

普通油茶泛素结合酶 UBE2-J2 的 cDNA 序列 及蛋白质结构分析

林萍¹, 姚小华¹, 曹永庆¹, 龙伟¹, 王开良^{1*}, 滕建华²

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 浙江省金华市东方红林场, 浙江 金华 321025)

摘要:泛素结合酶(E2)是泛素/26S蛋白酶体途径中3个关键酶之一,在靶蛋白识别、与泛素连接酶(E3)互作等蛋白的泛素依赖性水解和N-末端规则依赖性水解途径的关键环节中起重要作用。采用Solexa测序技术获得了1条普通油茶E2的全长cDNA序列,命名为*UBE2-J2*,该基因编码239AA,与其它物种的E2具有较高的一致性和相似性;同源建模的结果表明:普通油茶*UBE2-J2*蛋白具有泛素结合酶催化位点(UBCc),第8~122位氨基酸碱基为其泛素结合酶基因家族的保守区域,第75~122位氨基酸残基区域中有17个可与泛素形成硫酯键中间产物的残基,其中,87位的半胱氨酸残基是该酶活性中心位点,另有5个残基是与E3酶相互作用的位点。*UBE2-J2*具有C端延伸结构,故普通油茶*UBE2-J2*蛋白属于II类E2基因家族成员。

关键词:普通油茶;泛素结合酶;Solexa测序;生物信息学

中图分类号:S718.46

文献标识码:A

Characterization of a Novel Ubiquitin-conjugating Enzyme from *Camellia oleifera*

LIN Ping¹, YAO Xiao-hua¹, CAO Yong-qing¹, LONG Wei¹, WANG Kai-liang¹, TENG Jian-hua²

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China;

2. Dongfanghong Forest Farm of Jinhua City, Zhejiang Province, Jinhua 321025, Zhejiang, China)

Abstract: Ubiquitin-conjugating enzyme (E2) is one of three key enzymes in the ubiquitin-proteasome pathway (UPP). And it's very important in the protein degradation pathways depend on ubiquitin or N-end rule, including identify the target protein, interaction with ubiquitin-protein ligating enzymes (E3), and so on. A full length cDNA sequence of E2 was cloned by Solexa sequencing technology and named *UBE2-J2*. This cDNA codes 239 amino acids, and has significant amino acid sequence identity and similarity with E2s from other organism. The *UBE2-J2* protein has an ubiquitin-conjugating enzyme E2 catalytic (UBCc) domain from 8th to 122nd amino acid residue. There are 17 residues to compose Ubiquitin thioester intermediate interaction residues, 5 residues to compose E3 interaction residues and the 87th residue is the active site cysteine on conserved domain UBCc. *UBE2-J2* is a class II member of E2 family of *Camellia oleifera* according to bioinformatics analysis.

Key words: *Camellia oleifera*; ubiquitin-conjugating enzyme (E2); Solexa sequencing; bioinformatics

收稿日期:2012-09-26

基金项目:国家林业公益性行业科研专项“林改后南方林地可持续高效经营关键技术与集成示范”(201004008);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目“油茶品种分子鉴别系统构建及油茶基因芯片开发”(RISF6804)

作者简介:林萍(1980—),女,山东烟台人,助理研究员,博士,主要从事经济林遗传育种研究。

* 通讯作者:副研究员. E-mail:wangkl163@163.com

泛素/26S 蛋白酶体途径 (ubiquitin-proteasome pathway, UPP) 是目前已知的有选择性的降解蛋白质的最重要途径之一^[1], 该途径通过调节功能蛋白质的周转或降解蛋白质, 实现对多重代谢过程的调节^[2], 在维持细胞功能以及细胞周期运转、抵御环境胁迫、激素响应、胚胎发育和衰老等方面发挥着重要的作用^[3-12]。泛素化过程是一个受到高度调控的复杂过程, 有 3 种类型的酶参与催化 3 个级联反应, 这 3 类酶分别称为泛素激活酶 (ubiquitin activating enzyme, E1)、泛素结合酶 (ubiquitin-conjugating enzymes, E2) 和泛素连接酶 (ubiquitin-protein ligating enzymes, E3)^[13]。植物中泛素化研究最深入透彻的是模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), 约有 1 400 个基因 (约占总蛋白质数量的 5%) 编码蛋白泛素化过程中的相关酶类, 其中, E1 基因只有 2 个, 其突变体是致死的; E2 基因至少有 37 个, 在拟南芥基因组中形成 12 个亚家族; E3 决定泛素化底物的特异性, 因此是数量最多、多样性最高的酶, 已知有超过 1 300 个基因编码 E3 酶亚基^[7]。近年来, E3 蛋白在调控植物生长发育以及应对逆境胁迫等方面研究进展较大^[14-18], 而 E2 蛋白功能研究尽管也取得了一定进展, 但相对缓慢^[11]。

