

· 研究报告 ·

段昌柱 重庆医科大学教授、博士生导师。国家自然科学基金、重庆市科技攻关、重庆市自然科学基金获得者。国家自然科学基金通讯评议专家，教育部学位中心论文评审专家，重庆市科委项目通讯评议专家。长期致力于细胞增殖与调控研究，培养博士、硕士研究生 30 余人。



定量蛋白质组学揭示酵母去泛素化酶 Ubp14 生物学功能

李招娣^{1,2}, 兰秋艳², 李衍常², 徐聪², 常蕾², 徐平², 段昌柱¹

1 重庆医科大学 基础医学院 细胞生物学与遗传学教研室 分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016

2 军事科学院军事医学研究院 生命组学研究所 中国医学科学院蛋白质组学与药物研发新技术创新单元 国家蛋白质科学中心 (北京) 北京蛋白质组研究中心 蛋白质组学国家重点实验室, 北京 102206

李招娣, 兰秋艳, 李衍常, 徐聪, 常蕾, 徐平, 段昌柱. 定量蛋白质组学揭示酵母去泛素化酶 Ubp14 生物学功能. 生物工程学报, 2022, 38(10): 3901-3913.

LI ZD, LAN QY, LI YC, XU C, CHANG L, XU P, DUAN CZ. Quantitative proteomics reveal the potential biological functions of the deubiquitinating enzyme Ubp14 in *Saccharomyces cerevisiae*. Chin J Biotech, 2022, 38(10): 3901-3913.

摘要: 泛素化是一种动态可逆的蛋白质翻译后修饰, 泛素分子在泛素激活酶、泛素结合酶和泛素连接酶的级联酶促反应催化下共价连接到底物蛋白上。去泛素化酶将泛素分子从底物上移除, 动态可逆地调控泛素化修饰, 在成熟泛素的生成、泛素链的移除与修剪、游离泛素链的回收等过程中发挥着关键的调控作用。本文的研究对象是酵母中泛素特异性蛋白酶 (ubiquitin specific protease, USP) 家族成员 Ubp14, 负责回收细胞内游离的泛素链。本研究定量比较了酵母细胞中 Ubp14 缺失对全蛋白质组的影响, 进而找出其潜在的调控通路和分子功能。首先, 通过同源重组技术构建了 *ubp14Δ* 菌株, 发现其生长速度低于野生型酵母。利用稳定同位素氨基酸代谢标记技术结合深度覆盖的蛋白质组学分析技术, 系统比较了 *ubp14Δ* 菌株相对于野生型

Received: March 11, 2022; **Accepted:** May 10, 2022; **Published online:** May 13, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32071431, 31700723); National Key Research and Development Program of China (2017YFC0906600, 2017YFA0505000)

Corresponding author: DUAN Changzhu. E-mail: duanchzhu@cqmu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (32071431, 31700723); 国家重点研发计划 (2017YFC0906600, 2017YFA0505000)

菌株的差异蛋白, 共计鉴定 3 685 个蛋白, 通过统计学分析筛选得到 109 个差异蛋白。基因本体论分析发现, Ubp14 缺失引起的差异蛋白主要参与了包括氨基酸代谢、氧化还原和热应激等生物学过程。本研究为深入探究去泛素化酶 Ubp14 的生物学功能, 进而深刻理解游离泛素的稳态平衡与生物学过程调控提供了高可信的蛋白质组学数据信息。

关键词: 去泛素化酶; Ubp14; 稳定同位素氨基酸代谢标记技术; 泛素

Quantitative proteomics reveal the potential biological functions of the deubiquitinating enzyme Ubp14 in *Saccharomyces cerevisiae*

LI Zhaodi^{1,2}, LAN Qiuyan², LI Yanchang², XU Cong², CHANG Lei², XU Ping², DUAN Changzhu¹

1 Molecular Medicine and Cancer Research Center, Department of Cell Biology and Genetics, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

2 State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences (Beijing), Research Unit of Proteomics & Research and Development of New Drug, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing Institute of Lifeomics, Academy of Military Medical Sciences of Academy of Military Science, Beijing 102206, China

Abstract: Ubiquitination is one of the reversible protein post-translational modifications, in which ubiquitin molecules bind to the target protein in a cascade reaction of ubiquitin activating enzymes, ubiquitin conjugating enzymes, and ubiquitin ligases. The deubiquitinating enzymes (DUBs) remove ubiquitin residues from the substrates, which play key roles in the formation of mature ubiquitin, the removal and trimming of ubiquitin chains, as well as the recycling of free ubiquitin chains. Ubp14, a member of the ubiquitin specific proteases family in *Saccharomyces cerevisiae*, is mainly responsible for the recycling of intracellular free ubiquitin chains. To investigate its global biological function, a *ubp14Δ* mutant was constructed by homologous recombination technique. The growth rate of *ubp14Δ* mutant was lower than that of the wild-type (WT) strain. Using stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) combined with deep coverage proteomics analysis, the differentially expressed proteins of *ubp14Δ* mutant relative to the wild-type strain were systematically analyzed. A total of 3 685 proteins were identified in this study, and 109 differentially expressed proteins were filtered out by statistical analysis. Gene ontology analysis found that differentially expressed proteins caused by Ubp14 loss were mainly involved in amino acid metabolism, REDOX, heat shock stress and etc, which shed light on the broad biological function of this DUB. This study provides highly reliable proteomic data for further exploring the biological functions of the deubiquitination enzyme Ubp14, and further understanding the relationship between the free ubiquitin homeostasis and biological process regulation.

Keywords: deubiquitinating enzyme; Ubp14; stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC); ubiquitin

泛素化 (ubiquitination) 是真核生物中一种普遍存在的蛋白质翻译后修饰,可以在特定时空条件下精确传递不同的生物学信号,参与包括蛋白质降解、DNA 修复、内吞、自噬等在内的多种生物学过程,启动特定的细胞信号转导^[1]。泛素分子通过其 C 端的甘氨酸共价修饰到底物蛋白的赖氨酸残基上, N 端的甲硫氨酸和 7 个赖氨酸均可作为继续链接的位点,在 E1、E2、E3 的级联酶促反应下共价修饰到底物蛋白的赖氨酸残基上形成多聚泛素化修饰,去泛素化酶 (deubiquitin enzyme, DUB) 的存在使这一过程可逆化^[2]。泛素链的生成和修剪组成了泛素化修饰的调控网络,在维持内环境稳态方面有重要的意义^[3-4]。DUB 功能异常可能会导致自身免疫系统疾病、传染病、癌症等疾病的发生^[5-7],其具有成为药物靶点的巨大潜力。有研究表明, JAMM 金属蛋白酶家族成员 Psm14 为多发性骨髓瘤的潜在的治疗靶点,而 USP 家族成员 Usp14 有望成为非小细胞肺癌的潜在治疗靶点^[8-11]。

