

拟南芥 *AtTR1* 在盐胁迫应答中的功能初探

刘巧红, 杨 亮, 刘志斌, 李旭锋, 杨 毅

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘 要: 本研究主要探索油菜中 E3 泛素连接酶 BnTR1 在拟南芥中的同源基因 *AtTR1* (*At3g47550*) 的功能. 通过体外泛素化实验证明 *AtTR1* 具有 E3 连接酶活性. 基因表达分析显示该基因受 200 mmol/L NaCl 显著诱导, 说明该基因可能在响应盐胁迫中发挥一定的功能. 为了更深入的探究该基因在植物耐盐中的作用, 构建了植物表达载体 pZH01-*AtTR1* 转化突变体. 在含有潮霉素的培养基上筛选阳性苗, 并利用荧光定量 PCR 检测表明 *AtTR1* 基因已经成功转入突变体中.

关键词: E3 连接酶; 表达谱分析; 回复突变 *AtTR1/attr1*

中图分类号: Q945

文献标识码: A

文章编号: 0490-6756(2016)04-0895-05

First exploration on protein function of *Arabidopsis AtTR1* in response to salt stress

LIU Qiao-Hong, YANG Liang, LIU Zhi-Bing, LI Xu-Feng, YANG Yi

(Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: In this work, the function of *AtTR1* (*At3g47550*), the homologues of E3 ligase BnTR1 in *Arabidopsis* was studied. *In vitro* self-ubiquitination assay demonstrated that the protein possess an E3 ligase activity. The analysis of expression pattern revealed that *AtTR1* was dominantly induced by salt (200 mmol NaCl). The result indicated that the gene may play a certain function in response to salt stress. In order to further study the function of the gene in plant salt resistance, the plant expression Vector pZH01-*AtTR1* was constructed and introduced into mutants. Positive transgenic seedlings were selected for their ability to grow on a medium containing hygromycin. RT-PCR analysis of hygromycin resistant plants showed that *AtTR1* gene had been integrated into the genome of *attr1* mutant.

Key words: E3 ubiquitin ligases; gene expression profile; *AtTR1/attr1* complementary lines.

1 引 言

植物在生长发育的过程中会受到各种各样的逆境胁迫, 包括生物胁迫和非生物胁迫. 在胁迫的条件下, 植物的生长发育会受到严重的影响^[1]. 其中, 盐胁迫是目前影响植物生长和农作物产量的重

要非生物逆境因子之一, 例如土壤盐渍化严重影响植物的生长发育, 造成可耕地面积的减少和农作物的减产^[2]. 中国有约 2.7×10^7 hm^2 的土地盐渍化, 其中 7×10^6 hm^2 为农田^[3]. 盐渍化土地面积的不断扩大及耕地面积的减少已经给农业生产造成了重大的损失, 因此, 利用转基因手段获得抗盐的转基

收稿日期: 2015-03-02

基金项目: 国家自然科学基金(31171586); 973 计划(2015CB755700)

作者简介: 刘巧红(1990-), 女, 甘肃定西人, 硕士研究生, 研究方向为植物遗传与分子生物学. E-mail: 729380552@qq.com

通讯作者: 杨毅. E-mail: yangyi528@vip.sina.com

因植物,提高农作物产量、培育耐盐作物新品种已经成为当今植物生物技术领域研究的热点之一^[4].

植物通过对基因表达的不同水平进行调控从而应对各种非生物胁迫,如转录调控、转录后调控、翻译调控和翻译后修饰^[5].泛素化修饰作为重要的蛋白质翻译后修饰,在植物响应非生物胁迫的过程中起了重要的作用.对蛋白质进行多聚泛肽链修饰介导底物通过泛素-26 S 蛋白酶途径(Ubiquitination-26S proteasome path way),通过泛素结合酶(E1)、泛素结合酶(E2)和泛素连接酶(E3)把小分子泛素结合到底物蛋白质的赖氨酸(Lys)残基上,底物蛋白可能被接上单个泛素或多聚泛肽链,是一种调节真核细胞进程重要的必不可少的调节机制^[6].例如,调节许多细胞周期、细胞信号转导、DNA 修复、蛋白质运输以及生物和非生物胁迫应答过程^[7].在整个泛素化途径中,泛素连接酶 E3 起着决定底物的关键性作用^[8].根据结构的不同可以分为两大类:单亚基 E3 和多亚基 E3.单亚基 E3 包括 HECT、RING 和 U-box 三种结构域类型^[9].

