研究论文

氮代谢调控相关蛋白质泛素化修饰筛选

吕永坤， 周景文， 刘 龙*
（江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

摘要：通过对氮代谢相关透性酶及调控因子泛素化修饰的筛选，为通过改造蛋白质泛素化修饰来解除氮代谢阻遏效应提供参考。对此前建立的一种蛋白质泛素化快速检测方法进行了改造和发展，进一步增强了阳性子的荧光信号，并使得该方法可以用于定量分析，从而使泛素化检测的结果更为可靠。对氮代谢物阻遏效应密切相关的10个蛋白质的检测结果表明，其中5个受到泛素化修饰，4个不能受到泛素化修饰，1个不能确定是否受到泛素化修饰。除建立了一种可靠的蛋白质泛素化检测方法，也为通过蛋白质泛素化调控途径解除氮代谢物阻遏效应提供了思路。

关键词：酿酒酵母；透性酶；调控因子；泛素化；检测
中图分类号：S 665.2 **文献标志码**：A **文章编号**：1673—1689(2014)06—0576—07

Ubiquitination Detection of NCR Related Permeases and Regulators

LV Yongkun， *ZHOU Jingwen*， *LIU Long**
（School of Biotechnology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：To give support to release the nitrogen catabolite repression (NCR)，by rebuiling the ubiquitination system，the ubiquitination of NCR related permeases and regulators was detected. A fast ubiquitination detection procedure established before was modified and developed，which enhanced the fluorescence of the positive control and could quantify the fluorescence signal. The fluorescence quantification made this procedure more reliable. It was demonstrated that 5 of the NCR related proteins were ubiquitinated，4 were not ubiquitinated and 1 was not determined. We not only established a reliable ubiquitination detection procedure，but also gave a idea to release NCR through the ubiquitination modification procedure.

Keywords：*Saccharomyces cerevisiae*，permease，regulator，ubiquitination，detection

基于氮源的氮代谢调控影响到酿酒酵母*Saccharomyces cerevisiae*(*S. cerevisiae*) 几乎10%的基因表达[1]。当培养基中同时存在多种氮源时，*S. cerevisiae* 会优先利用丰富型氮源如谷氨酰胺、铵盐、谷氨酸、天冬氨酰等，只有当培养基中不存在丰富型氮源或者丰富型氮源被耗尽时，*S. cerevisiae* 才会开始利用精氨酸、尿素、尿囊素、GABA等贫乏型氮源。这种由丰富型氮源引起的对贫乏型氮源利用

收稿日期：2013-10-09
基金项目：国家973计划项目(2012CB720800)；国家自然科学基金重点项目(31130043)。
* **通信作者**：刘 龙(1980—)，男，江苏无锡人，工学博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事微生物系统代谢工程及工业酶的分子定向修饰研究。E-mail：longliu@jiangnan.edu.cn

的阻遏现象称之为氮代谢阻遏效应(NCR)。NCR 的原因在于,丰富型氮源对于 NCR 相关调控因子如 Gln3p、Gat1p 等的抑制作用及对于相关透性酶 Gap1p、Put4p 等表达的阻遏[2]。

氨基甲酸乙酯 Ethyl carbamate(EC)是发酵过程中普遍存在的一种潜在致癌物质。尿素是 EC 的主要前体物质,发酵酒中 90%以上的 EC 由尿素与乙醇自发反应生成[3-4]。而发酵液中绝大部分的尿素由酿酒酵母代谢产生,即精氨酸经精氨酸酶 Car1p-脲基酰胺酶 Dur1,2p 路径最终被分解为 NH_3 和 CO_2(图 1)。在酒精发酵阶段,酿酒酵母细胞内精氨酸酶基因 *CAN*1 的表达量很高,精氨酸被大量分解为尿素和鸟氨酸;与此同时,细胞优先利用已经大量存在的铵这种丰富型氮源,使得脲基酰胺酶基因 *DUR*1,2 受到 NCR 调控,起始转录被阻遏,基因表达水平远低于精氨酸酶基因的表达水平,从而导致多余尿素不能被及时分解。过量积累的尿素对细胞具有毒性,因此随即被尿素转运蛋白质 Dur4p 转运出细胞,最终导致发酵液中的尿素含量大幅增加[2,5]。解除 NCR 是减少发酵过程中 EC 的有效途径。