DUB 主要分为半胱氨酸蛋白酶和金属蛋白酶两大类。根据结构和作用机制,半胱氨酸蛋白酶又分为 4 类:泛素特异性蛋白酶 (ubiquitin-specific protease, USP)、泛素羧基末端水解酶 (ubiquitin C-terminal hydrolase, UCH)、卵巢肿瘤蛋白酶 (otubain protease, OUT)、Machado-Joseph disease 蛋白酶 (Machado-Joseph disease protease, MJD);而属于金属蛋白酶类的 DUB 为 MPN(+)/JAMM 蛋白酶 (JAMM)。结构上,前 4 种都含有半胱氨酸和组氨酸盒子等有催化活性的结构域。而 JAMM 中起着催化活性的为 JAMM/MPN⁺结构域^[12-13]。人类大约有 100 种 DUB,而酵母中有 21 种 DUB^[4,13]。其中,USP 是迄今为止研究最多且成员最广的一类 DUB,它在人体中大约有

60 种,而在酵母中有 16 种且用 UBP 表示^[13]。

ubp14 基因 (ORF YBR058c) 位于酵母基因组 2 号染色体上,其在人体中的同源基因为 *usp5* (*isot*),负责切割细胞中大多数游离的泛素链,切割特性为每次切掉链近端的一个泛素。在哺乳动物细胞中, Usp5 同样能够识别、切割未锚定泛素链并维持泛素单体稳态^[14]。Usp5 切割的速度会因为近端泛素 C 末端被酯化或移除 G76 而显著降低,即泛素链 C 端处于游离状态是 Usp5 识别底物的关键^[15]。Usp5 通过介导非锚定泛素链的水解来调节热诱导应激颗粒的组装和拆卸,下调 Usp5 会引起热应激颗粒的累积^[16]。有研究表明, DNA 双链断裂后, Usp5 被招募到 DNA 损伤位点切割多聚泛素链,促进细胞通过同源重组途径高效修复 DNA^[17]。Usp5 是 T-型钙通道亚型 Cav3.2 的相互作用蛋白并调节其细胞表面表达,在慢性疼痛反应中 Usp5 上调,而阻止 Usp5 与 Cav3.2 结合能够缓解神经性疼痛^[18]。Usp5 可以稳定免疫抑制分子细胞程序性死亡-配体 1 (PD-L1),使肿瘤细胞免受免疫系统破坏^[19]。Usp5 通过移除 G1/S-特异性周期蛋白-D1 (cyclin D1) 上的 K48 链修饰使其稳定,下调 Usp5 能够引起 cyclin D1 蛋白下降,诱导细胞周期的 G1/S 期阻滞,显著抑制胶质母细胞瘤的增殖和集落形成^[20]。此外, Usp5 可以通过其 DUB 活性稳定缺氧诱导因子-1 (HIF2 α),促进乳腺癌细胞的增殖和转移^[21]。Usp5 在人体中调控多种重要的生物学过程,具有成为药靶的巨大潜力。

酵母中,去泛素化酶 Ubp14 负责识别并切割游离泛素链,对于细胞中的泛素分子稳态维持极为重要,其缺失会导致游离泛素链的累积^[22]。细胞中的泛素分子稳态直接影响细胞中泛素化蛋白的稳态,进而对全蛋白质组产生影响,导致生物体稳态变化^[23]。研究表明, Ubp14 选择

性切割游离的泛素链, Ubp14 (人类中的 Usp5) 缺失导致酿酒酵母中 K29 和 K48 链的丰度增加了约 30 倍, 而 K63 链的累积程度不足 2 倍^[22]。Ubp14 缺失会引起蛋白酶体功能受损, 导致游离的泛素单体耗竭以及未切割的寡聚和多聚泛素链的累积。Ubp14 和 Ubp6 在促进体内泛素底物降解方面的作用相似, 二者的敲除皆可挽救 *ubp10* 敲除导致的细胞增殖缺陷^[24-25]。过表达 Ubp14 能够增加细胞中泛素链的降解从而增加游离的泛素单体, 使得细胞对应激易感, 并且阻碍某些蛋白的蛋白酶体降解途径, 影响细胞生长^[26]。

细胞中泛素化蛋白的丰度较低, 使得其鉴定较为困难^[27-28]。由于 DUB 的移除效应, 其对应的泛素化底物鉴定更加困难。因此, 本研究利用酵母同源重组技术^[29-30], 构建了 *ubp14Δ* 菌株, 结合基于 SILAC 的定量蛋白质组学技术, 在全蛋白质组水平分析了 Ubp14 缺失前后发生变化的蛋白^[31]。本研究聚焦到 DUB 缺失之后引起变化的蛋白质和通路, 从而对其功能和参与的生物学过程进行了分析。本研究共鉴定到 109 个差异蛋白, 其中包含 71 个上调蛋白、38 个下调蛋白。通过 GO 分析, Ubp14 可能参与了包括氨基酸合成、氨基酸代谢、氧化还原、细胞对热反应等过程。对热应激通路进行温度敏感验证, 高温使敲除菌株生长受损, 与 GO 分析得到的结果一致。表明本研究筛选得到的 *ubp14Δ* 菌株中 109 个潜在受 Ubp14 调控的蛋白以及其潜在的生物学功能可信。本研究可为深入探究去泛素化酶 Ubp14 的生物学功能, 理解游离泛素链的稳态平衡与生物学过程调控的功能探究提供数据支持和理论依据, 本实验方法也可为其他 DUB 的功能探究提供借鉴和思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

本研究用到的质粒和菌株见表 1。

1.1.2 培养基和培养条件

YPD 培养基 (100 mL): 2 g 蛋白胨, 1 g 酵母粉, 2 g 葡萄糖, 1.5 g 琼脂 (固体培养基加入), 100 mL 双蒸水。SC base (100 mL): 0.67 g 酵母氮源基础 (含硫酸铵), 2 g 葡萄糖, 0.8 g 琼脂糖 (固体培养基加入), 90 mL 双蒸水。SC 培养基 (100 mL): 90 mL SC base, 10 mL SC-10 × aa (成分见表 2)。

重标培养基: 90 mL SC base, 10 mL SC-10×aa-K/R, 300 μL K6 (1 g/100 mL), 200 μL R10 (1 g/100 mL); 轻标培养基: 90 mL SC base, 10 mL SC-10×aa-K/R, 300 μL K0 (1 g/100 mL), 200 μL R0 (1 g/100 mL)。

SD-ura 培养基 (100 mL): 0.17 g 酵母氮源基础 (不含硫酸铵), 0.5 g 硫酸铵, 2 g 葡萄糖, 0.8 g 琼脂糖 (固体培养基加入), 10 mL SD-10×aa mix-U (成分见表 3), 90 mL 双蒸水。遗传霉素 (G418) 在 YPD 培养基中的使用浓度是 50 μg/mL。WT 和 *ubp14Δ* 菌株在 220 r/min、30 °C 振荡培养。

