

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.21.004

文章编号: 1005-8982(2017)21-0018-07

## 啤酒酵母 *Ubr1* 野生型和缺失型 菌株的比较蛋白组学分析\*

彭健<sup>1</sup>, 张耀婷<sup>1</sup>, 李慧<sup>2</sup>, 肖小龙<sup>2</sup>, 韦超盈<sup>2</sup>, 周宇箏<sup>2</sup>, 卢爱<sup>2</sup>,  
张礼铭<sup>2</sup>, 周梅<sup>2</sup>, 陈杰<sup>1</sup>, 丁成明<sup>1</sup>, 夏赞贤<sup>2</sup>

(1.中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008; 2.中南大学生命科学学院, 湖南 长沙 410013)

**摘要:目的** 寻找并验证 *Ubr1* 泛素化底物蛋白大规模筛选方法的可行性。**方法** 通过对啤酒酵母 RJD347 (*Ubr1* 野生型)和 AVY26 (*Ubr1* 缺失型)的差异蛋白质组学比较,分析酵母中可能存在的 *Ubr1* 直接或间接作用的底物蛋白。进一步通过外源表达实验验证差异蛋白与 *Ubr1* 之间的相关性。**结果** 组学研究得到 249 个差异表达蛋白,其中 145 个蛋白在 AVY26 (*Ubr1* 缺失型)中表达上调。选取其中 40 个并外源表达验证 5 个差异蛋白 MLC2、SCD6、ARG1、HOG1 及 RTF1 与 *Ubr1* 具有相关性,受泛素连接酶 *Ubr1* 的泛素化调控。**结论** 建立 *Ubr1* 泛素化底物候选蛋白库,同时验证出 5 个潜在 *Ubr1* 泛素化底物蛋白。

**关键词:** 啤酒酵母;泛素连接酶 E3 成分 N- 识别蛋白 1;泛素化;蛋白质组学

**中图分类号:** Q591.2

**文献标识码:** A

## Comparative proteomic analysis of *Ubr1* wild type and deletion type of *Saccharomyces cerevisiae*\*

Jian Peng<sup>1</sup>, Yao-ting Zhang<sup>1</sup>, Hui Li<sup>2</sup>, Xiao-long Xiao<sup>2</sup>, Chao-ying Wei<sup>2</sup>, Yu-zheng Zhou<sup>2</sup>,  
Ai Lu<sup>2</sup>, Li-ming Zhang<sup>2</sup>, Mei Zhou<sup>2</sup>, Jie Chen<sup>1</sup>, Cheng-ming Ding<sup>1</sup>, Zan-xian Xia<sup>2</sup>

(1. Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China; 2. School  
of Life Sciences, Central South University, Changsha, Hunan 410013, China)

**Abstract: Objective** To justify the rationality of proteomic screening on a large scale and identify potential substrates of *Ubr1* with the approach. **Methods** In this work, comparative proteomic analysis between RJD347 (*Ubr1* wild type) and AVY26 (*Ubr1* deletion type) has been performed to screen the possible substrate proteins of *Ubr1*. Moreover, the correlation between the differentially expressed proteins and *Ubr1* was further verified by protein work. **Results** In total, 249 proteins which were differentially expressed were identified, of which 145 proteins were up-regulated in AVY26. Furthermore, the protein work confirmed 5 proteins including MLC2, SCD6, ARG1, HOG1 and RTF1 that were closely related to *Ubr1*. **Conclusions** A massive database of 249 proteins that are differentially expressed between RJD347 and AVY26 is established. Five potential substrates of *Ubr1* ubiquitination proteins is identified, which provides the experimental basis for further understanding of biological processes of *Ubr1*.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*; ubiquitin protein ligase E3 component N-recognin 1; ubiquitination; proteomics

泛素(ubiquitin)是一种包含 76 个氨基酸并存在于所有真核生物中的小分子蛋白<sup>[1]</sup>。泛素化修饰参与

收稿日期:2017-04-11

\* 基金项目:国家自然科学基金联合项目(No:U1603126);湖南省自然科学基金(No:2017JJ2334)

