



## 植物蛋白质S-亚硝基化修饰的检测与分析

陈立超<sup>†</sup>, 詹妮<sup>†</sup>, 李彦莎, 冯健, 左建儒<sup>\*</sup>

中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101

**摘要** S-亚硝基化是一种重要的蛋白质翻译后修饰方式, 是指一氧化氮(NO)基团共价连接至靶蛋白特定半胱氨酸残基的自由巯基, 从而形成S-亚硝基硫醇(SNO)的过程。S-亚硝基化修饰广泛存在于各有机体中, 通过改变蛋白质生化活性、稳定性、亚细胞定位以及蛋白质-蛋白质相互作用等机制而调控不同的生物学过程或信号通路。在蛋白质S-亚硝基化检测分析方法中, 最为广泛使用的是生物素转化法(biotin switch assay), 其基本原理是首先封闭未被修饰的自由巯基, 进而将被修饰的SNO基团特异地还原为自由巯基并使用生物素将其特异标记。被生物素标记的半胱氨酸残基(即被修饰位点)可进一步通过蛋白质免疫印迹和/或质谱等方法进行检测分析。该文详细描述了植物蛋白质样品的体内和体外生物素转化法的实验流程, 并对实验过程中的注意事项进行了讨论。

**关键词** 一氧化氮, S-亚硝基化, 生物素转化法, 植物

陈立超, 詹妮, 李彦莎, 冯健, 左建儒 (2019). 植物蛋白质S-亚硝基化修饰的检测与分析. 植物学报 54, 497–502.

一氧化氮(nitric oxide)是一种氮氧化物, 其化学式为NO, 相对分子量为30.01, 是一种结构简单的气体小分子。NO带有自由基, 其化学性质非常活泼。在常温下, NO为气体, 微溶于水并具有脂溶性, 可以快速透过生物膜扩散。因其上述性质, NO可以作为一种气体信号分子, 将细胞内产生的信息传递至周围的细胞质中, 并参与电子传递反应以及生物体的氧化还原反应。NO在有有机体的诸多生物学过程中都发挥重要的调控作用。在高等植物中, NO参与调控众多生长发育过程, 包括开花、种子萌发、叶片形态、气孔开闭及重力响应等(He et al., 2004; Albertos et al., 2015; Wang et al., 2015; Paris et al., 2018; Feng et al., 2019; Pan et al., 2019; Zhang et al., 2019a, 2019b)。此外, NO也参与调控植物对生物与非生物胁迫的响应(Chen et al., 2009; Yang et al., 2015; Lytvyn et al., 2016; Hu et al., 2017; Shi et al., 2017; Cui et al., 2018; Zhan et al., 2018; Feng et al., 2019)。

NO发挥其生理效应的主要方式之一是对靶蛋白的特异半胱氨酸位点进行翻译后修饰。NO通过可逆

地共价结合到蛋白质的半胱氨酸巯基(Cys-SH)上形成亚硝基硫醇(S-nitrosothiols, SNO), 这一过程被称为S-亚硝基化修饰(Hess et al., 2005)。S-亚硝基化修饰通常被认为是一种非酶促反应。然而, 近期的研究表明, 在特定条件下, S-亚硝基化修饰是一种由众多相关蛋白质参与的酶促反应过程(Seth et al., 2018)。与其它类型的蛋白质翻译后修饰(如泛素化、磷酸化和乙酰化)类似, S-亚硝基化修饰可以在多个层面改变蛋白质的功能(Hess and Stamler, 2012; Feng et al., 2019), 如蛋白质的亚细胞定位、蛋白质与蛋白质之间的互作、蛋白质的生物学活性以及蛋白质的稳定性。现有的研究表明, S-亚硝基化修饰通过改变蛋白质的功能而调控有机体的生长发育过程以及对胁迫的响应(Tada et al., 2008; Feng et al., 2013; Hu et al., 2017; Ling et al., 2017; Iglesias et al., 2018; Zhan et al., 2018; Feng et al., 2019; Seth et al., 2019)。因此, 鉴定S-亚硝基化修饰的靶蛋白以及修饰发生的位点对于研究NO调控某一特定生理过程的机制具有重要意义。在解析修饰位点的基础上, 人们可以通过比较模拟持续S-亚硝基化修饰以及不能发生