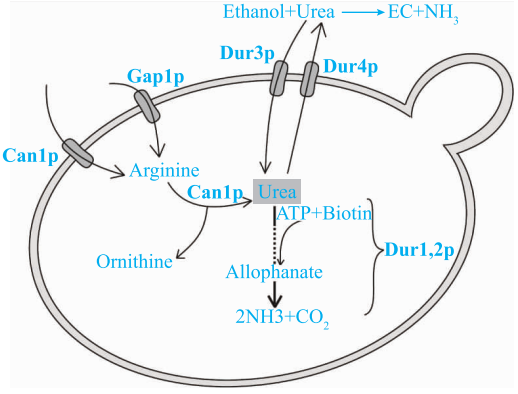


图 1　酿酒酵母酒精发酵过程中 EC 产生的主要途径

Fig. 1　Main pathway of EC production during alcohol fermentation by S. cerevisiae

1　泛素化调控研究概述

泛素 Ubiquitin(Ub)是一个由 76 个氨基酸组成的蛋白质,从酵母到人类高度保守。Ub 由 *UBI*1—*UBI*4 4 个基因编码(图 2)。其中,*UBI*1、*UBI*2 由泛素编码元件和尾巴结构构成,且在泛素编码元件相同的位置含有非同源的内含子,尾巴结构编码由 52 个氨基酸组成的蛋白质,该蛋白质为核糖体 60S 大亚基的组成部分;*UBI*3 由连续的泛素编码元件和尾巴结构组成,其尾巴结构编码 1 个由 76 个氨基酸组成的蛋白质,为核糖体 40S 小亚基组成部分;*UBI*4 由 5 个泛素编码元件 minigene 依次首尾相连,其尾巴结构由 1 个 Asn 组成[6-7]。由于 *UBI*1—*UBI*3 的表达产物为核糖体蛋白质,故为细胞生长所必需,且 *UBI*1、*UBI*2 的表达在稳定期细胞中受到抑制;*UBI*4 非细胞正常生长所必需,其功能其实是在胁迫条件下为细胞提供泛素[7]。

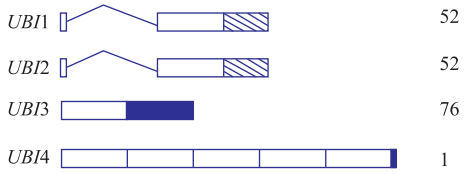


图 2　酵母泛素编码基因 *UBI*1—*UBI*4 的结构

Fig. 2　Organization of yeast *UBI*1—*UBI*4 genes

泛素化修饰作为一种重要的翻译后调控方式,其广泛存在于从酵母到人类所有真核生物的细胞中。泛素化调控最常见的方式是泛素-蛋白酶解途径,即受到泛素化修饰的蛋白质进入蛋白酶解途径并被蛋白酶所降解,降解既可以在液泡内进行,也可以在细胞质内进行[8]。泛素化修饰可以作为细胞对环境的应答,即通过对相关蛋白质的修饰-降解使细胞代谢做出调整。已有研究证明,NCR 相关的诸多转录因子及透性酶同时也受到泛素化调控(表 1)。NCR 与泛素化调控的偶联为通过改造泛素化调控解除 NCR 提供了前提。本研究中试图对 NCR 相关调控因子及膜蛋白质的泛素化修饰进行筛选,在已有泛素化调控理论的基础上,为解除 NCR 提供新的途径。

目前,蛋白质泛素化研究所采用的手段主要有蛋白质组学方法[23]、免疫共沉淀和蛋白质印记法[25]等,但是这些方法在操作上均较繁琐且灵敏度不高,可能检测不到瞬间、可逆的蛋白质泛素化。由于需要进行细胞裂解等操作,这些方法均不能反映出蛋白质泛素化的实时细胞环境,不能对泛素化修饰进行亚细胞定位。双分子荧光互补技术(BiFC)在用于蛋白质-蛋白质反应时具有很好的前景,其被应用于蛋白质泛素化检测时可以克服上述方法的不足[26]。被拆分后的荧光蛋白质片段不能产生荧光,但是当荧光蛋白质片段因相互靠近而重新组合为完整的荧光蛋白质时,这种重组的蛋白质可以恢复荧光。BiFC 技术正是基于荧光蛋白质的这一特性而建

