

小麦 *TaUBC* 基因泛素结合酶活性分析^①

张祥云 赵思语 温潇 王宁 郭彦 赵庆臻

(聊城大学 生命科学学院, 山东 聊城 252059)

摘 要 已报道的 RNA 水平研究表明 *TaUBC* 可能是小麦产量相关基因, 生物信息学分析显示该基因属于泛素结合酶家族. 荧光定量 PCR 显示 *TaUBC* 在小麦根茎叶中均有表达. 为了验证 *TaUBC* 蛋白是否具有泛素结合酶活性, 本文利用原核系统表达野生型 *TaUBC* 及三种点突变 *TaUBC*^{C21S}、*TaUBC*^{C85S}、*TaUBC*^{C107S} 蛋白, 并对这些蛋白进行体外泛素化活性分析. 结果证实 *TaUBC* 是一个有活性的泛素结合酶. 另外, 点突变 C85S 使得 *TaUBC* 丧失 E2 活性, C21S 和 C107S 则对活性没有影响, 证明其 UBC 结构域中第 85 位 Cys 是结合泛素的关键作用位点.

关键词 *TaUBC*; 泛素结合酶; 点突变; 体外泛素化反应

中图分类号 Q783

文献标识码 A

泛素蛋白酶体系统(Ubiquitin Proteasome System, UPS)是真核细胞中调控底物蛋白质泛素化修饰及降解的重要途径, 对真核生物维持自身生长发育及适应外界环境变化具有重要意义^[1-6]. 将泛素(Ubiquitin, Ub)加到靶蛋白上主要是通过泛素激活酶(Ubiquitin-activating enzyme, E1)、泛素结合酶(Ubiquitin-conjugating enzyme, E2)和泛素连接酶(Ubiquitin ligase, E3)依次作用实现的^[1-3]. 在上述级联反应中, E2 在 E1 和 E3 之间起到桥梁的作用, E2 通过与特定的 E3 协同作用将泛素连接到相应的靶蛋白上^[7-13], 而且 E2 还通过影响多聚泛素链的空间构型进而对底物的最终命运起重要的调节作用^[14-19], 因此对 E2 展开深入研究具有重要意义.

泛素结合酶(E2)的特征是都具有由 150 个左右的氨基酸残基形成的 UBC 结构域, 这个区域中有一个保守的 Cys 残基可与被 ATP 激活的 Ub 蛋白共价结合形成硫酯键^[6, 14, 20]. 目前已知的拟南芥 E2 基因功能主要涉及到开花过程调节^[21, 22]、雌配子发育^[23]、DNA 修复、过氧化物酶体功能^[24]及磷信号及抗逆过程调节等; 其他双子叶植物中发现的 E2 功能也多与逆境响应功能有关^[25-28]; 单子叶植物 E2 功能的研究相对起步较晚, 目前有玉米、水稻 E2 基因家族成员及进化关系分析^[29, 30], 在拟南芥中异位表达水稻 OgUBC1 可以赋予拟南芥对 UV-B 辐射及灰霉病感染的抗性^[31]; 小麦 *TaU4* 调节小麦对病原菌 *Zymoseptoria tritici* 的抗病性^[32], RNA 表达量的分析表明小麦 *TaE2* 在干旱、高盐和 ABA 胁迫下上调表达^[33], 但尚未见与产量相关的小麦 E2 基因的报道.

小麦是世界上总产量第二的粮食作物, 挖掘小麦产量相关基因具有重要的理论和应用价值. Yao 等发现小麦的种间杂交后代 3338/2463 与其母本普通小麦 3338 及父本斯佩尔特小麦 2463 相比, 杂种在分蘖期地上及地下部分均明显变大, 其中根的杂种优势比地上部分更加明显, 而田间试验表明每株杂种植株的产量比其亲本至少高出 20%. 差异消减杂交分析得到了若干个在杂种中相对于双亲有明显差异表达的基因(一般认为这些基因的功能对于杂种优势有明显贡献), 这些基因应该参与了小麦植株发育及产量的调控^[34].

TaUBC (Accession number: AY736121) 就是上述差异基因的一员, 它是目前发现的唯一一个显示直接与小麦产量相关的 E2 基因. *TaUBC* CDS 全长 447 bp, 杂种植株 *TaUBC* mRNA 的表达与双亲的差异已通过半定量

① 收稿日期: 2018-08-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31200907); 植物基因组学国家重点实验室开放课题(2016A0219-14); 山东省自然科学基金(ZR2014CL1009); 聊城大学大学生科技文化创新基金(SF2014261; 26312160907)资助

通讯作者: 赵庆臻, 女, 汉族, 博士, 副教授, 研究方向: 植物分子生物学, zhaqingzhen@lccu.edu.cn.

