

## 泛素特异性蛋白酶 2a 的原核表达纯化及酶活性分析

张万方, 孙寅玮, 王孟慧, 黄向瑜, 樊松乐, 徐磊

**摘要** 目的 为了探讨泛素特异性蛋白酶 2a( USP2a) 在肿瘤发生发展中的催化机制, 构建 USP2a C 末端催化结构域原核表达质粒 pET28a-USP2a-C, 分析 USP2a C 末端催化结构域的活性情况。方法 利用荧光检测方法测定 USP2a-C 的酶促动力学常数, 并采用液相色谱-质谱联用技术( LC-MS/MS) 分析 USP2a 的肽酶和异肽酶活性。结果 结果表明获得了可溶性表达的 USP2a-C 融合蛋白, 酶促动力学分析 USP2a-C 水解底物 Ub-AMC 的催化效率  $K_{cat}/K_m = 2.53 \times 10^5 \text{ mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$ ; LC-MS/MS 分析结果表明 USP2a-C 能有效分解 Di-Ub 和 Ub-V<sup>77</sup> 两种不同性质的底物, 并且两者之间的催化活性差异无统计学意义。结论 获得了可溶性表达的 USP2a-C 蛋白, 并且分析证明其具有完整的去泛素化酶的活性。

**关键词** 泛素特异性蛋白酶 2; 酶活性分析; 液相色谱-质谱联用技术

**中图分类号** R 362

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2018)03-0352-07  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.03.005

USP2 是一种去泛素化酶( deubiquitylating enzymes, DUB), 位于 11 号染色体上( 11q23.3) [1]。泛素化是蛋白质降解的一种重要方式 [2]。DUB 的作用主要是将泛素从目的蛋白上去掉, 是维护机体泛素水平的一个重要机制 [3], USP2 基因经过 5' 末端的选择性剪切可产生 USP2a 和 USP2b 两个亚型。研究 [4] 表明 USP2a 与多种肿瘤的发生发展相关, 沉默 USP2a 能诱导细胞凋亡。如在前列腺癌、乳腺癌、膀胱癌中 USP2a 能够促进细胞的迁移和侵袭 [5-7], 抑制 USP2a 则诱导细胞凋亡 [8]。另外, USP2a 能稳定 CyclinD1 [9], 参与细胞周期调控等。因此推测 USP2a 可能一种新的肿瘤标志基因 [10]。该研究通过表达 USP2a C 末端重组蛋白, 检测重组 USP2a 蛋白的酶活性, 并通过 LC-MS/MS 检测 USP2a 对不同性质底物的酶活性情况, 为进一步分

析 USP2a 的催化机制, 开发 USP2a 的功能型抑制剂提供重要的基础。

### 1 材料与方法

**1.1 引物设计与合成** 以 USP2a cDNA 为模板, 设计扩增其 C 末端结构域的特异引物, USP2a-I F: 5'-GGAATTCATGAATTCTAAGAGTGCCCAGG-3' (含有 EcoR I 酶切位点), USP2a-I R: 5'-CCGCTCGAGCTACATTCGGGAGGG-3' (含有 Xho I 酶切位点), 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

**1.2 目的片段的扩增与表达载体的构建** 采用 25  $\mu\text{l}$  PCR 反应体系进行扩增; PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 25 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$ 、8 min。产物进行电泳检测并回收目的片段。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 25 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$ 、8 min。产物进行电泳检测并回收目的片段。

**1.3 pET28-USP2a-C 的表达与纯化** 取单克隆菌落, 接种于含有卡那霉素的 LB 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 过夜培养。第 2 天扩大培养到 100 ml 含有卡那霉素的 LB 液体培养基中, 采用 30  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 继续培养; 检测 OD = 0.6 ~ 0.8 时进行 IPTG 诱导, IPTG 浓度为 0.8 mmol/L, 诱导 4 h 后收集菌液; 超声裂解后, 分别收集上清和沉淀, 通过 SDS-PAGE 电泳分析蛋白表达情况。使用组氨酸标签蛋白纯化试剂盒, 依照说明书进行蛋白纯化。

**1.4 重组蛋白 USP2a-C 的酶活性分析** 使用 SPEX Fluorolog-2 spectrofluorometer (激发光波长  $\lambda$ , 380 nmol/L; 发射光波长  $\lambda$ , 440 nmol/L) 检测系统, 分析重组蛋白的酶活性。根据米氏方程  $v = (V_{\max} \times [S]) / ([S] + K_m)$ , 对底物 Ub-AMC 进行梯度稀释, 分别测出每个浓度梯度的反应初始速率 ( $v$ ), 以  $v$  对底物浓度  $[S]$  作图, 同时设立空白对照。

**1.5 LC-MS/MS 分析蛋白 USP2a-C 的酶活性** 选取底物 Ub-V<sup>77</sup>(肽键) 和 Di-Ub(异肽键) 分别和 USP2a-C 进行反应, 并分别在 0、15、30、60、120 min 时加入终止缓冲液(水: 乙腈: 乙酸 = 80: 20: 1) 终止反应, 反应结果在 Agilent 1200 HPLC 和 Agilent

2017-11-27 接收

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目(编号: 15A180055); 新乡学院科技创新基金(编号: 15ZC13); 新乡市科技攻关项目计划(编号: CXGG17015)

作者单位: 新乡学院生命科学技术学院, 新乡 453003

作者简介: 张万方, 女, 讲师, 责任作者, E-mail: 94673366@qq.com



Q6410 上进行检测<sup>[11]</sup>, 采用 Mass Hunter workstation software 进行数据处理, 得到 USP2a-C 降解 Ub-V77 和 Di-Ub 的反应曲线图。