立的(图 3)[26-27]。

表 1 受到泛素化调控的调控因子及膜蛋白质

Table 1 Regulator and membrane proteins which are ubiquitinated

名称	功能	场址	NCR 亲缘	参考文献
Gln3p	Transcription factor	Cytoplasm/ Nucleas	Yes	[9-10]
Stp1p	Transcription factor	Cytoplasm/ Nucleas	Not determined	[11]
Gap1p	General amino acid permease	Plasma membrane	Yes	[12-15]
Put4p	Proline permease	Plasma membrane	Yes	[16-17]
Tat1p	AAP (amino acid permease)	Plasma membrane	Not determined	[18-19]
Mup1p	Methionine permease	Plasma membrane	Not determined	[20]
Lyp1p	Lysine permease	Plasma membrane	Not determined	[21-22]
Gnp1p	Glutamine permease	Plasma membrane	Yes	[23-24]
Agp1p	AAP	Plasma memnrane	Not determined	[22,24]

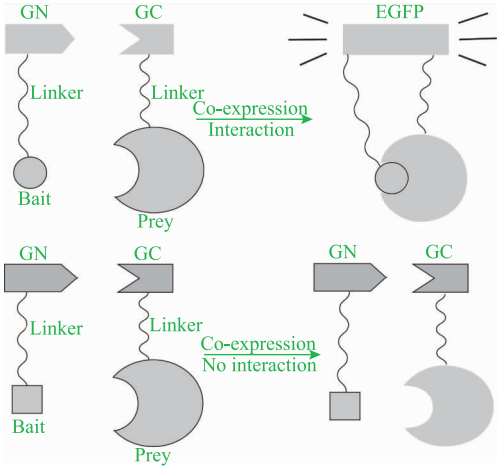


图 3 BiFC 技术原理

Fig. 3 Schematic diagram of BiFC principle

为了简化 BiFC 技术应用于蛋白质泛素化检测时共表达体系的构建,作者在此前的研究中建立了一种蛋白质泛素化快速检测方法。该方法可以实现对蛋白质泛素化修饰的快速检测,且不需要对细胞进行特殊处理,能反应出蛋白质泛素化的实时细胞环境[26,28]。且平行实验 Ni-NTA 纯化-SDS-PAGE 的结果已经证明了该方法的可靠性[28]。然而由于宿主细胞基因组所表达的游离泛素对于重组 pUbDerec16 质粒所表达的融合目的蛋白质的竞争性结合,使得阳性子的荧光信号受到削弱。作者在此基础上,敲除了宿主细胞基因组中的 1 个泛素编码基因 *UBI*4,以减少游离泛素的表达,从而增强阳性子的荧光信号。阳性对照与阴性对照荧光信号对比度的增加,进一步增强了该方法的可靠性。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 菌种和质粒 酿酒酵母菌株 CEN.PK2-1D (*MATα ura*3—52;*trp*1—289;*leu*2—3,112;*his*3Δ 1; *MAL*2—8^{C};*SUC*2)。质粒 pUbDetec16[28]。

2.1.2 培养基 使用标准的 YPD 和 LB 培养基。YNB 培养基:1.74 g/L Yeast Nitrogen Base without Amino Acids and Ammonium Sulfate, 20 g/L D-glucose, 5 g/L $(NH_4)_2SO_4$。亮氨酸缺陷型培养基(DM-*leu*$^-$):YNB 培养基中添加 50 μg/mL 组氨酸, 50 μg/mL 色氨酸, 50 μg/mL 尿嘧啶。尿嘧啶缺陷型培养基(DM-*ura*$^-$):YNB 培养基中添加 50 μg/mL 组氨酸, 50 μg/mL 色氨酸, 50 μg/mL 亮氨酸。亮氨酸、尿嘧啶双重缺陷型培养基(DM-*leu*$^-$,*ura*$^-$):YNB 培养基中添加 50 μg/mL 组氨酸, 50 μg/mL 色氨酸。YNB 完全培养基(CM):YNB 培养基中添加 50 μg/mL 组氨酸, 50 μg/mL 色氨酸, 50 μg/mL 亮氨酸, 50 μg/mL 尿嘧啶。固体培养基为相应的液体培养基中加入 20 g/L 琼脂糖。

