

復旦大學

本科毕业论文



论文题目：组蛋白去乙酰化酶 HDAC6/Sirtuin2 参与
 α -tubulin C 末端去酪氨酸化的功能研究

姓 名：武学诚 学 号：16307110250

院 系：生命科学学院

专 业：生物技术

指导教师：余巍 职 称：研究员

单 位：复旦大学生命科学学院

完成日期：2020 年 6 月 2 日

组蛋白去乙酰化酶 HDAC6/Sirtuin2
参与 α -tubulin C 末端去酪氨酸化的
功能研究

完成人

武学诚

指导小组成员

余巍 研究员

目 录

摘要	I
Abstract	II
一、前 言	1
1.1 微管蛋白翻译后修饰的生物学意义	1
1.2 微管蛋白去酪氨酸化的研究历程及生物学意义	3
1.3 组蛋白去乙酰化酶 HDAC6 和 Sirtuin2	6
1.4 本研究的意义	7
二、材料与方法	9
2.1 材料	9
2.1.1 细胞与实验动物	9
2.1.2 载体与宿主菌	9
2.2 仪器和设备	9
2.3 试剂	11
2.3.1 商业试剂	11
2.3.2 试剂和培养基的配制方法	12
2.4 实验方法和步骤	15
2.4.1 组蛋白去乙酰化酶（HDAC6 和 Sirtuin2）的获取	15
2.4.2 微管蛋白去酪氨酸化的体外检测	18
2.4.3 微管蛋白去酪氨酸化的细胞水平检测	19
2.4.4 微管蛋白去酪氨酸化的组织水平检测	22

三、研究结果23

3.1 组蛋白去乙酰化酶（HDAC6 和 Sirtuin2）的获取.....23

3.2 对微管蛋白的去酪氨酸化水平进行检测.....24

3.2.1 体外质谱检测.....24

3.2.2 体外细胞裂解物检测.....25

3.2.3 细胞水平检测.....26

3.2.4 组织水平检测.....28

四、讨 论30

4.1 本研究的实验结果总结与价值探讨.....30

4.2 未来寻找微管蛋白去酪氨酸化酶及调控因素的可能思路.....31

参考文献33

致谢35

摘要

微管和微丝是真核生物细胞骨架的重要成分，在细胞生命活动中发挥重要作用。微管是由 α 和 β 微管蛋白（Tubulin）的二聚体组成的多聚体。微管蛋白上的翻译后修饰，如去酪氨酸化、多聚谷氨酸化等，使微管出现了功能上的分化；这些翻译后修饰被人们称为“微管密码”。异常的微管蛋白的翻译后修饰与癌症、神经退行性疾病以及心脏病等多种重要疾病相关。因此，微管蛋白的翻译后修饰具体的发生和调控机制以及在生理、病理过程中的意义值得进一步研究。其中，微管蛋白 C 末端的去酪氨酸化是细胞有丝分裂、胞内物质转运、神经元生理活动、肌力传导等的重要调控信号。在微管寿命较长的神经元中，以去酪氨酸化存在的微管蛋白占主体。异常的去酪氨酸化水平会导致细胞生理功能的紊乱，进而引发心肌炎等疾病。过去一年半，我从生化、细胞、组织三个水平上对组蛋白去乙酰化酶 HDAC6 和 Sirtuin2（简称 Sirt2）与去酪氨酸化的 α -微管蛋白量之间的关系进行了探讨。本研究从寻找新的微管蛋白去酪氨酸化酶入手，但并没有找到，比较遗憾。不同于前人发现的微管蛋白去酪氨酸化酶 Vasohibin，我发现 HDAC6/Sirt2 不能直接切除 α -微管蛋白 C 末端的酪氨酸，但不能排除在生理条件下，HDAC6/Sirt2 会间接影响去酪氨酸化的 α -微管蛋白量。有证据表明 Vasohibin 不是唯一的微管蛋白去酪氨酸化酶，仅从 Vasohibin 入手对去酪氨酸化的调控过程及相关疾病进行研究是不够全面的。因此，继续寻找能执行此种功能的酶，进一步研究去酪氨酸化的调控过程及其与心肌炎等疾病的联系仍是当前细胞骨架研究中的重要任务。

关键词：组蛋白去乙酰化酶，微管蛋白，去酪氨酸化

Abstract

Microtubules and microfilaments are the main components of cytoskeleton in eukaryotic cells, and play vital roles in intracellular activities. Microtubules are polymers consist of the dimers of α and β tubulin. There are many post-translational modifications on α -tubulin like detyrosination, polyglutamylation, *etc.* These post-translational modifications lead to the differentiate of the function of microtubules. Thus, in the field, people called them “the tubulin codes”. Since abnormal level of modifications related to diseases like cancer, neurodegenerative diseases and heart failure, how these modifications are introduced to tubulin and how their functions are regulated are pending further investigation. The detyrosination of tubulin is an essential regulatory signal related to mitosis, cargo transporting, and the activities of neuron. In neurons, tubulins are mainly detyrosinated. Abnormal detyrosination results in a disorder of intracellular activities and can lead to disease like myocarditis. Therefore, exploring how the tubulin detyrosination is regulated, and looking for the tubulin detyrosination enzyme became my research focus in the past years. I investigated whether the histone deacetylases, HDAC6 and Sirtuin2, detyrosinates tubulin, biochemically, cellularly and on the tissue levels. Unlike Vasohibin, the only known tubulin detyrosination enzyme, I found that HDAC6 or Sirtuin2 does not detyrosinate tubulin. However, the possibility that HDAC6 and Sirtuin2 indirectly affect the level of tubulin detyrosination cannot be excluded. Evidences have suggested that Vasohibin is not the exclusive tubulin detyrosination enzyme. Investigating the tubulin detyrosination process only from the perspective of Vasohibin is biased. Searching for other tubulin detyrosination enzymes and further exploring the regulation of detyrosination process and its connection with diseases like myocarditis are important tasks for cytoskeleton researches.

Key words: Histone deacetylase, Tubulin, Detyrosination

一、前言

1.1 微管蛋白翻译后修饰的生物学意义

微管是真核生物细胞骨架系统中主要的一类纤维状成分，在细胞生命活动中发挥许多重要作用（如在细胞分裂时驱动染色体的分离，调控细胞的形态和流动性，作为马达蛋白在胞内转运物质的轨道等）^[1]。微管是一种多聚体，它的单位是一分子 α 和一分子 β 微管蛋白（Tubulin）组成的二聚体。 α 和 β 微管蛋白在进化上高度保守，结构基本一致。它们都具有一个球形的核心以及暴露于核心之外的 C 末端尾巴^[2]。这里的 C 末端尾巴上常发生一些翻译后修饰如去酪氨酸化，多聚谷氨酸化等（见图 1）。此外，微管蛋白球形的核心部分也具有易被翻译后修饰的位点，如第 40 位上的赖氨酸易被乙酰化，第 172 位上的丝氨酸易被磷酸化等。^[1]微管在细胞的正常生理活动中扮演着至关重要的角色，在维持细胞的正常形态和物质在细胞中的运输中也是不可或缺的一份子。在细胞分裂，神经元发育等生理活动进行的过程之中，许多蛋白质会结合到微管上发挥功能。而不同位置和形式的翻译后修饰又是影响微管蛋白的稳定性和与其他蛋白结合能力的重要因素。因此，这些翻译后修饰会通过影响微管蛋白的某些性质，进而对细胞的生理活动造成影响。例如， α -微管蛋白上第 40 位的赖氨酸如果被乙酰化修饰，微管上结合的动力蛋白的移动速度则会受到影响，这就影响到了胞内物质运输的过程^[3]。由此可见，翻译后修饰的形式和水平的不同会导致微管出现了功能上的分化，而这些翻译后修饰具体的发生机制以及在细胞生理功能上的意义仍需要进一步研究。因此，这些翻译后修饰被人们称为有待破译的“微管密码”^[1]。目前已知异常的微管蛋白的翻译后修饰水平与癌症、神经退行性疾病以及心脏病等多种重要疾病相关。破解微管密码的努力早在 50 年前便已开始（见图 2），微管蛋白乙酰化、多聚谷氨酸化的生成与消除机制已被探明。但至今仍有许多种类的翻译后修饰如去酪氨酸化，磷酸化等，它们的发生和消除机制并未被完全探明^[1]。

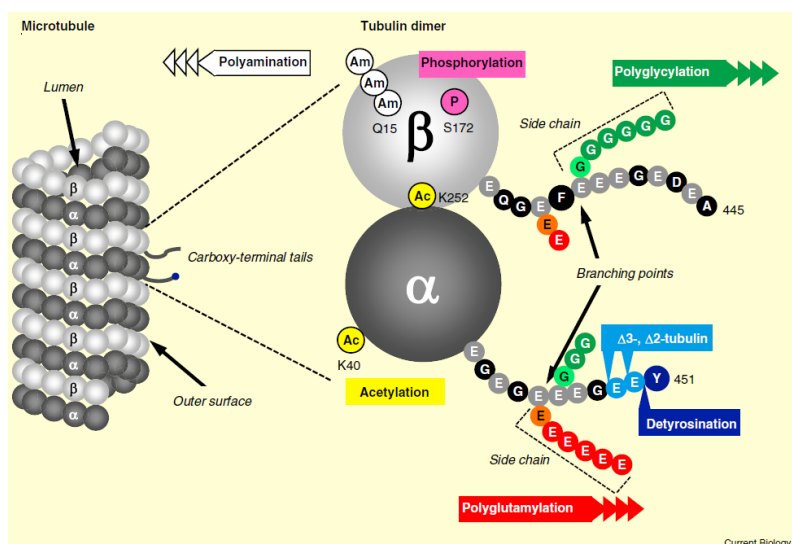


图 1. 微管蛋白的翻译后修饰总览

Figure 1. An overview of the post-translational modifications of tubulin

α 和 β 微管蛋白的 C 末端尾巴和球形中心上都可以发生翻译后修饰，其中 α -微管蛋白上主要发生乙酰化、多聚谷氨酸化和去酪氨酸化等修饰； β -微管蛋白上主要发生磷酸化、多聚酰胺化、多聚甘氨酸化等修饰(M.M.Magiera and C.Janke, 2013)

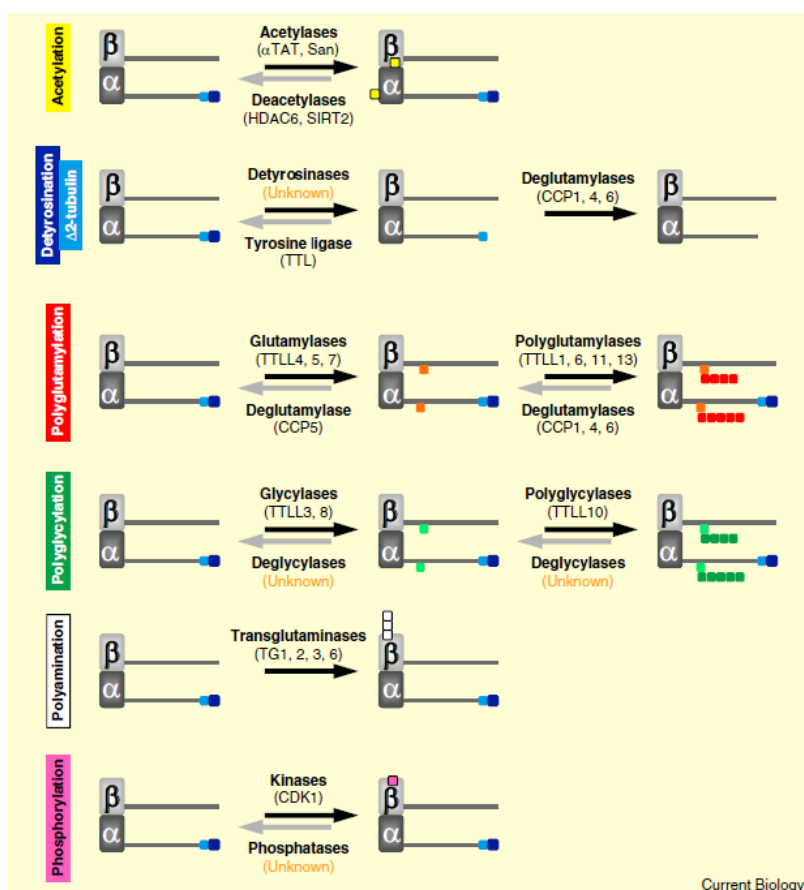


图 2. “微管密码”的破译进程

Figure 2. Deciphering “Tubulin Codes”

部分调控微管蛋白翻译后修饰的酶已经被鉴定到，如微管酪氨酸连接酶、磷酸激酶、谷氨酸化酶、多聚谷氨酸化酶、去谷氨酸化酶、乙酰化和去乙酰化酶等。但仍有未被鉴定到的酶如微管去甘氨酸化酶和磷酸酯酶等(M.M.Magiera and C.Janke, 2013)

