

小麦泛素结合酶 *TaE2* 的表达分析及蛋白互作

尹丽娟¹, 陈 阳², 刘 沛¹, 陈 明¹, 李连城¹, 徐兆师¹, 马有志¹

(¹中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程/农业部麦类生物学与遗传育种重点实验室, 北京 100081; ²西北农林科技大学农学院, 杨凌 712100)

摘要:以小麦抗逆相关蛋白 TaMAPK2 作为诱饵, 利用酵母双杂交系统筛选小麦 cDNA 融合表达文库, 获得候选蛋白 TaE2。生物信息学分析表明, *TaE2* 基因属于泛素结合酶 *UCE2* 基因家族成员。半定量 RT-PCR 结果表明 *TaE2* 基因在小麦根、茎、叶和种子等器官中均有表达, 荧光定量 PCR 显示 *TaE2* 基因在干旱、高盐和 ABA 胁迫下均上调表达。利用原核表达获得 GST-E2 融合蛋白并使用蛋白标记亲和层析柱纯化。本文报道的小麦 *TaE2* 基因, 为进一步分析泛素蛋白酶体途径在小麦逆境响应中的功能和机制打下基础。

关键词:小麦; *UCE2*; 表达模式; 酵母双杂交; 蛋白纯化

Expression Pattern and Protein Interaction Analysis of a Wheat Ubiquitin-conjugating Enzyme *TaE2*

YIN Li-juan¹, CHEN Yang², LIU Pei¹, CHEN Ming¹, LI Lian-cheng¹, XU Zhao-shi¹, MA You-zhi¹

(¹Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Triticeae Crops, Ministry of Agriculture, Beijing 100081; ²College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling 712100)

Abstract: The ubiquitin-conjugating enzyme, named TaE2, was obtained as the interaction protein of wheat stress-related TaMAPK2, which was used as bait protein to screen the wheat cDNA library by yeast two-hybrid system. Bioinformatic analysis showed that TaE2 was a member of ubiquitin-conjugating enzyme E2 family. Semi-quantitative RT-PCR showed that *TaE2* was expressed in root, stem, leaves, and seeds. *TaE2* was up-regulated under drought, high-salt, and ABA treatments. The fusion protein GST-TaE2 was expressed in *Escherichia. coli* and purified by GST-Trap HP. *TaE2* gene reported in this study lay a foundation for further studying the function and mechanisms of the ubiquitin proteasome pathway response to stresses.

Key words: wheat; *UCE2*; expression pattern; yeast two-hybrid system; protein purification

各种植物病虫害等生物逆境以及干旱、盐碱等非生物逆境是影响作物产量和品质的主要限制因素。研究植物对逆境信号的识别、传递以及响应的分子机制, 对于阐明植物适应逆境机理, 提高作物抗性有着重要意义^[1]。

植物在长期进化过程中形成了一套复杂而精细的信号传递网络, 能对外界胁迫信号产生一系列应答响应, 诱导抗逆相关基因的表达, 保护细胞正常的

生命活动。其中, 泛素蛋白酶体途径在维持细胞功能、抵御环境胁迫、激素响应和衰老等方面发挥着重要作用^[2-4]。植物细胞会因为各种原因产生异常或者受损的蛋白质, 而生物胁迫和非生物胁迫会加速这些异常蛋白质的产生, 影响细胞的正常代谢, 破坏细胞结构和功能的完整性。如果异常蛋白质积累过多, 就不能被修复或重新折叠。泛素蛋白酶体途径是蛋白质降解的重要途径, 主要通过泛素活化酶

收稿日期: 2013-03-19 修回日期: 2013-06-24 网络出版日期: 2013-12-19

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20131219.1310.025.html>

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171546); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1610032011011)