在众多类型的 E3 中,具有 RING 结构的 E3 在植物应答生物和非生物胁迫中起着重要作用. AtAIRP1(*Arobidopsis thaliana* ABA insensitive RING protein 1)正调控 ABA 介导的干旱反应^[10]; HOS1 降解 ICE1 负调控植物冷胁迫^[11]; ATAIRP3(*Arobidopsis thaliana* ABA insensitive RING protein 3)正调控盐和干旱胁迫^[12]. RING 结构域家族的特点是具有环指结构域(Ring finger domain),每个环指结构域连有两个锌离子,并且对 E3 连接酶的活性是必需的^[13].根据 RING 结构域的不同进一步划分为 RING-H2 (C3H2C3)、RING-HC (C3HC4)、RING-V、RING-C2 和 RING-D 等. U-box E3 连接酶的结构和 RING E3 很相似,但是锌离子对于这种结构的稳定性不是必需的.

本实验室在前期研究从油菜中克隆到新的 E3 连接酶 BnTR1 发现其正调控热胁迫应答^[14].本研究中的 At3g47550 与 BnTR1 的核苷酸序列相似性高达 86%,且蛋白质的氨基酸序列中都含有一个锌指拉链的结构功能域(RINGv),故本实验室将该基因命名为 AtTR1.为研究该基因与植物抗逆性的关系,构建了原核表达载体 pGEX6p-1- At-

TR1,热激转化至大肠杆菌 BL21,成功表达 GST-AtTR1 融合蛋白,体外泛素化实验证明其具有 E3 连接酶活性.进一步构建植物表达载体 pZH01-AtTR1,转化根癌农杆菌 EHA105 菌株,通过花序侵染的方法获得转基因植物,为今后深入探究此 E3 连接酶的功能奠定了基础.

2 实验材料与方法

2.1 实验材料

野生型拟南芥 Columbia(Col-0),拟南芥突变体种子 *attr1* (*salk*_090823c),原核表达载体 pGEX6p-1、植物表达载体 pZH01、JM109 菌株、农杆菌 EHA105 均由本实验室保存. E1 和 E2 购自 Boston Biochem 公司,泛素 Ub 购自 Sigma 公司.限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Ec*I136 II、*Sal* I、T4 DNA ligase 购自 TaKaRa 公司, RNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司,反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司,SYBGreen 购自 Bio-rad 公司,引物合成与测序由华大生物技术有限公司合成.

2.2 实验方法

2.2.1 植物培养 种子先用 20% 消毒水消毒灭菌 15 min,之后用灭菌的 ddH₂O 清洗 5 次均匀散布在 1/2 MS 培养基(含 0.8% 琼脂),4℃ 春化 2 天后转移到 22℃ 培养室培养 5~7d 移栽到土里.培养条件为 22~24℃,14h 光照/10h 黑暗,湿度 50%.

2.2.2 引物设计 从 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)查询获得 *At*TR1 的序列,及根据突变体号从 <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html> 查询相应的信息,用 Primer premier 5.0 设计引物.

2.2.3 非生物胁迫处理及荧光定量 PCR 1/2 MS 培养基上生长两周的幼苗分别 38℃ 热处理 1 h、3 h、5 h、200 mmol/L NaCl 的 1/2 MS 中处理 0 h、6 h、12 h、24 h.液氮速冻提取总 RNA.

2.2.4 蛋白诱导表达及纯化 利用表 1 所示引物进行扩增,将 *At*TR1 通过 *Bam*H I 和 *Sal* I 连接到原核表达载体 pGEX6p-1.构建好的重组载体 pGEX6p-1- *At*TR1 热激转化到大肠杆菌 BL21,37℃ 摇菌 OD₆₀₀ 值达 0.4~0.6,加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L,16℃ 摇菌诱导 16 h,超声波破碎细胞,用亲和层析的方法纯化 GST-AtTR1 融合蛋白.

