

胰蛋白酶镜像酶 LysargiNase 的开发及其在蛋白质组学研究中的应用

张俊令¹, 彭雪辉^{1,2}, 王富强¹, 徐平^{1,2}

1 军事科学院军事医学研究院 生命组学研究所 蛋白质组学国家重点实验室 国家蛋白质科学中心 (北京) 北京蛋白质组研究中心, 北京 102206

2 武汉大学 药学院 组合生物合成和药物开发教育部重点实验室, 湖北 武汉 430071

张俊令, 彭雪辉, 王富强, 等. 胰蛋白酶镜像酶 LysargiNase 的开发及其在蛋白质组学研究中的应用. 生物工程学报, 2019, 35(5): 741–748.

Zhang JL, Peng XH, Wang FQ, et al. Development of LysargiNase, a mirror trypsin and its application in proteomics. Chin J Biotech, 2019, 35(5): 741–748.

摘要: 蛋白质组学是系统鉴定、定量蛋白质及其翻译后修饰形式, 并研究这些蛋白质生物学功能的学科。目前, 基于质谱的鸟枪法蛋白质组学技术是蛋白质组学研究的主要手段之一, 其技术流程是先将蛋白质组样品经位点特异性蛋白酶消化形成肽组, 再进行高效液相色谱分离和质谱检测。而位点特异性蛋白酶对蛋白质样品的消化是质谱检测的前提和基础。随着蛋白质组学研究的深入, 多种位点特异性蛋白酶被先后开发利用; 而切割发生在相应氨基酸的 N 端, 与传统的 C 端蛋白酶互为镜像的蛋白酶的鉴定、开发、特性研究和广泛使用更是为蛋白质组学研究提供了新的工具。文中对最近发现的胰蛋白酶的镜像酶——赖氨酸精氨酸 N 端蛋白酶 (LysargiNase) 的特点及其应用进行综述, 为国内外学者更加广泛的使用创造条件。

关键词: 镜像酶, 赖氨酸精氨酸 N 端蛋白酶, 蛋白质组学, 质谱

Received: September 11, 2018; **Accepted:** November 20, 2018

Supported by: Major Projects for Precision Medicine Research (Nos. 2017YFC0906600, 2017YFC0906700), National Special Project on Infectious Diseases (No. 2018ZX10302302001), National Natural Science Foundation Youth Project (Nos. 31670834, 31870824).

Corresponding authors: Ping Xu. Tel: +86-10-61777113; Fax: +86-10-61777050; E-mail: xuping_bprc@126.com

Fuqiang Wang. Tel: +86-10-61777119; Fax: +86-10-61777050; E-mail: fqw3@hotmail.com

精准医学研究重点专项 (Nos. 2017YFC0906600, 2017YFC0906700), 国家传染病重大专项 (No. 2018ZX10302302001), 国家自然科学基金青年项目 (Nos. 31670834, 31870824) 资助。

Development of LysargiNase, a mirror trypsin and its application in proteomics

Junling Zhang¹, Xuehui Peng^{1,2}, Fuqiang Wang¹, and Ping Xu^{1,2}

1 State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences (Beijing), Beijing Institute of Lifeomics, Beijing 102206, China

2 Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Development, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract: Proteomics is a fast-growing discipline that aims at systematic identification, quantification of proteins and their post-translational modifications in cells. Mass spectrometry-based shotgun proteomics technology is currently one of the mainstream methods for proteomics research. With this method, proteins need to be digested to peptides by site-specific proteases before they can be detected with mass spectrometry. Therefore, site-specific proteases played key roles in this process and so far, a variety of specific proteases have been developed and used in proteomics study. Particularly, the identification, characterization and development of proteases that cleave at the N-termini of corresponding amino acid residues, which are just mirrors to those of typical C-termini proteases, provide novel tools for proteomics analysis. In this review, we summarized the proprieties of LysargiNase, a most recently identified mirror trypsin, and its applications in proteomics research to promote its more widespread usage.