油茶 (*Camellia* spp.) 是山茶科 (Theaceae) 山茶属 (*Camellia* L.) 中油用物种的总称, 是世界四大木本油料植物之一, 其中, 以普通油茶 (*C. oleifera* Abel.) 为主, 在我国有 2000 多年的栽培历史, 现有面积超过 300 万 hm^2 , 年产值 200 亿元以上。近年来, 我国油茶产业快速发展, 优良品种栽培面积不断扩大, 产生了显著的经济效益; 但与农作物及杨树 (*Populus* spp.)、杉木 (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.) 等其它研究较早的林木相比, 油茶分子基础研究甚少。郭静怡^[19] 已克隆了一个普通油茶泛素连接酶 E2 基因 (编码 152 个氨基酸残基, 命名为 *UBE2A*), 并开展 cDNA 序列分析和 RNAi 表达载体构建的研究, 但对其编码蛋白质的性质特点等未作研究。本研究在利用 Solexa 技术对普通油茶‘长林 4 号’无性系发育中的种子转录组测序中发现了 1 条编码泛素结合酶 (E2) 的全长 cDNA 序列, 命名为 *UBE2-J2*, 对该基因开展了序列分析和编码的蛋白质的结构预测分析, 为进一步了解普通油茶发育中种子的蛋白泛素化过程奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究材料

研究材料采自浙江省金华市东方红林场 4 年生普通油茶林。分别于 7 月 (种子开始膨大)、8 月 (种子营养高速合成期)、9 月 (种子营养高速合成期)、10 月下旬 (种子近成熟期) 4 个时期采集‘长林 4 号’种子, 剥取种仁, 保存于液氮中备用。

1.2 RNA 样品制备

采用 Trizol 法分别提取 4 个时期植物材料的 RNA, 采用 Nanodrop 2000 核酸蛋白分析仪、Agilent 2100 生物分析仪及琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, 保证 RNA 样品浓度 $\geq 400 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 28S:18S 大于 1.8, 生物分析仪检测获得的 RIN ≥ 8 。将符合要求的每个时期 RNA 样品进行转录组测序分析。转录组测序及序列组装、拼接由深圳华大基因公司完成。

1.3 生物信息学分析

通过与 NCBI 非冗余数据库进行 BlastP^[21] 比对, 筛选出普通油茶 *UBE2-J2* 基因 cDNA 序列。利用 DNASTar 软件分析推导 ORF 及编码蛋白 (*UBE2-J2*) 的氨基酸序列, 使用 Clustalx 软件进行多序列比对, 通过 ScanProsite^[22] 和 CDD^[23-24] (<http://www.us.expasy.org>) 进行功能结构域分析, 使用 Swiss-model^[25] 进行三维结构预测与三维结构比对, 并推导蛋白质功能。

1.4 UBE2 基因的表达量分析

分别于普通油茶种子发育的膨大前期 (6 月 6 日) 及快速膨大期 (7 月 11、25 日, 8 月 9 日) 采集未成熟种子样品, 采用 RN38 植物 RNA 快速提取试剂盒 (北京艾德莱生物科技有限公司生产) 提取样品 RNA, 定量后反转录合成 cDNA。利用 Primer Premier5.0 软件合成定量 PCR 引物, 以稀释 15 倍的各种品 cDNA 为模版, 利用 ABI 7300 qRT-PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司生产) 进行 qRT-PCR 反应, 以 β -actin 基因作为内参, 每反应重复 4 次, 检测 *UBE2-J2*、*UBE2A* 基因在种子快速膨大不同时期的表达量变化。qRT-PCR 反应检测数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析。