2.2 实验方法

2.2.1 *UBI*4 基因敲除 本研究中采用同源重组的方法构建 *UBI*4 缺陷型菌株。以质粒 pRS305-TEF1 为模版,通过 PCR 扩增得到 *LEU*2 及其上游 650 bp 和下游 450 bp 的 DNA 片段。使用融合 PCR 方法将 *UBI*4 上游 500 bp 片段及下游 500 bp 片段分别融合至上述 DNA 片段的上下游,即获得 *UBI*4 的敲除框。将敲除框连接 pMD18-T 载体(大连宝生物),转化大肠杆菌 JM109,挑取单菌落。测序(生工生物工程(上海)股份有限公司)正确后使用高效率电转化法[21]转化酿酒酵母 CEN.PK2-1D,在电转化前用醋酸锂和 DTT 预处理细胞。1.5 kV、25 μF 条件下电击 5 ms 后立即用 1 mL 冰上预冷的 1 mol/L 山梨醇悬浮细胞,转移至 1.5 mL 的离心管 30 ℃静置孵育 1 h。取 200 μL 涂布 DM-*leu*$^-$平板。2~3 d 后即可观察到

单菌落,菌落 PCR 验证。经验证为 Δ*ubi*4 缺陷型的菌株,被记为 CEN.PK2-1D-Δubi4。

2.2.2 蛋白质印记 将酿酒酵母菌株 CEN.PK2-1D 及 CEN.PK2-1D-Δubi4 分别在 CM 培养基、DM-*leu*⁻培养基中 30 ℃过夜培养,取 20 mL 培养物离心收集菌体后,使用 FUCOS™ Global Fractionation kit (Cat. #786-018,G-Biosciences,MO,USA)提取细胞内可溶性蛋白质。BCA 法(P0012S,南通碧云天生物技术研究所)测定提取液中蛋白质浓度。取等量40 μg 总蛋白质样品进行 SDS-PAGE。在冰浴中 70 V 电压下转膜 2 h,室温条件下封闭 1 h,封闭结束后将膜在 20~30 kDa 之间剪开,上部分使用小鼠抗 β-actin 单克隆抗体进行孵育,下部分使用小鼠抗泛素单克隆抗体进行孵育,一抗在 140 r/min 条件下孵育过夜。二抗在室温 140 r/min 条件下孵育 2 h。使用 WesternBright ECL 发光底物 Advansta 显色、ImageQuantLAS4000 系统成像。蛋白质印记膜使用 Immobilon-P^{SQ} Transfer Membrane(0.2 μm pore size,Millipore,Billerica,MA,U.S.A.);封闭液使用 RapidBlock™ Solution(AMRESCO,Solon,OH,USA);小鼠抗泛素单克隆抗体 Ub(P4G7):sc-53509,购自 Santa Cruz Biotechnology,Inc.,Dallas,Texas,U.S.A.;山羊抗小鼠二抗(Goat anti-Mouse IgG (H+L chain specific)),购自联科生物;内参抗体小鼠抗 β-actin 单克隆抗体,购自碧云天生物技术研究所。

2.2.3 重组质粒的转化及荧光检测 待研究蛋白质编码基因被去除终止密码子之后插入至质粒 pUbDetec16 多克隆位点处,使用高效率电转化法[29]转化酿酒酵母 CEN.PK2-1D-Δubi4。涂布 DM-*leu*⁻,*ura*⁻平板,3~4 d 后挑取单菌落进行菌落 PCR 验证。将阳性转化子接 DM-*leu*⁻,*ura*⁻液体培养基,待生长至稳定期后取适量菌液经生理盐水洗涤后重新悬浮于生理盐水中,使用荧光酶标仪(Biotek Synergy H4)检测其在激发光/发射光=485/524 条件下[30]的荧光强度 F。为了消除 96 孔板本底的荧光强度 F_b 的影响,在对样品进行扫描之前,首先对空白的 96 孔板在相同条件下进行扫描。样品的净荧光强度 NF 可通过公式(1)计算得到,除特别说明外本研究中所指荧光强度均为净荧光强度。使用分光光度计(Uvmini-1240,SHIMADZU)检测样品在 660 nm 下的吸光度 OD_{660}。以重组质粒 pUbDetec16-GAP1 的转化子 CEN.PK2-1D-Δubi4 [pUbDetec16-GAP1]作为阳性对照[31-32];以空白质粒 pUbDetec16 的转化子 CEN.PK2-1D-Δubi4 [pUbDetec16]作为阴性对照。蛋白质受到泛素化修饰与否通过泛素化修饰的置信度 C_u 来确定。