收稿日期: 2019-06-13; 接受日期: 2019-06-20

基金项目: 国家自然科学基金(No.31830017, No.31521001)和中国科学院战略先导B项目(No.XDB27030207)

<sup>†</sup> 共同第一作者

<sup>\*</sup> 通讯作者。E-mail: jrzuo@genetics.ac.cn

修饰的突变对蛋白质功能的影响,进而揭示靶蛋白特异位点的修饰对于蛋白质及其参与的生物学过程的影响(Shekariesfahlan and Lindermayr, 2018)。

S-亚硝基化修饰发生在蛋白质的半胱氨酸残基上。一般而言,蛋白质能否发生亚硝基化修饰取决于半胱氨酸残基周围的氨基酸组成及半胱氨酸残基在蛋白质三维结构上的相对空间位置。通过对不同靶蛋白的修饰位点进行系统分析,人们发现发生S-亚硝基化修饰的半胱氨酸残基通常位于一个酸-碱-疏水结构中([HKR]-C-[hydrophobic]X[D-E])或偏酸性环境中(Hess et al., 2005; Hu et al., 2015)。基于上述发现开发的亚硝基化修饰位点预测软件工具(如GPS-SNO)能够预测蛋白质中亚硝基化修饰的候选位点(Xue et al., 2010)。此外,利用植物PTM Viewer数据库也可以预测植物中S-亚硝基化修饰的潜在位点,其中包括多个已被实验验证的修饰位点(Willems et al., 2019)。与其它蛋白质翻译后修饰类似,预测的S-亚硝基化修饰位点及其功能需要实验生物学验证。

在S-亚硝基化修饰的研究中,通过生物素转化法(biotin switch assay)鉴定蛋白质中S-亚硝基化的修饰位点是目前最常用的方法(Jaffrey and Snyder, 2001)。其原理是将未发生S-亚硝基化修饰的自由巯基用烷化剂封闭,然后用还原剂(通常用抗坏血酸盐)将被S-亚硝基化的巯基还原为自由巯基,继而用生物素标记新形成的自由巯基。生物素化的半胱氨酸残基(即被S-亚硝基化修饰的半胱氨酸残基)可以利用生物素抗体进行蛋白质免疫印迹(western blotting)或通过液相色谱-串联质谱(liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; LC-MS/MS)技术进行检测分析。后者也被广泛用于高通量鉴定S-亚硝基化靶蛋白及修饰靶位点(Hu et al., 2015)。本文对重组蛋白质的体外生物素转化以及拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)体内蛋白质的生物素转化实验流程进行详细介绍,并对实验中的注意事项做出具体说明,旨在为本领域的研究提供借鉴及帮助。

## 1 实验材料

- (1) 纯化后的重组蛋白
- (2) 拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)或其它植物材料
- (3) 植物蛋白质抽提物(plant protein extracts)

## 2 试剂

- 棕色离心管: Axygen (Cat No.MCT-150-X)
- 丙酮(分析纯)
- Antibodies for target proteins (自制特异抗体或商用抗体;后者需具有携带特异标签(GFP、FLAG或MYC等)的转基因植物)
- Anti-biotin antibody: Cell Signaling Technology (Cat No.7075)
- Anti-BSA antibody: Proteintech (Cat No.6620 1-1-Ig)
- Anti-mouse IgG, goat, HRP-conjugated: EMAR (Cat No.EM35110)
- Biotin-HPDP: Thermo Scientific (Cat No.21341)
- Biotin-maleimide: Sigma-Aldrich (Cat No.B12-67)
- Bovine serum albumin (BSA): Amresco (Cat No.0332)
- Glutathione (reduced; L-glutathione) (GSH): BIODIE (Cat No.DE-J005)
- HEPES: Sigma-Aldrich (Cat No.H3375)
- High Capacity Neutravidin Agarose Resin: Thermo Scientific (Cat No.29202)
- Methyl methanethiosulfonate (MMTS): Thermo Scientific (Cat No.23011)
- NaCl: Sigma-Aldrich (Cat No.S7653)
- Neocuproine: Sigma-Aldrich (Cat No.N1501)
- IGEPAL CA-630: Sigma-Aldrich (Cat No. I8896)
- Protease Inhibitor Cocktail: Sigma-Aldrich (Cat No.P9599)
- Sodium dodecyl sulfate (SDS): Sigma-Aldrich (Cat No.L5750)
- S-nitrosoglutathione (GSNO): Sigma-Aldrich (Cat No.N4148)
- Sodium ascorbate: Sigma-Aldrich (Cat No. A7631)
- SuperSignal Western Femto Maximum Sensitivity Substrate Kit: Thermo Scientific (Cat No. 34096)
- Triton X-100: Amresco (Cat No.0694)