Keywords: mirror protease, LysargiNase, proteomics, mass spectrometry

蛋白质不仅是细胞的主要组成成分,也是生物学功能的主要执行者。蛋白质组学是系统鉴定、定量蛋白质及其翻译后修饰形式,并研究这些蛋白质生物学功能的新兴学科。随着质谱技术的快速发展,基于质谱的蛋白质组学方法已经成为生命科学和健康医学研究中不可或缺的工具^[1]。

鸟枪法是基于质谱的蛋白质组学最常用的研究策略。其技术流程是先将蛋白质组样品经位点特异性蛋白酶消化形成肽组,再进行高效液相色谱分离和质谱检测。其中位点特异性蛋白酶的研发和使用是高效蛋白质组学技术发展的前提和基础^[2]。

随着蛋白质组研究的迅速发展,新的特异性蛋白酶陆续被开发,多组合酶切方法的建立促进了蛋白质组深度覆盖鉴定技术的发展,也进一步提升了翻译后修饰位点鉴定的效率^[3-4]。

1 蛋白质组学研究中常用的蛋白酶

1.1 C端蛋白酶

胰蛋白酶 (Trypsin) 是蛋白质组学研究中常用的蛋白酶,可以高效、特异地切割赖氨酸和

精氨酸的 C 端。由于赖氨酸和精氨酸在蛋白质序列中分布较广,蛋白质样品经 Trypsin 消化后可产生平均长度为 14 个氨基酸残基并以碱性氨基酸结尾的肽段^[3,5-8]。这些肽段的羧基端的赖氨酸或精氨酸残基上以及氨基端分别带有一个正电荷^[9],使得它们在离子阱中碰撞诱导解离(Collision-induced dissociation, CID) 时产生 b、y 类型(y 离子为主)的离子碎片,便于被质谱有效检测^[9-11]。因此,胰蛋白酶贡献了目前蛋白质组数据库中绝大部分的数据^[3]。

丝氨酸蛋白酶 LysC 可特异性地切割赖氨酸的 C 端,对多种变性剂,如即使高达 8 mol/L 的尿素,都具有较好的耐受性,因此, LysC 经常被用于 Trypsin 处理之前的消化,可提高 Trypsin 的消化效率^[4],从而实现蛋白质组的高效鉴定。

同属丝氨酸蛋白酶的 GluC 能特异切割天冬氨酸和谷氨酸的 C 端,但其酶切特异性受制于反应缓冲液的 pH 值和组成成分^[3,12]。在碳酸氢铵和醋酸铵缓冲液中,该酶对谷氨酸残基的酶切特异性高达 80%左右,而对天冬氨酸残基的酶切特异

性仅占 8% 左右;而在磷酸盐缓冲液中,谷氨酸和天冬氨酸残基均可被酶切。GluC 用于多组合酶切可以有效缩短那些不含赖氨酸和精氨酸肽的长度,使之更容易被检测,从而有效提高蛋白质鉴定的覆盖度。

ArgC 则是一种半胱氨酸蛋白酶,可以特异性地切割精氨酸的 C 端。此外,该酶还可以低效切割赖氨酸的 C 端。因此,ArgC 的酶切特异性较差^[13],经常用于多组合酶切,从而提高蛋白质鉴定的覆盖度^[14]。

胃蛋白酶 (Pepsin) 属天冬氨酸蛋白酶,倾向于切割芳香族氨基酸 (酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸) 的 C 端,它在低 pH (pH 1–4) 下活性最高,对于二硫键的质谱解析非常有利^[4]。

糜蛋白酶 (Chymotrypsin), 又叫胰凝乳蛋白酶,可以切割疏水性氨基酸 (苯丙氨酸、酪氨酸、亮氨酸、色氨酸和甲硫氨酸等) 的 C 端,可用于膜蛋白的跨膜区域的鉴定。但是,由于该酶的酶切位点为多种疏水性氨基酸而容易导致过多的漏切^[4]。

