

# 中间锦鸡儿 *CiPUB22* 基因克隆与功能分析

岳文冉, 于秀敏, 岳俊燕, 杨 杞, 韩晓东, 王瑞刚, 李国婧\*

(内蒙古农业大学 生命科学学院, 内蒙古自治区植物逆境生理与分子生物学重点实验室, 内蒙古自治区抗逆植物遗传资源利用与分子改良科技创新团队, 呼和浩特 010018)

**摘 要:** 中间锦鸡儿(*Caragana intermedia*)耐旱、耐寒、耐盐碱, 是西北干旱地区的重要固沙灌木, 筛选其优良逆境基因, 可以作为林草基因工程的基因源。该研究在中间锦鸡儿干旱胁迫转录组文库中找到 1 条 *CiPUB22* (plant U-box 22) 基因的 cDNA 全长序列, *CiPUB22* 基因包括 1 260 bp 开放阅读框, 编码 419 个氨基酸。实时荧光定量 PCR 结果表明, 在脱水、盐和 ABA 处理 1 h 后 *CiPUB22* 基因表达量上升并达到最高水平, 分别为对照表达量的 12 倍、35 倍和 7 倍, 干旱处理后 12 d 达到最高值, 为对照的 2.5 倍, 表明 *CiPUB22* 的转录水平受非生物胁迫诱导。构建 *CiPUB22* 基因的过表达载体并转化野生型拟南芥, 对转基因纯合体株系抗逆性分析发现, 在 150 mmol/L NaCl、1  $\mu$ mol/L ABA 和 400 mmol/L 甘露醇处理下, 过表达株系的萌发率均低于野生型, 说明过表达 *CiPUB22* 基因降低了拟南芥在种子萌发过程中对盐和渗透胁迫的耐受性。

**关键词:** E3 泛素连接酶; 中间锦鸡儿; *CiPUB22*; 种子萌发; 渗透胁迫

中图分类号: Q786; Q789

文献标志码: A

## Cloning and Functional Characterization of *CiPUB22* from *Caragana intermedia*

YUE Wenran, YU Xiumin, YUE Junyan, YANG Qi,  
HAN Xiaodong, WANG Ruigang, LI Guojing\*

(College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Inner Mongolia Key Laboratory of Plant Stress Physiology and Molecular Biology, Inner Mongolia Scientific Innovation Team of Genetic Resource Utilization and Molecular Improvement of Stress Resistant Plants, Hohhot 010018, China)

**Abstract:** *Caragana intermedia* is an important sand-fixing shrub in northwest arid area with drought, cold and saline-alkali resistance. Excellent stress resistant candidate genes screened from it could provide good gene resources for genetic engineering of forest and forage species. In this study, the full length cDNA sequence of *CiPUB22* (plant U-box 22) had been mined from the transcriptome library constructed in our laboratory using drought stressed seedlings of *C. intermedia*. The *CiPUB22* gene contained 1 260 bp open reading frame (ORF) which encoding 419 amino acids. Quantitative real time PCR analysis showed that the expression levels of *CiPUB22* were significantly increased and reached the highest level, which was 12, 35 and 7 times of the control at 1 h after dehydration, NaCl and ABA treatments, respectively. After drought treatment, the relative expression of *CiPUB22* was significantly increased and reached the highest level at 12 d, which was 2.5 times more than that of the control. The results indicated that the transcrip-

收稿日期: 2018-08-18; 修改稿收到日期: 2018-11-13

基金项目: 内蒙古自治区科技创新引导项目(KCBJ2018012)

作者简介: 岳文冉(1990-), 女, 在读博士研究生, 主要从事植物生物化学与分子生物学研究。E-mail: yuewenran@126.com

\* 通信作者: 李国婧, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事植物生物化学与分子生物学研究。E-mail: liguoqing@imau.edu.cn

tion of *CiPUB22* was induced by abiotic stress. Furthermore, expression vector pCanG-*CiPUB22* was constructed and transformed into the wild-type *Arabidopsis*. Homozygous transgenic *Arabidopsis* overexpressing *CiPUB22* were generated for further analysis. Seed germination assay showed that *CiPUB22* transgenic lines germinated slower than that of wild-type on medium containing 150 mmol/L NaCl, 400 mmol/L mannitol or 1  $\mu$ mol/L ABA. These results indicated that *CiPUB22* decreased tolerance of the transgenic *Arabidopsis* to salt and osmotic treatments during seed germination.