2 结果与分析

2.1 普通油茶转录组测序结果

经过去除杂质数据以及 contig、scaffold 两重组

装,4个时期普通油茶样品共获得80310条 unigene 序列。All-unigene 序列长度主要分布在200~3000 bp 范围内,大于3000 bp 的序列只有640条,占全部序列数量的0.8%。300~1500 bp 范围内 unigene 序列数量较多,占全部序列数量的91.1%。在

All-unigene 中无 Gap(序列中 N 数量与全部碱基数量的比值)的序列有38019条,占全部序列的49.3%,说明测序质量较高,且多数序列的 N 数量都在13%以下,占全部序列的89.36%(图1)。

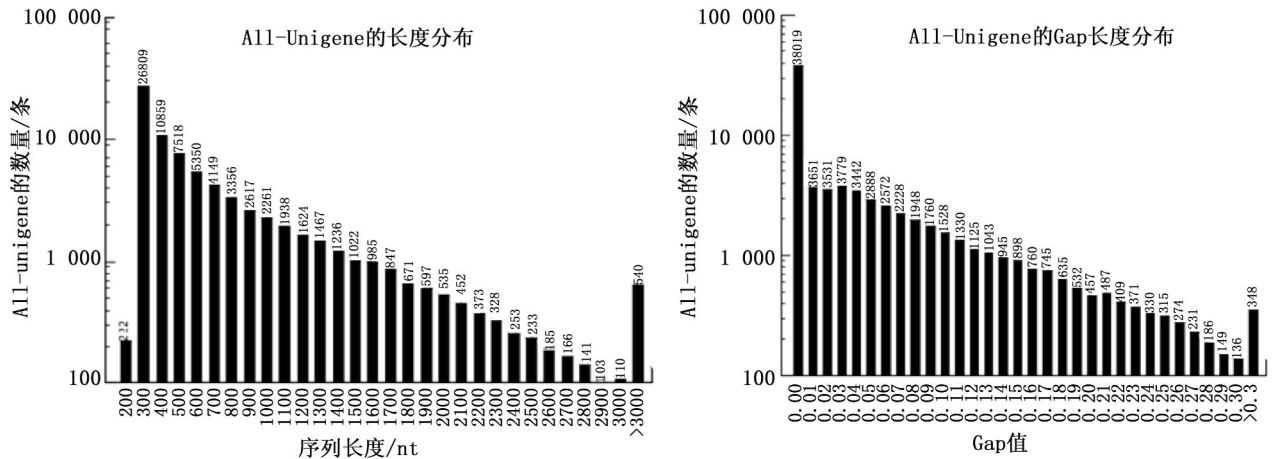


图1 All-unigene 序列的长度分布及 Gap 长度分布

2.2 普通油茶泛素结合酶 UBE2-J2 的全长 cDNA 序列分析

通过序列比对和分析,普通油茶 *UBE2-J2* 基因 cDNA 全长 1 008 bp, 编码区自 47 位的起始密码子 ATG 起, 终止于 766 位的 TGA, 5' UTR 46 bp, 3' UTR 242 bp, 编码 239 个氨基酸, 推测蛋白质分子量是 27.16 kD。编码的 239 个氨基酸中有 28 个强碱性 AA(K,R), 23 个强酸性 AA(D,E), 68 个疏水性 AA(A,I,L,F,W,V) 和 72 个极性 AA(N,C,Q,S,T,Y), 其 AA 序列为: MAEKACVKRLQKEYRALCK-EPVSHVTARPSDILEWHYVLEGSEGTPFAGGYYY GKIKFPPEYPFKPPGISMTTPNGRFMTQKKICLSMSDF HPESWNPMWSVSSILTGLLSFMMDTSPTTGSVTTTVA EKQRLAKSSSLAFNCKNPTFRKMFPEYVEKYEQQQLS EQPVPEQVSTTPTQQEGHRPLLDKTGNSTQEDLNKVE ALRDPNRNRKQSFPTWMLLLLVSIFGVVMALPLLQL。