1.2 微管蛋白去酪氨酸化的研究历程及生物学意义

作为“微管密码”需要破译的一部分，对于微管蛋白去酪氨酸化的研究始于1970年代^[4]。1973年， α -微管蛋白C末端的酶促酪氨酸化过程被发现，这个过程是不依赖于tRNA的，也就是说 α -微管蛋白的C末端可以纯粹依靠酶的催化连上一个酪氨酸残基。1977年， α -微管蛋白的C末端去酪氨酸化被发现^[2]。（见图3）1970年代末期，基因测序技术兴起， α -微管蛋白的基因测序结果表明这个C末端的酪氨酸是由基因编码的^{[1][2]}，因此，最初的翻译后修饰应该是去酪氨酸化。能催化微管蛋白C末端连接上酪氨酸残基的酶（Tubulin Tyrosine Ligase）在上个世纪率先被发现，而具有微管蛋白去酪氨酸化活性的蛋白Vasohibin直到2017年才被发现^{[5][6]}。

微管蛋白的去酪氨酸化是细胞有丝分裂、胞内物质转运、神经元生理活动与信号转导，肌力传导等生命活动的重要调控信号^[2]。微管蛋白在被翻译出来之时，是带有C末端的酪氨酸的，但是微管蛋白在上述生理功能中发挥作用时，其上的C末端酪氨酸是被切除的。研究表明，微管蛋白处于去酪氨酸化的状态时，其稳定性较高^{[1][3]}。在神经元等一些微管寿命较长的细胞中，以去酪氨酸化形式存在的微管蛋白是占主要地位的（见图4）^{[2][5]}。在心肌纤维中，降低微管蛋白去酪氨酸化水平会使得其收缩能力下降（见图5）^[2]。在神经元发育的进程中，微管蛋白的去酪氨酸化水平如果异常降低，其轴突的发育会表现出异常，具体表现是较正常神经元短且多分支（见图6）^[2]此外，异常的去酪氨酸化水平还会导致神经元功能紊乱，心肌炎，细胞形态异常以及肿瘤细胞的聚集^{[1][6]}。因此，探究能够调控去酪氨酸化微管蛋白的含量的方式，探明影响组织细胞内微管蛋白去酪氨酸化水平的因素，找出其他能够催化该化学反应的酶，阐明微管蛋白去酪氨酸化与微管稳定性的关系，并进一步研究该翻译后修饰的功能以及与疾病的联系是当前对细胞骨架的研究中的一些重要任务。

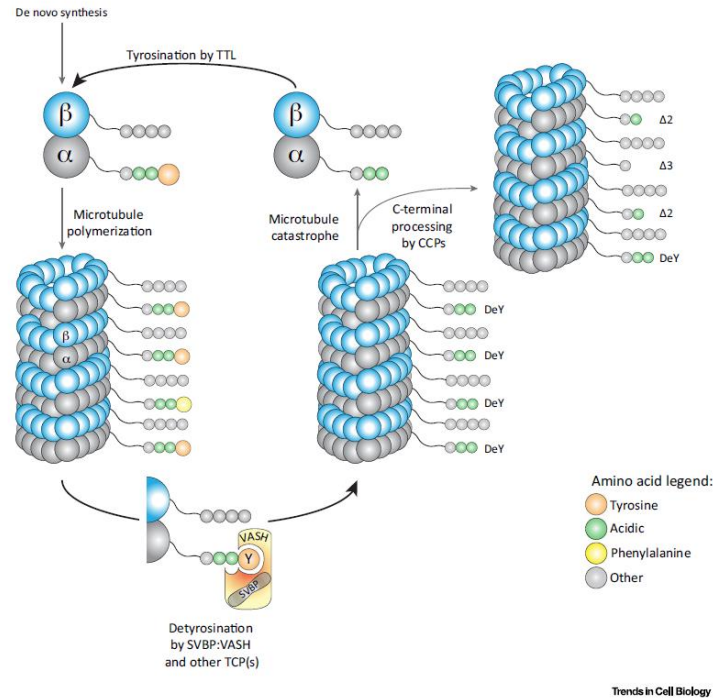


图 3. α -微管蛋白 C 末端去酪氨酸化/酪氨酸化过程示意图

Figure 3. The de-tyrosination cycle of α -tubulin

α -微管蛋白的去酪氨酸化过程是可逆的。 α -微管蛋白的基因编码了其 C 末端的酪氨酸，但此后会被去酪氨酸化酶切除；在生理条件需要的情况下，去酪氨酸化的 α -微管蛋白又会被微管酪氨酸连接酶连回尾端的酪氨酸(J.Nieuwenhuis and T.R. Brummelkamp, 2019)

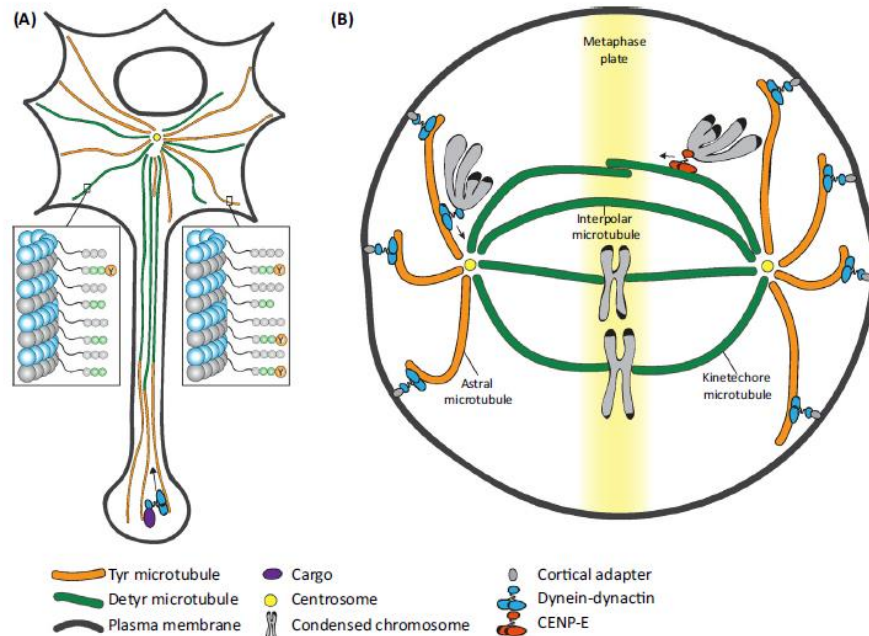


图 4. 去酪氨酸化的微管蛋白在维持正常神经元的功能以及细胞有丝分裂中发挥作用

Figure 4. Roles of de-tyrosinated tubulin in neuron and during mitosis

在神经元中，去酪氨酸化的微管蛋白（图中绿色部分）是占主要地位的；在细胞有丝分裂形成纺锤体的过程中，去酪氨酸化的微管蛋白也不可或缺(J.Nieuwenhuis and T.R. Brummelkamp, 2019)

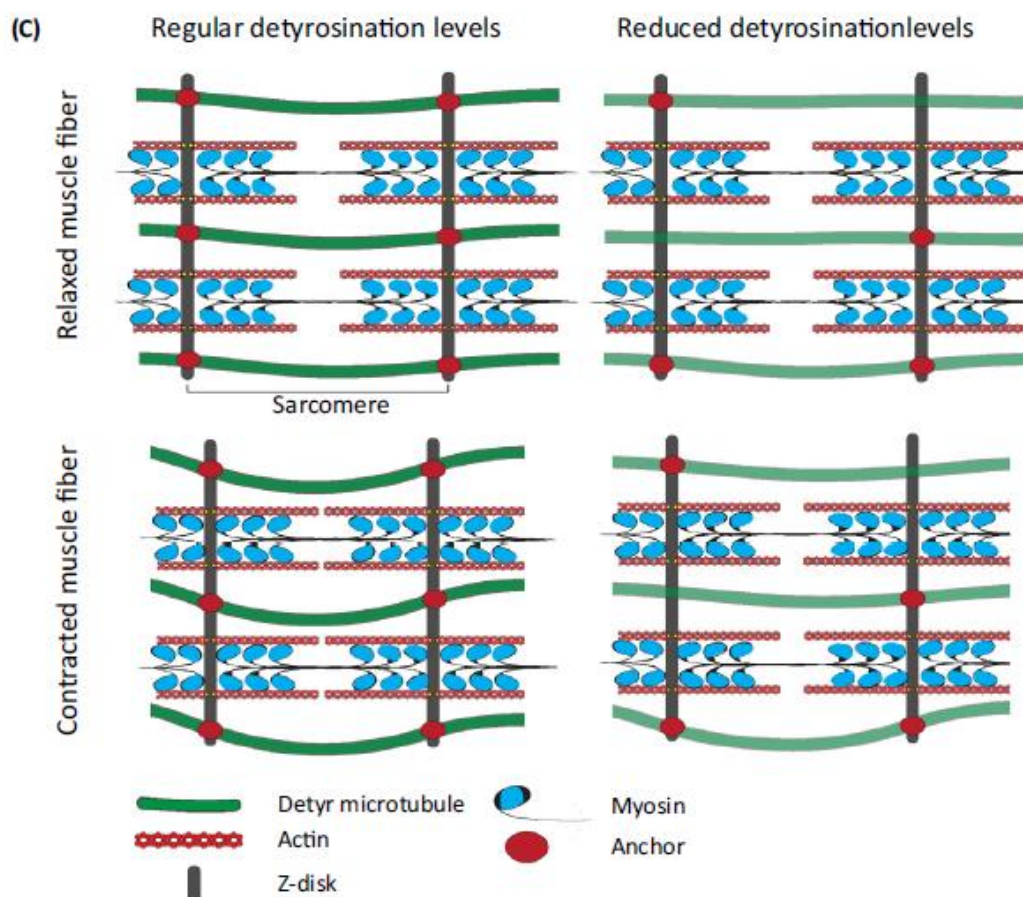


图 5. 去酪氨酸化的微管蛋白的水平下降会降低心肌纤维的收缩能力

Figure 5. Reduced tubulin detyrosination level hinders the contraction of cardiac muscle

如果去酪氨酸化的微管蛋白（图中绿色部分）水平下降，心肌收缩能力也会随之下降 (J.Nieuwenhuis and T.R. Brummelkamp, 2019)

2017 年，研究人员发现 Vasohibin 能够特异性切除 α -微管蛋白 C 末端的酪氨酸，即具有微管蛋白去酪氨酸化酶的活性。这填补了去酪氨酸化这一翻译后修饰的产生机制的空白^{[5][6]}，但是细胞实验显示，在 Vasohibin 缺陷型细胞株中，去酪氨酸化的微管蛋白量下降了但并未消失（见图 7）^[6]，这就表明细胞中还有其他能够完成这一翻译后修饰的方式，还存在其他蛋白具有微管蛋白去酪氨酸化酶的活性。因此，寻找其他具有此种活性的蛋白仍是破解微管密码工程中的一项迷人的探索性工作。

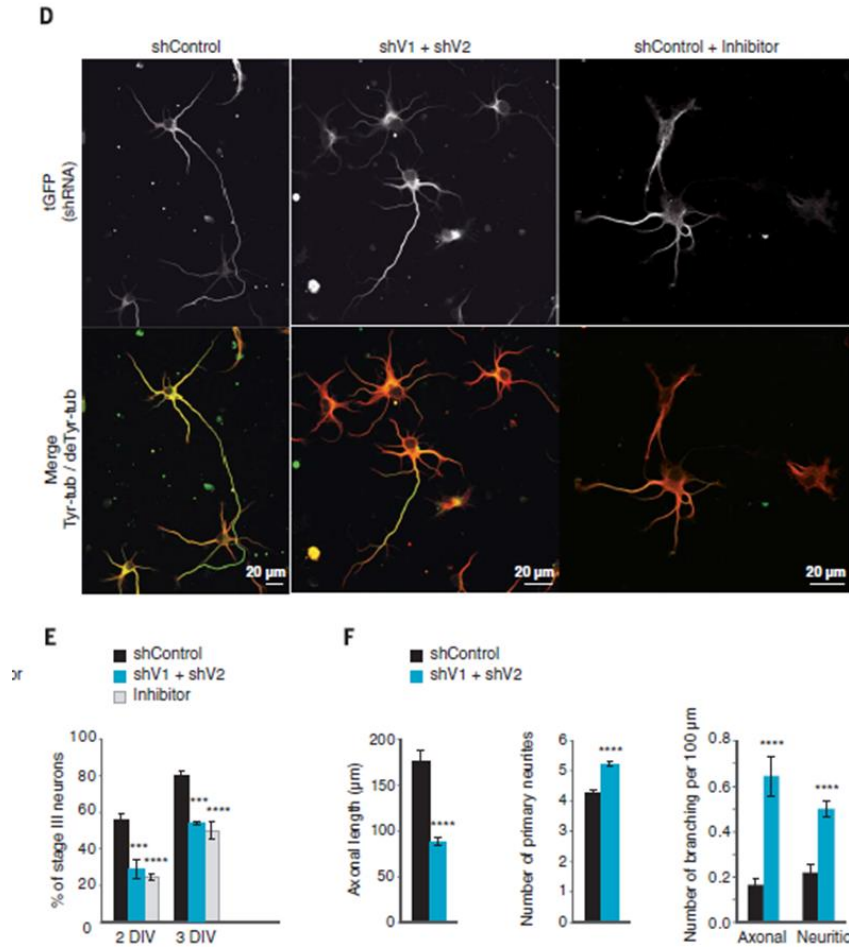


图 6. 微管蛋白去酪氨酸化修饰对神经元发育及结构的影响

Figure 6. Tubulin detyrosination level affects neuronal structure and development

