4-羟基壬烯醛修饰蛋白质组富集方法进展

袁文娟, 张斯文, 张莹, 陆豪杰*

复旦大学化学系和生物医学研究院, 上海 200032

* 联系人, E-mail: luhaojie@fudan.edu.cn

收稿日期: 2017-07-16; 接受日期: 2017-09-17; 网络版发表日期: 2017-12-25

国家重点研发计划(批准号: 2016YFA0501303)和国家自然科学基金(批准号: 21335002)资助

摘要 4-羟基壬烯醛(HNE)修饰是一种重要的翻译后修饰, 具有很重要的生物学意义和临床意义. 由于HNE修饰蛋白质在生物体内丰度普遍较低, 在质谱分析前要先进行富集. 本文介绍了目前富集HNE修饰蛋白质组的研究现状及其相关原理(主要富集方法: 免疫亲和法、凝集素-亲和素富集法、氟固相萃取法和固相脲化学法), 并总结了它们的优缺点; 在此基础上, 探讨了研究HNE修饰蛋白质组未来的研究方向.

关键词 蛋白质组学, 富集, 质谱, HNE修饰蛋白质

4-羟基壬烯醛(4-hydroxynonenal, HNE)是由多不饱和脂肪酸脂质过氧化产生的. 生物体内的蛋白质是HNE主要作用对象^[1], HNE与蛋白质结合后能改变蛋白质的结构和功能^[2], 并能与蛋白质上多种氨基酸残基的侧链发生迈克尔加成(Michael addition)反应, 包括半胱氨酸(Cys)、组氨酸(His)、赖氨酸(Lys)和精氨酸(Arg)^[3]. 这些加合物的形成会对细胞病理学、生理学过程产生影响, 例如, 抑制酶活性, 抑制蛋白质、RNA和DNA的形成, 诱导细胞凋亡等^[4]. HNE修饰蛋白质与多种疾病的发生相关, 如动脉粥样硬化、缺血再灌注损伤、帕金森氏综合征和阿尔兹海默病^[5,6], 另外, 它也可作为炎症的生物标志物^[7].

质谱技术是检测HNE修饰蛋白质常用的方法之一, 但是目前报道的关于该修饰蛋白质和修饰位点数目仍然非常有限. 主要是由于内源性的HNE修饰蛋白质丰度较低, 缺少高效的富集方法. 根据与HNE修饰蛋白质结合原理而发展的富集方法主要有亲和法(免

疫亲和法、生物素-亲和素富集法和氟固相萃取法)和固相脲化学法.

1 亲和法

1.1 免疫亲和法

免疫亲和法是基于抗原与抗体之间的相互作用, 使用其中一者亲和吸附另一者的分离方法. 这种方法被广泛应用到富集HNE修饰蛋白质中. 2002年, Fenaille等人^[8]采用2,4-二硝基苯肼(2,4-dinitrophenyl hydrazine, DNPH)作为衍生试剂, 利用它的肼基基团与HNE修饰肽段上的醛基发生腙反应, 从而使HNE修饰肽段与DNPH以共价键结合^[9], 再利用有特异性识别DNPH抗体的琼脂糖珠免疫吸附DNPH衍生的修饰肽段, 最终实现富集的目的. 由于该方法利用DNPH的肼基与醛基反应, 所以不但能富集HNE修饰肽段, 还可以富集到同样含有醛基的丙二醛修饰肽段.

引用格式: 袁文娟, 张斯文, 张莹, 等. 4-羟基壬烯醛修饰蛋白质组富集方法进展. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 134–139

Yuan W J, Zhang S W, Zhang Y, et al. Advancement in enrichment methods for 4-Hydroxynonenal modified proteome (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 134–139, doi: [10.1360/N052017-00156](https://doi.org/10.1360/N052017-00156)

另外一种免疫亲和法是直接基于HNE抗体来免疫吸附HNE修饰肽段, Bautista研究组^[10]发展了抗体亲和和柱法, 将HNE抗体通过蛋白质A/G琼脂糖珠固定上Spin Nab柱上, 酶解后的HNE修饰牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)通过亲和柱, 经过清洗、洗脱和质谱分析, 对HNE修饰肽段可实现较高的检测灵敏度. 该方法随后被应用在人体红细胞HNE修饰的膜蛋白质富集中, 并在生理条件的膜收缩蛋白质(β -spectrin)中发现了含HNE-lys和HNE-his的修饰肽段.

