

水稻泛素连接酶基因 *OsRING6* 的克隆及表达分析

范锡麟¹, 杜强¹, 杨珍珍¹, 何艳冰¹, 王国梁^{1,2}, 王志龙¹

(¹湖南省作物种质创新与资源利用重点实验室/湖南农业大学农学院, 长沙 410128;

²Department of Plant Pathology, The Ohio State University, Columbus 43210)

摘要: RING (Really Interesting New Gene) 型泛素连接酶在水稻生长、发育、生物和非生物胁迫中发挥着重要作用。根据水稻基因组信息, 利用 RT-PCR 技术从粳稻日本晴中克隆了 *OsRING6* 基因的 CDS 序列。该基因的全长 cDNA 为 1355 bp, 包括长度为 918 bp 的 CDS, 编码一个含 305 个氨基酸的蛋白, 预测该蛋白的分子量和等电点分别为 32.96 kD 和 3.49, 与籼稻 (CT832014) 和短花药野生稻 (XM_006659599) 中同源蛋白的序列相似性最高, 分别为 97% 和 83%。IPTG 诱导表达的 MBP-*OsRING6* 重组蛋白的表观分子量约为 100 kD, 比理论值 76 kD 大。启动子元件分析表明, 其含有与干旱胁迫、光反应、ABA 和 GA 信号传导相关的调控元件。Real-time PCR 结果表明, 该基因在水稻根、茎、叶、叶鞘、花和种子中都有表达, 在萌发后 4 d 的种子中表达量最高, 花中的表达量最低, 且该基因的表达受到盐和 ABA 的诱导及 PEG 的抑制。*OsRING6* 基因的克隆为水稻抗逆分子育种和功能分析提供了优质基因资源。

关键词: 水稻; 泛素连接酶; RING; 启动子; 表达分析

Cloning and Expression Analysis of the Rice Ubiquitin Ligase Gene *OsRING6*

FAN Xi-lin¹, DU Qiang¹, YANG Zhen-zhen¹, HE Yan-bing¹, WANG Guo-liang^{1,2}, WANG Zhi-long¹

(¹Hunan Provincial Key Laboratory of Crop Germplasm Innovation and Utilization/College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha 410128; ²Department of Plant Pathology, The Ohio State University, Columbus 43210)

Abstract: RING (Really Interesting New Gene) ubiquitin ligases play significant roles in rice, such as growth, development, resistance to biotic and abiotic stresses. In this study, we cloned the RING finger gene (*OsRING6*) from the *Japonica* cultivar Nipponbare (*Oryza sativa*) based on the sequence analysis of the rice genome and the RT-PCR method. The *OsRING6* full cDNA length was 1355 bp and contained a CDS of 918 bp nucleotides, and encoded a protein of 305 amino acids with the deduced molecular weight of 32.96 kD and pI value of 3.49. The similarity comparison revealed that the CDS sequence of *OsRING6* shared 97% and 83% homology with *Oryza sativa Indica* (CT832014) and *Oryza brachyantha* (XM_006659599), respectively. The relative molecular weight of the MBP-*OsRING6* recombinant protein induced by IPTG was about 100 kD, which was much bigger than deduced value of 76 kD. Promoter analysis indicated that it contained several regulatory elements related to drought stress, light response, ABA and GA signal transduction. Real-time PCR experiments showed that *OsRING6* was expressed mainly in root, stem, leaves, leaf sheath, flowers and seed, and its expression level was the highest in germinated seeds and the lowest in flowers among these detected tissues. We also found that *OsRING6* could be induced when treated with salt and ABA and inhibited by PEG. These data suggested that *OsRING6* might be involved in abiotic stresses such as salt and drought, and could be used

收稿日期: 2015-04-02 修回日期: 2015-04-29 网络出版日期: 2016-01-28

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160128.1531.020.html>

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31571995); 湖南省高校科技创新团队项目 (2012); 湖南省研究生科研创新项目 (CX2014B288)

第一作者研究方向为水稻抗逆分子生物学。E-mail: 459055335@qq.com

通信作者: 王志龙, 主要从事作物遗传育种与水稻抗逆分子生物学研究。E-mail: zhilongwang@126.com

for further functional study and breeding in rice.