表 1 实验使用引物
Tab. 1 Primer sequence used in assay

用途	<i>AtTR1</i> (At3g47550)	<i>Tub12/Actin</i>
突变体引物	LP;5'-GTCTGCTTCCAAGAAATGACG-3' RP;5'-GGTTCCAGATTTTCGAAAAAGC-3' LB1.3;5'-ATTTTGCCGATTTTCGGAAC-3'	
半定量 PCR 引物	F;5'-ATGGCTGATCATTGTGAGTTTATGTA-3' R;5'-TCGCCTTTCTCATTACACCAAC-3'	F;5'-AGCATGGTGTGTGTTAGCAACTGGG-3' R;5'-CCCGCTCTGCTGTTGTGGTGAA-3'
定量 PCR 引物	F;5'-TCCGCCTCCTCCTCTGATGAA-3' R;5'-GGATGAGAGCAGCAGAGCGACAA-3'	F;5'-ACATCCCACCTACTGGTCTGAAG-3' R;5'-GCATCTTGGTATTGCTGGTACTCT-3'
PCR 扩增引物	F;5'-ATGGCTGATCATTGTGAGTTTAT-3' R;5'- TCAAAC TGGTGT TGGGAC-3'	
原核表达引物	F;5'-GCGGATCCATGGCTGTCATTTGAGTTTAT-3' R;5'- GCGTCGACTCAAAC TGGTGT TGGGAC-3'	
回复突变引物	F;5'-CGCGGATCCATGGCTGATCATTGTGAGTTT-3' R;5'- GAGCTCAACTGGTGT TGGGACATTGGA-3'	

注: F 为正向引物; R 为反向引物; 下划线所示为酶切位点.

2.2.5 植物表达载体构建及农杆菌介导花序侵染法转化拟南芥 以反转录产物 cDNA 为模板, 以特异性引物进行 PCR 扩增, PCR 产物经琼脂糖电泳后用 Biomed 公司的 PCR 纯化试剂盒纯化回收扩增片段. 将回收片段和植物表达载体 pZH01 分别经 *Bam*H I 和 *Ec*I136 II 双酶切, 回收目的片段和 pZH01, 用 T4 DNA Ligase 进行连接, 将连接产物转化到大肠杆菌感受态 JM109 中, 从 LB+ Amp 的培养基上挑选单菌落接种到含 Amp 的液体 LB 中摇菌培养, 用菌落 PCR 法检测转化子. 挑选阳性菌提取重组质粒, 通过双酶切检测重组子是否连接上. 将通过菌落 PCR 法和双酶切检测后确认含有插入片段的质粒命名为 pZH01-*AtTR1*, 取阳性菌菌液送上海华大基因有限公司测序.

提取 pZH01-*AtTR1* 质粒, 用反复冻融法导入农杆菌 EHA105 中, 获得转化载体 EHA105/pZH01-*AtTR1*, 并用菌落 PCR 法鉴定出阳性转化子. 采用侵花序法通过农杆菌介导将 pZH01-*AtTR1* 整合到拟南芥基因中, 被侵染花序的植物暗箱中培养 16~24h 后, 使植物处于正常的生长条件下生长, 待成熟后收集种子烘干用于后续的筛选试验.

2.2.6 转录水平鉴定突变体和回复突变纯合子 Semi-quantitative PCR: 从生长两周的野生型、突变体和回复突变幼苗提取总 RNA 为模板进行转录为 cDNA, 进行 PCR 扩增, 条件为: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 10 s, 60℃ 退火 10 s, 72℃ 延伸 20 s, 45 个循环. 半定量内参为 *Actin*.

Real-time PCR: 植物总 RNA 反转录为 CD-

NA, 再使用 q-PCRmix-SYBR Green 反应体系为: 10μL SYBR Green I, 2.5μL+2.5μL Primer(F+R)(2pmM), 4μL cDNA 模板, 1μL ddH₂O. 加样后通过 Real-time-PCR 检测基因的表达量, q-PCR 实验程序为: 95℃ 预变性 5min; 95℃ 变性 10 s, 60℃ 退火 10 s, 72℃ 延伸 20 s, 45 个循环. 定量内参为 *Tublin2*.

