

doi: 103969/j.issn.0490-6756.2016.11.029

拟南芥 E3 连接酶 AT2G02960 在大肠杆菌中的功能分析

胡屹玲, 徐西兵, 梁可, 陈鹏, 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: 本研究以一个含有 C4HC3 锌指的 RING 结构域蛋白基因 AT2G02960 (简称 ATPRF1) 为研究对象, Western Blot 检测 ATPRF1 能够大幅度提高 σ^{32} 表达水平并稳定 σ^{32} , 提高大肠杆菌的热耐受性, 细菌双杂交及免疫共沉淀实验表明 ATPRF1 与 σ^{32} 及 DnaK 存在相互作用, 促进 DnaK 表达, 体外泛素实验验证 ATPRF1 将 σ^{32} 泛素化, 相互作用位点为 RING-finger 结构域. 证明 ATPRF1 参与 DnaK/J/E 分子伴侣体系, 提升大肠杆菌的热耐受性并能将 σ^{32} 多泛素化.

关键词: AT2G02960; DnaK; σ^{32} ; 细菌双杂交; 免疫共沉淀

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2016)06-1355-06

Fuctional analysis of an *Arabidopsis thaliana* E3 ligase At2G02960 in *E. coli*

HU Yi-Ling, XU Xi-Bing, LIANG Ke, CHEN Peng, 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 paper, the AT2G02960 (ATPRF1) protein is a RING-finger E3 ubiquitin ligase in *Arabidopsis thaliana*. According to the analysis of the growth curve of *E. coli*, ATPRF1 increased thermotolerance of *E. coli*. Western Blotting analysis indicated that ATPRF1 could raise the posttranslational levels of heat shock factor σ^{32} and heat shock protein DnaK, stabilize heat shock factor σ^{32} simultaneously. Co-immunoprecipitation and bacteria two-hybrid system experiments demonstrated that ATPRF1 interacted with both σ^{32} and DnaK. σ^{32} could be ubiquitinated by ATPRF1 *in vitro*. Hence, our results confirmed that ATPRF1 interacted with DnaK/J/E chaperone and enhanced the thermotolerance of *E. coli* and ubiquitinated σ^{32} .

Keywords: AT2G02960; DnaK; σ^{32} ; Bacteria two-hybrid system; Co-immunoprecipitation

1 引言

泛素及类泛素是一类小分子蛋白,具有通过共价键链接到蛋白质底物上调节部分蛋白质的功能,统称为泛素家族^[1]. 尽管类泛素与泛素的序列同源

性较低,但类泛素化修饰具有类似与泛素化修饰的酶级联反应过程,由泛素激活酶(E1)、泛素结合酶(E2)、泛素连接酶(E3)主导反应过程,部分类泛素修饰只具有 E1. 在原核生物中,具有 RING 结构域的 E3 含有一个锌指结构,根据 RING 结构域的不同

收稿日期: 2015-03-27

基金项目: 国家自然科学基金(31171586); 863 计划(2012AA022204)

作者简介: 胡屹玲(1989-),女,贵州安顺人,硕士研究生,研究方向为应用微生物.

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

分为 RING-H2 (C3H2C3)、RING-HC (C3HC4)、RING-V、RING-C2 及 RING-D 等^[2]。

目前对原核生物中的泛素修饰研究较多,而对于类泛素修饰系统的研究刚开始:在对结核分支杆菌的研究中发现 Pup 的类泛素修饰,而且能介导蛋白质的降解。原核生物类泛素修饰不仅与泛素修饰类似,作为蛋白质降解信号参与蛋白质的降解,而且有可能参与到其他生命活动^[3]。Dorval, V 等研究表明类泛素中 SUMO 几乎可以与泛素一样修饰上千种蛋白分子^[4]。在原核生物中发现的 Urm1 系统被认为是进化过程的分子活化石,连接太古菌类、原核生物的转硫系统和真核生物的泛素系统^[5]。细菌中的转硫蛋白 MoaD 和 This 参与硫转运途径,近年来相关报道其能参与蛋白质的修饰^[6,7]。