[通信作者] 夏赞贤, E-mail: xiazanxian@sklmg.edu.cn

细胞周期调控、细胞增殖和凋亡、脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)损伤、基因表达、信号传递及炎症反应等几乎一切生命活动<sup>[2-3]</sup>,并且与肿瘤<sup>[4]</sup>、心血管等<sup>[5]</sup>疾病的发生密切相关。在泛素化修饰过程中,泛素连接酶对底物的识别是决定泛素化修饰特异性的关键<sup>[6]</sup>。泛素连接酶 E3 成分 N- 识别蛋白 1 (ubiquitin protein ligase E3 component N-recognin 1, *Ubr1*)已被证明是 N 端规则信号通路最重要的 E3 连接酶,能识别含不稳定氨基酸末端的蛋白质<sup>[7]</sup>,结构上存在 3 个底物结合位点,分别能特异性结合蛋白质的碱性 N 端残基,大的疏水性 N 端残基,以及分子内包含 *Ubr1* 结合结构域的转录抑制因子 CUP9<sup>[8]</sup>。在啤酒酵母中,*Ubr1* 通过泛素化降解转录抑制因子 CUP9,从而调控寡肽/二肽转移蛋白 2 (peptide transporter 2, PTR2)的表达,促进酵母对寡肽和二肽的吸收<sup>[9]</sup>。*Ubr1* 在人体组织和细胞中也有表达,且与人肿瘤蛋白 p53 诱导蛋白 3(TP53I3)的泛素化降解有关<sup>[9]</sup>。此外,有研究表明,*Ubr1* 作为 N 端规则信号通路上的泛素连接酶,能够识别细胞质内错误折叠的蛋白并使之通过泛素-蛋白酶体途径降解<sup>[10]</sup>。然而,目前研究确定的 *Ubr1* 泛素化底物数量有限,绝大多数 *Ubr1* 的底物尚未被发现,缺乏系统性的底物筛选研究。

鉴定 E3 连接酶的底物不仅可以使笔者了解 E3 连接酶参与到的生物学过程,而且有助于笔者深入研究该 E3 连接酶催化底物泛素化的分子机制。传统的研究 E3 连接酶底物的方法通常是利用酵母双杂交等技术筛选相互作用的蛋白质<sup>[11]</sup>,再通过体外泛素化反应和体内泛素化反应的方法确定与该 E3 连接酶相互作用的蛋白质是否是其底物。但该技术通量低,效率不高<sup>[12]</sup>。因此,筛选鉴定泛素化底物是

当前泛素化研究的主要难点。蛋白质组学是后基因组时代主要的研究方法之一,能够在蛋白质水平上直接、大规模研究基因功能。YUMIMOTO 等<sup>[13]</sup>采用差异蛋白质组质谱鉴定方法对 F-box 族的泛素连接酶进行底物筛选,鉴定到 515 个与 3 个 E3 连接酶相互作用的蛋白。因此,差异蛋白质组质谱鉴定法是分析泛素连接酶底物的有力工具<sup>[13]</sup>。

酵母作为模式生物,不仅具有原核生物操作简单、生长快速的特点,并且还具具有真核细胞翻译后修饰功能的优势<sup>[14]</sup>。因此,本实验通过对 *Ubr1* 野生型 RJD347 及 *Ubr1* 缺失型 AVY26 的比较蛋白质组学研究,分析啤酒酵母中可能存在的 *Ubr1* 直接或间接作用的底物蛋白。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及主要试剂

1.1.1 菌株 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (由本实验室提供),酵母菌株 (MAT<sub>aura</sub> 3-52)<sup>[8]</sup>、AVY26(MAT<sub>aura</sub> 3-52 *Ubr1*  $\Delta$ , Hi3G)<sup>[8]</sup>、*Ubr1* 野生型 (*Saccharomyces cerevisiae* SC295)、(MAT $\alpha$  GAL4 GAL80 *ura* 3-52、*Leu* 2-3、112 *reg1*-501 *gal1* *pep* 4-3)<sup>[7]</sup> 及 *Ubr1* 缺失型 [*Saccharomyces cerevisiae* SC295 (*Ubr1*  $\Delta$ )] (SC295 *ubr* deleted)<sup>[7]</sup> (由本实验室构建保存<sup>[7]</sup>) (见表 1)。