第一作者主要从事植物抗逆分子生物学的研究。E-mail: chenyangrz@126.com

通信作者: 徐兆师, 主要从事植物抗逆分子生物学的研究。E-mail: xuzhaoshi@caas.cn

(E1, ubiquitin-activating enzyme)、泛素结合酶(E2, ubiquitin-conjugating enzyme)和泛素蛋白连接酶(E3, ubiquitin-protein ligating enzyme)三者的次第作用,将多聚泛肽连接到底物蛋白上,最终被 26S 蛋白酶体识别和降解^[5]。其中泛素结合酶 E2 是泛素-蛋白酶体途径的重要组成部分,对泛素化修饰的特异性和精确时空性起关键作用^[6]。

植物体内泛素结合酶 E2 主要参与 DNA 的修复^[7]、光周期调控^[8]、维管分化调控^[9]、缺素胁迫响应^[10-11]和抗逆胁迫响应^[12]等生物过程。近年来,泛素结合酶 E2 在提高植物生物胁迫和非生物胁迫抗性方面的研究已成为一个热点。番茄泛素结合酶 E2 蛋白基因 *LeUBC1* 受到热激和重金属诱导时表达增强,说明胁迫发生时,E2 蛋白可能参与了不正常蛋白的降解^[12]。徐晨曦等^[13]从耐盐灌木柽柳(*Tamarix androssowii*)中获得了 E2 基因,异源表达证明该基因能明显提高烟草的耐旱性。疣粒野生稻受白叶枯病病原菌胁迫时,泛素结合酶基因 *OmE2* 诱导表达,说明该基因可能参与疣粒野生稻胁迫信号传导和抗病应答反应^[14]。

小麦是我国的重要粮食作物之一,非生物胁迫严重影响着小麦的产量和品质。近几年研究表明,促分裂原活化蛋白激酶(MAPK, mitogen-activated protein kinases)参与各种非生物胁迫反应。本试验克隆到 1 个抗逆相关促分裂原活化蛋白激酶 TaMAPK2^[15],用 TaMAPK2 做诱饵,通过酵母双杂交筛选 cDNA 文库的方法,筛选到 1 个与 TaMAPK2 可能互作的蛋白泛素结合酶 TaE2,初步分析了 TaE2 的结构特征和表达特性,并在大肠杆菌中表达了 GST-TaE2 融合蛋白,为研究小麦泛素结合酶的功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料及胁迫处理

小麦材料农家种小白麦(*Triticum aestivum* L.)由中国农业科学院作物科学研究所景蕊莲研究员提供。将室温(昼夜温度 25 ℃/20 ℃)光照培养 10 d 左右的小麦幼苗分别进行干旱(幼苗置于干燥的滤纸上)、高盐(100 mmol/L NaCl 溶液)和 ABA(100 μmol/L)胁迫处理,在处理 0 h、0.5 h、1 h、3 h、6 h、12 h 和 48 h 时取样,迅速置液氮速冻后,于 -80 ℃ 保存备用。

1.2 UCE2 的序列及进化分析

根据 TaE2 氨基酸序列,在 NCBI 上进行 BlastP

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 同源性搜索,不同物种的同源基因使用 DNAMAN 进行氨基酸同源比对;为确定该基因所属蛋白家族,使用 ScanProsite 和 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 程序对基因进行蛋白家族预测^[14];为进一步研究泛素结合酶的进化关系,根据 NCBI 中已登录的 15 个植物物种的泛素结合蛋白序列,使用 DNAMAN 做系统发育树分析。

1.3 RNA 提取和组织表达分析

用 Trizol 试剂盒(TIANGEN,北京)提取小麦根、茎、叶和种子的总 RNA,按照 RNA kit ver. 3.0 cDNA 合成试剂盒(TaKaRa,大连)合成第一链 cDNA。以均一化的 cDNA 为模板,用 TaE2 基因的特异引物(上游引物 5'-TATGGGTCCTCCTGATAGTCCC-3';下游引物 5'-TATGGGTCCTCCTGATAGTCCC-3')进行 PCR 扩增,以小麦 *Actin* 基因作为内参(上游引物 5'-TGGGGAAAATATGGCATC-3';下游引物 5'-CCAGCAAGGTC CAAACGA-3')。