在大肠杆菌中,高温胁迫使得体内细胞会激发热激反应(Heat Shock Protein, 简称 HSR),启动热休克蛋白基因,快速合成多种热激蛋白(Heat Shock Protein, 简称 HSP),进一步促进蛋白正确折叠,降解错误折叠的蛋白,以防止细胞受到高温的损害^[8]。在大肠杆菌中 20 种热休克蛋白的合成受细菌特有的热休克转录因子 σ^{32} 调控。大肠杆菌 DnaK/J/E 分子伴侣系统在蛋白调控中起到重要作用,当处于热激条件下行使调控功能,DnaK、DnaJ 与热激转录因子 σ^{32} 特异性结合,促进 σ^{32} 与细胞膜上的蛋白酶 FtsH 降解,完成热激反应^[9-11]。

本研究以具有 C3HC4 型 RING 结构域拟南芥 E3 蛋白酶 AT2G02960,缩写命名为 ATPRF1,其氨基酸序列 43~88 位为 RING 结构域,在拟南芥中的功能研究未见报道。鉴于已有研究表明 σ^{32} 能够被类泛素蛋白 ThiS 修饰^[12]。本研究尝试验证 ATPRF1 能否提升大肠杆菌的耐热性,进一步验证 ATPRF1 与 σ^{32} 、DnaK 之间的作用,以及 ATPRF1 锌指结构在大肠杆菌中行使的作用。

2 材料与方法

2.1 实验材料

大肠杆菌 C600 野生菌株,大肠杆菌 JM109、BL21(DE3)均为本实验室保存。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;反转录试剂盒购于 TOYOBO; T4 DNA 连接酶和限制性内切酶购于 Fermentas; Western Maker、FastPfu 高保真酶购于 Transgen; 二抗、细菌双杂交系统试剂盒购自 Stratagene

公司;二抗、Western Blot 化学发光试剂和超滤管购于 Millipore;二抗、Western Blot 化学发光试剂和超滤管购于 Millipore; anti-DnaK 和 anti-His 抗体购于 Abcam; anti- σ^{32} 抗体购于 NeoClone. E1 和 E2 购于 Boston Biochem 公司,泛素 Ub 购于 Sigma 公司。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 引物设计 从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查询并获得 ATPRF1 的序列信息,用 Primer Premier 5.0 设计引物,(ATPRF1-S43C 表示将 ATPRF1 氨基酸序列第 43 位半胱氨酸突变为丝氨酸)。
pBAD-ATPRF1F: 5'-ACGCGTCGACTCAGACAGGATCGTCATGC-3' (*Sal* I)
pBAD-TPRF1R: 5'-TCCCCCGGGATGTCTCCGGTTAATGCG-3' (*Sma* I)
pET28a-ATPRF1F: 5'-CGCGGATCCTCAGACAGGATCGTCATGC-3' (*Bam* H I)
pET28a-ATPRF1R: 5'-ACGCGTCGACTCAGACAGGATCGTCATGC-3' (*Sal* I)
pBT-ATPRF1F: 5'-GAATTCATGTCTCCGGTTAATGCG-3' (*Eco* R I)
pBT-ATPRF1R: 5'-CTCGAGTCAGACAGGATCGTCATGC-3' (*Xho* I)

2.2.2 载体构建和 RING 结构域点突变 pET28a-ATPRF1 和 pBAD24-ATPRF1 重组载体构建:以反转录合成的拟南芥总 DNA 为模板,再以 ATPRF1 (Sense + Antisense) 引物,PCR 扩增 ATPRF1 基因片段,连接并转化,筛选阳性克隆,提取质粒,进行双酶切验证后测序鉴定,将 ATPRF1 及 pET28a 载体使用 *Bam* H I 及 *Sal* 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-ATPRF1;重复上述构建步骤构建 pBAD24-ATPRF1 的重组载体。据研究表明 RING 结构域中的 3 个金属离子结合氨基酸对于 E3 连接酶活性是必需的^[12]。突变载体构建,以 pMD19T-ATPRF1 为模板,使用 PCR 重叠延伸法把 ATPRF1 的氨基酸序列第 43 位及第 85 位进行突变,将 Cys 突变为 Ser,并命名为 Δ ZF,所有突变由基因测序证实。再构建突变株 Δ ZF 的 pBAD24- Δ ZF 及 pET28a- Δ ZF 重组载体。