3 结果分析

3.1 *AtTR1* 的生物信息学分析

AtTR1 基因位于拟南芥第 3 号染色体上, 全长 2083 bp, 包含 7 个外显子, 开放阅读框长 699 bp. 编码 232 个氨基酸, 蛋白大约 25 kDa. 在 Smart Domain 上预测 *AtTR1* 含有一个 RINGv 结构域, 不含有其他结构域, RING 结构域氨基酸序列分析显示 *AtTR1* 属于 C4HC3 型(图 1A), 对 *AtTR1* 进行同源比对, 发现除拟南芥外, 在油菜(*Brassica napus*)、芜菁(*Brassica rapa*) 等其他物种能找到氨基酸序列相似性较高的同源序列(图 1B,C).

3.2 非生物胁迫下的表达谱分析

为了分析 *AtTR1* 对植物非生物胁迫的响应, 本文对生长两周的野生型拟南芥幼苗分别用 NaCl 和热处理后检测其表达量变化. 如图 2 所示, 在 200 mmol/L NaCl 处理 6 h 时, 与对照相比, *At-TR1* 的表达量提高了 2 倍, 随着处理时间的增加, *AtTR1* 表达量逐渐上升, 在 24 h 时达到 4.5 倍; 高温 38℃ 热处理 1h、3h、5h 检测 *AtTR1* 的表达量与对照相比无明显的变化. 结果表明, *AtTR1* 明显受 NaCl 的诱导, 而不受热胁迫诱导.

