doi：10.3969/j.issn.0490-6756.2017.03.033

拟南芥 BAH1 与大肠杆菌热胁迫耐受的关系分析

梁　可[1]，徐西兵[1,2]，牛毓龙[1]，杨　毅[1]
(1. 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；2. 河南科技大学医学院，洛阳 471000)

摘　要：拟南芥 BAH1 含有保守的 C3H4 型 RING 结构域，与 DnaJ 锌指结构类似. 利用原核表达纯化的 BAH1 进行体外泛素化实验证明了 BAH1 具有 E3 连接酶活性. 然后通过表型回复实验发现 BAH1 融合 J-domain 结构域后(JdBAH1)和 DnaJ 一样能明显弥补 *danJ* 突变株 *MF*634 的热敏表型，在 43℃ 存活；而转入突变锌指结构的 JdBAH1C231S，C234S，C276S，C279S(JdBAH1△Zn1/2)菌株在 43℃ 高温条件下不能存活，说明 BAH1 在大肠杆菌内具有类似 DnaJ 锌指结构的功能. 因此，BAH1 在 *E. coli* 中的功能有可能与 DnaJ 相似，通过锌指结构参与了 DnaK/DnaJ 伴侣系统发挥功能.

关键词：锌指；BAH1；DnaJ；E3 泛素连接酶
中图分类号：Q945　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0490-6756(2017)03-0623-06

Functional analysis of *Arabidopsis thaliana* BAH1 in heat tolerance of *E. coli*

LIANG Ke[1], *XU Xi-Bing*[1,2], *NIU Yu-Long*[1], *YANG Yi*[1]
(1. Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of MOE,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China;
2. Medical College, Henan Science and Technology University, Luoyang471000, China)

Abstract: *Arabidopsis thaliana* BAH1 has a C3HC4-RING finger domain, which is similar to the zinc finger structure of DnaJ. Further self-ubiquitination assay in vitrousing purified BAH1 demonstrated BAH1 possessed E3 ligase activity. Then a phenotypic recovery experiment which showed JdBAH1(containing BAH1 and J-domain)was performed, the same with DnaJ, significantly compensated for the thermal phenotype of *danJ* mutant strain *MF*634. As a result, both could survive at 43℃. However, the strain which was imported the mutated zinc finger structure JdBAH1C231S, C234S, C276S, C279S(JdBAH1△Zn1/2)was not able to survive at 43℃. Hence, these results indicated that BAH1 may improve heat tolerance of *E. coli* through interacting with DnaK/DnaJ chaperone system. These results indicated that BAH1 may improve heat tolerance of *E. coli* through interacting with DnaK/DnaJ chaperone system.

Keywords: Zinc finger; BAH1; DnaJ; Ubiquitin E3 ligase

1　引　言

泛素及类泛素是一类小分子蛋白，具有通过共价连接蛋白质底物来调节部分蛋白质的功能，统称为泛素家族[1]. 泛素家族比其他类型的蛋白修饰拥有更多样的作用表面，对改变蛋白质分子构象及影

收稿日期：2016-01-08
基金项目：863 计划(2012AA022204)
作者简介：梁可(1991－)，女，湖南益阳人，硕士研究生，研究方向为微生物基因工程.
通讯作者：杨毅. E-mail：yangyi528@vip.sina.com

响蛋白之间的相互作用更有利.泛素依赖途径在生物体生命过程中具有重要作用,涉及细胞分化、细胞周期、胚胎形成、细胞凋亡、DNA 修复、跨膜运输及囊泡转、应激反应等生命活动[2].

经泛素或类泛素修饰的底物蛋白与其他蛋白的结合在一定程度上主要依赖于泛素或类泛素基因,而与底物蛋白自身的性质无明显关联.泛素系统由泛素激活酶(E1)、泛素结合酶(E2)、泛素连接酶(E3)组成.首先酶 E1 水解 ATP 并激活泛素分子,泛素与 E1 上的 Cys 残基结合,接着 E1 将激活的泛素分子转移至酶 E2,随后,泛素由酶 E2 转移至酶 E3 识别的靶蛋白的 Cys 残基上,并对其进行泛素化修饰.根据 Ub 与靶蛋白的相对比例可以将靶蛋白单泛素化修饰和多聚泛素化修饰[3].

