

K33 位乙酰化修饰 SUMO 蛋白的 化学合成

王业海¹, 孔一夫¹, 陈晨², 李宜明¹

(1. 合肥工业大学生物与医学工程学院, 合肥 230009;

2. 中国科学院强磁场科学中心, 合肥 230031)

摘要 采用高温辅助固相合成技术及基于多肽酰肼的自然化学连接技术, 高效获得了小泛素相关修饰物 (SUMO) 蛋白及 33 位赖氨酸 (K33) 乙酰化 SUMO 蛋白. 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和圆二色光谱分析结果表明, 与生物表达蛋白相比, 化学合成蛋白具有较好的纯度和类似的二级结构.

关键词 小泛素相关修饰物; 乙酰化; 高温辅助固相合成; 多肽酰肼; 自然化学连接

中图分类号 O629

文献标志码 A

在真核细胞中小泛素相关修饰物 (SUMO) 修饰已经成为调控蛋白质功能的一种关键翻译后修饰^[1-6]. 研究发现, 数以百计的蛋白可以被 SUMO 化^[7-9], SUMO 化蛋白进而参与到染色质的组装、DNA 的修复、蛋白质的体内平衡和信号转导等生理过程中^[10,11]. 与蛋白质泛素化类似, 蛋白质的 SUMO 化同样需要 E1 激活酶、E2 结合酶和 E3 连接酶等 3 种酶的参与^[12]. 这 3 种酶的协同作用使底物蛋白 SUMO 化, 而底物蛋白的 SUMO 化位点主要发生在一段收敛的 $\Psi K_{\alpha}D/E$ (Ψ 代表疏水性氨基酸; x 代表任意氨基酸) 序列的赖氨酸上^[13].

SUMO 化蛋白的识别主要是通过 SUMO 与其效应蛋白上 SUMO 相互作用基序 (SIM 域) 的非共价相互作用来实现^[14-16]. SIM 是一段少于 10 个氨基酸的多肽序列, 包含 1 个以 3~4 个氨基酸为核心的疏水序列 (主要是 Val 或者 Ile) 和 1 个邻近的酸性区域^[17]. SIM 中的疏水残基会结合 SUMO 结构中的 β 2 股, 并且会使 β 折叠延伸. SIM 中的酸性残基通过结合 SUMO 蛋白表面上的酸性区域来增加 SIM 与 SUMO 蛋白的结合力. SUMO 化蛋白与效应蛋白 SIM 域的正确识别是 SUMO 化蛋白发挥正常功能的关键.

SIM 中的一些 Ser 或 Thr 可以被磷酸化, 磷酸化后的 SIM 则可通过电荷相互作用增强其与 SUMO 化蛋白的结合力^[18-20]; SUMO 蛋白可以被乙酰化, 乙酰化后的 SUMO 蛋白与 SIM 的结合力则大幅度降低^[21]. SUMO 蛋白与 SIM 之间的这种精细化调控是 SUMO 化蛋白相关功能得以正常发挥的重要保证.