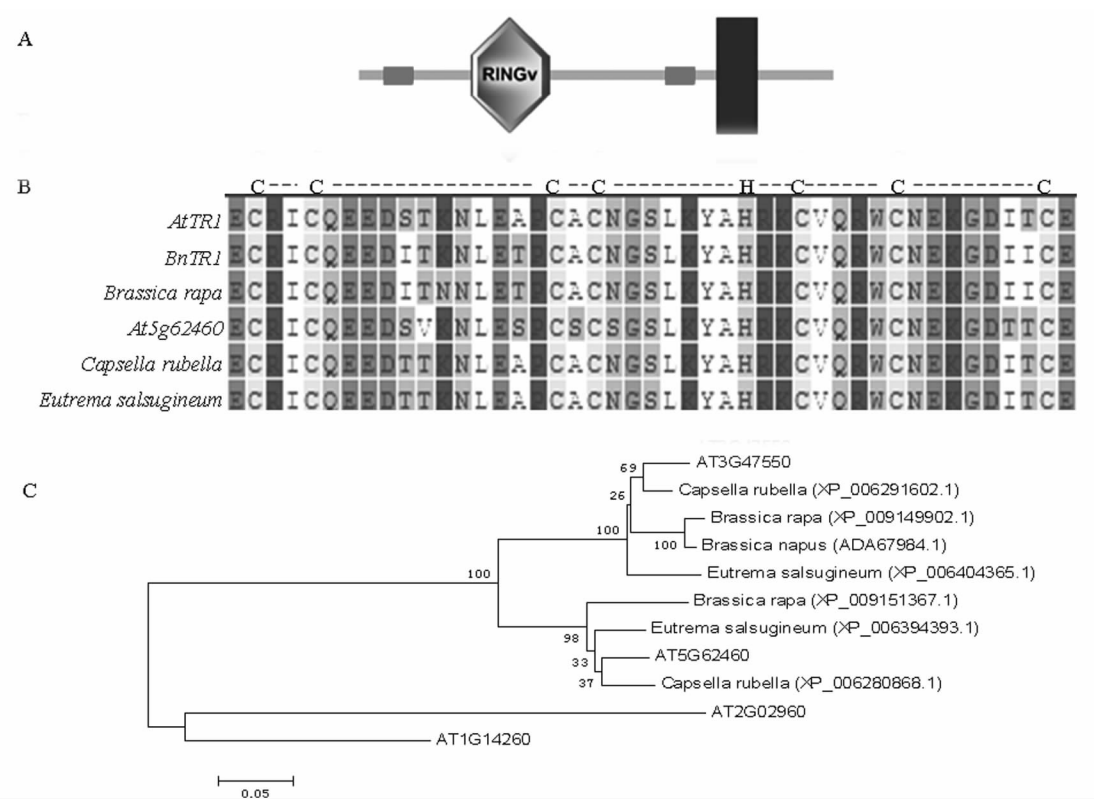


图 1 结构预测与同源性比对

A. 蛋白结构预测;B. 同源性比对;C. 同源基因进化树

Fig. 1 Structure prediction and homologous blast

A. Structure prediction; B. Homologous blast; C. Phylogenetic analysis of the eleven AtTR1 homologs

3.3 AtTR1 蛋白的 E3 连接酶活性检测

通过 IPTG 诱导,GST 亲和纯化,SDS-PAGE 电泳检测在 50 KD 左右有单一的条带,没有其他杂带(图 A),可以满足下游的实验要求. 我们用纯化的 GST-AtTR1 融合蛋白,与 human E1 (UBA1), human E2 (UBCH5B) 和 human His-ubiquitin 进行不同的组合配成泛素反应体系,进行 Western Blot 和泛素抗体检测,发现,只有融合蛋白 GST-AtTR1 和 Ub、E1、E2 都存在的情况下形成明显的拖尾现象,是泛素连接反应最直观的反应,而分别缺少 Ub、E1、E2 和 GST-AtTR1 的条件下,均无法形成泛素拖尾条带. 这说明 E1、E2 和 GST-AtTR1 是形成泛素条带的必要蛋白,同时也证明 GST-AtTR1 具有 E3 连接酶活性.

3.4 T-DNA 插入突变体纯合株系鉴定

在植物的基因功能分析方面,特别是模式植物拟南芥中,突变体可直观表现出该基因缺失后造成的功能缺陷,为基因功能提供直接的证据. 所以为了分析 AtTR1 基因功能,我们从拟南芥突变体种子库 ABRC 购买了相关突变体(SALK_090823c, 其插入位点见图 4A). 播种,生长四周后取叶片并

提取总 DNA. 在插入位置前后设计引物,LP 和 RP,同时设计了 T-DNA 序列上的一条通用引物 LBb1. 3,并以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,

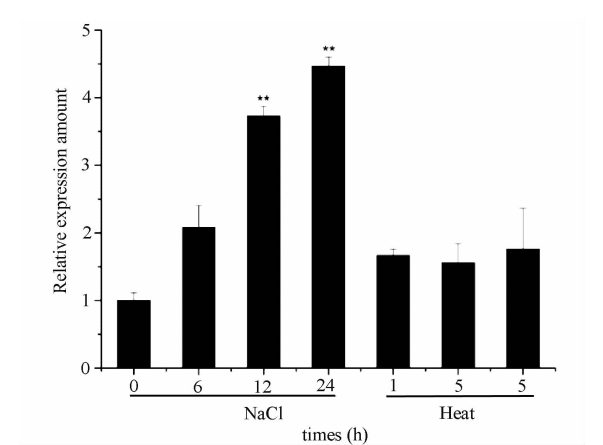


图 2 非生物胁迫下相对表达量

AtTR1 分别受 NaCl 和热胁迫的诱导表达分析. 2 周幼苗经 200 mmol/L NaCl 处理 0、6h、12h 和 24h,高温(38℃)处理 1h、3h、5h. 柱形图上的星号表示差异显著(* $P<0.05$ and ** $P<0.01$)

Fig. 2 Relative expression quantity under abiotic stress. Expression of AtTR1 in response to salt and heat stress. 2-week-old plants were incubated with 200 mmol/L NaCl for 0, 6h, 12h, 24h and heat stress for 1h, 3h, 5h. Asterisks indicate statistically significant differences between the 0h and other time, determined by Student's t tests, * $P<0.05$ and ** $P<0.01$.

