

蛋白质修饰的电化学研究

赵 婧¹, 朱小立¹, 李根喜^{1,2,*}

(1. 上海大学生命科学学院, 上海 200444;

2. 南京大学 医药生物技术国家重点实验室, 生物化学系, 江苏 南京 210093)

摘要: 蛋白质的翻译后修饰对于生命体执行正常的生理功能具有十分重要的作用, 是蛋白质科学研究的重要内容. 目前研究蛋白质修饰的方法主要有质谱法、亲和层析等, 然而由于蛋白质修饰研究的复杂性, 迫切需要发掘新的技术手段. 电化学方法理论成熟、应用广泛, 在生命科学许多领域发挥着越来越重要的作用. 蛋白质的体外修饰必将导致蛋白质特定位点基团的变化, 可以利用巧妙设计的电化学方法予以表征和分析, 以期探明修饰对蛋白质结构和功能的影响. 此外, 又可以利用电化学定量分析的独特优势快速准确地测定蛋白质修饰中涉及的相关酶活. 正因为如此, 蛋白质体外修饰的电化学研究已引起越来越多的关注. 本文以作者课题组近期研究工作为主, 结合国内外同行的相关代表性工作, 介绍电化学方法在蛋白质修饰方面的近期研究进展, 并探讨了今后的发展方向和趋势.

关键词: 蛋白质修饰; 蛋白质电化学; 生物电化学

中图分类号: O657.1

文献标识码: A

蛋白质的翻译后修饰指的是新合成的多肽及蛋白质在特定位点上所做的化学修饰, 包括磷酸化、乙酰化、甲基化、泛素化、糖基化、脂基化等^[1]. 翻译后修饰使蛋白质的结构更加复杂多样, 功能更为完善专一, 机体调节也更精巧细致, 对于生命体执行正常的生理功能具有十分重要的作用, 因而成为蛋白质科学研究的重要内容^[2]. 另一方面, 倘若上述复杂的修饰过程一旦失去了控制, 那么细胞的新陈代谢甚至个体的整体调控就会发生紊乱, 产生致命的后果. 研究表明, 多种疾病包括癌症、糖尿病、代谢综合征和神经综合征的发生都和蛋白质的异常修饰有着不同程度的相关性^[3]. 因此, 研究蛋白质的修饰不但有助于深入了解蛋白质的结构和功能, 而且对于各种疾病发病机理的探求也有着十分重要的意义.

有关蛋白质修饰的研究大致包括如下几方面: 蛋白质修饰的鉴定、修饰蛋白质的分离纯化以及其结构表征和功能检测等. 其中, 蛋白质修饰的鉴定即蛋白质修饰的检测是本项目研究的第一步, 于后续研究特别是分离纯化所采取的方法往往起到决定性的作用. 对于不同类别的蛋白质修

饰, 其鉴定或检测方法各不相同. 用于蛋白质糖基化修饰检测的常用方法有放射性标记法、分子荧光标记法、电泳法、凝集素标记法、抗体标记法及化学酵素法等. 而对蛋白质磷酸化修饰的检测, 也有很多成熟的方法, 包括³²P放射性标记、毛细管电泳、荧光标记、同位素编码亲和标签等方法. 至于其它类型的蛋白质修饰的鉴定, 可供选择的方法不多, 致使相关后续研究受到许多限制. 更何况, 涉及内源性蛋白质修饰的分析, 首先又必须清楚蛋白质的体外修饰条件, 这就非常迫切期待建立各种蛋白质修饰的模型以便配合体外多角度的研究和分析, 同时也有助于开发新的检测方法, 为蛋白质修饰的后续研究创造有利条件.

电化学技术由于理论成熟、操作相对简便且快速灵敏, 已逐渐发展成为生命科学研究中一种重要的分析方法. 尤其是随着蛋白膜伏安法的日益成熟, 越来越多带有电活性中心的蛋白质可借助于各种膜材料修饰在电极表面, 从而产生直接电化学以及电化学催化的响应信号^[4-11]. 近年来, 随着界面修饰技术、纳米技术、分子标记和识别技术的飞速发展, 蛋白质电化学研究不再局限于蛋

白质的电化学响应以及分析检测应用,逐渐突破了以往存在的手段单一、目标以及信息有限等诸多条件的限制,不断向着探索蛋白质结构及其功能的方向拓展^[12-30]. 在蛋白质修饰的研究方面,由于蛋白质的修饰必然导致蛋白质特定位点基团的变化,而这种变化又可以利用巧妙设计的电化学方法加以表征和分析,揭示蛋白质修饰所带来的结构和功能的影响. 另一方面,凭借电化学在定量检测方面独特的优势,可以更加快速、简便而准确地测定蛋白质修饰过程中涉及的相关酶活性,因而有望在蛋白质修饰的研究中发挥独特的作用. 本文主要以作者所在课题组近年来在蛋白质修饰的电化学研究领域开展的一些工作,并结合其他研究组相关代表性的成果,对蛋白质修饰的电化学研究进展进行综述,以期与同行交流、切磋.

1 蛋白质磷酸化修饰的电化学研究

蛋白质的磷酸化修饰是指通过蛋白质磷酸激酶将 ATP 分子中的磷酸基转移到蛋白质分子中特定位点 (Ser、Thr、Tyr 残基等) 的过程. 生物体内至少有 30% 的蛋白质被磷酸化修饰,而且涉及几乎所有的生理过程,包括细胞信号转导、激素分泌、基因转录、新陈代谢、神经活动、肌肉收缩以及细胞的增殖、发育和分化等^[31]. 蛋白质磷酸化水平的

异常上调或者下调与多种疾病如癌症、阿尔兹海默症等的发生密切相关^[32]. 因此,蛋白质磷酸化修饰的研究和检测具有重要的临床意义.