1.2 生物素-亲和素富集法

20世纪中期, 生物素(biotin)和亲和素(avidin)被学者发现, 它们之间的结合属于强非共价相互作用, 具有较高特异性、稳定性和灵敏度的特点^[11]. 该方法的缺点是由于biotin的存在而使肽段的离子化效率较低, 质谱串联谱图的解析变得相对复杂^[12]. 以biotin与avidin相互作用为基础的富集方法是富集HNE修饰蛋白质/肽段最为广泛的方法之一. 含酰肼官能团的biotin (酰肼-biotin)通过酰肼与醛的腙反应从而使HNE修饰蛋白质/肽段衍生上biotin富集标签(图1). 在进行质谱分析前通过biotin与avidin的相互作用达到富集HNE修饰蛋白质/肽段的目的, 用该富集方法已在肥胖小鼠(*Mus musculus*)脂肪组织中成功鉴定到64个羰基化修饰肽段, 对应37个蛋白质, 包含与胰岛素抵抗(insulin-

resistant)相关的HNE修饰蛋白质^[13].

由于酰肼-biotin与HNE修饰蛋白质/肽段上醛基反应形成的腙键是可逆键^[14], 在一定的条件下(如长期处于低pH环境)可能发生解离, 尤其在HPLC预分离采用的酸性环境中时. 因此有研究试图通过还原反应使腙键转变为更稳定的肼键^[15]来提高富集效率. 例如, 在HNE刺激过的人结肠癌细胞RKO中, HNE修饰蛋白质首先通过腙键衍生上酰肼-biotin, 形成腙键后继续用 $\text{NaBH}_4/\text{NaBH}_3\text{CN}$ 还原使该键转变成更稳定的肼键(图2). 最后利用biotin与avidin相互作用富集得到HNE修饰蛋白质; 用1D-SDS PAGE分离富集到的蛋白质, 酶解后用LC-ESI-MS/MS分析, 成功鉴定到417个HNE修饰蛋白质^[16].

另外一种提高衍生物稳定性的方法是通过点击化学反应衍生上biotin富集标签, 即含羟胺官能团的biotin (羟胺-biotin)和HNE修饰蛋白质/肽段上的醛基反应形成肼键^[17], 如图3, 该方法省去了稳定腙键的步骤, 在质谱分析前无需除盐, 减少了样品的损失; Maier研究组^[18]采用该方法在大鼠(*Rattus norvegicus*)心脏线粒体中成功鉴定到49个HNE修饰肽段, 对应27个蛋白质.

由于酰肼/羟胺官能团能和大部分的醛基/羰基反应, 因此酰肼-biotin和羟胺-biotin除了富集HNE修饰蛋白质/肽段外, 还能富集到其他醛基/羰基修饰蛋白质/肽段, 例如, 羟胺-biotin可用于4-羰基壬烯醛修饰蛋白质的富集和鉴定^[18], 酰肼-biotin适用于丙二醛修饰蛋白质的富集^[19].

此外, 由于叠氮-HNE (Azido-HNE), 炔炔-HNE (Alkynyl-HNE)与HNE具有相似的细胞毒性和激发基因表达的能力^[20], 所以另外一种通过biotin-avidin富集的方法是用^[20-22]HNE相似物代替HNE, 即在HNE末端碳上修饰上叠氮基团或者在 ω 位置上用一个炔炔基团取代. Biotin与叠氮/炔炔-HNE修饰蛋白质/肽段的反应是基于叠氮与炔炔的点击化学反应, 即1,3-偶极环加成反应(图4). 值得注意的是采用该方法不但可以检

图1 酰肼-biotin衍生HNE修饰肽段的示意图^[13]

图2 腙键被还原成肼键的示意图^[16]

图3 羟胺-biotin衍生HNE修饰肽段的示意图^[17]

测到Michael addition形式存在的叠氮/炔烃-HNE修饰蛋白质/肽段, 还可以检测到以Schiff base形式存在的修饰蛋白质/肽段. 该富集方法被应用到叠氮-HNE刺激过的人结肠癌RKO细胞研究中, 已成功鉴定到大约120个HNE修饰蛋白质; 在炔烃-HNE刺激过的人结肠癌RKO细胞中鉴定到600个修饰蛋白质^[20], 在健康人血浆中鉴定到53个炔烃-HNE修饰肽段, 对应14个蛋白质^[21].

1.3 氟固相萃取法

“氟蛋白质组学”方法是基于氟试剂衍生和氟固相萃取法(fluorous solid phase extraction, FSPE)结合的方法富集目标肽段^[12], FSPE的分离主要基于含氟试剂与氟固相之间的亲和作用. Lu研究组^[23]利用氟试剂衍生和FSPE结合的方法成功富集HNE修饰肽段. 在富集过程中, HNE修饰肽段通过醛基与羟胺功能化的C₆F₁₃发生羟胺点击化学反应如图5所示. 随后, 氟试剂衍生的HNE修饰肽段特异性地结合在商品化的氟固相萃取小柱上. 用清洗溶液清洗之后, 未被氟试剂衍生的杂

质被清洗掉, 而被衍生的HNE修饰肽段仍留在氟固相萃取小柱里. 最后, 经过洗脱溶液的洗脱, 被捕捉到的氟试剂衍生的修饰肽段被洗脱下来进行质谱分析. 在HNE修饰的MCF-7蛋白质中鉴定到661个HNE修饰肽段含673个HNE修饰位点, 对应432个蛋白质. 这也是目前在MCF-7细胞中检测到的关于HNE修饰的最大数据规模.