## 3 试剂配方

- Blocking buffer: 250 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES, pH7.7, 4 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> neocuproine, 2.5% SDS, 200 mmol·L<sup>-1</sup> MMTS

- HE buffer: 25 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES, pH7.7, 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA
- HEN buffer: 250 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES, pH7.7, 4 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> neocuproine
- HEN 2 buffer: 250 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES, pH7.7, 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> neocuproine, 1% IGEPAL CA-630, protease inhibitor cocktail
- HENS buffer: 250 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES, pH7.7, 4 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> neocuproine, 1% SDS
- Neutralization buffer: 25 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES, pH7.7, 100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 0.5% Triton X-100
- SDS-PAGE loading buffer (5X): 250 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH6.8, 10% SDS, 0.5% bromophenol blue, 50% glycerol, 5%-mercaptoethanol
- Wash buffer: 25 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES, pH7.7, 600 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 0.5% Triton X-100

## 4 设备与软件

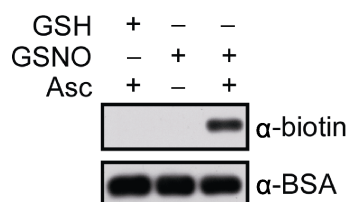
实验设备包括低温离心机、恒温混匀仪、涡旋仪、蛋白质电泳仪、转膜仪及暗室; 软件用GPS-SNO在线分析软件(Xue et al., 2010) (<http://sno.biocuckoo.org/>)。

## 5 实验程序

### 5.1 蛋白质体外生物素转化法(*in vitro* biotin switch assay)

- (1) 将纯化的重组蛋白质于4°C用HE buffer透析过夜;
- (2) 取1–30 μg重组蛋白质加至1.5 mL棕色离心管中, 加HEN buffer至总体积为200 μL。在黑暗中分别加入GSH和GSNO至终浓度为200 μmol·L<sup>-1</sup> (GSH处理为阴性对照; GSNO处理准备2份), 将上述样品放入恒温混匀仪中, 23°C, 800 rpm, 在黑暗中反应30分钟。后续操作直到步骤(6)均需在黑暗中进行;
- (3) 加入600 μL预冷的丙酮, 于–20°C沉淀蛋白质20分钟。在4°C, 13 000 ×g离心10分钟, 弃上清。用预冷的70%丙酮清洗沉淀物2–3次后, 室温下干燥蛋白质样品2分钟;

- (4) 用200 μL blocking buffer重悬蛋白质样品, 将样品放入恒温混匀仪中, 50°C, 1 200 rpm反应40分钟;
- (5) 重复步骤(3);
- (6) 加入80 μL HENS buffer重悬样品后, 加入10 μL 500 mmol·L<sup>-1</sup> sodium ascorbate和10 μL 4 mmol·L<sup>-1</sup> biotin-HPDP (其中一份GSNO处理样品不加sodium ascorbate, 但加入10 μL HENS buffer, 作为另一阴性对照)。将上述样品置于恒温混匀仪中, 23°C, 800 rpm反应1小时以完成生物素标记。以上所有操作步骤(步骤(1)–(6))均需要避光完成。完成生物素标记后, 加入不含还原剂的SDS上样缓冲液, 取部分样品进行SDS-PAGE胶分离和免疫印迹分析;
- (7) 以牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)为例, 10 μg BSA用于起始分析, 取0.2 μg反应后样品进行SDS-PAGE胶分离和免疫印迹分析, 以anti-biotin抗体检测(图1)。