2.3 普通油茶泛素结合酶 UBE2-J2 基因同源性比对分析

经比对,普通油茶 *UBE2-J2* 基因与 *UBE2A* 基因 cDNA 序列的同源性只有 35.53% (图 2)。通过 Blast 比对,发现普通油茶的 *UBE2-J2* cDNA 序列分别与拟南芥、茄子 (*Solanum melongena* L.)、大豆 (*Glycine max* (L.) Merrill)、蓖麻 (*Ricinus communis*

L.)、云杉 (*Picea asperata* Mast.) 的 *UBE2-J2* 基因同源性较高, 分别为 66.15%、66.7%、66.73%、69.25% 和 57.07%。采用 Clustalx 软件对上述 6 个物种 E2 的氨基酸序列进行多序列比对分析显示 (图 3): 普通油茶的 *UBE2-J2* 基因和其余 5 个物种的 *UBE2-J2* 基因的氨基酸序列同源性在 65.7%~83.68% 之间, 说明 *UBE2-J2* 的氨基酸序列在不同物种中具有较高的保守性。

2.4 普通油茶泛素结合酶 UBE2-J2 的保守区域分析

使用 ScanProsite 和 CDD 对普通油茶 *UBE2-J2* 保守结构域的分析结果显示: *UBE2-J2* 属 UBCc 超家族, 第 8~122 位氨基酸碱基为其泛素结合酶基因家族的保守区域 (图 4), 第 75~122 位氨基酸残基区域中有 17 个残基与泛素形成硫酯键中间产物的残基 (图 5), 其中, 87 位的半胱氨酸残基是活性位点 (图 4)。通常该活性位点旁边有如下保守序列: [FYWLSP]-H-[PC]-[NHL]-[LIV]-x(3,4)-G-x-[LIVP]-C-[LIV]-x(1,2)-[LIVR], 但普通油茶 *UBE2-J2* 的序列跟此序列不完全匹配。第 8 位的 K、65 位的 P、66 位的 F、100 位的 P、101 位的 M 共 5 个残基是与 E3 酶相互作用的位点 (图 3)。


```


油茶 MAEKACVKRLQKEYRALCKEPVSHVTARPSPSDILEWHYVLEGSEGTFFAGGYYGKIKFPPEYPFKPPG
茄子 MAEKACVKRLQKEYRALCKEPVSHVVARPSPSDILEWHYVLEGSEGTFFAGGYYGKIKFPPEYPFKPPG
大豆 MAEKSCIKRLQKEYRALCKEPVSHVVARPSPSDILEWHYVLEGSEGTFFAGGYYGKIKFPPEYPYKPPG
蓖麻 MAEKSCVSRQLQKEYRALCKEPVPHVVARPSSRDILEWHYVLEGSEGTFFAGGYYGKIKFPDYPNPPG
拟南芥 MAEKSCVSRQLQKEYRALCKEPVPHVVARPSSRDILEWHYVLEGSEGTFFAGGYYGKIKFPDYPNPPG
云杉 MAEKACVKRLQKEFRALCKEPVNVVARPSPSDILEWHYVLEGSEGTFFAGGVYHGKVKFPPEYPYKPPG
***. :*. :*****:*****. :*. :*****. ***** ***** *:*:*****:**::***
油茶 ISMTTPNGRFMTQKKICLSMSDFHPESWNFMWSVSSILTGLLSFMDTSPPTGSVTTTVAEKQLAKSSL
茄子 ISMTTPNGRFMTQKKICLSMSDFHPESWNFMWSVSSILTGLLSFMDNSPTTGSVSTTVAEKKLAASL
大豆 ISMTTPNGRFMTQKKICLSMSDFHPESWNFMWSVSSILTGLLSFMDNSPTTGSVNTTAAEKQLAKSSL
蓖麻 ITMTTPNGRFMTQKKICLSMSDFHPESWNFMWSVSSILTGLLSFMDNSPTTGSVNTTAAEKQLAKASL
拟南芥 ITMTTPNGRFMTQKKICLSMSDFHPESWNFMWSVSSILTGLLSFMDNSPTTGSVNTTAAEKQLAKASL
云杉 ISMTTPNGRFATHKRICMSMSDYHPETWNPWWSVSSILTGLLSFMDNSPTTGSVSTTVADKQLAKASL
*: * ***** *:*:**:*:*****:*****:***** ***** ***** *:*:*****:**::***
油茶 AFNCKNPTFRKMFPEYVEKYEQQQLSEQVPEQVSTTPTQEGHRPLLDKTGNSTQEDLNKVEALRDRPN
茄子 AFNCKNPTFRKLFPEYVEKYEQQQLSSQVPEQVSSMPAGADKSRPBLEKHDNSPKDEVNRVKALDKVKN
大豆 SFNCKNATFRKIFPEYVEKYNQQQLSEQAAPERVSLDTSPOKSSRPVLEKKLESNGEDMKRVDGLKEVR-
蓖麻 AFNCKNPTFKKLFPEYVEKYNQQQSEQIMSDQVSREASREDRSRPTLEKLDNSSGD--VKRDTLKDARR
拟南芥 AFNCKNPTFKKLFPEYVEKYNQQQSEQIMSDQVSREASREDRSRPTLEKLDNSSGD--VKRDTLKDARR
拟南芥 AFNCKNPTFKKLFPEYVEKYNQQQSEQIMSDQVSREASREDRSRPTLEKLDNSSGD--VKRDTLKDARR
:****. . *:*:*****. ****. :** .: . : . *
油茶 RRKQSFPTWMLLLLVSIFGVVMA LPLLQL----
茄子 QQRKSVPTWMLLLLVSIFGVVMA LPLLQL----
大豆 KNRKPFPTWMLLLLVSIFGVVMA LPLLQL----
蓖麻 NGKQTFPTWMLLLLVSIFGVVMA LPLLQL----
拟南芥 NGKQTFPTWMLLLLVSIFGVVMA LPLLQL----
云杉 GRSKNFPTWMLLLLVSIFGVVMA LPLLNLDLTNL
.: ****: :*. :** *****:*