同属丝氨酸蛋白酶的野生型和突变型 α -溶酶性蛋白酶 (α -lytic protease, WaLP/MaLP) 可以特异性地切割脂肪族氨基酸的羧基端,因此, WaLP/MaLP 可以用于膜蛋白的鉴定。但是,由于酶切位点太多,消化产生的肽段较随机,会影响蛋白质组学实验数据的重复性^[4,15]。

另外,在结构蛋白质组学研究中,非特异性的蛋白酶 K (Proteinase K) 被应用于交联肽的结构解析^[16];在膜蛋白的鉴定中,利用蛋白酶 K 消化产生的重叠肽帮助鉴定共价修饰 (磷酸化和甲基化)^[17]。

1.2 N 端蛋白酶

除这些 C 端蛋白酶外,越来越多的 N 端蛋白酶被发现和应用。如金属蛋白酶 AspN,可以特异性地切割天冬氨酸的 N 端或谷氨酸的 N 端。同属金属蛋白酶的 LysN 则特异地切割赖氨酸的 N 端。

而赖氨酸精氨酸 N 端蛋白酶 (LysargiNase) 是一种锌离子依赖的金属蛋白酶,可以特异性地切割赖氨酸和精氨酸的 N 端。

这些切割特异位点的 N 端蛋白酶与对应的 C 端蛋白酶,如 LysC/LysN^[18]、GluC/AspN^[4]、Trypsin/LysargiNase^[19]可以产生除末端氨基酸残基之外中间位置的氨基酸顺序一致的肽段^[20],因此被形象地称为镜像酶。在质谱检测时,N 端蛋白酶酶切产生的肽段中碱性氨基酸残基位于 N 端,使得电荷主要集中分布在肽段的 N 端,因此,在 CID/HCD 碎裂模式下形成的谱图具有比 y 系列离子更强的 b 系列离子峰,与普通 C 端蛋白酶消化肽段得到的 y 离子峰较强的特性形成互补,成对使用可以提高碎片离子的覆盖度,实现所鉴定肽段的完整测序^[20]。

其中,最近发现、鉴定的胰蛋白酶的镜像酶——LysargiNase 表现出较高的酶切特异性和活性,与 Trypsin 组合使用显示了广泛的应用前景,因此,文中对其特点及应用进行综述。

2 LysargiNase 的发现

LysargiNase 的发现源于对人妊娠相关血浆蛋白 A (Pregnancy-associated plasma protein A, PAPP-A) 的研究。PAPP-A 是 metzincin 部落 (Metzincin clan) 中的一员,也称为 pappalysin-1 或 IGFBP-4 蛋白酶,是一种高度糖基化的 170 kDa 的多结构域蛋白酶,特异性切割胰岛素样生长因子结合蛋白 (IGFBPs)。Tallant 等通过生物信息学检索分析,从古菌嗜乙酸甲烷八叠球菌 *Methanosarcina acetivorans* C2A 中鉴定了一个新的可能的 PAPP-A,将其命名为“ulilysin”^[21]。

通过对 ulilysin 和 pappalysin 的底物特异性和活性的研究,Tallant 等发现 ulilysin 可以特异地切割赖氨酸和精氨酸的 N 端^[22–23]。2015 年 Huesgen 等根据 ulilysin 的酶切位点特异性将其名称改为

LysargiNase^[19]。由于 LysargiNase 的酶切位点与 Trypsin 成镜像,因此,也称之为胰蛋白酶镜像酶。

3 LysargiNase 的特性

3.1 LysargiNase 的结构

在嗜乙酸甲烷八叠球菌中, LysargiNase 以酶原形式表达,由 342 个氨基酸组成,分子量大小为 40 kDa。在 Ca^{2+} 的介导下, LysargiNase 酶原 (Pro-LysargiNase) 可以在 Arg61 和 Ala322 两个位点发生自切,从而产生有活性的 29 kDa 成熟的 LysargiNase (Arg61-Ala322)^[21]。