Key words: rice; ubiquitin ligase; RING; promoter; expression analysis

水稻(*Oryza sativa* L.)是我国最重要的粮食作物,生物和非生物胁迫是引起水稻减产的重要因素之一。因此,克隆和利用新的抗胁迫基因,成为解决这一问题的有效途径。

泛素化修饰(ubiquitination)是一种广泛存在于真核细胞中的翻译后修饰系统,其主要作用是标记需要被降解的靶蛋白。泛素化过程需要3种泛素化酶的协同参与,即泛素活化酶 E1(ubiquitin activating enzyme),泛素结合酶 E2(ubiquitin-conjugating enzyme)和泛素连接酶 E3(ubiquitin ligase)。E1 负责激活游离的泛素分子并将其转移到 E2 上,E2 再将泛素分子通过 E3 转移至靶标蛋白上,E3 则负责对靶标蛋白的特异性识别,最后泛素化的靶蛋白被 26S 蛋白酶体识别并降解^[1]。根据亚基组成和作用机制,泛素连接酶 E3 又可分为单亚基类型(如 HECT、RING/U-box)和多亚基类型(如 SCF 复合体、后期促进复合体 APC 等^[2])。

近年来,已从高等植物中克隆了大量相关的泛素连接酶基因,锌指结构(RING-finger)泛素连接酶基因是其中分布最广泛、结构最保守的一类,其广泛参与多种生物学过程的调控,包括植物生长^[3-4]、发育^[5-6]、代谢^[7-8]、生物胁迫^[9-12]和非生物胁迫^[13-16]。此外,在拟南芥^[17-24]、烟草^[25]、玉米^[26]、小麦^[27]、大豆^[28]、豇豆^[29]和葡萄^[30]中也鉴定了与生物胁迫和非生物胁迫相关的泛素连接酶基因。本课题组在前期研究中发现了多个 RING 型的 E3 泛素连接酶基因,并从 *RING1* 开始命名,其中 *RING4*(AK068302)已被证明能正调控水稻对稻瘟病的抗性^[9]。本研究通过 RT-PCR 技术克隆了另一个 RING 型泛素连接酶基因 *RING6* 的 CDS 序列,分析了该基因的启动子响应元件,并通过 Real-time PCR 分析了该基因在水稻不同组织和不同胁迫条件下的表达特征,以及进行该基因编码蛋白的原核表达,为水稻抗逆基因工程提供了基因资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料和试剂

供试材料为 3 叶期的粳稻品种日本晴。植物总 RNA 提取试剂盒购自百泰克公司;First Strand cD-

NA Synthesis Kit 和蛋白分子标准购自 Thermo; SYBR Premix Ex TaqTM(RR420)购自 TaKaRa;Fast Pfu 高保真聚合酶和 *E. coli* Rosetta(DE3)感受态细胞购自北京全式金公司;原核表达载体 pMAL-c2X(NEB 公司)由本实验室保存;ABA 和 PEG6000 购自 Sigma;Anti-MBP 鼠单抗和 HRP 偶联的 Goat-anti-mouse 二抗购自 Proteintech;PVDF 膜和 ECL 化学发光液购自 Millipore;引物合成及测序由上海生工生物技术有限公司完成。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 的合成

在液氮中将不同材料研磨成粉末,按照百泰克植物总 RNA 提取试剂盒的操作步骤进行实验,经电泳检测后取 1 μg 总 RNA,经 DNase I 消化,按照 First Strand cDNA Synthesis 试剂盒说明书合成第 1 链 cDNA。

1.3 *OsRING6* 基因的生物信息学分析

根据 *OsRING6* 基因的 CDS 序列,通过 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov/)上的 BLAST 程序对 *OsRING6* 基因及其推导的氨基酸序列进行 Blast 比对和保守功能域预测;通过 <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>分析 *OsRING6* 基因的启动子响应元件;采用 DNASTAR 中的 MegAlign 软件构建 *OsRING6* 的系统进化树并进行保守结构域分析,分析该基因的进化关系。

1.4 *OsRING6* 原核表达载体的构建及诱导表达

根据水稻 *OsRING6* 的基因序列,分别设计引物(RING6-F: 5'-ggaattcatggacgccccaagg-3', RING6-R: 5'-cccaagcttcatgcccgggtgtctgt-3', 下划线分别为 *EcoRI* 和 *Hind* III 酶切位点)进行 PCR 扩增,反应体系为 5 × buffer 10 μL, dNTPs(2.5 μmol/L)2 μL, 引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, cDNA 模板 2 μL, Fast Pfu 1 μL, ddH₂O 34 μL。反应程序为 95℃ 预变性 2 min, 30 个循环(95℃ 变性 20 s, 56℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 30 s), 72℃ 延伸 5 min。电泳回收 PCR 产物,将 PCR 产物与 pMAL-c2X 质粒同时经 *EcoRI* 和 *Hind* III 双酶切,回收片段和载体,连接转化,将阳性克隆测序验证,将测序正确的重组质粒命名为 pMAL-*OsRING6*。