去酪氨酸化的微管蛋白水平下降会导致神经元轴突发育异常，相较于正常神经元（上图 D 左），异常神经元（上图 D 中、右）的轴突短且易分支(Aillaud et al., 2017)

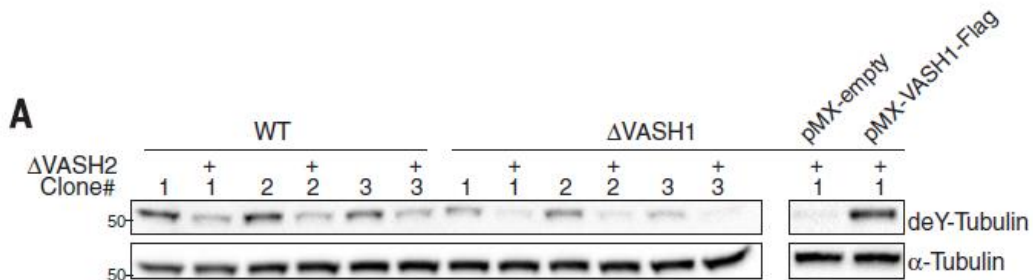


图 7. Vasohibin 不是唯一的微管蛋白去酪氨酸化酶

Figure 7. Vasohibin is not the only tubulin detyrosination enzyme

当 Vasohibin 缺失时，HEK293T 细胞内仍存在一定量的去酪氨酸化微管蛋白，但量显著少于野生型细胞，在 Vasohibin 缺失细胞系中回补 Vasohibin 的表达，可以看到去酪氨酸化微管蛋白量的回升。因此 Vasohibin 应不是唯一的去微管蛋白酪氨酸化酶(J.Nieuwenhuis and T.R. Brummelkamp, 2019)

1.3 组蛋白去乙酰化酶 HDAC6 和 Sirtuin2

组蛋白去乙酰化酶（HDACs），是一类在染色质重塑和基因表达调控中发挥

重要作用的蛋白^[7]。该蛋白家族成员大多位于细胞核中，而某些部分在细胞质中也存在，如 HDAC6 和 Sirtuin2（Sirtuin 简称为 Sirt），它们能对细胞质中的某些功能性蛋白进行去乙酰化修饰，进而调控这些蛋白的结构和功能，以及它们参与的通路。不同类型的细胞中，组蛋白去乙酰化酶在细胞核和细胞质中的分布情况也有一定的差异^[8]。HDAC6 和 Sirt2 能够互作^[9]，且参与许多信号通路的调控，如 ERK/CREB 通路^[10]。HDAC6 和 Sirt2 也是能够结合在微管上的蛋白，它们能够对 α -微管蛋白第 40 位赖氨酸进行去乙酰化，是两个调节微管翻译后修饰水平的重要蛋白质，能对微管蛋白的生理功能产生重要影响^{[3][11]}。HDAC6 和 Sirt2 催化活性部位的结构与经典的多肽外切酶----羧肽酶 A (CpA, Carboxypeptidase-A) 类似，都需要小辅助因子^{[11][12]}，以及催化反应的机理都是需要切去一个酰胺键（肽键）（见图 8）^[11]，表明 HDAC6/Sirt2 可能有外切多肽的能力。在我们的合作实验室（复旦大学生命科学学院赵世民教授实验室）中，发现了与 Sirt2 同家族的蛋白----Sirt1 可以对 ATK 蛋白的侧链进行去酪氨酸化（该数据暂未发表），而 Sirt2 与 Sirt1 又有许多结构上的相似性，因此 Sirt2 也有可能具有酪氨酸的外切酶活性。因此，HDAC6 和 Sirt2 有可能拥有外切多肽的能力，作为微管蛋白去酪氨酸化酶直接参与到微管蛋白去酪氨酸化的调控过程之中。另外，已知 HDAC6 和 Sirt2 能够结合微管蛋白，因而也存在它们能通过调控微管的稳定性和功能进而间接地影响去酪氨酸化过程的可能性。

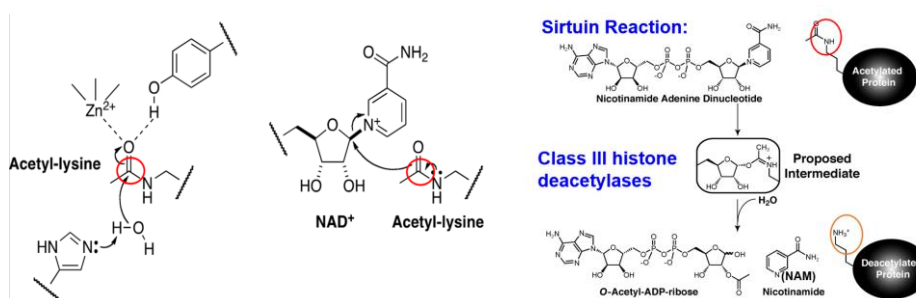


图 8. HDAC6 和 Sirt2 催化去乙酰化反应的机理

Figure 8. Mechanisms of deacetylation reaction catalyzed by HDAC6 and Sirt2

HDAC6 和 Sirt2 催化去乙酰化反应的机理是切开酰胺键，因此，它们可能具有广谱的去乙酰化能力

1.4 本研究的意义

乙酰化、多聚谷氨酸化、磷酸化、去酪氨酸化等多种微管蛋白翻译后修饰与微管功能的分化、细胞骨架结构的稳定、细胞正常形态和功能的维持紧密相关。如果这些修饰的水平出现异常，则可能导致癌症、神经退行性疾病和心脏病等威

胁人类健康的严重疾病。人们正行走在“破译微管密码”的漫长道路上，意图探明这些翻译后修饰的发生和调控机制，以得到预防和治疗上述疾病的思路。在这些微管蛋白的翻译后修饰之中，去酪氨酸化又是一种相对重要的修饰，去酪氨酸化修饰水平的异常能够带来神经元功能紊乱、心肌炎以及肿瘤细胞聚集等危害。人类对微管蛋白去酪氨酸化的发生和调控机制知之甚少，目前，仅有一种微管蛋白去酪氨酸化酶 Vasohibin 被鉴定到，而在 Vasohibin 缺失的细胞系中，去酪氨酸化的微管蛋白依然存在，这就表明细胞中仍有其他的微管蛋白去酪氨酸化酶。因此，寻找更多的微管蛋白去酪氨酸化酶，对微管蛋白去酪氨酸化修饰的调控方式进行深入研究十分具有价值，这项研究不仅能够丰富人们对于细胞骨架结构和功能的认知，还能对上述疾病的治疗和预防提出新策略。

组蛋白去乙酰化酶 HDAC6 和 Sirt2 是两个定位在细胞质中的去乙酰化酶，它们已被证实能与微管蛋白结合。且从催化机理上看，它们可能具有广谱的去酰基化能力（切割酰胺键/肽键的能力），是潜在的微管蛋白去酪氨酸化酶的候选者。此外，HDAC6 和 Sirt2 参与了细胞内许多信号通路的调控，也存在间接调控微管蛋白去酪氨酸化的可能性。因此，HDAC6 和 Sirt2 与微管蛋白去酪氨酸过程之间的关系值得深入调查。

本课题拟探究 HDAC6 和 Sirt2 是否参与了 α -微管蛋白去酪氨酸化的调控，拟研究 HDAC6 和 Sirt2 是否在体外直接具有微管蛋白去酪氨酸化的活性，并在细胞内和小鼠组织中拟探索 HDAC6 和 Sirt2 是否能对微管蛋白的去酪氨酸化过程造成影响。这些工作能够成为微管密码破译工程的一部分，加深人类对于细胞骨架和组蛋白去乙酰化酶家族蛋白的了解。若能探明微管蛋白去酪氨酸化的调控机制以及去酪氨酸化水平异常的原因，则能够对神经元功能紊乱，心肌炎等疾病提出可能的应对策略。

二、材料与方法

2.1 材料

2.1.1 细胞与实验动物

(a) 细胞: HEK293T (本实验室保藏)、MRC-5 (购于中国科学院-上海细胞库)

(b) 动物: 野生型及 $Sirt2^{-/-}$ 的小鼠

2.1.2 载体与宿主菌

(a) 重组表达载体:

pcDNA3.1-Flag-HDAC6、pRK7-Sirt2-Flag、pET28a-sumo-his-Sirt2

(b) 宿主菌: Trans® 的 BL21 和 DH5 α 大肠杆菌菌株

2.2 仪器与设备

表 1. 本课题用到的仪器与设备

Table 1. Instruments and equipments

仪器/设备	型号	生产商
超低温冰箱	Forma 905	Thermo Fisher
低温冰箱	DW-25L262	海尔医疗科研
4°C大冰箱	PLR1006	Thermo Fisher
海尔冰箱	BCD-225SFM	青岛海尔
海尔冰柜	BCD-190TMPK	青岛海尔
标准 pH 计	PB-10	Sartorius
蛋白纯化仪	AKTA Prime Plus	General Electric (GE)
蛋白电泳系统 (电泳仪/ 支架/槽)	Powerpack basic power supply	Bio-Rad
恒温干燥仪	DHG-9141A	上海精宏
恒温培养箱	DHP-9082	上海一恒
旋转型摇床	QB-206	海门其林贝尔
二氧化碳培养箱	HERA Cell 150i	Thermo Fisher
恒温水浴槽	DK-8D	上海精宏
分光光度计	2000c	Thermo Fisher
多功能台式离心机	Heraeus Multifuge X1R	Thermo Fisher

高压蒸汽灭菌锅	GR85DA	美国致微
恒温金属浴槽	GL-150B	海门其林贝尔
震荡培养箱	ZQZY-70B	上海知楚
生物安全柜	1386	Thermo Fisher
分析天平	Quintix313-1-cn	Sartorius
分析天平	Quintix124-1-cn	Sartorius
普通摇床	TS-200	海门其林贝尔
微孔板分光光度计	EPOCH2C	Biotek Instruments, Inc
小型台式离心机	Pico 17	Thermo Fisher
小型台式离心机	Fresco 17	Thermo Fisher
小型蠕动泵	BQ50-1J	上海熠辉
小型电泳仪	MINI-P4	Bio-Rad
液氮罐	CY50985	Thermo Fisher
制冰机	Xb70	宁波格兰特
PCR 仪	T100 Thermo Cycler	Bio-Rad
PCR 仪	S1000 Thermo Cycler	Bio-Rad
移液枪	L 系列	RAININ
电动移液器	118700	Thermo Fisher
电脑	Vostro 商用型	DELL
微波炉	MM721NH1-PW	美的集团
微型台式真空泵	QL-802A	海门其林贝尔
涡旋震荡仪	QL-866	海门其林贝尔
小型低速离心机	LX-300Mini-Centrifuging	海门其林贝尔
超净工作台	SW-CJ-1FD	AIRTECH 苏净安泰
化学发光图像分析系统	3300-Mini	Clinx 上海勤翔
凝胶成像分析仪	GenoSens 1860	Clinx 上海勤翔
磁力搅拌器	QL-3280A	海门其林贝尔
电子天平	YH-A-1002	瑞安英衡
震动型组织研磨棒		TIANGEN

2.3 试剂

2.3.1 商业试剂

表 2. 本课题用到的商业试剂/培养基列表
Table 2. Commercial reagents and culture media

实验试剂	生产商
高糖 DMEM 细胞培养基	HyClone
血清（FBS）	BI
pEI 转染试剂	Amershanm Bioscience
所有分析纯化学试剂（乙醇，甲醇等）	国药试剂
Lipofectamine 2000 脂质体转染试剂	Invitrogen
限制性内切酶	NEB
DNA 连接酶	NEB
PCR 试剂盒	NEB
同源重组连接试剂盒	翊圣
质粒小抽试剂盒	TIANGEN
质粒中抽试剂盒	MACHEREY-NAGEL（MN）
组织裂解液	TIANGEN
Protein Marker 26616	Thermo Fisher
DNA Ladder	TIANGEN
Coomassie Brilliant Blue G-250	西安德立生化
Bovine Serum Albumin（BSA）	BBI Life Science
Tween-20	生工生物工程
IPTG（异丙基硫代- β -D-半乳糖苷）	生工生物工程
抗生素（链霉素、青霉素、氯霉素、卡那霉素）	生工生物工程
Tris	BBI Life Science
甘氨酸	BBI Life Science
N,N-亚甲基双丙基酰胺	Sigma
TEMED	Sigma

Anti-tubulin 抗体	碧云天生物技术
Anti-Detyr-tubulin 抗体	Cell Signaling
Anti-Sirt2 抗体	Abcam
Anti-Flag 抗体	Sigma
Anti-HA 抗体	Abcam
鼠源二抗	碧云天生物技术
兔源二抗	碧云天生物技术
胰酶	GIBCO

2.3.2 试剂和培养基的配制方法

(a) LB 培养基

表 3. LB 培养基配方
Table 3. Ingredients of LB medium

Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g
ddH ₂ O	定容至 1 L

根据上述配方配制培养基，溶质溶解后，高温湿热灭菌（121℃，20 min），后室温保存（根据需要，可在使用前添加对应抗生素）。若需要将其转为固体 LB 培养基，则在高温灭菌前按 2% 的比例添加琼脂，灭菌后冷却至 50℃ 左右加入对应抗生素，摇匀后倒平板，待其凝固后 4℃ 保存。