1.4 RNA 提取和荧光定量 PCR 分析

用 Trizol 试剂盒(TIANGEN,北京)分别提取 4 种胁迫下不同时间样品的总 RNA,按照 RNA kit ver. 3.0 cDNA 合成试剂盒(TaKaRa,大连)合成第一链 cDNA 为模板。利用实时荧光定量 PCR 仪(BioRad iCycle, CA, USA)检测目的基因表达模式。反应体系 20 μL,含 2 × Taq PCR MasterMix(含荧光染料)10 μL、10 μmol/L 引物各 0.5 μL、cDNA 模板 1 μL、ddH₂O 8 μL。扩增程序为 95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 20 s,56 ℃ 退火 25 s,72 ℃ 延伸 20 s,40 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。以小麦 *Actin* 基因作为内参。

1.5 酵母双杂交验证互作

采用山梨醇法制备酵母 AH109(Clontech,美国)感受态,采用共转化法将诱饵载体 pGBKT7::TaMAPK2 与捕获载体 pGADT7::TaE2 转化至酵母细胞中。将转化后的酵母划线于 SD/-Trp/-Leu 平板上。若酵母菌株在 SD/-Trp/-Leu 平板上生长则证明诱饵载体和可能的互作质粒载体均已转入酵母菌株 AH109 中。挑取 SD/-Trp/-Leu 平板上生长的单克隆菌株于 1 mL YPDA 液体培养基中。在 30 ℃ 下振荡培养 2 d 后,吸取酵母菌液划线于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-gal 平板上。将平板置于 30 ℃ 倒置培养 3~4 d 后观察酵母菌落的显蓝情况。

1.6 TaE2 基因原核表达诱导及蛋白纯化

根据 TaE2 基因的 cDNA 序列,在正反向引物分

别引入 *Bam*H I/*Xho* I 酶切位点,以 pGADT7::TaE2 质粒为模板,高保真酶 primer star (TaKaRa, 大连), 利用特异引物扩增 TaE2 基因全长(上游引物 5'-TTAGGATCCATGGCTTCAAAACGTATC-3'; 下游引物 5'-AAACTCGAGTCATCCCATGGCATACTTC T-3'),回收目的片段,用 *Bam*H I/*Xho* I 双酶切回收片段及 pGEX-4T-1 载体(TaKaRa, 大连), T4 酶连接, 转化,提取重组质粒。将重组质粒热激转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中。将含有重组质粒的菌液按照 1: 100 的比例转接到 4 mL LB(含 100 mg/L 的 Amp)液体培养基中,37 ℃ 培养至菌液 OD₆₀₀ 达到 0.6 左右,加入 IPTG(终浓度为 1 mmol/L)16 ℃ 诱导过夜,阴性对照不加 IPTG。收集菌体,加入 200 μL ddH₂O,煮沸 10 min,取 10 μL 进行 SDS-PAGE 电泳,观察蛋白诱导表达情况。用同样的方法诱导菌体,收集菌体后用 5 mL 1 × PBS 悬浮,按 100:1 加入菌液裂解酶,用 1 μL/mL Dnase I 消化残留 DNA,室温放置 15 min,冰融法反复冻融 10 次,12000 r/min 离心 10 min,吸取上清液。将收集的上清液用亲和层析柱(GST-Trap HP, GE Healthcare)方法纯化。SDS-PAGE 电泳观察蛋白纯化情况。