**1.6 统计学处理** 由于 USP2a-C 蛋白催化分解底物的降解过程符合非线性关系, 因此采用 R Core Team, 2015 统计软件, R 语言中的 nls 函数进行非线性拟合, 两条非线性关系的显著性检验采用 Chen et al<sup>[12]</sup> 提出的残差平方和的 *F* 检验法。

## 2 结果

**2.1 USP2a 的克隆** 以 USP2a cDNA 为模板, PCR 扩增 USP2a C 末端催化结构域基因片段, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在 1 000 bp 左右处有特异性条带, 大小与预期相符。

连接载体 pET28a(+) , 挑取单菌落经菌液 PCR

检测和双酶切鉴定, 结果均能得到与预期大小一致的 DNA 条带, 见图 1。经过 DNA 测序证实 USP2a C 末端基因序列克隆成功, 测序结果见图 2~5。

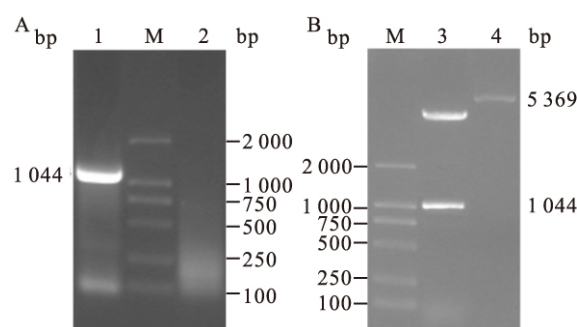


图 1 重组质粒 pET28-USP2a-C 的鉴定

A: PCR 电泳图; M: DNA Marker; 1: USP2a-C; 2: 无模板空白对照; B: 双酶切电泳图; 3: 重组质粒 pET28-USP2a-C; 4: 空质粒 pET28a

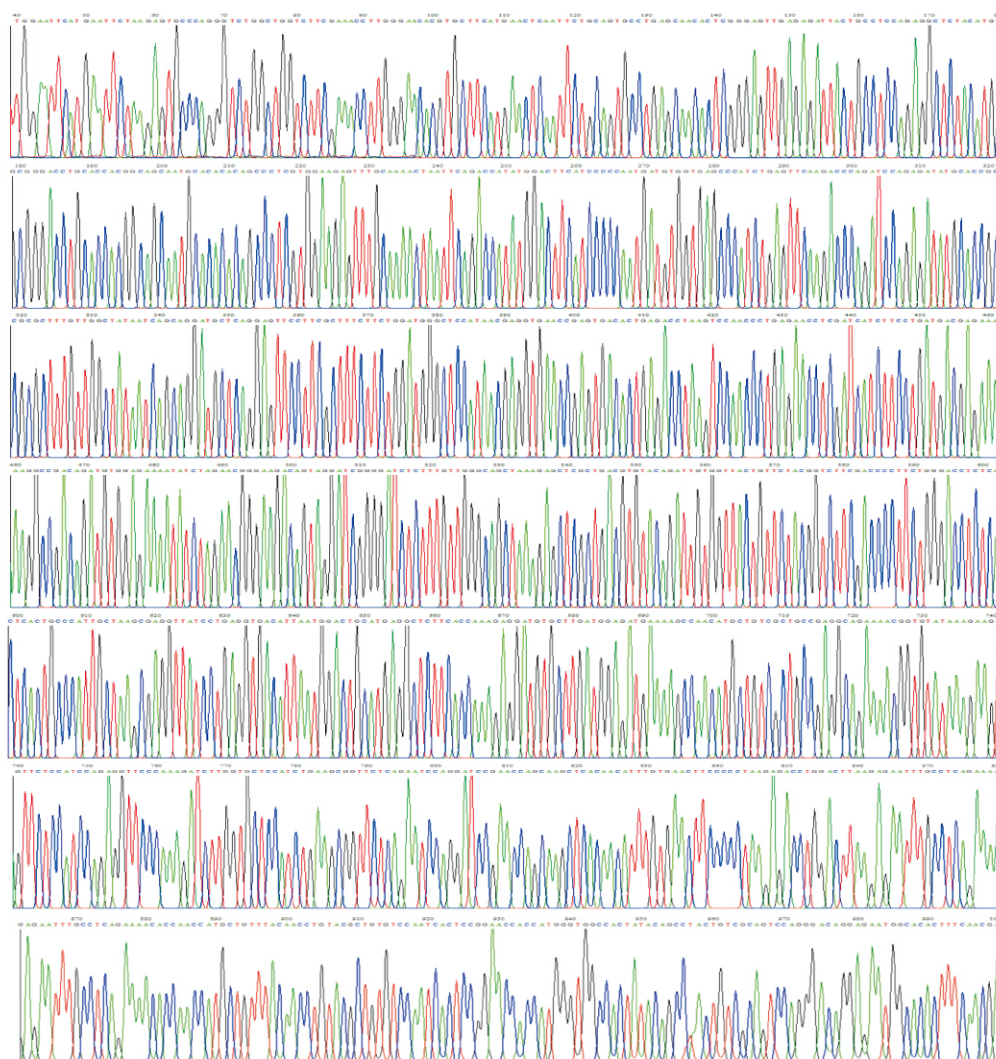


图 2 USP2a-C 正向测序结果



Download - GenBank Graphics

Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 2, mRNA (cDNA clone MGC:4176 IMAGE:3635143), complete cds  
Sequence ID: [BC002854.1](#) Length: 2070 Number of Matches: 1  
[See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 947 to 1900 GenBank Graphics