**Key words:** E3 ubiquitin ligase; *Caragana intermedia*; *CiPUB22*; seed germination; osmotic stress

泛素/26S蛋白酶体途径(ubiquitin proteasome pathway, UPP)是一类重要的蛋白质翻译后修饰过程,它能有效地调节功能蛋白质的选择性降解<sup>[1]</sup>,也是细胞进行自身功能调控的重要机制,包括两个连续的过程:第一步,在 ATP 存在下,泛素化系统将底物蛋白泛素化;第二步,26S蛋白酶体降解泛素化的靶蛋白<sup>[2]</sup>。UPP 途径主要由泛素(Ub)、泛素活化酶(E1)、泛素结合酶(E2)、泛素连接酶(E3)和 26S蛋白酶体组成,其中,泛素连接酶 E3 在底物的选择性降解过程中起到主要的作用<sup>[3]</sup>。

泛素连接酶 E3 的主要功能是识别将要被泛素化的靶蛋白,使活化的泛素接近特异靶蛋白的赖氨酸(Lys),从而将泛素转移到底物上去。在拟南芥中,编码 E3 基因的数量约 1 400 个<sup>[4]</sup>,水稻中有 1 300 个<sup>[5]</sup>。植物中目前已经鉴定出的 E3 共分成 5 类<sup>[6]</sup>:HECT (homologous to E6-APC-terminus)、RING (really interesting new gene)/U-box、APC (anaphase promoting complex, 后期促进复合物)、SCF (Skpl/Cullin or CDC53/F-box protein)复合体和 CUL3-BTB。

U-box 泛素连接酶是最早发现的 E3 泛素连接酶,结构域最早从酵母 UFD2 (ubiquitin fusion degradation protein 2)中发现,含有 70 多个保守的氨基酸,是一种泛素链延长因子<sup>[7]</sup>。U-box 是一种改造过的 RING 结构域,其含有保守组氨酸和半胱氨酸,通过分子间作用力整合金属离子稳定高级结构。目前,在拟南芥中有 64 个基因编码含有 U-box 的 E3 泛素连接酶<sup>[8]</sup>,水稻中已经发现了 77 个<sup>[9]</sup>。

已有的研究表明,植物 U-box 型 E3 泛素连接酶参与对植物生长发育、生物及非生物胁迫响应等过程中关键步骤的控制<sup>[10]</sup>。近年来,已有很多关于 *PUB22* 和其同源基因 *PUB23* 的功能报道。拟南芥 2 个同源的 U-box 型 E3 泛素连接酶 *PUB22* 和 *PUB23* 与 RPN12a 互作并可以泛素化 RPN12a,进而调控植物对干旱胁迫的响应过程<sup>[11]</sup>。辣椒 (*Capsicum annuum*) CaPUB1 (putative U-box protein 1),与拟南芥 *PUB22* 和 *PUB23* 同源性分别

为 51% 与 52%,研究发现,CaPUB1 能够与 RPN6 互作,通过体外泛素化 RPN6 来调控植物对干旱和高盐胁迫响应<sup>[12]</sup>。Seo D H 等<sup>[13]</sup>研究发现 *PUB22* 和 *PUB23* 在调控干旱胁迫响应过程中是不依赖 ABA 的,但是其调控机制还不清楚。Cho S K 等<sup>[14]</sup>研究表明 *PUB22* 和 *PUB23* 能泛素化并降解 RPN6。Zhao J F 等<sup>[15]</sup>研究发现,拟南芥 *PUB22* 和 *PUB23* 通过泛素化降解 ABA 受体 PYL9 (pyrabactin resistance-like)负调控拟南芥对干旱的耐受性。除此之外,*PUB22* 和 *PUB23* 还参与 PAMP (pathogen-associated molecular patterns)信号途径<sup>[16]</sup>和 MPK3 (mitogen-activated protein kinase3)引起的免疫响应<sup>[17]</sup>。

中间锦鸡儿 (*Caragana intermedia*) 属于豆科蝶形花亚科锦鸡儿属多年生落叶灌木,具有耐旱、耐寒、耐高温、耐盐碱等特性,是干旱草原、荒漠地带的优良固沙和水土保持植物;除此之外,中间锦鸡儿还有饲用价值和药用价值,也是生物质能源和造纸材料<sup>[18-19]</sup>。本研究在中间锦鸡儿干旱胁迫转录组文库中找到 1 条 E3 泛素连接酶编码基因的全长 cDNA 序列,生物信息学分析发现其属于 U-box 型 E3 泛素连接酶 *PUB22*。利用荧光定量 PCR 技术对 *CiPUB22* 在脱水、干旱、盐和 ABA 等处理下的表达进行了定量分析。并通过构建植物表达载体,将 *CiPUB22* 在拟南芥中过表达,对转基因纯合体株系在种子萌发过程中对盐和渗透胁迫的耐受性进行了初步分析。为进一步探究 *CiPUB22* 基因在中间锦鸡儿响应逆境胁迫过程中的功能奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料及植物处理方法

中间锦鸡儿种子采于内蒙古自治区乌兰察布市四子王旗,播种于营养土和蛭石(1:2)的混合土中,置于 22  $^{\circ}$ C、16 h 光照/8 h 黑暗的温室中进行培养。

选 1 个月苗龄长势一致的植株进行脱水、NaCl 和 ABA 处理。将苗从土中小心取出,洗净分别置于滤纸、含 300 mmol/L NaCl、100  $\mu$ mol/L ABA 溶

液中处理,分别在处理后的 0、1、3、6、12、24 和 48 h 进行取样,每个时间点取 3 株植物的地上部分,液氮速冻,−80 ℃ 保存。每种处理均进行 3 次生物学重复实验。