(b) PBS（磷酸缓冲液，10x）

表 4. PBS 配方
Table 4. Ingredients of PBS

NaCl	80 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14.4 g
ddH ₂ O	定容至 1 L

上述溶质溶解后，高温灭菌，后室温保存。使用前，用 ddH₂O 稀释到 1x，重新灭菌后即可使用。

(c) 聚乙烯亚胺 (Polyethylenimine, PEI, 1 mg/mL): 称取 0.01 g PEI 粉末, 80°C 加热溶解于 10 mL ddH₂O 中, 后冷却至室温, 调节 pH 至 7.0, 用 0.22 μm 的微膜过滤, 最后按 1 mL 的规格分配, 于-20°C长期保存。

(d) 抗生素配制

氨苄青霉素 (Ampicillin, 100 mg/mL, 1,000×): 称取 5 g 固体粉末, 加 ddH₂O 到 50 mL, 完全溶解混匀, 0.22 μm 微膜过滤, 按 1 mL 每管的规格分装, 于-20°C长期保存。

卡那霉素 (Kanamycin, 50 mg/mL, 1,000×): 称取固体粉末 2.5 g, 加 ddH₂O 到 50 mL, 完全溶解混匀, 0.22 μm 微膜过滤, 按 0.5 mL 每管的规格分装, 于-20°C长期保存。

(e) IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside, 48 mg/mL, 1,000×, 50 mL): 称取粉末 2.4 g, 加 ddH₂O 到 50 mL, 完全溶解混匀, 0.22 μm 微膜过滤, 按 0.5 mL 每管的规格分装, 于-20°C长期保存。

(f) DNA 电泳缓冲液(50×, 1 L): 称取 Tris 240 g、EDTA 37 g 溶于 600 mL ddH₂O, 加冰醋酸 57 mL, 加 ddH₂O 到 1 L, 完全混匀后常温放置。

(g) NP-40 细胞裂解液 (500 mL, 1%) 配方: 称取 NaCl 8.766 g 和 Tris 3.029 g 到 400 mL ddH₂O 中溶解, 调 pH 到 7.5, 加 5 mL NP-40 溶解, 加 ddH₂O 到 500 mL, 完全溶解混匀后置于 4°C保存。

(h) 蛋白酶抑制剂 Cocktail 的储存和稀释方法

表 5. 蛋白酶抑制剂 Cocktail 的储存和稀释配方

Table 5. Ingredients of the cocktail of proteinase inhibitors and their storage temperature

名称	储存浓度	溶剂	使用时稀释倍数	保存温度
PMSF	100 mM	Ethanol	100x	-80°C
Leupeptin	1 mg/mL	H ₂ O	1000x	-80°C
Aprotinin	1 mg/mL	H ₂ O	1000x	-80°C
Pepstatin	1 mg/mL	Methanol	1000x	-80°C
Na ₃ VO ₄	1 M	H ₂ O	1000x	-20°C
NaF	1 M	H ₂ O	100x	4°C

将要裂解细胞时, 将上表所示蛋白酶裂解液按相应稀释比例加入上述 NP-40 细胞裂解液中, 制成含有这六种蛋白酶的抑制剂的裂解细胞用溶液后, 即可加入

培养皿中，对细胞进行裂解。

(i) SDS-PAGE 电泳缓冲液(5x) 配方：称取 Tris 30.2 g、甘氨酸 188 g、SDS 10 g，加 ddH₂O 定容至 2 L，混匀，常温保存。电泳时稀释 5 倍使用。

(j) 转膜缓冲液 (Transfer membrane buffer, 5x) 配方：称取 Tris 45.5 g、甘氨酸 216.02 g，加 ddH₂O 定容至 2 L，混匀，常温保存。使用时取 200 mL 5×Transfer buffer，加 600 mL ddH₂O 和 200 mL 甲醇配成 1x Transfer Buffer，混匀后预冷至 4℃，转膜时即可使用。

(k) TBS (10x) 配方：称取 Tris 24.2 g、NaCl 80 g，加适量 ddH₂O 溶解混匀，调 pH 到 7.6 后，加 ddH₂O 到 1 L，混匀，保存在室温即可。

(l) TBST：取 100 mL 10×TBS，加入 900 mL ddH₂O 和 1 mL Tween-20，混匀后使用。

(m) 封闭液：以 TBST 为溶剂，配制 BSA 固体体积分数为 5% 的溶液。

(n) 抗体稀释液：先用 TBST 作溶剂，配制 2.5% 的 BSA 溶液，再按适当比例加入抗体混匀（通常在 1:1000-1:10000 之间）。

(o) Tris-HCl (1.5M, pH 8.8) 配方：称取 Tris 181.65 g 溶于适量 ddH₂O，调节 pH 至 8.8 后，再加 ddH₂O 到 1 L，混匀，保存在室温即可。

(p) Tris-HCl (1M, pH 6.8) 配方：称取 Tris 121.1 g 溶于适量 ddH₂O，调 pH 至 6.8 后，再加 ddH₂O 到 1 L，混匀，保存在室温即可。

(q) SDS (10%)：称取 SDS 20 g，加适量 ddH₂O 加热到 68℃ 溶解，调 pH 到 7.7 后，再加 ddH₂O 到 200 mL，混匀，保存在室温即可。

(r) 聚丙烯酰胺凝胶蛋白电泳（简称 SDS-PAGE）的分离胶和浓缩胶：

分离胶 (10%, 30 mL)：ddH₂O 11.9 mL、30% Acryl/Bis 10.0 mL、1.5 M Tris (pH 8.8) 7.5 mL、10% SDS 0.3 mL、10% APS 0.3 mL、TEMED 0.012 mL

浓缩胶 (5%, 10 mL)：ddH₂O 6.8 mL、30% Acryl/Bis 1.7 mL、1.0 M Tris (pH 6.8) 1.25 mL、10% SDS 0.1 mL、10% APS 0.1 mL、TEMED 0.01 mL

(s) 蛋白纯化用 Buffer A (镍柱亲和层析法) 配方：20 mM Tris-HCl、500 mM NaCl 与 25 mM Imidazole，溶剂为 ddH₂O，需调 pH 至 8.0，后使用 0.45 μm 滤膜抽滤，4℃ 保存。

(t) 蛋白纯化用 Buffer A (镍柱亲和层析法) 配方：20 mM Tris-HCl、500 mM NaCl

与 500 mM Imidazole, 溶剂为 ddH₂O, 需调 pH 至 8.0, 后使用 0.45 μM 滤膜过滤, 4°C 保存。

(u) Coomassie Brilliant Blue R-250 (0.1%) 配方: R-250 0.25 g、95%乙醇 45 mL、冰醋酸 10 mL, 加 ddH₂O 定容到 100 mL, 混匀后使用滤纸过滤。常温保存。

(v) 蛋白电泳凝胶染色液配方: 50 mL Coomassie Brilliant Blue R-250 (0.1%)、40 mL 甲醇、10 mL 冰醋酸, 混匀, 常温保存。可回收重复利用。

(w) 蛋白上样缓冲液 (Loading Buffer, 5x) 配方: 28 mL Tris-HCl (pH 6.8)、50 mL 甘油、20 mL β-巯基乙醇、10 g SDS、0.001~0.012 g 溴酚蓝, 混匀, 常温保存。若需要 1×上样缓冲液, 则再用 PBS 或 ddH₂O 稀释 5 倍即可。

(x) 去乙酰化酶反应体系缓冲液 (Deacetylation buffer) 配方: 50 mM Tris-HCl、4 mM MgCl₂, 0.2 mM DTT, 溶剂为 ddH₂O。需调 pH 至 9.0。4°C 存放。

2.4 实验方法

2.4.1 组蛋白去乙酰化酶 (HDAC6 和 Sirtuin2) 的获取

2.4.1.1 Sirtuin2 蛋白的获取

2.4.1.1.1 蛋白重组载体的获取

本实验室中保存有 Sirt2 (下称 Sirt2) 的重组载体 pET28a-sumo-his-Sirt2。

2.4.1.1.2 转化

(a) 从超低温中拿出适量 DH5α/BL21, 放于冰上约 3-5 min, 解冻。将解冻后的感受态细胞分装, 每管 30 μL。

(b) 向每管感受态细胞中加入 1 μL Sirt2 重组载体, 完全混合均匀, 在冰上安静放置, 不要惊扰转化中的细胞, 放置 20-30 min。

(c) 42°C 水浴热激 45 秒。

(d) 冰上静置 3-6 min。

(e) 在无菌操作台中, 向管中加 500-1000 μL LB 液体培养基 (未添加抗生素), 于 37°C, 220 rpm 摇床中放置 45 min。

(f) 摇床中复苏后, 5000 rpm, 常温离心 2 min, 除去绝大多数上清, 只留下约 100-200 μL, 将沉淀与剩余液体吹打混合均匀, 用于涂平板。

(g) 在无菌操作台中, 取涂布棒, 灼烧, 冷却, 将混匀的菌液涂到对具有对应抗性的 LB 平板上。

(h) 将接种好菌液的固体培养基平板倒放置于 37°C 恒温箱中，培养 16 h。

2.4.1.1.3 Sirtuin2 蛋白表达的小量诱导鉴定

(a) 取出 2.4.1.1.2 中培养好的平板（平板上清晰可见单菌落）。向摇菌管中加入 3-4 mL LB 液体培养基（含相应抗性）后，用 tip 头轻轻蘸取平板上的单个分布的菌落，进入摇菌管中，37°C，220 rpm 培养 3 h。

(b) 取 1 mL 菌液当作不诱导的阴性组，向摇菌管内留下的菌液按 1:500 之比例注入 1 M IPTG 溶液，诱导大肠杆菌表达 Sirt2，放回摇床内培养 3 h。

(c) 取加入 IPTG 后的菌液 1 mL，和先前的没有诱导的菌液一起 12000 rpm，常温离心 10 min，去除上清，加入 50 μ L 蛋白上样缓冲液（1x），95°C，加热 10 min，后 5000 rpm 离心 2 min。

(d) 取 5 μ L 上清进行 SDS-PAGE 电泳（180 V，60 min）

(e) 电泳后的凝胶用 Coomassie Brilliant Blue 染色，微波炉 100% 火力加热 90 s。

(f) 回收染色液，用水稍洗，除去残留染色液。用一张吸水纸盖在凝胶上，加入水没过凝胶和吸水纸，微波炉 80% 火力加热 12 min 脱色。

(g) 脱色完全后，可清除看见凝胶上的蛋白条带，对比未诱导和诱导后的样本可得出重组蛋白的表达情况。

2.4.1.1.4 Sirtuin2 蛋白的表达纯化

(a) 取出 2.4.1.1.2 中培养好的平板。向摇菌管中加入 5 mL LB 液体培养基（含相应抗性）后，用枪头挑取平板上的单菌落（单克隆）进入摇菌管中，37°C，220 rpm 培养 6 h。

(b) 将摇菌管里面的浑浊菌液全数转入 1 L LB 培养基（液体，含对应抗生素）中，37°C，220 rpm 培养至 OD 值达到 0.6-0.8（此过程通常需 3-4 小时）。

(c) OD 值达到 0.6 后，将震荡培养箱温度调至 16°C，让 1 L 菌液在箱内静置，温度降至 16°C 后，取出 1 mL 液，离心（作为没有诱导的阴性样品）。未诱导样品 12000 rpm，常温离心 10 min，去除上清，加入 50 μ L 蛋白上样缓冲液（1x），95°C 金属浴加热 10 min，保存待用。

(d) 对 1L 菌液注入 200 μ L，1 M IPTG 溶液，诱导大肠杆菌表达 Sirt2，16°C，220 rpm 摇 16-20 小时。

(e) 取出 1 mL 菌液离心（作为诱导后全菌样品）。全菌样品 12000 rpm 离心，

10 min, 去除上清, 加入 50 μ L 蛋白上样缓冲液 (1x), 95°C加热 10 min, 保存待用。

(f) 将 1 L 菌液转移到离心瓶中, 放入大离心机中, 4°C, 4000 rpm, 20 min, 除去上清。

(g) 向离心后的菌体沉淀加入 15-20 mL PBS 重悬菌体, 后于 4°C离心机中离心 15 min, 除去上清液。

(h) 向菌体沉淀中加入 6 倍沉淀体积的加入镍柱亲和层析法蛋白纯化 Buffer A, 重悬沉淀, 使用 10 mL 注射器针头过滤该重悬体系, 混匀后高压破菌。

(i) 破菌后, 把得到的液体放入大离心机, 4°C, 18000 rpm, 1 h, 吸出 40 μ L 上清, 加 10 μ L 蛋白上样缓冲液 (5x), 同时用枪头挑取少许菌体沉淀加入 50 μ L 蛋白上样缓冲液 (1x), 两个样本一起 95°C金属浴加热 10 min, 保存待用。

(j) 用 ddH₂O 清洗微型蠕动泵的管路, 清除气泡后, 在流动状态下将镍柱接入泵的管路中。此时用 Buffer A 润洗全管路, 平衡镍柱, 流动 5 个镍柱的体积的 Buffer A。

(k) 将破菌后离心的上清液接入蠕动泵中, 开始给镍柱上样。上样完成后, 用 Buffer A 润洗整个管路和镍柱。

(l) 将上样完成后的镍柱接入 ÄKTA prime plus 仪器, 按照该仪器的操作规范程序进行洗脱。

(m) 选取几管洗脱得到的样品, 取 40 μ L 样品, 加入 10 μ L 蛋白上样缓冲液 (5x), 95°C加热 10 min, 和先前的未诱导, 诱导, 完全菌体, 菌裂解上清和沉淀的样品一同做 SDS-PAGE 电泳检测 (180 V, 60 min)

(n) 按 2.4.1.1.3 中方法对凝胶进行染色, 脱色, 观察蛋白条带, 判断纯化效果。

(o) 若纯化效果较好, 选用合适大小, 滤膜的浓缩管, 对洗脱后得到的蛋白样品进行浓缩。

(p) 浓缩后测蛋白样品的浓度, 把蛋白分到不同的小离心管中保存, 在超低温液氮中迅速将其冷冻, 保存入 -80°C 冰箱。

2.4.1.1.5 酶活的测定

为了确证原核表达纯化的 Sirt2 能正常发挥其生物学功能, 需要测定其酶活。Sirt2 的经典功能是去乙酰化, 因此此处用其去乙酰化荧光底物 MAL 进行测定。

(a) 按照下表，在黑色 96 孔板中配制酶活检测的 50 μL 反应体系：

表 6. 酶活检测的 50 μL 反应体系

Table 6. Ingredients of the 50 μL enzyme activity testing system

组蛋白去乙酰化酶（Sirt2 等，浓度在 1mg/mL 以上）	1 μL
NAD ⁺ （原始浓度 200mM）	1 μL
MAL（去乙酰化荧光底物）	1 μL
Deacetylation Buffer	47 μL

(b) 配制好上述反应体系后，将 96 孔板放入酶标仪中，中速振板 30 s，使反应体系混合均匀。

(c) 放入 37°C 恒温箱中反应 2 h.

