰基-生物素置换法(Acyl-biotinyl exchange, ABE)由Drisdell等于2004年提出^[43]:先用碘乙酰胺或N-乙基顺丁烯二酰亚胺(NEM)完全封闭蛋白质Cys上所有自由巯基后,利用羟胺(HA)选择性地切开蛋白质Cys和脂肪酸修饰基团之间的硫酯键,产生新的自由巯基,再用合适的试剂如放射性标记的NEM使酰化修饰蛋白质在凝胶电泳分离后显影,或印迹后用荧光方法分析,或用具有巯基特异反应活性的试剂,如Biotin-conjugated 1-biotinamido-4-[4'-(maleimido-methyl)cyclohexanecarboxamido]butane(Btn-BMCC)^[44]或biotin-HPDP(N-[6-(biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide)^[45]等反应,将它转化成二硫键连接的生物素,再利用avidin/streptavidin和biotin间的相互作用纯化、检测S-棕榈酰化修饰蛋白质。Wan等^[46]以biotin-HPDP为生物素化试剂进行分离纯化,并用质谱方法鉴定了酵母中50个棕榈酰化修饰的蛋白质,包括SNARE蛋白家族、氨基酸通透酶和信号蛋白等。由于S-棕榈酰化修饰对HA水解敏感,棕榈酰化修饰蛋白质会在HA处理的样品中质谱信号强度相对较高,而非特异性吸附的蛋白在HA处理前后(-HA或+HA)的样品中信号强度几乎相等,因此,他们通过定量比较-HA或+HA样品中鉴定蛋白质的质谱谱图计数(Spectral count),从而分辨真假棕榈酰化修饰蛋白质。Zhao等^[47]也以Biotin-HPDP为生物素化试剂,纯化、富集tubulin的棕榈酰化修饰肽段,通过LC-MS/MS分析得到 α/β -Tubulin异源二聚体上有11个半胱氨酸发生了棕榈酰化修饰,他们也是通过spectral count方法分辨非特异吸附蛋白质的。Hemsley等^[48]也分析发现植物中的 α -Tubulin和AGG2发生了棕榈酰化修饰。Kang等^[49]用ABE法分析了大鼠神经的棕榈酰化修饰蛋白质组,鉴定出68个已知的棕榈酰化修饰蛋白质和200多个新的棕榈酰化修饰蛋白质,包括跨膜蛋白质和亲水性的蛋白质,如神经递质受体、黏附分子和支架蛋白等。Yang等^[50]采用棕榈酰化

蛋白质鉴定和位点识别(PalmPISC)方法结合质谱 Spectral count 定量方法,富集并鉴定了脂筏和非筏结构膜组分中 67 个已知的和 331 个新的候选 *S*-棕榈酰化修饰蛋白质,包括 25 个已知和 143 个新的候选 *S*-棕榈酰化修饰位点。Emmer 等^[51]用 ABE 法共鉴定到布氏锥虫(*T. Brucei*)中 124 个棕榈酰化修饰蛋白质。在分辨真假棕榈酰化修饰蛋白质/肽段时,除了可通过非标记定量的方法比较 + / - HA 样品质谱信号外,而且同位素标记质谱定量方法由于同位素标签的存在,可将标记后的样品混合同时测定,不但可以减少样品分析时间,而且可以获得重现性较好的数据,因此,在蛋白质组学研究中应用越来越广泛。Zhang 等^[52]利用 ICAT(Isotope-coded affinity tag)试剂定量分析 ZDHHC2 基因敲除前后 HeLa 细胞中 *S*-棕榈酰化修饰差异谱,共鉴定了 50 个蛋白质中的 57 个位点,发现 CKAP4/p63 是 DHHC2 重要的底物。Forrester 等^[53]用 methyl methanethiosulfonate 封闭自由巯基、羟胺水解切除硫酯键后,用修饰了丙基硫氧嘧啶的树脂富集 *S*-棕榈酰化修饰的肽段,然后用 iTRAQ(Isobaric tags for relative and absolute quantitation)方法定量比较 + / - HA 处理样品中的肽段丰度,识别 *S*-棕榈酰化修饰肽段与“污染”肽段,共鉴定到了 HEK293 细胞中 88 个肽段上 93 个可能的 *S*-棕榈酰化修饰位点。