作者课题组构建了一种可调节“开-关”的超灵敏“无标记”电化学方法,用于蛋白质磷酸化的检测^[33]. 如图 1 所示,底物多肽 (H-CALRRASL-GW-NH₂) 首先以其 C 端半胱氨酸残基中的巯基固定在电极表面. 在 pH 6.0 的反应环境下,底物多肽含有的 2 个精氨酸残基因其高等电点 (pI ≈ 10.8) 而呈现电正性,其它氨基酸 (pI ≈ 6) 则表现为电中性. 此时,由于静电排斥作用,电正性的精氨酸残基阻碍了溶液中相同电性的电化学信号探针 [Ru(NH₃)₅Cl]²⁺ 接近电极表面,因而无法观察到 [Ru(NH₃)₅Cl]²⁺ 的电化学响应信号,检测装置处于“关”的状态. 但当底物多肽在蛋白质磷酸激酶 PKA 作用下被磷酸化修饰之后,底物多肽上的丝氨酸残基被电负性的磷酸根离子所修饰. 磷酸根离子一方面结合电正性的 [Ru(NH₃)₅Cl]²⁺ 使其在电极表面聚集,另一方面和邻近多肽上的精氨酸结合,抵消其表面的正电荷,使电极表面的多肽形成一种较为松散的网状结构. 大量的 [Ru(NH₃)₅Cl]²⁺ 通过和磷酸根离子结合或者直接穿过多肽的松散结构接近电极,产生了显著的电化

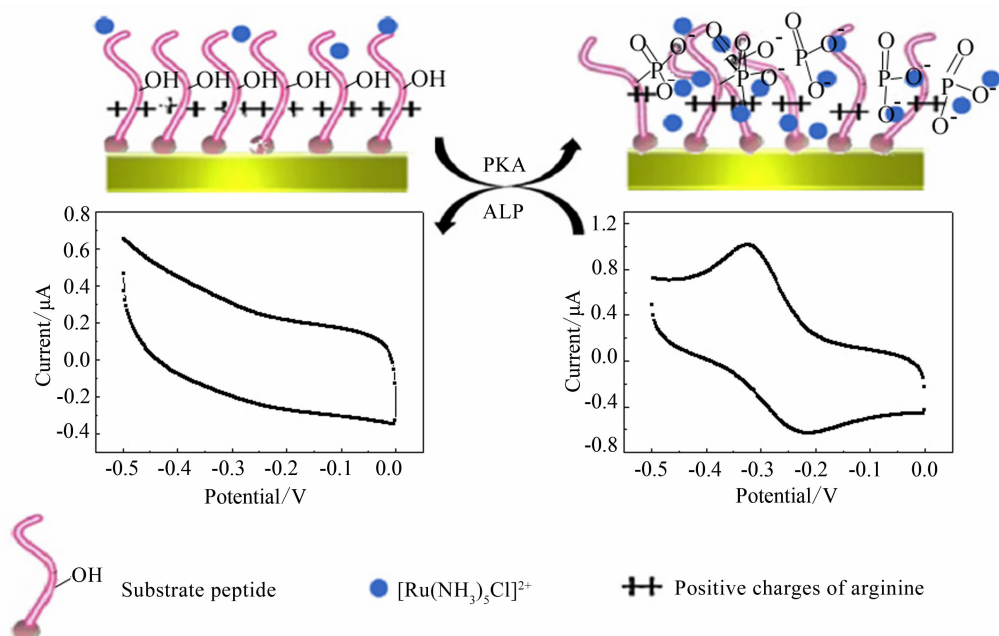


图 1 基于可调控“开-关”的蛋白质磷酸化检测的电化学传感器示意图^[33]

Fig. 1 Schematic illustration of the switchable “on-off” electrochemical biosensor for the detection of PKA-catalyzed phosphorylation^[33]

学信号,检测体系变为“开”的状态. 更为有趣的是,该装置可以在“开”、“关”状态之间实现反复切换. 如果在磷酸化的多肽体系中加入碱性磷酸酶,多肽底物发生去磷酸化反应而恢复到最初的状态. 精氨酸的正电荷重新排斥信号分子和电极之间的电子传递,检测体系又变回到“关”的状态. 该法不仅能够非常灵敏简便地对蛋白质磷酸化和去磷酸化进行表征,还可以在 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-2}$ 酶活单位/mL 范围内检测蛋白质激酶的活性,检测限为 1×10^{-4} 酶活单位/mL,是目前所知最灵敏的检测方法之一.

Yang 等以多聚(谷氨酸:酪氨酸 = 4:1, by mol)修饰的氧化铟锡电极设计了一种“无标记”检测酪氨酸激酶活性的电化学传感器^[34]. 该传感器利用电极表面多肽中的酪氨酸残基作为电化学信号探针,可以催化溶液中的电子传递促进剂 $\text{Os}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的反应而得到放大的伏安响应信号. 但是,当酪氨酸残基在蛋白质激酶——表皮生长因子受体 EGFR 作用下被磷酸化修饰后,磷酸化的酪氨酸由于失去了催化 $\text{Os}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的能力而无法继续产生电化学响应. 依据峰电流的下降,此传感器可以检测到低至 1 酶活单位/mL 的 EGFR. 此外,该法还被用于蛋白质激酶抑制剂 PD-153035、OSI-774 和 ZD-1839 的研究,测得的抑制常数和传统方法的相近. Xu 等基

于铈离子促发的信号变化提出另一种“无标记”电化学检测方案研究蛋白质磷酸化修饰^[35]. 由于铈离子可以选择性地富集在磷酸化多肽的表面,是一种潜在的磷酸化识别分子. 带有大量正电荷的铈离子可以作为桥梁,将电极表面的磷酸化多肽和带有大量磷酸根的 DNA 功能化金纳米颗粒连接起来,从而将金纳米颗粒固定在电极表面. 随后,大量六氨合铈离子扩散到金纳米颗粒表面产生放大的电化学信号. 此方法对蛋白质激酶 PKA 的检测限为 0.15 酶活单位/mL.

同样,借助金纳米颗粒的信号放大作用,作者课题组设计了一个基于酶响应检测蛋白质磷酸化的电化学方案^[36],如图 2 所示. 当固定在金电极表面的多肽底物在蛋白质磷酸激酶 PKA 的作用下被磷酸化之后,磷酸化的丝氨酸位点被用生物素标记的抗磷酸丝氨酸抗体识别并结合. 此时,通过生物素与链霉亲和素之间的特异性结合,表面修饰有链霉亲和素-辣根过氧化物酶复合物的金纳米颗粒被固定在电极表面. 由于辣根过氧化物酶可以催化氧化其底物 3,3',5,5'-四甲基对二胺基联苯(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)产生电化学信号,因此多肽底物磷酸化前后的电信号会表现出显著的差异. 该法不仅可以表征磷酸化程度,而且可实现对蛋白质磷酸激酶 PKA 活性的检测,

