

点击化学反应在蛋白质组学分析中的研究进展

占方玲¹ 高思宇² 谢元栋² 张金铭³ 李毅^{*2} 刘宁^{*1,3}

¹(吉林大学第二医院中心实验室, 长春 130041) ²(吉林大学口腔医院, 长春 130022)

³(吉林大学人兽共患病研究教育部重点实验室, 长春 130061)

摘要 一价铜催化的叠氮炔基的特异性反应通常被称为“点击化学反应”。点击化学反应作为一种重要的分子连接方式,能够在分子水平实现特定小分子基团之间的简单高效连接。因其快速高效、选择性高、条件温和、副反应少等优点,在蛋白质组学分析中有广泛应用,包括新生成蛋白的鉴定和多种翻译后修饰蛋白的鉴定等方面。因此,深入研究点击化学反应在蛋白质组学中的反应机制,对理解蛋白质的结构功能具有重要意义。本文综述了近年来点击化学反应在蛋白质组学中的几类重要应用,并对其未来的发展趋势进行了展望。

关键词 点击化学反应; 蛋白质组学; 评述

1 引言

蛋白质组 (Proteome) 源于蛋白质 (Protein) 与基因组 (Genome) 两个词的组合,这个概念最早是由澳大利亚 Macquarie 大学 Wilkins 等^[1]提出。蛋白质组学研究的主要内容包括在蛋白质水平上大规模地分析组织细胞的蛋白质表达水平、翻译后修饰、蛋白质间的相互作用等,从而揭示蛋白质的功能,已在疫苗筛选、指导治疗、临床药物开发及预后判断等领域发挥了重要作用^[2,3]。

近年来,化学蛋白质组学在化学生物学领域发展迅速,其利用合成化学方法生成小分子探针,揭示蛋白质的结构和功能。传统的蛋白标记探针主要有生物素、荧光基团等,但普遍存在降低蛋白质活性、对极性变化不够敏感等缺点^[4,5]。点击化学的出现极大地降低了因探针掺入对蛋白活性的影响。点击化学是指通过小分子基团的拼接,简单高效地完成 C-X-C 杂原子化学合成的一类组合化学方法。目前,常用的点击化学反应主要包括铜催化的叠氮-炔基环加成反应 (Copper-catalysed azide-alkyne cycloaddition reaction, CuAAC)、直接促进的叠氮-炔基环加成反应 (Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition, SPAAC)、逆电子需求的 Diels-Alder 反应 (Inverse electron demand Diels-Alder reaction, IEDDA) 和施陶丁格链接反应 (Staudinger ligation) 4 类^[6]。其中, CuAAC 是较为经典的点击化学反应,该反应是指由 Cu⁺ 催化叠氮化合物与炔基化合物,生成三唑五元环化合物的共价加成反应,如图 1 所示。该方法反应效率高,副反应少,反应条件温和,具有很高的化学选择性且不受水氧干扰、环境污染小等优点^[6]。近年来,点击化学反应与基于质谱法的蛋白质组学研究方法的结合在生物学领域广泛应用,特别是为新生成蛋白^[7]、棕榈酰化修饰蛋白^[8]、糖基化修饰蛋白^[9] 及磷酸化修饰蛋白的检测提供了方法,在蛋白质与蛋白质的相互作用^[10]、microRNA 生物合成^[11] 和 microRNA 前体与蛋白质相互作用^[12] 方面也有广泛应用。点击化学的使用对探索蛋白质生物学起到了巨大的推动作用。本文对基于点击化学反应在蛋白质组学研究中的几类重要生物学应用进展进行了综述。

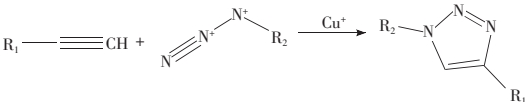


图1 点击化学反应原理^[6]
Fig.1 Schematic of click chemistry reaction^[6]

2019-11-15 收稿; 2019-12-24 接受
本文系国家自然科学基金项目 (No. 81472030)、吉林省科技厅项目 (No. 20180101267JC) 和吉林大学研究生创新项目 (No. 101832018C070) 资助
* E-mails: liu_ning@jlu.edu.cn; lyi99@jlu.edu.cn