RT-PCR 法证实,但目前尚未见相关蛋白质水平的分析报导. 本工作利用原核系统表达了 TaUBC 蛋白,并进行体外泛素化实验发现其确实具有泛素结合酶(E2)活性;同时还检测了分别将其 UBC 结构域中的三个 Cys 突变为 Ser 的点突变蛋白的 E2 活性,确定 TaUBC C85 是其关键的活性位点. 这些结果说明 TaUBC 应该是小麦体内有功能的 E2 基因,为深入研究该基因参与小麦植株发育及产量调控的机理奠定了基础.

1 材料与方 法

1.1 植物材料的培养

小麦材料中国春(*Triticum aestivum*)室温(25℃)光照培养(16 h/8 h)至三叶期.

1.2 TaUBC 的序列及进化分析

首先利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)程序分析 TaUBC 蛋白的结构域情况;再根据 TaUBC 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利用 Mega7 软件进行氨基酸序列比较,并构建系统发生进化树.

1.3 RNA 提取及荧光定量 PCR 分析

使用 Trizol 试剂盒分别提取长至三叶期的小麦幼苗的根、茎和叶的总 RNA;以 DNase I (RNase free)消化 RNA 中的 DNA,利用 AMV 反转录酶和锚定引物 Oligo(dT)₁₈ 合成第一链 cDNA;利用实时荧光定量 PCR 仪(Bio Rad iCycle, CA, USA)检测目的基因的表达模式. 反应体系 20 μL,含 2×Taq PCR MasterMix (含荧光染料) 10 μL、10 μmol/L qTaubc-F 和 qTaubc-R 引物(表 1)各 0.5 μL、cDNA 模板 1 μL、ddH₂O 8 μL. 扩增程序为:95℃预变性 3 min,95℃变性 5 s,60℃退火/延伸 15 s,共 40 个循环,以小麦 *Actin* 基因作为内参.

1.4 TaUBC CDS 的克隆及 pET28a-TaUBC 重组质粒的构建

根据 TaUBC 的 cDNA 序列,在正反向引物分别引入 EcoR I / Sal I 酶切位点,以 1.3 中的小麦第一链 cDNA 为模板,利用特异引物 Taubc-F 和 Taubc-R(表 1)扩增 TaUBC 基因全长. 回收 PCR 产物,用 EcoR I / Sal I 分别双酶切回收片段及与 pET28a 质粒, T4 DNA 连接酶连接,转化,提取重组质粒. 选择经双酶切 Pst I / Sma I 鉴定正确的 pET28a-TaUBC 质粒测序.

1.5 pET28a-TaUBC^{C21S}、pET28a-TaUBC^{C85S}及 pET28a-TaUBC^{C107S}点突变重组质粒的构建

以 pET28a-TaUBC 质粒为模板,分别以 Taubc-C21S-F 和 Taubc-C21S-R、Taubc-C85S-F 和 Taubc-C85S-R、Taubc-C107S-F 和 Taubc-C107S-R(表 1)为引物,用 KOD-plus-Neo Taq 酶扩增获得重组质粒 pET28a-TaUBC 的三种点突变质粒(分别带有 C21S, C85S 和 C107S 点突变). 扩增程序为:98℃预变性 2 min,98℃变性 10 s,55℃退火 30 s,68℃延伸 6 min,共 12 个循环,68℃延伸 7 min. 反应产物经 Dpn I 消化(37℃, 1 h),取适量消化产物转化大肠杆菌 DH5α,提取质粒. 质粒送测序,分别得到粒 pET28a-TaUBC^{C21S}、pET28a-TaUBC^{C85S}和 pET28a-TaUBC^{C107S}三种点突变质粒.

表 1 PCR 引物序列

Primer name	Primer sequence (5' - 3')
Taubc-F	GGAATCATGGCGTCCAAGAGGATC
Taubc-R	GCGTCGACCTAGCCCATGGCGTACTTC
Taubc-C21S-F	ACCCTCCCACCTCGTCCAGCGCAGGTCCTGTA
Taubc-C21S-R	TACAGGACCTGCGCTGGACGAGGTGGGAGGGT
Taubc-C85S-F	CAGCAACGGCAGCATTTCCTTGACATTCTCAAG
Taubc-C85S-R	CTTGAGAATCAAGGGAAATGCTGCCGTTGCTG
Taubc-C107S-F	GTCTGTGTCAATCTCTTCGTTGCTGACGGAC
Taubc-C107S-R	GTCCGTCAGCAACGAAGAGATTGACAGCAGGAC
qTaubc-F	ATGGCGTCCAAGAGGATCCT
qTaubc-R	ACCACCGGTGAACGGACTGTCA
wheat-actin-F	CAGCAACTGGGATGATATGG
wheat-actin-R	ATTTCGCTTTCAGCAGTGGT

注:限制性内切酶识别位点用下划线标出;F 代表上游引物,R 代表下游引物.