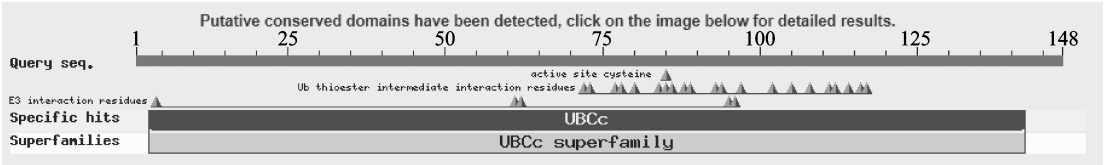


图1 TaE2 蛋白功能域预测

Fig.1 Domains prediction of TaE2 protein



小麦 (*Triticum aestivum*) : AAY29571. 1; 短柄草 (*Brachypodium distachyon*) : XP_00356489. 1; 水稻 (*Oryza sativa Japonica Group*) :

NP_001044640. 2; 玉米 (*Zea mays*) : NP_001104888. 1; 水稻 (*Oryza sativa Indica Group*) : ABR25804. 1; 大豆 (*Glycine max*) : NP_001235332. 1;

野茶树 (*Camellia sinensis*) : AEW24433. 1; 葡萄 (*Vitis vinifera*) : XP_002284203. 1; 苹果 (*Malus domestica*) : ACB87920. 1;

毛果杨 (*Populus trichocarpa*) : XP_002331848. 1; 蓖麻 (*Ricinus communis*) : XP_002509917. 1; 沙冬青 (*Ammopiptanthus mongolicus*) : AFC01193. 1;

黄瓜 (*Cucumis sativus*) : XP_004145921. 1; 长筒石蒜 (*Lycoris longituba*) : AFP44114. 1; 番茄 (*Solanum lycopersicum*) : NP_001234247. 1

图2 TaE2 蛋白多序列比对

Fig.2 Multiple alignment of TaE2 protein

2.2 TaE2 基因的组织特异性表达

组织表达模式对于基因在个体中的功能非常重要。通过 RT-PCR 分析 TaE2 基因在小麦 4 种不同组织中的表达情况(图 4)。实验结果表明,在正常生长条件下,TaE2 基因在小麦根、茎、叶和种子中均

2 结果与分析

2.1 TaE2 同源性比较及进化树分析

结合 ScanProsite 和 SMART 对 TaE2 蛋白分析,发现酶活性位点 74 ~ 89 位的 15 个氨基酸残基以及 85 位的半胱氨酸残基与其他物种的泛素结合酶对应的序列完全匹配,说明 TaE2 具有半胱氨酸催化位点和结合酶的活性,属于泛素结合蛋白家族成员(图 1)。在 NCBI 中 BlastP 搜索发现,TaE2 蛋白序列与二穗短柄草、梗稻、玉米以及籼稻等许多物种的泛素结合蛋白具有极高的相似性。序列比对结果表明,TaE2 蛋白与二穗短柄草、梗稻序列相似性达 99%,与玉米和籼稻的序列相似性达 98%,与大豆和野茶树的相似性达 96%,与葡萄、苹果、杨树、蓖麻、沙冬青、黄瓜、石蒜以及番茄的相似性达 95%,这说明泛素结合酶家族具有高度的保守性(图 2)。进化树分析表明,TaE2 与二穗短柄草、梗稻、玉米和籼稻的泛素结合蛋白聚为一类,而其他 10 个物种的泛素结合蛋白聚为另一类,说明泛素结合蛋白在进化过程中可能形成 2 个不同的方向(图 3)。