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1762 bits(954)	0.0	954/954(100%)	0/954(0%)	Plus/Plus
Query 47	CATGAATCTAAGAGTCCCAGGGTCTGGCTGGTCTTCGAAACCTGGGAACACGTGCTT	106		
Sbjct 947	CATGAATCTAAGAGTCCCAGGGTCTGGCTGGTCTTCGAAACCTGGGAACACGTGCTT	1006		
Query 107	CATGAACCTCAATCTGCAGTGCCTGAGCAACACTCGGAGTTGAGAGATTACTGCCTCCA	166		
Sbjct 1007	CATGAACCTCAATCTGCAGTGCCTGAGCAACACTCGGAGTTGAGAGATTACTGCCTCCA	1066		
Query 167	GAGGCTCTACATGCGGGACCTGCACACGGCAGCAATGCACACAGCCCTCTGGGAAGA	226		
Sbjct 1067	GAGGCTCTACATGCGGGACCTGCACACGGCAGCAATGCACACAGCCCTCTGGGAAGA	1126		
Query 227	GTITGCAAACTAATTCAGACCATATGGACTTCATCCCCCAATGATGGTGAGCCCATC	286		
Sbjct 1127	GTITGCAAACTAATTCAGACCATATGGACTTCATCCCCCAATGATGGTGAGCCCATC	1186		
Query 287	TGAGTTCAAGACCCAGATCCAGAGATATGCACCGGCTTTGTTGGCTATAATCAGCAGGA	346		
Sbjct 1187	TGAGTTCAAGACCCAGATCCAGAGATATGCACCGGCTTTGTTGGCTATAATCAGCAGGA	1246		
Query 347	TGCTCAGGAGTTCCTTCGCTTTCTTCTGGATGGGCTCCATAACGAGGTGAACCGAGTGAC	406		
Sbjct 1247	TGCTCAGGAGTTCCTTCGCTTTCTTCTGGATGGGCTCCATAACGAGGTGAACCGAGTGAC	1306		
Query 407	ACTGAGACCTAAGTCCAAACCTGAGAACCTCGATCATCTTCTGATGACGAGAAAGGCCG	466		
Sbjct 1307	ACTGAGACCTAAGTCCAAACCTGAGAACCTCGATCATCTTCTGATGACGAGAAAGGCCG	1366		
Query 467	ACAGATGTGGAGAAAATATCTAGAACGGGAAGACAGTAGGATCGGGATCTCTTTGTTGG	526		
Sbjct 1367	ACAGATGTGGAGAAAATATCTAGAACGGGAAGACAGTAGGATCGGGATCTCTTTGTTGG	1426		
Query 527	GCAGCTAAGAGCTCGCTGACGTGTACAGATTGTGTTACTGTTCTACGGTCTTCGACCC	586		
Sbjct 1427	GCAGCTAAGAGCTCGCTGACGTGTACAGATTGTGTTACTGTTCTACGGTCTTCGACCC	1486		
Query 587	CTTCTGGACCTCTCACTGCCATTGCTAAGCGAGGTTATCCTGAGGTGACATTAAATGGA	646		
Sbjct 1487	CTTCTGGACCTCTCACTGCCATTGCTAAGCGAGGTTATCCTGAGGTGACATTAAATGGA	1546		
Query 647	CTGCATGAGGCTCTTACCAAGAGGATGTGCTTGATGGAGATGAAAGCCAACATGCTG	706		
Sbjct 1547	CTGCATGAGGCTCTTACCAAGAGGATGTGCTTGATGGAGATGAAAGCCAACATGCTG	1606		
Query 707	TGCTGCCGAGGCGAGAAAACGGTGTATAAAGAAAGTTCTCCATCCAGAGGTTCCCAAGAT	766		
Sbjct 1607	TGCTGCCGAGGCGAGAAAACGGTGTATAAAGAAAGTTCTCCATCCAGAGGTTCCCAAGAT	1666		
Query 767	CTTGGTCTCCATCTGAAGCGGTTCTCAGAAATCCAGATCCGAACCGAAGCTCACAAAC	826		
Sbjct 1667	CTTGGTCTCCATCTGAAGCGGTTCTCAGAAATCCAGATCCGAACCGAAGCTCACAAAC	1726		
Query 827	ATTGTGAACCTTCCCCCTAAGAGACCTGGACTTAAGAGAATTGCCTCAGAAAACACCAA	886		
Sbjct 1727	ATTGTGAACCTTCCCCCTAAGAGACCTGGACTTAAGAGAATTGCCTCAGAAAACACCAA	1786		
Query 887	CCATGCTGTTTACAACCTGTACGCTGTGTCCAATCACTCCGGAACCAACATGGGTGGCCA	946		
Sbjct 1787	CCATGCTGTTTACAACCTGTACGCTGTGTCCAATCACTCCGGAACCAACATGGGTGGCCA	1846		
Query 947	CTATACAGCCTACTGTGCGAGTCCAGGACAGGAGAATGGCACACTTTCAACGA	1000		
Sbjct 1847	CTATACAGCCTACTGTGCGAGTCCAGGACAGGAGAATGGCACACTTTCAACGA	1900		