干旱处理:植株正常生长 1 个月,最后一次浇水 1 d 后取样作为对照,之后停止浇水,每隔 3 d 取样 1 次,干旱 16 d 后复水,复水 2 d 后再取样,取样时间点分别为 0、3、6、9、12、15 和 17 d (16F),取样方法同上。

野生型拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) Columbia-0 生态型 (Col-0) 由本实验室保存,植物表达载体 pCanG-HA 由中国科学院遗传与发育研究所谢旗研究员惠赠,大肠杆菌 DH5a 及农杆菌 GV3101 由本实验室保存。

## 1.2 方法

**1.2.1 总 RNA 提取与反转录** 利用 Trizol 法提取中间锦鸡儿总 RNA。用超微量核酸蛋白测定仪 (美国 Quawell-超微量分光光度计 Q5000) 对 RNA 浓度进行测定,用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量,选取质量好的 RNA 进行 cDNA 第一链的合成,按试剂盒 (全式金,AT311-03) 说明书进行操作。

**1.2.2 不同胁迫处理下的表达分析** 根据转录组数据库中获得基因序列,利用软件 Primer 5 设计引物 F-*CiPUB22*-Q (TCAGAAAAGGTAACAA-AAGCGACA) 和 R-*CiPUB22*-Q (TTCAGCTCT-TCCCTCAGCACA)。采用 SYBR Green I 荧光染料法检测,利用 LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪 (Roche 公司) 进行扩增。反应体系为:10 μL SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa 公司),上下游引物各 0.4 μL (10 μmol/L),稀释模板 5 μL,DEPC 水 4.2 μL,总体积 20 μL。反应程序为:95 ℃ 预变性 30 s,95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火 15 s,72 ℃ 延伸 30 s,40 个循环,实验结果用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算。

所用内参引物为 q*CiEF1α*-F (CAAAAAGTC-CCCTCGTTGTCTC) 和 q*CiEF1α*-R (AGCAATC-GTTCTTCCTAATGATCTAA); q*AtEF1α*-F (AGAA-GGGTGCCAAATGATGAG) 和 q*AtEF1α*-R (GGA-GGGAGAGAGAAAGTCACAGA)。

**1.2.3 基因克隆与表达载体构建** 以中间锦鸡儿 1 个月苗龄幼苗的 cDNA 为模板,根据 pCanG-HA 表达载体的多克隆位点,设计含有 *Sal* I 和 *Sac* I 酶切位点的特异引物 F-*CiPUB22* (GCGTCGACAT-GGATGAGATCGATGTTTCCT,下划线为 *Sal* I 酶切位点) 和 R-*CiPUB22* (GCGAGCTCTTTCACA-

CATAATTAGGGTACGA,下划线为 *Sac* I 酶切位点) 进行 PCR 扩增,扩增条件为:98 ℃ 预变性 3 min,98 ℃ 变性 15 s,57 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环;72 ℃ 补充延伸 10 min。利用琼脂糖凝胶回收试剂盒 (天根生物公司) 回收目的片段,并连入 pEASY-Blunt Simple 载体中 (北京全式金生物公司),转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞,菌落 PCR 及酶切验证重组子,菌液送测序,将验证正确的质粒连入表达载体 pCanG-HA 中,进行菌落 PCR 及酶切验证,将验证正确的重组质粒电转化农杆菌 GV3101,挑取阳性克隆进行 PCR 与测序验证,本实验所用引物及测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。

**1.2.4 拟南芥遗传转化** 通过浸花法将重组质粒 pCanG-*CiPUB22* 转化野生型拟南芥<sup>[20]</sup>,把收取的种子种在含有 25 mg/L 卡那霉素的 1/2MS 培养基中筛选阳性植株,筛选得到 T<sub>3</sub> 代纯合体株系。提取纯合体株系 RNA,将其反转录成 cDNA,利用实时荧光定量 PCR 对转基因纯合体株系表达量进行检测,选取表达量较高的 3 个株系进行后续实验。

**1.2.5 胁迫处理下种子萌发率检测** 拟南芥种子先用 75% 乙醇灭菌 10 min,再用无水乙醇灭菌 10 min,待种子晾干后分别种在含有 150 mmol/L NaCl,1 μmol/L ABA,400 mmol/L 甘露醇和对照的 1/2MS 培养基中,每个株系 55 颗种子,4 ℃ 同步化处理 3 d,取出置于 22 ℃、16 h 光照/8 h 黑暗的温室中进行培养,24 h 后开始统计萌发率。