1.1.3 主要试剂和仪器

dNTPs 购自 TaKaRa; 遗传霉素购自 AMERSCO 公司; 2×Taq PCR Master Mix 购自 BIOMIGA 公司; DNA 胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司; Ac-Trypsin 蛋白酶由实验室自制^[33-34]。

PCR 仪、凝胶成像系统和电泳仪电源, BIO-RAD 公司; 涡旋混合仪, 海门其林公司; 生化培养箱, 上海一恒; 脱色摇床、电泳槽, 北京市六一仪器厂; 分光光度计, SHIMADZU BIOTECH 公司; 质谱、超高压色谱、冷冻离心机、摇床、超低温冰箱, Thermo 公司。

表 1 本研究所用的质粒和菌株

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains & plasmids	Description	Types	Background	Sources
WT (JMP024)	Endogenous ubiquitin genes are knocked out, ubiquitin expression in plasmid	Strain	SUB592	[23]
<i>ubp14</i> Δ	<i>ubp14</i> is knocked out	Strain	JMP024	This study
pFA6a-kanMX4	KanMX4	Plasmid		[32]

表 2 SC-10×氨基酸混合物

Table 2 SC-10×aa mix

Amino acids	The final concentration (mg/L)	10×aa mix (g/L)
Adenine sulfate	20	0.2
Uracil	20	0.2
L-arginine-HCl	20	0.2
L-tyrosine	30	0.3
L-leucine	30	0.3
L-isoleucine	30	0.3
L-phenylalanine	50	0.5
L-glutamic acid	100	1.0
L-aspartic acid	100	1.0
L-valine	150	1.5
L-threonine	200	2.0
L-serine	400	4.0
L-histidine-HCl	20	0.2
L-lysine-HCl	30	0.3

表 3 SD-10×氨基酸混合物 (无尿嘧啶)

Table 3 SD-10×aa mix-U

Amino acids	The final concentration (mg/L)	10×aa mix (g/L)
L-arginine-HCl	20	0.2
L-histidine-HCl	20	0.2
L-lysine-HCl	30	0.3

1.2 实验方法

1.2.1 敲除菌株的构建

同源重组片段构建：在 SGD 数据库找到酿酒酵母中 *ubp14* 基因上下游序列，设计同源臂并合成引物 ubp14-F 和 ubp14-R。用 pFA6a-kanMX4 质粒为模板进行 PCR，扩增用于同源重组的替换片段卡那霉素抗性基因 *kan*^[35]。PCR 引物见表 4。产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检验后，进

行纯化。

酵母感受态制备：配制过滤无菌冰冻的感受态细胞 (freezing competent cell, FCC) 溶液 (20 mL)：10 mL 10% 的无菌 DMSO，10 mL 10% 的无菌甘油。从平板上挑取 WT 菌株 (JMP024) 单克隆接种到 5 mL YPD 培养基中，220 r/min、30℃ 摇床培养过夜。12–16 h 后测定 OD_{600} ，以起始 $OD_{600}=0.3$ 转接到 50 mL 2×YPD 培养基中，当 OD_{600} 为 1.5 时，3 000×g 离心 5 min 收菌。用 1 mL 无菌水洗细胞，重复一次，转移至无菌离心管中，4℃、3 000×g 离心 5 min 弃去上清。用 200 μL 的 FCC 溶液重悬细胞沉淀。每管 20 μL 分装到 1.5 mL 离心管中，得到酵母感受态细胞。

敲除菌株的构建：配制 FCC 转化体系 (360 mL)：36 μL 的 1 mol/L 的醋酸锂，260 mL 的 50% 的 PEG3350，50 μL 的鲑精 DNA 以及 14 μL 的 DNA 产物。将感受态细胞在 37℃ 水浴解冻 30–60 s，3 000×g 离心 2 min，弃上清。将配好的转化体系与菌体混匀，42℃ 水浴 1 h，3 000×g 离心 30 s，弃上清。1 mL YPD 重悬细胞，并 30℃ 温育 2 h。3 000×g 离心 1 min，弃上清，取一半菌体涂板。

敲除菌株的验证：挑取抗性培养基上生长的单克隆进行 PCR 验证。PCR 验证体系：10 μL 2×Taq mix、0.2 μL primer-F、0.2 μL primer-R、少量菌体，最后加去离子水补足至 20 μL。PCR 用到的引物见表 4。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检验。

表 4 菌株构建所用引物

Table 4 Primers used in this study

Name	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
ubp14-F	AGGTAAATTCATCCAAAAAGAGAGCCCCGAAGTCTTTCTCACATTTCAGAAAGACATGGAGGCCCA GAATAC	69
ubp14-R	TATATATATATATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTAAACGTTCTTCAGTATAGCGACCAGCATTC	69
A1	GCTTGTGCTGTGACTGGAGTCGGAATCGCAGAC	34
B1	GAGTCGGAATCGCAGAC	17
C1	ACATACCCACCACTAAGG	18
D1	GAAGAACCTCAGTGGCAA	18

1.2.2 生长曲线绘制

从平板上挑取少许菌落，接种到 5 mL 的 SC 培养基中，30 °C、220 r/min 培养过夜，第 2 天以起始 $OD_{600}=0.26$ 转接到 50 mL SC 培养基中，每隔 2 h 测定 OD_{600} ，测定总时间为 24 h。每个菌株设置 3 个生物学重复。

1.2.3 SILAC 样品制备

用 YPD 平板活化 WT、*ubp14Δ* 菌株，30 °C 生化培养箱培养过夜，每个菌株挑取 2 个单克隆分别转接到含 4 mL YPD 培养基的试管中，30 °C 摇床 220 r/min 培养过夜；第 2 天测定 OD_{600} ，从中取出 500 μL，加 1 mL 水洗 2 次，3 000×g 离心 5 min，弃上清，用 1 mL 水重悬菌体；根据 OD_{600} 计算转接所需的菌体量，以起始 $OD_{600}=0.001$ 将 WT 菌株转接到 20 mL 轻标 SC 培养基中，将 *ubp14Δ* 菌株转接到 20 mL 重标 SC 培养基中，每组 2 个生物学重复。在 OD_{600} 为 1.5 时收集菌体，3 000 r/min 离心 5 min；每管用 1 mL 水洗两次，17 000×g 离心，弃上清；用 1 mL 0.1% NaN_3 重悬菌体，取少量测定 OD_{600} ，根据测定的 OD_{600} 值取对应的 WT 轻标和 *ubp14Δ* 的重标各 15 OD 混合，两个生物学重复分别记为 R1、R2。17 000×g、4 °C 离心 5 min，加裂解缓冲液及与菌体体积相等的玻