(d) 取 0.005 g 胰酶粉末，加入 1 mL ddH₂O 溶解，配制成溶液。取出 96 孔板，向有样本的孔里注入 50 μL 胰酶溶液，放进 37°C 恒温箱，反应 1 h。

(e) 使用酶标仪检测荧光强度（F360/F460），该数值大小能反映酶的活性高低。

2.4.1.2 HDAC6 的获取

从本实验室的合作伙伴处获取了用昆虫细胞纯化体系获得的 HDAC6，以及用大肠杆菌纯化体系获得的 Sirt7。均按 2.4.1.1.5 中所述方法确认了其酶活。

2.4.2 微管蛋白去酪氨酸化的体外检测

2.4.2.1 体外质谱检测

(a) 从吉尔生化处订购了一段序列为“EGEGEEEGEEY”的肽段，分子量为 1256，命名为 EY-11（和 α -微管蛋白的 C 末端相同），将 EY-11 溶解于去乙酰化酶反应体系缓冲液（Deacetylation buffer）中，使得 EY-11 的浓度为 10 mM。

(b) 按照酶 1 μL ，10 mM EY-11 1 μL ，200 mM NAD⁺ 1 μL ，Deacetylation Buffer 97 μL 的比例配制总量为 100 μL 的质谱检测体系，完全混合后，放进 37°C 恒温箱，反应 2 h。

(c) 将反应后的体系交由平台技术员进行 MALDI-TOF 质谱检测。本实验选取了 CpA（羧肽酶 A），Sirt2，Sirt7 以及 HDAC6 这四种酶以及一个阴性对照组共五个样品参与质谱检测。

(d) 依据质谱结果峰图分析肽段是否被去酪氨酸化。

2.4.3 微管蛋白去酪氨酸化的细胞水平检测

2.4.3.1 用于细胞转染的质粒准备

转染细胞所需的质粒浓度较高，故需要进行质粒中抽，获得浓度在 500-2000 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 范围中的质粒。

(a) 按 2.4.1.1.2 及 2.4.1.1.3 中所述方法，将所需质粒转化进入 DH5 α 菌株中，涂平板，挑取单菌落进行摇菌。在摇菌管中培养 16 h 左右后，转移进入 300 mL 培养基进行中摇，37°C 摇 16 h 左右。

(b) 将菌液转入 300 mL 离心瓶中，4000 rpm，4°C，20 min，去除上清液。

(c) 使用 MACHEREY-NAGEL (MN) 试剂盒，按照试剂盒的说明，中抽质粒。

(d) 将中抽后的质粒用 Nanodrop 测浓度，将浓度标记于管壁上，-20°C 保存待用。

2.4.3.2 HEK293T 细胞培养、转染和收集

细胞培养操作的器具均需灭菌（紫外照射）处理，手需要消毒处理，且均在细胞房、生物安全柜中进行。

2.4.3.2.1 复苏

(a) 配制培养基。向 HyClone DMEM 中按 10% 体积加入胎牛血清 (FBS)，链霉素 (0.1 mg/mL) 以及青霉素 (100 U/mL)，混匀。

(b) 从超低温中拿出细胞系，赶紧放进 37°C 水浴，开流水泵解冻。

(c) 解冻后，900 rpm，3 min 离心，去上清，注入 1 mL 培养基，重悬。

(d) 重悬后，注入皿。根据皿的尺寸再补充一些培养基，晃动数分钟使细胞均匀排布。

(e) 培养在 5% 二氧化碳箱中，温度 37°C，湿度 95%。

(f) 定时镜检观察，如果细胞长到了皿底的 90% 以上，即需要传代。

2.4.3.2.2 传代培养

(a) 用真空泵接大枪头，除尽泛黄的培养基。

(b) 向培养皿中缓慢加入适量 PBS，洗濯，后除去。

(c) 加入 1 mL 胰酶，轻微转动使胰酶分散，37°C，消化 2 min。

(d) 镜检，看到细胞都脱离皿底，呈圆形后，注入 3 mL 培养基，终止胰酶反应。

(e) 重悬皿中细胞，混匀后注入 15 mL 离心管，900 rpm，3 min 离心。

(f) 弃上清，注入 X mL 培养基，缓慢重悬细胞，将悬液注入新的 X 个培养皿，每皿 1 mL。(X 一般为 2-4，视细胞量及皿的大小而定)

2.4.3.2.3 转染

(a) 细胞量达到长满皿底面积的 60-70%时，且形态正常时，则可转染。取用未加 FBS 的培养基 300 μ L，向其中加入 1.5-3 μ g (量视培养皿大小而定，需计算对应的体积) 需转染的质粒，并加入 4.5-9 μ L PEI 转染试剂 (1 μ g/ μ L)，轻柔涡旋震荡后，安静放置 15 min。

(b) 取静置好的转染体系，加入培养皿，轻柔摇晃培养皿混匀。

(c) 8 h 后，用真空泵除去培养基和转染体系，换入新的培养基 (含 FBS)

(d) 24-72 h 内可收集细胞 (待细胞长满皿底后收集)。

2.4.3.2.4 冻存

暂时完成细胞部分实验，或是要保留某种处理过的细胞株时，采用冻存法保存这些细胞。

(a) 取需要冻存的，长势正常，基本长满培养皿底的细胞，用真空泵轻轻除去培养基。

(b) 注入一些 PBS 洗濯细胞，后除去。

(c) 注入 0.5-1 mL 胰酶，混匀，37°C，1-2 min，镜检细胞是否圆形，悬浮。

(d) 补加 1 mL 培养基，停止反应，重悬。转入 15 mL 管中，900 rpm，离心 3 min，除去上清。

(e) 若要分 X 管冻存，则对沉淀补加 X mL 培养基，吹打，完全混合均匀。(X 一般为 2-3)

(f) 加入细胞悬液体积 1/10 的 DMSO，混匀。

(g) 将悬液分别注入 X 个冻存管中，1 mL/管。

(h) 把冻存管塞进冻存盒里面，放入 -80°C 冰箱，12-24 h 后将管从盒中取出，-80°C 保存或者液氮中保存。

2.4.3.2.5 收集裂解

(a) 取配好的 NP-40 lysis buffer X mL (X 为需要收集的皿数)，按前述比例加入抑制剂，配成实际使用的裂解体系。

- (b) 取出按实验需要处理好的，长满了培养皿的细胞，放于冰上。
- (c) 用真空泵弃去泛黄的培养基，加一些 PBS 洗濯细胞，弃去 PBS。
- (d) 向各皿中注入 1 mL 裂解体系，混合均匀，放入 4°C 旋转摇床中，缓慢旋转孵育 20-30 min。
- (e) 收集皿中液体，注入 1.5 mL 管中，4°C，12000 rpm，15 min 离心。
- (f) 收集离心后的上清，此上清液即所得的细胞裂解产物。

2.4.3.3 MRC-5 细胞培养、转染与收集

2.4.3.3.1 培养、冻存和收集裂解

MRC-5 细胞培养、冻存和收集裂解方法与 HEK293T 基本一致，参见 3.1 所述步骤。不同之处仅在于 MRC-5 所使用的 DMEM 需加入 20% 的 FBS，且 MRC-5 生长较 HEK293T 慢，通常 3 天才能传代，HEK293T 只需 1-2 天即可传代。

2.4.3.3.2 转染

MRC-5 细胞无法使用 PEI 转染，故换成 Lipofectamine 2000 脂质体和 Opti-MEM 来转染，操作步骤如下：

- (a) 将 2-4 μg 质粒和 6-12 μL Lipofectamine 2000 混入 600 μL Opti-MEM 中，混匀，室温静置 10 min。
- (b) 吸取上述体系加入可以用来转染的细胞里，温柔地混匀，放回箱里培养。
- (c) 8 h 后除去转染体系，换入新的培养基，继续培养。
- (d) 24-72 h 内可收集细胞（待细胞长满皿底后收集）。

2.4.3.4 微管蛋白去酪氨酸化的细胞裂解物检测

(a) 按照酶 1 μL ，100 mM DTT 1 μL ，200 mM NAD^+ 1 μL ，细胞裂解物 47 μL 的比例配制 50 μL 的细胞裂解物检测体系，完全混合均匀，37°C，反应 2 h。

(b) 注入 10 μL 蛋白上样缓冲液 (5x)，混匀，95°C 加热 10 min，5000 rpm，2 min 离心，免疫印迹 (Western Blot) 检测已经去酪氨酸化的 α -微管蛋白量，以 α -微管蛋白的总量为内参。

(c) 免疫印迹分为以下几个环节。

SDS-PAGE 电泳：先 80 V，待 Marker 分开后调为 135 V。

转膜：将蛋白样品从凝胶上转移到 NC 膜上，仍利用电泳仪完成，需在 4°C 环境下进行，电泳仪参数为 300 A 恒流，70 min。

封闭：用 5% BSA 旋转孵育 NC 膜 1 h，后裁剪 NC 膜，只保留需要检测的蛋白的部分。

特异性抗体孵育：将需检测的蛋白的特异性抗体加入 NC 膜中，在旋转摇床上孵育 2 h。回收抗体，用 TBST 洗濯，摇洗 5 min，3 次。

二抗孵育：将上述特异性抗体对应动物来源的二抗注入 NC 膜中，旋转孵育 2 h。回收抗体，用 TBST 洗濯，摇洗 5 min，3 次。

显影：配制显影液（Bio-Rad kit），用分析仪（Chemiluminescence），连接电脑进行显影操作，看 NC 膜上的蛋白条带，判断所检测的蛋白的量的变化。

2.4.3.5 细胞内过表达 HDAC6/Sirtuin2 后的微管蛋白去酪氨酸化水平检测

（a）取适宜转染的 HEK293T 细胞及 MRC-5 细胞，将 pcDNA3.1-Flag-HDAC6 和 pRK7-Sirt2-Flag 两种重组载体共转染进入细胞中，使得 HDAC6 和 Sirt2 在相应细胞中得以过表达。

（b）收集，裂解上述细胞，免疫印迹检测去酪氨酸化的微管蛋白量，以 α -微管蛋白的总量为内参。

2.4.4 微管蛋白去酪氨酸化的组织水平检测

（a）饲养野生型和 Sirt2^{-/-}的小鼠，取用年龄 6-8 周的小鼠做后续实验。

（b）剪取小鼠的尾部末端，放入 1.5 mL 离心管中，向其中加入 40 μ L HB Buffer（5x），2-3 μ L Proteinase K（72x），再加 ddH₂O 补到 200 μ L，配置成鼠尾裂解体系，放于 55°C 下裂解反应 8 h，95°C 金属浴加热 10 min 终止裂解反应，用该裂解产物作为模板，用三引物 PCR 的方法进行鉴定它们的基因型，用 2% 的琼脂糖凝胶，电泳跑胶检测 PCR 产物，筛选出基因型为野生型及 Sirt2^{-/-}的小鼠。

（c）选取基因型为野生型及 Sirt2^{-/-}的小鼠各两只，处死。取其右大腿的肌肉。每只小鼠剪取体积约 50 μ L 的肌肉。

（d）用主要成分为尿素的组织裂解液及电动研磨棒对小鼠大腿肌肉组织进行裂解。每 50 μ L 的组织加入 300 μ L 裂解液，用电动研磨棒研磨 3 min，得到组织悬液，混匀。

（e）取 50 μ L 组织悬液，注入 10 μ L 蛋白上样缓冲液（6x），混匀，95°C 金属浴加热 10 min，5000 rpm 离心 2 min，免疫印迹检测去酪氨酸化的微管蛋白量，以 α -微管蛋白的总量为内参。