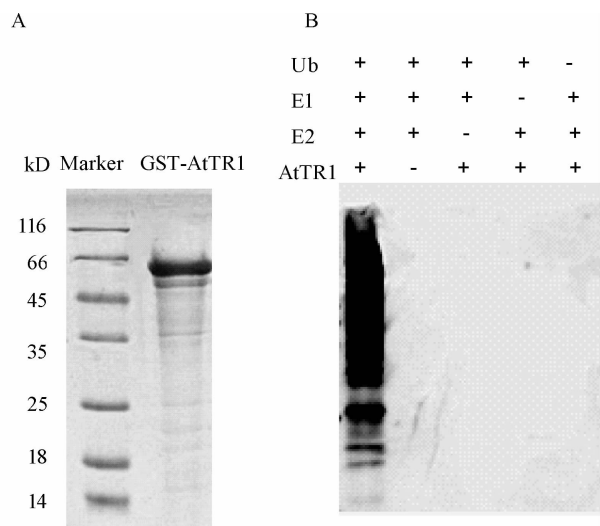


图 3 体外泛素化分析

A. *AtTR1* 蛋白的表达及纯化. B. GST-*AtTR1* 融合蛋白在 E1, E2, 以及带 His 标签的泛素分子存在的条件下进行体外 E3 连接酶活性分析. 样品经过 12% SDS-PAGE 后, 进行 Western blot, 随后用泛素抗体进行孵育, 分析目的条带.

Fig. 3 In vitro self-ubiquitination assay

A: Expression and purification of GST-*AtTR1* fusion protein. B: GST-*AtTR1* was assayed for E3 activity in the presence of E1, E2 and His tag ubiquitin. Samples were resolved by 12% SDS-PAGE. The corresponding protein bands with ubiquitin were detected by anti-Ub immunoblot analysis.

在 DNA 水平上对突变体进行纯合鉴定. 如图 4 所示, 当筛选为纯合突变株系时, 使用引物 LP 和 RP 进行 PCR 时没有条带, 而使用 LBb1.3 和 RP 时有条带, 野生型作为对照. 此外, 为了进一步验证这个 T-DNA 插入纯合突变体, 确实造成了基因表达受阻. 我们用半定量 RT-PCR 对其 RNA 表达水平进行了检测. RT-PCR 的结果显示, 突变体中 *AtTR1* 基因的表达量显著降低, 说明 T-DNA 插入成功打断了 *AtTR1* 的转录, 突变体材料可用于后续分析.

3.5 转基因植物的 Real-time PCR 鉴定

为了分析 *AtTR1* 的基因功能, 我们首先构建了植物表达载体 pZH01-*AtTR1*, 经农杆菌转化, 花序浸染后得到 T_0 代转基因种子, 并经潮霉素板筛选得到转基因苗(图 5A). 得到 T_1 代的种子后, 将 T_2 代播种在卡那板上, 可以观测分离得到的纯合株系, 纯合株系幼苗移苗生长 4 周提取叶片 RNA 检测转基因株系中 *AtTR1* 的表达量并将其中表达量最高和相对较高的株系用于后续的研究. 如图 5B 所示, *AtTR1* 的表达量在转基因株系分别有不同倍数的提高, 我们选择了表达量较高的株系 COM3-2、COM4-8 和 COM7-2, 其中, 株系 COM4-8 和 COM7-2 的表达量较野生型提高了 2 倍左右, 株系 COM3-2 较野生型提高了 1.7 倍左右. 此结

果说明突变体中含有 *AtTR1* 基因片段, 我们获得了回复突变纯合株系做进一步的表型分析.

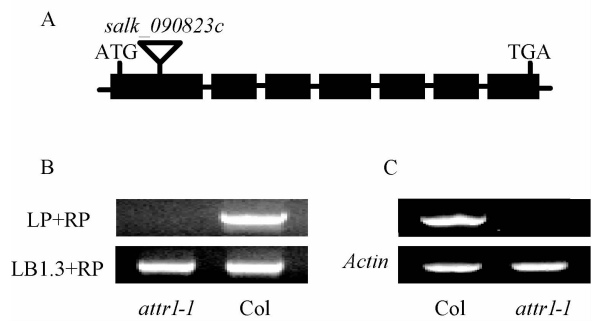


图 4 拟南芥 *AtTR1* 纯合突变体(SALK_090823c)的鉴定

A. T-DNA 插入突变体 *attr1*(*salk_090823c*) 结构图. 黑色矩形代表编码区域, 实线代表内含子, 倒三角形表示 T-DNA 插入. B 和 C. 利用基因组 PCR 及反转录 PCR 对野生型及突变体分别进行 DNA 水平及 RNA 水平鉴定. Col, Columbia 生态型-0, *Actin* 为内参.