1.1.2 主要材料和试剂 表达载体 pFLAGUBR1-SBX (由本实验室构建并保存),鼠抗 Flag 单克隆抗体 (美国 Sigma 公司)、辣根过氧化物酶 HRP- 兔抗鼠抗体 (上海 Beyotime Biotechnology 公司)、内切酶 *Xho* I 和 *Sal* I 及 T4 连接酶 (美国 New England Biolabs 公司),其他化学试剂如组氨酸、尿嘧啶、聚乙二醇 PEG3350、醋酸锂及单链鲑鱼精子等均为国产分析纯。实验所用菌株及载体信息见表 1。

表 1 引物设计

引物名称	核算序列	来源
ARG1	正向:5'-GACGCGTCGACATGTCTAAGGAAAAGTTG-3'	实验室构建
	反向:5'-ACCGCTCGAGTTACTTGTGCATCGTCGTCCTTGTAGTCAGATCCACCCAAAGTCAACTCTTCACCTTTGG-3'	实验室构建
HOG1	正向:5'-ACGCCTCGAGATGACCACTAACGAGGAATTC-3'	实验室构建
	反向:5'-ACCGCTCGAGTTACTTGTGCATCGTCGTCCTTGTAGTCAGATCCACCCTGTTGGAAGTCAATTAGCG-3'	实验室构建
MLC2	正向:5'-ACGCGTCGACATGGACCATAGTGAATCGCTAACG-3'	实验室构建
	反向:5'-ACCGCTCGAGTTACTTATCGTCGTCATCCTTGAATCAGATCCACCATCGGTGATTGAATCTAAG-3'	实验室构建
RTF1	正向:5'-ACGCGTCGACATGTCTGATTAGATGAGG-3'	实验室构建
	反向:5'-ACCGCTCGAGTTACTTGTGCATCGTCGTCCTTGTAGTCAGATCCACCAAACCTAAGGTCAAATTTGATATCC-3'	实验室构建
SCD6	正向:5'-ACGCGTCGACATGTGCGAGTACATCGGTAAC-3'	实验室构建
	反向:5'-ACCGCTCGAGTTACTTGTGCATCGTCGTCCTTGTAGTCAGATCCACCAAATCAACGTTGGAAGGAGG-3'	实验室构建

## 1.2 菌体蛋白样品的准备

挑取 RJD347 和 AVY26 分别接种至酵母浸出粉葡萄糖培养基 (YPD 培养基) 中, 30℃ 培养至菌体 OD600 约为 0.75, 离心收集菌体, 用酵母裂解缓冲液 (SDT 缓冲液) 重悬菌体, 经 Fast Prep-24 高速均质器 (美国 MP Biomedicals 公司) 裂解 60 s, 13 000 r/min 离心, 上清液经蛋白样品酶解 (filter-aided sample preparation, FASP) 用于质谱分析。

## 1.3 质谱分析

Q Exactive HF 质谱仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 与液相色谱 - 串联质谱 (LC-MS/MS) 系统联用, 对肽段样品进行检测。

## 1.4 质粒构建及酵母转化

**1.4.1 质粒构建** 以提取的酵母基因组 DNA 为模板, 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增 5 个差异蛋白 (MLC2、SCD6、ARG1、HOG1 和 RTF1) 基因, PCR 所用引物设计见表 1。Xho I 和 Sal I 双酶切扩增片段及 pFLAG-UBR1-SBX 载体片段, 胶回收酶切产物, 酶连过夜后转化至 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , 涂布于含氨苄的 LB 培养板, 37℃ 过夜培养, 筛选阳性单克隆菌落, 提取质粒, 双酶切鉴定后取阳性克隆质粒送铂尚生物公司测序。

**1.4.2 酵母转化** 取对数生长期的 SC295 和 SC295 (*Ubr1  $\Delta$ ) 菌液离心, 去上清液, 磷酸盐缓冲液 PBS 冲洗 2 次, 实验组取 1  $\mu$ g 质粒 (加无菌水至 34  $\mu$ l)、对照组 (无菌水 34  $\mu$ l) 分别加入适量 PEG3301、醋酸锂、鲑鱼单链精子后转化至 SC295 和 SC295 (*Ubr1  $\Delta$ ) 的沉淀中, 42℃ 温浴 40 min, 加入 1 ml YPD, 30℃ 摇床培养 2 ~ 3 h, 涂布于 SD-L 培养板, 30℃ 培养 2 ~ 3 d, 挑取单克隆菌液进行 PCR 验证。**