## 2 结果与分析

### 2.1 *CiPUB22* 基因的克隆和表达载体构建

分析显示中间锦鸡儿干旱转录组文库中获得的 E3 泛素连接酶编码基因,具有完整的开放阅读框和部分 UTR 序列。因此,根据 pCanG-HA 表达载体设计含有 *Sal* I 和 *Sac* I 酶切位点的特异引物 F-*CiPUB22* 和 R-*CiPUB22*,利用中间锦鸡儿 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,得到目的片段 (图 1, A)。将克隆得到的序列片段连入 pEASY-Blunt-Simple 克隆载体中,将测序验证正确的序列用 *Sal* I 和 *Sac* I 酶切后连入表达载体 pCanG-HA 中,将重组表达载体 pCanG-*CiPUB22* 转化大肠杆菌,挑取阳性克隆菌落质粒,用 *Sal* I 和 *Sac* I 酶切 (图 1, B),结果表明酶切片段正确,重组载体构建成功。将验证正确的重组质粒电转化农杆菌 GV3101,挑取阳性克隆进行 PCR 验证,结果如图 1, C 所示。

### 2.2 CiPUB22 基因序列分析

克隆得到的 *CiPUB22* 基因的 cDNA 序列, 包含 1 260 bp 开放阅读框, 起始密码子 ATG, 终止密码子 TGA, 编码 419 个氨基酸(图 2)。将氨基酸序列在 NCBI 上进行 BlastP 比对, 发现其具有 U-box 型结构域, 与苜蓿 (*Medicago truncatula*) PUB23 蛋白(XP\_013450220.1)、鹰嘴豆 (*Cicer arietinum*) PUB22 蛋白(XP\_004494254.1)、木豆 (*Cajanus cajan*) PUB22 蛋白(XP\_020225250.1)、拟南芥 PUB22 (NP\_190813.1) 和 PUB23 蛋白(OAP08906.1) 相似性分别为 84%、84%、81%、58% 和 58%, 说明克隆得到的该基因属于 U-box 型基因, 因此将其命名为 *CiPUB22*。利用 MEGA5 邻近相接法构建系统进化树(图 3), *CiPUB22* 与苜蓿 PUB23 和鹰嘴豆 PUB22 蛋白聚类到一起, 序列比对结果显示蛋白序列相似性分别为 84%, 亲缘关系最近。

### 2.3 CiPUB22 基因表达分析

利用荧光定量 PCR 对 *CiPUB22* 基因在不同胁迫处理下的表达模式进行分析, 干旱胁迫处理 12 d 后 *CiPUB22* 基因的表达量达到最高水平, 约为未处

理时表达量的 2.5 倍, 15 d 后逐渐下降(图 4, A)。脱水胁迫处理 1 h 后 *CiPUB22* 表达量上升到最高水

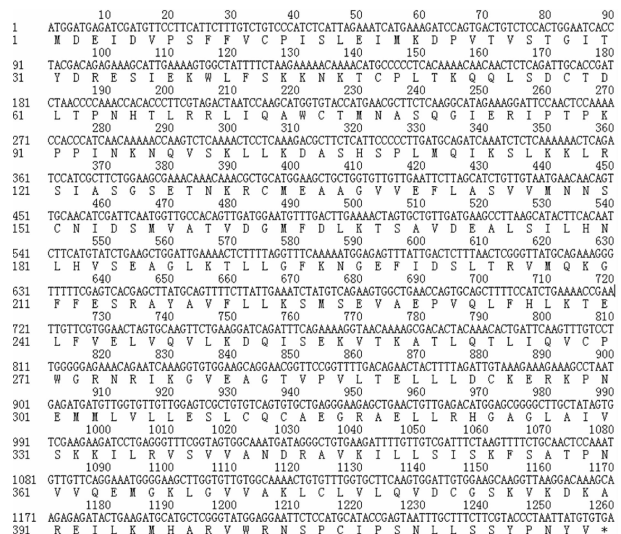
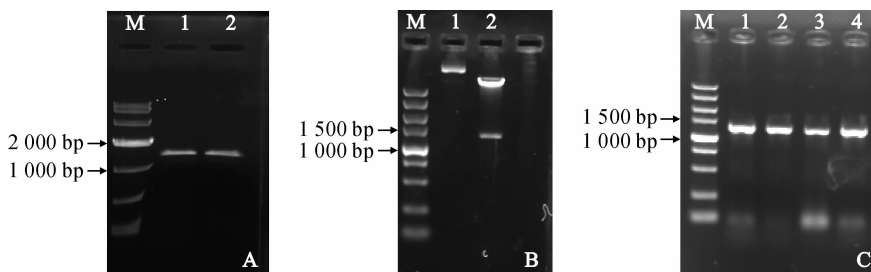


图 2 *CiPUB22* 基因 cDNA 序列及氨基酸序列  
\* . 表示终止密码子  
\* . indicates termination codon  
Fig. 2 The cDNA and deduced amino acid sequences of *CiPUB22*



A. *CiPUB22*, M. DL10000; 1 和 2. *CiPUB22* cDNA; B. pCanG-*CiPUB22* 重组载体酶切验证; 1. 重组载体对照; 2. *Sal* I 和 *Sac* I 双酶切结果; M. DL5000; C. pCanG-*CiPUB22* 菌落 PCR 验证; 1~4. 单克隆; M. DL5000  
图 1 pCanG-*CiPUB22* 表达载体构建  
A. *CiPUB22*, M. DL10000; 1, 2. *CiPUB22* cDNA. B. Identification of pCanG-*CiPUB22* digested by restriction enzyme. 1. Vector control; 2. Digest with *Sal* I and *Sac* I; M. DL5000; C. Identification of pCanG-*CiPUB22* by colony PCR; 1-4. Random single colony; M. DL5000