有表达,而且表达量基本一致。

2.3 TaE2 基因在各种逆境胁迫下的表达模式

通过荧光定量 PCR 对干旱、高盐和外源 ABA 3 种胁迫下的表达量情况分析(图 5)。结果表明,TaE2 基因对于干旱和高盐胁迫比较敏感,均在 0.5 h

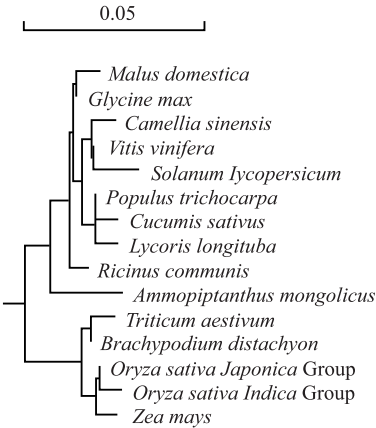


图3 TaE2 氨基酸与其他物种的系统发育树分析
Fig.3 Phylogenetic analysis of TaE2 and other species

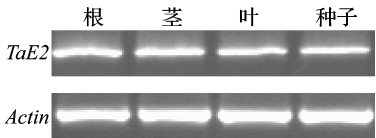
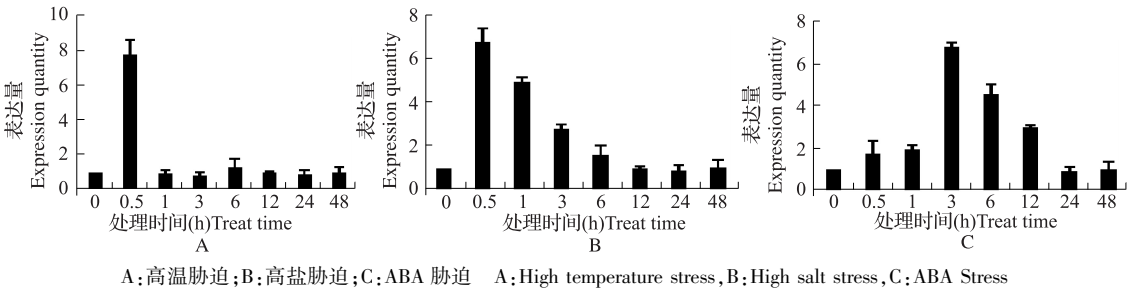
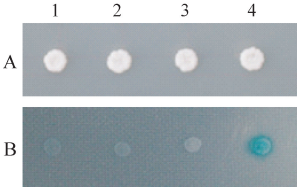


图4 TaE2 基因在小麦不同组织中的表达
Fig.4 Expression of TaE2 gene in different tissues of wheat



A:高温胁迫;B:高盐胁迫;C: ABA 胁迫 A:High temperature stress, B:High salt stress, C:ABA Stress

图5 TaE2 基因在干旱、高盐 and ABA 胁迫下的表达
Fig.5 The expression profiles of TaE2 gene under drought,high-salt,and ABA stresses



1:pGADT7 + pGBKT7,2:pGADT7-TaE2 + pGBKT7,
3:pGADT7 + pGBKT7-TaMAPK,4:pGADT7-TaE2 + pGBKT7-TaMAPK
A:SD/-Trp/-Leu, B:SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-gal

图6 酵母双杂交验证 TaE2 与 TaMAPK 互作
Fig.6 Interaction between TaE2 and TaMAPK in yeast two-hybrid system

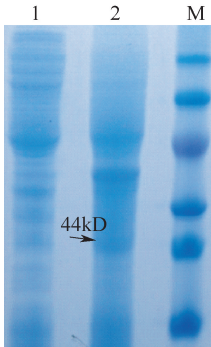
2.5 TaE2 基因的原核表达及蛋白纯化

已转入重组质粒的表达菌株经 IPTG 16 ℃ 诱导过夜后,总蛋白经过 SDS-PAGE 电泳分析,在分子量 44kD 左右可见蛋白表达,与预期大小相同(图 7)。通过液氮反复冻融法分离总蛋白上清液和沉淀,经

时达到最大表达量,分别是对照的 7.7 倍和 6.8 倍,而后干旱胁迫下基因的表达量迅速降低,一直维持在对照表达量水平,而在高盐胁迫下,基因的表达量逐渐降低,到 12 h 后维持到对照表达量水平。在 ABA 胁迫下基因的表达量缓慢上升,到 3 h 时达到最高,为对照的 6.9 倍,然后缓慢降低,到 24 h 后降低到对照表达量水平并保持不变。表达模式结果表明,TaE2 基因参与了干旱、高盐 and ABA 胁迫响应,可能会对提高小麦非生物逆境胁迫抗性发挥作用。