1.6 *TaUBC* 野生型及其 3 种点突变重组蛋白的原核表达

将 *pET28a-TaUBC*、*pET28a-TaUBC*^{C21S}、*pET28a-TaUBC*^{C85S} 和 *pET28a-TaUBC*^{C107S} 质粒分别热激转化大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS。取适量含有重组质粒的菌液接入 50 mL LB 液体培养基 (含 50 μg/mL 卡那霉素和 0.2% 葡萄糖) 中使 OD₆₀₀ 在 0.1 左右, 37°C 振荡培养至 OD₆₀₀ = 0.2-0.3 后, 改为 18°C 振荡培养至 OD₆₀₀ = 0.6 左右 (取 500 μL 菌液收集菌体, 为样品 1), 加入 IPTG (终浓度为 0.2 mmol/L) 18°C 诱导过夜 (取 200 μL 菌液收集菌体, 为样品 2); 然后各用 500 μL 1×Bugester (Novagen 70584-3) 裂解 30 min, 13 000 rpm 离心 30 min, 吸取上清液。样品 1 和 2 分别加入 50 μL 1×SDS 上样缓冲溶液, 煮沸 10 min, 取 15 μL 同少量上清 (样品 3) 一起进行 12% SDS-PAGE 电泳检测蛋白诱导及可溶性情况。

1.7 *TaUBC*、*TaUBC*^{C21S}、*TaUBC*^{C85S} 和 *TaUBC*^{C107S} 蛋白的体外泛素结合酶活性分析

TaUBC、*TaUBC*^{C21S}、*TaUBC*^{C85S} 和 *TaUBC*^{C107S} 共 4 种重组蛋白参考 Zhao 等 [35] 的方法进行体外泛素结合酶活性反应, 在 30 μL 总反应体系中, 包含 1.5 μL 20×buffer (1M Tris-HCl, pH 7.4, 200 mM MgCl₂, 200 mM ATP), 50 ng E1 (小麦 E1, GI: 136632), 200-500 ng E2, 2 μg Ub (拟南芥 UBQ14, At4g02890) 等。反应条件为: 37°C, 5 min。随后均分反应液分别加入含 DTT 和不含 DTT 的 4×SDS 上样缓冲液, 混匀, 离心, 100°C, 煮沸 5 min。

1.8 蛋白免疫印迹分析

反应产物经 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 转移至硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂牛奶 (1×PBS 配制) 室温封闭 2 h; 一抗 anti-Ub 的鼠血清抗体 (1:5 000 稀释), 室温反应 1 h, 1×PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 与 HRP (辣根过氧化物酶) 偶联的羊抗鼠二抗 (1:2 500 稀释), 室温反应 1 h, 1×PBS 洗涤 3 次; 用 Millipore 化学发光试剂盒对膜进行显色, 压片, 最后对 X 光片进行显影及定影。

2 结果与分析

2.1 *TaUBC* 同源性比较及进化树分析

SMART 在线预测 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 蛋白质结构表明其第 4-147 氨基酸组成的肽链部分能形成一个高度保守的泛素结合酶 E2 的催化结构域 UBCc (Ubiquitin-conjugating enzyme E2, catalytic domain homologues), 如图 1(a)。将 *TaUBC* 氨基酸序列在 NCBI 数据库中比对发现, 其氨基酸序列与二穗短柄草 *BdUBC28*、节节麦序列 *UBC28 like isoform 1* 相似度 100%、与大麦预测的泛素结合酶 *BAJ96360* 及玉米中的序列 *ZmUBC4* 相似度均达 99%, 与水稻 *OsUBC28*、棉花 *UBC 17 kDa like*、榴莲 *XP022770533* 等序列相似度 98%, 说明该基因属于一个高度保守的家族。*TaUBC* 在拟南芥及酵母中的同源基因分别为 *AtUBC28* 和 *ScUBC4*, *TaUBC* 与二者的序列相似度分别为 95% 和 78%。*TaUBC* 与部分其他物种的氨基酸序列比对结果见图 2。进化树分析表明, *TaUBC* 与玉米 *ZmUBC4*、水稻 *OsUBC28* 聚为一类, 而另一个小麦泛素结合酶 *TaU4* 与 *AtUBC28* 和 *ScUBC4* 在进化上比 *TaUBC* 与它们的亲缘关系更近, 如图 1(b), 说明 *TaUBC* 和 *TaU4* 可能是在小麦发展的后期朝不同方向进化而来的。