```

图 3 6 个物种泛素结合酶 UBE2-J2 的氨基酸序列 Clustalx 同源性分析

hits by profiles:[1 hit(by 1 profile) on 1 sequence]

Hits by PS50127 UBIQUITIN_CONJUGAT_2 Ubiquitin-conjugating enzymes family profile:

USERSEQ1  (239 aa)

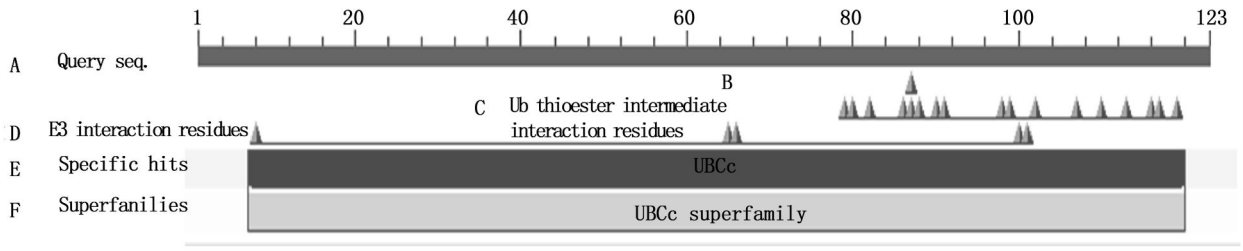
8-122: score=22.445

KRLQKEYRALCKEPVSHVTARPSPS-DILEWHYVLEGSEGTFFAGGYYGKIKFPPEYPF
 KPPGISMTTPNGRFMTQK--KICLSMSDFhPESWNFMWSVSSILTGLLSFMDTSPTT--

Predicted feature:

ACT_SITE	87	Glycyl thioester intermediate (By similarity)	[condition:C]
----------	----	---	---------------

图 4 普通油茶 UBE2-J2 保守区域比对及半胱氨酸活性位点分析结果



A: 比对的序列; B: 半胱氨酸活性位点; C: 泛素形成硫酯键中间产物的残基; D: 与 E3 相互作用的残基; E: 特异性注释; F: 超级家族
 图 5 普通油茶泛素结合酶 UBE2-J2 催化位点 (UBCc) 分析