2.4 酵母双杂交验证互作

将诱饵载体与捕获载体共转化进入酵母细胞,同时将 3 组对照组合质粒共转入酵母细胞中,在营养缺陷型 SD/-Trp/-Leu 培养基上划线培养,挑取单菌落摇菌,吸取 1 μL 点到平板上。酵母在 SD/-Trp/-Leu 平板上生长证明 2 个质粒已经全部转化进入酵母细胞中。再吸取菌液点到营养缺陷型 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-gal 培养基上培养,结果显示 2 个重组质粒共转化的酵母菌落能正常生长且菌落显蓝色(图 6)。酵母双杂交系统互作结果初步证实 TaMAPK2 和 TaE2 蛋白发生了相互作用。



M:蛋白分子量;1:GST-TaE2 蛋白未加 IPTG 诱导;
2:GST-TaE2 加 IPTG 诱导;箭头表示诱导的 GST-TaE2 融合蛋白
M;Protein marker, line1:control, line 2:GST-TaE2 fusion protein, Arrow pointes to the GST-TaE2 fusion protein

图7 重组 GST-TaE2 融合蛋白的诱导

Fig.7 The induced of recombinant GST-TaE2 protein

过 SDS-PAGE 分析,GST-TaE2 以可溶性蛋白的形式存在上清液中。将分离的上清液用 GST 亲和层析柱(GST-Trap HP)纯化蛋白,SDS-PAGE 检测结果显示蛋白条带大小约为 44 kD(图 8),无杂带出现,证实已得到单一的目的蛋白。

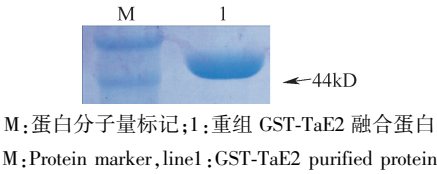


图 8 重组 GST-TaE2 融合蛋白的纯化

Fig. 8 The purification of recombinant GST-TaE2 protein

3 讨论

拟南芥基因组编码 37 个泛素结合酶 E2 基因以及 8 个 E2-like 基因,决定着蛋白泛素化的效率和特异性^[16]。E2 蛋白都包含一个 150 个氨基酸组成的保守催化结构域,内含有一个高度保守的半胱氨酸(cysteine)保守位点;E2-like 蛋白则只包含一个 UBC 结构域,而缺少 E2 酶的半胱氨酸催化位点,因此没有 E2 的酶活性。通过酵母双杂交筛库获得的 TaE2 基因编码的蛋白与其他物种的泛素结合酶具有高度的相似性,其酶活性位点的 15 个氨基酸残基和 85 位的半胱氨酸残基与其他物种的泛素结合酶对应的序列完全匹配,具有半胱氨酸催化位点和结合酶的活性,因此 TaE2 属于泛素结合酶基因。

蛋白激酶催化的蛋白磷酸化和蛋白磷酸酶催化的去磷酸化作用在植物细胞感受各种环境信号及其信号传递过程中起着重要作用,其中 MAPK 的研究已成为一个研究热点。研究发现,MAPK 不仅参与了植物的生长发育过程和激素调控,还在逆境胁迫应答过程中起着重要的作用^[17-19]。在干旱、高盐、病害以及低温等胁迫条件下,水稻 OsMAPK5 在转录水平、蛋白水平及其蛋白激酶的活性水平都被诱导提高,提高转基因水稻对逆境胁迫的抗性^[17]。拟南芥 MPK9 和 MPK12 的基因沉默突变株系中,ABA 接到的气孔关闭过程异常,说明二者参与 ABA 信号通路^[20]。以 TaMAPK2 为诱饵进行酵母双杂交筛库,获得互作蛋白 TaE2,蛋白互作实验初步验证了 TaMAPK2 与 TaE2 蛋白互作。结果表明,TaE2 可能参与 TaMAPK2 的降解过程。泛素蛋白酶体 E2 与 MAPK 共同调控小麦对干旱、高盐逆境响应的信号的传递、基因的表达和细胞质的功能活动,提高植物的抗逆性。