三、研究结果

3.1 组蛋白去乙酰化酶（HDAC6 和 Sirtuin2）的获取

取用本实验室已经收藏着的重组表达载体 pET28a-His-Sumo-Sirt2, 将其转化进入大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3), 挑取转化成功的单克隆菌株并大量培养, 用 IPTG 诱导该菌株大量表达 His-Sumo-Sirt2, 后裂解细菌, 使用镍柱亲和层析蛋白纯化法得到了 Sirt2 (具体步骤见 2.4.1.1, 蛋白纯化效果的检测胶图见图 9)。

收到中科院合作实验室赠予的 HDAC6 (昆虫细胞表达) 和 Sirt7 (原核表达), 经荧光底物法酶活测试, 用于实验的 Sirt2 及 HDAC6 活性正常 (Sirt7 已在原实验室接受过酶活检测, 活性正常), 可以用于后续微管蛋白去酪氨酸化的检测实验 (见图 10、11)。由于体外检测体系简单, 耗时较短, 能够接受增加一个样本的检测, 本着充分发挥实验材料效用的原则, 下面也将原实验计划外的 Sirt7 加入体外的 α -微管蛋白去酪氨酸化检测实验中。

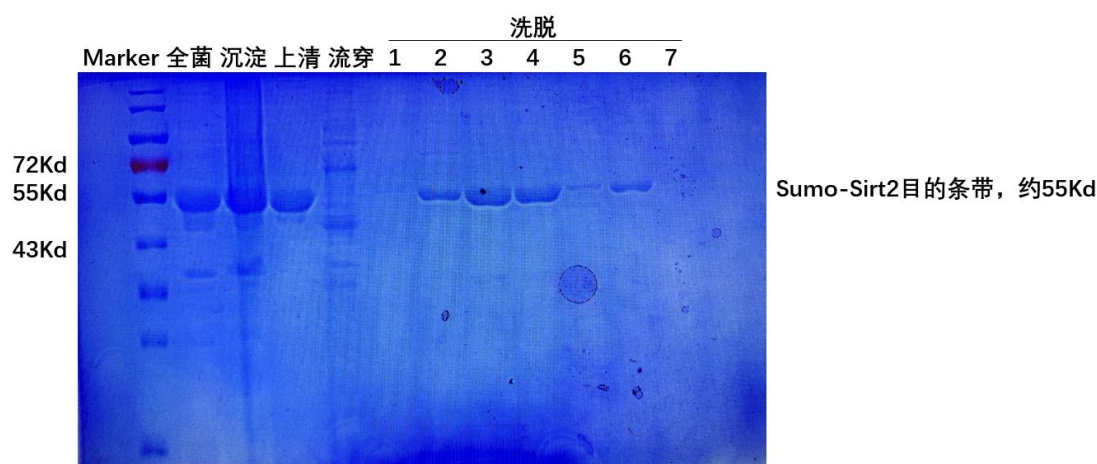


图 9. His-Sumo-Sirt2 纯化结果

Figure 9. Purification of His-Sumo-Sirt2

使用镍柱亲和层析法纯化带有 His-Sumo 标签的 Sirt2 蛋白 (大小约 55kD, 图中简称为 Sumo-Sirt2), 纯化过程中收集不同阶段的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳检测并用 Coomassie Brilliant Blue 对凝胶进行染色观察。本凝胶图像各泳道的蛋白样品从左至右分别是指示蛋白大小的 Marker、用于表达蛋白的大肠杆菌全菌体、裂解细菌后的沉淀、裂解细菌后的上清液、上样时流穿镍柱的液体、对镍柱进行洗脱后得到的第 1 至第 7 管蛋白样品。可见在全菌、沉淀和上清样本中均在 55kD 处观察到较强的条带, 表明蛋白在菌株内正常地大量表达, 且可在裂解细菌的上清液中收集到足量蛋白; 流穿液中 55kD 处未见较强的条带, 且有许多其他大小的条带, 表明大部分的 His-Sumo-Sirt2 与镍柱结合效果较好, 其他杂质蛋白未结合到镍柱上; 从洗脱样本中可见本次对 Sirt2 的纯化效果很好, 洗脱后的蛋白样品在胶图中难以看见杂带

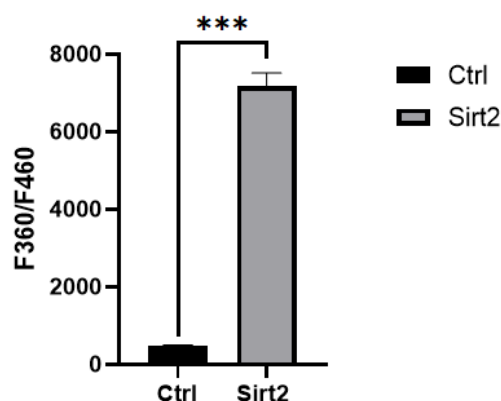


图 10. Sirt2 的去乙酰化酶活检测结果

Figure 10. Deacetylation enzyme activity of Sirt2

使用荧光底物检测去乙酰化酶的活性。底物未经去乙酰化时，其荧光基团处于猝灭状态，经去乙酰化后，底物能够发出荧光，此时使用酶标仪检测荧光的强度即可判断酶的活性。通常，若检测到的底物荧光强度相对值在 3000 以上，即可认为该去乙酰化酶活性正常。未加酶的对照组的强度通常在 800 以下。从图中可见 Sirt2 处理组的底物荧光强度相对值在 7000 以上，而对照组只有约 500，表明 Sirt2 活性正常，可用于后续实验

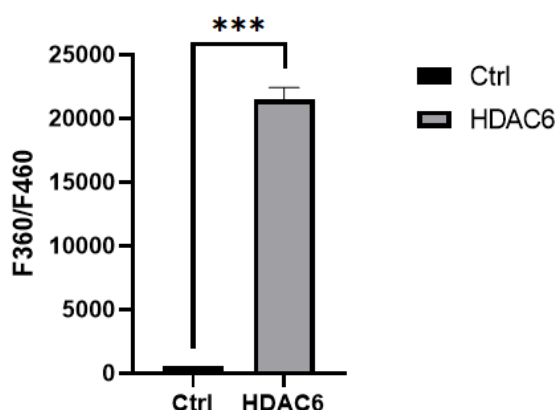


图 11. HDAC6 的去乙酰化酶活检测结果

Figure 11. Deacetylation enzyme activity of HDAC6

同样地，使用荧光底物法检测 HDAC6 的活性。从图中可见 HDAC6 处理组的底物荧光强度相对值在 20000 以上，而对照组只有约 500，表明 HDAC6 活性正常，可用于后续实验

3.2 对微管蛋白的去酪氨酸化水平进行检测

3.2.1 体外质谱检测

首先，我们从体外生化反应的角度，探究组蛋白去乙酰化酶是否具有微管蛋白去酪氨酸化酶的活性。本实验的目的在于检测所选定的 HDAC6, Sirt2, Sirt7 这三种酶是否在体外简单缓冲体系中，对于模仿 α -微管蛋白的 C 末端的肽段具有直接的酪氨酸外切酶的活性。通过质谱检测肽段的前后分子量是否变化（是否出现了相差一个酪氨酸残基的变化），我们能够判断所选酶是否具有预期功能。

采用 CpA (Carboxypeptidase-A, 是一种具有在体外直接切除肽段 C 末端氨基酸的能力的酶, 具有广谱性)作为阳性对照。质谱结果显示, 只有 CpA 拥有直接对于该肽段的外切酪氨酸能力。因此, CpA 在后续实验中也能作为很好的阳性对照。其他三种 HDACs 在此种条件下没有酪氨酸外切酶的活性 (见图 12)。

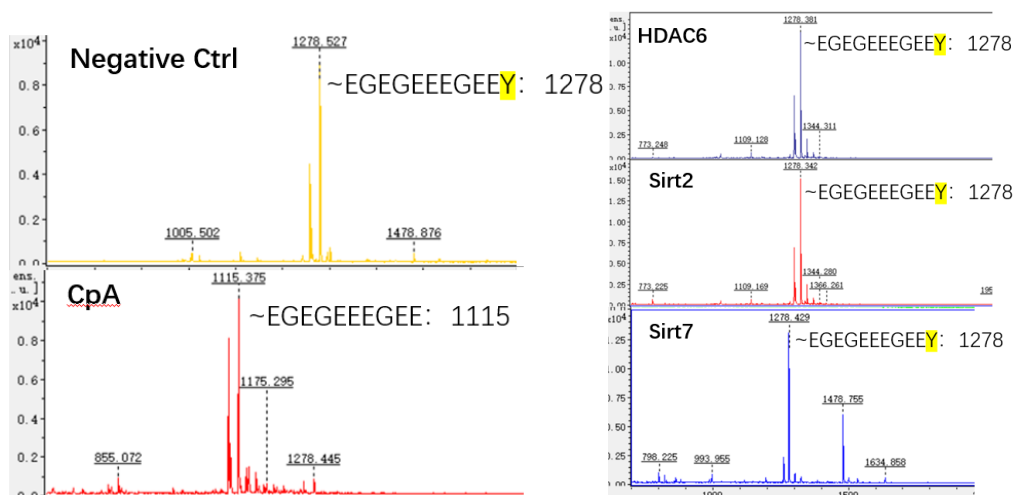


图 12. 模仿 α -微管蛋白 C 端的肽段, 在体外用不同的酶处理后的去酪氨酸化质谱检测结果
Figure 12. The de-tyrosination of a peptide mimicking the C-terminal of α -tubulin, treated by different enzymes and detected by MALDI-TOF mass spectrometry

由公司合成的, 序列为“EGEGEEEGEEY”, 测得分子量为 1278, 用于模拟 α -微管蛋白 C 末端的肽段被不同酶处理过后的 MALDI-TOF 质谱检测结果。如果样本中出现了分子量为 1115 的峰, 则说明肽段 C 末端的酪氨酸被切除了。可见除 CpA 处理的样本外, 其余样本都未出现分子量为 1115 的峰, 均只出现了分子量为 1278 的峰, 表明肽段 C 末端的酪氨酸并未被切除

3.2.2 体外细胞裂解物检测

为了确定 CpA 在细胞裂解物中也能直接切除 α -微管蛋白 C 末端的酪氨酸, 以继续作为阳性对照, 我们将 CpA 加入 HEK293T 细胞裂解物中, 37 度恒温箱中反应 2 小时, 后用免疫印迹 (Western Blot) 检测 α -微管蛋白的量, 得到图 13 所示的结果。可见经 CpA 处理后, 细胞裂解物中去酪氨酸化的 α -微管蛋白的量相比空白对照组显著增加, 且切除酪氨酸之效果在此种 CpA 浓度梯度设置下几乎不受 CpA 浓度影响, 说明 CpA 的外切酶活性很高, 仅需少量即可将体系中的许多 α -微管蛋白转为去酪氨酸化的状态。因此, CpA 处理在体外细胞裂解物的微管蛋白去酪氨酸化检测中也可以作为很好的阳性对照。

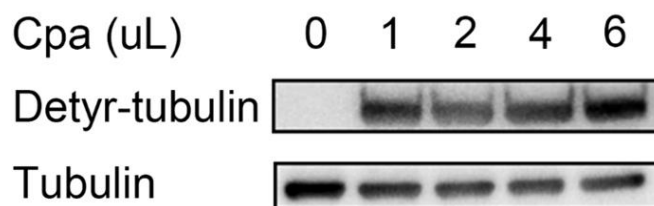


图 13. CpA 在细胞裂解物中高效切除 α -微管蛋白 C 末端的酪氨酸

Figure 13. CpA cut off the C-terminal tyrosine of α -tubulin efficiently in cell lysates

野生型 HEK293T 细胞裂解物用不同量的 CpA 处理后，进行免疫印迹检测去酪氨酸化微管蛋白的量，可见较少量的 CpA 即可使得去酪氨酸化微管蛋白的量显著上升

本实验的目的在于检测所选定的 HDAC6, Sirt2, Sirt7 这三种酶是否在体外较复杂的缓冲体系（细胞裂解物）中，对于 α -微管蛋白的 C 末端的酪氨酸具有直接的外切酶的活性。相比于体外简单体系，细胞裂解物中可能存在人类尚未鉴别到的组蛋白去乙酰化酶的辅助因子。将 HDAC6, Sirt2, Sirt7 三种酶及阳性对照 CpA 分别加入 HEK293T 细胞裂解物中，37 度恒温箱中反应 2 小时，后用免疫印迹检测 α -微管蛋白的量，得到图 14 所示的结果。可见只有用 CpA 处理，去酪氨酸化的 α -微管蛋白的量相比空白对照组会显著增加，用其他酶处理得到的去酪氨酸化的 α -微管蛋白的量相比空白对照组无明显变化，这表明，将 HDAC6, Sirt2, Sirt7 直接加入细胞裂解物是无法切除 α -微管蛋白的 C 端酪氨酸的。