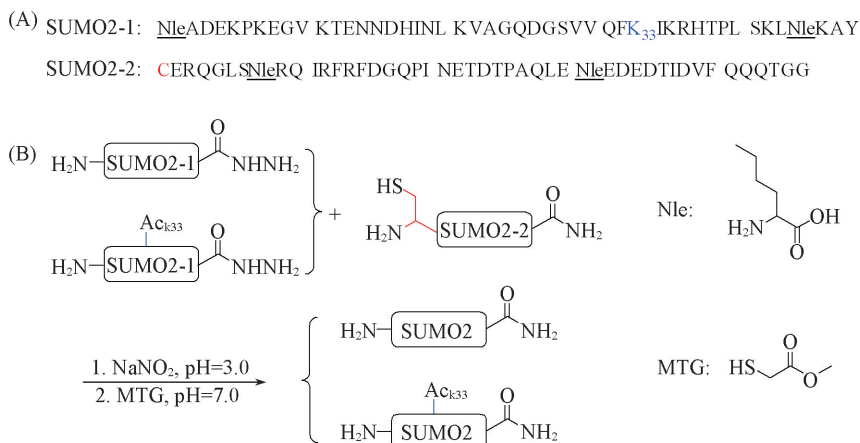
与磷酸化 SIM 的制备相比, 制备大量、性质均一的乙酰化 SUMO 则要困难得多. 目前, 制备乙酰化 SUMO 蛋白的主要方法为通过非天然氨基酸定点嵌入方法将乙酰化 Lys 嵌入到 SUMO 蛋白中, 或通过酶促反应, 体外获得乙酰化 SUMO 蛋白^[22]. 这 2 种方法都难以获得大量的乙酰化 SUMO 蛋白. 近年来, 由于多肽固相合成及片段连接技术的发展, 使得蛋白质化学合成成为一种高效获得翻译后修饰蛋白的方法^[23-34]. 尤其是高温辅助的 Fmoc 固相多肽合成技术有助于一次性合成序列较长的多肽片段^[35]. 基于此, 本文以高温辅助的 Fmoc 固相合成技术结合基于多肽酰肼的自然化学连接方法, 将乙酰化 SUMO 蛋白分成两片段合成, 然后将两片段肽连接获得全长蛋白, 合成路线如 Scheme 1 所示.

收稿日期: 2016-06-12. 网络出版日期: 2016-10-19.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 21372058, 21572043) 资助.

联系人简介: 李宜明, 男, 博士, 副教授, 主要从事翻译后修饰蛋白的化学合成、结构及功能方面的研究.

E-mails: lym2007@mail.ustc.edu.cn; ymli@hfut.edu.cn



Scheme 1 Amino acid sequence of SUMO2(A) and the synthesis strategy of SUMO2 and K33-Ac-SUMO2(B)

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

20 种 Fmoc 氨基酸、Fmoc-Nle-OH 和 6-氯苯并三氮唑-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯(HCTU)购自吉尔生化(上海)有限公司; *N,N'*-二甲基甲酰胺(DMF)、二氯甲烷(DCM)、*N,N'*-二异丙基乙胺(DIEA)、三氟乙酸(TFA)、甲醇、苯酚和乙腈均为分析纯, 巯基乙酸甲酯(纯度为 96%), 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 哌啶、乙醚和水合肼均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司; 三苯基甲基氯树脂(取代度为 0.43 mmol/g)和 Rink 酰胺树脂(取代度为 0.34 mmol/g)购自天津南开和成科技有限公司; 2-巯基乙酸乙酯(Oxyma, 纯度为 98%)和 *N,N'*-二异丙基碳二亚胺(DIC, 纯度为 99%)购自安耐吉化学公司。

Centrifuge 5424 型离心机(德国艾本德股份公司); FE20-K-Plus 型 pH 计(瑞士梅特勒-托利多公司); SHB-III 型台式循环水式多用真空泵(郑州长城仪器有限公司); FD-1A-50 型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司); IKA C-MAG SH7 型磁力搅拌器[德国艾卡(广州)仪器设备有限公司]; ME103E 型分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司); LC-20AT 型高效液相色谱(HPLC)仪(日本岛津公司); Ultimate XB-C18 型分析型色谱柱(ϕ 250 mm \times 4.6 mm, 美国格雷斯公司); Ultimate XB-C18 型半制备型色谱柱(ϕ 250 mm \times 10 mm, 美国格雷斯公司); 安捷伦 1100 型液相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司); J-1100 型圆二色光谱(CD)仪(香港佰泰科技有限公司)。

1.2 酰肼树脂的制备

将 2 g 三苯基甲基氯树脂(0.86 mmol)溶于 30 mL DMF/DCM(体积比 1:1)混合溶剂中, 加入 8.6 mmol 水合肼和 17.2 mmol DIEA, 冰浴条件下反应 12 h; 加入 2 mL 甲醇封闭未反应掉的三苯基甲基氯树脂; 反应结束后, 依次用 DMF、水、甲醇和乙醚洗涤得到的酰肼树脂, 风干并置于 4 °C 冰箱中备用(经测定酰肼树脂的取代度为 0.38 mmol/g)。