2.2.3 细菌生长曲线测定实验 大肠杆菌的转化及培养:将构建的 pBAD24-ATPRF1、pBAD24- Δ ZF、pBAD24 分别转化至大肠杆菌 C600 菌株。分别在 37℃、43℃ 条件下测定大肠杆菌生长曲线:

以大肠杆菌菌液培养时间为横坐标,所测定菌液的平均 OD₆₀₀ 值为纵坐标,绘出三株菌株的在 37℃ 及 43℃ 下的生长曲线,实验重复三次。

2.2.4 Western Blot 检测 σ^{32} 及 DnaK 蛋白表达量 将构建的 pBAD24-ATPRF1、pBAD24- Δ ZF 及 pBAD24 转化至大肠杆菌 C600 中,分别从新转化平板上挑取单菌落,37℃ 过夜培养后按 1:100 比例转接至新鲜 LB 培养基(含 50 μ g/mL Amp)中,培养至 OD₆₀₀ 值为 0.6 时,添加 L-阿拉伯糖至浓度为 0.5%,30℃ 诱导培养 1h,测定 OD₆₀₀ 值,将上述三种菌液 OD₆₀₀ 值调为一致,4℃ 收集等量菌体,加等量上样缓冲液,并分别上样 5 μ L(检测 DnaK 时,样品均稀释 10 倍)进行 SDS-PAGE 电泳,分别使用 anti- σ^{32} 及 anti-DnaK 抗体,按照分子克隆指南 ([13]) 的方法进行蛋白质免疫印迹。

2.2.5 蛋白纯化 将构建的 pET28a-ATPRF1、pET28a- Δ ZF 重组载体转化至大肠杆菌 BL21。从转化平板上挑单菌落接至新鲜 LB 培养基(含 μ g/mL Kana) 37℃、180r/min 过夜培养,后以 1:100 比例转接于 250mL 三角瓶(含 100mL LB)中培养至 OD₆₀₀ 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 0.22 μ m 滤膜过滤。按照 Ni-NTA 树脂纯化手册 ([13]) 进行蛋白纯化。

2.2.6 免疫共沉淀 取纯化的 1.25 μ M ATPRF1 蛋白、 Δ ZF 蛋白分别与 0.5 μ g 的 DnaK 加入到预冷的 300 μ L buffer K(30 mM HEPES/KOH, pH 7.6, 40 mM KCl, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 7 mM 醋酸镁),冰上孵育 30 min;加入 1 μ g anti-His 抗体,冰上孵育 1 h;之后加入 20 μ L protein A/G plus-agarose immunoprecipitation reagent,冰上孵育 2 h;将孵育后的混合液于 4℃ 下 1000 g 离心 5 min,弃去上清,然后用 1 mL PBS buffer 清洗 4 次。将沉淀重悬于 1xSDS-PAGE 上样缓冲液中,利用 anti-DnaK 的一抗,按照

分子克隆指南 ([13]) 的方法进行蛋白质免疫印迹。

2.2.7 细菌双杂交实验 制备 XL1-Blue MRF Kan Strain 感受态细胞,细菌双杂交筛选平板及各试剂、培养基;按 BacterioMatch II Two-Hybrid System Library Construction Kit 说明书配置。构建双杂交载体 pBT-ATPRF1 及 pBT- Δ ZF,与 pTRG-RpoH、pTRG、pTRG-DnaK 进行共转,以阳性组、阴性组作为对照,分别转入报告菌株,并涂布于非选择性平板及选择性平板,培养 36h 后观察 ([13])。

2.2.8 体外泛素化实验 将 4 μ g 的 ATPRF1 或者其突变体蛋白和 150 ng 的 σ^{32} 蛋白加入到含有 2 μ g E1、4 μ g E2 和 2 μ g 泛素的 buffer Z 中,总体积 20 μ L,30℃ 反应 2 h,反应结束后加入 5 μ L 5xSDS-PAGE 上样缓冲液,95℃ 处理 5 min,样品用于 western blotting 检测。