2 新生成蛋白的检测

蛋白质的合成是一个动态过程,在正常和病理条件下,细胞会通过产生新生成蛋白对环境变化做出反应,准确检测蛋白质对环境扰动所做出的反应对理解其潜在作用机制具有十分重要的意义。新旧蛋白质共享相同的氨基酸库,在生物学上难以区分,因此有必要对新生成蛋白进行特殊标记以进行定性与定量分析。传统标记方法使用稳定同位素氨基酸标记法(Stable isotope labelling by amino acids in cell culture, SILAC)^[13]比较扰动前后蛋白质的表达变化。相较于极高丰度的原有蛋白质,新生成蛋白质常因丰度太低,无法实现在大多数质量分析仪的定量动态范围内的检测^[14],因此 SILAC 对于测量蛋白质合成的短时段内变化并不是最佳的方法。已有研究发现了两种非天然氨基酸叠氮高丙氨酸(Azidohomoalanine, AHA)和高炔丙基甘氨酸(Homopropargylglycine, HPG),它们可以在细胞的正常蛋白质合成时掺入到该蛋白的一级结构中,并且无明显细胞毒性^[15,16]。生物正交非天然氨基酸标记法(Bioorthogonal noncanonical amino acid tagging, BONCAT, 如图 2 所示^[17])利用此特点,通过代谢标记引入 AHA 或 HPG^[18,19]这种小分子基团甲硫氨酸类似物。将被标记的细胞进行裂解后,通过点击化学反应将带有炔或叠氮化物的亲和标签共价连接在目的蛋白上,再经过亲和素琼脂糖凝珠对目的蛋白进行纯化富集,最后将富集产物酶解成多肽,利用高通量质谱进行分析检测。该方法具有特异性强、灵敏度

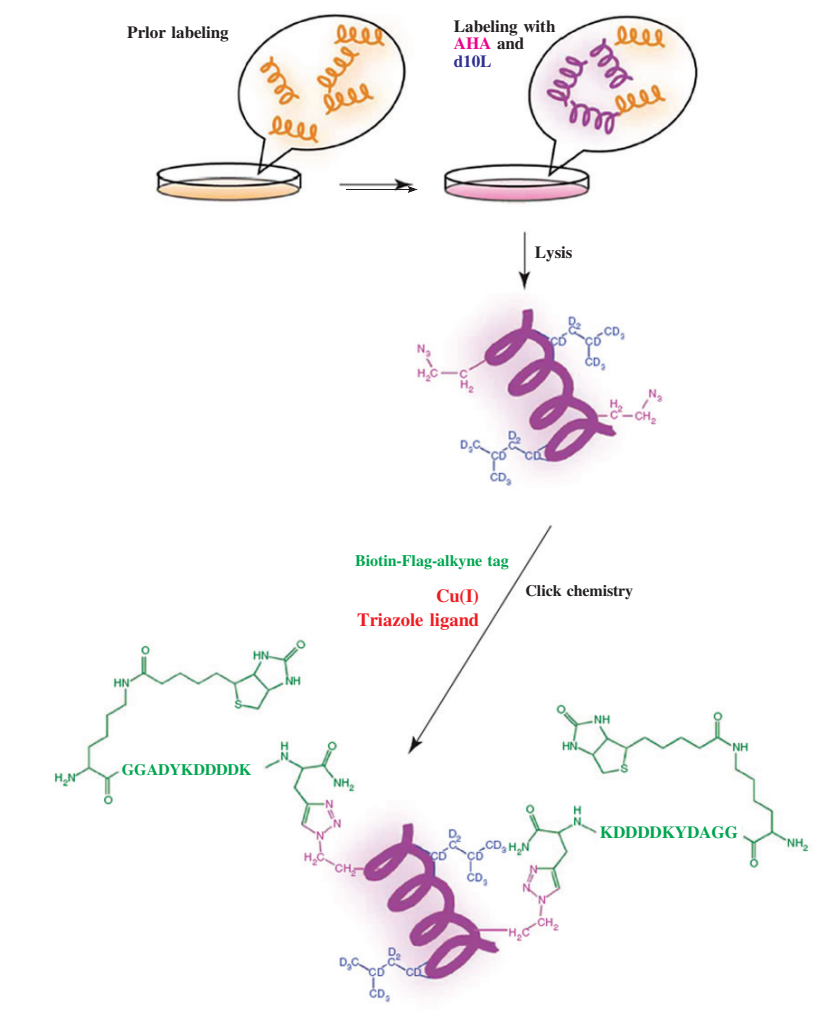


图 2 使用 BONCAT 方法对新生成蛋白进行标记、检测和鉴定^[17]

Fig. 2 Bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT) strategy for labeling, detection and identification of newly synthesized proteins^[17]

