

拟南芥 *AtPUB18* 的亚细胞定位和 酶活性及 *AtPUB18* 的表达

赵兰杰¹, 朱守鸿², 张新宇², 李艳军², 孙 杰², 刘永昌^{2*}

(1 石河子大学 生命科学学院, 新疆石河子 832000; 2 石河子大学 农学院/新疆生产建设兵团绿洲生态农业重点实验室, 新疆石河子 832000)

摘 要: 通过 RT-PCR 技术从拟南芥中克隆到 *AtPUB18* 全长 ORF。利用 VectorNTI 和 MEGA 5.0 对蛋白序列进行生物信息学分析结果显示, *AtPUB18* 和 *AtPUB19* 蛋白序列相似性为 74.9%, 一致性为 63.5%; 构建 *AtPUB18* 启动子(1 974 bp)融合 *GUS* 报告基因载体并转化拟南芥, 组织化学染色分析显示, 低温和干旱诱导后转基因植株中 *AtPUB18* 表达水平显著提高; 构建 *AtPUB18* 与绿色荧光蛋白基因(*GFP*)融合的瞬时表达载体并转化原生质体, 激光共聚焦显微镜观察发现, *AtPUB18*-*GFP* 融合蛋白分布在细胞核和细胞质中; 构建 *AtPUB18* 与麦芽糖结合蛋白基因(*MBP*)融合表达载体并转化大肠杆菌表达融合蛋白, 纯化后的蛋白进行泛素连接酶活性检测结果显示, 在小麦泛素激活酶 E1 和人泛素结合酶 E2 存在时, *AtPUB18* 具有泛素连接酶活性。研究表明, *AtPUB18* 是一个有功能的泛素连接酶, 定位在细胞膜和细胞质中, 可能参与拟南芥对非生物胁迫的响应。

关键词: 拟南芥; *AtPUB18*; 泛素连接酶; 非生物胁迫

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Subcellular Localization and Ligase Activity of *AtPUB18* and Its Expression Pattern in *Arabidopsis thaliana*

ZHAO Lanjie¹, ZHU Shouhong², ZHANG Xinyu², LI Yanjun², SUN Jie², LIU Yongchang^{2*}

(1 College of Life Science, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China; 2 College of Agronomy, Shihezi University/Key Oasis Eco-Agriculture Laboratory of Production and Construction Group, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

Abstract: The full length ORF of *AtPUB18* was cloned from *Arabidopsis thaliana* by RT-PCR. Informatic analysis manifested that *AtPUB18* shared similarity of 74.9% and identity of 63.5% with *AtPUB19* using VectorNTI and MEGA5.0; A 1 974 bp promoter fragment of *AtPUB18* was fused with *GUS* gene to generate transgenic *A. thaliana*. The expression level of *AtPUB18* was elevated after drought and cold treatment by histochemical *GUS* assay. *AtPUB18* was fused with green fluorescent protein(*GFP*) gene to generate a transient expression vector. *AtPUB18*-*GFP* fusion protein was expressed in *A. thaliana* protoplasts and observed using confocal microscope. The result showed that *AtPUB18*-*GFP* fusion protein distributed in nucleus and cytosol; *AtPUB18* was fused with maltose binding protein(*MBP*) gene to generated *AtPUB18*-*MBP* fusion protein in *E. coli* for ubiquitin ligase activity assay. The result indicated that *AtPUB18* had ubiquitin ligase activity with the presence of wheat E1 and human E2. Our studies implied that *AtPUB18* was a functional E3 ligase and localized in nucleus and cytosol, and might be involved in the response to abi-

收稿日期: 2014-01-12; 修改稿收到日期: 2014-04-08

基金项目: 新疆生产建设兵团博士资金专项(2013BB003); 石河子大学高层次人才启动项目(RCZX201218)

作者简介: 赵兰杰(1987—), 女, 硕士, 主要从事植物功能基因组学研究。E-mail: 781692734@qq.com

* 通信作者: 刘永昌, 博士, 讲师, 主要从事棉花遗传育种及棉花功能基因组学研究。E-mail: liuyongchang2003@126.com

otic stress in *A. thaliana*.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; AtPUB18; E3 ligase; abiotic stress