## 1.5 Western blot 检测

挑取阳性单克隆菌落, 经 10% 的聚丙烯酰胺凝胶分离后, 电转移至聚偏氟乙烯 PVDF 膜上, 以 5% 脱脂牛奶室温摇床封闭 1 h, 加入鼠抗 Flag 单克隆抗体, 室温摇床孵育 2 h, 加入 HRP 标记的兔抗鼠 IgG, 室温摇床孵育 1 h, ECL 发光成像。

## 1.6 统计学方法

采用 DAVID 在线对酵母细胞胞内差异蛋白进行功能注释聚类分析; 应用 R 语言 “heatmap” 包绘制蛋白差异表达聚类图。

## 2 结果

### 2.1 RJD347 与 AVY26 胞内蛋白组学差异分析

RJD347、AVY26 胞内总蛋白质谱分析共检测到

2 388 种蛋白, 其中有 249 种蛋白在 RJD347 (*Ubr1* 野生型) 和 AVY26 (*Ubr1* 缺失型) 中不同 (见图 1), 该蛋白中, 145 个蛋白在 AVY26 中表达上调。由于 *Ubr1* 已被证明是 N 端规则信号通路最重要的 E3 连接酶, 因此在 AVY26 中, *Ubr1* 泛素化底物的含量上升。由此可见, 质谱结果检测到的 145 个上调蛋白可能是 UBR1 潜在的泛素化底物。

此外, 结果发现 AVY26 中有 104 个蛋白表达呈下调趋势 (见图 1), 质谱结果也显示, PTR2 蛋白在 AVY26 中含量较野生型减少 (见表 2)。笔者筛选 RJD347 与 AVY26 蛋白表达差异倍数较大的 40 种蛋白进行进一步分析 (见表 2), 表 3 分别列出 AVY26/RJD347 (A/R) 胞内蛋白差异倍数 Ratio 等相关信息。其中 Ratio (A/R) > 1 表示该蛋白在突变菌株中升高, Ratio (A/R) < 1 为蛋白在突变菌株中降低。表 3 中列举在 AVY26 胞内蛋白含量上升的 20 种蛋白, 该上调的蛋白可能是 E3 连接酶 *Ubr1* 潜在的泛素化底物。进一步通过数据库查找及文献比对, 发现差异倍数较大的蛋白如 MLC2、SCD6 及 ARG 家族 (ARG1、3、4、5、6 和 7)、HOG1、GDH1、RTF1、AKR1、HXT4 及 SMC3 目前还未有研究报道与 *Ubr1* 泛素化调节相关。见表 2 和图 2。

### 2.2 外源验证差异蛋白与 *Ubr1* 的相关性

SC295 菌株因缺失 *pep4-3* 基因编码翻译后调控酵母液泡水解酶, 这有利于蛋白外源表达及稳定性的检测。为进一步验证上述差异蛋白与 *Ubr1* 之间的相关性, 笔者筛选差异最大的 5 种差异蛋白进行外源验证, 在总蛋白趋于一致的情况下 (见图 2), MLC2、SCD6、ARG1、HOG1 在 SC295 中未检测到蛋

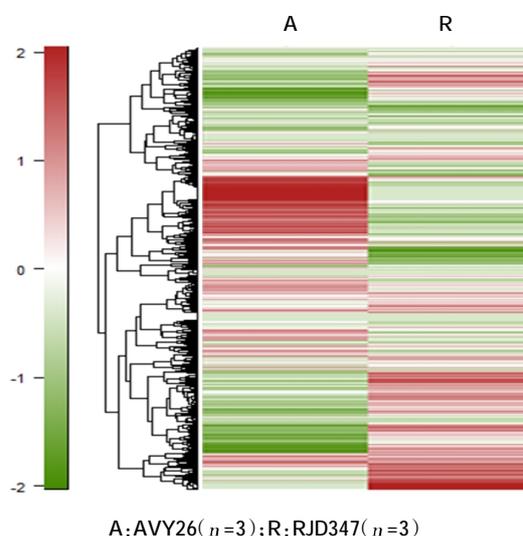


图 1 RJD347 与 AVY26 胞内蛋白表达差异聚类图

白表达,而在 SC295(*Ubr1*Δ)中检测到蛋白高表达 (见图 2A~D)。RTF1 虽然在 SC295 能够被检测,但在 SC295(*Ubr1*Δ)中蛋白水平明显高于野生菌(见图 2E)。由此看出,在 SC295 中,*Ubr1* 的潜在作用底