图3 USP2a-C 正向测序结果 BLAST 对比结果

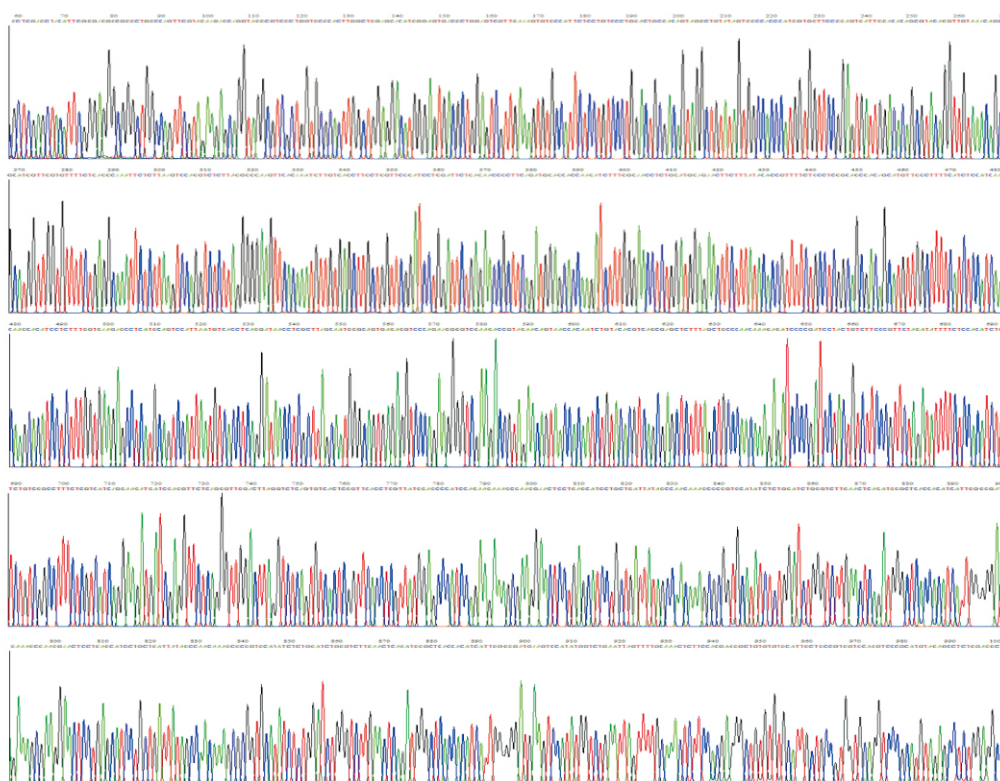


图4 USP2a-C 反向测序结果



Download - GenBank Graphics

Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 2, mRNA (cDNA clone MGC:4176 IMAGE:3635143), complete cds  
Sequence ID: BC002854.1 Length: 2070 Number of Matches: 1  
See 1 more title(s)

Range 1: 1060 to 1995		GenBank	Graphics	Next Match	Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1729 bits(936)	0.0	936/936(100%)	0/936(0%)	Plus/Minus	
Query 65	GCTACATTCGGGAGGGGGGCTGGCCAGTTCGTAGAAGAGCAGGTAGGCGTCGCTGGTGC			124	
Sbjct 1995	GCTACATTCGGGAGGGGGGCTGGCCAGTTCGTAGAAGAGCAGGTAGGCGTCGCTGGTGC			1936	
Query 125	GCACCTTGGCTGGAGGACATGGGAGTGACGCTGGAGTCGTTGAAAGTGTGCCATTCTCCTG			184	
Sbjct 1935	GCACCTTGGCTGGAGGACATGGGAGTGACGCTGGAGTCGTTGAAAGTGTGCCATTCTCCTG			1876	
Query 185	TCCCTGGACTGCGACAGTAGGCTGTATAGTGCCACCCATGGTGGTTCGGAGTGATTGG			244	
Sbjct 1875	TCCCTGGACTGCGACAGTAGGCTGTATAGTGCCACCCATGGTGGTTCGGAGTGATTGG			1816	
Query 245	ACACAGCGTACAGGTTGTAACAGCATGGTGGTGTCTTCTGAGGCAAAATCTCTTAAGT			304	
Sbjct 1815	ACACAGCGTACAGGTTGTAACAGCATGGTGGTGTCTTCTGAGGCAAAATCTCTTAAGT			1756	
Query 305	CCAGGTCCTTTAGGGGGAAGTTCACAAATGTTGTGAGCTTGTGGTTCGGATCCTGGATT			364	
Sbjct 1755	CCAGGTCCTTTAGGGGGAAGTTCACAAATGTTGTGAGCTTGTGGTTCGGATCCTGGATT			1696	
Query 365	CTGAGAACCGCTTCAGATGGAGCACCAGATCTTTGGGAACCTCTGGATGGAGAACTTCT			424	
Sbjct 1695	CTGAGAACCGCTTCAGATGGAGCACCAGATCTTTGGGAACCTCTGGATGGAGAACTTCT			1636	
Query 425	TTATACACGTTTTTCTGCTCGGACGCGACAGCATGTTGGCTTTTCATCTCCATCAAGCA			484	
Sbjct 1635	TTATACACGTTTTTCTGCTCGGACGCGACAGCATGTTGGCTTTTCATCTCCATCAAGCA			1576	
Query 485	CATCCTCTTTGGTGAAGAGCCTCATGCAGTCCATTAAATGTCACCTCAGGATAACCTCGCT			544	
Sbjct 1575	CATCCTCTTTGGTGAAGAGCCTCATGCAGTCCATTAAATGTCACCTCAGGATAACCTCGCT			1516	
Query 545	TAGCAATGGGACGTGAGAGGTCCGAGAGGGGTGGAAGACCGTAGAAGTAAACACAAT			604	
Sbjct 1515	TAGCAATGGGACGTGAGAGGTCCGAGAGGGGTGGAAGACCGTAGAAGTAAACACAAT			1456	
Query 605	CTGTACACGTGAGGAGCTCTTTAGCTGCCAACAAAGAGATCCCCGATCCTACTGCTT			664	
Sbjct 1455	CTGTACACGTGAGGAGCTCTTTAGCTGCCAACAAAGAGATCCCCGATCCTACTGCTT			1396	
Query 665	CCCCTTCTAGATATTTCTCCACATCTGCGGCTTTCTGTCATCAGGAAGATGATCGA			724	
Sbjct 1395	CCCCTTCTAGATATTTCTCCACATCTGCGGCTTTCTGTCATCAGGAAGATGATCGA			1336	
Query 725	GGTCTTCAGGGTTGGACTTAGGTCTCAGTGTCACTCGGTTCACTCTGTTATGGAGCCAT			784	
Sbjct 1335	GGTCTTCAGGGTTGGACTTAGGTCTCAGTGTCACTCGGTTCACTCTGTTATGGAGCCAT			1276	
Query 785	CCAGAAGAAAGCGAAGGAACCTCTGAGCATCTGCTGATTATAGCCAAACAAAGCGCGTG			844	
Sbjct 1275	CCAGAAGAAAGCGAAGGAACCTCTGAGCATCTGCTGATTATAGCCAAACAAAGCGCGTG			1216	
Query 845	CATATCTCTGATCTGGGTCTTGAACCTCAGATGGGCTCACACATATTGGGGGATGAAG			904	
Sbjct 1215	CATATCTCTGATCTGGGTCTTGAACCTCAGATGGGCTCACACATATTGGGGGATGAAG			1156	
Query 905	TCCATATGGTCTGAATTAGTTTTCGAAACTCTCCACGAGGGCTGTGTGCTGATTGCTGC			964	
Sbjct 1155	TCCATATGGTCTGAATTAGTTTTCGAAACTCTCCACGAGGGCTGTGTGCTGATTGCTGC			1096	
Query 965	CGTGGTGCAGGTCCCGCATGTAGAGCCTCTGGAGGC			1000	
Sbjct 1095	CGTGGTGCAGGTCCCGCATGTAGAGCCTCTGGAGGC			1060	