**图1** 牛血清白蛋白(BSA)体外S-亚硝基化修饰的分析检测  
使用biotin-maleimide标记BSA样品, 经SDS-PAGE胶分离后进行免疫印迹分析。分别采用anti-biotin和anti-BSA抗体作为第一抗体(primary antibodies; 1:20 000稀释), anti-mouse IgG为第二抗体(secondary antibodies)。样品信号用SuperSignal Western Femto Maximun Sensitivity Substrate Kit检测。曝光时间分别为20秒(上)和30秒(下)。GSH: 谷胱甘肽; GSNO: S-亚硝基谷胱甘肽; Asc: 抗坏血酸盐

### Figure 1 *In vitro* analysis of S-nitrosylated bovine serum albumin (BSA)

BSA is labelled with biotin-maleimide, subjected to SDS-PAGE and western blotting. Anti-biotin and anti-BSA antibodies are used as primary antibodies, respectively (dilution in 1:20 000) and anti-mouse IgG as a secondary antibody. Signals are detected by using the SuperSignal Western Femto Maximun Sensitivity Substrate Kit. The blots are exposed for 20 sec (top) and 30 sec (bottom), respectively. GSH: Glutathione; GSNO: S-nitrosoglutathione; Asc: Sodium ascorbate

### 5.2 蛋白质体内生物素转化法(*in vivo* biotin switch assay)

- (1) 用液氮研磨粉碎植物材料, 转移粉末至1.5 mL棕

色离心管中, 迅速加入预冷的HEN 2 buffer, 充分混匀后于4°C, 13 000 ×g离心10分钟, 转移上清至新离心管。重复离心2次;

(2) 测定蛋白质浓度后, 取约200 μg蛋白质加至1.5 mL棕色离心管中, 加入30 μL 25% SDS, 30 μL 2 mol·L<sup>-1</sup> MMTS, 补充加入HEN 2 buffer至终体积为300 μL。准备2份样品, 于恒温混匀仪中, 50°C, 1 200 rpm反应40分钟;

(3) 加入900 μL预冷的丙酮, -20°C沉淀蛋白质20分钟。4°C, 13 000 ×g离心10分钟, 弃上清, 用预冷的70%丙酮清洗3次后, 室温干燥样品2分钟;

(4) 用240 μL HENS buffer悬浮蛋白质样品, 其中一份样品加入30 μL 500 mmol·L<sup>-1</sup> sodium ascorbate及30 μL 4 mmol·L<sup>-1</sup> biotin-HPDP, 另一份样品加入30 μL HENS buffer及30 μL 4 mmol·L<sup>-1</sup> biotin-HPDP (不加sodium ascorbate, 作为阴性对照), 在恒温混匀仪中, 23°C, 800 rpm反应90分钟;

(5) 重复步骤(3); 上述实验步骤((1)–(5))均需避光进行;

(6) 用300 μL HENS buffer溶解蛋白质, 留取30 μL样品加SDS-PAGE上样缓冲液作为后续免疫印迹的阳性对照input。在剩余样品(270 μL)中加入810 μL neutralization buffer和30 μL neutravidin agarose resin (neutravidin agarose resin 需要用neutralization buffer平衡3次), 混匀后于4°C反应过夜。该步骤是将被biotin标记的所有蛋白特异性地结合在neutravidin agarose resin上;

(7) 反应过夜的样品用washing buffer清洗4–6次后, 悬浮于SDS-PAGE loading buffer (1X), 100°C煮样10分钟。经SDS-PAGE胶分离后进行免疫印迹分析。

## 6 注意事项

(1) 高质量的重组蛋白质是体外生物素转化法成功的关键, 要保证蛋白质纯度高、杂带少。可根据需要选择不同的标签。His标签分子量较小, 适合纯化分子量比较小的蛋白质。GST和MBP标签适合纯化分子量较大以及可溶性较差的蛋白质。选择GST标签时要注意, GST本身含有4个半胱氨酸, 且部分半胱氨酸可以被亚硝基化修饰, 因此需要对载体进行改造, 将半胱氨酸突变为不能发生修饰的丝氨酸(Feng et al., 2013);