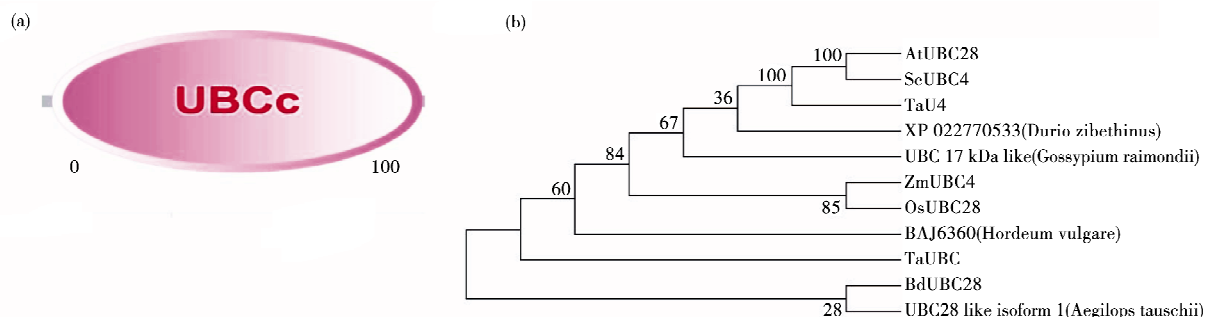


图 1 *TaUBC* 的 SMART 结构域分析结果及其与其他物种的系统发育树分析

(a) *TaUBC* domain predication by online SMART website; (b) The phylogenetic tree of *TaUBC* and parts of other UBC genes. 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*): *AtUBC28* (NP_564828); 酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*): *ScUBC4* (NP_009638); 小麦 (*Triticum aestivum*): *TaU4* (AY736121); 榴莲 (*Durio zibethinus*): *XP022770533*; 棉花 (*Gossypium raimondii*): *UBC 17 kDa like*; 玉米 (*Zea mays*): *ZmUBC4* (ACG31607); 水稻 (*Oryza sativa*): *OsUBC28* (XP_015635592); 大麦 (*Hordeum vulgare*): *BAJ96360*; 二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon*): *BdUBC28*; 节节麦 (*Aegilops tauschii*): *UBC28 like isoform 1*.

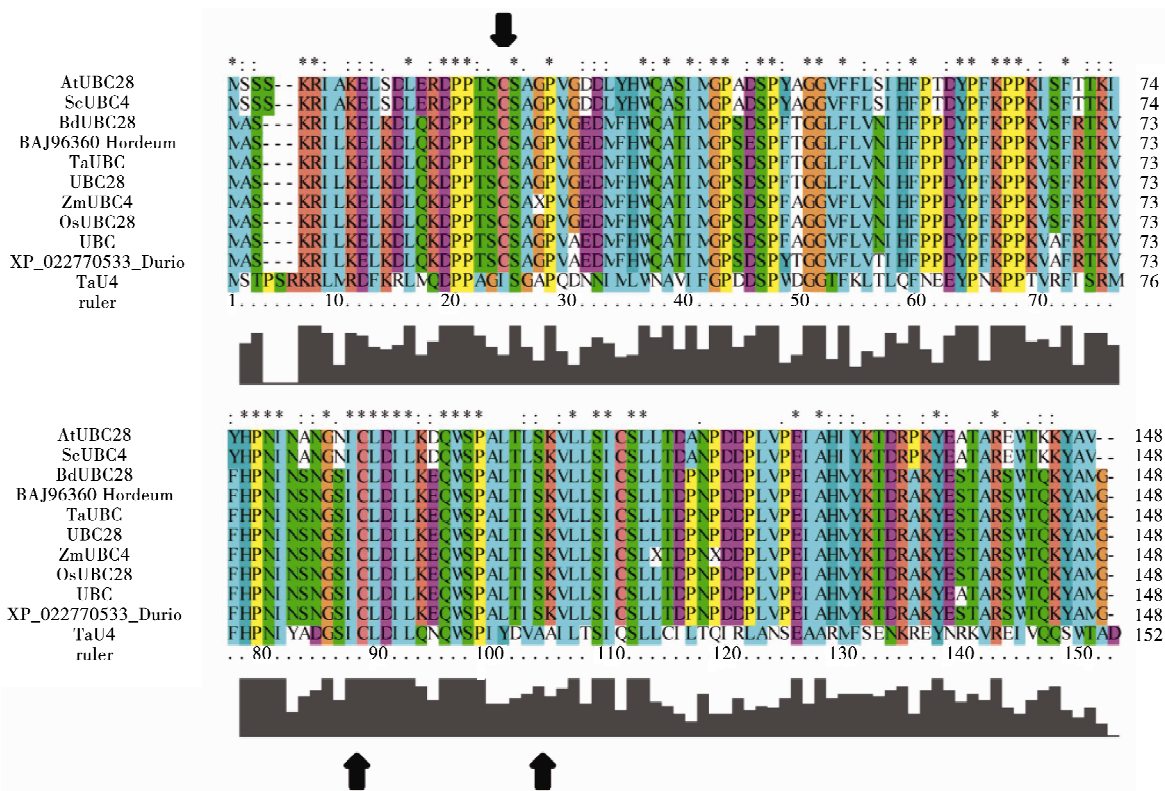


图 2 TaUBC 多蛋白序列比对

The arrow highlights the active site cysteine present in all the UBC enzymes. The higher gray value representing the higher sequence similarity.