表 2 RJD347 与 AVY26 中差异最大的前 40 种胞内蛋白

No.	标准命名	蛋白描述(全称)	系统命名	序列号 Accession	Ratio(A/R)
1	RTF1	Restores TBP Function	YGL244W	P53064	22.34
2	AKR1	An Kyrin Repeat containing	YDR264C	P39010	9.31
3	ARG1	ARGinine requiring	YOL058W	P22768	8.14
4	ARG7	ARGinine requiring	YMR062C	NP013778	5.54
5	NUT1	Negative regulation of URS Two	YGL151W	P53114	5.24
6	MLC2	Myo1p Light Chain	YPR188C	Q06580	3.74
7	ALD5	ALdehyde Dehydrogenase	YER073W	P40047	3.16
8	SDT1	Suppressor of Disruption of TFIIS	YGL224C	P53078	2.84
9	SCD6	Suppressor of Clathrin Deficiency	YPR129W	P45978	2.77
10	ARG5,6	ARGinine requiring	YER069W	Q01217	2.6
11	MRN1	Multicopysuppressor of rsc nhp6	YPL184C	Q08925	2.29
12	ARG4	ARGinine requiring	YHR018C	P04076	2.2
13	CPA2	Carbamyl Phosphate synthetase A	YJR109C	P03965	2.16
14	TDH1	Triose-phosphate DeHydrogenase	YJL052W	P00360	1.85
15	ODC2	Oxo Dicarboxylate Carrier	YOR222W	Q99297	1.76
16	GRH1	GRasp65 (Golgi reassembly stacking protein of 65 kD) Homolog	YDR517W	Q04410	1.65
17	GDH1	Glutamate DeHydrogenase	YOR375C	P07262	1.62
18	ILV3	IsoLeucine-plus-Valine requiring	YJR016C	P39522	1.46
19	HOG1	High Osmolarity Glycerol response	YLR113W	P32485	1.46
20	ARO1	AROMATIC amino acid requiring	YDR127W	Q06408	1.41
21	FMN1	FMN biosynthesis	YDR236C	Q03778	0.24
22	AAP1	Arginine/alanine AminoPeptidase	YHR047C	P37898	0.19
23	MRPL15	Mitochondrial Ribosomal Protein, Large subunit	YLR312W-A	P36523	0.18
24	SML1	Suppressor of Mec1 Lethality	YML058W	Q04964	0.18
25	CTS1	Chi Tina Se	YLR286C	P29029	0.17
26	ERG7	ERGosterol biosynthesis	YHR072W	P38604	0.17
27	ELP6	ELongator Protein	YMR312W	Q04868	0.16
28	BOS1	Bet One Suppressor	YLR078C	P25385	0.15
29	SMD2	Small nuclear ribonucleoproteinSm D2	YLR275W	Q06217	0.14
30	NTE1	Neuropathy Target Esterase	YML059C	Q04958	0.13
31	UTH1	yoUTH	YKR042W	P36135	0.12
32	NRP1	N (asparagine)-Rich Protein	YDL167C	P32770	0.12
33	MPD2	Protein disulfide isomerase	YOL088C	Q99316	0.11
34	NAB2	Nuclear poly Adenylated RNA-Binding	YGL122C	P32505	0.1
35	SMC3	Structural maintenance of chromosomes protein 3	YJL074C	P47037	0.07
36	UBC4	UBiquitin-Conjugating	YBR082C	P15731/P15732	0.07
37	PNP1	purine nucleoside phosphorylase	YLR209C	Q05788	0.07
38	NAT5	N-terminal Acetyl Transferase	YOR253W	Q08689	0.07
39	PTR2	Peptide Transport	YKR093W	P32901	0.06
40	HXT4	He Xose Transporter	YHR092C	P32467	0.04

物 MLC2、SCD6、ARG1、HOG1 及 RTF1 由于受 *Ubr1* 的调控,可能被泛素化降解,因而无法检测到蛋白的表达或检测到低表达;而在 SC295(*Ubr1*Δ)中,则呈现相反的结果(见图 3)。因此,可以初步确定 MLC2、