图5 USP2a-C 反向测序结果 BLAST 对比结果

**2.2 USP2a-C 的表达与纯化** 将测序正确的重组质粒 pET28-USP2a-C 进行表达与纯化, SDS-PAGE 电泳结果显示, 上清液中含有大量的目的蛋白, 分子量 41 ku, 与预期大小相同, 证明 USP2a-C 以可溶性蛋白的形式进行表达。确定表达条件后, 大量表达纯化 USP2a-C 蛋白, 表达产物经 Ni-NTA 柱层析纯化目的蛋白, 收集样品, 得到纯化的 USP2a-C 蛋白, 见图 6。

纯化后 SDS-PAGE 电泳图上只有目的蛋白一条带, 说明 USP2a-C 蛋白纯化程度很高。使用 LC-MS/MS 分析纯化的 USP2a-C 蛋白的纯度和分子量。分析得到单一的主峰, 检测的分子量大小为 41 361.8 ku 与理论值(41 362.1 ku)一致, 证明所纯化得到的是 USP2a-C 目的蛋白, 见图 7。

**2.3 USP2a-C 蛋白的酶动力学分析** 根据米氏方程  $v = (V_{\max} \times [S]) / ([S] + K_m)$ , 得到 USP2a-C 分解 Ub-AMC 的最大反应速率  $V_{\max} = 6.57940 \times 10^{-10} \text{ mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$ , 米氏常数  $K_m = 1.08568 \times 10^{-6} \text{ mol}/\text{L}$ , 催化常数  $K_{\text{cat}} = 2.74 \times 10^{-1} \text{ 1/s}$ , 催化效率  $K_{\text{cat}}/K_m = 2.53 \times 10^5 \text{ mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$ 。证实纯化的 USP2a-C 蛋白

具有良好的催化活性, 见图 8。

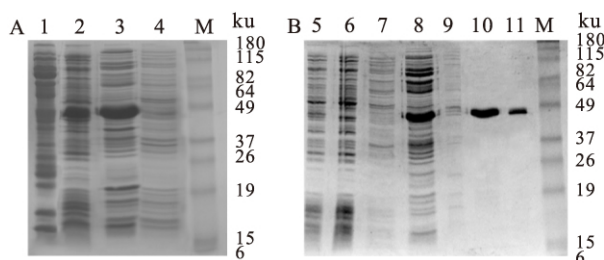


图6 重组 USP2a-C 蛋白电泳图

A: 重组 USP2a-C 蛋白诱导表达图; M: Marker(ku); 1: 空白对照; 2: 全菌液; 3: 超声裂解后的上清液; 4: 超声裂解后的沉淀; B: 重组 USP2a-C 蛋白纯化电泳图; 5~8: 洗涤穿出血; 9: Ni-NTA 珠子; 10~11: 纯化后的目的蛋白

**2.4 LC-MS/MS 分析 USP2a-C 蛋白酶分解不同底物的酶活性** 分别选取了双泛素 Di-Ub( Ub<sup>K48C</sup>-Ub<sup>D77</sup>) 和泛素的衍生物 Ub-V<sup>77</sup> 作为底物。其中 Di-Ub 中两个泛素之间是正常的异肽键结构; 底物 Ub-V<sup>77</sup> 的 Ub 和氨基酸残基 V<sup>77</sup> 之间是由肽键相连接。