将重组质粒 pMAL-*OsRING6* 转化 *E. coli* Rosetta(DE3)感受态细胞,接种于含 Amp 100 mg/L 的 LB 液体培养基中,37℃ 振荡培养过夜,再以 1:100 接种

扩大培养,继续培养至 $OD_{600} = 0.5$ 时,添加终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达(同时以未添加 IPTG 的菌液作为阴性对照), 37°C 继续振荡培养 5 h 。离心收集菌体,加入 $5 \times \text{SDS}$ 上样缓冲液, 100°C 变性 10 min ,进行 SDS-PAGE 电泳,分析该蛋白的原核表达状况。

待电泳完成后,取出 PAGE 胶,将 PVDF 膜裁剪成适当大小,甲醇预处理后 100 V 恒压转膜 90 min 。取出 PVDF 膜,PBST 洗涤 3 次,每次 5 min , 10 mL 5% 脱脂奶粉/PBST 室温封闭 1 h 。倒去牛奶,加入 10 mL PBST 和 $2 \mu\text{L}$ anti-MBP,室温孵育 1 h 。PBST 洗涤 5 次,每次 5 min 。加入 10 mL PBST 和 $2 \mu\text{L}$ HRP 偶联二抗,室温孵育 1 h 。PBST 洗涤 5 次,每次 5 min ,取出 PVDF 膜置于 ECL 化学发光液中,暗室压片。

1.5 *OsRING6* 基因的表达分析

根据 *OsRING6* 的 CDS 序列,设计 Real-time PCR 引物 (*OsRING6*-qF: $5'$ -ccgggcatgacatcactaca- $3'$; *OsRING6*-qR: $5'$ -tgagcgtcttaaccagacc- $3'$),以水稻泛素基因 *Ubiquitin* 为内参 (*UBQ*-qF: $5'$ -aacagctgaggc-ccaaga- $3'$; *UBQ*-qR: $5'$ -acgattgatttaaccagtcctga- $3'$)。以 $1/2 \text{ MS}$ 液体培养基处理的 3 叶期日本晴为材料,选取根、茎、叶、叶鞘、花、干种子和萌发后 4 d 的种子。以分别经 200 mmol/L NaCl、 20% PEG6000 或 $100 \mu\text{mol/L}$ ABA 处理的根部样品为材料,并于 0 h 、 1 h 、 3 h 、 6 h 和 12 h 取样^[31-32],相同处理的 3 份材料混合后作为一个样品。利用 ABI StepOne 实时定量 PCR 仪对 *OsRING6* 在水稻不同组织和不同胁迫处理时间点的样品进行组织表达特异性和胁迫表达分析,反应体系为 SYBR Premix Ex Taq $10 \mu\text{L}$,上下游

引物 ($10 \mu\text{mol/L}$) 各 $0.4 \mu\text{L}$, ROX Reference Dye ($50 \times$) $0.4 \mu\text{L}$, cDNA 模板 $2 \mu\text{L}$, ddH₂O $7.8 \mu\text{L}$ 。反应程序为 95°C 预变性 30 s , 40 个循环 (95°C 变性 5 s , 60°C 退火 30 s),每个样品 3 孔重复,每个处理 3 次生物学重复,利用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算 *OsRING6* 基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 *OsRING6* 基因的生物信息学分析

通过序列比对,*OsRING6* 在水稻中以单拷贝形式存在,没有高度同源的基因,其 cDNA 全长为 1355 bp ,包含长度为 69 bp 的 $5'$ -非翻译区 ($5'$ -UTR) 和 368 bp 的 $3'$ -非翻译区 ($3'$ -UTR) 以及长度为 918 bp 的 CDS 序列,编码 1 个含 305 个氨基酸的多肽,推测其分子量和等电点分别为 32.96 kD 和 3.49 。将该基因及其编码的蛋白质通过 NCBI 的 Blast 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行比对,分析发现,其与 NCBI 数据库中籼稻 (CT832014)、短花药野生稻 (XM_006659599)、毛竹 (FP101770)、二穗短柄草 (AK425551)、大麦 (AK373556) 和小麦 (AK331217) 同源基因的核苷酸序列相似性分别为 98% 、 88% 、 91% 、 92% 、 90% 和 90% ,氨基酸序列的相似性分别为 97% 、 83% 、 69% 、 68% 、 67% 和 67% 。

通过 DNASTAR 软件的 Clustal W 程序进行多重序列比对,构建 *OsRING6* 的系统进化树(图 1),发现在分析序列中,水稻 *OsRING6* 与籼稻 (CT832014) 的亲缘关系最近,与玉米 (NM_001155824) 的亲缘关系较远。