SCD6、ARG1、HOG1 及 RTF1 蛋白与泛素连接酶 *Ubr1* 相关,并可能是泛素化 *Ubr1* 的直接作用底物。该实验结果也与质谱组学分析相符。

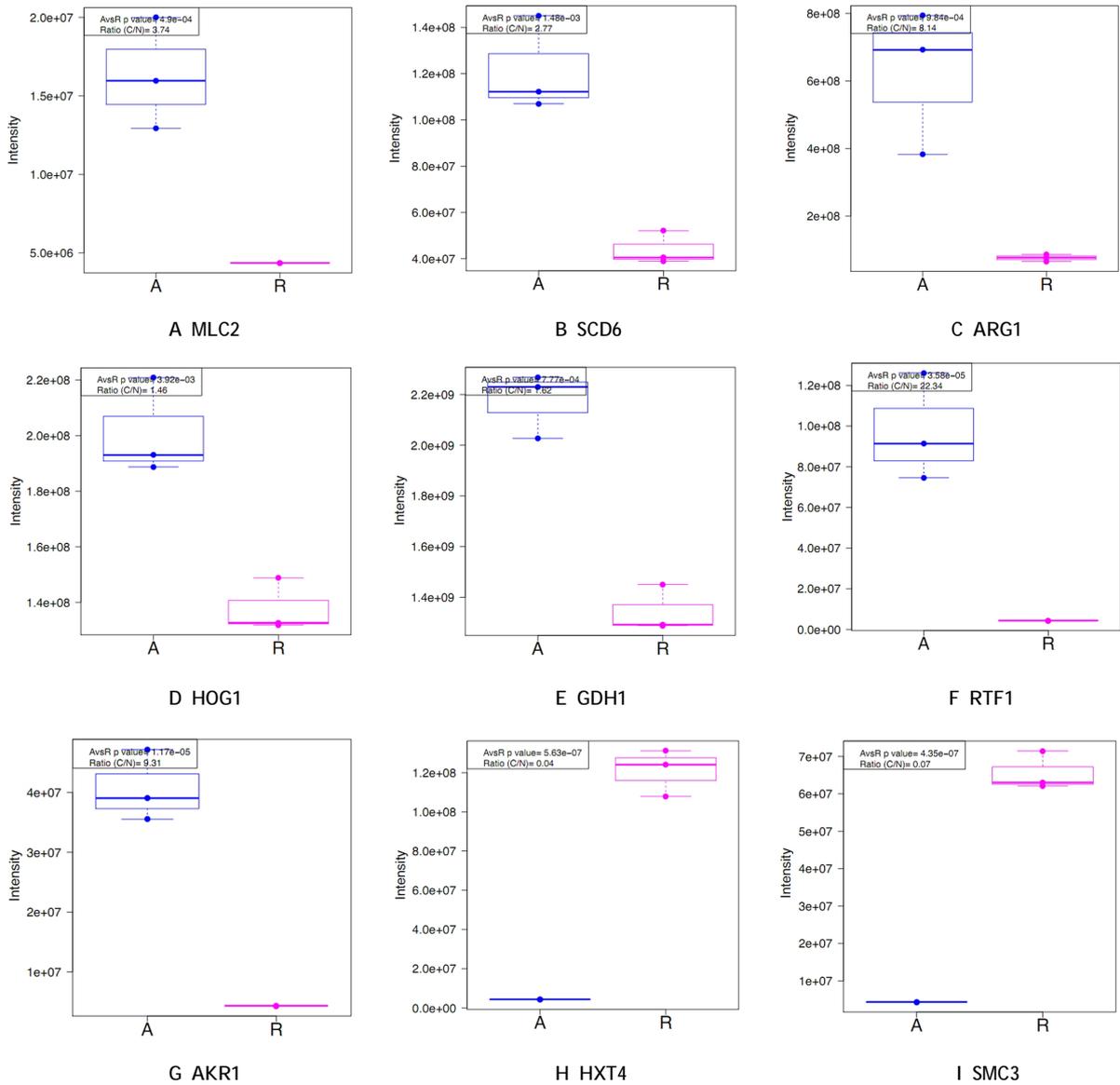
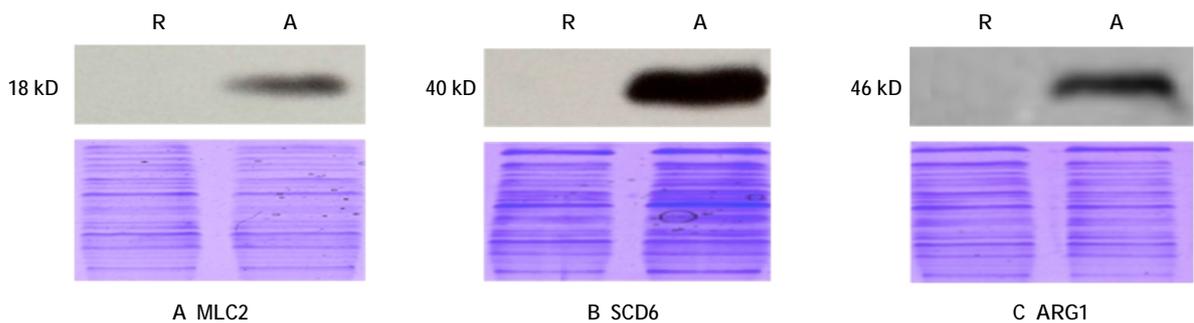