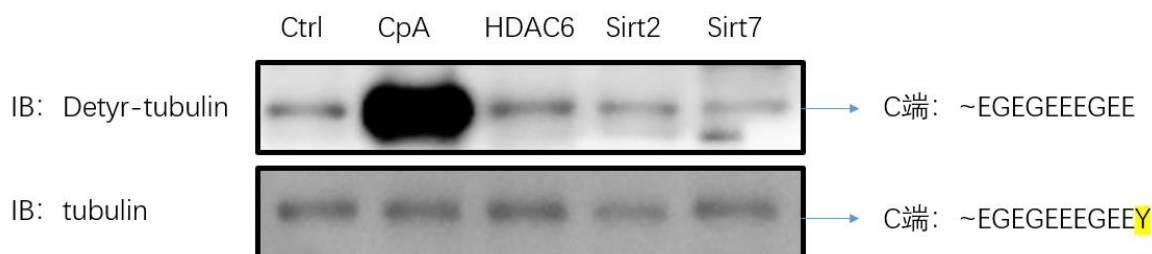


图 14. CpA, HDAC6, Sirt2, Sirt7 处理后的 HEK293T 细胞裂解物中 α -微管蛋白去酪氨酸化水平的免疫印迹检测结果

Figure 14. The α -tubulin dephosphorylation level of HEK293T cell lysates, treated with CpA, HDAC6, Sirt2 or Sirt7, detected by Western Blot

向野生型 HEK293T 细胞裂解物中加入 CpA, HDAC6, Sirt2, Sirt7 四种酶，37℃ 反应 2 小时，后免疫印迹检测裂解物中去酪氨酸化微管蛋白的量，可见只有 CpA 处理组的去酪氨酸化微管蛋白量显著上升。表明在这种条件下只有 CpA 能够切除 α -微管蛋白的 C 端酪氨酸，而 HDAC6, Sirt2, Sirt7 不能

3.2.3 细胞水平检测

细胞内的环境较之体外更为复杂，存在着许多蛋白质的互作以及信号通路。

HDAC6 和 Sirt2 在细胞内的含量变化可能会影响这两种蛋白与微管蛋白以及其他蛋白的互作，对与微管蛋白去酪氨酸化调控相关的通路产生影响。本实验的目的在于探索 HDAC6 和 Sirt2 在细胞内过表达（含量上调）后对去酪氨酸化的 α -微管蛋白的量的影响。

将 pcDNA3.1-Flag-HDAC6 转染进入 HEK293T 细胞中，让 HDAC6 在细胞中过表达，探究 HDAC6 的过表达对细胞中去酪氨酸化的 α -微管蛋白的量的影响。收集，裂解细胞后对去酪氨酸化的 α -微管蛋白的量进行免疫印迹的检测结果如图 15 所示。可见 HDAC6 过表达的细胞样本中，去酪氨酸化的 α -微管蛋白的量与对照组相比没有显著变化。表明 HDAC6 的过表达对 HEK293T 细胞中去酪氨酸化的 α -微管蛋白的量无显著影响。

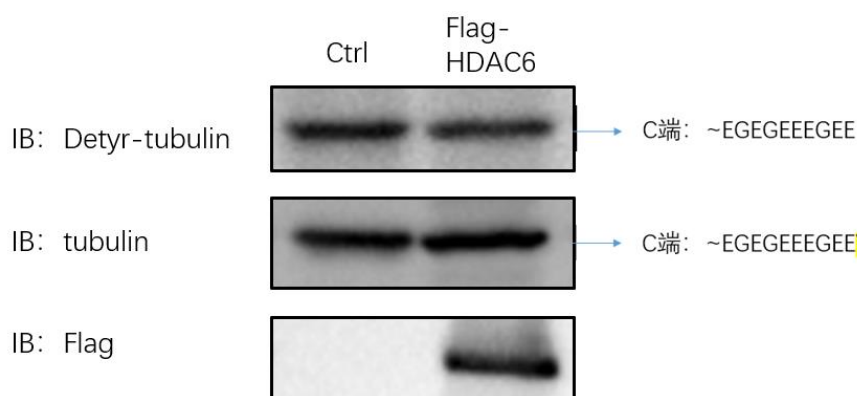


图 15. HDAC6 过表达的 HEK293T 细胞中 α -微管蛋白去酪氨酸化水平的免疫印迹检测结果
Figure 15. The α -tubulin deacetylation level in HEK293T cells overexpressing HDAC6, detected by Western Blot

向 HEK293T 细胞中转染 pcDNA3.1-Flag-HDAC6 重组载体，使得 HDAC6 在细胞中过量表达，后收集细胞，裂解，进行免疫印迹检测去酪氨酸化微管蛋白的量。可见 HDAC6 过表达的细胞中去酪氨酸化微管蛋白的量较之野生型没有明显差别

由于在表皮细胞（Epithelial Cell）和成纤维细胞系（Fibroblast）中，组蛋白去乙酰化酶的细胞定位存在一定差别^[8]，因此引入成纤维细胞 MRC-5 进行实验，探究在成纤维细胞系 MRC-5 中，HDAC6 与 Sirt2 是否与去酪氨酸化的微管蛋白量存在关联。且 HDAC6 和 Sirt2 是存在相互作用，可以互相结合的一对蛋白质，它们的结合可能也会影响到它们的功能^[9]，因此我们设计了将 HDAC6 和 Sirt2 共转染进入细胞的实验。

将 pcDNA3.1-Flag-HDAC6 以及 pRK7-Sirt2-Flag 分别或同时转染进入 HEK293T 及 MRC-5 细胞中，探究 HDAC6、Sirt2 的分别或同时过表达对细胞中

去酪氨酸化的 α -微管蛋白的量的影响，收集，裂解细胞并对去酪氨酸化的 α -微管蛋白的量进行免疫印迹的检测结果如图 16 所示。可见 HDAC6、Sirt2 分别或同时过表达的细胞样本中，去酪氨酸化的 α -微管蛋白的量与对照组相比没有显著变化。表明 HDAC6、Sirt2 的过表达对 HEK293T 及 MRC-5 细胞中去酪氨酸化的 α -微管蛋白的量无显著影响。

需要指出的是，图 16 所示的对 MRC-5 的共转染是失败的，HDAC6 和 Sirt2 的重组载体在本实验室所使用的转染方法下无法同时被转染到 MRC-5 细胞中，因此暂无法得知 HDAC6、Sirt2 的同时过表达对 MRC-5 细胞中去酪氨酸化的 α -微管蛋白的量的影响。

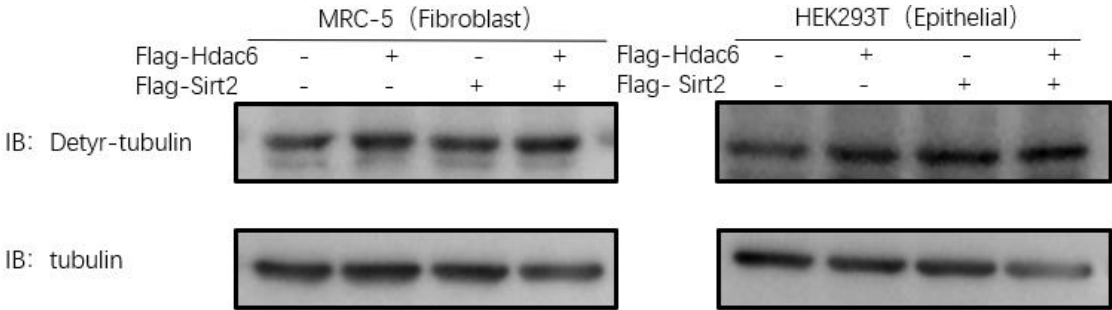


图 16. HDAC6、Sirt2 分别/同时过表达的 HEK293T 及 MRC-5 细胞中 α -微管蛋白去酪氨酸化水平的免疫印迹检测结果

Figure 16. The α -tubulin dephosphorylation level in MRC-5 and HEK293T cells with HDAC6 and/or Sirt2 overexpressing, detected by Western Blot

将 pcDNA3.1-Flag-HDAC6 以及 pRK7-Sirt2-Flag 分别或同时转染进入 HEK293T 及 MRC-5 细胞中，使得 HDAC6、Sirt2 在 HEK293T 及 MRC-5 细胞中分别或同时过表达。后收集细胞，裂解，进行免疫印迹检测去酪氨酸化微管蛋白的量。可见 HDAC6、Sirt2 分别或同时过表达的细胞中去酪氨酸化微管蛋白的量较之野生型没有明显差别

3.2.4 组织水平检测

在生理条件下，由于神经和体液调节的参与，微管蛋白去酪氨酸化很可能会受到更多因素如激素的调控。因此，探究生理条件下影响微管蛋白去酪氨酸化水平的因素是十分必要的。本实验室拥有一群基因型为野生型以及 Sirt2^{-/-}的小鼠，这便于我们在更高层次，更复杂的体内生理条件下探究 Sirt2 对体内去酪氨酸化的微管蛋白量的影响。我们设计了在小鼠组织中检测微管蛋白量的实验。我们剪取小鼠尾部，裂解后用三引物 PCR 法对小鼠的基因型进行鉴定，确定了所选鼠的基因型（见图 17）。此后，处死小鼠并解剖得到它们的大腿肌肉组织，裂解组织后进行免疫印迹检测不同基因型的小鼠大腿肌肉中去酪氨酸化 α -微管蛋白的

量，检测结果如图 18 所示。在有限的样本中，我们发现了性别差异。我们发现雌性小鼠组织中，Sirt2 的敲除使得其肌肉组织中去酪氨酸化 α -微管蛋白的量相对于野生型显著减少；但在雄性小鼠中，Sirt2 的敲除使得其肌肉组织中去酪氨酸化 α -微管蛋白的量相对于野生型显著增加。但由于样本量较小，我们还需要进一步确认这一差异是由性别导致的，仍存在小鼠之间随机的个体差异、小鼠的年龄不同导致此去酪氨酸化 α -微管蛋白的量变化的可能性。



图 17. Sirt2^{-/-}小鼠基因型鉴定

Figure 17. Genotyping of the Sirt2^{-/-} mice

剪取小鼠尾部，裂解，后用三引物 PCR 法鉴定小鼠的基因型，图中蓝色圈中的条带即为野生型的小鼠样本，红色圈中的条带即为基因型为 Sirt2^{-/-}的小鼠的样本

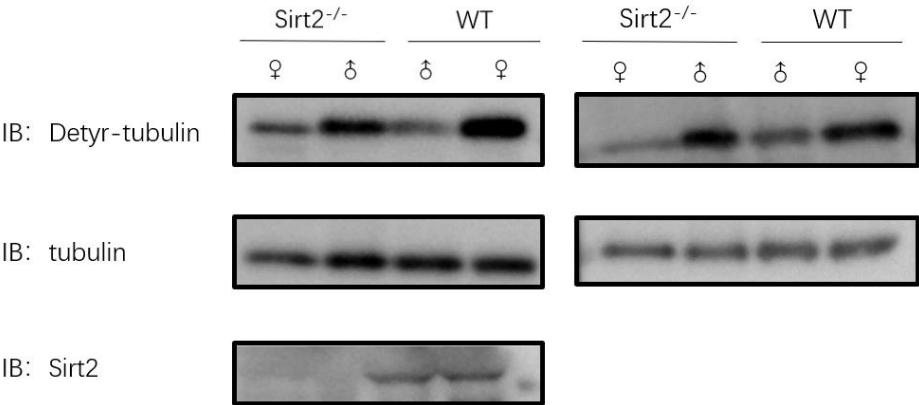


图 18. 小鼠大腿肌肉裂解物中 α -微管蛋白去酪氨酸化水平的免疫印迹检测结果

Figure 18. The α -tubulin dephosphorylation level of mouse thigh muscle lysates, detected by Western Blot

剪取小鼠大腿肌肉，裂解，进行免疫印迹检测该肌肉组织中微管蛋白去酪氨酸化的量。可见在雌性小鼠组织中，Sirt2 的敲除使得其肌肉组织中去酪氨酸化 α -微管蛋白的量相对于野生型显著减少；但在雄性小鼠中，Sirt2 的敲除使得其肌肉组织中去酪氨酸化 α -微管蛋白的量相对于野生型显著增加

四、讨论

4.1 本研究的实验结果总结与价值探讨

微管蛋白翻译后修饰的调控与细胞正常形态和功能的维持以及癌症、神经退行性疾病和心脏病等威胁人类健康的严重疾病息息相关。在乙酰化、多聚谷氨酸化、磷酸化等多种微管蛋白的翻译后修饰之中，去酪氨酸化修饰是一种相对重要而暂未被深入研究的修饰形式。人类目前对于这种修饰形式的发生和调控机制知之甚少，而去酪氨酸化修饰水平的异常又能够带来神经元功能紊乱、心肌炎以及肿瘤细胞聚集等危害。因此，寻找微管蛋白去酪氨酸化酶、对微管蛋白去酪氨酸化修饰的调控进行深入研究十分具有价值，这不仅能够丰富人们对于细胞骨架的认知，还能对相关疾病提出新的应对策略。