植物固着生长的特性使其在生长发育过程中不可避免地与外界环境有着密切关联。高盐、干旱、低温、高温或重金属污染等不利因素影响植物正常生长和发育,并造成农作物减产或绝收。植物通过在基因表达的不同水平进行调控从而应对各种非生物胁迫,如转录调控、转录后调控、翻译调控和翻译后修饰^[1]。作为重要的蛋白翻译后修饰,泛素化在植物响应非生物胁迫的过程中起了重要作用。泛素(ubiquitin)是一种由 76 个氨基酸组成的小蛋白,其氨基酸序列和结构在不同生物中都高度保守^[2]。底物蛋白质的泛素化需要多个酶的共同参与,其中主要有泛素激活酶 E1、泛素结合酶 E2、泛素连接酶 E3。在这个过程中,泛素连接酶 E3 决定了底物特异性。目前植物中泛素连接酶 E3 分为 4 类:HECT (Homologous to E6-AP COOH-Terminus)、RING (Really Interesting New Gene)、U-box 和 cullin-RING (CRLs)^[3]。U-box 结构域最早从酵母蛋白 UFD2 (ubiquitin fusion degradation protein-2)中发现,含有 70 多个保守氨基酸^[4]。在拟南芥中,预测有 64 个基因编码含 U-box 结构域的泛素连接酶^[5]。

U-box 泛素连接酶能使底物蛋白和自身泛素化,是泛素/蛋白酶系统的重要组分。以前的研究表明,U-box 泛素连接酶在植物应对非生物胁迫过程中具有重要作用。*AtCHIP* 编码一个 U-box 类型的泛素连接酶,其表达水平受热、冷、盐的诱导。*AtCHIP* 编码的蛋白可以促进 FstH1 和 FstH2 的降解,降低拟南芥在高光强条件清除损伤蛋白的能力^[6]。除此之外,该基因过表达植株增强了对低温的敏感性^[7]。拟南芥 *AtPUB22* 和 *AtPUB23* 及其在辣椒中的同源基因 *CaPUB1* 受低温和干旱诱导,负调控植物的抗旱性^[8-9]。*AtPUB19* 表达水平在干旱、高盐、冷和 ABA 诱导后明显升高。*AtPUB19* 的 T-DNA 插入突变体表现为对 ABA 的敏感性增加,并加强了 ABA 诱导的气孔关闭进而提高植物耐旱性^[10]。*AtPUB18* 与 *AtPUB19* 高度同源,但其在植物响应非生物胁迫过程中的分子机理还不清楚。本研究通过 RT-PCR 技术克隆到 *AtPUB18* 的 ORF 序列,并对蛋白序列、基因表达模式、蛋白的亚细胞定位及泛素连接酶活性等方面进行了研究,为进一步阐明 *AtPUB18* 在拟南芥抗逆过程中的生物学功能奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

实验材料为野生型拟南芥(生态型为 Columbia-0)。将拟南芥种子用 10%次氯酸钠进行表面消毒 15~20 min,灭菌蒸馏水冲洗种子 3~5 次。灭菌后的种子用 0.2%琼脂粉培养基重悬,播种在 1/2 MS 固体培养基。4℃处理 2~3 d 后,放入标准培养间进行培养。

1.2 方法

1.2.1 *AtPUB18* 基因克隆及序列分析 以培养 10 d 的拟南芥幼苗为材料,提取总 RNA。用 TaKaRa 的 Dnase 除去 RNA 中的 DNA 并反转录为 cDNA 的第一条链进行 PCR 扩增 *AtPUB18*,扩增产物连接到克隆载体 pEASY-Blunt 中进行测序。利用 VectorNTI 软件进行蛋白序列比对,并用 MEGA 5.0 软件构建系统进化树。

1.2.2 *AtPUB18* 启动子融合 *GUS* 基因载体构建及组织化学染色 以拟南芥基因组 DNA 为模板,克隆 *AtPUB18* 启动子序列(ATG 上游 1 974 bp 的 DNA 序列),上游引物 P₁ (TGAAGCTTTGTGCTTTGGTTCATGATG,下划线为 *Hind*Ⅲ 酶切位点),下游引物为 P₂ (ACTCTAGAGCTGCTATGACTTTGTAGAT,下划线为 *Xba*Ⅰ 酶切位点)。将克隆的片段连接到 pCambia1300-221 载体中,将重组载体转入农杆菌 *EHA105* 中,花序侵染法转化野生型拟南芥,纯合转基因株系用于组织化学染色。将 2 周左右的拟南芥移植到液体 1/2 MS 中,24 h 后更换新鲜的培养基,置于 4℃培养箱,进行低温处理 4 h;同时,将幼苗置于滤纸上,进行模拟干旱处理 4 h,用不处理的幼苗作为对照。将处理后的幼苗浸泡在染色液中(0.2 mol/L NaH₂PO₄·H₂O, 3.9 mL;0.2 mol/L Na₂HPO₄·2H₂O, 6.1 mL;100 mmol/mL X-gluc, 200 μL),放置于 37℃过夜,用 75%乙醇脱色至无色。