2.2 小麦中 TaUBC 基因的组织特异性表达

检测小麦根、茎及叶不同组织中 TaUBC 的转录水平,经荧光定量 PCR 结果显示,在正常培养条件下, TaUBC 基因在小麦的根茎叶中均有表达,但表达量有所不同,其中在茎中的转录水平最低,叶和根中的表达水平分别可达茎中的 5 倍及 8 倍左右(图 3)。

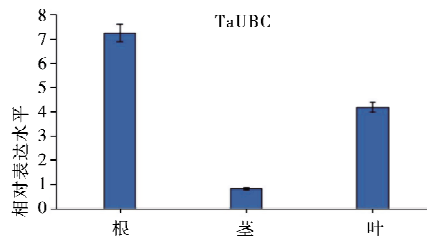


图 3 TaUBC 基因在不同小麦组织中的表达

2.3 TaUBC 及其 3 种点突变蛋白的原核表达

2.3.1 野生型及三种点突变 TaUBC 蛋白的序列对比. 将 TaUBC 野生型(WT)及三种点突变蛋白(C21S、C85S 和 C107S)部分氨基酸序列进行比对,结果见图 4,方框标出的是不同蛋白中氨基酸突变的位点。

Majority templet	ELKDLQKDPPTSCSAGPVGEDMF	FRTKVFHPNINSNGSICLDILKF	ISKVLLSICSLTDPNPDDPLVF						
	10	20	30	70	80	90	100	110	120
WT	ELKDLQKDPPTSCSAGPVGEDMF	FRTKVFHPNINSNGSICLDILKE	ISKVLLSICSLTDPNPDDPLVF						
C21S	ELKDLQKDPPTSSAGPVGEDMF	FRIKVFHPNINSNGSICLDILKE	ISKVLLSICSLTDPNPDDPLVF						
C85S	ELKDLQKDPPTSCSAGPVGEDMF	FRTKVFHPNINSNGSICLDILKE	ISKVLLSICSLTDPNPDDPLVF						
C107S	ELKDLQKDPPTSCSAGPVGEDMF	FRTKVFHPNINSNGSICLDILKE	ISKVLLSICSLTDPNPDDPLVF						

图 4 TaUBC 野生型与三种点突变蛋白的氨基酸序列差别

Different amino acid residues among TaUBC, TaUBC^{C21S}, TaUBC^{C85S} and TaUBC^{C107S} are marked with boxes.

Majority templet is the highest sequence identity among different protein

2.3.2 TaUBC 及 3 种点突变蛋白的原核表达. 已分别转入四种重组质粒的表达菌株经 IPTG 18℃ 诱导过夜后,用 1×Bugester 缓冲液裂解,离心获取蛋白上清液. 经 SDS-PAGE 电泳检测,样品 2 与样品 1 相比,在 17 kDa 左右可见蛋白诱导表达条带(图 5 箭头所指),与预期分子量(16.94 kDa)相符. 裂解后的上清(样品 3)总蛋白在相同的位置也有明显的蛋白条带,说明 TaUBC, TaUBC^{C21S}, TaUBC^{C85S} and TaUBC^{C107S} 以可溶性蛋白的形式存在于上清中(图 5)。

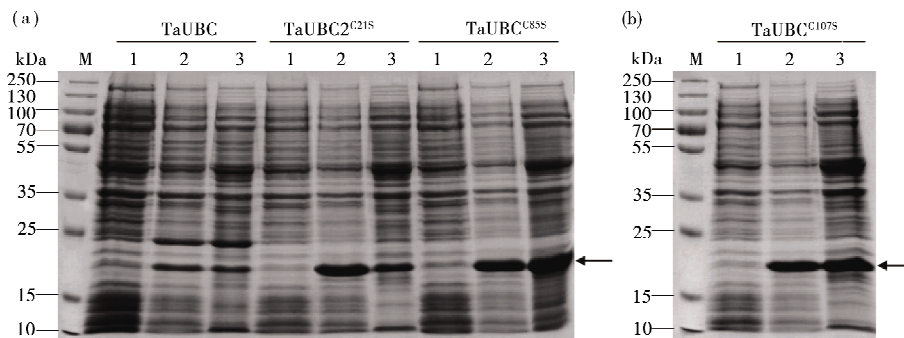


图 5 *TaUBC* 及 *TaUBC*^{C21S}, *TaUBC*^{C85S} 和 *TaUBC*^{C107S} 重组蛋白的 IPTG 诱导表达

(a) Induced expression of recombinant *TaUBC*, *TaUBC*^{C21S} and *TaUBC*^{C85S}, (b) Induced expression of recombinant *TaUBC*^{C107S}. M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder; 1: Bacteria cell extracts before IPTG induction; 2: Bacteria cell extracts after IPTG induction; 3: Bacteria cell supernatant extracts after lysis