璃珠，涡旋 1 min，冰上静置 1 min，重复 15 次。17 000×g、4 °C 离心 1 min，取上清转移至新管与 5×SDS 上样缓冲液混合。

1.2.4 质谱样品制备

配置 10% SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶，将 R1、R2 样品经电泳分离，用考马斯亮蓝染液染色处理直至看到清晰的蛋白条带。根据蛋白条带的位置对其进行分区划线并切块，其中 R1 分为 28 个条带，R2 分为 36 个条带。再将各条带切成体积为 1 mm³ 胶粒转移到 EP 管中。向含有胶粒的 EP 管中加入 300 μL 脱色液，涡旋至溶液颜色不再变深，离心 1 min，去掉上清。重复上述步骤至胶粒颜色变为无色。离心弃上清，加入 300 μL 乙腈 (acetonitrile, ACN)，先用手轻弹混匀将硬粒打散，再涡旋直至胶粒变为白色硬颗粒，将样品置于真空冷冻干燥仪中彻底干燥。加入酶解液，以酶液刚好浸没胶粒为准，冰上放置，胶粒溶胀后补加酶解液；冰上放置 40 min，直至胶粒不再膨大；37 °C 封口放置，酶解 12 h。

酶解结束后，17 000×g 离心 1 min，将酶液小心吸出，转移至新的 EP 管中。向胶中加入抽提液 40 μL (5% 甲酸 (formic acid, FA), 50% ACN)，17 000×g 离心 1 min，静置 4 min，

吸出上清, 转移到对应的 EP 管中, 重复该步骤 4–5 次。加入 ACN 重复脱水, 同样转移到对应的离心管中, 混匀后检测肽段浓度, 确定上样体积。最后, 将离心管置于旋转蒸发器中干燥以获得肽段样品。

1.2.5 质谱检测参数

用上样缓冲液溶解样品, $17\ 000\times g$ 离心 15 min。质谱检测使用超高压液相色谱 (Nano Acquity, Waters) 分离梯度, 上样体积为 $3\ \mu\text{L}$, 上样流速为 $10\ \mu\text{L}/\text{min}$ 。洗脱下来的组分直接经过纳喷离子源 (nanoelectrospray ionization, NSI) 进入高分辨率质谱仪 (LTQ Orbitrap Velos, Thermo Fisher Scientific) 检测。流动相 A: 98% 双蒸水+2%乙腈+0.1%甲酸; 流动相 B: 100% 乙腈+0.1%甲酸。洗脱条件: 0–5 min, 流动相 B 由 3%增长至 6%; 5–50 min, 流动相 B 由 6%线性增长至 40%; 50–60 min, 流动相 B 由 40%增长至 50%。流动相流速为 $0.3\ \mu\text{L}/\text{min}$ 。扫描范围 300–1 600 m/z , 分辨率为 30 000, 自动增益控制 (automatic gain control, AGC) 为 1×10^6 ; 数据采集模式为数据依赖模式 (data-dependent acquisition, DDA); 选择一级谱中丰度排名前 20 的离子进一步在离子阱中碎裂并检测; 离子碎裂模式为高能碰撞诱导碎裂 (high energy collision-induced dissociation, HCD), AGC 为 1×10^5 , 最大离子注射时间为 100 ms。自动排除扫描正 1 价离子和未被识别的离子。动态排除的时间为 30 s, 期间不检测相同的已测序离子, 提升测序覆盖度。

1.2.6 数据分析

使用 MaxQuant (version 1.5.3.0) 软件搜库得到的原始定量蛋白质组学数据进行差异蛋白筛选。分别对两组的比值 ($ubp14\Delta/\text{WT}$) 划分频数区间, 在 Excel 中用 NORM.DIST 函数建立高斯拟合曲线。R1、R2 的 SD 值均为 0.13, 以

3 倍 SD 值为卡值标准, 在 R1、R2 中同时鉴定到且趋势一致的为差异蛋白。利用 David 在线网站 (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>) 分别对上下调的差异蛋白进行 GO 分析, 选取 $P<0.05$ 的部分差异通路进行展示。

1.2.7 点板实验

挑取 WT 与 $ubp14\Delta$ 菌株单克隆, 分别接种到 5 mL YPD 培养基中, $30\ ^\circ\text{C}$ 、220 r/min 摇床培养过夜, 第 2 天取 1 mL WT 与 $ubp14\Delta$ 菌液, $3\ 000\times g$ 离心 1 min, 用无菌水洗 3 次, 再用 1 mL 无菌水重悬, 测量 OD 后先稀释至 1 OD/mL, 再梯度稀释相应倍数, 取 $2\ \mu\text{L}$ 菌体悬浊液点板。将板子分别置于 $30\ ^\circ\text{C}$ 、 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养。一定时间后, 拍照观察。

2 结果与分析

2.1 酵母 $ubp14$ 敲除菌株构建与验证

$ubp14$ 基因位于酵母基因组 2 号染色体上, 通过同源重组的方法用卡那霉素抗性基因 kan 代替 $ubp14$ 。以 pFA6a- $kanMX4$ 质粒为模板 DNA, 利用引物 $ubp14\text{-F}$ 和 $ubp14\text{-R}$ 扩增得到用于同源重组的 kan 片段。以 WT 菌株为模板无法扩增出任何片段, 而以 pFA6a- $kanMX4$ 质粒为模板可以扩增出 kan 片段 (图 1A)。将扩增得到的片段转化到酵母细胞中, 选取部分单克隆菌落, 利用表 4 中两对引物 A1、B1 对上游片段进行验证, C1、D1 对下游片段进行 PCR 验证, 扩增出原 $ubp14$ 上下游部分序列及 kan 部分片段 (图 1B), 从基因层面证明 $ubp14$ 已成功敲除。对 WT 及 $ubp14\Delta$ 菌株进行蛋白质组分析, Ubp14 仅在 WT 菌株中被检测到, 信号强度超过 7×10^6 , 而敲除菌株中没有检测到 Ubp14 的蛋白信号 (图 1C), 该结果从蛋白质层面证明 $ubp14$ 敲除成功。

2.2 酵母敲除 *ubp14* 后生长减缓

对 WT 和 *ubp14*Δ 菌株进行生长曲线的测绘, 从表型上探究 Ubp14 缺失是否会引起细胞生长的变化。分别将等起始量 ($OD_{600}=0.26$) 的 WT 和 *ubp14*Δ 菌株接种到 SC 培养基中, 每隔 2 h 测定吸光度 OD_{600} , 测定总时间为 24 h, 每个菌株设置 3 个生物学重复。在指数生长期 *ubp14*Δ 菌株的生长较 WT 菌株略为缓慢, WT

菌株的平台期为 4.3 OD , 而 *ubp14*Δ 菌株的平台期为 3.6 OD , 相较于野生型下降了 0.7 OD (图 2A)。在指数生长期 (6–8 h) 测定这两个菌株的倍增时间, *ubp14*Δ 菌株倍增时间为 2.6 h, 而 WT 菌株倍增时间为 1.8 h, *ubp14*Δ 的倍增时间延长了 0.8 h, 出现了明显的生长阻滞 (图 2B)。表明 Ubp14 参与菌株生长, 其影响的关键蛋白和通路有待进一步研究。