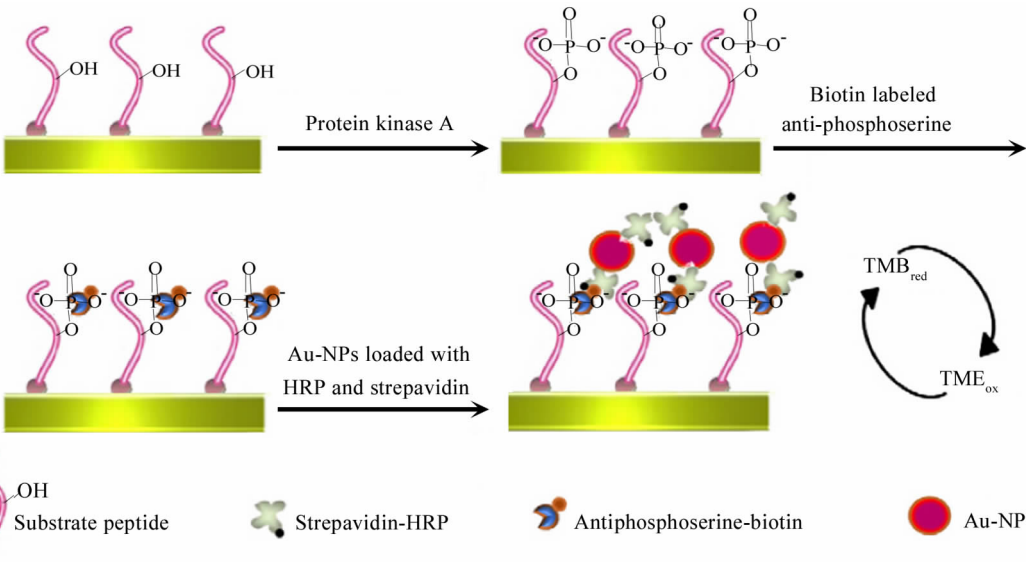


图 2 基于酶响应检测蛋白质磷酸激酶 A 催化的蛋白质磷酸化的电化学策略示意图^[36]

Fig. 2 Schematic illustration of the enzyme-responsive electrochemical strategy for the detection of PKA-catalyzed phosphorylation^[36]

检测限为 1×10^{-3} 酶活单位/mL, 检测范围为 $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-2}$ 酶活单位/mL. 根据紫外催化的标准曲线计算, 1 个金纳米颗粒表面带有 4 个链霉亲和素-辣根过氧化物酶复合物, 而在链霉亲和素-辣根过氧化物酶复合物中, 辣根过氧化物酶和链霉亲和素的摩尔比为 1.5:1. 由此可知, 1 个金纳米颗粒表面携带有 6 个辣根过氧化物酶. 显然, 使用链霉亲和素-辣根过氧化物酶复合物修饰的金纳米颗粒作为信号标记可以产生级联放大的效果, 大大增强检测信号的强度, 提高检测的灵敏度. 同时, 该方案运用了特异性很高的抗体识别体系, 对特异性的检测具有明显的优势.

Song 等使用二茂铁分子修饰的 ATP 作为蛋白质磷酸化反应的磷酸根来源, 对蛋白质磷酸化修饰实现了简便直观的电化学检测^[37]. 当电极表面的底物多肽在蛋白质激酶 PKC 的作用下被磷酸化修饰后, 二茂铁分子跟随磷酸根一同被固定在多肽分子上, 进而与电极表面发生电子传递而产生电化学信号, 并且该电化学信号又随着蛋白质磷酸化程度以及溶液中磷酸激酶浓度的增加而升高. 利用此方法, 可以检测到低至 0.1 酶活单位/

mL 的磷酸激酶.

2 蛋白质生物素化修饰的电化学研究

蛋白质生物素化是转录调节和代谢其中的一个重要过程^[38], 能够影响转录调节的某些途径. 例如, 生物素化的 AMP 能激活可溶性鸟苷酸环化酶, 组蛋白的生物素化可影响染色质的重组. 另一方面, 代谢过程中, 糖异生、脂肪酸代谢和氨基酸代谢的关键步骤都受到蛋白质生物素化的影响. 一个典型的例子是在脂肪酸的合成中, 乙酰辅酶 A 羧化酶——一种重要的生物素依赖酶的生物素化是触发反应的第一个关键步骤^[39].

作者课题组使用生物素连接酶 BirA 及其底物多肽(N-CGLNDIFEAQKIEWR-C)在电极表面模拟研究了蛋白质的生物素化, 并提出一种电化学检测蛋白质生物素化的方法^[40], 如图 3A 所示. 首先, 修饰在电极表面的巯基乙胺分子以其带正电荷的氨基末端将带负电荷的金纳米颗粒吸附在电极表面, 形成一层紧密的金纳米颗粒修饰层. 随后, 底物多肽通过 N 端半胱氨酸的巯基与金纳米颗粒形

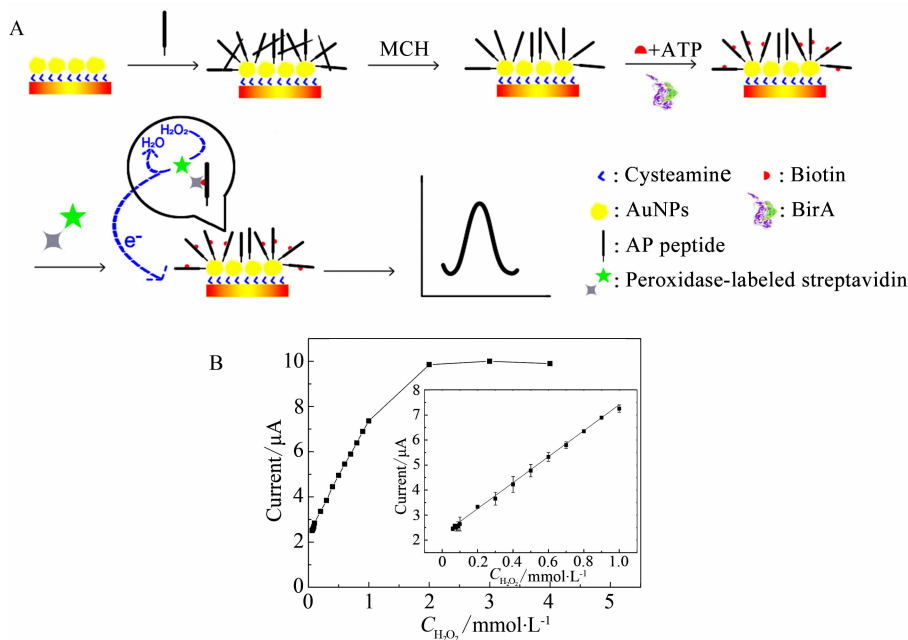


图 3 蛋白质生物素化的电化学模拟与检测示意图(A)和蛋白质生物素化检测峰电流值和 H_2O_2 浓度的关系图(B) (插图为 H_2O_2 在 $6 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内和电流之间的线性关系图)^[40]