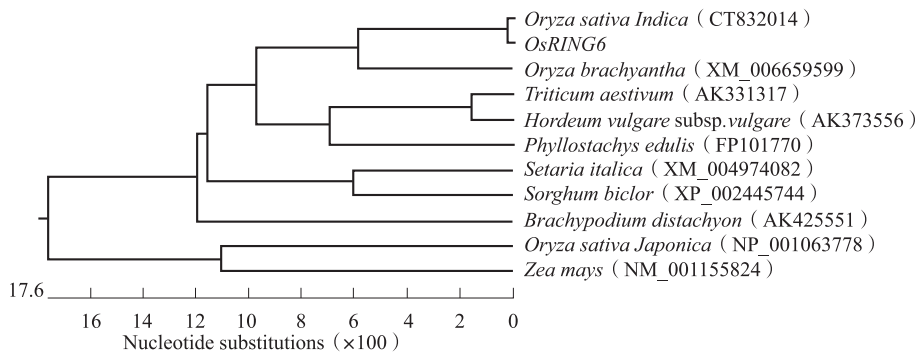


图 1 水稻 *OsRING6* 与其他物种同源基因的进化树分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *OsRING6* and its homologous genes

对水稻 *OsRING6* 蛋白的保守功能域和结合位点的分析表明(图 2),该蛋白属于 RING (Really Interest-

ing New Gene) 结构域家族,在 C-端 $252 \sim 297$ 氨基酸的位置含有一个高度保守的 $\text{C}_3\text{H}_2\text{C}_3$ (RING-H₂ finger)

结构域, C²⁵³、C²⁵⁶、C²⁷¹、C²⁷⁹、C²⁹⁰ 和 C²⁹³ 以及 H²⁷³ 和 H²⁷⁶ 分别为保守的半胱氨酸和组氨酸残基, 通过形成

锌指结构以结合锌离子, 半胱氨酸和组氨酸残基的突变会导致 E3 泛素连接酶活性的丧失^[13,23]。

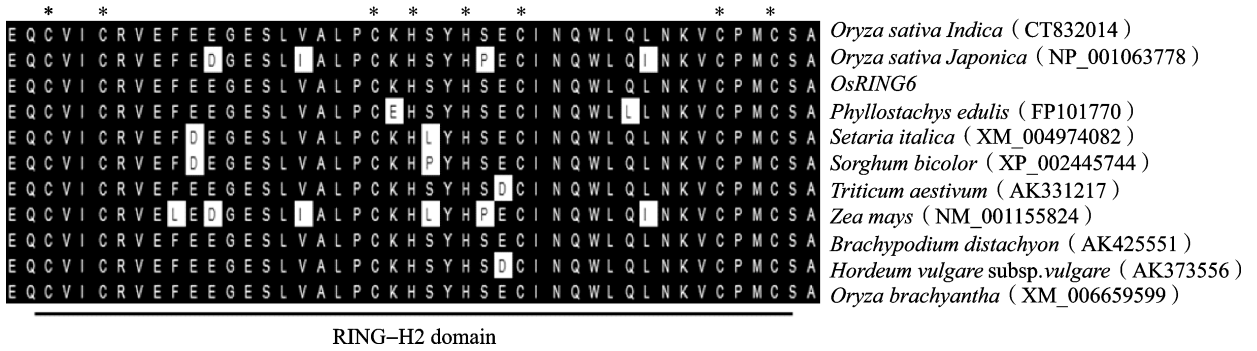


图 2 OsRING6 和其他物种同源蛋白 RING-H2 结构域比对

Fig. 2 Multiple alignment of RING-H2 finger from OsRING6 and its homologous proteins

通过数据库 <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/> 分析 *OsRING6* 基因的启动子响应元件, 结果表明 (表 1), 其 5' 端上游 1500 bp 的启动子区域包含有与植物光反应调控相关的 GAG-motif、G-box、Gap-box、TCT-motif 和 C-box 元件, 与植物 ABA 信号传导途径相关的 ABRE 和 motif II b 元件, 与植物干旱胁迫反应相关的 MBS 元件, 与植物 GA 信号传导途径相关的 P-box 元件以及与胚乳表达相关的 Skn-1 motif 元件。

表 1 *OsRING6* 启动子顺式作用元件分布及数量

Table 1 Distribution and numbers of cis-elements of *OsRING6* gene

启动子元件	数量	识别序列	功能
Promoter cis-elements	Numbers	Target sequence	Function
MBS	2	T/CAACTG	干旱响应元件
ABRE	2	C/TACCTG	ABA 响应元件
	1	GCCCGGTGGC	
Motif II b	1	CCGCCGCGCT	ABA 响应元件
GAG-motif	1	AGAGACT	光反应元件
G-box	1	CACGTG	光反应元件
Gap-box	1	CAAATGAAA/GA	光反应元件
TCT-motif	1	TCTTAC	光反应元件
C-box	1	CTGACGTACAG	光反应元件
P-box	1	CCTTTTG	GA 响应元件
Skn-1 motif	1	GTCAT	胚乳表达相关