Fig. 1 The construction of pCanG-*CiPUB22* recombinant vector

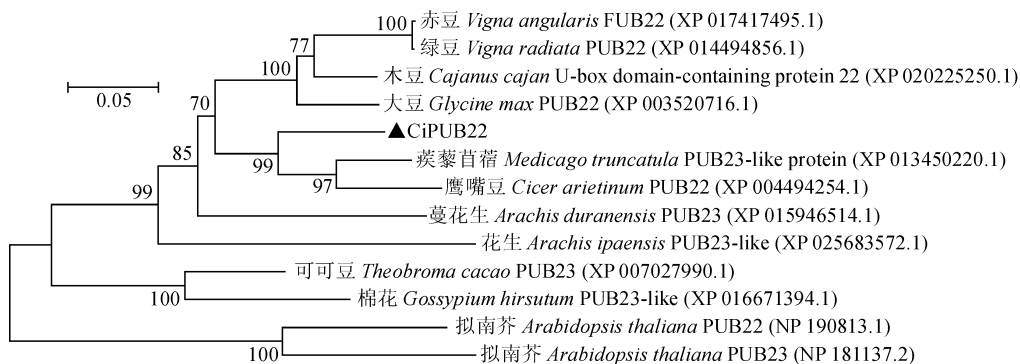


图 3 *CiPUB22* 与其他植物相关蛋白系统进化分析  
Fig. 3 Phylogenetic analysis of *CiPUB22* and other related proteins

平,达到未处理的 12 倍左右,3 h 后表达量开始逐渐下降,12 h 达最低,低于未处理的表达量,24 h 基本恢复到未处理时的表达水平。在 NaCl 胁迫处理后,*CiPUB22* 基因在 1 h 后表达量达最高约为未处理的 35 倍左右,3 h 后呈逐渐下降趋势。在 ABA 处理 1 h 后,*CiPUB22* 基因表达量最高约为未处理的 7 倍,但 3 h 后表达量下降,基本与未处理的表达量一致,6 h 后低于未处理的表达量(图 4, B)。这些结果表明 *CiPUB22* 的转录水平受非生物胁迫诱导,推测 *CiPUB22* 可能参与中间锦鸡儿抵抗非生物胁迫的分子机制。

## 2.4 *CiPUB22* 转基因纯合体表达分析

将重组植物表达载体 pCanG-*CiPUB22* 转入野生型拟南芥,筛选出具有卡那霉素抗性的 T<sub>3</sub> 代阳性纯合植株 8 株,提取这些株系的 RNA,反转录合成 cDNA,利用基因特异引物 F-*CiPUB22* 和 R-*CiPUB22* 进行 PCR 鉴定,如图 5, A 所示,以野生型拟南芥 cDNA 为模板没有扩增出目的条带,而中间锦鸡儿和 8 个转基因株系均扩增出目的条带,表明

*CiPUB22* 基因在转基因株系中表达,利用 qRT-PCR 对 8 个转基因株系的表达水平进行检测,如图 5, B 所示,选取表达量最高的 3 个株系 T<sub>3</sub>-6、T<sub>3</sub>-19 和 T<sub>3</sub>-24 进行后续实验分析。

## 2.5 *CiPUB22* 转基因拟南芥种子萌发率检测

将野生型拟南芥和 3 个过表达株系的种子,分别种在含有 0、150 mmol/L NaCl、1 μmol/L ABA 和 400 mmol/L 甘露醇的 1/2 MS 培养基中,统计种子萌发情况。在 1/2MS 培养基中,3 个过表达株系的萌发率与野生型一致(图 6, A 和 E),1 μmol/L ABA 处理第 4 天时,野生型萌发率为 97%,3 个过表达株系的萌发率分别为 90%、75%和 82%(图 6, B 和 F)。在含有 150 mmol/L NaCl 的培养基中,萌发第 5 天时野生型的萌发率为 94%,3 个过表达株系的萌发率分别为 86%、61%和 66%(图 6, C 和 G)。在 400 mmol/L 甘露醇处理下,3 个过表达株系的萌发率均低于野生型(图 6, D 和 H)。以上结果表明:异源表达 *CiPUB22* 基因降低了拟南芥种子萌发阶段对盐、渗透胁迫和 ABA 的耐受力。