1.2.3 *AtPUB18*-GFP 融合载体构建及原生质体转化 将 *AtPUB18* 全长 ORF 克隆到原核表达载体 pGFP2 中,用于转化拟南芥原生质体^[11]。上游引物为 P₃ (ACCTCGAG ATGATCCATACGAAAACCGGGTCTG,下划线为 *Xho*Ⅰ 酶切位点),下游引物为 P₄ (ACGGTACCCAGGCGTGAACGAAC-

CGTC,下划线为 *Kpn* I 酶切位点)。

1.2.4 AtPUB18-MBP 原核表达载体构建及体外泛素连接酶活性检测 将 *AtPUB18* 全长 ORF 克隆到原核表达载体 pMalC2 中,用于原核表达融合蛋白。上游引物为 P_5 (ACCTCGAGATGATCCAT-ACGAAAACCGGGTCTG,下划线为 *Xho* I 酶切位点),下游引物为 P_6 (ACCTGCAGTCACCAG-GCGTGAACGAACCGTC,下划线为 *Pst* I 酶切位点)。融合表达载体通过热激转化法转入大肠杆菌 *BL21* 中,利用 IPTG 诱导后表达融合蛋白。超声破碎细胞后提取总蛋白,利用 MBP 抗体的琼脂糖珠进行蛋白纯化。纯化后的融合蛋白 MBP-AtPUB18 与小麦泛素激活酶 E1 (UBA1)、人泛素结合酶 E2 (UBCh5b) 及带有 HIS 标签的拟南芥的泛素 (UBQ14) 混合,30 °C 孵育 1.5 h。反应产物经过 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,利用 Anti-HIS 的抗体进行蛋白杂交检测蛋白体外泛素化连接酶活性^[12]。

2 结果与分析

2.1 AtPUB18 的克隆与序列分析

以拟南芥 cDNA 为模板,通过 RT-PCR 技术扩增 *AtPUB18* (At1G10560) 全长 ORF 序列。回收 PCR 产物并对其进行连接、转化和测序。为了研究 AtPUB18 与其他物种中 U-box 类型泛素连接酶的亲缘关系,对 AtPUB18 与其他物种中已报道的 U-

box 类型泛素连接酶进行了系统进化分析。利用 MEGA5.0 软件构建系统进化树,结果表明 AtPUB18 (NP_172526.1) 与 AtPUB19 (NP_176225.1) 亲缘关系最近,首先聚类在一起。利用 VectorNTI 对 AtPUB18 和 AtPUB19 的蛋白序列进行比对分析发现 2 个蛋白序列相似性为 74.9%,一致性为 63.5%。AtPUB18 与其他已经报道的 U-box 泛素连接酶的亲缘关系比较远,包括拟南芥中含有 TPR 结构域的 AtCHIP (NP_566305.1)、含有 WD40 结构域的 AtPUB59 (NP_563708.1) 和 AtPUB60 (NP_001031471.1) 及含有 UFD2 结构域的 AtUFD2 (NP_568313.2) (图 1)。

2.2 AtPUB18 低温和干旱诱导后的表达

为了研究 *AtPUB18* 的胁迫诱导表达模式,克隆了 *AtPUB18* 起始密码子 ATG 前 1 974 bp 启动子序列,并驱动 *GUS* 基因在野生型拟南芥中表达。取 2 周左右转基因幼苗,经 4 °C 和干旱处理后,通过组织化学染色方法观察基因表达情况。结果表明,未经胁迫处理时,报告基因在幼苗中有微弱表达。经过 4 °C 和干旱处理 4 h 后,*GUS* 基因表达水平明显上调 (图 2)。以上结果表明,AtPUB18 为低温和干旱胁迫诱导的基因。

2.3 AtPUB18 的亚细胞定位分析

为了研究 AtPUB18 的亚细胞定位,构建 AtPUB18-GFP 瞬时表达载体,转化拟南芥原生质体。转化的原生质体细胞培养 1 d 后,利用荧光共聚焦显微镜观察蛋白亚细胞定位。结果显示,绿色荧光在细胞核与细胞质中都有分布 (图 3),说明 AtPUB18 定位于细胞核与细胞质中。