1.3 小泛素相关修饰物第一片段(SUMO2-1)的制备

将 263.1 mg 酰肼树脂置于固相合成管中, 用 15 mL DMF/DCM 混合溶剂(体积比 1:1)溶胀 15 min 后抽干, 采用高温辅助的 Fmoc 固相合成法合成 SUMO2-1(0.4 mmol 氨基酸+0.4 mmol Oxyma+0.4 mmol DIC), 反应时间为 20~30 min, 反应温度为 75 °C。其中, 精氨酸(Arg)采用 HCTU 作为缩合剂, 室温下反应 40 min, 反应 2 次; 组氨酸(His)采用 DIC 作为缩合剂, 室温下反应 40 min; 半胱氨酸(Cys)采用 DIC 作为缩合剂, 50 °C 反应 40 min。反应完毕, 依次用 DMF, DCM 和 DMF 各洗涤 5 次, 加入含有哌啶(体积分数 20%)的 DMF 溶液反应 2 次(反应时间分别为 2 和 10 min), 脱除 Fmoc 保护基。组装完肽链后, 向多肽合成管中加入 8 mL 切割试剂[$V(\text{TFA}):V(\text{苯酚}):V(\text{水}):V(\text{三异丙基硅烷, TIPS})=88:5:5:2$], 反应 2 h, 将多肽从树脂上切下, 并脱除侧链保护基团。将切割液置于离心管中,

用 N_2 气鼓泡, 浓缩溶液, 最后用冰乙醚沉淀, 离心, 得到粗肽, 经 LC-MS 分析确定是否为目标产物, 使用半制备型 HPLC 分离得到 SUMO2-1 (110 mg, 分离产率 20.8%).

1.4 K33 乙酰化小泛素相关修饰物第一片段 (K33-Ac-SUMO2-1) 的制备

将 263.1 mg 酰肼树脂置于固相合成管中, 用 15 mL DMF/DCM 混合溶剂 (体积比 1:1) 溶胀 15 min 后抽干; 采用高温辅助的 Fmoc 固相合成法合成 K33-Ac-SUMO2-1. 每一种氨基酸耦合的合成步骤与 SUMO2-1 相同, 不同之处在于第 33 位的 Lys 采用侧链氨基 Alloc 保护的 Fmoc 氨基酸进行耦合. 当所有氨基酸耦合完成后, 先用四(三苯基膦)钯 (0.01 mmol) 脱除 K33 位赖氨酸上的 Alloc 保护基 (反应 2 次, 每次 30 min); 冲洗后再加入乙酸酐试剂 (1 mL 乙酸酐 + 1 mL DIEA + 8 mL DMF) 对 K33 进行乙酰化修饰, 反应 10 min 后, 将肽链末端的 Fmoc 保护基用哌啶脱除掉. 最后, 将多肽从树脂上切割下来, 采用相同的后处理过程得到粗肽, 经 LC-MS 分析确定是否为目标产物, 使用半制备型 HPLC 分离得到 K33-Ac-SUMO2-1 (106 mg, 分离产率 19.8%).

1.5 小泛素相关修饰物第二片段 SUMO2-2 的制备

将 294 mg Rink 酰胺树脂置于固相合成管中, 用 15 mL DMF/DCM 混合溶剂 (体积比 1:1) 溶胀 15 min 后抽干; 采用高温辅助的 Fmoc 固相合成法合成 SUMO2-2. 每一种氨基酸耦合的合成步骤与 SUMO2-1 相同. 加完所有氨基酸后, 将多肽从树脂上切割下来, 采用相同的后处理过程得到粗肽, 经 LC-MS 分析确定是否为目标产物, 使用半制备型 HPLC 分离得到 SUMO2-2 (95 mg, 分离产率 17.9%).