该方法的主要优点是氟试剂能提高HNE修饰肽段的离子化效率, 有利于串联质谱的解析; 其次是富集后无需额外的除盐步骤, 可直接进行质谱分析, 但是该方法所应用的氟试剂价格较高.

2 固相胍化学法

固相胍化学法是富集HNE修饰蛋白质/肽段另外一种常见的方法, 该富集方法的原理是基于胍固相材料上的酰胍基团与HNE修饰蛋白质/肽段上醛基的反应. HNE修饰蛋白质/肽段上的醛基与固相上的胍基在pH为3.6的酸性条件可共价键合形成胍腙键, 利用离心法使连有HNE修饰蛋白质/肽段的胍固相材料从复杂的混合物中分离出来, 在10%甲酸, 60℃条件下, 胍腙键被解开从而释放出HNE修饰蛋白质/肽段(图6). 已经报道用于HNE修饰蛋白质/肽段的胍固相材料主要有带酰胍官能团的玻璃珠^[24,25]. Griffin研究组^[24]在2007年把该方法应用于HNE刺激的酵母裂解物中, 在67个蛋白中成功鉴定到125个HNE修饰的位点; Prokai研究组^[25]随后也将该富集方法与中性丢失策略相结合, 应用到掺杂着HNE修饰肽段的小鼠脑组织蛋白质酶解肽段中, 成功鉴定到HNE修饰肽段, 并且发现所采用的方法有利于研究低丰度的HNE修饰蛋白质.

由于固相胍化学法是HNE修饰蛋白质/肽段通过

图4 biotin衍生HNE相似物修饰肽段的示意图^[20]

图 5 羟胺功能化的C₆F₁₃衍生HNE修饰肽段的示意图^[23]

化学键合作用连接在分离材料上, 所以与亲合作用的富集方法相比选择性较高; 而且富集完成后HNE修饰蛋白质/肽段还是以完整的形式存在. 该方法不涉及额外的分子标签的衍生, 质谱串级谱图解析更为简单. 但是该方法耗时较长, 且通过解离肼键达到洗脱目的的条件较为苛刻^[26].

3 发展与展望

以上的研究方法有各自的优点与不足, 选择合适的方法对于HNE修饰蛋白质的研究非常重要. 在病理状态下生物体内HNE修饰的新陈代谢、信号通路、调控作用越来越引起人们的关注, 有望成为未来研究的热点方向. 对于HNE修饰蛋白质的进一步生物功能

图 6 固相肼材料富集HNE修饰肽段的示意图^[24]

的研究得益于开发更加高效的分析方法, 在富集方法的基础上发展一种识别与定量相结合的分析方法将既是方法学上研究的关注点也是促进HNE修饰成为热点修饰的催化剂.

参考文献

- 1 Poli G, Chiarotto E, Biasi F, et al. Enzymatic impairment induced by biological aldehydes in intact rat liver cells. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1982, 38: 71–76
- 2 Siems W, Grune T. Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med*, 2003, 24: 167–175
- 3 Zhao J, Chen J, Zhu H, et al. Mass spectrometric evidence of malonaldehyde and 4-hydroxynonenal adductions to radical-scavenging soy peptides. *J Agric Food Chem*, 2012, 60: 9727–9736
- 4 Awasthi Y C, Yang Y, Tiwari N K, et al. Regulation of 4-hydroxynonenal-mediated signaling by glutathione *S*-transferases. *Free Radical Biol Med*, 2004, 37: 607–619
- 5 Uchida K, Toyokuni S, Nishikawa K, et al. Michael addition-type 4-hydroxy-2-nonenal adducts in modified low-density lipoproteins: markers for atherosclerosis. *Biochemistry*, 1994, 33: 12487–12494
- 6 Sayre L M, Zelasko D A, Harris P L R, et al. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 1997, 68: 2092–2097
- 7 Poli G, Schaur R J, Siems W G, et al. 4-Hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev*, 2008, 28: 569–631
- 8 Fenaille F, Tabet J C, Guy P A. Immunoaffinity purification and characterization of 4-hydroxy-2-nonenal- and malondialdehyde-modified peptides by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 2002, 74: 6298–6304
- 9 Fenaille F, Tabet J C, Guy P A. Identification of 4-hydroxy-2-nonenal-modified peptides within unfractionated digests using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem*, 2004, 76: 867–873
- 10 Méndez D, Hernández M L, Díez A, et al. Combined proteomic approaches for the identification of specific amino acid residues modified by 4-hydroxy-2-nonenal under physiological conditions. *J Proteome Res*, 2010, 9: 5770–5781