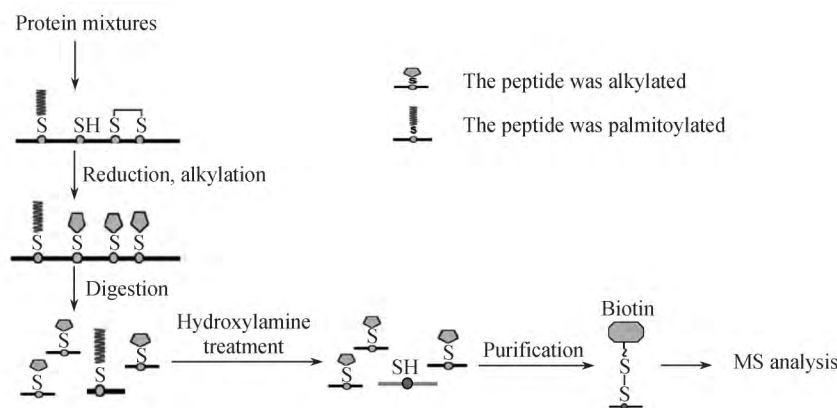


图 3 “以半胱氨酸为中心”的分析流程的示意图

Fig. 3 Diagrammatic sketch of “cysteine-centric” approach

还原、烷基化以打开并封闭蛋白质中 Cys 上原有的巯基,将蛋白质酶解成肽段,利用羟胺选择性地切开 Cys 和棕榈酰化修饰基团之间的硫酯键,产生新的自由巯基,最后利用具有巯基特异反应活性的试剂进行纯化、检测棕榈酰化修饰蛋白质。

Disulfide bonds of proteins were reduced firstly, and free cysteine residues were alkylated. After proteins were digested into peptides, the sample was treated with hydroxylamine to selectively cleave thioesters. The newly exposed cysteine residues were disulfide-bonded to affinity beads and were purified. The eluate was then analyzed by LC-MS.

ABE 法的优点是不需代谢标记,可分析细胞(包括癌细胞)、组织和体液样品,尽管在检测棕榈酰化修饰蛋白质方面有了很大的进展,但也有如下的局限性:(1) 假阳性率相对较高:该法是硫酯键特异的方法而不是 *S*-棕榈酰化修饰特异的方法,外源性的羟胺水解敏感的硫酯键蛋白质都可能被同时富集而造成假阳性。实际操作时,首先要确保蛋白质中原先存在的自由巯基完全封闭,需严格控制自由巯基封闭试剂的种类、用量和孵育时间等;需控制反应时间、羟胺的浓度和溶液的 pH 值,保证羟胺完全切除棕榈酰化修饰基团;去除棕榈酰化修饰基团后,应完全标记新产生的自由巯基;用链霉亲和素磁珠富集时,也可能会将体内生物素化修饰蛋白质富集而造成固有背景,以上这些因素会导致近三分之一的鉴定蛋白质为假阳性结果^[8,54]。与 ABE 方法相比,点击化学具有明显较低的假阳性率^[55]。因此,为减少假阳性结果,一般需进行对照实验。(2) 该法为间接检测和纯化方法,用该法得到的蛋白质可能是棕榈酸修饰的蛋白质,也可能是对羟胺水解敏感的其它脂肪酸修饰的蛋白质,若需准确鉴定连接到蛋白质上的脂质类型,则需采用 GC-MS 进一步分析。

6 展 望

由于缺乏明确的蛋白质棕榈酰化修饰位点,极大地阻碍了棕榈酰化修饰蛋白质功能的研究。尽管

近年来已受到越来越多的重视,并取得了较大的进展,尤其是 ABE 法和棕榈酸盐类似物代谢标记方法的发展,使越来越多的棕榈酰化修饰位点得到了鉴定,但目前关于棕榈酰化修饰蛋白质组研究的报道主要集中于位点的鉴定,即定性研究,且现有方法也都各有其不足之处。因此,仍需致力于棕榈酰化修饰蛋白质定性及定量分析,发展更有效及准确特异的研究方法,比如,由于棕榈酰化修饰蛋白质为细胞膜蛋白或者是与膜相关的蛋白质,疏水性强,因此可结合细胞膜蛋白质组学方法,增加膜蛋白的溶解性;现有分析方法操作步骤多,易造成样品损失尤其是低丰度蛋白质的损失,且鉴定结果的假阳性率高,因此可适当简化操作流程,选用合适的去垢剂,采用选择性好、富集效率高的新型富集载体,甚至是选用能同时满足富集和定量分析要求的富集材料,并建立相应的分析方法;发展灵敏度高、选择性好的荧光检测试剂;发展一些代谢效率更高的脂肪酸类似物等,从而提高样品分析的重复性、灵敏度和定量的准确性,以获得更多可靠的棕榈酰化修饰蛋白质及其位点的信息,甚至与活细胞成像等方法相结合,从而有助于进一步揭示动态 S-棕榈酰化修饰的生物重要性和功能。