2.4 *TaUBC* 及其 3 种点突变重组蛋白体外泛素结合酶活性分析

位于 E2 蛋白 UBC 结构域中的一个保守的 Cys 可与 Ub 通过硫酯键共价结合。体外检测 Cys 能否与 Ub 结合, 可以分析该蛋白是否具有 E2 活性, 原理是分析形成的 E2-Ub 化合物是否能被新加入的还原剂 DTT 或巯基乙醇打开。分别检测 *TaUBC*、*TaUBC*^{C21S}、*TaUBC*^{C85S} 和 *TaUBC*^{C107S} 在有或无 DTT 的情况下与 Ub 的结合情况, 反应产物用 anti-Ub 抗体进行 Western blot 检测, 可见 *TaUBC*、*TaUBC*^{C21S} 和 *TaUBC*^{C107S} 在无 DTT 存在时均可以形成 E2-Ub 化合物, 在加入 DTT 后该条带消失 (图 6), 说明 *TaUBC*、*TaUBC*^{C21S} 和 *TaUBC*^{C107S} 均能够与 Ub 形成对 DTT 敏感的硫酯键, 都具有 E2 活性; 而 *TaUBC*^{C85S} 在有或无 DTT 时均不能与 Ub 结合, 该蛋白不具有 E2 活性 (图 6)。由于野生型 *TaUBC* 具有 E2 活性, C21S、C107S 点突变未影响此活性, 而 C85S 点突变蛋白则丧失了 E2 活性, 说明 *TaUBC* UBC 结构域中第 85 位 Cys 是形成 E2-Ub 硫酯键的关键位点。

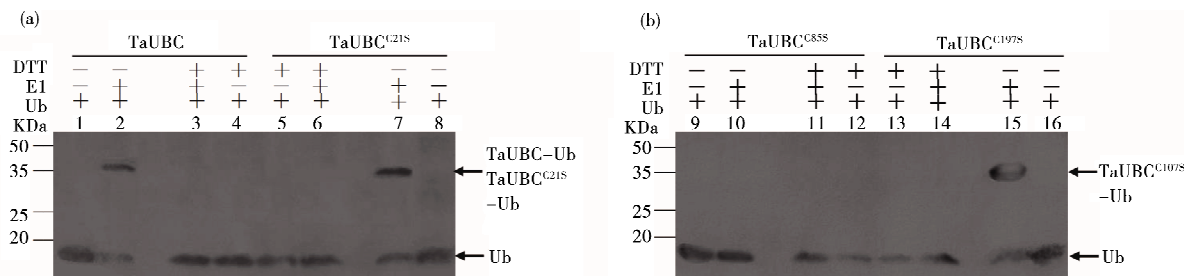


图 6 *TaUBC* 及其 3 种点突变 *TaUBC*^{C21S}, *TaUBC*^{C85S} 和 *TaUBC*^{C107S} 重组蛋白体外泛素化分析

(a) DTT-sensitive thioester bond assay for recombinant *TaUBC* and *TaUBC*^{C21S}; (b) DTT-sensitive thioester bond assay for recombinant *TaUBC*^{C85S} and *TaUBC*^{C107S}; M: Prestained Protein Molecular Weight Marker

3 讨论

蛋白质泛素化修饰是真核生物包括高等植物中重要的翻译后修饰之一, 研究证实蛋白质的泛素化降解参与了几乎所有的生理生化途径中关键调控蛋白的降解调节, 因此作为泛素化修饰关键酶之一的泛素结合酶, 在调节植物生长发育及在不同胁迫条件下的响应过程中发挥着不可忽视的重要功能。重要的农作物小麦产量的提升一直是农业生产上的追求。因此寻找小麦产量相关基因中的泛素结合酶家族成员, 深入分析其调控小麦产量过程的作用机制, 可以加深我们对蛋白质泛素化修饰调控小麦生长发育、响应逆境并最终影响产量过程的理解, 同时也可利用植物基因工程等手段进行小麦品种改良提供备选基因。

Yao 等利用抑制消减杂交技术分析杂种优势小麦与其双亲的差异表达基因, 找到了多个潜在的产量相关基因, *TaUBC* 是其中唯一一个具有 UBC 结构域的成员, 它可能作为泛素结合酶调节小麦生长发育及产量的形成 [34]。这些线索告诉我们值得深入分析 *TaUBC* 在小麦体内的作用机制, 但该文只是对这些基因进行了 RNA 水平的分析, 未有任何蛋白质方面的信息提供, 因此应该首先检测该基因的蛋白质产

物是否具有泛素结合酶活性,由此判断其是否真正在小麦体内发挥蛋白质泛素化修饰关键酶的作用。

正常生长条件下, TaUBC 在小麦的根、茎、叶中均有表达,说明该基因功能与小麦正常条件下的生长发育有关。其中根中的表达量明显高于茎和叶,暗示 TaUBC 可能更多地参与了根的功能,这也与 Yao 等的结果即杂种的根部明显比双亲发达一致。