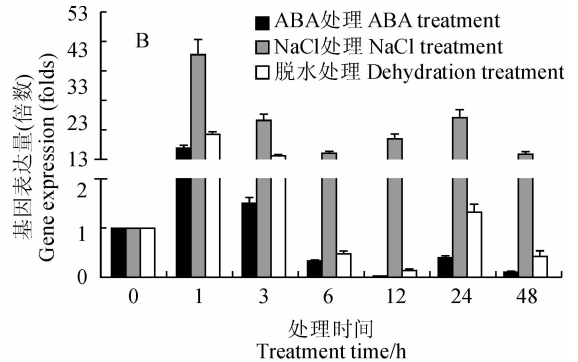
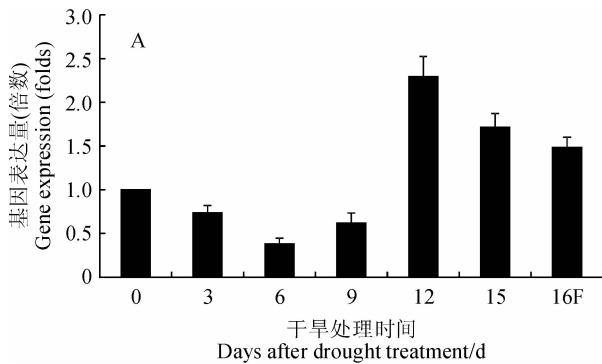
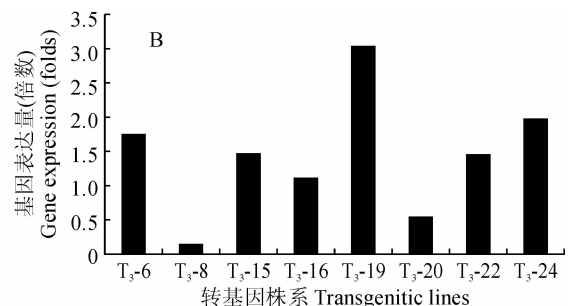
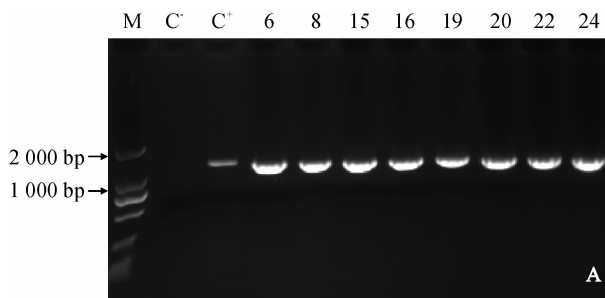


图 4 qRT-PCR 检测各种处理条件下 *CiPUB22* 基因的表达

Fig. 4 The expression of *CiPUB22* under different treatments detected by qRT-PCR



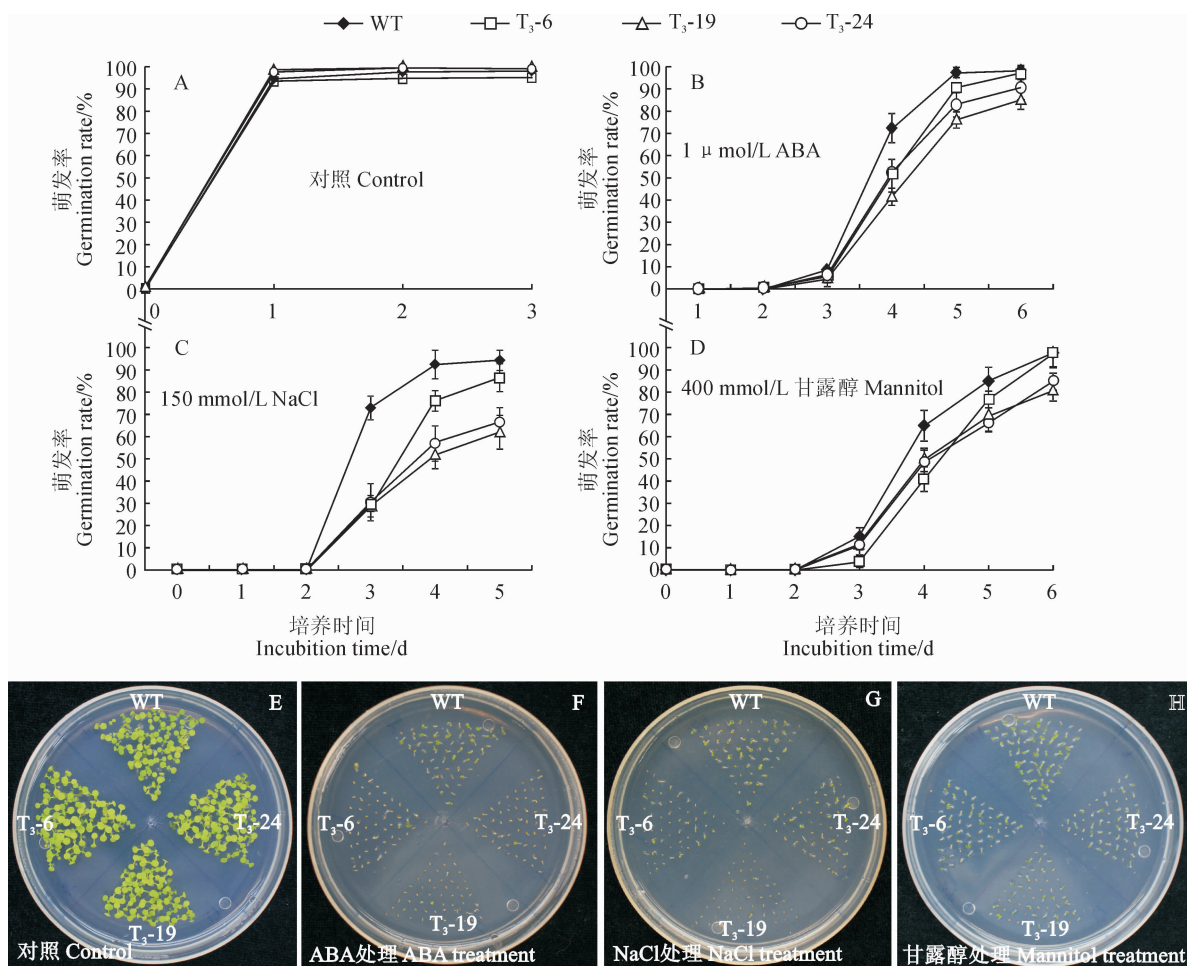
A. *CiPUB22* 转基因株系 RT-PCR 鉴定; M. DL2000; C<sup>-</sup>. 阴性对照(拟南芥 cDNA); C<sup>+</sup>. 阳性对照(中间锦鸡儿 cDNA);