Fig. 3 Illustration of electrochemical simulation and detection of protein biotinylation (A) and the relationship between the obtained amperometric current and the concentration of H_2O_2 in the detection of protein biotinylation (B) (Inset shows a linear range from 6×10^{-5} to $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)^[40]

成金硫键固定在电极表面. 经过巯基乙醇的短暂处理, 金纳米颗粒表面的多肽修饰层变得更加致密有序. 在生物素连接酶 BirA 的作用下, 电极表面的底物多肽被生物素修饰, 其赖氨酸残基连接上了生物素分子. 借助生物素和链霉亲和素的亲和作用, 辣根过氧化物酶修饰的亲合素分子结合到电极表面. 利用辣根过氧化物酶催化过氧化氢还原产生的电化学信号, 实现了蛋白质生物素修饰的检测(如图 3B 所示). 该研究不仅提出了高效灵敏检测蛋白质生物素化的电化学方法, 而且在体外构建了一个蛋白质生物素修饰动态研究的模型, 为蛋白质生物素化研究提供了新的思路. 值得一提的是, 该研究方案中引入的金纳米颗粒有效促进了电活性分子和电极之间的电子传递, 增强了电化学催化信号, 从而提高了检测的灵敏性, 同时实验方法也更加方便.

由于生物素分子和抗生物素之间的高度亲和性, 生物素化修饰的蛋白质分子常被作为检测探针广泛应用于生物分析, 尤其是蛋白质的电化学研究^[41-43]. Huang 等利用银纳米颗粒和抗生物素修饰电极将生物素化的乙酰胆碱酯酶固定在电极表面, 用于杀虫剂的电化学检测^[44]. Vidal 等利用电极表面固定的赭曲霉素 A (OTA) 衍生物和溶液中的毒枝菌素竞争性结合生物素化的抗 OTA 抗体, 以抗生物素修饰的辣根过氧化物酶作为电流信号来源, 定量检测溶液样本中的 OTA 含量^[45]. Zhang 等将生物素化的多肽修饰在电极表面作为 Caspase-3 反应底物, 通过监测与生物素结合的碳纳米管探针引发的电化学响应变化实现了 Caspase-3 酶活以及细胞凋亡的检测^[46].

3 蛋白质糖基化修饰的电化学研究

蛋白质糖基化是蛋白质翻译后修饰中最重要的内容之一, 它指的是蛋白质和葡萄糖(醛基糖)之间发生非酶反应生成糖化蛋白的过程. 糖链改变了蛋白质的内在特性, 对糖蛋白整体生物学功能的体现至关重要. 在生物体中超过 50% 的蛋白质都存在不同程度的糖基化, 其中包括染色质蛋白、核孔蛋白、RNA 聚合酶 II、转录因子和蛋白翻译调控因子等等, 涉及到细胞免疫、蛋白质翻译调控和蛋白质降解等众多生物过程^[47]. 此外, 非酶催化血清蛋白, 特别是红血球中的血红蛋白和血清中的白蛋白, 发生糖基化反应是导致糖尿病诸多并发症的重要原因^[48].

作者课题组借助电化学技术分别研究了糖基化对血红蛋白和人血清白蛋白结构和功能的影响, 得出许多有意义的结果^[49]. 在血红蛋白糖基化的研究中, 作者采用传统的蛋白膜伏安法, 研究了含有电活性中心的血红蛋白糖基化前后结构和功能的变化. 如图 4 所示, 以 DMSO 作膜修饰材料, 将血红蛋白固定在石墨电极表面, 得到了良好的循环伏安响应. 但当血红蛋白和一定浓度的葡萄糖共培养之后, 糖基化的血红蛋白在石墨电极表面的电化学响应相对于未经糖基化修饰的血红蛋白有了显著降低, 可能是糖基化修饰改变了血红蛋白血红素中心的微环境, 甚至可能已经破坏了其血红素中心, 使血红素和电极表面之间的电子传递受到抑制. 进一步研究还发现, 峰电流的降低与培养时间以及葡萄糖的浓度成正比. 培养时间越长, 葡萄糖浓度越高, 峰电流的降低越明显, 预示着血红蛋白糖基化的程度越高, 血红素中心的破坏程度越严重. 作者还进一步研究了血红蛋白对氧气的电催化活性, 以此探究糖基化对血红蛋白生理功能的影响. 血红蛋白对氧气的电催化活性可以在一定程度上反映血红蛋白的携氧能力. 电催化活性越高, 表明血红蛋白的携氧能力越高. 电化学测试结果显示, 糖基化显著降低了血红蛋白对氧气的电催化活性. 糖基化程度越高, 该活性的丧失越显著. 由于血红素中心是血红蛋白发挥其生理功能的重要活性位点, 据此可以推断, 血红蛋白的糖基化修饰破坏了血红蛋白血红素中心的结构, 影响了其正常生理功能的发挥, 这或许就是糖尿病诸多并发症的重要成因之一.

血清白蛋白是另一种对糖基化修饰作用比较敏感的蛋白质, 它富含多个分子的结合位点, 可以和很多体内或体外的小分子进行特异性结合, 其中包含和血红素分子特异性结合的位点^[50]. 血清白蛋白的血红素特异性结合位点中的 114 位精氨酸, 186 位精氨酸和 190 位赖氨酸都是碱性氨基酸, 是蛋白质糖基化修饰过程中葡萄糖分子的结合位点. 作者研究了血清白蛋白在糖基化前后和血红素结合能力的变化, 进而探讨了糖基化对血清白蛋白结构功能的影响. 电化学方法首先证实了溶液中游离的血红素分子可以在电极表面得到良好的电化学响应. 但是, 当血红素和血清白蛋白结合之后, 血清白蛋白阻碍了血红素与电极之间的电子传递, 导致血红素的电化学信号下降. 然