3 结果分析

3.1 ATPRF1 能提高大肠杆菌的耐热性

本研究中将转化 pBAD24 质粒的大肠杆菌 C600 作为阴性对照,将 pBAD24-ATPRF1、pBAD24- Δ ZF 质粒转入大肠杆菌 C600 菌株,进行生长曲线测定。如图 1,结果显示:37℃ 条件下,ATPRF1、突变株 Δ ZF 和 pBAD24 对照组生长状况基本一致;而在 42℃ 条件下,pBAD24-ATPRF1 比空载对照组提前进入稳定期;而 pBAD24- Δ ZF 与空载对照组生长趋势相近。比较图 1A、1B,发现对 ATPRF1 而言,高温胁迫对其影响较小,与 37℃ 生长状况相似;而对突变株 Δ ZF 在高温胁迫时生长状况不佳,与转入 pBAD24 质粒的阴性对照株相似。表明 ATPRF1 具有提高大肠杆菌耐热性的生理功能,且锌指结构对于 ATPRF1 在大肠杆菌中行使耐热生理功能有着重要作用。

3.2 Western Blot 检测内源蛋白 σ^{32} 及 DnaK

分别将转化了 pBAD24-ATPRF1、pBAD24- Δ ZF

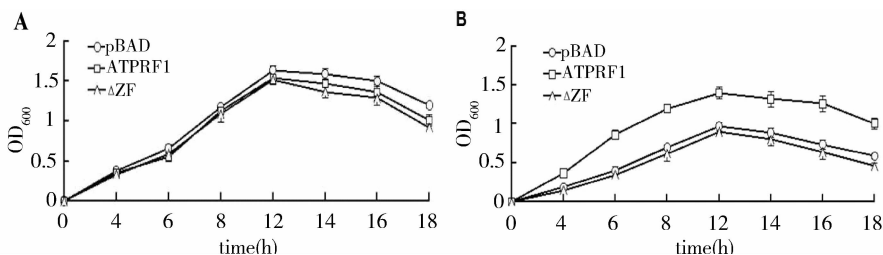


图 1 不同温度下的生长曲线

Fig. 1 The growth curve under different temperatures

A: 37℃ 下的生长曲线 B: 43℃ 下的生长曲线

A. The growth curve under 37℃ B. The growth curve under 43℃

及 pBAD24 的大肠杆菌菌株, 30°C 培养 1h 后, 加入阿拉伯糖于 42°C 诱导, 分别在不同时间点收集等量的菌体, 进行 Western Blot 检测(分别使用 anti- σ^{32} 及 anti-DnaK 抗体). 如图 2, 使用 Bio-Rad Image Lab4.1 软件计算条带灰度值, 随着时间的增加, 诱导表达 ATPRF1 的菌株与 pBAD24 对照菌株相比, σ^{32} 水平明显上升且维持较高水平, 至 30min 时, 表达量为 pBAD24 对照的 13 倍; 而内源 DnaK 水平上升但上升趋势没有 σ^{32} 明显, 至 30min 时, 表达量为 pBAD24 对照 3 倍. 突变株 ΔZF 与空载对照组相比, σ^{32} 、DnaK 水平皆无明显变化. 实验表明 ATPRF1 能够显著提高大肠杆菌体内大幅提高 σ^{32} 及热激蛋白的表达水平并能稳定 σ^{32} . 突变型 ΔZF 中 σ^{32} 、DnaK 表达量均无变化. 推测 ATPRF1 的锌指结构具有与 DnaJ 锌指结构相似的功能, 以此稳定热休克转录因子 σ^{32} .