B. qRT-PCR 鉴定 *CiPUB22* 转基因株系表达量

图 5 *CiPUB22* 转基因株系验证与表达水平检测

A. RT-PCR identification of *CiPUB22* transgenic *Arabidopsis* lines; M. DL2000; C<sup>-</sup>. Negative control (*Arabidopsis* cDNA); C<sup>+</sup>. Positive control (*Caragana intermedia* cDNA); B. qRT-PCR analysis of *CiPUB22* expression in *CiPUB22* transgenic *Arabidopsis* lines

Fig. 5 Identification and expression analysis of *CiPUB22* transgenic *Arabidopsis* lines



A~D. 野生型和过表达株系萌发率统计; E~H. 对照, 1  $\mu\text{mol/L}$  ABA, 150 mmol/L NaCl 和 400 mmol/L 甘露醇处理野生型和过表达株系生长情况, 图片为生长第 6 天拍照

图 6 不同处理下转基因株系与野生型萌发率检测

A—D. Seed germination rates of the wild-type and *CiPUB22* transgenic lines. E—H. Phenotypes of the wild-type and *CiPUB22* transgenic lines on 1/2MS medium supplemented with or without 150 mmol/L NaCl, 1  $\mu\text{mol/L}$  ABA and 400 mmol/L mannitol.

Photographs were taken 6 days after the end of stratification

Fig. 6 Germination assays of the transgenic lines and wild type under different treatments

### 3 讨论

环境胁迫,如干旱、盐碱、极端温度等严重影响农作物的产量和品质。植物受到胁迫以后会激活一系列生理反应过程来应对胁迫,泛素化过程是真核生物所特有的选择性降解体内蛋白的过程,生物胁迫和非生物胁迫都会诱导泛素化过程发挥功能,而 E3 泛素连接酶在选择性降解靶蛋白中发挥重要作用,因此对 E3 泛素连接酶的研究已经成为了热点。

已有实验证明,拟南芥 *PUB22* 和 *PUB23* 两个同源 U-box 型 E3 泛素连接酶基因,其转录水平受非生物胁迫诱导,但是对 ABA 不敏感<sup>[12]</sup>。在本实验中,通过 Blast 分析发现,该基因属于 plant U-box 型 E3 泛素连接酶 *PUB22* 基因,*CiPUB22* 受脱水、干旱和盐等胁迫的不同程度的诱导与报道的结果一

致,说明 *CiPUB22* 基因参与响应干旱和盐胁迫,可能与植物抗逆胁迫有关。前人报道 *PUB22* 不受 ABA 处理诱导<sup>[12]</sup>,本实验发现 *CiPUB22* 基因在 ABA 处理 1 h 后,表达量最高约为未处理的 7 倍左右,3 h 后表达量下降基本与未处理的表达量一致,6 h 后低于未处理的表达量。说明 *CiPUB22* 基因能够受 ABA 诱导,这一结果与前人报道不一致,还有待于进一步研究。

ABA 在植物生长发育和响应逆境胁迫过程中发挥重要作用,包括调控种子发育与抑制种子萌发<sup>[21]</sup>,已有研究证明,很多 U-box 型 E3 泛素连接酶参与种子萌发过程,如 *AtPUB18* 和 *AtPUB19* 是 2 个同源性最高的蛋白,*AtPUB18* 或者 *AtPUB19* 任意一个基因突变以后与野生型相比,对 ABA 和盐抑制的种子萌发都没有任何变化;但是



*pub18pub19* 双突变体种子萌发则表现出对 ABA 和盐抑制不敏感的表型<sup>[13]</sup>; *pub44* 和 *pub43* 的突变体种子萌发表现出对 ABA 抑制的不敏感表型<sup>[22]</sup> 等。种子萌发率实验中发现,在 150 mmol/L NaCl 和 400 mmol/L 甘露醇处理后,过表达株系的萌发率低于野生型,说明 *CiPUB22* 减弱了转基因拟南