从图 9 可知, 反应在加入酶后立即开始, 15 min 时底物的 Di-Ub 被分解了 45.83%, Ub-V<sup>77</sup> 被分解了



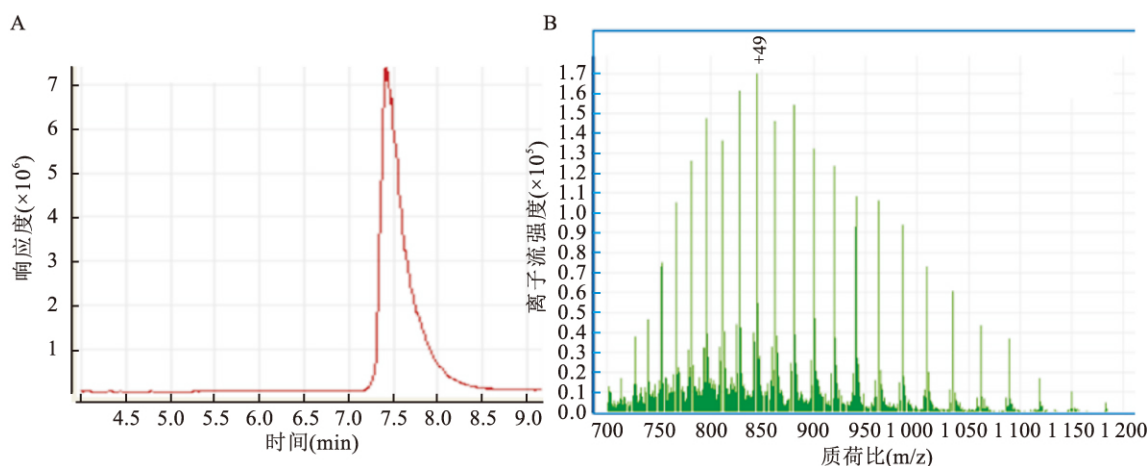


图7 LC-MS/MS分析纯化的 USP2a-C 的蛋白性质

A: 高效液相分离图, B: 质谱分析图

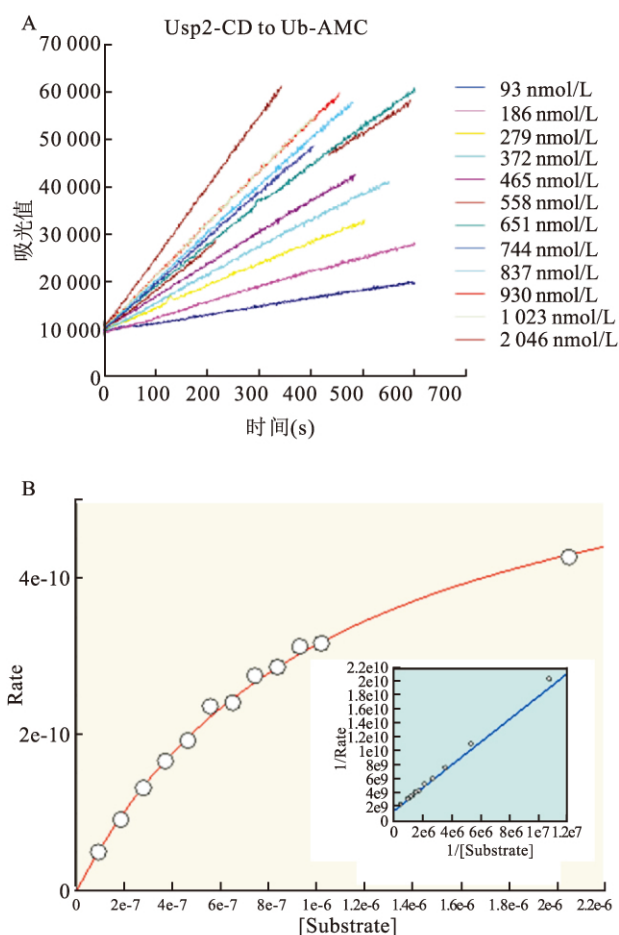
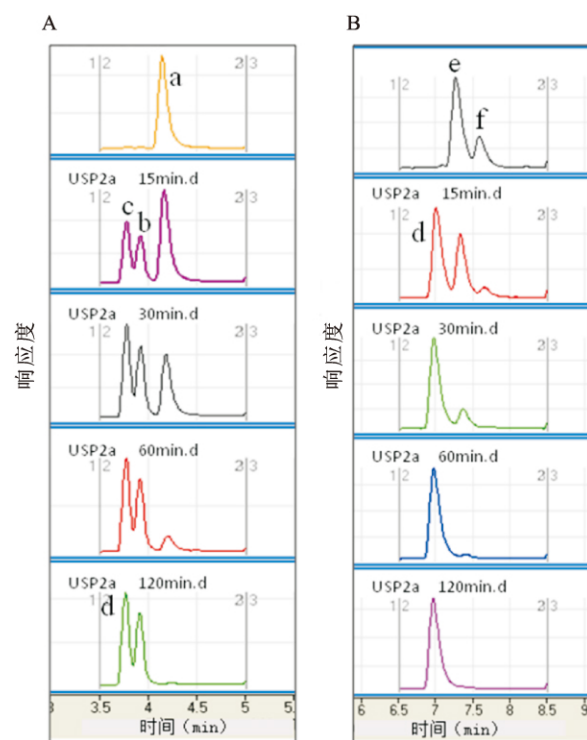


图8 USP2a-C 催化水解 Ub-AMC 催化参数的测定

A: USP2a-C 催化水解梯度稀释的 Ub-AMC 产物 AMC 的吸收值随时间的变化图; B: 不同浓度梯度的 Ub-AMC 反应初速度对底物浓度的关系图

parameter	Value	Std Error
$V_{max}$	6.57940e-010	2.05622e-011
$K_m$	1.08568e-006	6.10686e-008