Fig. 4 Identification of *attr1* T-DNA insertion mutant plants

A: Schematic representation of the *attr1* (*salk_090823c*) allele with T-DNA insertion. Gray bars indicate coding regions, and solid lines represent introns of the *AtTR1* gene. T-DNA insertions are indicated by triangles. B and C: Genotyping PCR and RT-PCR analysis of wild-type and *attr1* plants at DNA and RNA level, respectively. Col, Columbia-0. Constitutively expressed *Actin* mRNA was used as a loading control.

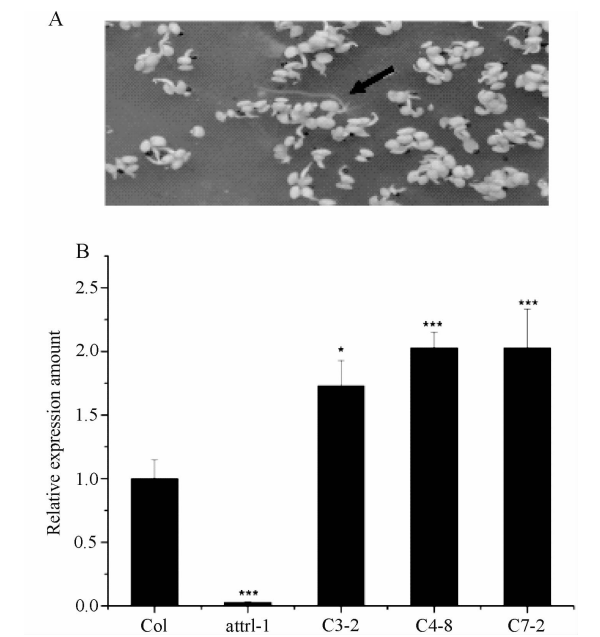


图 5 回复突变 *AtTR1*/*attr1* 的纯合筛选

A. 阳性苗在筛选培养基中的生长状况; B. Real-time PCR 检测 *AtTR1* 在野生型、突变体及回复突变中的表达量. 柱形图上的星号表示差异显著 (* $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$)

Fig. 5 Screening of homozygous *AtTR1*/*attr1* complementary lines

A: Positive transgenic seedling growing on the selective medium. B: Real-time PCR analysis of *AtTR1* in wild-type, mutant, and complementary plants. Asterisks indicate statistically significant differences between the wild-type and other plants, determined by Student's *t* tests, * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$.

4 讨 论

生物体内蛋白功能的实现,离不开各种形式的蛋白翻译后的修饰过程.其中泛素化过程近年来引起了越来越广泛的关注,与蛋白质磷酸化信号传导作用相似,泛素化在细胞生命活动的许多进程中发挥着至关重要的作用^[15].可参与调控细胞生命活动的各个生理代谢过程,不仅调节植物生长和发育,同时对植物响应外界生物与非生物胁迫的过程是不可或缺的^[16].泛素 E3 连接酶在蛋白质的翻译后修饰中起着决定底物特异性的关键作用,在植物体内 E3 连接酶参与多种生物胁迫和非生物胁迫应答反应^[17].

本实验室在前期研究发现 E3 连接酶 BnTR1 在热胁迫中起正调控作用,同源比对发现 BnTR 与拟南芥中的 At3g47550(AtTR1)氨基酸序列相似性高达 86%,生物信息学分析显示这两个蛋白氨基酸序列中都含有一个 RING 结构域,属于 C4HC3 型.在 SMART(<http://www.smart.embl-heidelberg.de/>)预测出 BnTR1 的 C 端有跨膜结构域(Transmembrane Domain, TMD),而 At-TR1 没有类似的结构域,推测 C 端结构域的不同可能导致这两个蛋白的生物学功能不同.表达谱结果显示 AtTR1 受 NaCl 诱导显著但不受热诱导,而 BnTR1 受热胁迫诱导显著,AtTR1 和 BnTR1 对同一种逆境因子的响应表现出了一定的差异性,暗示它们参与不同的胁迫应答.为了验证 AtTR1 是否具有 E3 活性,我们从大肠杆菌中诱导表达并纯化了带 GST 标签的 AtTR1 蛋白,并进行了体外泛素化实验.结果表明,当 E1、E2 及 GST-AtTR1 共同存在的情况下会形成多聚泛素化条带,证实 AtTR1 具有 E3 连接酶活性.前人研究发现 RING 结构与植物抗逆密切相关^[18].在许多已知的 E3 连接酶中,许多 RING 结构的 E3 连接酶参与调解盐、干旱、热等非生物胁迫的细胞应答^[19-21].为研究该基因与植物抗逆性的关系,构建了植物表达载体 pZH01-AtTR1,经农杆菌转化,花序侵染得到转基因植物,通过 Realtime-PCR 鉴定 AtTR1 的表达量.结果显示 COM4-8 和 COM7-2 两个株系中 At-TR1 表达量较野生型提高 2 倍多,COM3-2 较野生型高达 1.7 倍.本研究成功获得了突变体及回复突变纯合株系种子,为后续研究该基因的功能奠定了基础.