泛素结合酶(E2)都具有一个约 150 个氨基酸组成的 UBC 结构域,其中一个保守的半胱氨酸可以与泛素蛋白 C 末端甘氨酸的羧基缩合形成共价的硫酯键,这个 E2-Ub 中间体在由 E1、E2 和 E3 依次地协同作用将泛素转移到底物上去的过程中起着重要的传递泛素的作用,该半胱氨酸位点为泛素结合酶活性所必须。E2-like 或称为 UEV(ubiquitin conjugating enzyme variants)蛋白同样具有 UBC 结构域,但由于缺少这个半胱氨酸位点,UEV 蛋白没有泛素结合酶的活性。因此对于一个新基因,其蛋白质序列通过生物信息学预测得知可能为泛素结合酶,那么首先应该通过体外实验验证其是否确实具有结合泛素的能力,从而为深入研究其在生物体内的基因功能提供必要的线索。将 Cys 可以检测该位点是否为结合泛素的关键催化位点。本研究的结果证实, TaUBC 野生型蛋白能够与泛素蛋白之间形成对 DTT 敏感的硫酯键,因此可以确定其具有泛素结合酶活性,且 C85 是结合泛素的关键位点。本结果证明 TaUBC 应该是小麦体内一个有功能的泛素结合酶基因,为下一步深入探讨其小麦体内的基因功能打下了良好基础。

参 考 文 献

- [1] Vierstra R D. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10:385-397.
- [2] Bachmair A, Novatchkova M, Potuschak T, et al. Ubiquitylation in plants. a post-genomic look at a post-translational modification[J]. *Trends Plant Sci*, 2001, 6:463-470.
- [3] Vierstra R D. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins[J]. *Trends Plant Sci*, 2003, 8:135-142.
- [4] Stone S L. The role of ubiquitin and the 26S proteasome in plant abiotic stress signaling[J]. *Front Plant Sci*, 2014, 5:135.
- [5] Wang F, Deng X W. Plant ubiquitin-proteasome pathway and its role in gibberellin signaling[J]. *Cell Res*, 2011, 21:1286-1294.
- [6] Smalle J, Vierstra R D. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55:555-590.
- [7] Lei L, Bandola-Simon J, Roche P A. Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D1 (Ube2D1) mediates lysine-independent ubiquitination of the E3 ubiquitin ligase March-1[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293:3904-3912.
- [8] Sanchez-Martin P, Roma-Mateo C, Viana R, et al. Ubiquitin conjugating enzyme E2-N and sequestosome-1 (p62) are components of the ubiquitination process mediated by the malin-laforin E3-ubiquitin ligase complex[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 69:204-214.
- [9] Sheng Y, Hong J H, Doherty R, et al. A human ubiquitin conjugating enzyme (E2)-HECT E3 ligase structure-function screen[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11:329-341.
- [10] Soss S E, Yue Y, Dhe-Paganon S, et al. E2 conjugating enzyme selectivity and requirements for function of the E3 ubiquitin ligase CHIP[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286:21277-21286.
- [11] Vanni E, Gatherer D, Tong L, et al. Functional characterization of residues required for the herpes simplex virus 1 E3 ubiquitin ligase ICP0 to interact with the cellular E2 ubiquitin-conjugating enzyme UBE2D1 (UbcH5a) [J]. *J Virol*, 2012, 86:6323-6333.
- [12] Wang D, Tian Y, Wei D, et al. DNA Damage-Induced Foci of E2 Ubiquitin-Conjugating Enzyme are Detectable upon Co-transfection with an Interacting E3 Ubiquitin Ligase[J]. *Biochem Genet*, 2016, 54:147-157.
- [13] Ibarra R, Sandoval D, Fredrickson E K, et al. The San1 Ubiquitin Ligase Functions Preferentially with Ubiquitin-conjugating Enzyme Ubc1 during Protein Quality Control[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291:18778-18790.
- [14] Ye Y, Rape M. Building ubiquitin chains. E2 enzymes at work[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10:755-764.
- [15] Li W, Tu D, Brunger A T, et al. A ubiquitin ligase transfers preformed polyubiquitin chains from a conjugating enzyme to a substrate [J]. *Nature*, 2007, 446:333-337.
- [16] Hill S, Harrison J S, Lewis S M, et al. Mechanism of Lysine 48 Selectivity during Polyubiquitin Chain Formation by the Ube2R1/2 Ubiquitin-Conjugating Enzyme[J]. *Mol Cell Biol*, 2016, 36:1720-1732.
- [17] Ryan P E, Sivadasan-Nair N, Nau M M, et al. The N terminus of Cbl-c regulates ubiquitin ligase activity by modulating affinity for the ubiquitin-conjugating enzyme[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285:23687-23698.
- [18] Nguyen L, Plafker K S, Starnes A, et al. The ubiquitin-conjugating enzyme, UbcM2, is restricted to monoubiquitylation by a two-fold mechanism that involves backside residues of E2 and Lys48 of ubiquitin[J]. *Biochemistry*, 2014, 53:4004-4014.
- [19] van Wijk S J, Timmers H T. The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins[J]. *FASEB J*, 2010, 24:981-993.
- [20] Michelle C, Vourch P, Mignon L, et al. What was the set of ubiquitin and ubiquitin-like conjugating enzymes in the eukaryote com-