酶 E3 的外形像一个夹子,靶蛋白连接在中间的空隙内.酶的左侧结构域具有靶蛋白的特异性识别功能,所以泛素连接酶 E3 决定底物蛋白的特异性选择,负责靶蛋白的特异识别[4]泛素连接酶根据结构分为单亚基 E3 和多亚基 E3[5].单亚基 E3 包括 RING、HECT 和 U-box 三种结构域类型.RING finger 结构域可以简单的描述为:Cys-X_2-Cys-$X_{(9\text{-}39)}$-Cys-$X_{(1\text{-}3)}$-His-$X_{(2\text{-}3)}$-Cys-X_2-Cys-$X_{(4\text{-}48)}$-Cys-X_2-Cys,其中 X 代表任意氨基酸,虽然在某些位置有特殊的残基倾向[6],这 70 个氨基酸能够固定两个锌离子.根据 RING 结构域的不同分为 RING-H2(C3H2C3)、RING-HC(C3HC4)、RING-V、RING-C2 及 RING-D 等[7].已有研究表明,在植物中,具有 RING 结构域的泛素连接酶 E3 除了涉及对植物生长发育过程的调控,如激素信号转导[8,9]、开花[10]、胚胎发生[11],还参与热胁迫等逆境胁迫响应过程中关键步骤的控制[12].

当大肠杆菌受到热胁迫时,会诱导 DnaK, DnaJ, GroEL 等热激蛋白的表达,DnaK/DnaJ 伴侣系统能折叠修复变形蛋白或新生肽链,同时降解错误折叠的蛋白.其中 DnaJ 同样具有 RING 结构域,是 DnaK 的辅因子伴侣,能促进非天然状态的底物蛋白与 DnaK 的结合与分离,从而帮助 DnaK 折叠蛋白[13].

At1g02860,编码一个泛素 E3 连接酶 BAH1 (BENZOIC ACID HYPERSENSTIVE1),因其参与拟南芥免疫反应而得名[14].结构分析发现,BAH1 具有 RING 和 SPX 两个结构域,在其氨基酸序列 231~279 位为 C3HC4 型 RING finger 结构域.研究表明 BAH1 的 SPX 结构域参与拟南芥磷代谢通路[15],但 BAH1 的 RING finger 结构域功能未见报道.在大肠杆菌中,热休克蛋白 DnaJ 同样具有 RING finger 结构域.本研究主要分析了 BAH1 的 RING finger 结构域类型,并分析 BAH1 与 DnaJ 锌指是否具有相似的功能.

2 材料与方法

2.1 实验材料

大肠杆菌 DH5α、Rosetta(DE3)均为本实验室保存,*dnaJ* 突变菌株 *MF*634(F^-,thr^{-1},*dnaJ*256(*ts*))购买自耶鲁大肠杆菌菌种保藏中心(CGSC).其中,DH5α 用于载体构建和克隆,Rosetta 菌株用于 BAH1 蛋白的表达纯化,*dnaJ* 突变菌株 *MF*634 用于热敏感表型实验.pET28a、pBAD24 载体由本实验室保存;pMD19-T 购于 Takara 公司.

RNA 提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购于 Sigma 公司;T4 DNA 连接酶和限制性内切酶购于 Fermentas;protein marker、FastPfu 高保真酶购于 Transgen;二抗、Western Blot 化学发光试剂和超滤管购于 Millipore.引物合成及测序由华大基因公司完成.

2.2 实验方法

2.2.1 多系列比对 在 KEGG 信息资源数据库中查找真核生物中与 BAH1 同源的 RING finger 家族蛋白的氨基酸序列,找到相应的 RING finger 结构域,并比对分析其相似性.

2.2.2 引物设计 从 NCBI(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)查询并获得 BAH1 的序列信息,用 Primer Premier 5.0 设计引物,见表 1,其中 pBAD-BAH1、pET28a-BAH1 引物序列下划线处为酶切位点,突变引物 $BAH1^{C231S,C234S}$、$BAH1^{C276S,C279S}$ 下划线处为突变位点($BAH1^{C231S,C234S}$ 表示将 BAH1 氨基酸序列第 231,234 位半胱氨酸突变为丝氨酸,$BAH1^{C276S,C279S}$ 表示将 BAH1 氨基酸序列第 276,279 位半胱氨酸突变为丝氨酸).