图 2 *Ubr1* 泛素化底物筛选差异倍数



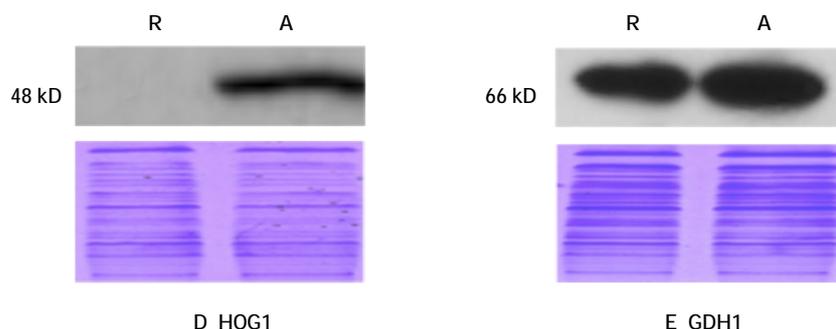


图 3 差异蛋白转化至野生型和突变型 *Ubr1* 中的蛋白表达

### 3 讨论

目前研究发现, *Ubr1* 在酵母系统中存在 221 个相互作用蛋白,而在人体中则证实只存在 84 个相互作用蛋白。本研究通过比对 RJD347 与 AVY26 胞内蛋白质组的差异,发现共 249 个蛋白有差异表达,其中 145 个蛋白在 AVY26 中含量增加,104 个蛋白含量降低。由于 *Ubr1* 作为泛素 E3 连接酶,可直接调控底物蛋白的泛素化降解,因此 145 个在 AVY26 中含量增加的蛋白为泛素连接酶 *Ubr1* 的潜在泛素化底物。进一步通过外源验证蛋白 MLC2、SCD6、ARG1、HOG1 及 RTF1 在 SC295 (*Ubr1*  $\Delta$ ) 中表达提高。

泛素连接酶 *Ubr1* 的潜在泛素化底物在酵母生理代谢过程中起重要的作用,SCD6 是翻译起始抑制子,在 DNA 复制应激时形成胞间集合体,通过其 RGG 结构域结合 eIF4G 抑制前起始复合物的募集<sup>[9]</sup>。值得注意的是,一些 *Ubr1* 潜在的泛素化底物蛋白在人体中也存在其相应的同源蛋白,且与人体多种疾病相关并参与有机体重要的活动调控。酵母源 MLC2 (myolp Light Chain) 可调控酵母细胞 II 型肌球蛋白 Myolp 轻链,参与 Myolp 重链轻链环肽解体<sup>[10]</sup>,对应人源肌球蛋白调节轻链激酶 MLC2 (Myosin light chain 2) 在人体中具有催化肌球蛋白的磷酸化,控制平滑肌的收缩活动的作用,MLC2 的表达失调可导致原发性心肌症的发生<sup>[11]</sup>。此外,精氨酸酶 (Arginase) 家族中的 ARG1、3、4、5、6 及 7 检测到在 *Ubr1*  $\Delta$  缺失型中高表达(见表 3),说明 ARG 家族蛋白为 *Ubr1* 的潜在直接底物。酵母 *Ubr1* 泛素化底物的筛选研究有助于笔者深入了解 *Ubr1* 参与生物学过程,同时还可以为人体内 *Ubr1* 介导的 N 端规则及对应的泛素化底物筛选提供线索,为研究上述相关疾病发病机制及人类生命活动提供新思路。