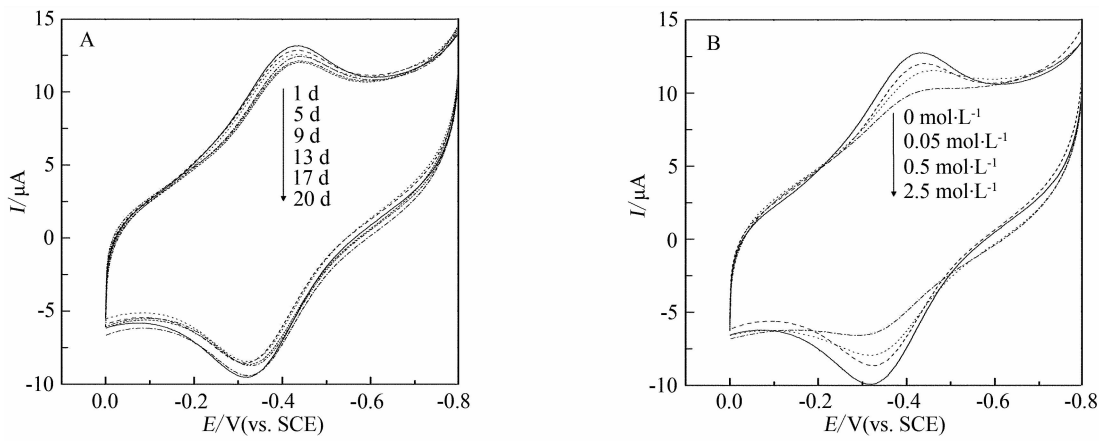


图4 血红蛋白($10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)经 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖培养1,5,9,13,17,20 d(A)和经0,0.05,0.5,2.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖培养20 d(B)后于热解石墨电极表面的循环伏安曲线^[49]

Fig.4 Cyclic voltammograms of the PG electrode immobilized with $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Hb which has been previously incubated with $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ glucose for 1,5,9,13,17 and 20 d (A), and with 0,0.05,0.5,2.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ glucose for 20 d (B)^[49]

而,当血清白蛋白被糖基化之后,其血红素结合位点中的碱性氨基酸残基由于结合了葡萄糖分子而失去和血红素结合的能力,因而使更多的血红素处于游离状态,血红素的信号又有了明显的回升.如图5所示,葡萄糖浓度越高,培养时间越长,由于更多的血清白蛋白被糖基化,导致可以与血红素结合的白蛋白数量变少,使得游离血红素增加,可以观察到的峰电流也就更高.由此可知,糖基化使血清白蛋白的结构发生了明显的改变,致使其丧失了和特定小分子(如血红素)的结合能力,这必然会影响其正常生理功能的发挥,甚至引起严重的后果,引发糖尿病并发症等诸多疾病.

以上结果均表明,有关糖基化修饰对蛋白质结构和功能影响的电化学研究可以为糖尿病等疾病的病理、病因研究提供一定的实验依据,有利于进一步揭示疾病的发生原因,也展示了电化学技术更多潜在的临床检验和研究价值.

蛋白质的糖基化修饰也引起了众多研究组的关注.例如,由于糖基化血红蛋白 HbA_{1c} 是血红蛋白 β -侧链中的缬氨酸残基被糖基化修饰后的产物,是体内长期血糖水平的重要标志^[51-52], Park等^[53]借助葡萄糖分子的顺-二醇结构和硼酸二醇形成的共价键,设法将糖基化血红蛋白 HbA_{1c} 结合到噻吩-3-硼酸修饰的金电极表面,阻碍了溶液中铁氰化钾在电极上的电子传递,导致电极表面阻抗的增加,且其阻抗值随 HbA_{1c} 浓度的增加而增

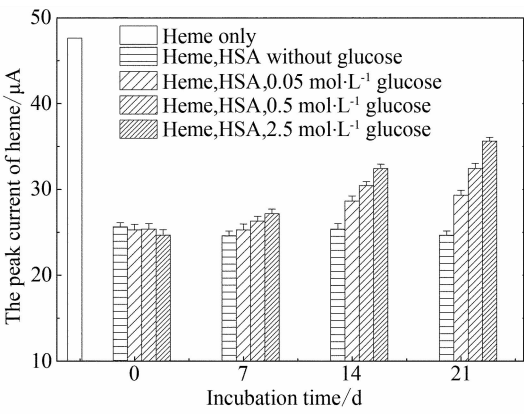


图5 不同浓度葡萄糖糖基化修饰的人血清白蛋白存在下,血红素的峰电流值随培养时间变化的关系图^[49]

Fig.5 Relationship between the peak current of heme and the incubation time for $40\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ HSA glycated by glucose with different concentrations^[49]

大.因此,利用噻吩-3-硼酸自组装膜修饰的金电极可以制备一种选择性检测糖基化血红蛋白 HbA_{1c} 的电化学阻抗传感器.同样利用硼酸修饰电极, Song等^[54]将 HbA_{1c} 固定在硼酸修饰电极表面形成位阻,其作用是阻碍了高碘酸盐处理过的葡萄糖氧化酶在电极表面的吸附.由于葡萄糖氧化酶的氧化还原信号随着 HbA_{1c} 浓度的增加而降低, Song等应用酶回填技术提出了一种检测 HbA_{1c} 的电化学方法,可以检测到占全部血红蛋白2.5%到15%浓度的 HbA_{1c} .

4 蛋白质 N-同型半胱氨酸化修饰的电化学研究

同型半胱氨酸是体内缺少维生素 B₁₂ 时甲硫氨酸去甲基后形成的代谢产物^[52]. 经过转运 RNA 催化,同型半胱氨酸进一步形成内酯结构,变为同型半胱氨酸硫代内酯 (HTL)^[55]. 血液中 HTL 浓度的升高会引起高同型半胱氨酸症,是导致心血管类疾病的重要原因之一. 高浓度 HTL 还会引发神经系统的疾病,如智力衰退和帕金森综合症等. HTL 还被认为与周期性的动脉闭塞、静脉血栓症、孕期综合症等疾病的发生相关^[56]. HTL 在体内的主要作用机理是当它与赖氨酸残基的 ϵ -氨基发生反应后,进而对蛋白质进行 N-同型半胱氨酸化修饰,使其氨基乙酰化并产生游离的巯基末端. 自然状态下,带有这样游离巯基的蛋白质可以通过形成二硫键发生聚集,引发蛋白质一系列性质的改变,如生理活性的降低、溶解度降低以及免疫原性增强等^[57-59],这也是同型半胱氨酸引起细胞损伤和导致心血管疾病的根本原因.