2.2.3 载体构建和 RING 结构域点突变 pET28a-BAH1 和 pBAD24-BAH1 重组载体构建:以反转录合成的拟南芥总 DNA 为模板,再以表 1 中 BAH1(Sense+Antisense)引物,PCR 扩增 BAH1 基因片段,得到的 PCR 产物与 pMD19-T 载体连接并转化至 DH5α 菌株,筛选阳性克隆,提取质粒,进行双酶切验证后测序鉴定,将 BAH1 及 pET28a 载体使用 *Bam*HⅠ及 *Xho*Ⅰ进行酶切消化,获得目的片段后进行胶回收并将两者连接,得到重组载体 pET28a-BAH1;重复上述构建步骤构建 pBAD24-BAH1 的重组载体.

表 1　本研究使用的引物

Tab. 1　The sequence of the primers used in this study

pBAD-BAH1	Sense	CGCCCGGGATGAAGTTTTGTAAGAAGTAT
pBAD-BAH1	Antisense	CCGGTCGACTCATATTCCAGTGAAGCTTC
pET28a-BAH1	Sense	CGGGATCCATGAAGTTTTGTAAGAAGTAT
pET28a-BAH1	Antisense	CCGCTCGAGTATTCCAGTGAAGCTTC
$BAH1^{C231S,\ C234S}$	Sense	TGACTTGACTTCTTCAATATCCCTGGACACGG
$BAH1^{C231S,\ C234S}$	Antisense	CCGTGTCCAGGGATATTGAAGAAGTCAAGTCA
$BAH1^{C276S,\ C279S}$	Sense	AACTGAAAAATCCCCGCTTTCCCGTGAGGATG
$BAH1^{C276S,\ C279S}$	Antisense	CATCCTCACGGGAAAGCGGGGATTTTTCAGTT
pET28a -Jd	Sense	GAATTCCATATGATGGCTAAGCAAGATTATTACGAG
pET28a -Jd	Antisense	CGGGATCCGCCGCCAAAAATATCGCCGAAAAC

突变载体构建，以 pMD19T-BAH1 为模板，使用 PCR 重叠延伸法把 BAH1 的氨基酸序列第 231，234，276 及第 279 位 Cys 突变为 Ser，所有突变由基因测序证实. 再构建突变 pBAD24-BAH1△Zn1/2 及 pET28a-BAH1△Zn1/2 重组载体.

JdBAH1 融合片段载体构建，PCR 扩增得到 J-domain（含 DnaJ5′端的 300bp 片段），*Nde* Ⅰ/*Bam*H Ⅰ 双酶切连接至 pET28a-BAH1 得到 pET28a-JdBAH1 重组载体，再用 *Nco* Ⅰ/*Xba* Ⅰ 双酶切 pET28a-JdBAH1 重组载体（*Xba* Ⅰ 位点位于 BAH1）与 pBAD24-BAH1 重组载体，再重新连接得到 pBAD24-JdBAH1 载体.

2.2.4　蛋白纯化　将分别转化了 pET28a-BAH1，pET28a-BAH1△Zn1/2 重组载体的 Rosetta 菌株 37℃过夜培养，以 1∶100 比例转接于 250mL 三角瓶（含 100mLLB）中培养至 OD_{600} 为 0.6时，加入 IPTG 至终浓度为 0.2mM，16℃诱导培养 12h. 离心收集菌体，超声破碎后离心收集上清，用 0.22μm 滤膜过滤. 按照 Ni-NTA 树脂纯化手册进行蛋白纯化，再用 10kD 的超滤管超滤去除蛋白液中的咪唑并浓缩蛋白，取蛋白液进行 SDS-PAGE 检测.

2.2.5　大肠杆菌 *dnaJ* 缺陷菌株的热敏感表型弥补实验　将分别转化了 pBAD24、pBAD24-BAH1、pBAD24-JdBAH1、pBAD24-DnaJ 的 *dnaJ* 缺陷菌株 *MF*634 过夜培养，以 1∶100 转接至新鲜培养基，37℃培养至 OD_{600} 为 0.6，用无菌水以 10 倍梯度稀释法分别稀释菌液至 10^{-6}，分别点板于不添加 Arabinose 的平板及添加 0.1% Arabinose 平板，置于 37℃或 43℃培养 12h.