$$NF=F-F_b \quad (1)$$

$$RF=\frac{NF}{OD_{660}\times 100} \quad (2)$$

$$C_u=\frac{F_s-F_n}{F_p-F_n}\times 100\% \quad (3)$$

上式中:RF 为相对荧光强度,指单位细胞的净荧光强度;C_u 为泛素化修饰的置信度;F_s 为样品的相对荧光强度;F_n 为阴性对照的相对荧光强度;F_p 为阳性对照的相对荧光强度。

显然,当 $C_u\leqslant 0$ 时,该蛋白质的荧光信号弱于阴性对照;当 $C_u\geqslant 0$ 时,该蛋白质的荧光信号强于阴性对照;且当 $C_u\geqslant 100\%$时,该蛋白质的荧光信号强于阳性对照。因此作者设定,当 $C_u\leqslant 0$ 时,该待检测蛋白质不受泛素化调控;当 $C_u\geqslant 50\%$时,该蛋白质受到泛素化调控;当 $0\leqslant C_u\leqslant 50\%$时,由于荧光信号大于阴性对照但又与之接近,因此暂时不对其是否受到泛素化修饰进行判断。

3 结果与讨论

3.1 酿酒酵母 CEN.PK2-1D-Δubi4 菌株构建

为减少细胞内非融合型游离泛素对于融合型目的蛋白质的竞争性结合,研究中在酿酒酵母菌株 CEN.PK2-1D 的基础上构建了 *UBI*4 缺陷型菌株 CEN.PK2-1D-Δubi4 (*MATα ura*3-52;*trp*1-289;*leu*2-3,112;*his*3Δ1;Δ*ubi*4::*LEU*2;*MAL*2-8^C;*SUC*2)。使用融合 PCR 技术,构建得到了敲除框 Δubi4::LEU2(图 4(a))。将敲除框转化出发菌株 CEN.PK2-1D 后涂布亮氨酸缺陷型平板,2~3 d 后挑取单菌落并进行 PCR 验证,共得到 6 株阳性转化子。对比菌株 CEN.PK2-1D-Δubi4 与出发菌株 CEN.PK2-1D 的生长速率发现,敲除 *UBI*4 对于菌株 CEN.PK2-1D-Δubi4 的生长速率几乎没有影响(图 4(b)),这与 Finley 等的研究一致[7]。说明 ubi4 缺陷对于细胞的整体代谢没有显著影响,况且 ubi4 缺陷导致的游离泛素表达量的下降可以被检测载体 pUbDetec16 所表达的 Ub 补偿。因此,宿主 CEN.PK2-1D-Δubi4 细胞中所发生的蛋白质泛素化修饰可以反映出正常状态下的蛋白质泛素化调控。

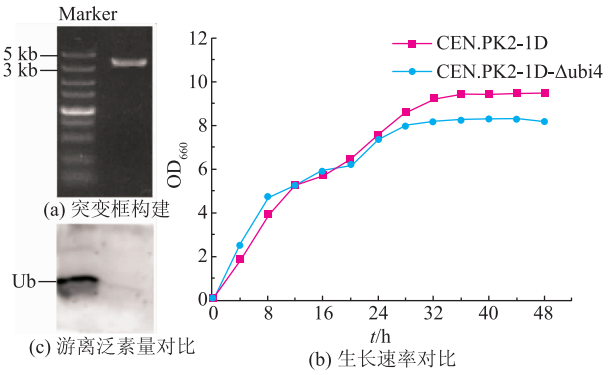


图 4　缺陷型菌株 CEN.PK2–1D–Δubi4 的构建及 *ubi4* 缺陷对其生理状态的影响

Fig. 4　Construction of CEN.PK2–1D–Δubi4 strain and the impact of *ubi4* defective to cell physiological state