本研究采用差异蛋白质组学的方法筛选 *Ubr1*

泛素化底物的方法,不仅不受蛋白表达纯化的影响,覆盖率广,可直接检测细胞内生理状态下的 *Ubr1* 作用底物,提高实验的准确性,为筛选鉴定 E3 连接酶 *Ubr1* 作用底物提供大量候选蛋白,为研究 *Ubr1* 催化底物泛素化的机制提供实验依据,对研究该潜在底物的同源蛋白是否受泛素化调节生命活动及相关疾病具有重要意义。

#### 参 考 文 献:

- [1] ETZIONI A, CIECHANOVER A, PIKARSKY E. Immune defects caused by mutations in the ubiquitin system[J]. J Allergy Clin Immunol, 2017, 139(3): 743-753.
- [2] MOYNAGH P N. The roles of Pellino E3 ubiquitin ligases in immunity[J]. Na Rev Immunol, 2014, 14(2): 122-131.
- [3] VARSHAVSKY A. Discovery of the biology of the ubiquitin system[J]. JAMA, 2014, 311(19): 1969-1970.
- [4] POTU H, PETERSON LF, KANDARPA M, et al. Usp9x regulates Ets-1 ubiquitination and stability to control NRAS expression and tumorigenicity in melanoma[J]. Nat Commun, 2017 (8): 14449.
- [5] YANG N, YU F, SHAO G, et al. The E3 ubiquitin ligase c-Cbl mediates integrin  $\beta_1$  ubiquitination during dilated cardiomyopathy[J]. BiochemBiophys Res Commun, 2016, 479(4): 728-735.
- [6] NGUYEN H C, WANG W, XIONG Y. Cullin-RING E3 ubiquitin ligases: bridges to destruction[J]. Subcell Biochem, 2017(83): 323-347.
- [7] XIA Z, WEBSTER A, DU F, et al. Substrate-binding sites of UBR1, the ubiquitin ligase of the N-end rule pathway[J]. J Biol Chem, 2008, 283(35): 24011-24028.
- [8] XIA Z, TURNER G C, HWANG C S, et al. Amino acids induce peptide uptake via accelerated degradation of CUP9, the transcriptional repressor of the PTR2 peptide transporter[J]. J Biol Chem, 2014, 283(43): 28958-28968.
- [9] STANCOVSKI I, GONEN H, ORIAN A, et al. Degradation of the proto-oncogene product c-Fos by the ubiquitin proteolytic system in vivo and in vitro: identification and characterization of the conjugating enzymes[J]. Mol Cell Biol, 1995, 15(12): 7106-

- 7116.
- [10] EISELE F, WOLF D H. Degradation of misfolded protein in the cytoplasm is mediated by the ubiquitin ligase Ubr1 [J]. *Febs Letters*, 2008, 582(30): 4143-4146.
- [11] 刘禹辰, 贺福初, 王建. 大规模酵母双杂交技术的发展及其在蛋白质相互作用组学中的应用[J]. *生命科学*, 2014, 26(4): 421-429.
- [12] 郭正光. 两种高效研究泛素连接酶底物的新策略[D]. 北京: 北京协和医学院, 2012.
- [13] YUMIMOTO K, MATSUMOTO M, OYAMADA K, et al. Comprehensive identification of substrates for F-box proteins by differential proteomics analysis [J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(6): 3175-3185.
- [14] 田小梅, 任建洪, 房聪. 不同碳源下毕赤酵母 GS115 蛋白组学分析[J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(1): 21-29.
- [15] RAJYAGURU P, SHE M, PARKER R. Scd6 targets eIF4G to repress translation: RGG motif proteins as a class of eIF4G-binding proteins[J]. *Mol Cell*, 2012, 45(2): 244-254.
- [16] LUO J, VALLEN E A, DRAVIS C, et al. Identification and functional analysis of the essential and regulatory light chains of the only type II myosin myo1p in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *J Cell Biol*, 2004, 165(6): 843-855.
- [17] LU K H, CHEN P N, HSIEH Y H, et al. 3-Hydroxyflavone inhibits human osteosarcoma U2OS and 143B cells metastasis by affecting EMT and repressing u-PA/MMP-2 via FAK-Src to MEK/ERK and RhoA/MLC2 pathways and reduces 143B tumor growth in vivo[J]. *Food Chem Toxicol*, 2016(97): 177-186.