2.2.6 体外泛素化实验　反应体系 20μL：Tris-HCl pH 8.0（50mmol/L），$MgCl_2$（10mmol/L），ATP（2mmol/L，DTT（0.2mmol/L，E1（50nmol/L），E2（100nmol/L），BAH1/ΔZn1/2 蛋白（0.1mmol/L）. 30℃反应 2h，加入 5×LoadingBuffer，沸水浴 5min，通过 SDS-PAGE 电泳和 Western-Blot，随后使用 anti-Ub 及抗体检测. 将分别缺少 E1、E2、Ub、BAH1、BAH1△Zn1/2 作为负对照.

3　结　果

3.1　BAH1 锌指结构分析

拟南芥 *At*1g02860 基因位于拟南芥第 1 号染色体上，编码 333 个氨基酸的 BAH1 蛋白，相对分子质量约为 38KD. 本研究将该基因所编码蛋白的氨基酸序列与真核生物中其他 7 个同源蛋白的进行多序列比对，图 1A 结果显示 BAH1 的 231～279 位点含有高度保守的 C3HC4 型 RINGfinger 结构域. 图 1B 是 BHA1RING 结构域的三维预测结果，发现 BHA1RING 结构域能结合两个锌指，形成典型的交叉式锌指结构. 说明该蛋白序列与 RING finger 家族蛋白在结构上高度相似，可能有相似或相关的功能.

3.2　BHA1 蛋白纯化及 E3 连接酶活性检测

为了进一步研究 BAH1 的功能，利用 pET28a 载体外源表达并纯化了 His-BAH1 及 His -BAH1△Zn1/2 蛋白. 从图 2A 可知，BAH1 及 BAH1△Zn1/2 在大肠杆菌中均能稳定表达，并主要在上清中表达，纯化后的洗脱液中可以看到 40 kD 附近有一条高分度、几乎无杂带的目的条带. RING 结构蛋白是 E3 泛素连接酶的一种典型类型，为了检测 BAH1 的 E3 泛素连接酶活性，进行了体外泛素化实验（图 2B），BAH1 是已知的具有 E3 泛素连接酶活性的 RING 结构域蛋白，发现在 E1、

E2、Ub 均存在的情况下,BAH1 能形成明显的自泛素化条带,而 BAH1△Zn1/2 不能形成自泛素化条带,且缺失 E1、E2、Ub 中任意一种蛋白时也不能形成泛素化条带. 这些结果说明 BAH1 的 RING finger 结构域具有 E3 泛素连接酶活性.