图9 USP2a-C 分解 Di-Ub 和 Ub-V<sup>77</sup> 的活性分析图

a: Di-Ub; b: Ub<sup>K48C</sup>; c: Ub-wt + Ub-D<sup>77</sup>; d: Ub-wt; e: Ub-V<sup>77</sup>; f: Ub-V<sup>77</sup>-SO<sub>2</sub>

55.35%, 60 min 时, 底物 Ub-V<sup>77</sup> 的分解率已达到 96.35%, Ub-V<sup>77</sup> 的分解率也已达到 90% 左右, 120 min 时两个反应均已检测不到底物, 反应结束。由此可以证明纯化的 USP2a-C 蛋白具有完好的半胱氨酸蛋白酶活性, 能有效地催化分解异肽键和肽键底物。

**2.5 USP2a-C 分解 Di-Ub 和 Ub-V<sup>77</sup> 酶活性的统计分析** 经过非线性拟合统计分析, 显示 USP2a-C 分



解 Di-Ub 和 Ub-V<sup>77</sup> 两种不同性质底物的反应进程的统计分析结果显示差异无统计学意义,说明表达纯化的 USP2a-C 蛋白半胱氨酸蛋白酶活性正常。见图 10。

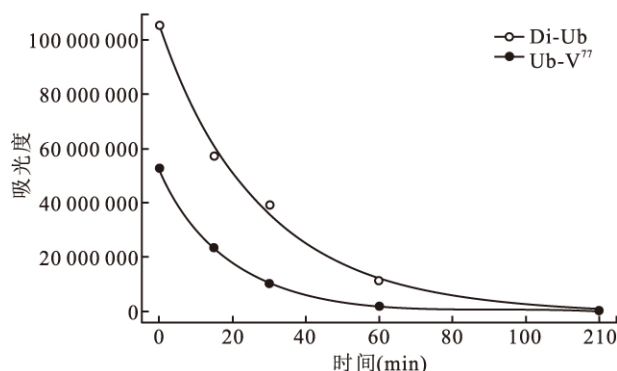


图 10 USP2a-C 催化分解底物的非线性拟合图

### 3 讨论

大肠杆菌原核表达系统具有操作简单、成本低廉等优点,因此本研究选择大肠杆菌表达系统。以 USP2a cDNA 为模板,用 PCR 法克隆了 USP2a C 末端催化结构域基因片段,成功构建了原核表达质粒 pET28-USP2a-C,并获得了可溶性表达的 USP2a-C 蛋白。为了检测获得的 USP2a C 末端片段的酶活性,本研究选用了 DUB 通用底物 Ub-AMC 检测酶的活性,结果证明重组蛋白具有很高的酶活性,并且酶活性稳定,室温放置 3 h 后酶活性依然不受影响。根据酶动力学原理,测定出了 USP2a-C 蛋白的酶动力学参数(米氏常数  $K_m$ 、催化常数  $K_{cat}$  以及催化效率  $K_{cat}/K_m$ )与文献<sup>[11]</sup>报道一致。

真核蛋白通过大肠杆菌进行表达多以包涵体的形式产生,通常没有活性,需要通过体外复性使蛋白得以活化,复性过程对酶的量以及活性造成一定的损失,得到活性酶产量很少。因此对于原核表达的重组蛋白酶,获得可溶性表达就显得至关重要,本研究为了得到可溶性表达的 USP2a-C 重组蛋白,对诱导表达的条件进行了优化,通过 20、25、30、37、42 °C 等一系列温度的实验,显示在 30 °C 条件下,诱导 4 h 可产生大量的可溶性表达的蛋白。

为了检测表达的 USP2a-C 蛋白的半胱氨酸蛋白酶功能是否完整,本研究选用了两种不同性质的底物 Di-Ub 和 Ub-V<sup>77</sup> 进行实验。他们都不含荧光因子,不能通过荧光检测分析酶活性,通常对于没有荧光物质的底物在检测酶活性时多使用 SDS-PAGE 的方法<sup>[13]</sup>。SDS-PAGE 检测方法通常是将反应体系

配好后,按照反应条件的要求进行反应,等反应完成后,将整个反应体系进行 SDS-PAGE 电泳,通过电泳条带的深浅以及有无判断酶活性变化。但是 SDS-PAGE 不灵敏,而且只能观察反应系统中底物或产物物质的量的最终变化结果,不能准确地对反应过程以及产物进行定性分析。本研究采用 LC-MS/MS 方法,不但能够实时监测反应的进程情况,而且能对反应过程中底物或产物的变化进行定量检测和定性测定。通过对 LC-MS/MS 检测的 USP2a-C 降解两种不同性质底物的反应进程进行非线性拟合统计分析后显示,二者差异无统计学意义。说明表达纯化的 USP2a-C 蛋白半胱氨酸蛋白酶具有完整的酶活性。

大量的研究<sup>[14-18]</sup>表明 USP2a 与多种肿瘤的发生发展具有重要关系,目前推测 USP2a 是一种新的肿瘤标志物。因此研究 USP2a 的活性功能以及底物特异性将对肿瘤的检测与治疗提供重要的理论依据。下一步将对 USP2a 的催化机制以及在细胞中的活性机制开展进一步的研究。

总之,本研究获得了 USP2a 的可溶性表达并初步分析了 USP2a 活性情况,为今后研究 USP2a 催化机制以及开发 USP2a 抑制剂提供了重要基础,对肿瘤的诊断和新药的开发具有重要意义。