作者课题组以细胞色素 c 作为模型蛋白,采用电化学技术研究了蛋白质 N-同型半胱氨酸化修饰^[60]. 如图 6 所示,当 HTL 与赖氨酸残基的 ϵ -氨基发生反应后,细胞色素 c 表面就会产生自由的同型半胱氨酸巯基. 作者利用这个新增的巯基将 N-同型半胱氨酸化细胞色素 c 自组装在金电极表面,并依据修饰后的细胞色素 c 具有良好的电化学响应研究了这一修饰过程. 结果表明,蛋白质的 N-同型半胱氨酸化修饰是一个与浓度相关的过程. HTL 浓度增加,蛋白质的修饰程度加剧,不仅使更多蛋白的赖氨酸残基被标记上同型半胱氨酸巯基,且同一个蛋白分子上也有更多赖氨酸残基被修饰,以致更多的细胞色素 c 带上了自由的巯基,被修饰的细胞色素 c 也更容易在电极表面自组装,表现出更强的电化学响应. 差分脉冲伏安法研究结果表明,峰电流的增加与 HTL 和细胞色素 c 的摩尔浓度比在 3 ~ 12 范围内呈正比 (如图 7A 所示). 但当二者摩尔浓度比超过 12 之后,峰电流几乎不再增加,说明该比例的 HTL 足以将细胞色素 c 修饰. 进一步研究发现,N-同型半胱氨酸化修饰前后,细胞色素 c 对过氧化氢催化的能力并没有显著的差异,说明 N-同型半胱氨酸化修饰虽然改变了

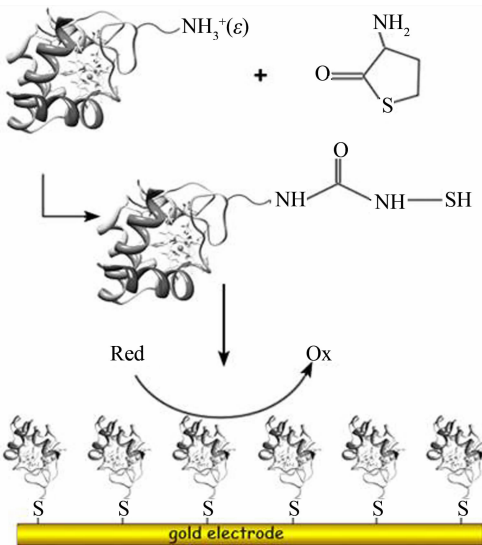


图 6 细胞色素 c N-同型半胱氨酸化修饰的电化学研究示意图^[60]

Fig. 6 Schematic illustration of the electrochemical method in monitoring the modification of cytochrome c with nomocysteine-thiolactone (HTL)^[60]

赖氨酸残基的 ϵ -氨基结构,但并不影响蛋白质的二级结构,也不改变其血红素活性中心的功能.

在这一工作中,作者还进一步研究了抑制剂对 HTL 修饰的影响. 结果表明,随着抑制剂磷酸吡哆醛 (PLP) 的加入,PLP 与 HTL 反应形成噻嗪结构而使 HTL 失去与蛋白质作用的能力,未被修饰的细胞色素 c 由于表面没有自由的巯基,不能被固定在金电极表面,因此也就不能产生电化学信号. 进一步研究发现,峰电流的下降与 PLP 和 HTL 摩尔浓度比在 0 ~ 0.35 范围内成线性关系 (如图 7B 所示). 当 PLP 和 HTL 的摩尔浓度比 > 0.5 之后,电流峰几乎不再下降,说明大部分的修饰反应都被抑制了. 该研究表明,电化学不仅可以作为蛋白质 N-同型半胱氨酸化修饰研究的有效方法,而且可为抑制剂筛选提供一个灵敏的平台.

5 结语与展望

当前,蛋白质翻译后修饰的研究正以各种方式在各个层面上蓬勃开展. 利用电化学方法研究蛋白质修饰,可以高效灵敏地实现各种不同修饰的检测,同时还可进一步揭示、探明相关修饰所涉及的反应过程以及蛋白质修饰前后结构和功能的变化,乃至如何利用其中有益于机体的变化来抑制那些不利于机体的变化. 当然,蛋白质的翻译后修饰作为一个极具挑战性的研究方向,需要综合

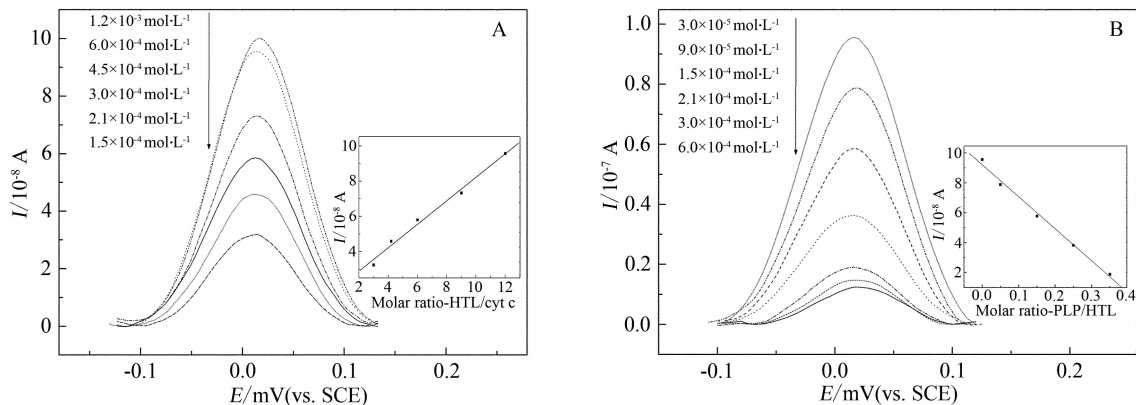


图7 细胞色素 c 和不同浓度 HTL 共培养后得到的差分脉冲伏安图 (A) (插图为阴极峰电流随 HTL/细胞色素 c 摩尔浓度比变化关系图) 和 $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 细胞色素 c + $6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HTL 在不同浓度 PLP 存在条件下共培养后得到的差分脉冲伏安图 (B) (插图为阴极峰电流随 PLP/HTL 摩尔浓度比变化关系图) [60]

Fig. 7 Differential pulse voltammograms for cytochrome c incubated by HTL with different concentrations (A) (the insert shows the relationship between the cathodic peak current and molar ratio of HTL/cytochrome c and differential pulse voltammograms for $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ cytochrome c incubated with $6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HTL treated by different concentrations of PLP (B) (the insert shows the relationship between the cathodic peak current and molar ratio of PLP/HTL) [60]

应用多种现代技术手段. 如何将电化学技术与其它多种研究手段有机结合, 以便在体外甚至体内研究中获得更多有价值的研究成果, 将成为今后努力的方向. 可以预期, 一旦这种结合有效开展起来, 必定会给蛋白质修饰的研究带来更多、更好的发现, 为蛋白质科学以及相关领域的发展做出贡献.