References

- 1 Fukata Y, Fukata M. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2010**, 11(3): 161–175
- 2 Stoeck A, Shang L, Dempsey P J. *J. Cell Sci.*, **2010**, 123(Pt 13): 2319–2331
- 3 Abrami L, Leppla S H, van der Goot F G. *J. Cell Biol.*, **2006**, 172(2): 309–320
- 4 Maria P P, Aldo A V, Vanesa M T, Rafael G O, Guillermo A G, Jose L D. *PLOS ONE*, **2013**, 8(10): e75232
- 5 DeJesus G, Bizzozero O A. *Neurochem. Res.*, **2002**, 27(12): 1669–1675
- 6 Zeidman R, Jackson C S, Magee A I. *Mol. Membr. Biol.*, **2009**, 26(1): 32–41
- 7 Smotrys J E, Linder M E. *Annu. Rev. Biochem.*, **2004**, 73: 559–587
- 8 Roth A F, Wan J, Bailey A O, Sun B, Kuchar J A, Green W N, Phinney B S, Yates JR 3rd, Davis N G. *Cell*, **2006**, 125(5): 1003–1013
- 9 Zhou F, Xue Y, Yao X, Xu Y. *Bioinformatics*, **2006**, 22(7): 894–896
- 10 Ren J, Wen L, Gao X, Jin C, Xue Y, Yao X. *Protein Eng. Des. Sel.*, **2008**, 21(11): 639–644
- 11 Xue Y, Chen H, Jin C, Sun Z, Yao X. *BMC Bioinformatics*, **2006**, 7: 458
- 12 Wang X B, Wu L Y, Wang Y C, Deng N Y. *Protein Eng. Des. Sel.*, **2009**, 22(11): 707–712
- 13 Li Y X, Shao Y H, Deng N Y. *Protein Peptide Lett.*, **2011**, 18(2): 186–193
- 14 Liang X, Lu Y, Neubert T A, Resh M D. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277(36): 33032–33040
- 15 Kordyukova L V, Serebryakova M V, Baratova L A, Veit M. *J. Virol.*, **2008**, 82(18): 9288–9292
- 16 Serebryakova M V, Kordyukova L V, Baratova L A, Markushin S G. *Eur. J. Mass Spectrom.*, **2006**, 12(1): 51–62
- 17 Ozols J, Caron J M. *Mol. Biol. Cell*, **1997**, 8(4): 637–645
- 18 Bizzozero O A, Malkoski S P, Mobarak C, Bixler H A, Evans J E. *J. Neurochem.*, **2002**, 81(3): 636–645
- 19 Sorek N, Poraty L, Sternberg H, Bar E, Lewinsohn E, Yalovsky S. *Mol. Cell Biol.*, **2007**, 27(6): 2144–2154
- 20 Batistic O, Sorek N, Schultke S, Yalovsky S, Kudla J. *Plant Cell*, **2008**, 20(5): 1346–1362
- 21 Sorek N, Yalovsky S. *Nat. Protoc.*, **2010**, 5(5): 842–848
- 22 Li J, Yue Y, Hu X, Zhong H. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(12): 5080–5087
- 23 Resh M D. *Methods*, **2006**, 40(2): 191–197
- 24 Saxon E, Bertozzi C R. *Science*, **2000**, 287(5460): 2007–2010
- 25 Kolb H C, Finn M G, Sharpless K B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2001**, 40(11): 2004–2021
- 26 Hang H C, Geutjes E J, Grotenbreg G, Pollington A M, Bijlmakers M J, Ploegh H L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129(10): 2744–2745
- 27 Kostiuk M A, Corvi M M, Keller B O, Plummer G, Prescher J A, Hangauer M J, Bertozzi C R, Rajaiah G, Falck J R, Berthiaume L G. *FASEB J.*, **2008**, 22(3): 721–732
- 28 Ching W, Hang H C, Nusse R. *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283(25): 17092–17098
- 29 Martin D D, Vilas G L, Prescher J A, Rajaiah G, Falck J R, Bertozzi C R, Berthiaume L G. *FASEB J.*, **2008**, 22(3): 797–806
- 30 Agard N J, Baskin J M, Prescher J A, Lo A, Bertozzi C R. *ACS Chem. Biol.*, **2006**, 1(10): 644–648