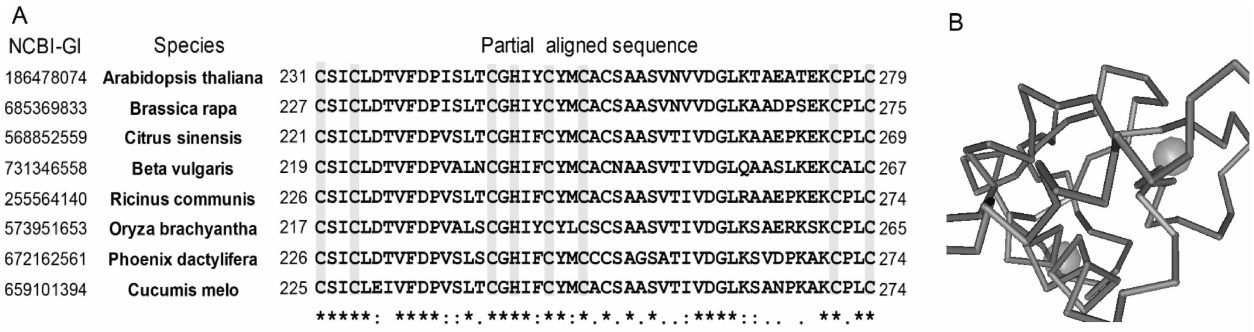

图 1 BAH1 锌指的结构功能分析

A. C3HC4 型 RING 结构域的多序列比. B. BAH1 锌指结构的三维模型

Fig. 1 The analysis of zinc finger in BAH1

A. Multiple sequence alignment of C3HC4 RING domain. B The model of zinc finger three-dimensional structure.

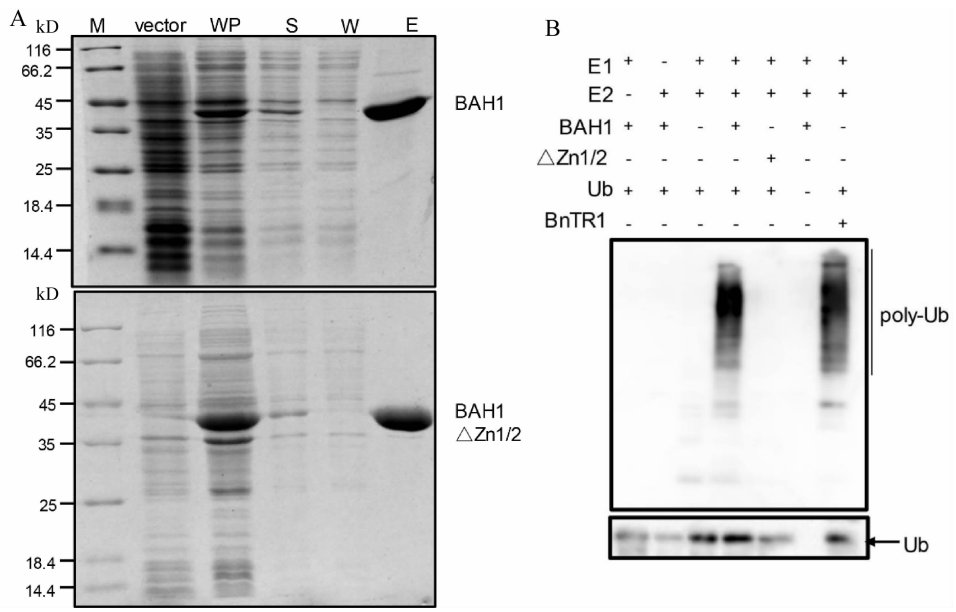

图 2 体外泛素化分析

A. BAH1 及其突变蛋白的表达纯化. B. BAH1 体外泛素化分析

Fig. 2 The analysis of self-ubiquitination in vitro.

A. Purification ofBAH1 and mutant. B. The analysis of self-ubiquitination in vitro of BAH1

(M: marker; WP: whole protein; S: supernatant; W: washing; E: elution)

3.3 BAH1 具有与 DnaJ 相似的 RING 结构域

大肠杆菌 DnaJ 蛋白是热休克蛋白 Hsp40 家族的一个成员,它和 DanK 及 GrpE 共同构成了完整的热休克蛋白 Hsp70 的分子伴侣链,参与细胞内蛋白折叠、解折叠、组装和转运[16]. 研究表明 DnaJ 包括由 376 个氨基酸组成的四个结构域: J-domain,富 G/ F 结构域,锌指结构域和 C 末端结构域. DnaJ 单体含 10 个 Cys 残基,除 Cys^{265} 和 Cys^{323},外其它 8 个和 2 个锌离子配位形成两个锌指结构[17].

BAH1 与 DnaJ 具有相似的锌指结构域,那么 BAH1 的锌指结构能否替换 DnaJ 的锌指结构? 我们利用 *dnaJ* 缺陷菌株 *MF*634 设计了热敏感表型回复实验. 有报道表明 *dnaJ* 缺陷菌株在 43℃ 的高温条件下不能存活[18],DnaJ N 端的 J-domain 及 G/F 区域在 DnaJ 的伴侣活性中具有重要作用[19],于是我们构建了类似 DnaJ 的嵌合蛋白 JdBAH1,即在 BAH1 的 N-端连接上 J-domain. 通过 *dnaJ* 缺陷菌株的热敏感表型分析,我们发现 JdBAH1 和 DnaJ 一样能够弥补 *dnaJ* 缺陷菌株对热的敏感性,而突变了锌指结构的 $JdBAH1^{C231S,C234S,C276S,C279S}$

(JdBAH1△Zn1/2)的菌株在 43 ℃高温条件下不能存活，并且通过 western blotting 检测确定所有过表达蛋白都能正常表达(图 3). 说明 BAH1 与大肠杆菌 DnaJ 具有相似的锌指结构，且 BAH1 在 J-domain 及 G/F 区域的辅助下具有 DnaJ 的部分功能，即 BAH1 具有类似 DnaJ 锌指的功能.