3.2　游离泛素表达量及荧光强度变化

菌株 CEN.PK2–1D 与 CEN.PK2–1D–Δubi4 分别在 CM 培养基及 DM–leu⁻培养基中 30 ℃、200 r/min 生长过夜后，离心收集菌体并提取胞内可溶性蛋白质。经 BCA 法测定，CEN.PK2–1D 和 CEN.PK2–1D–Δubi4 总蛋白质质量浓度分别为 1.77 μg/μL 和 1.66 μg/μL。取等量 40 μg 总蛋白质进行蛋白质印记杂交。结果显示，相对于出发菌株 CEN.PK2–1D，CEN.PK2–1D–Δubi4 胞内的游离泛素量降低到几乎检测不到的水平(图 4(c))。*UBI4* 的缺失虽然使细胞内游离泛素的表达量极大地降低，但对细胞生长几乎没有影响。说明在正常生长条件下，*UBI4* 所表达的泛素并非细胞生长所必需。导致这一现象的原因可能在于，在没有胁迫(高温、氨基酸类似物等)的条件下，细胞内并不产生较多的“错误”蛋白质，因此无需大量泛素对这些蛋白质进行标记，使其进入蛋白质酶解途径[7]。因此，即使游离泛素量很低，胞内也不会因积累大量“错误”蛋白质而导致对细胞的毒害作用。为了验证 *UBI4* 缺失对荧光信号的增强作用，pUbDetec16–GAP1 分别被转化至菌株 CEN.PK2–1D 和 CEN.PK2–1D–Δubi4 中表达。相对于出发菌株 CEN.PK2–1D [pUbDetec16–GAP1]，Δ*ubi4* 缺陷型菌株 CEN.PK2–1D–Δubi4 [pUbDetec16–GAP1]的相对荧光强度(RF)增强了 183.9%。该结果表明，宿主细胞游离泛素表达量的下降减少了其对于检测载体表达的融合型蛋白质的竞争性结合，融合型 GC、GN 重组为 GN–GC 的比例增加，重组型 GN–GC 能够恢复荧光，从而荧光信号被增强。

3.3　泛素化调控的筛选

本研究中选取了与 NCR 密切相关的 10 个透性酶及调控因子作为研究对象，且到目前为止，除 Stp1p[11]外这些蛋白质均未被证明是否受到泛素化调控。结果见表 2，其中 5 个蛋白质被证明受到泛素化调控，4 个被证明不能受到泛素化调控。Dal80p 的 RF 虽然大于阴性对照，但较为接近，所以暂时不判断其是否受到泛素化调控。虽然由于 Dal80p 的泛素化置信度 C_u 接近于阴性对照而不能确定其是否受到泛素化的调控，但是其与 Gzf3p 的高度同源性似乎从另一个角度证实 Dal80p 也受到泛素化调控。

表 2　泛素化调控筛选结果

Table 2　Outcome of the ubiquitination detection

名称	功能	泛素化置信度/%	泛素化
Ure2p	Transcription factor	537.5	Yes
Gzf3p	Transcription factor	1459.5	Yes
Can1p	Arginine permease	−1514.6	No
Dal5p	Allantoate permease	492.3	Yes
Dal80p	Transcription factor	28.6	Not Determined
Stp1p	Transcription factor	181.5	Yes
Hip1p	Histidine permease	−637.6	No
Alp1p	Arginine transporter	936.1	Yes
Bap2p	Leucine permease	−516.0	No
Dur3p	Transporter[a]	−273.2	No

注：a 为尿素和聚胺输送。

Peng J 等 (2003) 使用蛋白质组学方法对 *S. cerevisiae* 中 1 075 个蛋白质的泛素化位点进行了检测，其中包括 Ure2p、Gzf3p、Hip1p。结果筛选到了 72 个蛋白质中的 110 个泛素化位点，但是这 72 个蛋白质中并不包括上述 3 个蛋白质。其原因可能在于，其所使用方法的灵敏度不足以检测到某些蛋白质瞬间、可逆的泛素化修饰[26]。