1.6 SUMO2-1 与 SUMO2-2 肽片段连接

参照文献 [36~38] 方法, 将 26.3 mg SUMO2-1 用 PBS 缓冲液 (6.0 mol/L $Gn \cdot HCl$, 0.2 mol/L Na_2HPO_4) 溶解, 在 $-10^\circ C$, pH=3.0 条件下用亚硝酸钠氧化, 得到酰基叠氮产物, 再加入巯基乙酸甲酯 (MTG), 调节 pH 值至 7.0, 得到 SUMO2-1 硫酯; 加入 39.7 mg SUMO2-2, 用分析型 HPLC 监测反应; 待完全转化为 SUMO2 后, 经 LC-MS 分析确定是否为目标产物, 用半制备型 HPLC 分离, 冻干, 得到全长的 SUMO2 蛋白 (24 mg, 分离产率 45.6%).

1.7 K33-Ac-SUMO2-1 与 SUMO2-2 肽片段连接

将 26.5 mg K33-Ac-SUMO2-1 用 PBS 缓冲液溶解, 在 $-10^\circ C$, pH=3.0 条件下用亚硝酸钠氧化, 得到酰基叠氮产物; 再加入巯基乙酸甲酯 (MTG), 调节 pH 值至 7.0, 得到 K33-Ac-SUMO2-1 的硫酯; 加入 39.7 mg SUMO2-2, 用分析型 HPLC 监测反应; 待完全转化为 K33-Ac-SUMO2 后, 经 LC-MS 分析确定是否为目标产物, 用半制备型 HPLC 分离, 冻干, 得到全长的 K33-Ac-SUMO2 蛋白 (21 mg, 分离产率 39.7%).

2 结果与讨论

2.1 SUMO2 肽片段的合成与 HPLC 表征

实验中尝试采用标准的 Fmoc 固相合成方法合成 SUMO2 肽片段. 将所需的氨基酸 (0.4 mmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)- N,N,N',N' -四甲基脲六氟磷酸酯 (0.36 mmol) 和 N,N' -二异丙基乙胺 (0.8 mmol) 依次加入合成管中反应生成 SUMO2 肽片段, 由于片段过长导致合成效果并不理想. 在 Fmoc 固相合成方法中, 高温可以提高氨基酸之间的耦合效率, 进而提高长片段多肽合成产率, 因此本文采用该方法合成 SUMO 的 2 个片段. 通过这种方法制得了纯度较高的 2 个片段的粗肽, 但质谱分析发现所得到的产物并不是 SUMO2-1 和 SUMO2-2. 经过分析发现, 相比于正常肽片段每个产物的分子量都多 32. 由于甲硫氨酸 (Met) 易于氧化, 且每条肽片段都含有 2 个 Met, 故推测是在合成过程中 Met 发生了氧化. 因此, 采用正亮氨酸 (Nle) 替代 Met 来获得正确的多肽片段^[24]. 经过改进获得了纯度较高的粗肽产物, HPLC 分析结果如图 1 所示. 虽然乙酰化片段 1 的纯度比天然片段略有下降, 但整体产率依然较好 (SUMO2-1 产率 20.8%, K33-Ac-SUMO2-1 产率 19.8%, SUMO2-2 产率 17.9%).

2.2 SUMO2 的获得与 HPLC 表征

在获得 SUMO2 肽片段后, 利用基于多肽酰肼的自然化学连接方法进行肽片段的连接. 首先, 使用 MPAA 作为硫醇试剂进行肽片段的连接, 经过 4~5 h 的反应即可获得连接产物. 但在随后的分离过程