- mon ancestor[J]. *J Mol Evol*, 2009, 68:616-628.
- [21] Gu X, Jiang D, Wang Y, et al. Repression of the floral transition via histone H2B monoubiquitination[J]. *Plant J*, 2009, 57:522-533.
- [22] Xu L, Menard R, Berr A, et al. The E2 ubiquitin-conjugating enzymes, AtUBC1 and AtUBC2, play redundant roles and are involved in activation of FLC expression and repression of flowering in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant J*, 2009, 57:279-288.
- [23] Wang S, Cao L, Wang H. *Arabidopsis* ubiquitin-conjugating enzyme UBC22 is required for female gametophyte development and likely involved in Lys11-linked ubiquitination[J]. *J Exp Bot*, 2016, 67:3277-3288.
- [24] Kao Y T, Bartel B. Elevated growth temperature decreases levels of the PEX5 peroxisome-targeting signal receptor and ameliorates defects of *Arabidopsis* mutants with an impaired PEX4 ubiquitin-conjugating enzyme[J]. *BMC Plant Biol*, 2015, 15:224.
- [25] Bahmani R, Kim D, Lee B D, et al. Over-expression of tobacco UBC1 encoding a ubiquitin-conjugating enzyme increases cadmium tolerance by activating the 20S/26S proteasome and by decreasing Cd accumulation and oxidative stress in tobacco (*Nicotiana tabacum*) [J]. *Plant Mol Biol*, 2017, 94:433-451.
- [26] Chung E, Cho C W, So H A, et al. Overexpression of VrUBC1, a Mung Bean E2 Ubiquitin-Conjugating Enzyme, Enhances Osmotic Stress Tolerance in *Arabidopsis*[J]. *PLoS One*, 2013, 8:e66056.
- [27] Wan X, Mo A, Liu S, et al. Constitutive expression of a peanut ubiquitin-conjugating enzyme gene in *Arabidopsis* confers improved water-stress tolerance through regulation of stress-responsive gene expression[J]. *J Biosci Bioeng*, 2011, 111:478-484.
- [28] Zhou G A, Chang R Z, Qiu L J. Overexpression of soybean ubiquitin-conjugating enzyme gene GmUBC2 confers enhanced drought and salt tolerance through modulating abiotic stress-responsive gene expression in *Arabidopsis*[J]. *Plant Mol Biol*, 2010, 72:357-367.
- [29] E Z, Zhang Y, Li T, et al. Characterization of the Ubiquitin-Conjugating Enzyme Gene Family in Rice and Evaluation of Expression Profiles under Abiotic Stresses and Hormone Treatments[J]. *PLoS One*, 2015, 10:e0122621.
- [30] Jue D, Sang X, Lu S, et al. Genome-Wide Identification, Phylogenetic and Expression Analyses of the Ubiquitin-Conjugating Enzyme Gene Family in Maize[J]. *PLoS One*, 2015, 10:e0143488.
- [31] Jeon E H, Pak J H, Kim M J, et al. Ectopic expression of ubiquitin-conjugating enzyme gene from wild rice, OgUBC1, confers resistance against UV-B radiation and Botrytis infection in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 427:309-314.
- [32] Millyard L, Lee J, Zhang C, et al. The ubiquitin conjugating enzyme, TaU4 regulates wheat defence against the phytopathogen *Zymoseptoria tritici*[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:35683.
- [33] 尹丽娟, 陈阳, 刘沛, 等. 小麦泛素结合酶 TaE2 的表达分析及互作[J]. *植物资源学报*, 2014, 15:144-149.
- [34] Yao Y, Ni Z, Zhang Y, et al. Identification of differentially expressed genes in leaf and root between wheat hybrid and its parental inbreds using PCR-based cDNA subtraction[J]. *Plant Mol Biol*, 2005, 58:367-384.
- [35] Zhao Q, Tian M, Li Q, et al. A plant-specific *in vitro* ubiquitination analysis system[J]. *Plant J*, 2013, 74:524-533.

Ubiquitin Conjugating Enzyme Activity Analysis of Wheat *TaUBC* Gene

ZHANG Xiang-yun ZHAO Si-yu WEN Xiao WANG Ning GUO Yan ZHAO Qing-zhen

(School of Life Sciences, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract Reported results of *TaUBC* gene in RNA level indicated it may be a yield-relevant gene in wheat. Bioinformatic analysis showed that *TaUBC* was expressed in root, stem and leaf. In order to verify whether *TaUBC* protein has ubiquitin conjugating enzyme activity, wild type and three different point mutation types of *TaUBC* protein (*TaUBC*^{C21S}, *TaUBC*^{C85S}, *TaUBC*^{C107S}) were expressed in bacteria respectively. Ubiquitin conjugating enzyme activity were then detected by *in vitro* ubiquitination assay. The results showed that *TaUBC* was an active ubiquitin conjugating enzyme. Point mutation C85S resulted in loss of ubiquitin conjugating enzyme activity of *TaUBC*, while C21S and C107S had no influence on the activity, proving that C85 in the UBC domain is the crucial catalytic site for ubiquitin binding.

Key word *TaUBC*; ubiquitin conjugating enzyme; point mutation; *in vitro* ubiquitination assay