(2) 部分常用药品母液配置方法如下:

HEPES: 1.25 mol·L<sup>-1</sup>, 抽滤除菌

SDS: 25% (w/v)

Neocuproine: 10 mmol·L<sup>-1</sup>, DMSO溶解

EDTA: 0.5 mol·L<sup>-1</sup>, pH8.0

MMTS: 2 mol·L<sup>-1</sup>, DMF溶解

NaCl: 4 mol·L<sup>-1</sup>

Biotin-HPDP: 4 mmol·L<sup>-1</sup>, DMSO溶解

Biotin-maleimide: 4 mmol·L<sup>-1</sup>, DMSO溶解

Sodium ascorbate: 500 mmol·L<sup>-1</sup>, HEN buffer溶解, 现配现用;

(3) 用于体外生物素转化法的蛋白质量和反应体积可根据实际情况进行调整。GSNO的工作浓度可根据蛋白质的不同适当调整, 在100–300 μmol·L<sup>-1</sup>范围内均可, 但是加入的GSNO体积不应超过反应总体积的1%;

(4) 丙酮清洗蛋白质时, 将丙酮沿蛋白质沉淀的对侧管壁缓慢加入, 可适当离心, 防止蛋白质随丙酮一起被倒出离心管;

(5) 封闭是体外生物素转化法成功的最关键的一步, 首先应保证蛋白质完全溶解, 一般先将HEPES、EDTA、neocuproine和SDS混匀, 加入管中, 与蛋白质孵育5分钟左右, 涡旋震荡, 充分溶解蛋白质后, 再加入MMTS, 充分混匀, 进行封闭;

(6) 封闭结束后, 用丙酮清洗蛋白质要彻底, 倒掉丙酮后将离心管倒扣于吸水纸上, 避免残留的MMTS影响后续biotin标记;

(7) 根据实验要求选择不同的biotin标记物, 使用较多的为biotin-HPDP。Biotin-HPDP与巯基反应, 二者以S-S键连接, 因此loading buffer中不应含有DTT和β-巯基乙醇等还原剂。但biotin-HPDP活性较弱, 因此如果遇到较难检测到修饰的蛋白质可尝试biotin-maleimide。此外, 质谱鉴定亚硝基化修饰位点时, 后续操作较多, 标记物一般选用biotin-maleimide;

(8) Biotin标记后的样品, 由于反应体系中的盐浓度以及SDS浓度较高, 条带一般会出现拖尾现象, 尤其是外侧泳道, 可将样品用PBS等稀释后, 再加蛋白质上样缓冲液进行电泳;

(9) 对于细胞质等定位的蛋白质而言, HEN 2 buffer可满足实验要求。但是对某些核定位的蛋白质, 可考虑使用HEN/RIPA buffer (250 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES, pH7.7, 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> neocuproine, 1% Triton X-100, protease inhibitor cocktail,

0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate)制备样品;

(10) 用于体内生物素转化法反应的蛋白质用量可根据实际情况进行调整。若蛋白质亚硝基化修饰水平较低, 可适当增加反应体积、增加样品量;

(11) 体内生物素转化法完成生物素标记, 蛋白质经丙酮沉淀清洗后, 后续实验操作不需要避光。在样品与neutravidin agarose resin结合之前, 蛋白质需要充分溶解, 避免出现假阳性。