2.2 *OsRING6* 基因 CDS 的克隆与 *OsRING6* 蛋白的原核表达

将引物 RING6-F 和 RING6-R 扩增 cDNA 得到的 PCR 产物及 pMAL-c2X 质粒经 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切、连接、转化, 待重组质粒经双酶切验证后 (图 3 和图 4), 将构建好的重组质粒命名为 pMAL-*OsRING6*。

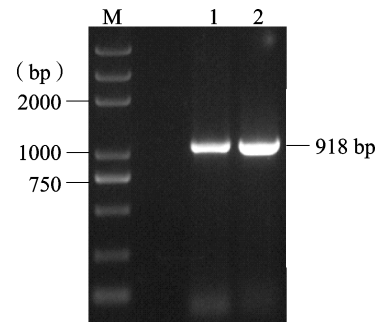


图 3 *OsRING6* 的 PCR 扩增电泳图

Fig. 3 Electrophoretogram of *OsRING6* amplification

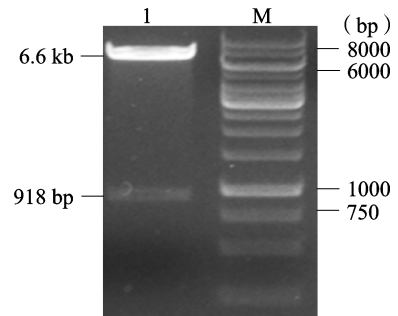
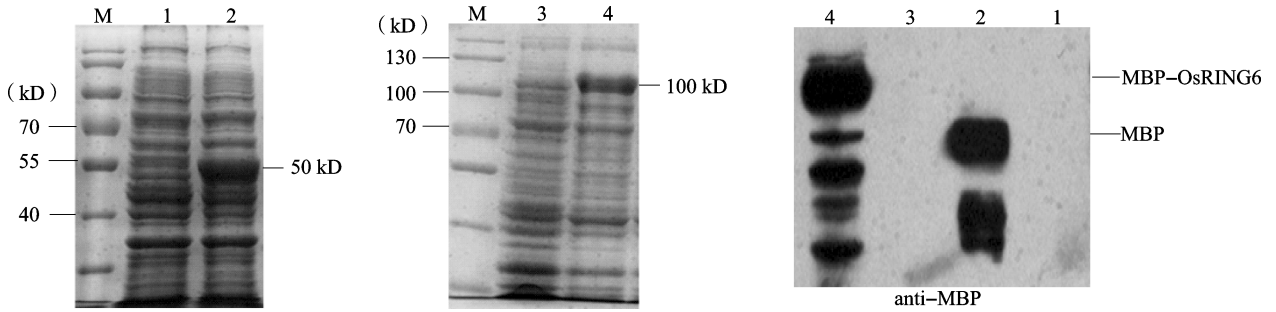


图 4 pMAL-*OsRING6* 质粒双酶切电泳图

Fig. 4 Double digestion electrophoretogram of pMAL-*OsRING6* plasmid

将重组质粒 pMAL-*OsRING6* 转入大肠杆菌 Rosetta(DE3) 表达菌株, 经 IPTG 诱导表达和 SDS-PAGE 电泳分析(图 5), 未经 IPTG 诱导的菌液没有表达出相应蛋白; IPTG 诱导后空载体编码的 MBP 蛋白的大小约为 50 kD, 与预期结果一致; 而 MBP-*OsRING6* 重组蛋白的表观大小约为 100 kD, 比理论

值 76 kD 大。Western blot 也表明, MBP 和 MBP-*OsRING6* 重组蛋白能被 anti-MBP 抗体检测到(箭头所示), 其余条带应该为相应蛋白部分降解后的特异性蛋白, 这些结果表明, *OsRING6* 蛋白可能在该大肠杆菌表达系统中经过了蛋白翻译后修饰, 这为后续蛋白纯化及离体泛素化实验奠定了基础。



M: 蛋白分子标准; 1 ~ 2: MBP 未诱导的总蛋白和诱导的总蛋白; 3 ~ 4: MBP-*OsRING6* 未诱导的总蛋白和诱导的总蛋白

M: Protein marker, 1-2: Not induced and induced total protein of MBP, 3-4: Not induced and induced total protein of MBP-*OsRING6*

图 5 pMAL-c2X 和 pMAL-*OsRING6* 在大肠杆菌 Rosetta(DE3) 中表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