- 31 Mikic I , Planey S , Zhang J , Ceballos C , Seron T , von Massenbach B , Watson R , Callaway S , McDonough P M , Price J H , Hunter E , Zacharias D. *Methods Enzymol.* , **2006** , 414: 150 – 187
- 32 Kenworthy A K. *Methods* , **2006** , 40(2) : 198 – 205
- 33 Kanaani J , Patterson G , Schaufele F , Lippincott-Schwartz J , Baekkeskov S. *J. Cell Sci.* , **2008** , 121(Pt 4) : 437 – 449
- 34 Hannoush R N , Arenas-Ramirez N. *ACS Chem. Biol.* , **2009** , 4(7) : 581 – 587
- 35 Zhang M M , Tsou L K , Charron G , Raghavan A S , Hang H C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **2010** , 107(19) : 8627 – 8632
- 36 Charron G , Wilson J , Hang H C. *Curr. Opin. Chem. Biol.* , **2009** , 13(4) : 382 – 391
- 37 Yount J S , Moltedo B , Yang Y Y , Charron G , López C B , Hang H C. *Nat. Chem. Biol.* , **2010** , 6(8) : 610 – 614
- 38 Charron G , Zhang M M , Yount J S , Wilson J , Raghavan A S , Shamir E , Hang H C. *J. Am. Chem. Soc.* , **2009** , 131(13) : 4967 – 4975
- 39 Yap M C , Kostiuk M A , Martin D D , Perinpanayagam M A , Hak P G , Siddam A , Majjigapu J R , Rajaiah G , Keller B O , Prescher J A , Wu P , Bertozzi C R , Falck J R , Berthiaume L G. *J. Lipid Res.* , **2010** , 51(6) : 1566 – 1580
- 40 Martin B R , Cravatt B F. *Nat. Methods* , **2009** , 6(2) : 135 – 138
- 41 Martin B R , Wang C , Adibekian A , Tully S E , Cravatt B F. *Nat. Methods* , **2012** , 9(1) : 84 – 89
- 42 Menendez J A , Colomer R , Lupu R. *Med. Hypotheses* , **2005** , 64(2) : 342 – 349
- 43 Drisdell R C , Green W N. *Biotechniques* , **2004** , 36(2) : 276 – 285
- 44 Drisdell R C , Manzana E , Green W N. *J. Neurosci.* , **2004** , 24(46) : 10502 – 10510
- 45 Drisdell R C , Alexander J K , Sayeed A , Green W N. *Methods* , **2006** , 40(2) : 127 – 134
- 46 Wan J , Roth A F , Bailey A O , Davis N G. *Nat. Protoc.* , **2007** , 2(7) : 1573 – 1584
- 47 Zhao Z , Hou J , Xie Z , Deng J , Wang X , Chen D , Yang F , Gong W. *Protein J.* , **2010** , 29(8) : 531 – 537
- 48 Hemsley P A , Taylor L , Grierson C S. *Plant Methods* , **2008** , 4: 2
- 49 Kang R , Wan J , Arstikaitis P , Takahashi H , Huang K , Bailey A O , Thompson J X , Roth A F , Drisdell R C , Mastro R , Green W N , Yates JR 3rd , Davis N G , El-Husseini A. *Nature* , **2008** , 456(7224) : 904 – 909
- 50 Yang W , Di Vizio D , Kirchner M , Steen H , Freeman M R. *Mol. Cell. Proteomics* , **2010** , 9(1) : 54 – 70
- 51 Emmer B T , Nakayasu E S , Souther C , Choi H , Sobreira T J , Epting C L , Nesvizhskii A I , Almeida I C , Engman D M. *Eukaryot. Cell* , **2011** , 10(3) : 455 – 463
- 52 Zhang J , Planey S L , Ceballos C , Stevens S M Jr , Keay S K , Zacharias D A. *Mol. Cell. Proteomics* , **2008** , 7(7) : 1378 – 1388
- 53 Forrester M T , Hess D T , Thompson J W , Hultman R , Moseley M A , Stamler J S , Casey P J. *J. Lipid Res.* , **2011** , 52(2) : 393 – 398
- 54 Roth A F , Wan J , Green W N , Yates J R , Davis N G. *Methods* , **2006** , 40(2) : 135 – 142

Progress in Research Methods for Protein Palmitoylation

FANG Cai-Yun , ZHANG Xiao-Qin , LU Hao-Jie*

(Department of Chemistry and Institutes of Biomedical Sciences , Fudan University , Shanghai 200433 , China)

Abstract Protein palmitoylation , as one of the most important lipid post-translational modifications , plays a key significant role in different cellular functions such as signal transduction , metabolism , apoptosis , and so on. Disorders of protein palmitoylation will lead to many human diseases , including cancer. Therefore , qualitative and quantitative analysis of protein palmitoylation is very important for underlying its biological functions. Here , the progress of technologies and methods for palmitoylation in recent years were reviewed. Their advantages/disadvantages and future trend were also discussed.

Keywords Palmitoylation; Mass spectrometry; Proteomics; Review

(Received 10 August 2013; accepted 16 December 2013)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21205018 , 21025519) and Shanghai Pujiang Program (No. 13PJJD003)