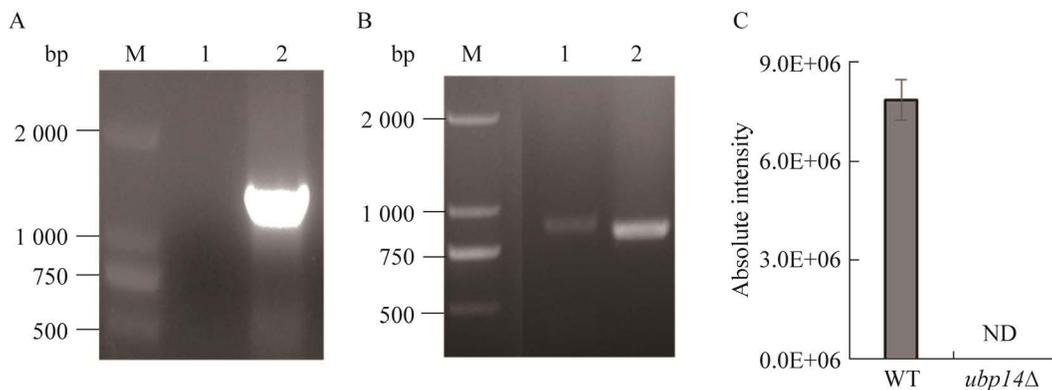


图 1 *ubp14*Δ 菌株构建与验证

Figure 1 Construction of *ubp14*Δ mutant. (A) PCR results of *kan*. Lane 1: PCR results of WT strain; lane 2: PCR results of pFA6A-KANMX4 plasmid. (B) Knockout verification of *ubp14*Δ mutant. Lane 1: *kan* gene upstream fragment validation; lane 2: *kan* gene downstream fragment validation. (C) Quantitative information of Ubp14 in WT strain and *ubp14*Δ mutant. ND: not detected.

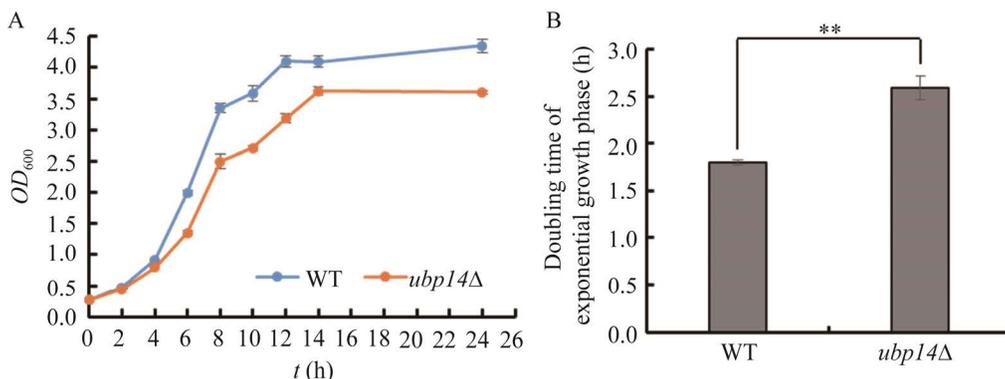


图 2 *ubp14*Δ 菌株生长阻滞

Figure 2 Growth retardation of the *ubp14*Δ mutant. (A) Growth curves of WT and *ubp14*Δ mutant. (B) Doubling time of WT and *ubp14*Δ mutant.

2.3 定量蛋白质组学筛选 *ubp14Δ* 菌株差异表达蛋白

为了得到高覆盖的蛋白质组学数据,按流程制备质谱样品(图 3A),用胰蛋白酶进行消化(图 3B)。用质谱检测标记效率,结果证明标记效率超过 99% (数据未展示),符合 SILAC 定量比较的要求。利用基于 SILAC 标记技术的高覆盖定量蛋白质组学策略比较了 Ubp14 缺失前后酵母蛋白组中所有蛋白的含量变化。鉴定结果如表 5 所示,R1 共鉴定到 3 205 个蛋白,其中定量的蛋白有 2 757 个,定量变异系数(CV)平均为 13.2%;R2 共鉴定到 3 860 个蛋白,其中定量的蛋白有 3 570 个,CV 平均为 14.7%。R1、R2 中有定量信息的蛋白有 2 642 个重复(表 5),两次实验重复性较好,并且它们的相关性较好,两组定量的变异系数均小于 15%,数值可信(图 4A、4C)。对 R1、R2 样品的比值(*ubp14Δ*/WT)取 Log_2 进行了频数分布统计,并用样本标准差(SD)等于 0.13 绘制了高斯拟合曲线(图 4B)。以

3 倍 SD 值为卡值标准,两次实验中均符合卡值区间且趋势一致的差异蛋白有 109 个,其中包括 71 个上调蛋白,38 个下调蛋白(图 4C)。

2.4 差异蛋白 GO 分析

为了探究 Ubp14 潜在的调控通路及分子功能,分别对这 71 个上调蛋白以及 38 个下调蛋白进行 GO 分析,包括分子功能分析、参与过程分析及亚细胞定位分析(图 5A、5B)。结果显示上调的差异蛋白主要参与氨基酸生物合成、代谢、氧化还原及细胞对热反应等过程,这些蛋白具有催化酶活性、转移酶活性、裂解酶活性和氧化还原活性,主要定位在细胞质与线粒体中。其中,敲除菌株中上调差异蛋白涉及细胞对热反应的分析与人体中 *ubp14* 的同源基因 *usp5* 耗竭引起热休克蛋白上调的报道一致^[16]。下调的差异蛋白主要参与硫酸盐同化、代谢过程、氨基酸生物合成以及氧化还原过程,具有催化酶活性、还原型辅酶 II (NADPH) 活性、水解酶活性和氧化还原活性,这些蛋白

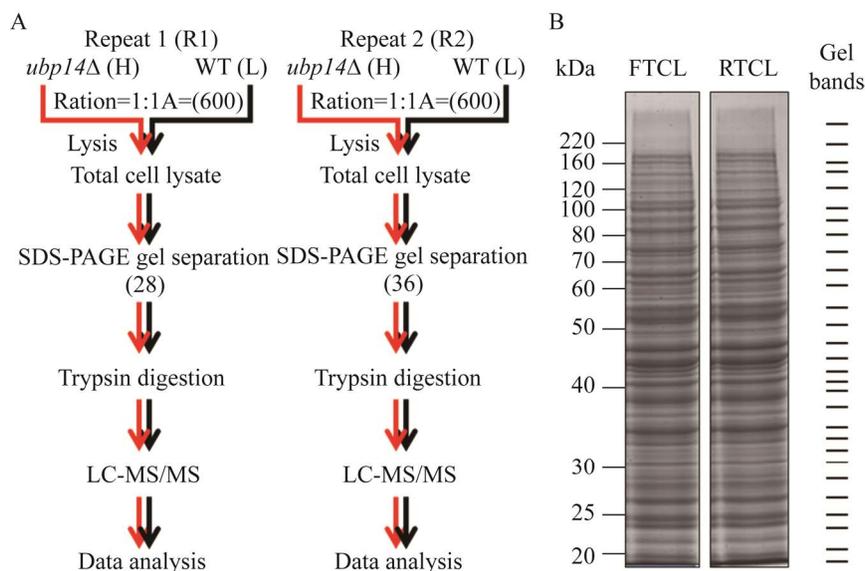


图 3 SILAC 样品制备流程

Figure 3 SILAC sample preparation process. (A) SILAC labeled mass spectrometry sample preparation process. (B) Separation of protein samples.