Fig. 5 SDS-PAGE and Western blot analysis of the expressed products of pMAL-c2X and pMAL-*OsRING6* in *E. coli* Rosetta(DE3)

2.3 *OsRING6* 基因的表达分析

实时定量 PCR 结果表明(图 6), *OsRING6* 基因在水稻根、茎、叶、叶鞘、花和种子中都有表达, 其中萌发后 4 d 的种子中表达量最高, 干种子的表达量次之, 花的表达量最低, 且萌发后 4 d 的种子的表达量是干种子的 1.48 倍, 表明该基因可能与种子萌发有关。并且已有文献报道了与水稻种子萌发相关的泛素连接酶基因^[5]。

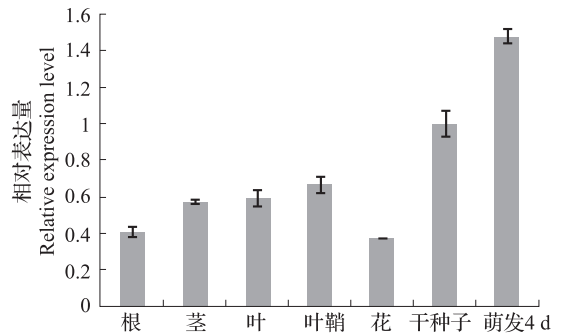


图 6 *OsRING6* 基因在水稻不同组织的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of *OsRING6* in various tissues of rice

以 0 h 根部的表达量为基准, 对材料进行不同胁迫时间点的表达分析(图 7), 结果表明, 200 mmol/L NaCl 处理 1 h 和 3 h 时, *OsRING6* 在根部表达量最高, 分别是处理前的 2.18 倍和 2.13 倍, 此后开始下降并于 9 h 恢复至正常水平, 这说明

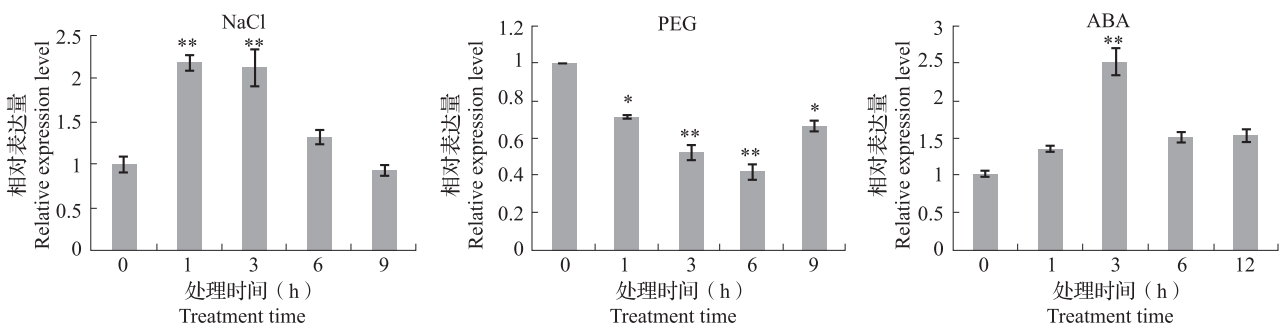


图 7 *OsRING6* 在 NaCl, PEG 和 ABA 胁迫条件下的表达分析

Fig. 7 Expression analysis of *OsRING6* under treatment with NaCl, PEG and ABA

OsRING6 可能作为早期响应基因在盐胁迫中起调控作用。经 20% PEG 模拟干旱处理, *OsRING6* 从 1 h 到 6 h 的表达量呈下降趋势, 并于 6 h 时降至最低, 为处理前的 0.42 倍, 此后开始恢复, 并于 9 h 时恢复至处理后 1 h 时的水平。100 $\mu\text{mol/L}$ ABA 处理 3 h 时, *OsRING6* 在根部表达量达到峰值, 为处理前的 2.48 倍, 此后开始逐渐下降。这两组结果暗示, *OsRING6* 可能以依赖于 ABA 的信号传导途径在干旱胁迫中起调控作用。