高等优点^[20,21], 可以选择性富集新生成蛋白, 实现对新生成蛋白更深入的分析, 从而促进细胞间相互作用的生物学的研究发展。

该方法自建立以来, 在动态蛋白质组学的分析中得到广泛应用。Shen 等^[22]采用 Bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT) 与 MS 联用技术对哺乳动物细胞进行了研究, 发现了数百个新生成蛋白在视觉条件时视神经支配区急剧增加; 作者进一步发现, Rab3 家族成员中的突触蛋白 Rab3a、Rab3b 和 Rab3c 受到视觉神经的差异调节, 在视觉刺激的顶盖脑中 Rab3b 和 Rab3c 的表达量显著增加, 而 Rab3a 显著减少, 说明 Rab3 家族成员可能在体内介导视觉依赖的行为可塑性中扮演不同的角色。Howden 等^[23]利用 AHA 标记并结合了 SILAC 的方法 (Quantitative non-canonical amino acid tagging, QuaNCAT), 只需要标记细胞数小时或喂食/注入动物 1~4 天, 即可实现对低丰度新生成蛋白的定量分析。在该研究中, 利用重同位素标记的氨基酸对 T 细胞刺激后分泌的新生成蛋白进行标记, 随后通过亲和素微珠对目的蛋白进行富集, 最后利用 MS 对新生成蛋白进行了定量检测。Ma 等^[24]的方法更简单直接, 使用重同位素标记的 AHA (Heavy isotope-labeled azidohomoalanine quantification, HILAQ) 进行新生成蛋白的标记, 再通过点击反应添加生物素, 接着对标记的蛋白进行沉淀洗涤和消化。该研究组对 HT22 细胞氧化模型的新生成蛋白进行了定量检测, 发现 226 种蛋白质的丰度发生了两倍的变化, 108 种蛋白质在细胞死亡途径中得到富集, 证明了 HT22 细胞作为一种分子工具, 在研究神经退行性疾病涉及的细胞凋亡的过程中十分有效。他们还将 HILAQ 法与 QuaNCAT 法进行比较发现, HILAQ 使用肽水平富集, 已被证明是比 QuaNCAT 中使用蛋白质水平富集的更灵敏的方法, 且 HILAQ法定量的新生成蛋白是 QuaNCAT 法定量的 3.5 倍以上。综上, HILAQ 方法是一种新型的新生成蛋白的定量检测方法, 通过使用重同位素的标记简化了新合成蛋白质组的分析过程, 并且具有更高的灵敏度。崔秀雲等^[25]首先利用脂多糖刺激 Raw264.7 细胞产生肿瘤坏死因子 α , 然后通过代谢掺入 AHA, 并利用点击化学反应, 使细胞中的新生成的蛋白标记上生物素标签, 再利用抗体对标记蛋白进行特异性捕获, 从而达到检测特定的新生成蛋白的目的。该研究为检测特定的微量新生成蛋白提供了一种可借鉴的方法。

除了上述 AHA 或 HPG, 一种非天然氨基酸对-叠氮-L-苯丙氨酸 (*p*-azido-L-phenylalanine, azF) 也被用于蛋白质的代谢标记^[26,27]。Smits 等^[28]开发了一种 Click-MS 的新型检测方法, 利用琥珀抑制技术选择性地终止琥珀终止密码子 (UAG) 掺入到目的蛋白中, 同时添加特定的 tRNA 和酰氨基-tRNA 合成酶 (aa-RS)。然后, 通过无铜点击化学反应对掺入对-叠氮-L-苯丙氨酸的目的蛋白进行特异性捕获, 最后利用质谱检测, 实现单个目的蛋白的选择性富集。研究者利用此方法, 从哺乳动物细胞粗提取物中特异性富集了两种目标蛋白: 信号转录与激活因子 1 (STAT1) 和甲基 CpG 结合域蛋白 3 (MBD3)。与使用 AHA 或 HPG 的蛋白质标记策略有所不同, 该方法实现了对单个目的蛋白的特异性富集, 对于揭示特定目标蛋白的代谢情况以及与其它蛋白间的相互作用具有重要意义。

3 翻译后修饰蛋白的检测

3.1 棕榈酰化修饰蛋白的检测

棕榈酰化修饰蛋白的传统检测方法是酰基生物素置换法 (Acyl-biotinyl exchange, ABE)^[29]。ABE 法是先利用碘乙酰胺封闭蛋白质半胱氨酸上的自由巯基, 利用羟胺选择性地切割蛋白质半胱氨酸和脂肪酸修饰基团之间的硫酯键, 再将带有生物素的巯基特异性反应活性试剂与新产生的自由巯基反应, 最后对目的蛋白 S-棕榈酰化修饰蛋白进行纯化、富集和检测。已有研究采用 ABE 法对生物样本中的棕榈酰化修饰蛋白进行了数量及修饰位点的鉴定分析^[30,31]。尽管 ABE 法在检测棕榈酰化修饰蛋白质方面有了很大进展, 但由于羟胺切割的是硫酯键, 而不是 S-棕榈酰化修饰的特异位点, 其它对羟胺敏感的硫酯键蛋白也有可能被同时富集^[32], 因此存在假阳性率高、灵敏度低、放射性强等缺点, 极大限制了在棕榈酰化修饰蛋白检测方面的应用。

近年来, 研究者发展了另一种蛋白质棕榈酰化修饰的分析方法: 化学报告基团法 (Chemical Reporter)^[33], 该方法能够区分 S-脂肪酰化 (棕榈酰化修饰) 的蛋白和 N/O-脂肪酰化的蛋白。与上述