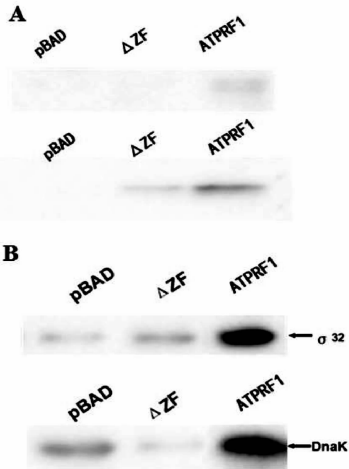


图 2 Western Blot 分析分别转化 pBAD24、 ΔZF 及 ATPRF1 的大肠杆菌

A. 时间点为 10 min 的 Western Blot 分析;
B. 时间点为 30 min 的 Western Blot 分析

Fig. 2 Analysis the level of σ^{32} /DnaK in E. coli harboring pBAD24, ΔZF and ATPRF1 by Western Blot

A. Western Blot at 10 min; B. Western Blot at 30 min

3.3 免疫共沉淀分析 ATPRF1 与 DnaK、 σ^{32} 之间的相互作用

图 4A 所示为其蛋白纯化结果, 目的条带大小 45KD 与预测相符. 为检验 ATPRF1、 ΔZF 是否能与 DnaK 及 σ^{32} 相互作用, 本研究将纯化的 ATPRF1 蛋白、 ΔZF 蛋白、DnaK 蛋白/ σ^{32} 蛋白与 anti-His 抗体进行免疫共沉淀实验(购买的 DnaK 蛋白未含 His 标签, 而表达的 AT2GATPRF160 目的蛋白带有 6 \times His 标签), 后利用 anti-DnaK、anti-His-tag 抗体进行 Western Blot 实验检测. 结果显示(图 3B)在与 anti-His 抗体免疫共沉淀后的蛋白中, ATPRF1 能检测到 σ^{32} 、DnaK 条带, ΔZF 无 DnaK 条带. 表明 RING 结构域对于 AT-

PRF1 与 σ^{32} 、DnaK 之间相互作用起关键性作用.

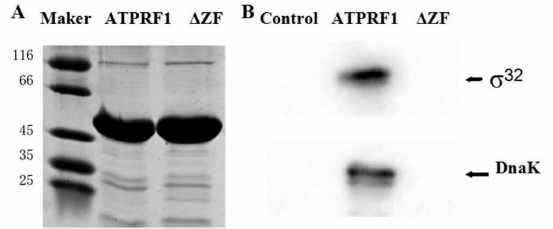


图 3 免疫共沉淀检验 ATPRF1 与 σ^{32} 、DnaK 间相互作用

A ATPRF1 及突变体的蛋白纯化 B 免疫共沉淀检验 ATPRF1 与 σ^{32} 、DnaK 间相互作用

Fig. 3 Detection of the interaction of ATPRF1 and σ^{32} /DnaK *in vitro* by co-immunoprecipitation

A. Purification of ATPRF1 and mutations; B. Detection of the interaction of ATPRF1 and σ^{32} /DnaK *in vitro* by co-immunoprecipitation

3.4 细菌双杂交验证 ATPRF1 与 DnaK 及 σ^{32} 的相互作用

为了进一步验证 ATPRF1 与 DnaK 及 σ^{32} 的相互作用是否能在体内实现, 本研究中构建 ATPRF1、DnaK、 σ^{32} (RpoH) 细菌双杂交检测质粒, 用于验证 ATPRF1 与 DnaK 及 σ^{32} 的相互作用. 所有共转化后的报告菌株在非选择性培养基上皆有菌落生成, 表明双杂交质粒成功转化进入报告菌株.

观察细菌双杂交筛选平板, 阳性对照及含有 pBT-ATPRF1/pTRG-DnaK 质粒、pBT- ΔZF /pTRG-DnaK 质粒、pBT-ATPRF1/pTRG-RpoH 的报告菌株在 36h 后有菌落生成, 阴性对照、自激活对照、pBT- ΔZF /pTRG-RpoH 均无菌落长出, 至培养终止 48h(如图 4). ATPRF1 与 σ^{32} 、DnaK 产生体内相互作用; 突变型 ΔZF 与 DnaK 具有微弱的相互作用, 但与 σ^{32} 不具有体内相互作用. 该体内实验与免疫共沉淀实验结果相符, 表明 ATPRF1 与 σ^{32} 、DnaK 相互作用的位点位于 RING 结构域内. 对于突变型 ΔZF 在细菌双杂交及免疫共沉淀能够与 DnaK 有微弱相互作用(图 4B), 大肠杆菌体内作为重要的分子伴侣的 DnaK 在与大肠杆菌表达的外源蛋白会发生特异性结合.