参考文献 (References):

- [1] Appel R D, Bairoch A. Post-translational modifications: A challenge for proteomics and bioinformatics [J]. *Proteomics*, 2004, 4 (6): 1525-15261.
- [2] Mann M, Jensen O N. Proteomic analysis of post-translational modifications [J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21 (3): 255-261.
- [3] Seo J, Lee K J. Post-translational modifications and their biological functions: Proteomic analysis and systematic approaches [J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 37 (1): 35-44.
- [4] Fan C H, Wang H Y, Sun S, et al. Electron transfer reactivity and enzymatic activity of hemoglobin in a SP sephadex membrane [J]. *Analytical Chemistry*, 2001, 73 (13): 2850-2854.
- [5] Zhou H, Gan X, Wang J, et al. Hemoglobin-based hydrogen peroxide biosensor tuned by the photovoltaic effect of nano titanium dioxide [J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77 (18): 6102-6104.
- [6] Zhang W J, Huang Y X, Dai H, et al. Tuning the redox and enzymatic activity of glucose oxidase in layered organic films and its application in glucose biosensors [J]. *Analytical Biochemistry*, 2004, 329 (1): 85-90.
- [7] Shen M, Wang J, Yang M, et al. Direct electrochemistry of the Ti (IV)-transferrin complex: Probing into the transport of Ti (IV) by human serum transferrin [J]. *Electrochemistry Communications*, 2011, 13 (2): 114-116.
- [8] Wang J, Liang Z Q, Wang L H, et al. Electron transfer reactivity and catalytic activity of structurally rigidized hemoglobin [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2007, 125 (1): 17-21.
- [9] Li G X. Protein-based voltammetric sensors [M]//Grimes C A, Dickey E C, Pishko M V (Eds.). *Encyclopedia of sensors*, Volume 8. Stevenson Ranch: American Scientific Publishers, 2006: 301-313.
- [10] Li G X. Protein-based biosensors using nanomaterials [M]//Kumar C (Eds.). *Nanotechnologies for life sciences*, Volume 8. New York: Wiley-VCH, 2007: 278-310.
- [11] Li G X. Heme protein-based electrochemical biosensors [M]//Kadish K M, Smith K M, Guillard R (Eds.). *Handbook of porphyrin science*, Volume 5. Singapore: World Scientific Publishing, 2010: 203-298.
- [12] Li G X (李根喜). *Electrochemical study of protein*

- enzyme[J]. Journal of Shanghai University (Natural Science) (上海大学学报(自然科学版)), 2011, 17(4):567-572.
- [13] Xiao H, Zhou H, Chen G F, et al. Interaction between inducible nitric oxide synthase and calmodulin in Ca^{2+} -free and -bound forms [J]. Journal of Proteome Research, 2007, 6(4):1426-1429.
- [14] Zhang K, Zhu X L, Wang J, et al. Strategy to fabricate an electrochemical aptasensor: Application to the assay of adenosine deaminase activity [J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(8):3207-3211.
- [15] Xiao H, Liu L, Meng F B, et al. Electrochemical approach to detect apoptosis [J]. Analytical Chemistry, 2008, 80(13):5272-5275.
- [16] Liu T, Zhu W, Yang X, et al. Detection of apoptosis based on the interaction between annexin V and phosphatidylserine [J]. Analytical Chemistry, 2009, 81(6):2410-2413.
- [17] Yang Q L, Zhao J, Zhou N D, et al. Electroanalysis of telomere-bending motions caused by hTRF1 [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011, 26(5):2228-2231.
- [18] Huang Y X, Liu L, Shi C, et al. Electrochemical analysis of the effect of Ca^{2+} on cardiolipin-cytochrome c interaction [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1760(12):1827-1830.
- [19] Yang R, Gao G, Liu T, et al. Enhanced ability of hemoglobin to carry oxygen by salidroside [J]. Electrochemistry Communications, 2007, 9(1):94-96.
- [20] Xiao H, Wang J, Chen G F, et al. Electrochemical evaluation of self-disassociation of PKA upon activation by cAMP [J]. Langmuir, 2007, 23(7):3506-3508.
- [21] Huang J Y, Chen L, Zhang X, et al. Electrochemical studies of ion-channel behavior of annexin V in phosphatidylcholine bilayer membranes [J]. Electrochemistry Communications, 2008, 10(3):451-454.
- [22] Liang X Q, Chen G F, Zhang X, et al. Study of UVA irradiation on hemoglobin in the presence of NADH [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2008, 90(1):53-56.
- [23] Wang J, Cao Y, Chen G F, et al. Regulation of thrombin activity with a bifunctional aptamer and hemin: Development of a new anticoagulant and antidote pair [J]. ChemBioChem, 2009, 10(13):2171-2176.
- [24] Zhou N D, Cao Y, Li G X. Electron transfer and interfacial behavior of redox proteins [J]. Science China Chemistry, 2010, 53(4):720-736.
- [25] Liu X J, Huang Y X, Zhang W J, et al. Electrochemical investigation of redox thermodynamics of immobilized myoglobin: Ionic and ligation effects [J]. Langmuir, 2005, 21(1):375-378.
- [26] Huang J Y, Zhang D M, Xing W, et al. An approach to assay the enzymatic activity of calcineurin and the inhibitory effect of zinc ion [J]. Analytical Biochemistry, 2008, 375(2):385-387.
- [27] Cao Y, Wang J, Xu Y, et al. Combination of enzyme catalysis and electrocatalysis for biosensor fabrication: application to assay the activity of indoleamine 2,3-dioxygenase [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2010, 26(1):87-91.
- [28] Miao P, Ning L, Li X, et al. An electrochemical alkaline phosphatase biosensor fabricated with two DNA probes coupled with λ exonuclease [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011, 27(1):178-182.
- [29] Cao Y, Jing W, Xu Y Y, et al. Sensing purine nucleoside phosphorylase activity by using silver nanoparticles [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2010, 25(5):1032-1036.
- [30] Shao Z Y, Liu Y X, Xiao H, et al. PCR-free electrochemical assay of telomerase activity [J]. Electrochemistry Communications, 2008, 10(10):1502-1504.
- [31] Manning G, Whyte D B, Martinez R, et al. The protein kinase complement of the human genome [J]. Science, 2002, 298(5600):1912-1934.
- [32] Cohen P. Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century? [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2002, 1(4):309-315.
- [33] Wang J, Shen M, Cao Y, et al. Switchable “on-off” electrochemical technique for detection of phosphorylation [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2010, 26(2):638-642.
- [34] Yang Y, Guo L H, Qu N, et al. Label-free electrochemical measurement of protein tyrosine kinase activity and inhibition based on electro-catalyzed tyrosine signaling [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011, 28(1):284-290.
- [35] Xu X, Nie Z, Chen J, et al. A DNA-based electrochemical strategy for label-free monitoring the activity and inhibition of protein kinase [J]. Chemical Communications, 2009, 45:6946-6948.
- [36] Wang J, Cao Y, Li Y, et al. Electrochemical strategy for