3 结论与讨论

目前国内外在拟南芥和水稻中还没有该基因研究的报道。本研究通过生物信息学分析与定量 PCR 技术以及蛋白原核表达相结合的手段, 首次从水稻中克隆了 *OsRING6* 基因的 CDS 序列, 分析发现该基因同时在种子萌发、干旱及盐胁迫、ABA 信号传导和光周期调控中起着重要作用。通过序列比对发现, 该基因 C-末端含有高度保守的 RING 结构域, 其保守的半胱氨酸和组氨酸残基的突变会导致 E3 泛素连接酶活性的丧失。蛋白序列比对结果表明, 其与籼稻和短花药野生稻中同源蛋白的序列相似性较高, 分别为 97% 和 83%。不同组织的表达分析发现, *OsRING6* 基因在水稻根、茎、叶、叶鞘、花和种子中都有表达, 在萌发后 4 d 的种子中表达量最高, 干种子的表达量次之, 花的表达量最低, 暗示 *OsRING6* 在不同组织中存在表达时空性差异, 其在种子萌发前后表达量的变化表明该基因可能与水稻种子萌发有关。不同胁迫处理表达分析发现, *OsRING6* 表达能受到 NaCl 诱导, 并在早期做出应答反应, 暗示 *OsRING6* 可能作为早期响应基因在盐胁迫中起调控作用; *OsRING6* 表达还受到 PEG 的抑制和 ABA 的诱导, 推测其可能参与了干旱胁迫和 ABA 信号传导途径的调节。此外, *OsRING6* 启动子元件分析表明, 其启动子区域包含有与 ABA 信号传导及干旱胁迫相关的 ABRE、motif II b 和 MBS 元件, 进一步暗示 *OsRING6* 基因可能与依赖于 ABA 信号传导途径的干旱胁迫有关。蛋白原核表达及 western blot 结果表明, MBP-*OsRING6* 重组蛋白的表观大小约为 100 kD, 比理论值 76 kD 大; 而空载体编码的 MBP 蛋白的大小与理论值相符, 这表明 *OsRING6* 蛋白在该大肠杆菌表达系统中可能经过了蛋白翻译后修饰。目前, 本课题组已获得了 *OsRING6* 相关的转基因材料, 下一步将重点关注 *OsRING6* 基因在 ABA 信号传导途径和干旱胁迫中的功能研究, 同时将对光

周期调控、GA 信号传导等方面进行探讨。此外, 还将对 RING 结构域中半胱氨酸或组氨酸残基进行点突变, 获得失去 E3 泛素连接酶活性但不影响蛋白互作的突变类型, 以便开展 *OsRING6* 蛋白的离体泛素化和酵母双杂交分析。

参考文献

- [1] Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life [J]. *Embo J*, 1998, 17: 7151-7160
- [2] Vierstra R D. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 385-397
- [3] Xie Q, Guo H S, Dallman G, et al. SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals [J]. *Nature*, 2002, 419: 167-170
- [4] Hu X, Qian Q, Xu T, et al. The U-Box E3 ubiquitin ligase TUD1 functions with a heterotrimeric G a subunit to regulate brassinosteroid-mediated growth in rice [J]. *PLoS Genet*, 2013, 9 (3): e1003391
- [5] Park G G, Park J J, Yoon J, et al. A RING finger E3 ligase gene, *Oryza sativa* Delayed Seed Germination 1 (*OsDSG1*), controls seed germination and stress responses in rice [J]. *Plant Mol Biol*, 2010, 74 (4-5): 467-478
- [6] Li S, Li W, Huang B, et al. Natural variation in PTBI regulates rice seed setting rate by controlling pollen tube growth [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2793
- [7] Kobayashi T, Nagasaka S, Senoura T, et al. Iron-binding haemerythrin RING ubiquitin ligases regulate plant iron responses and accumulation [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2792
- [8] Lim S D, Hwang J G, Han A R, et al. Positive regulation of rice RING E3 ligase OsHIR1 in arsenic and cadmium uptakes [J]. *Plant Mol Biol*, 2014, 85: 365-379
- [9] Li W, Zhong S, Li G, et al. Rice RING protein OsBB1 with E3 ligase activity confers broad-spectrum resistance against *Magnaporthe oryzae* by modifying the cell wall defence [J]. *Cell Res*, 2011, 21 (5): 835-848
- [10] Park C H, Chen S, Shirsdkar G, et al. The *Magnaporthe oryzae* effector AvrPiz-t targets the RING E3 ubiquitin ligase APIP6 to suppress pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in rice [J]. *Plant Cell*, 2012, 24 (11): 4748-4762
- [11] Rosebrock T R, Zeng L, Brady J J, et al. A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity [J]. *Nature*, 2007, 448 (7151): 370-374
- [12] Liu L, Jin L, Huang X, et al. OsRFP2-10, a RING-H2 finger E3 ubiquitin ligase, is involved in rice antiviral defense in the early stages of rice dwarf virus infection [J]. *Mol Plant*, 2014, 7 (6): 1388-1404
- [13] Ning Y, Jantasuriyarat C, Zhan Q, et al. The SINA E3 ligase OsDIS1 negatively regulates drought response in rice [J]. *Plant Physiol*, 2011, 157 (1): 242-255
- [14] Lim S D, Cho H Y, Park Y C, et al. The rice RING finger E3 ligase, OsHCH1, drives nuclear export of multiple substrate proteins and its heterogeneous overexpression enhances acquired thermotolerance [J]. *J Exp Bot*, 2013, 64 (10): 2899-2914
- [15] Lourenco T, Sapeta H, Figueiredo D D, et al. Isolation and characterization of rice (*Oryza sativa* L.) E3-ubiquitin ligase OsHOS1 gene in the modulation of cold stress response [J]. *Plant Mol Biol*, 2013, 83 (4-5): 351-363
- [16] Fang H, Meng Q, Xu J, et al. Knock-down of stress inducible *OsRFP1* encoding an E3 ubiquitin ligase with transcriptional activation activity confers abiotic stress tolerance through enhancing antioxidant protection in rice [J]. *Plant Mol Biol*, 2015, 87 (4-5): 441-458