ABE 法不同的是,该方法将含有炔基的棕榈酸类似物代谢掺入细胞蛋白质,然后通过点击化学方法,选择性地将带叠氮基团的生物素连接到标记了炔基探针的蛋白质上,接着使用羟胺对棕榈酰化修饰蛋白的硫酯键处进行特异性切割,最后采用抗生物素琼脂糖凝珠对蛋白质进行富集和鉴定,从而实现对棕榈酰化修饰蛋白的检测,如图 3 所示。炔烃和叠氮化物脂肪酸探针通常都能有效标记细胞脂肪酰化蛋白质,其中炔基探针因具有较低的背景信号及更高的检测灵敏度和检测效率等优点应用更为广泛^[34]。同时,添加一个叠氮基团到脂肪酸链上可能会影响脂肪酸的疏水性,而炔基可保留脂肪酸碳链的疏水性,减少对脂肪酸物理化学性质的改变及其与脂质间的相互作用的影响^[32]。Yount 等^[35]在吞噬细胞(鼠树突状细胞系)中使用 Alk-C16 进行大规模棕榈酰化酶图谱分析,鉴定出 157 种具有多种功能,包括先天免疫的 S-棕榈酰化蛋白(其中 60 个高可信度蛋白和 97 个中可信度蛋白)。他们研究发现棕榈酰化对于干扰素诱导的跨膜蛋白(IFITM3)的抗病毒活性至关重要,该蛋白在其膜上 3 个近半胱氨酸残基(Cys71/72/105)处被棕榈酰化。此外,Teo 等^[36]将基于点击化学的探针用于分析感染单纯疱疹病毒(HSV)的宿主细胞中的整体脂肪酰化,发现宿主 S 棕榈酰化蛋白的一个子集(包括干扰素和四跨膜蛋白家族成员)被选择性抑制,在感染过程中,很大一部分 HSV 蛋白均被 S-棕榈酰化。

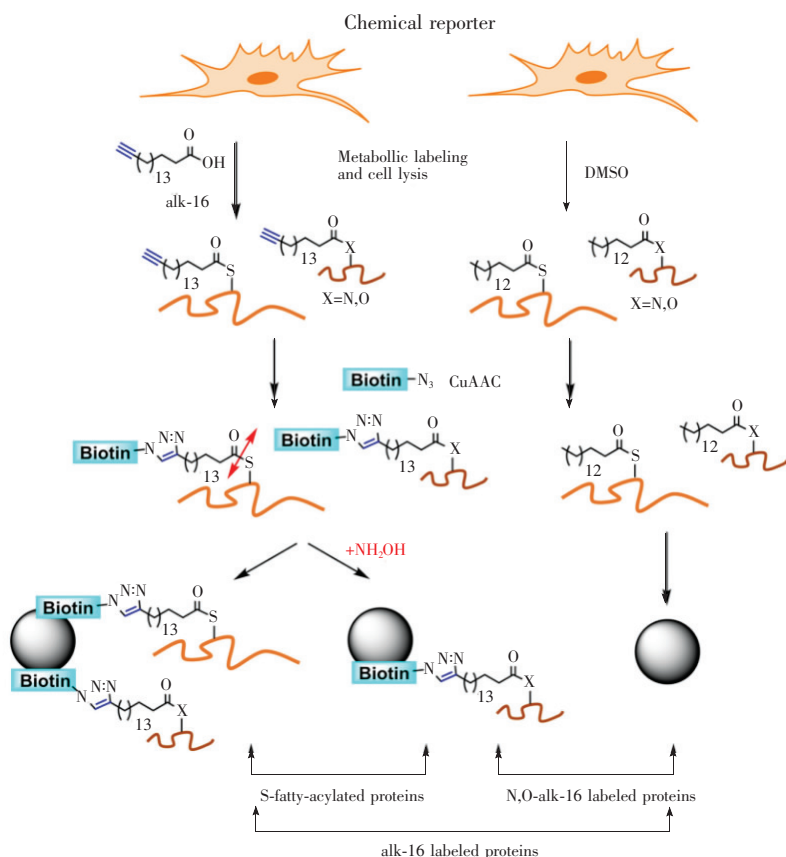


图 3 采用化学标记法鉴定棕榈酰化修饰蛋白^[33]

Fig. 3 Identification of palmitoylated proteins by chemical labeling^[33]

3.2 糖基化修饰蛋白的检测

蛋白质的糖基化修饰是一种重要且常见的翻译后修饰,占人类蛋白质总量的一半以上,该修饰方式参与许多生理功能和生物学途径^[37]。在许多疾病中都能观察到糖基化修饰蛋白的异常,如自身免疫性疾病、心血管疾病、阿尔兹海默症和癌症等^[38,39],因此对生理病理条件下的糖基化修饰蛋白进行动态监测对于理解疾病的发生发展机制具有重要意义。

点击化学介导的糖基化蛋白的标记(Glycoprotein labeling with click chemistry, GLCC)是一种常用检测手段^[40]。在这种方法中,含有生物正交功能基团(如叠氮)的单糖类类似物通过细胞自身的代谢机制掺入细胞的聚糖中,再利用点击化学反应将带有生物素或荧光基团的炔基标记分子连接到糖基化蛋白