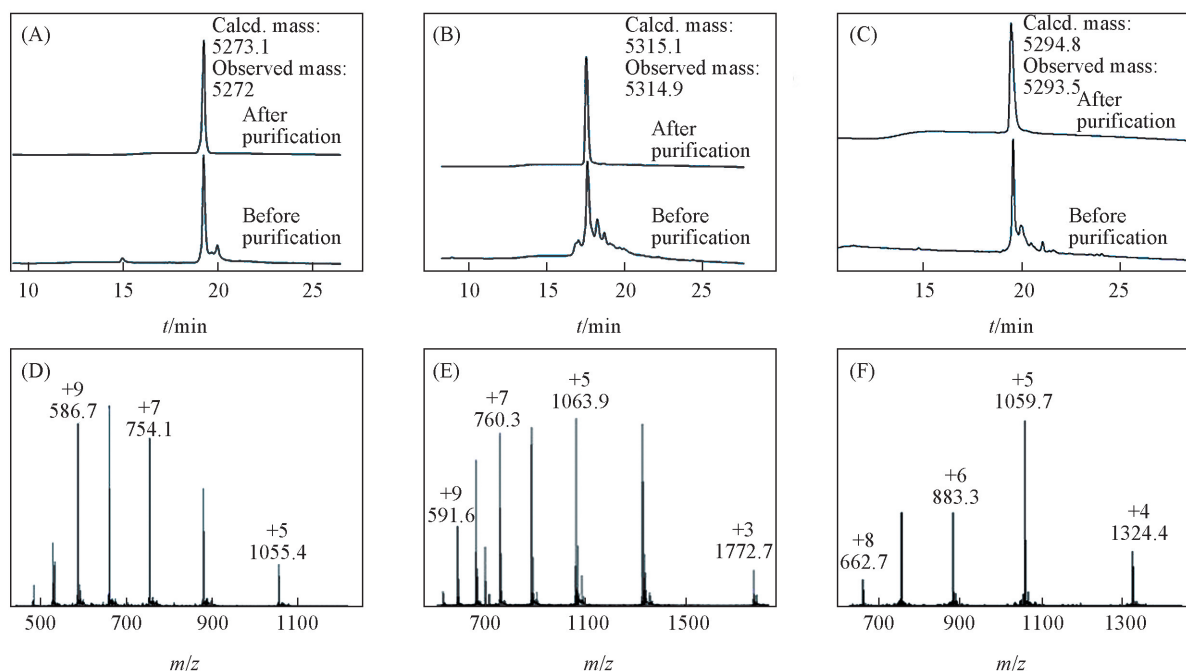


Fig.1 HPLC trace (A, B, C) and MS (D, E, F) of SUMO2-1 (A, D), K33-Ac-SUMO2-1 (B, E) and SUMO2-2 (C, F)

中发现, 产物 SUMO2 的出峰位置与 MPAA 的出峰位置重合, 调整分离梯度后依然无法将两者分开. 为了解决这个问题, 使用 MTG 作为反应的硫醇试剂进行肽片段的连接^[24]. 经过 5~6 h 反应, 获得了全长的 SUMO2 产物 (产率 45.6%), HPLC 分析结果如图 2 所示, 并且在后续的分纯化过程中并未受到硫醇出峰的影响.

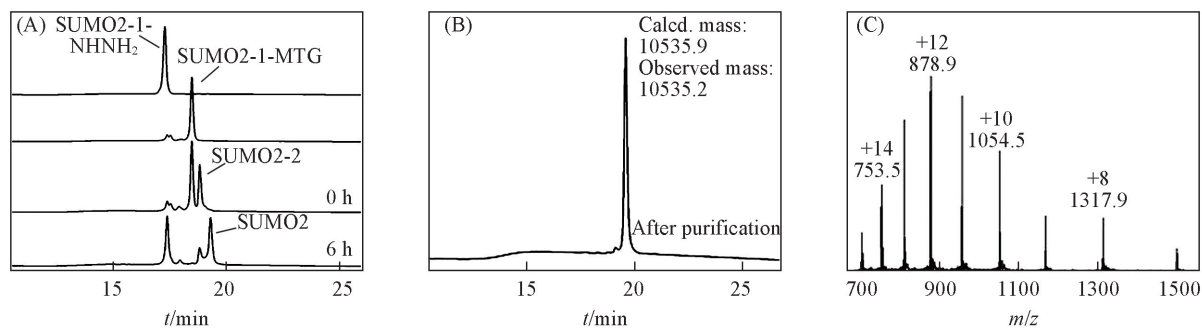


Fig.2 Ligation trace of SUMO2-1 (A) and SUMO2-2 (B), and MS (C) of SUMO2

2.3 K33-Ac-SUMO2 的获得与 HPLC 表征

以 MTG 作为硫醇试剂, 通过两片段多肽酰肼连接反应, 获得了目标 K33-Ac-SUMO2 蛋白 (产率 39.7%), 图 3 示出了 HPLC 分析结果. 同样, 使用 MTG 作为硫醇可使产物的分离较为顺利.