对于被证明受到泛素化修饰的蛋白质，可结合 UC San Diego 开发的蛋白质泛素化位点在线预测工具 UbPred (http://www.ubpred.org/)[33]进一步确定蛋白质的泛素化位点。将被预测为高置信度的赖氨酸位点突变为精氨酸位点，突变后的基因插入到蛋白质泛素化检测载体 pUbDetec16 的多克隆位点处，

重组质粒转化菌株 *S. cerevisiae* CEN.PK2-1D-Δubi4。根据对转化子荧光信号的定量分析，计算泛素化置信度 C_u 并判断突变后的蛋白质是否受到泛素化调控。如果突变后蛋白质不再受到泛素化修饰，则上述高置信度位点包括该蛋白质的全部泛素化位点；如果突变后蛋白质受到泛素化调控，则需要将突变的范围扩大到中等置信度的泛素化位点，并检测突变后的蛋白质是否依然受到泛素化调控。

确定了蛋白质泛素化位点的范围之后，通过组合突变位点来确定具体的泛素化位点。例如确定了Gap1p的泛素化位点的范围为K9、K16、K76，则需要突变其中的2个位点，从而有3种组合。如果 $Gap1p^{K9R,K16R}$ 受到泛素化修饰，则K76为Gap1p的泛素化位点，反之亦然。确定了蛋白质的泛素化位点之后，即可通过对泛素化位点的改造来控制该蛋白质是否受到泛素化调控及受到泛素化调控的强度。

4 结 语

作者在前述的研究中，建立了一种蛋白质泛素化检测方法，可以快速而简便地对细胞内蛋白质的泛素化进行实时、原位检测。本次研究则对其进行了改进和发展，克服了其阳性子荧光信号弱的不足，且使其能够用于定量分析。通过对宿主细胞的改造，阳性转化子的相对荧光信号较改造前增强了183.9%。定量分析结果表明，本研究过程中所选取的10个NCR相关蛋白质中的5个受到泛素化调控，4个不能受到泛素化调控，1个不能确定是否受到泛素化调控。值得注意的是，在所选取的10个蛋白质中，除Stp1p外，其余的均未曾被报道过受到泛素化修饰的情况。本次研究所构建的方法及在该方法基础上得出的结果，为通过泛素化调控的途径解除 *S. cerevisiae* NCR奠定了基础。

参考文献：

[1] Deed N K, van Vuuren H J, Gardner R C. Effects of nitrogen catabolite repression and di-ammonium phosphate addition during wine fermentation by a commercial strain of *S. cerevisiae* [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2011, 89 (5): 1537-1549.

[2] Hofman-Bang J. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Molecular Biotechnology**, 1999, 12(1): 35-71.

[3] Weber J, Sharypov V. Ethyl carbamate in foods and beverages: A review[J]. **Environmental Chemistry Letters**, 2009(7): 233-247.

[4] Sen N P, Seaman S W, Boyle M, et al. Methyl carbamate and ethyl carbamate in alcoholic beverages and other fermented foods[J]. **Food Chemistry**, 1993, 48(4): 359-366.

[5] Beltran G, Novo M, Rozes N, et al. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations [J]. **FEMS Yeast Research**, 2004, 4(6): 625-632.

[6] Ozkaynak E, Finley D, Solomon M J, et al. The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions [J]. **EMBO Journal**, 1987, 6(5): 1429-1439.

[7] Finley D, Ozkaynak E, Varshavsky A. The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses[J]. **Cell**, 1987, 48(6): 1035-1046.

[8] Mac Gurn J A, Hsu P C, Emr S D. Ubiquitin and membrane protein turnover: from cradle to grave [J]. **Annual Review of Biochemistry**, 2012, 81: 231-259.

[9] Courchesne W E, Magasanik B. Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*: roles of the *URE2* and *GLN3* genes[J]. **Journal of Bacteriology**, 1988, 170(2): 708-713.

[10] Crespo J L, Helliwell S B, Wiederkehr C, et al. NPR1 kinase and RSP5-BUL1/2 ubiquitin ligase control GLN3-dependent transcription in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2004, 279(36): 37512-37517.

[11] Mayor T, Lipford J R, Graumann J, et al. Analysis of polyubiquitin conjugates reveals that the Rpn10 substrate receptor contributes to the turnover of multiple proteasome targets[J]. **Molecular & Cellular Proteomics**, 2005, 4(6): 741-751.