LysargiNase 是唯一一个被发现的古菌 pappalysin, 与人类 PAPP-A 具有序列相似性,均属于金属蛋白酶中的锌金属蛋白酶超家族 (Zincins superfamily) 中的 metzincin 部落 (Metzincin clan)。该部落中的蛋白酶都包含一个锌结合共有序列 (Zinc-binding consensus sequence, ZBCS) HEXXHXXGXXH/D (X 代表 20 种氨基酸中的任何一种)。该序列提供了 3 个锌配体残基 (由 3 个或 2 个组氨酸和 1 个天冬氨酸组成) 和作为广义碱 (General base) 的谷氨酸残基,具有高度保守性^[21]。此外,该部落蛋白在邻近活性中心特定位置还有一个含甲硫氨酸的 1,4- β -转角,称之为甲硫氨酸转角 (Met turn),甲硫氨酸转角在结构和空间上具有保守性,且对于酶结构的完整性和功能的发挥是不可缺少的^[24]。Metzincin 部落的命名也源于此特性。Metzincin 部落已有多个家族成员,如虾红素 astacins、ADAMs4/adamalysins、serralysins、matrix metalloproteinases (MMPs)、leishmanolysins、snapalysins 和 pappalysins,它们均已具有其蛋白质结构信息,为深入研究这些蛋白的功能创造了条件^[25-29]。

根据这些蛋白质结构预测,metzincin 部落成员具有相似的骨架结构和活性位点。利用锌结合蛋白家族蛋白酶的序列和结构相似性,预测

LysargiNase (Arg61-Ala322) 的二级结构主要包括 8 个 β 链 (β -strand) (β 1、 β 2、 β 3、 β 4、 β 5、 β 6、 β 7、 β 8) 和 5 个 α 螺旋 (α -helix) (α 1、 α 2、 α 3、 α 4、 α 5), 其三维结构为椭球状分子^[21]。

LysargiNase 分子可被锌离子结合位点即活性位点分为两部分。其中,一部分是富含规则的二级结构的蛋白质 N 端亚结构域 (NTSD, Arg61-Asn235),另一部分为具有不规则二级结构的蛋白质 C 端亚结构域 (CTSD, Leu236-Ala322)。NTSD 是通过强烈扭曲的 β 1 从分子的背面进入,主要是 5 个平行的 β 折叠片;CTSD 起始于 Leu236,并具有可作为两个邻近钙结合位点的支架^[24]。

LysargiNase 活性位点裂缝的顶部由 NTSD 的反平行链 β 7 (其反向平行于结合的肽底物) 和 β 5- β 6 带构成,其中, β 5- β 6 带远离活性位点裂缝的区域用来调节填充进去的底物残基。裂缝底部由 CTSD 内的 Tyr237-Trp240、Pro265-Gly268、甲硫氨酸转角 (Met turn) 及其后的 4 个残基 (Asn288-Asp295) 的片段组成^[23]。起催化作用的锌离子通过溶剂分子和 ZBCS 中的 His228、His232 和 His238 的 N 原子形成四面体配位嵌入活性位点 α 4 中。

控制 LysargiNase 活性的开关是 2 个钙离子^[24]。它们的结合位点位于 LysargiNase 的 CTSD 中。当钙离子缺失时, LysargiNase 是无活性的;当钙离子存在时,该酶的结构才能被固定,并具有特异的酶切活性。

3.2 LysargiNase 的蛋白酶活性

LysargiNase 可特异地切割赖氨酸和精氨酸的 N 端,酶切特异性高达 92%,而且与 Trypsin 类似,酶切活性略倾向于赖氨酸残基 (K : R 约 52% : 40%)^[19]。由于 LysargiNase 的酶切特点,可以产生 N 端带碱性氨基酸残基 (K/R) 的肽段,这种肽段的正电荷都位于其 N 端,因此,胰蛋白酶镜像酶消化的肽段在 CID 和 HCD 碎裂模式下产生以 b