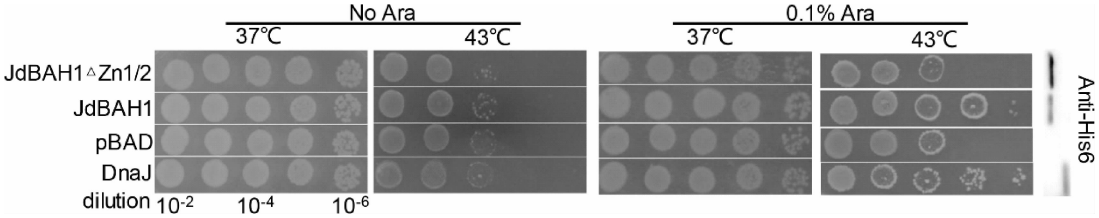

图 3　大肠杆菌 dnaJ 缺陷菌株的热敏感表型分析

Fig. 3　Complementation array for analysis of the temperature-sensitive phenotype of E. coli △dnaJ

4　讨　论

真核生物，蛋白质可以通过许多小分子与蛋白共价连接而被修饰，其中一种类型的修饰就是通过共价连接泛素或者类泛素蛋白(UBLs)，这种修饰可以调控很多生理过程[3]. 泛素是一类小分子蛋白，在整个生物界都是非常保守的，它可以迅速与成千上万的底物蛋白共价连接. 泛素化是可逆的，依赖 ATP 并且通过泛素激活酶 E1，泛素结合酶 E2，泛素连接酶 E3 一系列催化反应所致. 真核生物中通常有 1 或 2 个 E1，几十个 E2，几百到几千个 E3[20]，说明真个泛素化过程中，泛素连接酶 E3 决定底物蛋白特异性. 在拟南芥中，E3 泛素连接酶大部分都是 RING 结构类型的 E3，RING 结构域是由 8 个结合金属离子的半胱氨酸残疾和组氨酸残疾构成，结合两个锌离子以支撑整个结构域[21].

本研究中，BAH1(*At*1*g*02860)是含有 C3HC4 型锌指结构的拟南芥蛋白. 锌指结构在进化过程中具有广泛的保守性，结构上的相似性，功能上的保守性[22]. 体外泛素化实验表明 BAH1 的 RING 结构域部分具有 E3 连接酶的活性，众所周知泛素 E3 连接酶在蛋白质的翻译后修饰中起着关键性作用，BAH1 可能通过 RING 结构发挥重要功能.

DnaJ 是大肠杆菌中含有 RING 结构域的热激蛋白，由 8 个半胱氨酸残疾结合 2 个锌指构成发卡型的锌指结构. 既然 BAH1 与 DnaJ 都含有类似的锌指结构，于是利用 *dnaJ* 突变菌株进行了依赖于 DnaJ 的热敏表型实验，发现 BAH1 融合 J-domain 结构域后能明显弥补 *danJ* 突变株的热敏表型，而 JdBAH1△Zn1/2 并不能恢复突变菌株的生长，说明 BAH1 在大肠杆菌内具有类似 DnaJ 锌指结构的功能. 在大肠杆菌中，DnaK/DnaJ 分子伴侣系统在热应激反应中负责变性蛋白的修复，DnaJ 作为 Dnak 的辅因子伴侣能够将特异的蛋白底物呈递给 DnaK，通过 DnaK 与 DnaJ 的相互作用，激活了 DnaK 的 ATP 酶活力，促使 ATP 水解为 ADP，从而形成 DnaK-蛋白底物-DnaJ 复合物，促使 DnaK 构象改变，将蛋白底物锁定在底物结合缝隙中，从而折叠或修复底物蛋白[16]. 除了 DnaJ 的辅因子伴侣功能，体外实验表明 DnaJ 还具有不依赖于 DnaK 的自主伴侣活性，如其不依赖 DnaK 就能与非折叠的蛋白结合并阻止其聚集[23]. 锌指结构域是 DnaJ 蛋白的重要组成，它参与 DnaJ 蛋白与目的多肽之间的相互作用，帮助蛋白折叠、解折叠、组装和转运[24-26]. 在体外蛋白修复反应中，DnaJ 锌指结构主要与变性蛋白结合从而抑制其聚集，锌指突变体缺失了与未折叠多肽的结合能力[26]. 在大肠杆菌的体外实验显示 DnaJ 锌指结构直接参与底物蛋白的结合[27]. 因此，具有类似 DnaJ 锌指结构的 BAH1 可能参与 Dnak/DnaJ 伴侣系统结合底物蛋白发挥功能，这有待进一步的研究.