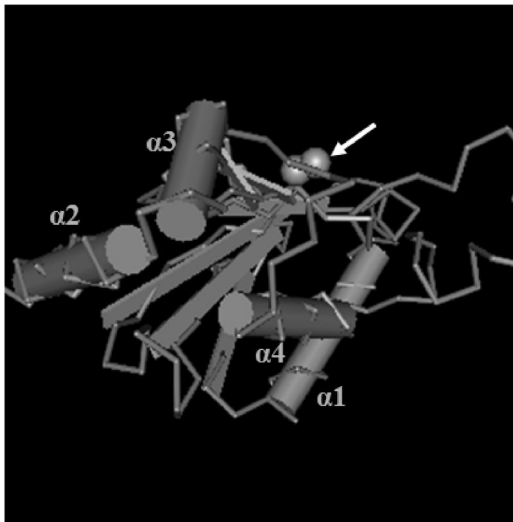


图 6 位于 87 位的半胱氨酸残基在保守区域中的位置

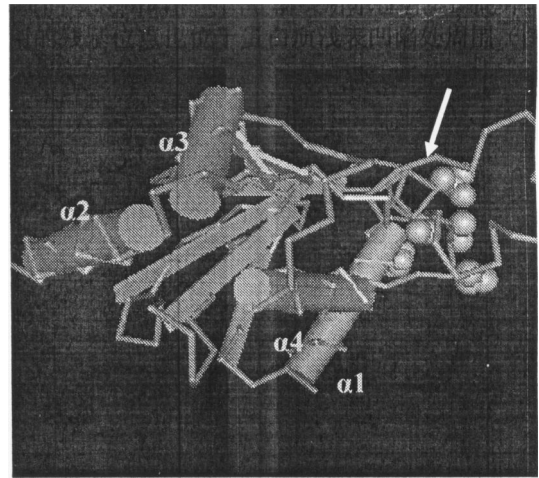


图 8 与 E3 相互作用的残基位在保守区域的位置

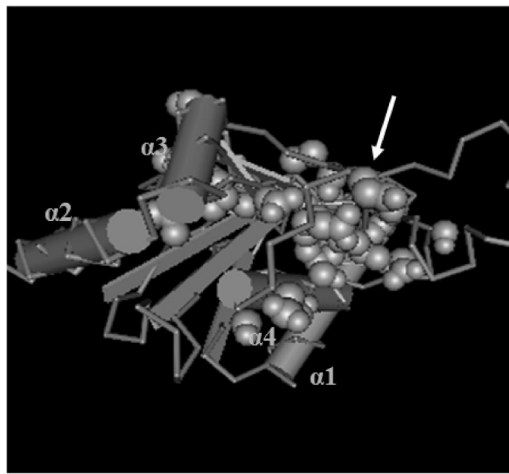


图 7 与泛素通过硫酯键结合的残基在保守区域中的位置

图 9 表明: 2 个 *UBE2* 基因表达量的变化趋势基本一致, 均在果实快速膨大初期与膨大前保持基本相当的表达水平, 果实膨大中期表达量迅速升高, 到果实膨大后期, *UBE2-J2*、*UBE2A* 基因的表达量分别

达到膨大前的 4.91 倍和 2.64 倍。在果实膨大期的各阶段, *UBE2-J2* 基因的表达量均低于 *UBE2A* 基因。果实膨大前 *UBE2A* 基因的表达量是 *UBE2-J2* 基因的 5.17 倍, 果实膨大后期前者是后者的 2.78 倍。

3 结论与讨论

泛素/26S 蛋白酶体途径能够选择性地降解蛋白质, 在细胞的许多代谢过程中起关键作用, 是真核生物重要的翻译后修饰系统, 如参与细胞周期调控、信号传导、应急反应、受损或错误折叠蛋白的降解以及 DNA 修复等^[26]。单泛素化的靶蛋白不会水解, 但可调节其生物学活性, 如调节靶蛋白的稳定性、使靶蛋白重新折叠及易位、改变染色体结构、基因修复、复制及表达调节等^[24]。

蛋白质的泛素化过程是一系列的酶促级联反应, E2 是这个酶促级联反应的重要组分。目前研究表明, 在所有的真核细胞中都有多种 E2, 如人类至少有 30 种 E2, 拟南芥有 37 种, 多样性的 E2 对于靶蛋白的特异性选择具有重要作用。E2 根据其结构