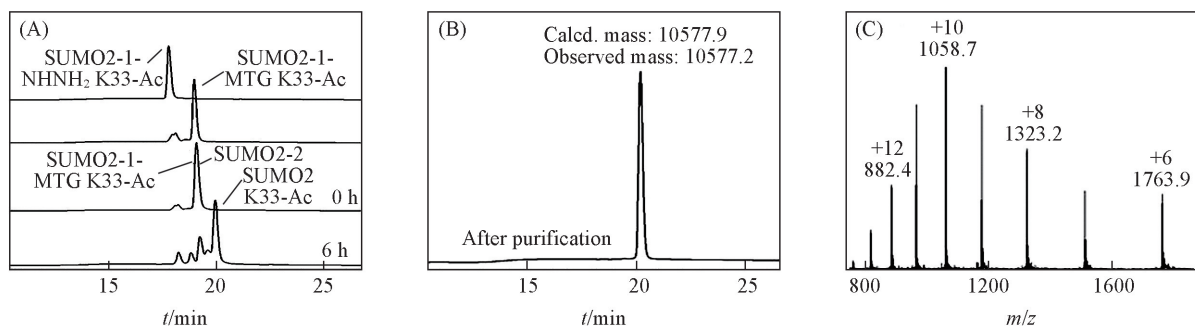


Fig.3 Ligation trace of K33-Ac-SUMO2-1 (A) and SUMO2-2 (B), and MS (C) of K33-Ac-SUMO2

2.4 SDS-PAGE 分析

通过 SDS-PAGE 鉴定了 SUMO 和 K33-Ac-SUMO 蛋白是否具有正确的分子量. 由图 4 可知, 化学全合成的 SUMO 及 K33-Ac-SUMO 蛋白与生物表达的 SUMO 蛋白处在同一位置, 且具有较好的纯度.

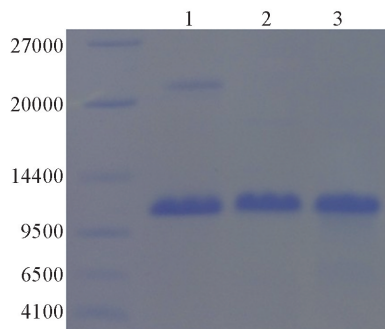


Fig.4 SDS-PAGE of expressed SUMO2 (1), synthesized SUMO2 (2) and synthesized K33-Ac-SUMO2(3)

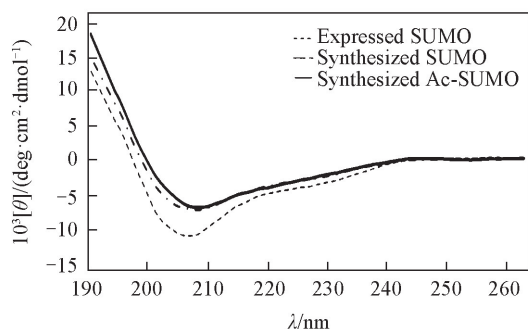


Fig.5 CD spectra of expressed SUMO2, synthesized SUMO2 and synthesized K33-Ac-SUMO2

2.5 圆二色光谱(CD)分析

利用圆二色光谱(CD)鉴定了 SUMO 蛋白和 K33-Ac-SUMO 蛋白是否具有正确的二级结构. 将合成蛋白溶于水使其自发折叠, 调节浓度至 0.5~1 mg/mL 用于 CD 测试. 由图 5 可知, 化学全合成的 SUMO 蛋白和 K33-Ac-SUMO 蛋白与生物表达的 SUMO 蛋白在溶液中具有类似的二级结构.