本研究从体外生化，细胞和组织三个水平上探讨了组蛋白去乙酰化酶 HDAC6 和 Sirt2 与 α -微管蛋白去酪氨酸化的关系。首先我们试图探明 HDAC6 和 Sirt2 是否直接具有对于 α -微管蛋白酪氨酸外切酶活性，在体外质谱检测和细胞裂解物检测中得到了否定的答案。进一步，我们研究在较为复杂的细胞内环境中，HDAC6 和 Sirt2 的过表达是否直接或间接地能够对去酪氨酸化 α -微管蛋白的量产生影响。这个想法的起源在于已知 Sirt2 和 HDAC6 能够结合微管，并能对微管蛋白第 40 位赖氨酸进行去乙酰化。而 HDAC6 与 Sirt2 在细胞内又常常组成复合体，以复合体的形式存在，而去乙酰化和去酪氨酸化在化学反应机理上又有一定相似性，因此我们假设 HDAC6 与 Sirt2 在细胞内过表达会对去酪氨酸化 α -微管蛋白的量产生影响。然而在细胞水平的实验结果表明，它们的过表达对去酪氨酸化 α -微管蛋白的量没有显著影响。此后，我们希望在更为复杂的组织水平中探究 Sirt2 的敲除对去酪氨酸化 α -微管蛋白的量的影响。我们初步发现了一定的性别差异。在雌性小鼠组织中，Sirt2 的敲除使得其肌肉组织中去酪氨酸化 α -微管蛋白的量相对于野生型显著减少；但在雄性小鼠中，Sirt2 的敲除使得其肌肉组织中去酪氨酸化 α -微管蛋白的量相对于野生型显著增加。但由于样本量较小，我们无法确认这一差异是由性别导致的，也有可能就是小鼠之间随机的个体差异导致的，也可能与小鼠的年龄有关。这一初步结论需要通过加大样本量进行重复实验来证实或者证伪。如果 Sirt2 影响去酪氨酸化 α -微管蛋白的量的性别差异被证实，则我们可以进一步设计实验，在细胞水平确认雌雄激素或其他性别因素对 α -

微管蛋白的去酪氨酸化是否有影响，并以此为起点探究性别差异的成因。如果性别差异通过了细胞水平上的验证，则可进一步使用质谱检测导致出现该结果的可能的分子机制(如某种激素是 Sirt2 发挥去酪氨酸化间接/直接作用的结合分子)。

4.2 未来寻找微管蛋白去酪氨酸化酶及调控因素的可能思路

人们对于 α -微管蛋白去酪氨酸化酶的寻找和深入探索仍在继续。目前已知唯一的微管蛋白去酪氨酸化酶 Vasohibin (SVBP-Vasohibin 复合物) 的结构已被成功解析，它可能的酪氨酸外切机理也被一并提出。2019 年 6 月，中、美共 4 家实验室在同一时间段内解析了微管蛋白去酪氨酸化酶 Vasohibin 及 SVBP-Vasohibin 复合物的结构，并提出了可能作用机制的假说。文献认为 Vasohibin 在催化中心具有非典型的半胱氨酸-组氨酸-丝氨酸的催化活性结构，这个结构能够使得酶和底物之间形成组氨酸-水分子-丝氨酸之间的氢键，利于离子配对，使底物更好的结合。Vasohibin 的 $\alpha 1$, $\alpha 2$ 两个 helix 的不够稳定，而且溶解性较差，小亚基 SVBP 的结合主要是起到稳定该结构的作用，而 $\alpha 1$, $\alpha 2$ 这两个 helix 是催化所必须的结构，缺少 $\alpha 1$, $\alpha 2$ 的 Vasohibin 截短体的催化能力降低了 80%，这能够解释 SVBP 结合的重要性。在 Vasohibin 的催化活性部位周围，环绕了一圈带正电的氨基酸，组成一条正电沟，会将 SVBP-Vasohibin 复合物引向带负电的微管蛋白 C 末端。将一些带正电的氨基酸突变成其他电性的氨基酸，会使得 Vasohibin 催化效果下降。这种“正电沟”是许多参与微管蛋白翻译后修饰的蛋白都具有的共同特征。微管蛋白 C 末端至少有 5 个氨基酸（即 EGEEY）伸入到了催化活性部位之中，可能也有更多的氨基酸伸入^{[13][14]}。

在 Vasohibin 缺失的细胞系中，仍存在去酪氨酸化的微管蛋白。这证实 Vasohibin 并不是唯一的微管蛋白去酪氨酸化酶。因此，寻找其他微管蛋白去酪氨酸化酶和调控因素的工作仍是任重道远的。Vasohibin 结构的解析，对于下一个微管蛋白去酪氨酸化酶的寻找是具有指导意义的，可以通过结构相似性的比对来判断一个蛋白成为微管蛋白去酪氨酸化酶的可能性，且 SVBP 对于 Vasohibin 结构稳定性的作用、Vasohibin 结构中正电沟的存在^{[13][14]}也能在许多方面给予我们启示，这是蛋白质的结构与功能紧密相连，相互依存的又一有力例证。

在日后的工作中，我们可以采取先筛选后验证的思路，即先筛选能与微管蛋白互作的蛋白，或与 Vasohibin 存在结构上相似性的蛋白，不要局限于 HDACs

家族，根据筛选结果再进一步探究所选蛋白对微管蛋白去酪氨酸化的影响，进而去探明该翻译后修饰的发生和调控机制，为心肌炎等相关疾病的预防和治疗带来新的思路。

参考文献

1. Maria M. Magiera and Carsten Janke. Post-translational modifications of tubulin. *Current Biology*. (2014)6, R351-R354.
2. Joppe Nieuwenhuis and Thijn R. Brummelkamp. The Tubulin Detyrosination Cycle: Function and Enzymes. *Trends in Cell Biology*. (2019)1, 80-92.
3. Neha Kaul, Virupakshi Soppina, and Kristen J. Verhey. Effects of α -Tubulin K40 Acetylation and Detyrosination on Kinesin-1 Motility in a Purified System. *Biophysical Journal*. (2014) 12, 2636–2643.
4. Anna Akhmanova and Helder Maiato. Closing the tubulin detyrosination cycle. *Science*. (2017)358, 1381-1382.
5. Aillaud et al. Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCPs) that regulate neuron differentiation. *Science*. (2017)358, 1448–1453.
6. Nieuwenhuis et al. Vasohibins encode tubulin detyrosinating activity. *Science*. (2017) 358, 1453–1456.
7. 曹端芳, 杨娜. 组蛋白去乙酰化酶的结构及应用. *Progress in Biochemistry and Biophysics*. (2015)11, 978-993.
8. Shashi Kiran et al. Intracellular distribution of human SIRT7 and mapping of the nuclear/nucleolar localization signal. *FEBS Journal*. 2013(280), 3451–3466.
9. Fatimah Nahhas et al. Mutations in SIRT2 deacetylase which regulate enzymatic activity but not its interaction with HDAC6 and tubulin. *Mol Cell Biochem*. (2007) 303, 221–230.
10. Sin-Gu Jeong, Goang-Won Cho. The tubulin deacetylase Sirt-2 regulates neuronal differentiation through the ERK/CREB signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (2017)482, 182-187.
11. Jeannette Chloe Bulinski, Julia E. Richards and Gianni Piperno. Posttranslational Modifications of α -Tubulin: Detyrosination and Acetylation Differentiate Populations of Interphase Microtubules in Cultured Cells. *The Journal of Cell Biology*, (1988)106, 1213-1220.
12. Michael S. Finnin, Jill R. Donigian, Nikola P. Pavletich. Structure of the histone deacetylase SIRT2. *Nature Structural Biology*. (2001)8, 621–625.
13. Shanhui Liao et al. Molecular basis of vasohibins-mediated detyrosination and its impact on spindle function and mitosis. *Cell Research*. (2019) 29, 533–547.
14. Na Wang et al. Structural basis of tubulin detyrosination by the vasohibin–SVBP enzyme complex. *Nature Structural & Molecular Biology*. (2019)26, 571–582.
15. Yoon et al. SIRT1-Mediated eNAMPT Secretion from Adipose Tissue Regulates Hypothalamic NAD⁺ and Function in Mice. *Cell Metabolism*. (2015)21, 706–717.
16. Annemieke J. M. DE RUIJTER et al. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J*. (2003) 370, 737-749.
17. Lin Li, Xiang-Jiao Yan. Tubulin acetylation: responsible enzymes, biological functions and human diseases. *Cell. Mol. Life Sci*. (2015) 72, 4237–4255.
18. Yuming Cao et al. Pseudophosphatase MK-STYX Alters Histone Deacetylase 6 Cytoplasmic Localization, Decreases Its phosphorylation, and Increases Detyrosination

- of Tubulin. *Int. J. Mol. Sci.* (2019) 20, 1455(1-16).
19. Dorota Wloga, Ewa Joachimiak, Panagiota Louka and Jacek Gaertig. Posttranslational Modifications of Tubulin and Cilia. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* (2017)9, 1-14.
20. Yasuyuki Miyake et al. Structural insights into HDAC6 tubulin deacetylation and its selective inhibition. *Nature Chemical Biology.* (2016)12, 748-754.
21. Van der Laan et al. Evolutionary Divergence of Enzymatic Mechanisms for Tubulin Detyrosination. *Cell Reports.* (2019) 29, 4159–4171.

致谢

我于 2019 年初加入余巍老师的实验室学习，至今已有一年半的时间。余巍老师是我在“生命科学学院本科生全员导师”制度中的个人导师，拥有这样一位科研视野开阔、科学思想严谨、工作认真负责、用心教书育人的导师是我的幸运。我仍记得初到实验室的那天，有些迷茫的我和余老师探讨未来的规划，在聊天中我逐渐获得了拨开迷雾的勇气。在实验室日常的学习与训练中，余老师给予了我自由空间，同时也会经常对我的实验思路和技术进行指导，我的科研视野在一次次与余老师的讨论及实验室每周的组会中不断拓宽，获益良多。余老师对我的学业发展和个人生活都比较关心，让我十分感激。余老师在我毕业论文课题实施的全过程中都给予了悉心指导，使我能顺利通过。此外，在我临近本科毕业的关键时刻，在申请季中压力和实验不顺利的焦虑一并向我袭来之时，余老师对我的升学申请提供了大力支持，帮助我拨开乌云，获得了心仪学校的录取以继续我的学术生涯。这一年来余老师对我的指导、支持、关心与鼓励不胜枚举，我感激涕零，唯有在科研路上不断努力，在未来用硕果报答师恩。

实验室的师兄师姐们也对我的研究开展和技术学习提供了强有力的支持。我的带教是谢良国师兄，初见他时觉得他是个腼腆的大男孩，但经过相处后发现他有着了一颗热情温暖的心。他对待实验十分细心，对待科研和生活的态度比较乐观，对我的失误和情绪都会予以包容。我实验能顺利进行，他的保驾护航不可或缺。很幸运我能遇到这样一位和我合拍的师兄，并成为了好兄弟。我对谢师兄怀有深深的感激，希望兄弟情谊长存。王超和李超群师兄科研经验丰富，思路开阔，对我的课题和实验方法提出了富有建设性的意见，推进了我课题的进程。希望他们在未来的工作中能够一帆风顺！沈潮师兄虽然相处时间不长，但我也见证了她的毕业，祝福他爱情事业的双丰收。陈昕媛师姐管理实验室的日常事务，为我们良好的实验环境提供了保障。汤云兰师姐对待科研十分认真努力，她坐在我身边，她的努力时常感染到我。她经常对我的实验提出技术上的建议，并指导我培养新购入的细胞系，感谢她对我的帮助，希望她未来能做出一番事业。万星佑师姐虽然很严格，但如果没有这份严格，我可能细胞实验的失败率会提高很多，她挽救我的共转染实验于水火之中，并给我提供空载质粒，让我体会到了实验室成员互

帮互助的温暖。祝她毕业顺利，生活幸福，经常能有空去逛街旅行。可爱的戚倩、秦懿偲和向升师姐是日常欢乐的源泉，使得枯燥的实验增添了几分色彩，同时戚倩师姐对我的蛋白纯化实验提供了许多帮助，秦懿偲师姐为我提供了多种质粒，我十分感激，祝她们实验顺利，心想事成，笑口常开。赵颖颖、李梦云师姐和李晨语同学与我进入实验室的时间相差不多，同是“新人”，也经常交流合作，一同进步，祝她们能在实验室开创一段美好回忆。

在余巍老师实验室的这一年半，有汗水，有皱起的眉头，有欣喜，也有失落，但最后我将美好的祝愿留下，带着甘甜的回忆去开创新的未来。我会记得陪我走过本科后半段的你们，再次感谢！日后如果有机会，我会常回来实验室看看，希望情谊长存。

本课题虽然有许多阴性结果，但在推进这个课题的过程中，我的科研思维和实验技术得到了强化训练，心理承受和抗压能力也得到显著提升，为未来承担更重要更复杂的课题打牢了地基。感谢复旦大学生命科学学院“拔尖计划”对我研究的支持，我在数次“拔尖计划”的考核中锻炼了演讲和表达能力，同时得到了评委老师们对我研究的意见和建议，开阔了我的思路，拓宽了研究视野。最后，要感谢我在复旦大学求学的这四年里遇到的每一位帮助过我的老师和同学，他们都为我的人生增添了亮色，让我拥有不断向前的勇气，也要感谢复旦的一草一木，伴我走过四度春秋，见证我的成长。我即将踏上攻读生物化学博士的旅程，这一路定充满艰难险阻，但我会铭记“博学而笃志，切问而近思”的校训，发扬“团结，服务，牺牲”的复旦精神，努力进取，永不退缩，在拓宽人类视野的生命科学科研事业上做出贡献。