上,最后通过链霉亲和素琼脂糖凝珠或荧光共聚焦显微镜成像对标记分子进行富集和检测。目前,已有大量研究成功利用点击化学反应对糖基化蛋白实现了可视化的动态检测。Rong 等^[41]将叠氮作为化学报告基团,代谢掺入到大鼠心脏组织中,利用点击化学反应在叠氮上连接带荧光基团的炔基反应试剂,最后通过荧光共聚焦显微镜成像鉴定出超过 200 种唾液酸化修饰的心肌蛋白如 T-kininogens 等,并对唾液酸化的聚糖和 O 连接的聚糖进行了高分辨率的成像分析,发现它们主要分布在细胞与细胞间的连接处和 T 型管的细胞膜上。该研究还证明,点击化学反应介导的糖蛋白标记在细胞水平、独立的心脏器官水平和多肽水平都能实现标记,并成功进行检测(图 4)。其中,在细胞水平采用一价铜离子催化的点击反应将代谢掺入的叠氮糖与炔基荧光 488 分子相连接,通过荧光共聚焦显微镜成像进行检测;在独立心脏器官水平,对标记了叠氮糖的心脏组织进行 Langendorff 灌注,考虑到铜离子的生物毒性,研究采用的是不依赖于铜的 DBCO-荧光 488 基团标记代谢掺入的叠氮糖,并对完整的心脏进行荧光成像分析;在组织裂解液水平,将掺入了叠氮化物的心脏组织进行裂解后,与炔基生物素进行点击反应,用链霉亲和素富集唾液酸化的糖蛋白,然后进行凝胶水平的蛋白鉴定。这些实验都证明了大鼠心脏糖原的体内代谢标记可使完整心脏组织中的心肌细胞表面聚糖可视化,并发现在独立器官水平的心肌肥大模型小鼠的病理过程中,唾液酸化聚糖的生物合成上调,证明唾液酸化对心脏发育和发病机制存在潜在影响。Herber 等^[42]采用点击反应富集糖表面蛋白(Surface-spanning protein enrichment with click sugars, SUSPECS)方法,实现了细胞表面糖蛋白的富集、鉴定和定量分析。该研究先使用点击化学反应选择性标记细胞表面糖基化修饰蛋白,而后通过对生物素的检测,对糖基化修饰蛋白进行高通量质谱定量分析。基于免疫荧光共聚焦显微镜显示,SUSPECS 选择性标记了细胞表面蛋白,在原代神经元表面存在近 700 种跨膜糖蛋白。他们还将该方法应用于治疗阿尔兹海默病的关键药物靶标蛋白酶 BACE1 的研究中,发现 BACE1 通过抑制酶代谢,选择性重塑了神经元表面糖蛋白组,这种将点击化学反应与疾病关键药物靶标蛋白检测相结合的手段对揭示阿尔兹海默病的发病机制具有重要意义。Song 等^[43]将含叠氮的 $Ac_4ManNAz$ 代谢掺入到细胞膜表面,利用铜催化的点击化学反应富集糖基化修饰蛋白,通过这种方式能够去除丰度较高的胞质蛋白,更好地表征细胞膜表面的糖基化修饰蛋白。Yang 等^[44]成功对前列腺癌细胞系中的唾液酸化糖蛋白进行了鉴定。在非转移性 N2 细胞系中观察到 36 种细胞表面的糖蛋白,其中有 8 种糖蛋白参与细胞凋亡过程;在转移性 ML2 细胞系中发现 44 种细胞表面的糖蛋白,其中有 11 种糖蛋白与细胞运动、迁移和侵袭有关。在上述与细胞侵袭有关的糖蛋白中,有 6 种糖蛋白不论是转移性还是非转移性均可用作生物标记。该研究策略对前列腺癌发生发展过程的研究起到了极大的推动作用。

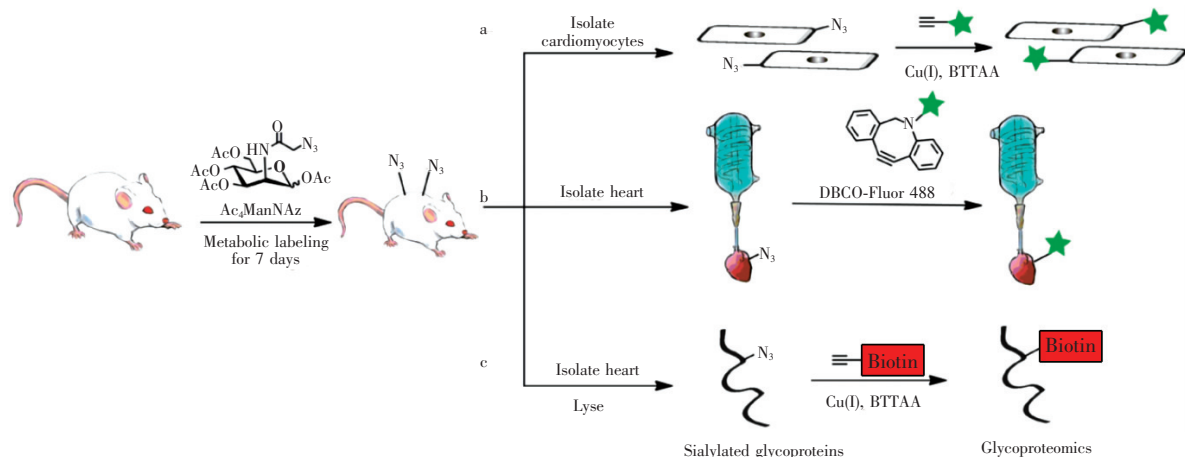


图 4 通过体内代谢标记,在细胞水平、器官水平和组织裂解液水平对小鼠心脏唾液酸化糖蛋白进行蛋白质组学鉴定^[41]