3 结 论

采用高温辅助的 Fmoc 固相多肽合成方法, 结合多肽酰肼连接技术以两片段高效合成了 SUMO2 蛋白与 K33-Ac-SUMO2 蛋白. 通过与生物表达 SUMO2 的 SDS-PAGE 和 CD 数据进行分析比较, 证明了合成蛋白具有较好的均一性与类似的二级结构. 本文通过化学合成的策略获得了含有翻译后修饰的 SUMO2 蛋白, 为研究乙酰化 SUMO2 与底物蛋白 SIM 的相互作用提供了重要的基础. 除 SUMO 蛋白外, 泛素蛋白也含有类似的乙酰化及磷酸化修饰^[39,40], 这些翻译后修饰发挥了重要的生理功能. 该合成策略的成功应用也为高效获得含有类似翻译后修饰的泛素蛋白提供了有效的途径.

参 考 文 献

- [1] Geoffroy M. C., Hay R. T., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2009**, 10(8), 564—568
- [2] Flotho A., Melchior F., *Annu. Rev. Biochem.*, **2013**, 82, 357—385
- [3] Bergink S., Jentsch S., *Nature*, **2009**, 458(7237), 461—467
- [4] Van der Veen A. G., Ploegh H. L., *Annu. Rev. Biochem.*, **2012**, 81, 323—357
- [5] Gartner A., Muller S., *Mol Cell*, **2014**, 55(1), 1—3
- [6] Shen Q. Q., Zeng M. Y., Zhao Y. H., *Chem. J. Chinese Universities*, **2014**, 35(5), 965—970(沈晴晴, 曾明湧, 赵元辉. 高等学校化学学报, **2014**, 35(5), 965—970)
- [7] Impens F., Radoshevich L., Cossart P., Ribet D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2014**, 111(34), 12432—12437
- [8] Lamoliatte F., Caron D., Durette C., Mahrouche L., Maroui M. A., Caron-Lizotte O., Bonneil E., Chelbi-Alix M. K., Thibault P., *Nat. Commun.*, **2014**, 5, 5409
- [9] Hendriks I. A., D'Souza R. C., Chang J. G., Mann M., Vertegaal A. C., *Nat. Commun.*, **2015**, 6, 7289
- [10] Gareau J. R., Lima C. D., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2010**, 11(12), 861—871
- [11] Wilkinson K. A., Henley J. M., *Biochem. J.*, **2010**, 428(2), 133—145
- [12] Streich F. C. Jr., Lima C. D., *Annu. Rev. Biophys.*, **2014**, 43, 357—379
- [13] Sriramachandran A. M., Dohmen R. J., *Biochim. Biophys. Acta*, **2014**, 1843(1), 75—85
- [14] Li W. Z., Meng W., Tian P., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2015**, 31(1), 149—155
- [15] Kerscher O., *EMBO Rep.*, **2007**, 8(6), 550—555
- [16] Van Wijk S. J., Muller S., Dikic I., *Genes Dev.*, **2011**, 25(17), 1763—1769
- [17] Hickey C. M., Wilson N. R., Hochstrasser M., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2012**, 13(12), 755—766