2.4 AtPUB18 的体外泛素连接酶活性分析

为了研究 AtPUB18 的泛素连接酶活性,构建 MBP-AtPUB18 原核表达载体并转化大肠杆菌 *BL21* 表达融合蛋白,纯化得到 MBP-AtPUB18 融合蛋白。在 ATP 提供能量,小麦 E1 (UBA1)、人 E2 (UBCh5b) 和拟南芥的泛素蛋白 (UBQ14) 存在条件下,进行体外泛素化反应。结果表明,在小麦 E1、人 E2 及 AtPUB18 同时存在时,可以检测到被泛素化的 AtPUB18,而在其他泳道均检测不到被泛素化的 AtPUB18 (图 4)。

3 讨论

在很多国家,非生物胁迫已经成为影响作物产量的主要原因^[13]。每年由于非生物胁迫引起的农作物减产或绝收占总产量损失的 50%,直接经济损

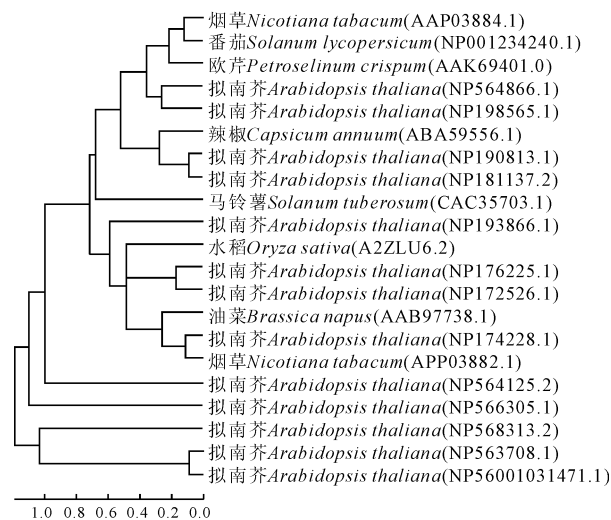


图 1 AtPUB18 与其他物种 PUB 蛋白氨基酸

序列的系统进化分析

标尺表示演化距离

Fig. 1 Phylogenetic analysis of amino acid sequences of AtPUB18 and members of PUB proteins from other species

Scaleplate represents the evolution distance of these plants

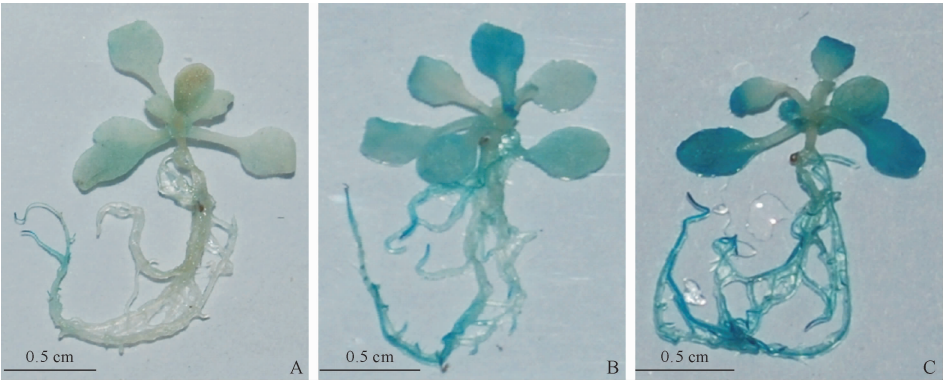


图 2 转基因拟南芥低温和干旱胁迫后组织化学染色分析
A. 对照, 1/2 MS 培养液处理的幼苗; B. 4 °C 处理 4 h 的幼苗; C. 干旱处理 4 h 的幼苗
Fig. 2 The histochemical GUS assay of transgenic *A. thaliana* after low temperature and drought stress treatment
A. Plants treated with liquid 1/2 MS as control; B. Plants treated with 4 °C for four hours; C. Plants treated with drought stress for four hours