**致谢** 感谢中国科学院遗传与发育生物学研究所左建儒课题组从事一氧化氮研究的过去和现在的所有成员。

## 参考文献

- Albertos P, Romero-Puertas MC, Tatematsu K, Mateos I, Sánchez-Vicente I, Nambara E, Lorenzo O** (2015). S-nitrosylation triggers ABI5 degradation to promote seed germination and seedling growth. *Nat Commun* **6**, 8669.
- Chen R, Sun S, Wang C, Li Y, Liang Y, An F, Li C, Dong H, Yang X, Zhang J, Zuo J** (2009). The *Arabidopsis* *PARQUAT RESISTANT2* gene encodes an S-nitrosoglutathione reductase that is a key regulator of cell death. *Cell Res* **19**, 1377.
- Cui B, Pan Q, Clarke D, Villarreal MO, Umbreen S, Yuan B, Shan W, Jiang J, Loake GJ** (2018). S-nitrosylation of the zinc finger protein SRG1 regulates plant immunity. *Nat Commun* **9**, 4226.
- Feng J, Chen L, Zuo J** (2019). Protein S-nitrosylation in plants: current progresses and challenges. *J Integr Plant Biol* doi.org/10.1111/jipb.12780.
- Feng J, Wang C, Chen Q, Chen H, Ren B, Li X, Zuo J** (2013). S-nitrosylation of phosphotransfer proteins represses cytokinin signaling. *Nat Commun* **4**, 1529.
- He Y, Tang RH, Hao Y, Stevens RD, Cook CW, Ahn SM, Jing L, Yang Z, Chen L, Guo F, Fiorani F, Jackson RB, Crawford NM, Pei ZM** (2004). Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* **305**, 1968–1971.
- Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS** (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 150–166.
- Hess DT, Stamler JS** (2012). Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification. *J Biol Chem* **287**, 4411–4418.
- Hu J, Huang X, Chen L, Sun X, Lu C, Zhang L, Wang Y, Zuo J** (2015). Site-specific nitrosoproteomic identification of endogenously S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **167**, 1731–1746.
- Hu J, Yang H, Mu J, Lu T, Peng J, Deng X, Kong Z, Bao S, Cao X, Zuo J** (2017). Nitric oxide regulates protein methylation during stress responses in plants. *Mol Cell* **67**, 702–710.
- Iglesias MJ, Terrile MC, Correa-Aragunde N, Colman SL, Izquierdo-Álvarez A, Fiol DF, París R, Sánchez-López N, Marina A, Calderón Villalobos LIA, Estelle M, Lamattina L, Martínez-Ruiz A, Casalagué CA** (2018). Regulation of SCFTIR1/AFBs E3 ligase assembly by S-nitrosylation of *Arabidopsis* SKP1-like1 impacts on auxin signaling. *Redox Biol* **18**, 200–210.
- Jaffrey SR, Snyder SH** (2001). The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci STKE* **2001**, p11.
- Ling T, Bellin D, Vandelle E, Imanifard Z, Delledonne M** (2017). Host-mediated S-nitrosylation disarms the bacterial effector HopA1 to reestablish immunity. *Plant Cell* **29**, 2871–2881.
- Lytvyn DI, Raynaud C, Yemets AI, Bergounioux C, Blume YB** (2016). Involvement of inositol biosynthesis and nitric oxide in the mediation of UV-B induced oxidative stress. *Front Plant Sci* **7**, 430.
- Pan QN, Geng CC, Li DD, Xu SW, Mao DD, Umbreen S, Loake GJ, Cui BM** (2019). Nitrate reductase-mediated nitric oxide regulates the leaf shape in *Arabidopsis* by mediating the homeostasis of reactive oxygen species. *Int J Mol Sci* **20**, 2235.
- París R, Vazquez MM, Graziano M, Terrile MC, Miller ND, Spalding EP, Otegui MS, Casalagué CA** (2018). Distribution of endogenous NO regulates early gravitropic response and PIN2 localization in *Arabidopsis* roots. *Front Plant Sci* **9**, 495.
- Seth D, Hess DT, Hausladen A, Wang L, Wang YJ, Stamler JS** (2018). A multiplex enzymatic machinery for cellular protein S-nitrosylation. *Mol Cell* **69**, 451–464.
- Seth P, Hsieh PN, Jamal S, Wang L, Gygi SP, Jain MK, Collier J, Stamler JS** (2019). Regulation of microRNA machinery and development by interspecies S-nitrosylation. *Cell* **176**, 1014–1025.
- Shekariesfahlan A, Lindermayr C** (2018). Identification of NO-sensitive cysteine residues using cysteine mutants of recombinant proteins. In: Mengel A, Lindermayr C, eds. Nitric Oxide: Methods and Protocols. New York: Springer New York. pp. 183–203.
- Shi H, Liu W, Wei Y, Ye T** (2017). Integration of auxin/indole-3-acetic acid 17 and RGA-LIKE3 confers salt