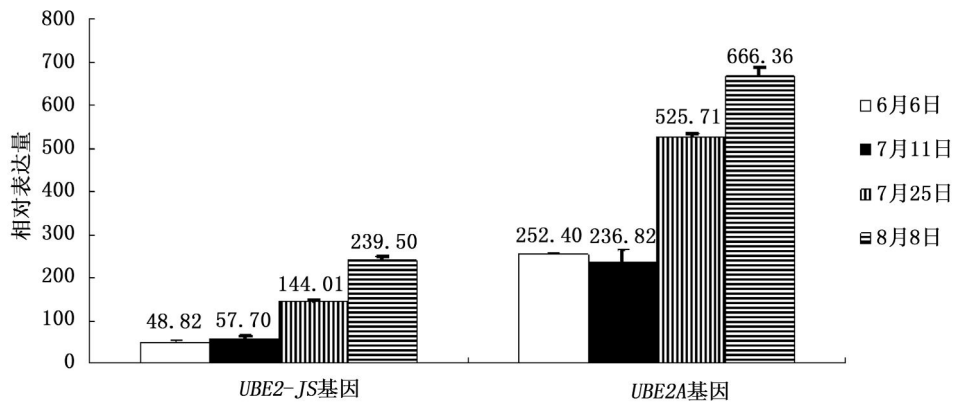


图9 2个 *UBE2* 基因在普通油茶种子膨大期的表达量变化

和功能大致可以分为4类^[26-29]: I类 E2, 由长150AA的保守催化结构域(UBC)组成, 在许多短周期蛋白和异常蛋白的泛素依赖性降解中起重要作用; II类 E2, 含催化结构域和一个C-末端延伸结构, 其C-末端延伸结构具有多种功能, 如参与靶蛋白识别, 与E3酶互作、参与N-末端规则(N-end rule)依赖性蛋白水解途径; III类 E2, 含催化结构域和1个N-末端延伸结构, 其N-末端延伸结构的功能还不清楚; IV类 E2, 同时含有催化结构域、C-末端延伸结构和N-末端延伸结构。普通油茶 *UBE2-J2* 与其它物种的E2具有极高的相似性和相似的三维结构, 含有E2的保守催化结构域、活性位点半胱氨酸残基, 第123~239位AA为C-末端延伸结构, 因此普通油茶 *UBE2-J2* 属于油茶II类E2, 而郭静怡等^[19]克隆的油茶 *UBE2* 基因编码152个氨基酸, 只包含1个UBC, 属于I类E2。

根据序列比对分析结果可见, 同一植物体内的不同种E2的序列同源性较低, 不同物种中的同一种E2则具有较高的同源保守性, 推测这可能与其功能不同有关。根据qRT-PCR结果, 普通油茶 *UBE2-J2* 与 *UBE2A* 在果实膨大期的表达变化模式相似, 但 *UBE2A* 的本底表达水平更高, 而 *UBE2-J2* 的表达量增高幅度更大, 推测其功能可能有差异。普通油茶中E2的研究分析初步印证了已有的报道, E2存在着种类和功能多样性, 当遭受逆境或处于不同的发育期时, 不同种类的E2通过表达量的变化等表现出不同的表达方式^[30]。研究表明, 拟南芥的E2基因多以多拷贝形式存在, 造成E2蛋白功能冗余, 这可能是E2基因研究进展相对缓慢的原因。随着新一代测序技术的不断发展成熟, 越来越多的模式植物的全基因组或转录组序列测序完成, 利用不同的模

式植物研究基因的功能, 有望解决E2功能冗余性问题, 推动E2基因的研究进展。普通油茶不同E2成员的克隆、功能鉴定等相关研究有待于进一步开展。

参考文献:

- [1] 郭启芳, 邹琦, 王玮. 植物泛素/26S蛋白酶体通路的生理功能和分子生物学[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(5): 533-539
- [2] 朱经春, 王台, 陈克成. 泛肽系统的组成和功能(一)——系统组成、底物识别与蛋白质泛肽化[J]. 植物学通报, 1999, 16(3): 208-218
- [3] 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
- [4] 盛仙永, 胡正海, 林金星. 泛素/蛋白酶体途径及其在高等植物有性生殖中的作用[J]. 西北植物学报, 2004, 24(8): 1527-1536
- [5] Ingvarsdson C, Veierskov B. Ubiquitin and proteasome-dependent proteolysis in plants[J]. Physiologia Plantarum, 2001, 112(4): 451-459
- [6] Moon J, Parry G, Estelle M. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development[J]. Plant Cell, 2004, 16(12): 3181-3195
- [7] Smalle J, Vierstra R D. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway[J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55: 555-590
- [8] Dreher K, Callis J. Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants[J]. Annals of Botany, 2007, 99(5): 787-822
- [9] Zhang Y, Yang C, Li Y, et al. SDIR1 is a RING finger E3 ligase that positively regulates stress-responsive abscisic acid signaling in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2007, 19(6): 1912-1929
- [10] Shi S Q, Shi Z, Jiang Z P, et al. Effects of exogenous GABA on gene expression of *Caragana intermedia* roots under NaCl stress: regulatory roles for H₂O₂ and ethylene production[J]. Plant, Cell & Environment, 2009, 33(2): 149-162
- [11] 王金利, 史胜青, 贾利强, 等. 植物泛素结合酶E2功能研究进展[J]. 生物技术通报, 2010(4): 7-10
- [12] 徐晨曦, 姜静, 刘甜甜, 等. 柃柳泛素结合酶基因(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
- [13] 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
- [14] 许传俊, 李 玲. 泛素/26S 蛋白酶体途径与植物的生长发育[J]. 西北植物学报, 2007, 27(3): 635-643
- [15] Gohre V, Spallek T, Haweker H, *et al.* Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB [J]. *Current Biology*, 2008, 18 (23): 1824-1832
- [16] Lai J, Chen H, Teng K, *et al.* RKP, a RING finger E3 ligase induced by BSCTV C4 protein, affects geminivirus infection by regulation of the plant cell cycle[J]. *Plant Journal*, 2009, 57(5): 905-917
- [17] Lee H K, Cho S K, Son O S, *et al.* Drought stress-induced Rma1H1, a RING membrane-anchor E3 ubiquitin ligase homolog, regulates aquaporin levels via ubiquitination in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. *Plant Cell*, 2009, 21 (2): 622-641
- [18] Pan J, Fujioka S, Peng J, *et al.* The E3 ubiquitin ligase SCFT-IR1/AFB and membrane sterols play key roles in auxin regulation of endocytosis, recycling, and plasma membrane accumulation of the auxin efflux transporter PIN2 in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(2): 568-580
- [19] 郭静怡. 油茶泛素结合酶 E2 基因全长 cDNA 克隆及其 RNAi 干扰载体的构建[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2011
- [20] Mortazavi A, Williams B A, McCue K, *et al.* Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(7): 621-628
- [21] Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17): 3389-3402
- [22] de Castro E, Sigrist C J, Gattiker A, *et al.* ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(web server issue): 362-365
- [23] Marchler-bauer A, Anderson J B, Cherukuri P F, *et al.* CDD: a Conserved Domain Database for protein classification[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(database issue): 192-196
- [24] 易乐飞, 刘楚吾, 王 萍, 等. 条斑紫菜泛素结合酶基因的 cDNA 序列克隆与分析[J]. 水产学报, 2009, 33(5): 719-726
- [25] Schwede T, Kopp J, Guex N, *et al.* SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13): 3381-3385
- [26] 陈建明, 余应年. 真核泛素缀合途径研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(2): 175-178
- [27] Plafker S M, Plafker K S, Weissman A M, *et al.* Ubiquitin charging of human class III ubiquitin-conjugating enzymes triggers their nuclear import[J]. *Journal of Cell Biology*, 2004, 167(4): 649-659
- [28] Matuschewski K, Hauser H P, Treier M, *et al.* Identification of a novel family of ubiquitin-conjugating enzymes with distinct amino-terminal extensions [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(5): 2789-2794
- [29] Jentsch S. The ubiquitin-conjugation system[J]. *Annual Review of Genetics*, 1992, 26: 179-207
- [30] 赖 燕, 徐 波, 林 明, 等. 辣椒泛素交联酶 cDNA 的分离及其在 UV-B 作用下的表达分析[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2008, 37(2): 162-165