- [18] Stehmeier P., Muller S., *Mol. Cell*, **2009**, 33(3), 400—409
- [19] Chang C. C., Naik M. T., Huang Y. S., Jeng J. C., Liao P. H., Kuo H. Y., Ho C. C., Hsieh Y. L., Lin C. H., Huang N. J., *Mol. Cell*, **2011**, 42(1), 62—74
- [20] Cappadocia L., Mascle X. H., Bourdeau V., Tremblay-Belzile S., Chaker-Margot M., Lussier-Price M., Wada J., Sakaguchi K., Aubry M., Ferbeyre G., Omichinski J. G., *Structure*, **2015**, 23(1), 126—138
- [21] Ullmann R., Chien C. D., Avantiaggiati M. L., Muller S., *Mol. Cell*, **2012**, 46(6), 759—770
- [22] Fang G. M., Li Y. M., Shen F., Huang Y. C., Li J. B., Lin Y., Cui H. K., Liu L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50(33), 7645—7649
- [23] Xu B. F., Yang S., Zhu J. M., Ma Y. D., Zhao G., Guo Y., Xu L., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2014**, 30(1), 103—107
- [24] Zheng J. S., Tang S., Huang Y. C., Liu L., *Acc. Chem. Res.*, **2013**, 46(11), 2475—1484
- [25] Huang Y. C., Fang G. M., Liu L., *Natl. Sci. Rev.*, **2016**, 3(1), 107—116
- [26] Zheng J. S., Tang S., Qi Y. K., Wang Z. P., Liu L., *Nat. Protoc.*, **2013**, 8(12), 2483—2495
- [27] Huang Y. C., Li Y. M., Chen Y., Pan M., Li Y. T., Yu L., Guo Q. X., Liu L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52(18), 4858—4862
- [28] Huang Y. C., Chen C. C., Gao S., Wang Y. H., Xiao H., Wang F., Tian C. L., Li Y. M., *Chem. Eur. J.*, **2016**, 22(22), 7623—7628
- [29] Chen C. C., Huang Y. C., Xu L., Zhen Y., Xu H. J., Guo Q. X., Tian C. L., Li Y. M., Shi J., *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, 12(46), 9413—9418
- [30] Chen C. C., Li S. J., Chen Y. Q., Xu H. J., Li Y. M., *Chin. J. Org. Chem.*, **2014**, 37(7), 1452—1457
- [31] Kent S. B. H., *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38(2), 338—351
- [32] Huang Y. C., Liu L., *Sci. China Chem.*, **2015**, 58(12), 1779—1781
- [33] Dawson P. E., Muir T. W., Clarklewis I., Kent S. B. H., *Science*, **1994**, 266(5186), 776—779
- [34] Fang G. M., Wang J. X., Liu L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51(41), 10347—10350
- [35] Huang Y. C., Guan C. J., Tan X. L., Chen C. C., Guo Q. X., Li Y. M., *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, 13(5), 1500—1506
- [36] Tang S., Si Y. Y., Wang Z. P., Mei K. R., Chen X., Cheng J. Y., Zheng J. S., Liu L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, 54(19), 5713—5717
- [37] Wang J. X., Fang G. M., He Y., Qu D. L., Yu M., Hong Z. Y., Liu L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, 54(7), 2194—2198
- [38] Pan M., Gao S., Zheng Y., Tan X. L., Lan H., Tan X. D., Sun D., Lu L., Wang T., Zheng Q., Huang Y., Wang J. W., Liu L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138(23), 7429—7435
- [39] Wauer T., Simicek M., Schubert A., Kmomander D., *Nature*, **2015**, 524(7565), 370—374
- [40] Ohtake F., Saeki Y., Sakamoto K., Ohtake K., Nishikawa H., Tsuchiya H., Ohta T., Tanaka K., Kanno J., *EMBO Rep.*, **2015**, 16(2), 192—201

Chemical Synthesis of K33 Acetylated SUMO Protein[†]

WANG Yehai¹, KONG Yifu¹, CHEN Chenchen², LI Yiming^{1*}

(1. School of Biological and Medical Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China;

2. High Magnetic Field Laboratory of the Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract Sumoylated protein was found to reduce the protein binding force with the SUMO-interaction motif (SIM) of effector protein when K33 of SUMO was acetylated. To further study the structures and mechanism, a large amount of uniformity acetylated SUMO protein was greatly needed. In this work, SUMO protein and K33 acetylated SUMO protein was efficiently obtained using high temperature assisted solid-phase peptide synthesis (SPPS) technology combined with peptide hydrazide ligation. SUMO and K33 acetylated SUMO was identified with corrected molecular weight by the SDS-PAGE. It was also confirmed that the chemically synthetic protein and biologically expressed SUMO2 own similar homogeneity and secondary structure by the CD analysis. These results provided a foundation for the follow-up study of K33 acetylated SUMO protein.

Keywords Small ubiquitin-related modifier; Acetylation; High temperature assisted solid-phase peptide synthesis; Peptide hydrazide; Native chemical ligation (Ed.: P, H, W, K)

[†] Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos.21372058, 21572043).