- [17] Tian M, Lou L, Yu F, et al. The RING finger E3 ligase STRF1 is involved in membrane trafficking and modulates salt stress response in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2015, doi:10.1111/tpj.12797
- [18] Zhang H, Cui F, Wu Y, et al. The RING finger ubiquitin E3 ligase SDIR1 targets SDIR1-INTERACTING PROTEIN1 for degradation to modulate the salt stress response and ABA signaling in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2015, 27(1):214-227
- [19] 姜颖, 曹言勇, 路运才, 等. 拟南芥中 RING 型 E3 泛素连接酶基因 *AtGW2* 的克隆和功能分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(3):448-454
- [20] Xu D, Lin F, Jiang Y, et al. The RING-finger E3 ubiquitin ligase COP1 SUPPRESSOR1 negatively regulates COP1 abundance in maintaining COP1 homeostasis in dark-grown *Arabidopsis* seedlings [J]. *Plant Cell*, 2014, 26(5):1981-1991
- [21] Indriolo E, Safavian D, Goring D R, et al. The ARC1 E3 ligase promotes two different self-pollen avoidance traits in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2014, 26(4):1525-1543
- [22] Goring D R, Indriolo E, Samuel M A, et al. The ARC1 E3 ligase promotes a strong and stable self-incompatibility response in *Arabidopsis* species; response to the Nasrallah and Nasrallah commentary [J]. *Plant Cell*, 2014, 26(10):3842-3846
- [23] Nakamura M, Toyota M, Tasaka M, et al. An *Arabidopsis* E3 Ligase, SHOOT GRAVITROPISM9, modulates the interaction between Statoliths and F-Actin in gravity sensing [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(5):1830-1848
- [24] Zhou J, Zhang Y, Qi J, et al. E3 ubiquitin ligase CHIP and NBR1-mediated selective autophagy protect additively against proteotoxicity in plant stress responses [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(1):e1004116
- [25] Xia Z, Su X, Liu J, et al. The RING-H2 finger gene 1 (*RHF1*) encodes an E3 ubiquitin ligase and participates in drought stress response in *Nicotiana tabacum* [J]. *Genetica*, 2013, 141(1-3):11-21
- [26] Liu J, Xia Z, Wang M, et al. Overexpression of a maize E3 ubiquitin ligase gene enhances drought tolerance through regulating stomatal aperture and antioxidant system in transgenic tobacco [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2013, 73:114-120
- [27] 尹丽娟, 陈阳, 刘沛, 等. 小麦泛素结合酶 *TaE2* 的表达分析及蛋白互作 [J]. *植物遗传资源学报*, 2014, 15(1):144-149
- [28] Zhang X, Wang N, Chen P, et al. Overexpression of a soybean arid-like ubiquitin ligase gene *GmARL1* enhances aluminum tolerance in *Arabidopsis* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11):e111120
- [29] Sadhukhan A, Panda S K, Sahoo L, et al. The cowpea RING ubiquitin ligase VuDRIP interacts with transcription factor VuDREB2A for regulating abiotic stress responses [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2014, 83:51-56
- [30] Yu Y, Xu W, Wang J, et al. The Chinese wild grapevine (*Vitis pseudoreticulata*) E3 ubiquitin ligase *Erysiphe necator*-induced RING finger protein 1 (EIRP1) activates plant defense responses by inducing proteolysis of the VpWRKY11 transcription factor [J]. *New Phytol*, 2013, 200(3):834-846
- [31] 周慧梅, 谢德颖, 李佳佳, 等. 一个特异水稻原纤蛋白 *FBN11* 的生物信息学和基因表达特性分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2014, 15(3):655-661
- [32] 李媛媛, 安艳秋, 王凤涛, 等. 小麦中小 GTP 结合蛋白基因 *TaRop2* 克隆及其表达分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2015, 16(2):315-322