[12] Regenberg B, Hansen J. *GAP1*, a novel selection and counter-selection marker for multiple gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Yeast**, 2000, 16(12): 1111-1119.

[13] Uemura T, Kashiwagi K, Igarashi K. Uptake of putrescine and spermidine by Gap1p on the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2005, 328(4): 1028-1033.

[14] Jauniaux J C, Grenson M. *GAP*1, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **European Journal of Biochemistry**, 1990, 190(1): 39–44.

[15] Hein C, André B. A C-terminal di-leucine motif and nearby sequences are required for NH_4^+-induced inactivation and degradation of the general amino acid permease, Gap1p, of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Molecular Microbiology**, 1997, 24(3): 607–616.

[16] Springael J Y, Nikko E, André B, et al. Yeast Npi3/Bro1 is involved in ubiquitin-dependent control of permease trafficking[J]. **FEBS Letters**, 2002, 517(1–3): 103–109.

[17] Lasko P F, Brandriss M C. Proline transport in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Journal of Bacteriology**, 1981, 148(1): 241–247.

[18] Hitchcock A L, Auld K, Gygi S P, et al. A subset of membrane-associated proteins is ubiquitinated in response to mutations in the endoplasmic reticulum degradation machinery [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2003, 100(22): 12735–12740.

[19] Abe F, Iida H. Pressure-induced differential regulation of the two tryptophan permeases Tat1 and Tat2 by ubiquitin ligase Rsp5 and its binding proteins, *Bul*1 and *Bul*2[J]. **Molecular and Cellular Biology**, 2003, 23(21): 7566–7584.

[20] Menant A, Barbey R, Thomas D. Substrate-mediated remodeling of methionine transport by multiple ubiquitin-dependent mechanisms in yeast cells[J]. **The EMBO Journal**, 2006, 25(19): 4436–4447.

[21] Mayor T, Graumann J, Bryan J, et al. Quantitative profiling of ubiquitylated proteins reveals proteasome substrates and the substrate repertoire influenced by the Rpn10 receptor pathway[J]. **Molecular & Cellular Proteomics**, 2007, 6(11): 1885–1895.

[22] Seyfried N T, Xu P, Duong D M, et al. Systematic approach for validating the ubiquitinated proteome [J]. **Analytical Chemistry**, 2008, 80(11): 4161–4169.

[23] Peng J, Schwartz D, Elias J E, et al. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination [J]. **Nature Biotechnology**, 2003, 21(8): 921–926.

[24] Tagwerker C, Flick K, Cui M, et al. A tandem affinity tag for two-step purification under fully denaturing conditions application in ubiquitin profiling and protein complex identification combined with *in vivo* Cross-Linking [J]. **Molecular & Cellular Proteomics**, 2006, 5(4): 737–748.

[25] Shema E, Oren M, Minsky N. Detection and characterization of ubiquitylated H2B in mammalian cells[J]. **Methods**, 2011, 54(3): 326–330.

[26] Kerppola T K. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells[J]. **Annual Review of Biophysics**, 2008, 37: 465–487.

[27] Kerppola T K. Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells[J]. **Nature Protocols**, 2006, 1(3): 1278–1286.

[28] Lv Y, Zhao X, Liu L, et al. A simple procedure for protein ubiquitination detection in *Saccharomyces cerevisiae*: Gap1p as an example[J]. **Journal of Microbiological Methods**, 2013, 94(1): 25–29.

[29] Wu S, Letchworth G J. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol[J]. **BioTechniques**, 2004, 36(1): 152–155.

[30] Demidov V V, Dokholyan N V, Witte-Hoffmann C, et al. Fast complementation of split fluorescent protein triggered by DNA hybridization[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2006, 103(7): 2052–2056.

[31] Merhi A, Gérard N, Lauwers E, et al. Systematic mutational analysis of the intracellular regions of yeast Gap1 permease [J]. **PLos One**, 2011, 6(4): e18457.

[32] Risinger A L, Kaiser C A. Different ubiquitin signals act at the Golgi and plasma membrane to direct GAP1 trafficking[J]. **Molecular Biology of the Cell**, 2008, 19(7): 2962–2972.

[33] Radivojac P, Vacic V, Haynes C, et al. Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites [J]. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, 2010, 78(2): 365–380.