参考文献:

- [1] Zhu J. Salt and drought stress signal transduction in plants [J]. Annu Rev Plant Biol, 2002, 53 (4): 247.
- [2] Arabidopsis Genome Initiative. A G. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* [J]. Nature, 2000, 408(6814):796.
- [3] Shi H. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA, 2000, 97(12): 6896.
- [4] Huang P, Ju H W, Min J H, *et al.* Molecular and physiological characterization of the *Arabidopsis thaliana* Oxidation-related Zinc Finger 2, a plasma membrane protein involved in ABA and salt stress response through the ABI2-mediated signaling pathway [J]. Plant & Cell Physiology, 2012, 53 (1): 193.
- [5] Pickart C. Back to the future with ubiquitin [J]. Cell, 2004, 116(2): 181-190.
- [6] Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling [J]. Science, 2007, 315(5809): 201.
- [7] Smalle J, Vierstra R D. The ubiquitin k26S proteasome proteolytic pathway [J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55(1): 555.
- [8] Glickman M H, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction [J]. Physiological Reviews, 2002, 82(2): 373.
- [9] Miller J, Gordon C. The regulation of proteasome degradation by multi-ubiquitin chain binding proteins [J]. Febs Letters, 2005, 579(15): 3224.
- [10] Ryu M Y, Cho S K, Kim W T. The *Arabidopsis* C3H2C3-type RING E3 ubiquitin ligase AtAIRP1 is a positive regulator of an abscisic acid-dependent response to drought stress [J]. Plant Physiology, 2010, 154(4): 1983.
- [11] Chua K C, Chandran V, Acharya R, *et al.* Higher Order Spectral (HOS) analysis of epileptic EEG signals [J]. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2007: 6495.
- [12] Kim J H, Kim W T. The *Arabidopsis* RING E3 Ubiquitin Ligase AtAIRP3/LOG2 Participates in Positive Regulation of High Salt and Drought Stress Responses [J]. Plant Physiology, 2013, 162(3): 1733.
- [13] Walters M S. The RING Finger Domain of Varicel-

- la-Zoster Virus ORF61p Has E3 Ubiquitin Ligase Activity That Is Essential for Efficient Autoubiquitination and Dispersion of Sp100-Containing Nuclear Bodies [J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(13):6861.
- [14] Liu Z B, Wang J M, Yang F X, *et al.* A novel membrane-bound E3 ubiquitin ligase enhances the thermal resistance in plants [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, 12(1): 93.
- [15] Smalle J, Kurepa J, Yang P, *et al.* Cytokinin Growth Responses in Arabidopsis Involve the 26S Proteasome Subunit RPN12 [J]. *Plant Cell Online*, 2002, 14(1): 17.
- [16] 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.
- [17] Lorick K L, Jensen J P, Fang S, *et al.* RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1999, 96(20): 11364.
- [18] Kim S J, Kim W T. Suppression of Arabidopsis RING E3 ubiquitin ligase AtATL78 increases tolerance to cold stress and decreases tolerance to drought stress [J]. *Febs Letters*, 2013, 587(16): 2584.
- [19] Coscoy L, Sanchez D J, Ganem D. A novel class of herpesvirus-encoded membrane-bound E3 ubiquitin ligases regulates endocytosis of proteins involved in immune recognition [J]. *J Cell*, 2001, 155(7): 1265.
- [20] Clough S J, Bent A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Journal*, 1998, 16(6): 735.
- [21] Lee H, Xiong L, Gong Z, *et al.* The Arabidopsis HOS1 gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleocytoplasmic partitioning [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(7): 912.