3.5 ATPRF1 的体外泛素化分析

过 HIS 亲和纯化的融合蛋白 ATPRF1 在泛素 (Ub)、E1、E2 都存在的条件下, 能形成明显的自泛素化条带, 而分别缺少 E1、E2、ATPRF1 无泛素化条带; 经过 HIS 亲和纯化的融合蛋白突变型 ΔZF 在泛素 (Ub)、E1、E2 都存在的条件下, 无泛素化条带(如图 5A). 说明 ATPRF1 具有 E3 连接酶的活性, 并且 E3 连接酶活性依赖于 RING 结构域; 而突变型 ΔZF 已失去 E3 酶活性. ATPRF1 在泛素 (Ub)、 σ^{32} 、

E1、E2 都存在的条件下,能形成明显的自泛素化条带,而 ΔZF 无泛素化条带(如图 5B)。该结果进一步

证明 ATPRF1 在大肠杆菌中与 σ^{32} 间能发生相互作用;同时,ATPRF1 能将 σ^{32} 多泛素化。

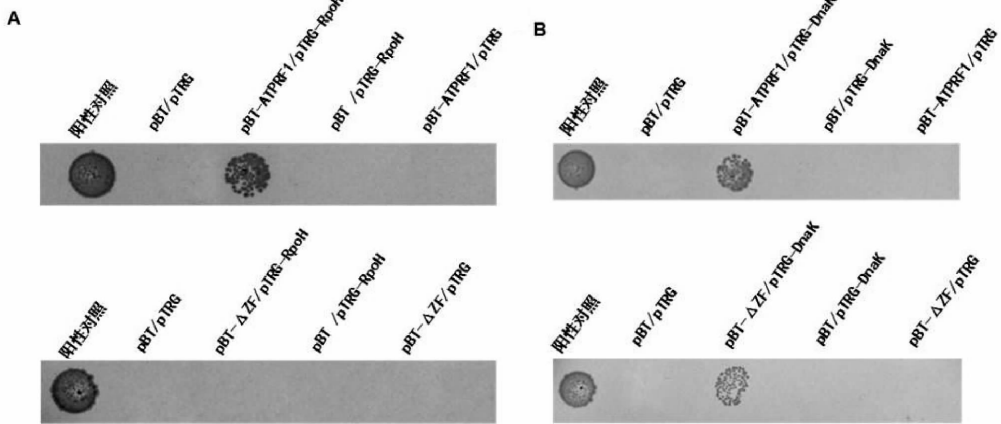


图 4 细菌双杂交分析 ATPRF1 与 σ^{32} 、DnaK 间的相互作用

A:ATPRF1 与 σ^{32} 间的相互作用; B:ATPRF1 与 DnaK 间的相互作用

Fig. 4 Analysis of the interaction of ATPRF1 and σ^{32} /DnaK *in vivo* by bacteria two-hybrid system A. Analysis of the interaction of ATPRF1 and σ^{32} ; B. Analysis of the interaction of ATPRF1 and DnaK