离子为主的碎片离子,而在 ETD 碎裂模式下产生以 c 离子为主的碎片离子^[20]。不仅如此,LysargiNase 消化产生的肽段在碎裂时也易产生 a 离子,这些 a 离子可增加肽段鉴定的可信度^[19]。

LysargiNase 还可切开多种翻译后修饰,如甲基化、对称或不对称的二甲基化修饰的赖氨酸或精氨酸残基的 N 端,呈现出一定的二位、三位的羧基酶活性。但 LysargiNase 无法切开乙酰化修饰的赖氨酸残基^[19],这为该酶的结构改造和稳定性研究指明了方向。

LysargiNase 的特性研究显示了与 Trypsin 有很好的互补性,因此 Trypsin/LysargiNase 的联合使用或许可以弥补各自单独使用的缺陷,为解决质谱蛋白质鉴定中的系列难题提供广阔的应用前景。

4 LysargiNase 在蛋白质组学研究中的应用

4.1 蛋白质 C 末端蛋白质组鉴定

蛋白质羧基端的氨基酸序列及其修饰状态影响着蛋白质的生物学功能,在多种生物学过程中发挥重要作用。例如,许多生物活性肽羧基端的 α -酰胺化可以中和羧基的负电荷,从而提高其与受体的结合能力,增强结合的稳定性^[30]。因此蛋白质羧基端结构解析至关重要^[31-32]。

在基于质谱的蛋白质组学研究中,传统的 Trypsin 可以特异性地切割赖氨酸和精氨酸的 C 端,产生 C 端带碱性氨基酸的肽段,但这使得蛋白质的羧基端肽段缺乏碱性氨基酸从而易产生一价离子,不能被质谱检测。LysargiNase 可特异地切割赖氨酸和精氨酸的 N 端,产生 N 端带碱性氨基酸的肽段,这一特点可有效促进蛋白质羧基端肽段的鉴定。质谱检测发现, Trypsin 消化的 MDA-MB-231 细胞裂解物中鉴定到 39 个蛋白质 C 端肽段,占肽段总鉴定量的 0.9%;而在 LysargiNase 消化的 MDA-MB-231 细胞裂解物中

鉴定到了 70 个蛋白质 C 端肽段,占肽段总鉴定量的 2.1%,是胰蛋白酶的 2 倍^[19]。因此,利用 LysargiNase 可实现蛋白质 C 端蛋白质组学深度覆盖。

4.2 磷酸化蛋白质组研究

2015 年 Overall 等^[19]研究发现, LysargiNase 可在 Trypsin 基础上将磷酸化位点的覆盖度提高 23%。有意思的是 LysargiNase 更有利于鉴定到 RXS 和 RXXSP 等类型的 motif。而这一类 motif 正是 PKC、ERK 和 CDK5 等激酶识别的底物^[33]。2017 年 Heck 等关于 LysargiNase 的研究表明,ETD 碎裂模式可将 LysargiNase 酶切后的产物二级谱鉴定率由 20% 提高到 41%。他们分别利用 Trypsin 和 LysargiNase 鉴定到 12 280 个和 6 686 个磷酸化位点,但其中仅有 3 852 个位点被共同鉴定, LysargiNase 单独鉴定到 2 834 个磷酸化位点,使得磷酸化位点的鉴定量提高了 18.7%。对这些位点的深入分析发现, LysargiNase 对某些位点的鉴定具有偏好性,如 RB1 的 S788 和 Y813 位点只能被 LysargiNase 鉴定到,不能被 Trypsin 鉴定到^[20]。