主要定位在 NADPH 复合物中。研究表明,酿酒酵母中 Met3、Met14、Met16 在将硫酸盐同化还原为硫化物的过程中是必要的^[36],虽然没有证据表明 Ubp14 是否影响这一通路,但在敲除菌株中观察到了 Met3、Met14、Met16 的下调。而甲硫氨酸调控通路是受到泛素化调控的,推测细胞内游离泛素链和泛素分子的含量变化,可能间接影响了甲硫氨酸合成通路相关蛋白的稳态,进而引发相关通路失调^[37-38]。

2.5 *ubp14*Δ 菌株对高温敏感

GO 分析发现,在 *ubp14*Δ 菌株中有 5 个上调蛋白 (Hsp26、Hsp78、Ssa4、Hsp31、Hsp42) 隶属于热休克蛋白家族成员,此类蛋白在细胞热休克时表达上调。其中, Hsp26 具有恢复错误折叠蛋白的正常折叠结构的功能^[39]; Hsp78 在酵母的线粒体基质中表达,对于线粒体热耐受性和热休克后线粒体错误折叠蛋白质的恢复至关重要^[40]; Hsp70 可以促进错误折叠的蛋白质降解^[41]; 除热刺激外, Hsp31 在过氧化氢处理后也增加,缓解蛋白质聚集和错误折叠,并对许多的底物蛋白有效^[42]; Hsp42 可以促进细胞中应激诱导的错误折叠蛋白隔离形成胞质聚

集体,这些上调的热休克蛋白对错误折叠蛋白的修复均有作用^[43]。此外,两次重复中定量到的 19 个热休克蛋白家族成员大部分均有上调现象 (图 6A)。对 *ubp14*Δ 菌株进行温度敏感实验验证 GO 分析的结果,在 30 °C 和 37 °C 条件下,用 SD 培养基和 SC-ura 培养基分别培养了 WT 和 *ubp14*Δ 菌株并观察其生长表型。结果表明,两种菌株在 30 °C 生长最佳,生长没有显著差异。37 °C 处理后 *ubp14*Δ 菌株存在明显的生长阻滞现象 (图 6B), *ubp14* 敲除会导致菌株对高温敏感。

表 5 质谱鉴定结果

Table 5 Identification by mass spectrometry

Items	R1	R2
Protein groups	3 205	3 806
Peptides	22 346	54 462
Average sequence coverage (%)	18.4	33.6
MS/MS	737 087	816 279
PSM	146 248	332 449
MS/MS identified (%)	19.8	40.7
Quantified proteins	2 757	3 570
Average quantified CV (%)	13.2	14.7

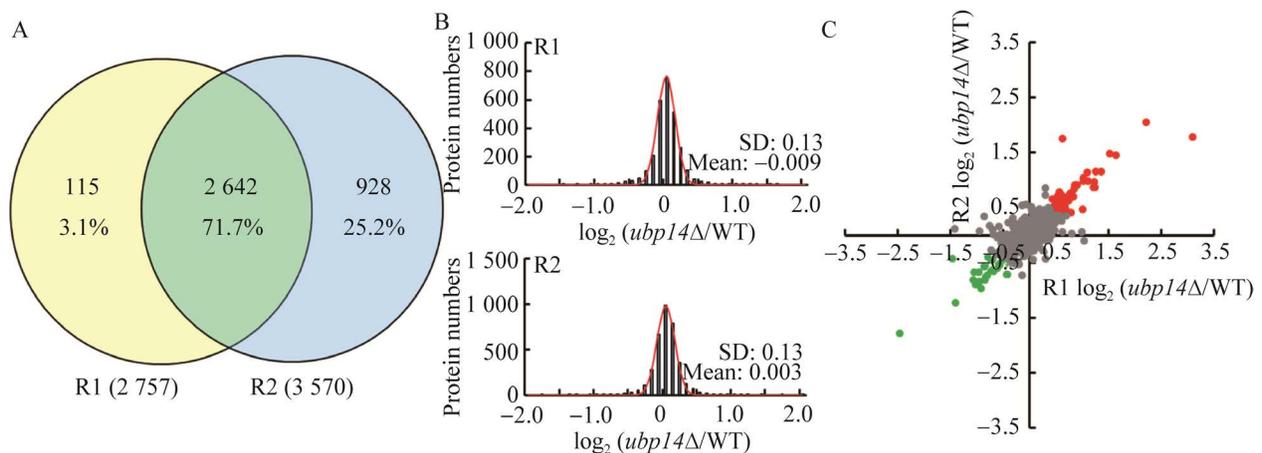


图 4 *ubp14*Δ 菌株中差异蛋白分析

Figure 4 Analysis of differentially expression proteins in *ubp14*Δ strains. (A) Venn diagram for quantitative proteins in two experiments. (B) Gaussian fitting curve of ratio value frequency distribution. (C) Common quantitative protein Log_2 ratio (*ubp14*Δ/WT) distribution, red spots represent up-regulated proteins and green spots represent down-regulated proteins.