芥在种子萌发阶段对盐和渗透胁迫的耐受力。在本研究中发现,ABA 处理以后过表达株系的萌发率低于野生型,说明 *CiPUB22* 增加了转基因拟南芥对 ABA 的敏感性。目前还没有报道证明 *CiPUB22* 基因在种子萌发过程中的功能,其具体作用机制还需要进一步验证。

## 参考文献:

- [1] 杨东叶,刘凯于,于泽华. 泛素连接酶 E3[J]. 中国细胞生物学学报, 2005, **27**(3): 281-285.  
YANG D Y, LIU K Y, YU Z H. E3 ubiquitin ligase[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2005, **27**(3): 281-285.
- [2] SMALLE J, VIERSTRA R D. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, **55**(1): 555-590.
- [3] DESHAIES R J, JOAZEIRO C A. RING domain E3 ubiquitin ligases[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, **78**(1): 399-434.
- [4] LEE J H, KIM W T. Regulation of abiotic stress signal transduction by E3 ubiquitin ligases in *Arabidopsis*[J]. *Molecules and Cells*, 2011, **31**(3): 201-208.
- [5] DU Z, ZHOU X, LI L, et al. Plants UPS: a database of plants' ubiquitin proteasome system [J]. *BMC Genomics*, 2009, **10**(1): 1-6.
- [6] MOON J, PARRY G, ESTELLE M. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development[J]. *Plant Cell*, 2004, **16**(12): 3 181-3 195.
- [7] HATAKEYAMA S, NAKAYAMA K I. U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2003, **302**(4): 635-645.
- [8] WIBORG J, O'SHEA C, SKRIVER K. Biochemical function of typical and variant *Arabidopsis thaliana* U-box E3 ubiquitin-protein ligases[J]. *Biochemical Journal*, 2008, **413**(3): 447-457.
- [9] ZENG L R, QU S H, BORDEOS A, et al. Spotted leaf11, a negative regulator of plant cell death and defense, encodes a U-box/armadillo repeat protein endowed with E3 ubiquitin ligase activity[J]. *Plant Cell*, 2004, **16**(10): 2 795-2 808.
- [10] 黄海杰,陈雄庭. 植物泛素/26S蛋白酶体途径研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2008, **28**(7): 127-132.  
HUANG H J, CHEN X T. The progress on the ubiquitin 26S proteasome pathway in plants[J]. *China Biotechnology*, 2008, **28**(7): 127-132.
- [11] 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]. *Plant Cell*, 2008, **20**(7): 1 899-1 914.
- [12] CHO S K, CHUNG H S, RYU M Y, et al. Heterologous expression and molecular and cellular characterization of Ca-

- PUB1 encoding a hot pepper U-Box E3 ubiquitin ligase homolog[J]. *Plant Physiology*, 2006, **142**(4): 1 664-1 682.
- [13] 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.
- [14] CHO S K, BAE H, RYU M Y, et al. PUB22 and PUB23 U-BOX E3 ligases directly ubiquitinate RPN6, a 26S proteasome lid subunit, for subsequent degradation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2015, **464**(4): 994-999.
- [15] ZHAO J F, ZHAO L L, et al. Arabidopsis E3 ubiquitin ligases PUB22 and PUB23 negatively regulate drought tolerance by targeting ABA receptor PYL9 for degradation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, **18**(9): 1 841.
- [16] STEGMANN M, ANDERSON R G, ICHIMURA K, et al. The ubiquitin ligase PUB22 targets a subunit of the exocyst complex required for PAMP-triggered responses in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2012, **24**(11): 4 703-4 716.
- [17] FURLAN G, NAKAGAMI H, ESCHEN-LIPPOLD L, et al. Changes in PUB22 ubiquitination modes triggered by mitogen-activated protein kinase3 dampen the immune response [J]. *Plant Cell*, 2017, **29**(4): 726-745.
- [18] 梅二罕,赵建龙,李俊梅. 发展锦鸡儿的重要意义[J]. 内蒙古林业, 2004, (2): 10-11.
- [19] 牛西午. 关于在我国西北地区大力发展柠条林的建议[J]. 山西农业科学, 1999, **27**(1): 3-7.  
NIU X W. A proposal on actively developing Caragana forest in the orthwest of China[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 1999, **27**(1): 3-7.
- [20] ZHANG X R, HENRIQUES R, LIN S S, et al. Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method[J]. *Nature Protocols*, 2006, **1**(2): 641-646.
- [21] SHEARD L B, ZHENG N. Plant biology signal advance for abscisic acid[J]. *Nature*, 2009, **462**(7 273): 575-576.
- [22] SALT J N, YOSHIOKA K, MOEDER W, et al. Altered germination and subcellular localization patterns for PUB44/SAUL1 in response to stress and phytohormone treatments [J]. *PLoS One*, 2011, **6**(6): e21321.