- stress resistance through stabilization by nitric oxide in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **68**, 1239–1249.
- Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, Dong X** (2008). Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**, 952–956.
- Wang P, Zhu JK, Lang Z** (2015). Nitric oxide suppresses the inhibitory effect of abscisic acid on seed germination by S-nitrosylation of SnRK2 proteins. *Plant Signal Behav* **10**, e1031939.
- Willems P, Horne A, Van Parys T, Goormachtig S, De Smet I, Botzki A, Van Breusegem F, Gevaert K** (2019). The Plant PTM Viewer, a central resource for exploring plant protein modifications. *Plant J* **99**, 752–762.
- Xue Y, Liu Z, Gao X, Jin C, Wen L, Yao X, Ren J** (2010). GPS-SNO: computational prediction of protein S-nitrosylation sites with a modified GPS algorithm. *PLoS One* **5**, e11290.
- Yang H, Mu J, Chen L, Feng J, Hu J, Li L, Zhou JM, Zuo J** (2015). S-nitrosylation positively regulates ascorbate peroxidase activity during plant stress responses. *Plant Physiol* **167**, 1604.
- Zhan N, Wang C, Chen L, Yang H, Feng J, Gong X, Ren B, Wu R, Mu J, Li Y, Liu Z, Zhou Y, Peng J, Wang K, Huang X, Xiao S, Zuo J** (2018). S-nitrosylation targets GSNO reductase for selective autophagy during hypoxia responses in plants. *Mol Cell* **71**, 142–154.
- Zhang L, Shi X, Zhang Y, Wang J, Yang J, Ishida T, Jiang W, Han X, Kang J, Wang X, Pan L, Lv S, Cao B, Zhang Y, Wu J, Han H, Hu Z, Cui L, Sawa S, He J, Wang G** (2019a). CLE9 peptide-induced stomatal closure is mediated by abscisic acid, hydrogen peroxide, and nitric oxide in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **42**, 1033–1044.
- Zhang ZW, Fu YF, Zhou YH, Wang CQ, Lan T, Chen GD, Zeng J, Chen YE, Yuan M, Yuan S, Hu JY** (2019b). Nitrogen and nitric oxide regulate *Arabidopsis* flowering differently. *Plant Sci* **284**, 177–184.

## Detection and Analysis of Protein S-nitrosylation in Plants

Lichao Chen<sup>†</sup>, Ni Zhan<sup>†</sup>, Yansha Li, Jian Feng, Jianru Zuo<sup>\*</sup>

*Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*

**Abstract** S-nitrosylation is an important protein posttranslational modification, involved in covalently linking a nitric oxide (NO) molecule to the thiol group of a cysteine residue to generate S-nitrosothiols. S-nitrosylation regulates multiple biological processes by modulating protein activity, stability, subcellular localization and protein-protein interactions. The biotin-switch assay is one of the most-often used methods to detect and analyze protein S-nitrosylation. In principle, the free thiols in a target protein are first blocked, followed by reducing the S-nitrosothiols of the target protein to free thiols by ascorbate, which are subsequently labelled by biotin to form biotinylated proteins. The biotin-labelled sample was assayed by immunoblotting and mass spectrometry. Here, we present detailed experimental procedures for the *in vitro* and *in vivo* biotin-switch methods and give advice on key troubleshooting solutions.

**Key words** nitric oxide, S-nitrosylation, biotin-switch assay, plants

**Chen LC, Zhan N, Li YS, Feng J, Zuo J** (2019). Detection and analysis of protein S-nitrosylation in plants. *Chin Bull Bot* **54**, 497–502.

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this paper

<sup>\*</sup> Author for correspondence. E-mail: jrzuo@genetics.ac.cn

(责任编辑: 朱亚娜)