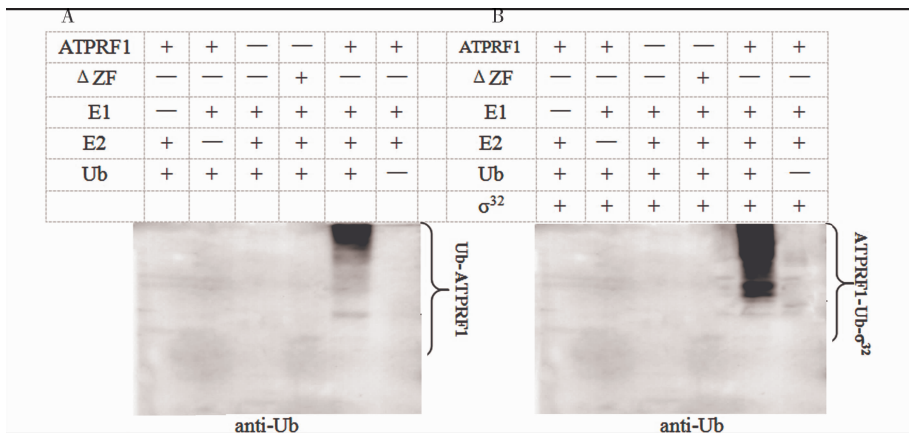


图 5 ATPRF1 的体外泛素化分析

A:ATPRF1 的 Ub 体外泛素化 B:ATPRF1 体外泛素化 σ^{32}

Fig. 5 In vitro self-ubiquitination assay of ATPRF1

A. self-ubiquitination of ATPRF1; B. The ubiquitination of σ^{32} by ATPRF1

4 讨论

本研究中,ATPRF1 (At2g02960) 是含有 C3HC4 型锌指结构的拟南芥蛋白,其 RING 结构域位于氨基酸序列的 43 位至 88 位,猜测具有 E3 结构的 ATPRF1 在大肠杆菌中能参与 DnaK/J 蛋白折叠的系统,同时为了探索对 ATPRF1 的 RING-finger 在大肠杆菌中能否行使一定的作用,我们对 ATPRF1 的锌指关键位点进行点突变。

首先测定大肠杆菌在不同温度下的生长曲线,发现 ATPRF1 能够提高大肠杆菌对热的耐受性,突变型在热激条件下不能正常生长,暗示 ATPRF1 与大肠杆菌的热激蛋白有一定相关性,而 RING 结构域对于 ATPRF1 耐热性起着重要作用。大肠杆菌在 30~37℃ 时,体内 σ^{32} 的水平非常

低,其主要受到 DnaK/DnaJ 系统的活性控制和蛋白酶体 FtsH 的稳定性控制;在 42℃ 热激条件下时,细胞体内 σ^{32} 蛋白编码基因 rpoH 转录出来的 mRNA 形成紧密的二级结构被解除, σ^{32} 蛋白的翻译抑制也被解除,细胞内 σ^{32} 蛋白大量合成,此时 σ^{32} 调控的热激蛋白大量合成,并在 10min 内使热激蛋白在细胞内的表达水平达到最高峰。大肠杆菌体内的 σ^{32} 水平受到 DnaK/J 系统反馈调节而变化:首先 DnaK/J 系统能将 σ^{32} 运送到膜定位的蛋白酶体 FtsH 进行降解,控制体内 σ^{32} 的水平;其次 σ^{32} 被 DnaK/J 结合后活性受到控制^[15]。对比 ATPRF1 锌指结构突变型,Western Blot 结果表明 ATPRF1 的 σ^{32} 表达量的上调后稳定于一定的水平,DnaK 的表达水平呈现少量上升趋势,同时,体内、体外相互作用实验表明 ATPRF1 与 DnaK、 σ^{32}

均存在相互作用。因此我们猜测造成 σ^{32} 表达量上升且趋于稳定的原因有两方面:一方面,ATPRF1 可能与 DnaK 发生相互作用,使得 σ^{32} 释放,阻止 σ^{32} 被运送到蛋白酶体降解;另一方面,ATPRF1 可能与 σ^{32} 直接结合,以保护体内的 σ^{32} 。

大肠杆菌的 HSP40 蛋白 DnaJ 有两个锌指结构,其在 N 末端含有一个激活 DnaK 的 ATP 酶活的结构域(J-domain),一个 G/F 区,锌指结构和 C 末端结构域,并且 DnaJ 的锌指结构能够与 DnaK 相互作用,是其在 DnaK/DnaJ 系统中发挥功能必不可少的结构域,其次 DnaJ 作为分子伴侣独立行