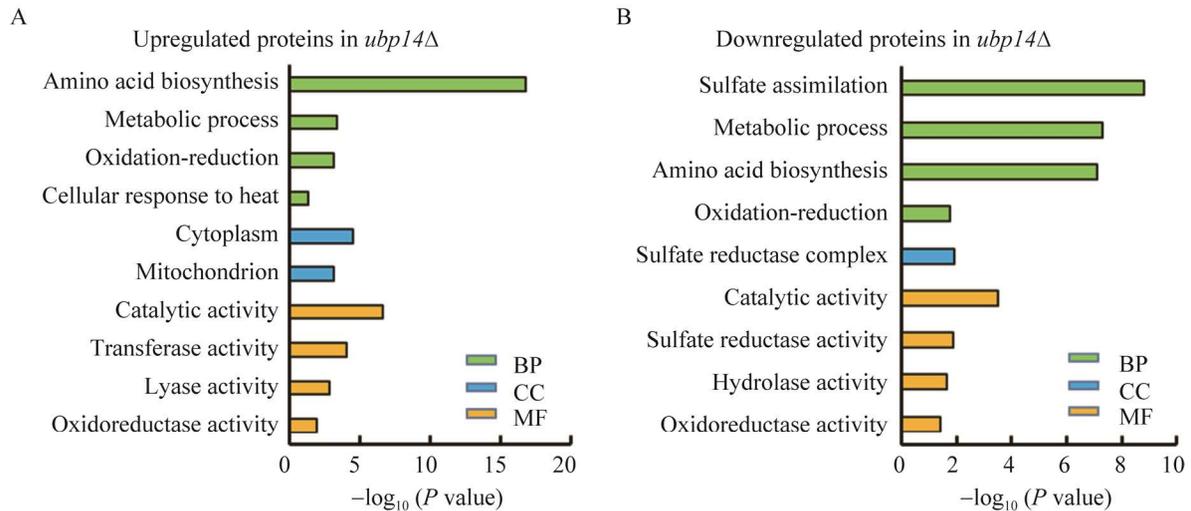


图 5 差异蛋白 GO 分析

Figure 5 GO analysis of differentially expressed proteins. (A) Up-regulated proteins. (B) Down-regulated proteins.

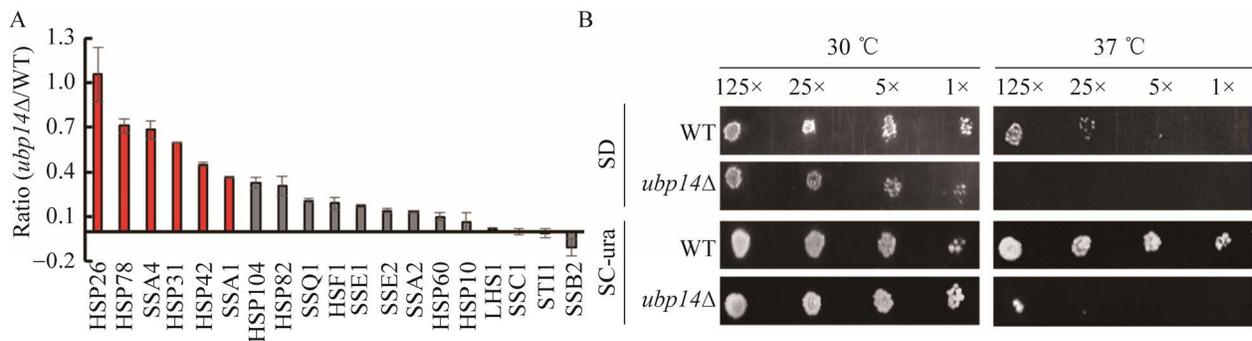


图 6 *ubp14Δ* 菌株对高温敏感

Figure 6 *ubp14Δ* mutant is sensitive to high temperature. (A) Changes of heat shock protein family members. (B) Strain spot plate experiment.

3 讨论与结论

酵母中，去泛素化酶 Ubp14 负责识别并切割游离泛素链，在泛素稳态维持中具有重要调控作用。其缺失导致游离泛素链的累积，进而影响整个泛素化调控网络。本研究通过同源重组用卡那霉素抗性基因 *kan* 替代酵母基因组中的 *ubp14*，为探究 Ubp14 的功能奠定了基础。利用构建的 *ubp14Δ* 菌株，首先观察了 Ubp14 缺失引发的效应，发现 *ubp14Δ* 菌株存在生长阻

滞现象，Ubp14 可能参与调控细胞增殖。

本研究系统比较了 WT 和 *ubp14Δ* 菌株中的差异蛋白，共筛选到 109 个差异蛋白。通过 GO 分析发现，上下调的差异蛋白均参与了氨基酸合成、氧化还原以及代谢等生物学过程。*ubp14Δ* 菌株受影响的代谢通路与氨基酸合成通路可以解释其表现出的生长阻滞现象。有研究表明，Usp5 的耗竭加速热应激颗粒组装，还可以通过引起未锚定泛素链累积从而抑制热应激颗粒拆卸，这与在 *ubp14Δ* 菌株中观察到的

热休克蛋白上调的结果一致。不同温度下的点板实验证实 *ubp14Δ* 菌株对高温 (37 °C) 敏感, Ubp14 可能通过调控泛素链降解参与调控细胞内热应激过程。这条通路的成功验证说明了研究方法的可行性以及结果的可信性。本研究聚焦在 Ubp14 潜在生物学功能的发现, 其他一些功能和精确的调控机制有待进一步探索。

本文仅探究了 *ubp14* 敲除在全蛋白质组水平引起的变化, 包含 Ubp14 引起的直接效应以及 Ubp14 通过影响游离泛素稳态引起的间接效应。实验分析得到的部分生物学功能可能是由于生物副效应引起的, 下一步的工作将对这些上下调的差异蛋白进行 RNA-seq 分析以及 Ubp14 相互作用组的筛选进而探索 Ubp14 直接调控的生物学过程。

综上所述, 本研究筛选了 Ubp14 缺失前后产生差异的蛋白并对其进行了 GO 分析, 揭示了 Ubp14 潜在的生物学功能, 并选取了部分通路进行验证。这为 Ubp14 在人体中的同源去泛素化酶 Usp5 的底物和功能研究提供了新的方向, 本文的研究方法也为其他去泛素化酶底物及功能研究提供了新思路。