### 参考文献

- [1] Priolo C, Tang D, Brahmamandan M, et al. The isopeptidase USP2a protects human prostate cancer from apoptosis [J]. Cancer Res, 2006, 66(17): 8625-32.
- [2] Daniel J A, Torok M S, Sun Z W, et al. Deubiquitination of histone H2B by a yeast acetyltransferase complex regulates transcription [J]. J Biol Chem, 2004, 279(3): 1867-71.
- [3] Nijman S M, Luna-Vargas M P, Velds A, et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes [J]. Cell, 2005, 123(5): 773-86.
- [4] Migita T, Ruiz S, Fornari A, et al. Fatty acid synthase: a metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 2009, 101(7): 519-32.
- [5] Qu Q, Mao Y, Xiao G, et al. USP2 promotes cell migration and invasion in triple negative breast cancer cell lines [J]. Tumour Biol, 2015, 36(7): 5415-23.
- [6] Mahul Mellier A, Datler C, Pazarentzos E, et al. De-ubiquitinating proteases USP2a and USP2c cause apoptosis by stabilising R1P1 [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1823(8): 1353-65.
- [7] Shan J, Zhao W, Gu W. Suppression of cancer cell growth by promoting cyclin D1 degradation [J]. Mol Cell, 2009, 36(3): 469-76.
- [8] Stevenson L F, Sparks A, Allende-Vega N, et al. The deubiquitinating enzyme USP2a regulates the p53 pathway by targeting Mdm2 [J]. EMBO J, 2007, 26(4): 976-86.
- [9] Reglinski K, Keil M, Altendorf S, et al. Peroxisomal import reduces



- the proapoptotic activity of deubiquitinating enzyme USP2 [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): 1–20.
- [10] Shi D, Grossman S R. Ubiquitin becomes ubiquitous in cancer: emerging roles of ubiquitin ligases and deubiquitinases in tumorigenesis and as therapeutic targets [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 10(8): 737–47.
- [11] Amerik A Y, Nowak J, Swaminathan S, et al. The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways [J]. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(10): 3365–80.
- [12] Chen Y, Jackson D A, Harvey H H. A comparison of von bertalanffy and polynomial functions in modeling fish growth data [J]. *Can J Fish Aquatic Sci*, 1992, 49(6): 1228–35.
- [13] McGouran J F, Gaertner S R, Altun M, et al. Deubiquitinating enzyme specificity for ubiquitin chain topology profiled by di-ubiquitin activity probes [J]. *Chem Biol*, 2013, 20(12): 1447–55.
- [14] Tong X, Buelow K, Guha A, et al. USP2a protein deubiquitinates and stabilizes the circadian protein CRY1 in response to inflammatory signals [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(30): 25280–91.
- [15] Shi Y, Solomon L R, Pereda-Lopez A, et al. Ubiquitin-specific cysteine protease 2a (USP2a) regulates the stability of aurora-a [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(45): 38960–8.
- [16] Benassi B, Marani M, Loda M, et al. USP2a alters chemotherapeutic response by modulating redox [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4:e812.
- [17] Devine T, Dai M S. Targeting the ubiquitin-mediated proteasome degradation of p53 for cancer therapy [J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19: 3248–62.
- [18] Wei T, Biskup E, Gjerdrum L M, et al. Ubiquitin-specific protease 2 decreases p53-dependent apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(30): 48391–400.

## Prokaryotic expression and purification of USP2a and activity analysis

Zhang Wanfang, Sun Yinwei, Wang Menghui, et al

(School of Life Science and Technology, Xinxiang University, Xinxiang 453003)

**Abstract Objective** In order to study the mechanism of USP2a in tumor genesis and development, the primers were designed to PCR the C terminal catalytic domain of USP2a. **Methods** The PCR products were cloned into plasmid pET28a(+). The fusion protein USP2a-C was induced and expressed in *E. coli* BL21 and purified by Ni-NTA affinity chromatogram. The kinetic parameters of USP2a-C were detected by fluorescence, the activity of peptidase and isopeptidase were analyzed by LC-MS/MS. **Results** The soluble fusion protein USP2a-C were successfully expressed and purified. The kinetic parameters of USP2a-C hydrolyzed Ub-AMC with a  $K_{cat}/K_m$  of  $2.53 \times 10^5 \text{ mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$ . LC-MS/MS results indicated that USP2a-C could hydrolyze Di-Ub and Ub-V<sup>77</sup> effectively. **Conclusion** The C terminal catalytic domain of USP2a has the total catalytic activity of deubiquitinating enzymes.

**Key words** ubiquitin-specific protease 2; activity analysis; LC-MS/MS

(上接第 351 页)

## A preliminary study on the regulatory effect of breast cancer associated fibroblasts on MCF7 cells

Li Zhen, Tu Daoyuan, Zhen Linlin, et al

(Dept of Breast and Thyroid Surgery, Huai'an First People's Hospital Affiliated to NJMU, Huai'an 223300)

**Abstract Objective** To study the regulatory effect of breast cancer associated fibroblasts (CAFs) on MCF7 cells, and the role of tumor microenvironment in the development of breast cancer. **Methods** CAFs were isolated by collagenase I digestion and cultured. DCFHDA method was used for the detection of reactive oxygen species (ROS). Chick embryo chorioallantoic membrane assay was used to detect angiogenesis. **Results** Co-culture of MCF7 cells and CAFs promoted proliferation of tumor cells and CAFs, and promoted the production of ROS. Addition of peroxidase into co-culture system inhibited the production of ROS. Besides, co-culture of MCF7 cells and CAFs significantly promoted angiogenesis in breast cancer cells; the over expression of peroxidase in CAFs significantly inhibited this process. **Conclusion** CAFs have regulatory effect on the expression of ROS in MCF7 cells, and can promote the angiogenesis in tumor cells.

**Key words** breast cancer associated fibroblasts; breast cancer MCF7 cells; reactive oxygen species; angiogenesis