使功能的重要结构域。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^[16]。细菌双杂交及免疫共沉淀实验表明 ATPRF1 与 DnaK 存在相互作用,而正是由于这样的相互结合,使得 σ^{32} 与 DnaK 水平有所上升。而 ATPRF1 的锌指结构突变体与 DnaK 无相互作用,并且 σ^{32} 与 DnaK 水平无上调。ATPRF1 的锌指结构与 DnaJ 在功能上的保守性可能是 ATPRF1 发挥生理功能的基础,推测 ATPRF1 在进化上可能与 DnaJ 具有某种未知的联系,由于在实验中我们验证了双锌指突变,两个锌指结构在大肠杆菌中单独行使何种作用还需要进一步的实验予以验证。

泛素实验进一步验证了 ATPRF1 的 RING 结构域能够与 σ^{32} 存在相互作用。失去 E3 酶活的突变型不具备泛素化 σ^{32} 的能力;ATPRF1 具有 E3 酶活性且能对 σ^{32} 进行泛素化修饰,且 ATPRF1 呈现多聚泛素化条带。这种 E3 连接酶在体外泛素化大肠杆菌热击转录因子的现象也是联系真核生物与原核生物的一个纽带。为蛋白结构功能的进化提供依据,在原核生物中存在着类泛素修饰系统,如在大肠杆菌中的类泛素修饰蛋白 MoaD 和 ThiS 能参与硫转运途径中并能够修饰蛋白,最新研究表明 σ^{32} 能够受到类泛素蛋白 ThiS 的修饰^[7,12],推断 ATPRF1 将 σ^{32} 多泛素化的原因可能是 σ^{32} 在大肠杆菌体内受到类泛素的修饰调控。

参考文献:

[1] Huibregtse J M, Scheffner M, Beaudenon S, *et al.* A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92: 2563.

[2] Noma A, Sakaguchi Y, Suzuki T. Mechanistic characterization of the sulfur-relay system for eukaryotic 2-thiouridine biogenesis at tRNA wobble positions [J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(4): 1335.

[3] 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 Physical, 2005, 139: 1597.

[4] Dorval V, Fraser P E. Sumo modification of natively unfolded proteins tau and alpha-synuclein [J]. Biol Chem, 2006, 281(15): 9919.

[5] Petroski M D, Salvesen G S, Wolf D A. Urm1 couples sulfur transfer to ubiquitin-like protein function in oxidative stress [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(5): 1749.

[6] Iyer L M, Burroughs A M, Aravind L. The prokaryotic antecedents of the ubiquitin-signaling system and the early evolution of ubiquitin-like beta-grasp domains [J]. Genome Biology, 2006, 7(7): 60.

[7] Lehmann C, Begley T P, Ealick S E. Structure of the Escherichia coli ThiS-ThiF complex, a key component of the sulfur transfer system in thiamin biosynthesis [J]. Biochemistry, 2006, 45(1): 11.

[8] Leichert L I. Proteomic methods unravel the protein quality control in Escherichia coli [J]. Proteomics, 2011, 11(15): 3023.

[9] Genevaux P, Georgopoulos C, Kelley W L. The Hsp70 chaperone machines of Escherichia coli: a paradigm for the repartition of chaperone functions [J]. Molecular microbiology, 2007, 66(4): 840.

[10] Murata M, Fujimoto H, Nishimura K, *et al.* Molecular strategy for survival at a critical high temperature in Escherichia coli [J]. PLoS One, 2011, 6(6): 20063.

[11] Muffler A, Barth M, Marschall C, *et al.* Heat shock regulation of sigma S turnover: a role for DnaK and relationship between stress responses mediated by sigma S and sigma32 in Escherichia coli [J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(2): 445.

[12] Stone S L, Hauksdottir H, Troy A, *et al.* Functional analysis of the RING-Type ubiquitin ligase family of Arabidopsis [J]. Plant Physical, 2005, 137: 13.

[13] Karimova G, Pidoux J, Ullmann A, *et al.* A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(10): 5752.

[14] Guisbert E, Yura T, Rhodius V A, *et al.* Convergence of molecular, modeling, and systems approaches for an understanding of the Escherichia coli heat shock response [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2008, 72(3): 545.

[15] Hennessy F, Nicoll W S, Zimmermann R, *et al.* Not all J domains are created equal; implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions [J]. Protein Sci, 2005, 14(7): 1697.