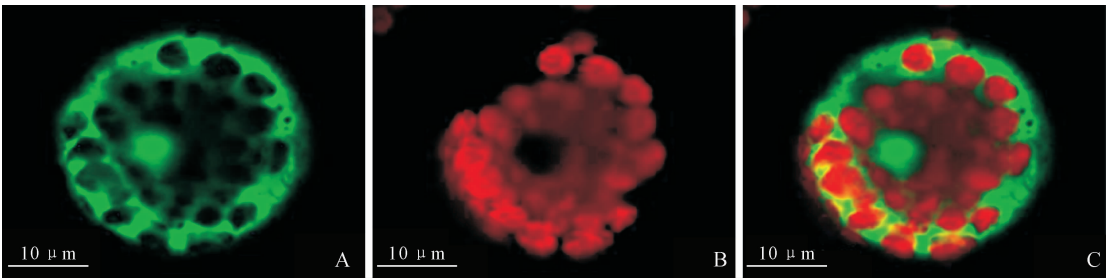


图 3 AtPUB18 的亚细胞定位
A. 表达 AtPUB18-GFP 融合蛋白的拟南芥原生质体; B. 叶绿体自发荧光; C. A 和 B 的叠加图
Fig. 3 Subcellular localization of AtPUB18 in protoplasts of *A. thaliana*
A. Confocal section of an *A. thaliana* protoplast expressing AtPUB18-GFP fusion protein;
B. Fluoresce of chlorophyll; C. A and B merged image

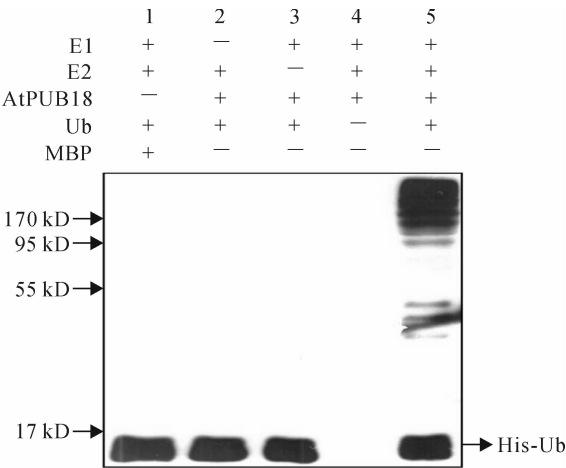


图 4 AtPUB18 的体外泛素化活性检测
Fig. 4 E3 ubiquitin ligase activity assay of AtPUB18 *in vitro*

失大约上亿美元^[14]。在非生物胁迫中,对植物危害最大胁迫因子主要包括干旱、高盐和低温^[15]。大量研究表明拟南芥 U-box 泛素连接酶参与调控植物响应非生物胁迫的过程,如 *AtCHIP*、*AtPUB22*、*AtPUB23*、*AtPUB19* 等。

前期研究表明,*AtPUB19* 负调控了拟南芥的抗旱性及对 ABA 的响应。*AtPUB18* 与 *AtPUB19* 同源关系最近,但与其相关的研究很少。有研究表明在干旱和 ABA 诱导后,*AtPUB18* 起始密码子 ATG 上游 1 kb 的启动子区就可以驱动 *GUS* 基因表达,而诱导前检测不到 *GUS* 活性,但实时定量 PCR 结果却显示 *AtPUB18* 诱导前有少量表达^[16]。因此,本研究利用 *AtPUB18* 上游 1 974 bp 的启动子驱动 *GUS* 基因表达,结果发现诱导前报告基因有少量表达,诱导后 *GUS* 的表达水平明显升高,从而推测 1

kb 后的启动子区对维持胁迫诱导前 AtPUB18 的表达量有重要作用。前期研究表明 AtPUB18 的启动子在高盐胁迫后也能够驱动报告基因表达,序列分析发现启动子内包含多个非生物胁迫响应的顺式作用元件,如 HSE、ABRE、MYB 和 LTR 等^[17]。同时,AtPUB18 和 AtPUB19 的双突变体在萌发阶段表现出对高盐抑制的不敏感性,也增强了拟南芥的抗旱性,更加明确证明了 AtPUB18 调控了拟南芥对非生物胁迫的响应^[15-16]。PUBs 蛋白家族中很多蛋白都定位在细胞膜上,如 AtPUB27、AtPUB42、AtPUB43、AtPUB44^[18]。有研究表明 PUBs 的定位与蛋白内的 ARM 结构域有关,去掉 ARM 结构域的 AtPUB44 能够从细胞膜进入细胞质内^[18]。AtPUB18 的 C 端也具有 ARM 结构域,但 AtPUB18-