Fig. 4 Proteomic identification of mouse cardiac sialylated glycoproteins by *in vivo* metabolic labeling at the cell level, organ level and tissue lysate level^[41]

目前,点击化学反应不局限于叠氮和炔基的反应,还有一类新型的点击化学反应——硫醇和烯的特异性反应^[45],在分子印迹技术标记糖蛋白方面发展迅速。首先,分子印迹是一种在模板分子存在下制备特异识别聚合物的技术,因具有成本低且易于制备的优点,被成功应用于分子的分离和识别^[46]。相比于以往荧光功能单体繁琐的设计合成过程,新型分子印迹荧光传感器的合成无需额外的荧光材料(量子点、碳点和荧光素等),只需通过简单的点击反应即可将普通的蛋白质印迹聚合物转变成一种新型的分子印迹荧光传感材料,可应用于生物大分子(如蛋白质和多肽)的识别。Zhao 等^[47]利用该结合技术,将普通分子印迹聚合物升级为生物传感器荧光传感材料,成功实现了糖蛋白的快速检测。他们使用含有二硫键的功能单体,在二硫键断裂后,将暴露的硫醇基团通过“硫醇-烯”的点击反应连接上带有荧光特性和位点特异性识别的功能基团。通过一步位点特异性反应,不仅引入了与糖蛋白具有亲和力的官能团,还赋予了普通蛋白印迹聚合物良好的荧光特性(线性范围为 0.1 ~ 10 mg/mL),使普通蛋白印迹聚合物中功能基团的转换更方便简单。

3.3 磷酸化修饰蛋白的检测

蛋白质的磷酸化修饰是一种重要的翻译后修饰,参与细胞的增殖分化、信号转导、新陈代谢等生命活动过程,是生物体内最重要的调节机制之一^[48]。异常的磷酸化调节会导致许多严重的人类疾病^[49],对磷酸化修饰蛋白进行检测分析有助于推进疾病发病机制的研究。目前,常用的磷酸化修饰蛋白分离富集方法主要包括三类:免疫沉淀法、亲和色谱法和化学衍生法^[50]。

近年来,点击化学反应在磷酸化修饰蛋白的检测方面也发挥了巨大作用。Akiba 等^[51]发现了一种带正电荷的双核 Tb(III)络合物 Tb2-L,该络合物仅在磷酸酪氨酸存在下明显发光,可用于选择性地检测磷酸酪氨酸(pTyr)。然而,当多肽底物带正电荷时,因存在静电互斥作用,检测灵敏度明显降低。为克服此缺点,该研究组提出了一个更优的方法,向 Tb2-L 分子中添加带有炔基的基团,生成一种新型的络合物探针 Tb2-LcIyne;同时,向磷酸化多肽底物的半胱氨酸残基上引入一个叠氮基团,最后利用叠氮-炔基的点击化学反应使络合物探针与磷酸化的多肽底物实现共价结合。当多肽底物被磷酸化时,基于镧系元素发光的信号会发生明显改变,从而实现酶促酪氨酸磷酸化蛋白的动态监测。在这项研究中,酪氨酸磷酸化肽段的信号可通过时间分辨光谱清晰地与背景区分开,易于进行详细的定量分析。综上,该方法利用点击化学反应,只需将这种 Tb(III)络合物添加到反应混合物中,即可实现对酪氨酸激酶的磷酸化和去磷酸化的实时监控,是一种测定潜在蛋白激酶抑制剂的良好工具,对药物开发的研究具有十分重要的推进作用。

4 展望

近年来,将点击化学反应与 SILAC、BONCAT、分子印迹等方法相结合,为高通量质谱法检测蛋白质提供了新思路。通过使用可发生点击反应的探针,可对新生成蛋白和翻译后修饰蛋白进行可视化研究,并实现蛋白质组学的定性与定量检测。考虑到蛋白质糖基化修饰和磷酸化修饰等翻译后修饰在多种疾病中的关键作用,开发相应的蛋白特异性识别探针至关重要。目前,点击化学反应仅在少数几种类型的蛋白质翻译后修饰中得到应用,利用点击化学反应开发针对其它类型的蛋白质翻译后修饰的特异性探针的研究将成为未来一个重要的研究方向。同时,对于蛋白质标记而言,目前仅针对甲硫氨酸开发了可直接进行点击反应的小分子类似物,而针对其它种类的氨基酸筛选出一系列相应类似物,将极大拓展点击化学反应在蛋白质动态分析中的广泛应用。此外,铜催化的点击化学反应会带来一定的生物毒性,因此,开发无毒高效的体内新型点击反应仍然是未来点击化学反应研究的一个热点方向。