参考文献：

[1]　Scheffner M, Nuber U, Huibregtse J M. Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade [J]. Nature, 1995, 373 (6509): 81.

[2]　Mukhopadhyay D , Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling [J]. Science, 2007, 315(5809): 201.

[3]　Pickart C M , Eddins M J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms [J]. BBA-Mol Cell Res, 2004, 1695(1): 55.

[4]　Hershko A. The ubiquitin system[M]. USA: Springer, 1998.

[5]　Borden K L, Freemont P S. The RING finger domain: a recent example of a sequence—structure

family [J]. Curr Opin Struc Biol, 1996, 6(3): 395.

[6] Isaacson M K, Ploegh H L. Ubiquitination, ubiquitin-like modifiers, and deubiquitination in viral infection [J]. Cell Host Microbe, 2009, 5(6): 559.

[7] Vega-Sánchez M E, Zeng L, Chen S, *et al*. SPIN1, a K homology domain protein negatively regulated and ubiquitinated by the E3 ubiquitin ligase SPL11, is involved in flowering time control in rice [J]. Plant Cell, 2008, 20(6): 1456.

[8] Goodno G D, Book L D, Rothenberg J E. Low-phase-noise, single-frequency, single-mode 608 W thulium fiber amplifier [J]. Optics Letters, 2009, 34(8): 1204.

[9] Lee S, Lee D W, Lee Y, *et al*. Heat shock protein cognate 70-4 and an E3 ubiquitin ligase, CHIP, mediate plastid-destined precursor degradation through the ubiquitin-26S proteasome system in Arabidopsis [J]. Plant Cell, 2009, 21(12): 3984.

[10] 陈鹏, 徐西兵, 胡屹玲, 等. 拟南芥 Hsp40 蛋白 AtDjA5 在大肠杆菌中的功能分析 [J]. 四川大学学报:自然科学版, 2015, 52(5):1117.

[11] Yaeno T, Iba K. BAH1/NLA, a RING-type ubiquitin E3 ligase, regulates the accumulation of salicylic acid and immune responses to Pseudomonas syringae DC3000 [J]. Plant Physiology, 2008, 148(2): 1032.

[12] Hsieh L C, Lin S I, Shih A C C, *et al*. Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in Arabidopsis by deep sequencing [J]. Plant Physiology, 2009, 151(4): 2120.

[13] Mayer M, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism [J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(6): 670.

[14] Martinez-Yamout M, Legge G B, Zhang O, *et al*. Solution structure of the cysteine-rich domain of the Escherichia coli chaperone protein DnaJ [J]. J Mol Biol, 2000, 300(4): 805.

[15] Genevaux P, Schwager F, Georgopoulos C, *et al*. Scanning mutagenesis identifies amino acid residues essential for the in vivo activity of the Escherichia coli DnaJ (Hsp40) J-domain [J]. Genetics, 2002, 162(3): 1045.

[16] Perales-Calvo J, Muga A, Moro F. Role of DnaJ G/F-rich domain in conformational recognition and binding of protein substrates [J]. J Biol Chem, 2010, 285(44): 34231.

[17] Kraft E, Stone S L, Ma L, *et al*. Genome analysis and functional characterization of the E2 and RING-type E3 ligase ubiquitination enzymes of Arabidopsis [J]. Plant Physiology, 2005, 139(4): 1597.

[18] Larkindale J, Hall J D, Knight M R, *et al*. Heat stress phenotypes of Arabidopsis mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance [J]. Plant Physiology, 2005, 138(2): 882.

[19] Metzger M B, Pruneda J N, Klevit R E, *et al*. RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination [J]. BBA-Mol Cell Res, 2014, 1843(1): 47.

[20] Lu Z, Cyr D M. Protein folding activity of Hsp70 is modified differentially by the hsp40 co-chaperones Sis1 and Ydj1 [J]. J Biol Chem, 1998, 273(43): 27824.

[21] Banecki B, Liberek K, Wall D, *et al*. Structure-function analysis of the zinc finger region of the DnaJ molecular chaperone [J]. J Biol Chem, 1996, 271(25): 14840.

[22] Szabo A, Korszun R, Hartl F U, *et al*. A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates [J]. The EMBO Journal, 1996, 15(2): 408.

[23] Linke K, Wolfram T, Bussemer J, *et al*. The roles of the two zinc binding sites in DnaJ [J]. J Biol Chem, 2003, 278(45): 44457.