GFP 融合蛋白定位细胞核和细胞质中。同时,将 GFP 融合到 AtPUB18 的 N 端也得到了同样的结果,暗示 AtPUB18 可能具有不同的生物学功能,能够特异降解细胞质和细胞核蛋白质^[16]。泛素连接酶可以使底物蛋白泛素化,进而促进底物蛋白的降解。AtPUB18 在酵母 E1 和拟南芥 AtUBC7 存在时具有很强泛素酶活性,但 AtUBC8 存在时其泛素酶活性很弱^[19]。本研究发现在小麦 E1 和人 E2 存在时,AtPUB18 也具有很强的泛素酶活性,说明 AtPUB18 泛素连接酶活性的强弱与泛素结合酶 E2 具有很大关系。虽然已经明确 AtPUB18 参与调控拟南芥对非生物胁迫的响应,但其底物蛋白及其参与调控植物对非生物胁迫应答的分子机制还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] HIRAYAMA T, SHINOZAKI K. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future[J]. *Plant Journal*, 2010, **61**(6): 1 041—1 052.
- [2] SULLIVAN J A, SHIRASU K, DENG X W. The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2003, **4**(12): 948—958.
- [3] VIERSTRA R D. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology[J]. *Nature Reviews*, 2009, **10**(6): 385—397.
- [4] KOEGL M, HOPPE T, SCHLENKER S, et al. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly[J]. *Cell*, 1999, **96**(5): 635—644.
- [5] ARAVIND L, KOONIN E V. The U box is a modified RING finger—a common domain in ubiquitination[J]. *Current Biology*, 2000, **10**(4): R132—134.
- [6] MURATA S, CHIBA T, TANAKA K. CHIP: a quality-control E3 ligase collaborating with molecular chaperones[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2003, **35**(5): 572—578.
- [7] YAN J, WANG J, LI Q, HWANG J R, et al. AtCHIP, a U-box-containing E3 ubiquitin ligase, plays a critical role in temperature stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2003, **132**(2): 861—869.
- [8] CHO S K, CHUNG H S, RYU M Y, et al. Heterologous expression and molecular and cellular characterization of CaPUB1 encoding a hot pepper U-Box E3 ubiquitin ligase homolog[J]. *Plant Physiology*, 2006, **142**(4): 1 664—1 682.
- [9] CHO S K, RYU M Y, SONG C, et al. *Arabidopsis* PUB22 and PUB23 are homologous U-Box E3 ubiquitin ligases that play combinatory roles in response to drought stress[J]. *The Plant Cell*, 2008, **20**(7): 1 899—1 914.
- [10] LIU Y C, WU Y R, HUANG X H, et al. AtPUB19, a U-Box E3 ubiquitin ligase, negatively regulates abscisic acid and drought responses in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Molecular Plant*, 2011, **4**(6): 938—946.
- [11] LIAO J M(廖嘉明), WANG B CH(王伯初), WANG Y CH(王益川), et al. Optimization conditions of *Arabidopsis* mesophyll protoplast isolation[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2010, **30**(6): 1 271—1 276(in Chinese).
- [12] XIE Q, GUO H S, DALLMAN G, et al. SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals[J]. *Nature*, 2002, **419**(6 903): 167—170.
- [13] NAKAMINAMI K, MATSUI A, SHINOZAKI K, et al. RNA regulation in plant abiotic stress responses[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819, (2): 149—153.
- [14] MAHAJAN S, TUTEJA N. Cold, salinity and drought stresses: an overview[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2005, **444**(2): 139—158.
- [15] BERGLER J, HOTH S. Plant U-box armadillo repeat proteins AtPUB18 and AtPUB19 are involved in salt inhibition of germination in *Arabidopsis*[J]. *Plant Biology*(Stuttgart, Germany), 2011, **13**(5): 725—30.
- [16] SEO D H, RYU M Y, JAMMES F, et al. Roles of four *Arabidopsis* U-Box E3 ubiquitin ligases in negative regulation of abscisic acid-mediated drought stress responses[J]. *Plant Physiology*, 2012, **160**(1): 556—568.
- [17] ZHANG X Y(张新宇), ZHAO L J(赵兰杰), LI Y J(李艳军), et al. Expression of AtPUB18 after salt stress treatment and analysis of its promoter from *Arabidopsis thaliana*[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2014, **34**(1): 54—59(in Chinese).
- [18] DRECHSEL G, BERGLER J, WIPPEL K, et al. C-terminal armadillo repeats are essential and sufficient for association of the plant U-box armadillo E3 ubiquitin ligase SAUL1 with the plasma membrane[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, **62**(2): 775—785.
- [19] MUDGIL Y, SHIU S H, STONE S L, et al. A large complement of the predicted *Arabidopsis* ARM repeat proteins are members of the U-Box E3 ubiquitin ligase family[J]. *Plant Physiology*, 2004, **134**(1): 59—66.