References

- 1 Williams K L, Gooley A A, Wilkins M R, Packer N H. *J. Proteomics*, **2014**, 107: 13–23
- 2 Aslam B, Basit M, Nisar M A, Khurshid M, Rasool M H. *J. Chromatogr. Sci.*, **2017**, 55(2): 182–196
- 3 Huang Z, Ma L G, Huang C H, Li Q F, Edouard C N. *Proteomics*, **2017**, 17: 6

- 4 Shao S, Chen B, Cheng J, Wang C, Zhang Y, Shao L, Hu Y, Han Y, Han F, Li X. *Biosens. Bioelectron.*, **2017**, 94: 162–168
- 5 Tse J, Wang Y, Zengeya T, Rozners E, Tan-Wilson A. *Anal. Biochem.*, **2015**, 470: 34–40
- 6 Meyer J P, Adumeau P, Lewis J S, Zeglis B M. *Bioconjugate Chem.*, **2016**, 27(12): 2791–2807
- 7 Güney A, Kasper L J, Georgi T, Sivakumar S, Jennifer R, Irina E, Iván C, Irena V, Erin S. *RNA Biol.*, **2016**, 14(1): 20–28
- 8 Gao X, Hannoush R N. *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136(12): 4544–4550
- 9 Suttapitugsakul S, Ulmer, L D, Jiang C, Sun F, Wu R. *Anal. Chem.*, **2019**, 91(10): 6934–6942
- 10 Bertrand H C, Schaap M, Baird L, Georgakopoulos N D, Fowkes A, Thiollier C, Kachi H, Dinkova-Kostova A T, Wells G. *J. Med. Chem.*, **2015**, 58(18): 7186–7194
- 11 Walczak S, Sikorski P J, Kasprzyk R, Kowalska J, Jemielity J. *Org. Biomol. Chem.*, **2018**, 16(36): 6741–6748
- 12 Sherman E J, Lorenz D A, Garner A L. *ACS Comb. Sci.*, **2019**, 21(7): 522–527
- 13 Eichelbaum K, Winter M, Berriel Diaz M, Herzig S, Krijgsveld J. *Nat. Biotechnol.*, **2012**, 30(10): 984–990
- 14 Ma Y, Yates J R. *Expert Rev. Proteomics*, **2018**, 15(7): 545–554
- 15 Wang J, Zhang J, Lee Y M. *Nat. Protoc.*, **2017**, 12(2): 279–288
- 16 Teramoto H, Kojima K. *Macromol. Biosci.*, **2015**, 15(6): 719–727
- 17 Dieterich D C, Lee J J, Link A J, Granmann J, Tirrell D A, Schuman E M. *Nat. Protoc.*, **2007**, 2(3): 532–540
- 18 Serwa R A, Sekine E, Brown J, Teo S H C, Tate E W, O'Hare P. *PLoS Pathog.*, **2019**, 15(10): e1007956
- 19 Li Z, Zhu Y, Sun Y, Qin K, Liu W, Zhou W, Chen X. *ACS Chem. Biol.*, **2016**, 11(12): 3273–3277
- 20 Franco M, D'Haeseleer P M, Branda S S, Liou M J, Haider Y, Segelke B W, El-Etr S H. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, **2018**, 8: 370
- 21 Dieterich D C, Link A J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, 103(25): 9482–9487
- 22 Shen W, Liu H H, Schiapparelli L, McClatchy D, He H, Yates J R, Cline H T. *Cell Rep.*, **2014**, 6(4): 737–747
- 23 Howden A J, Geoghegan V, Katsch K, Efstathiou G, Bhushan B, Boutureira O, Thomas B, Trudgian D C, Kessler B M, Dieterich D C, Davis B G, Acuto O. *Nat. Methods*, **2013**, 10(4): 343–346
- 24 Ma Y, McClatchy D B, Barkallah S, Wood W W, Yates J R. *J. Proteome Res.*, **2017**, 16(6): 2213–2220
- 25 CUI Xiu-Yun, SUN Ning-Ning, XIE Xiao-Na, SUN Wan-Chun, ZHAO Qing, LIU Ning. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2018**, 46(11): 1808–1813
- 崔秀雲, 孙宁宁, 谢晓娜, 孙万春, 赵 晴, 刘 宁. *分析化学*, **2018**, 46(11): 1808–1813
- 26 Liu W, Brock A, Chen S, Chen S, Schultz P G. *Nat. Methods*, **2007**, 4(3): 239–244
- 27 Wang L, Brock A, Herberich B, Schultz P G. *Science*, **2001**, 292(5516): 498–500
- 28 Smits A H, Borrmann A, Roosjen Mark, Hest J C M, Vermeulen M. *ACS Chem. Biol.*, **2016**, 11(2): 3245–3250
- 29 Woodley K T, Collins M O. *Methods Mol. Biol.*, **2019**, 1977: 71–82
- 30 Brigidi G S, Bamji S X. *J. Vis. Exp.*, **2013**, (72): UNSP e50031
- 31 Zhang X, Zhang Y, Fang C, Zhang L, Yang P, Wang C, Lu H. *Anal. Chem.*, **2018**, 90: 6161–6168
- 32 FANG Cai-Yun, ZHANG Xiao-Qin, LU Hao-Jie. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2014**, 42(4): 616–622
- 方彩云, 张晓勤, 陆豪杰. *分析化学*, **2014**, 42(4): 616–622
- 33 Thinin E, Fernandez J P, Molina H, Hang H C. *J. Proteome Res.*, **2018**, 17(5): 1907–1922
- 34 Peng T, Hang H C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137(2): 556–559
- 35 Yount J S, Moltedo B, Yang Y Y, Charron G, Moran T M, Lopez C B, Hang H C. *Nat. Chem. Biol.*, **2010**, 6: 610–614
- 36 Teo C S H, Serwa R A, O'Hare P C. *PLoS Pathog.*, **2016**, 12(10): e1005927
- 37 Lai Z W, Nice E C, Oliver S L. *Proteomics*, **2013**, 13(3–4): 512–525
- 38 Carsten G, Martin K, Yasmin G, Felix S, Andreas T, Lindhorst T K. *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, 11: 4006
- 39 Vajaria B N, Patel P S. *Glycoconjugate J.*, **2017**, 34(2): 147–156
- 40 Wu Z L, Huang X, Burton A J, Swift K A. *Carbohydr. Res.*, **2015**, 412: 1–6
- 41 Rong J, Han J, Dong L, Tan Y H, Yang H Q, Feng L S, Wang Q W, Meng R, Zhao J, Wang S Q. *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136(50): 17468–17476