- 11 Green N. Avidin. 1. The use of [^{14}C] biotin for kinetic studies and for assay. *Biochem J*, 1963, 89: 585–591
- 12 Brittain S M, Ficarro S B, Brock A, et al. Enrichment and analysis of peptide subsets using fluoruous affinity tags and mass spectrometry. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 463–468
- 13 Grimsrud P A, Picklo Sr. M J, Griffin T J, et al. Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6: 624–637
- 14 Yuan Q, Zhu X, Sayre L M. Chemical nature of stochastic generation of protein-based carbonyls: metal-catalyzed oxidation versus modification by products of lipid oxidation. *Chem Res Toxicol*, 2007, 20: 129–139
- 15 Mirzaei H, Regnier F. Affinity chromatographic selection of carbonylated proteins followed by identification of oxidation sites using tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 2005, 77: 2386–2392
- 16 Codreanu S G, Zhang B, Sobecki S M, et al. Global analysis of protein damage by the lipid electrophile 4-hydroxy-2-nonenal. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8: 670–680
- 17 Chavez J, Wu J, Han B, et al. New role for an old probe: affinity labeling of oxylipid protein conjugates by *N'*-aminooxymethylcarbonylhydrazino D -biotin. *Anal Chem*, 2006, 78: 6847–6854
- 18 Chavez J D, Wu J, Bisson W, et al. Site-specific proteomic analysis of lipoxidation adducts in cardiac mitochondria reveals chemical diversity of 2-alkenal adduction. *J Proteomics*, 2011, 74: 2417–2429
- 19 Soreghan B A, Yang F, Thomas S N, et al. High-throughput proteomic-based identification of oxidatively induced protein carbonylation in mouse brain. *Pharm Res*, 2003, 20: 1713–1720
- 20 Vila A, Tallman K A, Jacobs A T, et al. Identification of protein targets of 4-hydroxynonenal using click chemistry for *ex vivo* biotinylation of azido and alkynyl derivatives. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21: 432–444
- 21 Kim H Y H, Tallman K A, Liebler D C, et al. An azido-biotin reagent for use in the isolation of protein adducts of lipid-derived electrophiles by streptavidin catch and photorelease. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8: 2080–2089
- 22 Jacobs A T, Marnett L J. Systems analysis of protein modification and cellular responses induced by electrophile stress. *Acc Chem Res*, 2010, 43: 673–683
- 23 Yuan W J, Zhang Y, Xiong Y, et al. Highly selective and large scale mass spectrometric analysis of 4-hydroxynonenal modification via fluoruous derivatization and fluoruous solid-phase extraction. *Anal Chem*, 2017, 89: 3093–3100
- 24 Roe M R, Xie H, Bandhakavi S, et al. Proteomic mapping of 4-hydroxynonenal protein modification sites by solid-phase hydrazide chemistry and mass spectrometry. *Anal Chem*, 2007, 79: 3747–3756
- 25 Rauniyar N, Stevens S M, Prokai-Tatrai K, et al. Characterization of 4-hydroxy-2-nonenal-modified peptides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using data-dependent acquisition: neutral loss-driven MS_3 versus neutral loss-driven electron capture dissociation. *Anal Chem*, 2009, 81: 782–789
- 26 Zhang Y, Zhang C, Jiang H, et al. Fishing the PTM proteome with chemical approaches using functional solid phases. *Chem Soc Rev*, 2015, 44: 8260–8287

Advancement in enrichment methods for 4-Hydroxynonenal modified proteome

YUAN WenJuan, ZHANG SiWen, ZHANG Ying & LU HaoJie

Department of Chemistry and Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China

4-Hydroxynonenal (HNE) is an important modification with great biological characterization and clinical significance. The low-abundance HNE modified proteins need to be enriched before mass spectrometry analysis. Here we summarize the current research state and theory of enrichment methods (four methods: immunoaffinity enrichment, biotin-avidin enrichment, fluoruous solid-phase extraction, solid-phase hydrazide enrichment) for HNE modified proteomes, and describe the advantages and disadvantages of each method. Finally, we discuss the search trends of the HNE modified proteins in future.

proteome, enrichment, mass spectrometry, HNE modified proteins

doi: [10.1360/N052017-00156](https://doi.org/10.1360/N052017-00156)