- detection of phosphorylation based on enzyme-linked electrocatalysis [J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2011, 656 (1/2): 274-278.
- [37] Song H, Kerman K, Kraatz H. Electrochemical detection of kinase-catalyzed phosphorylation using ferrocene-conjugated ATP [J]. Chemical Communications, 2008, 44(4): 502-504.
- [38] Beckett D. Biotin sensing at the molecular level [J]. Journal of Nutrition, 2009, 139(1): 167-170.
- [39] Ng B, Polyak S W, Bird D, et al. Escherichia coli biotin protein ligase: Characterization and development of a high-throughput assay [J]. Analytical Biochemistry, 2008, 376(1): 131-136.
- [40] Wang Z Y, Liu L, Xu Y Y, et al. Simulation and assay of protein biotinylation with electrochemical technique [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011, 26(11): 4610-4613.
- [41] Du D, Wang L, Shao Y, et al. Functionalized graphene oxide as a nanocarrier in a multienzyme labeling amplification strategy for ultrasensitive electrochemical immunoassay of phosphorylated p53 (S392) [J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(3): 746-752.
- [42] Tully E, Higson S P, O'Kennedy R. The development of a 'labelless' immunosensor for the detection of *Listeria monocytogenes* cell surface protein, Internalin B [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2008, 23(6): 906-912.
- [43] Shi X W, Liu Y, Lewandowski A T, et al. Chitosan biotinylation and electrodeposition for selective protein assembly [J]. Macromolecular Bioscience, 2008, 8(5): 451-457.
- [44] Huang X, Du D, Gong X J, et al. Composite assembly of silver nanoparticles with avidin and biotinylated AChE on gold for the pesticidal electrochemical sensing [J]. Electroanalysis, 2008, 20(4): 402-409.
- [45] Vidal J C, Bonel L, Duato P, et al. Improved electrochemical competitive immunosensor for ochratoxin A with a biotinylated monoclonal antibody capture probe and colloidal gold nanostructuring [J]. Analytical Methods, 2011, 3(4): 977-984.
- [46] Zhang J J, Zheng T T, Cheng F F, et al. Electrochemical sensing for caspase 3 activity and inhibition using quantum dot functionalized carbon nanotube labels [J]. Chemical Communications, 2011, 47(4): 1178-1180.
- [47] Li J (李军), Du X (杜鑫), Hosseini Moghaddam S H, et al. The research progress in protein glycosylation modification [J]. Bulletin of Science and Technology (科技通报), 2009, 25(6): 773-783.
- [48] Suzuki K, Yagi K, Oka R, et al. Relationships of serum haptoglobin concentration with HbA1c and glycated albumin concentrations in Japanese type 2 diabetic patients [J]. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2009, 47(1): 70-74.
- [49] Yang J H, Zhao J, Xiao H, et al. Study of hemoglobin and human serum albumin glycation with electrochemical techniques [J]. Electroanalysis, 2011, 23(2): 463-468.
- [50] Nicoletti F, Howes B, Fittipaldi M, et al. Ibuprofen induces an allosteric conformational transition in the heme complex of human serum albumin with significant effects on heme ligation [J]. Journal of the American Chemical Society, 2008, 130(35): 11677-11688.
- [51] Adamczyk M, Chen Y Y, Johnson D D, et al. Chemiluminescent acridinium-9-carboxamide boronic acid probes: application to a homogeneous glycated hemoglobin assay [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2006, 16(5): 1324-1328.
- [52] Nathan D M, Turgeon H, Regan S. Relationship between glycated haemoglobin levels and mean glucose levels over time [J]. Diabetologia, 2007, 50(11): 2239-2244.
- [53] Park J Y, Chang B Y, Nam H, et al. Selective electrochemical sensing of glycated hemoglobin (HbA_{1c}) on thiophene-3-boronic acid self-assembled monolayer covered gold electrodes [J]. Analytical Chemistry, 2008, 80(21): 8035-8044.
- [54] Song S Y, Yoon H C. Boronic acid-modified thin film interface for specific binding of glycated hemoglobin (HbA_{1c}) and electrochemical biosensing [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2009, 140(1): 233-239.
- [55] Clarke R, Daly L, Robinson K, et al. Hyperhomocysteinemia: An independent risk factor for vascular disease [J]. The New England Journal of Medicine, 1991, 324(17): 1149-1155.
- [56] Yang X, Gao Y, Zhou J. Plasma homocysteine thiolactone adducts associated with risk of coronary heart disease [J]. Clinica Chimica Acta, 2006, 364(1/2): 230-234.
- [57] Perla-Kaján J, Twardowski T, Jakubowski H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans [J]. Amino

Acids,2007,32(4):561-572.

[58] Jakubowski H. Pathophysiological consequences of homocysteine excess [J]. The Journal of Nutrition, 2006,136(6 Suppl):1741S-1749S.

[59] Perla-Kaján J, Marczak t, Kaján L, et al. Modification by homocysteine thiolactone affects redox status of cytochrome c [J]. Biochemistry, 2007, 46 (21) : 6225-6231.

[60] Zhao J, Zhu W, Liu T, et al. Electrochemical probing into cytochrome c modification with homocysteine-thiolactone [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010,397(2):695-701.

Electrochemical Study of Protein Modification

ZHAO Jing¹, ZHU Xiao-li¹, LI Gen-xi^{1,2*}

(1. *Laboratory of Biosensing Technology, School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China*; 2. *Department of Biochemistry and State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, China*)

Abstract: Protein post-translational modification is a key physiological procedure, which has received more and more research interests from the scientists not only in protein science but also in some other fields. The usually employed techniques for the study of protein modification include mass spectroscopy, affinity chromatography, etc. Considering the complexity of protein modification and the urgent demand of such kind of study, it is highly required to develop new techniques to perform more studies. Electrochemical methods, which have been widely used in chemical study and analysis, are playing an increasingly important role in many fields of biological studies. The modification of protein may induce chemical changes of specific groups, which may be characterized by using electrochemical methods via various approaches. Therefore, the changes of protein structure and function through protein modification can be revealed and the enzyme activity involved in protein modification may be detected rapidly, sensitively and accurately by taking the advantages of electrochemical methods, and consequently more and more achievements have been obtained. Based on some recent studies in the group of the authors and also some interesting works from other groups, this article reviews the progress of electrochemical study on protein modification, so as to exchange the research ideas with the colleagues in electrochemical community and some others related to protein science.

Key words: protein modification; protein electrochemistry; bioelectrochemistry