我们实验室的研究发现, LysargiNase 酶切后鉴定的磷酸化肽段与 Trypsin 具有很强的互补性。因此用它来提高磷酸化蛋白质组覆盖度的同时,也能够提供新的磷酸化 motif 和位点信息 (Peng, X et al. 未发表数据)。

4.3 甲基化蛋白质组鉴定

蛋白质甲基化是一种重要的翻译后修饰,主要发生在精氨酸和赖氨酸残基上。蛋白质的甲基化修饰参与多种细胞过程,包括信号转导、mRNA 剪接、转录控制、DNA 修复和蛋白质易位等。精氨酸的甲基化主要有 ω -NG-单甲基精氨酸 (MMA)、 ω -NG,NG-不对称二甲基精氨酸 (aDMA) 和 ω -NG,N'G-对称二甲基精氨酸 (sDMA) 3 种形式^[34]。赖氨酸的甲基化主要有 ϵ -N-单甲基赖氨酸、

ϵ -N-二甲基赖氨酸或 ϵ -N-三甲基赖氨酸 3 种类型^[35-36]。蛋白质甲基化的失调通常与各种疾病状态相关,包括癌症^[37-38]、心血管和肺部疾病^[37]、神经退行性疾病^[39-41]等。因此,对于蛋白质甲基化修饰的鉴定有助于相关疾病的诊疗。

在翻译后修饰蛋白质组学研究中,胰蛋白酶 (Trypsin) 对于被修饰的赖氨酸和精氨酸残基会产生漏切,从而影响甲基化位点的鉴定^[11, 42]。而 LysargiNase 可以切割甲基化修饰的赖氨酸和精氨酸,比 Trypsin 切割甲基化赖氨酸的能力高出 7 倍左右^[19]。另外, LysargiNase 还可以切割精氨酸的 3 种甲基化形式,而 Trypsin 只能切割未修饰的精氨酸^[1]。Ma 等^[43]利用 LysargiNase 和 Trypsin 的组合酶切,将甲基化位点的鉴定量在传统的 Trypsin 消化基础上提高了 80%,且 LysargiNase 消化产生的甲基化肽段表明其切割可能更倾向于某些特定 motif,例如 RG、RGG 等。

LysargiNase 与 Trypsin 的互补性可用于提高甲基化位点的鉴定量,促进表观遗传学的研究和甲基化修饰相关疾病的研究。

虽然 LysargiNase 与 Trypsin 相比,在鉴定翻译后修饰方面有较好的优势和补充,但是,实验数据显示 LysargiNase 的肽段和蛋白鉴定量略低于 Trypsin^[17],而镜像酶的成对使用对两个酶的活性、位点特异性等提出了更高的要求。因此,要想使 LysargiNase 和 Trypsin 组合的使用发挥更好的作用,可能需要根据 LysargiNase 的结构和活性特点对其进行改造。

5 小结与展望

蛋白质及其翻译后修饰鉴定技术的发展得益于位点特异性蛋白酶的开发和性能的改善。以 LysargiNase 为代表的镜像酶的开发及其在蛋白质组学研究中的应用,不仅促进了传统蛋白质组学中难鉴定的 C 端蛋白质组研究,提升了蛋白质组研究的技术水平,而且已为多种蛋白质翻译后修

饰鉴定研究提供了强有力的技术支持。随着对 LysargiNase 性质认识的不断深化、样品制备技术的改进以及质谱技术的发展,针对 LysargiNase 开发出更加高效甚至全新的鉴定策略,必然会进一步推动蛋白质组学深度覆盖鉴定和定量技术的进步,为深入探究蛋白质在生命活动中的功能奠定坚实的技术基础。