REFERENCES

- [1] Swatek KN, Komander D. Ubiquitin modifications. *Cell Res*, 2016, 26(4): 399-422.
- [2] 李衍常, 高媛, 徐忠伟, 等. 蛋白质组学在去泛素化酶研究中的应用. *生物工程学报*, 2014, 30(9): 1341-1350. Li YC, Gao Y, Xu ZW, et al. Application of proteomics in deubiquitinases research. *Chin J Biotech*, 2014, 30(9): 1341-1350 (in Chinese).
- [3] Amer-Sarsour F, Kordonsky A, Berdichevsky Y, et al. Deubiquitylating enzymes in neuronal health and disease. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1): 120.
- [4] Mevissen TET, Komander D. Mechanisms of deubiquitinase specificity and regulation. *Annu Rev Biochem*, 2017, 86: 159-192.
- [5] Ruan J, Schlüter D, Wang X. Deubiquitinating enzymes (DUBs): DoUBLE-edged swords in CNS autoimmunity. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 102.
- [6] Bodda C, Reinert LS, Fruhwürth S, et al. HSV1 VP1-2 deubiquitinates STING to block type I interferon expression and promote brain infection. *J Exp Med*, 2020, 217(7): e20191422.
- [7] Deng L, Meng T, Chen L, et al. The role of ubiquitination in tumorigenesis and targeted drug discovery. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 11.
- [8] Schauer NJ, Magin RS, Liu X, et al. Advances in discovering deubiquitinating enzyme (DUB) inhibitors. *J Med Chem*, 2020, 63(6): 2731-2750.
- [9] Harrigan JA, Jacq X, Martin NM, et al. Deubiquitylating enzymes and drug discovery: emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(1): 57-78.
- [10] Farshi P, Deshmukh RR, Nwankwo JO, et al. Deubiquitinases (DUBs) and DUB inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*, 2015, 25(10): 1191-1208.
- [11] Lim KH, Joo JY, Baek KH. The potential roles of deubiquitinating enzymes in brain diseases. *Ageing Res Rev*, 2020, 61: 101088.
- [12] Das T, Shin SC, Song EJ, et al. Regulation of deubiquitinating enzymes by post-translational modifications. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 4028.
- [13] Nijman SM, Luna-Vargas MP, Velds A, et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*, 2005, 123(5): 773-86.
- [14] Ning F, Xin H, Liu J, et al. Structure and function of USP5: insight into physiological and pathophysiological roles. *Pharmacol Res*, 2020, 157: 104557.
- [15] Reyes-Turcu FE, Horton JR, Mullally JE, et al. The ubiquitin binding domain ZnF UBP recognizes the C-terminal diglycine motif of unanchored ubiquitin. *Cell*, 2006, 124(6): 1197-208.
- [16] Xie X, Matsumoto S, Endo A, et al. Deubiquitylases USP5 and USP13 are recruited to and regulate heat-induced stress granules through their deubiquitylating activities. *J Cell Sci*, 2018, 131(8): jcs210856.
- [17] Nakajima S, Lan L, Wei L, et al. Ubiquitin-specific protease 5 is required for the efficient repair of DNA double-strand breaks. *PLoS One*, 2014, 9(1): e84899.
- [18] Garcia-Caballero A, Gadotti VM, Chen L, et al. A cell-permeant peptide corresponding to the cUBP domain of USP5 reverses inflammatory and neuropathic pain. *Mol Pain*, 2016, 12: 1744806916642444.
- [19] Pan J, Qiao Y, Chen C, et al. USP5 facilitates non-small

- cell lung cancer progression through stabilization of PD-L1. *Cell Death Dis*, 2021, 12(11): 1051.
- [20] Li G, Yang T, Chen Y, et al. USP5 sustains the proliferation of glioblastoma through stabilization of cyclin D1. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 720307.
- [21] Huang W, Liu X, Zhang Y, et al. USP5 promotes breast cancer cell proliferation and metastasis by stabilizing HIF2 α . *J Cell Physiol*, 2022, Epub ahead of print.
- [22] Li Y, Lan Q, Gao Y, et al. Ubiquitin linkage specificity of deubiquitinases determines cyclophilin nuclear localization and degradation. *iScience*, 2020, 23(4): 100984.
- [23] Xu P, Duong DM, Seyfried NT, et al. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell*, 2009, 137(1): 133-145.
- [24] Eisele F, Braun B, Pfirrmann T, et al. Mutants of the deubiquitinating enzyme Ubp14 decipher pathway diversity of ubiquitin-proteasome linked protein degradation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 350(2): 329-333.
- [25] Mapa CE, Arsenault HE, Conti MM, et al. A balance of deubiquitinating enzymes controls cell cycle entry. *Mol Biol Cell*, 2018, 29(23): 2821-2834.
- [26] Amerik AY, Swaminathan S, Krantz BA, et al. *In vivo* disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome. *EMBO J*, 1997, 16(16): 4826-4838.
- [27] Komander D, Rape M. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem*. 2012, 81: 203-229.
- [28] Heride C, Urbé S, Clague MJ. Ubiquitin code assembly and disassembly. *Curr Biol*, 2014, 24(6): R215-20.
- [29] 刘伟, 贺福初, 姜颖. 蛋白质组体内标记技术——SILAC 技术. *生命的化学*, 2009(3): 427-430.
Liu W, He FC, Jiang Y. Proteome *in vivo* labeling using SILAC technology. *Chem life*, 2009, 29(3): 427-430 (in Chinese).
- [30] Lan Q, Wang Y, Sun Z, et al. Quantitative proteomics combined with two genetic strategies for screening substrates of ubiquitin ligase Hrt3. *J Proteome Res*, 2020, 19(1): 493-502.
- [31] Kouranti I, McLean JR, Feoktistova A, et al. A global census of fission yeast deubiquitinating enzyme localization and interaction networks reveals distinct compartmentalization profiles and overlapping functions in endocytosis and polarity. *PLoS Biol*, 2010, 8(9): e1000471.
- [32] Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, et al. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, 2003; 425(6959): 686-691.
- [33] Zhao M, Wu F, Xu P. Development of a rapid high-efficiency scalable process for acetylated Suscrofa cationic trypsin production from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein Expr Purif*, 2015, 116: 120-126.
- [34] Wu F, Zhao M, Zhang Y, et al. Recombinant acetylated trypsin demonstrates superior stability and higher activity than commercial products in quantitative proteomics studies. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2016, 30(8): 1059-1066.
- [35] 林晓华, 柯崇榕, 吴毕莎, 等. 酿酒酵母 *SNF4* 基因敲除缺失菌株的构建. *生物工程学报*, 2011, 27(4): 572-578.
Lin XH, He CR, Wu BS, et al. Construction of *Saccharomyces cerevisiae* mutant with knockout of *SNF4* gene. *Chin J Biotech*, 2011, 27(4): 572-578 (in Chinese).
- [36] Donalies UE, Stahl U. Increasing sulphite formation in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of *MET14* and *SSU1*. *Yeast*, 2002, 19(6): 475-484.
- [37] Li Y, Dammer EB, Gao Y, et al. Proteomics links ubiquitin chain topology change to transcription factor activation. *Mol Cell*, 2019, 76(1): 126-137.e7.
- [38] Kaiser P, Flick K, Wittenberg C, Reed SI. Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF(Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell*, 2000, 102(3): 303-314.
- [39] Cashikar AG, Duennwald M, Lindquist SL. A chaperone pathway in protein disaggregation. Hsp26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by Hsp104. *J Biol Chem*, 2005, 280(25): 23869-23875.
- [40] Abrahão J, Mokry DZ, Ramos CHI. Hsp78 (78 kDa heat shock protein), a representative AAA family member found in the mitochondrial matrix of *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Mol Biosci*, 2017, 4: 60.
- [41] Needham PG, Patel HJ, Chiosis G, et al. Mutations in the Yeast Hsp70, Ssa1, at P417 alter ATP cycling, interdomain coupling, and specific chaperone functions. *J Mol Biol*, 2015, 427(18): 2948-2965.
- [42] Tsai CJ, Aslam K, Drendel HM, et al. Hsp31 is a stress response chaperone that intervenes in the protein misfolding process. *J Biol Chem*, 2015, 290(41): 24816-24834.
- [43] Grousl T, Ungelenk S, Miller S, et al. A prion-like domain in Hsp42 drives chaperone-facilitated aggregation of misfolded proteins. *J Cell Biol*, 2018, 217(4): 1269-1285.

(本文责编 郝丽芳)