在正常生长条件下,TaE2 在植物体的根、茎、叶和种子等器官均有表达,说明 TaE2 在正常生长条

件下参与植物体正常的生命活动。植物受到非生物胁迫条件下,泛素蛋白酶体途径就会降解植物体内产生的并不断累积的各种异常或者受损的蛋白质,提高植物对于非生物胁迫的抗逆性。例如拟南芥中编码 U-box 蛋白 PUB22 和 PUB23 可以通过泛素化 RPN12a 来共同参与控制干旱信号转导途径^[21]。受胁迫诱导表达上调的基因在提高植物的生物和非生物胁迫抗性上发挥着重要作用^[22-24]。在干旱、高盐和 ABA 胁迫下,TaE2 均表现出上调表达,表明 TaE2 能够参与逆境胁迫响应,可能在提高小麦抗逆性中发挥重要作用。本研究诱导表达了大量的融合蛋白 GST-TaE2,并对目的蛋白进行了亲和层析纯化,获得了高纯度的 GST-TaE2 融合蛋白,为进一步分析 TaE2 蛋白活性以及提高植物体抗逆性的作用奠定了基础。

参考文献

[1] Zhu J K. Plant salt tolerance [J]. Trends Plant Sci, 2001, 6: 66-71

[2] 董发才,宋纯鹏. 植物细胞中的泛素及其生理功能[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(1): 54-59

[3] Ingvarsdén C, Veierskov B. Ubiquitin and proteasome-dependent proteolysis in plant [J]. Plant Physiol, 2001, 112: 451-459

[4] Dreher K, Callis J. Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants [J]. Ann Bot, 2007, 99: 787-822

[5] Smalle J, Vierstra R D. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway [J]. Annu Rev Plant Biol, 2004, 55: 555-590

[6] Pickart C M. Mechanisms underlying ubiquitination [J]. Annu Rev Biochem, 2001, 70: 503-533

[7] Wang B, Elledge S J. Ubc13/Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80/Abraxas/Brcal/Brc36 complex in response to DNA damage [J]. PNAS, 2007, 104: 20759-20763

[8] Lau O S, Deng X W. Effect of Arabidopsis COP10 ubiquitin E2 enhancement activity across E2 families and functional conservation among its canonical homologs [J]. Biochem J, 2009, 418: 683-690

[9] Criqui M C, Engler J D, Camasses A. Molecular characterization of plant ubiquitin-conjugating enzymes belonging to the UbcP4/E2-C/UBCx/UbcH10 gene family [J]. Plant Physiol, 2002, 130: 1230-1240

[10] Lin W Y, Lin S I, Chiou T J. Molecular regulators of phosphate homeostasis in plants [J]. J Exp Bot, 2009, 60: 1427-1438

[11] Peng M S, Hannam C, Gu H L, et al. A mutation in NLA, which encodes a RING-type ubiquitin ligase, disrupts the adaptability of Arabidopsis to nitrogen limitation [J]. Plant J, 2007, 50: 320-337

[12] Feussner K, Feussner I, Leopold I. Isolation of a cDNA coding for an ubiquitin-conjugating enzyme UBC1 of tomato-the first stress-induced UBC of higher plants [J]. FEBS Lett, 1997, 409: 211-215

[13] 徐晨曦,姜静,刘甜甜. 柽柳泛素结合酶基因(E2s)的序列分析及功能验证[J]. 东北林业大学学报, 2007, 35(11): 1-4

[14] 蒋春苗,黄兴奇,付坚,等. 疣粒野生稻泛素结合酶基因的全长 cDNA 序列克隆与分析 [J]. 作物学报, 2012, 38(5): 808-813

[15] 刘沛,徐兆师,晏月明,等. 小麦 TaMAPK2 激酶基因的原核表达及多克隆抗体制备 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(1): 92-95