REFERENCES

- [1] Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, et al. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature*, 2014, 509(7502): 582–587.
- [2] Wu FL, Zhao MZ, Zhang Y, et al. Application of optimized multi-enzyme combination and sample pretreatment in proteomics. *Chin J Biotech*, 2016, 32(3): 306–316 (in Chinese).
吴飞林, 赵明治, 张瑶, 等. 蛋白质水解酶和样品预处理优化技术在蛋白质组学研究中的应用. *生物工程学报*, 2016, 32(3): 306–316.
- [3] Tsiatsiani L, Heck AJR. Proteomics beyond trypsin. *FEBS J*, 2015, 282(14): 2612–2626.
- [4] Giansanti P, Tsiatsiani L, Low TY, et al. Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin. *Nat Protocols*, 2016, 11(5): 993–1006.
- [5] Bensimon A, Heck AJR, Aebersold R. Mass spectrometry-based proteomics and network biology. *Ann Rev Biochem*, 2012, 81: 379–405.
- [6] Altelaar AF, Munoz J, Heck AJR. Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(1): 35–48.
- [7] Munoz J, Low TY, Kok YJ, et al. The quantitative proteomes of human-induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Mol Syst Biol*, 2011, 7: 550.
- [8] Neuhauser N, Nagaraj N, Mchardy P, et al. High performance computational analysis of large-scale proteome data sets to assess incremental contribution to coverage of the human genome. *J Proteome Res*, 2013, 12(6): 2858–2868.
- [9] Tabb DL, Huang YY, Wysocki VH, et al. Influence of basic residue content on fragment ion peak intensities

- in low-energy collision-induced dissociation spectra of peptides. *Anal Chem*, 2004, 76(5): 1243–1248.
- [10] Olsen JV, Ong SE, Mann M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol Cellular Proteom*, 2004, 3(6): 608–614.
- [11] Hohmann L, Sherwood C, Eastham A, et al. Proteomic analyses using *Grifola frondosa* metalloendoprotease Lys-N. *J Proteome Res*, 2009, 8(3): 1415–1422.
- [12] Drapeau GR, Boily Y, Houmard J. Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, 1972, 247(20): 6720–6726.
- [13] Krueger RJ, Hobbs TR, Mihal KA, et al. Analysis of endoproteinase Arg C action on adrenocorticotrophic hormone by capillary electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 1991, 543: 451–461.
- [14] Guo XF, Trudgian DC, Lemoff A, et al. Confetti: a multiprotease map of the *HeLa* proteome for comprehensive proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13(6): 1573–1584.
- [15] Meyer JG, Kim S, Maltby DA, et al. Expanding proteome coverage with orthogonal-specificity α -lytic proteases. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13(3): 823–835.
- [16] Wu CC, Maccoss MJ, Howell KE, et al. A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(5): 532–538.
- [17] Petrotchenko EV, Serpa JJ, Hardie DB, et al. Use of proteinase K nonspecific digestion for selective and comprehensive identification of interpeptide cross-links: application to prion proteins. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11(7): M111.013524.
- [18] Taouatas N, Drugan MM, Heck AJR, et al. Straightforward ladder sequencing of peptides using a Lys-N metalloendopeptidase. *Nat Methods*, 2008, 5(5): 405–407.
- [19] Huesgen PF, Lange PF, Rogers LD, et al. LysargiNase mirrors trypsin for protein C-terminal and methylation-site identification. *Nat Methods*, 2015, 12(1): 55–58.
- [20] Tsiatsiani L, Giansanti P, Scheltema RA, et al. Opposite Electron-transfer dissociation and higher-energy collisional dissociation fragmentation characteristics of proteolytic K/R(X)_n and (X)_nK/R peptides provide benefits for peptide sequencing in proteomics and phosphoproteomics. *J Proteome Res*, 2017, 16(2): 852–861.
- [21] Tallant C, Garc á-Castellanos R, Seco J, et al. Molecular analysis of ulilysin, the structural prototype of a new family of metzincin metalloproteases. *J Biol Chem*, 2006, 281(26): 17920–17928.
- [22] Tallant C, Garc á-Castellanos R, Marrero A, et al. Activity of ulilysin, an archaeal PAPP-A-related gelatinase and IGFBP protease. *Biol Chem*, 2007, 388(11): 1243–1253.
- [23] Garc á-Castellanos R, Tallant C, Marrero A, et al. Substrate specificity of a metalloprotease of the pappalysin family revealed by an inhibitor and a product complex. *Arch Biochem Biophys*, 2007, 457(1): 57–72.
- [24] Tallant C, Garc á-Castellanos R, Baumann U, et al. On the relevance of the Met-turn methionine in metzincins. *J Biol Chem*, 2010, 285(18): 13951–13957.
- [25] Zhu ZL, Gong WM, Zhu XY, et al. Purification, characterization and conformational analysis of a haemorrhagin from the venom of *Agkistrodon acutus*. *Toxicon*, 1997, 35(2): 283–292.
- [26] Stöcker W, Grams F, Baumann U, et al. The metzincins—topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci*, 1995, 4(5): 823–840.
- [27] Bode W, Gomis-Rüth FX, Stöckler W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the ‘metzincins’. *FEBS Lett*, 1993, 331(1/2): 134–440.
- [28] Gomis-Rüth FX. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol Biotechnol*, 2003, 24(2): 157–202.
- [29] Gomis-Rüth FX. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *J Biol Chem*, 2009, 284(23): 15353–15357.
- [30] Prigge ST, Mains RE, Eipper BA, et al. New insights into copper monooxygenases and peptide amidation:

- structure, mechanism and function. *Cell Mol Life Sci CMLS*, 2000, 57(8/9): 1236–1259.
- [31] Zhang CX, Weber BV, Thammavong J, et al. Identification of carboxyl-terminal peptide fragments of parathyroid hormone in human plasma at low-picomolar levels by mass spectrometry. *Anal Chemistry*, 2006, 78(5): 1636–1643.
- [32] Johnson KA, Paisley-Flango K, Tangarone BS, et al. Cation exchange-HPLC and mass spectrometry reveal C-terminal amidation of an IgG1 heavy chain. *Anal Biochem*, 2007, 360(1): 75–83.
- [33] Rogers LD, Brown NF, Fang Y, et al. Phosphoproteomic analysis of *Salmonella*-infected cells identifies key kinase regulators and SopB-dependent host phosphorylation events. *Sci Signal*, 2011, 4(191): rs9.
- [34] Blanc RS, Richard S. Arginine methylation: the coming of age. *Mol Cell*, 2017, 65(1): 8–24.
- [35] Dillon SC, Zhang X, Trievel RC, et al. The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol*, 2005, 6(8): 227.
- [36] Zhang XD, Bruice TC. Histone lysine methyltransferase SET7/9: formation of a water channel precedes each methyl transfer. *Biochemistry*, 2007, 46(51): 14838–14844.
- [37] Martin C, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(11): 838–849.
- [38] Peng C, Wong CCL. The story of protein arginine methylation: characterization, regulation, and function. *Expert Rev Proteomics*, 2017, 14(2): 157–170.
- [39] Pope AJ, Karupiah K, Cardounel AJ. Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. *Pharmacol Res*, 2009, 60(6): 461–465.
- [40] Obeid R, Schadt A, Dillmann U, et al. Methylation status and neurodegenerative markers in Parkinson disease. *Clin Chem*, 2009, 55(10): 1852–1860.
- [41] Lu HY, Liu XZ, Deng YL, et al. DNA methylation, a hand behind neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci*, 2013, 5: 85.
- [42] Wang KY, Dong MM, Mao JW, et al. Antibody-free approach for the global analysis of protein methylation. *Anal Chem*, 2016, 88(23): 11319–11327.
- [43] Ma M, Zhao XY, Chen S, et al. Strategy based on deglycosylation, multiprotease, and hydrophilic interaction chromatography for large-scale profiling of protein methylation. *Anal Chem*, 2017, 89(23): 12909–12917.

(本文责编 陈宏宇)