- 42 Herber J, Njavro J, Feederle R, Schepers U, Müller U C, Bräse S, Müller S A, Lichtenthaler S F. *Mol. Cell. Proteomics*, **2018**, 17(8): 1487–1501
- 43 Song E, Mechref Y. *Biomarkers Med.*, **2015**, 9(9): 835–844
- 44 Yang L, Nyalwidhe J O, Guo S, Drake R R, Semmes O J. *Mol. Cell. Proteomics*, **2011**, 10(6): M110.007294
- 45 Yang X H, Davision R T, Dong M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, 140(33): 10443–10446
- 46 Vasapollo G, Sole R D, Mergola L, Lazzoi M R, Scardino A, Scorrano S, Mele G. *Int. J. Mol. Sci.*, **2011**, 12(9): 5908–5945
- 47 Zhao T, Wang J, He J, Deng Q, Wang S. *Biosens. Bioelectron.*, **2017**, 91: 756–761
- 48 Taracha A, Kotarba G, Wilanowski T. *Postepy Biochem.*, **2017**, 63(2): 137–142
- 49 Singh V, Ram M, Kumar R, Prasad R, Roy B K, Singh K K. *Protein J.*, **2017**, 36(1): 1–6
- 50 SHI Wen-Hao, TONG Meng-Sha, LI Kai, WANG Yu-Shen, DING Chen. *Prog. Biochem. Biophys.*, **2018**, 45(12): 1250–1258
- 石文浩, 童梦莎, 李 恺, 王钰坤, 丁 琛. 生物化学与生物物理研究进展, **2018**, 45(12): 1250–1258
- 51 Akiba H, Sumaoka J, Tsumoto K, Komiyama M. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(7): 3834–3840

Applications of Click Chemistry Reaction for Proteomics Analysis

ZHAN Fang-Ling¹, GAO Si-Yu², XIE Yuan-Dong², ZHANG Jin-Ming³, LI Yi^{*2}, LIU Ning^{*1,3}

¹(Central Laboratory, the Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China)

²(Stomatological Hospital of Jilin University, Changchun 130022, China)

³(Key Laboratory of Zoonosis Research, Ministry of Education, Jilin University, Changchun 130061, China)

Abstract Cu(I)-catalyzed azide-alkyne specific reaction, popularly known as the “click chemistry reaction”, is defined as an important molecular connection method, which can realize simple and efficient connection between specific small molecule groups at the molecular level. Because of its advantages such as high efficiency, high selectivity, mild conditions and few side reactions, click chemistry reaction has been widely used in proteomics analysis, including the identification of newly synthesized proteins and the identification of various post-translational modified proteins. Therefore, in-depth study of the reaction mechanism of click chemistry reaction in proteomics is very important for understanding the structure and function of proteins. The goal of this review is to highlight the progress of several important applications of click chemistry in proteomics analysis in recent years, and discuss the future trends of the click chemistry in proteomics.

Keywords Click chemistry reaction; Proteomics; Review

(Received 15 November 2019; accepted 24 December 2019)

This work was supported by the National Nature Science Foundation of China (No. 81472030), the Jilin Province Science and Technology Department Project (No. 20180101267JC) and the Graduate Innovation Fund of Jilin University (No. 101832018C070).