

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2017.03.032

# 拟南芥 AtTR1 对 AtCPK28 和 AtCPK32 的体外泛素化修饰研究

樊莉娟, 陈彩丽, 朱旭辉, 黄奎, 姚润东, 王健美

(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:** 为了研究 E3 连接酶 AtTR1 和非生物胁迫应答的相关蛋白 AtCPK28、AtCPK32 之间关系, 本文构建原核表达载体 pET28a-AtCPK28 和 pET28a-AtCPK32, 并在大肠杆菌中表达了 AtTR1、AtCPK28 和 AtCPK32 重组蛋白, 利用亲和层析纯化相应融合蛋白. 将 AtCPK28 和 AtCPK32 蛋白分别加入含有 ATP、泛素、E1、E2 和 AtTR1 的体外泛素反应体系中, western blot 检测到 AtCPK28 和 AtCPK32 有多聚泛素化条带, 说明 AtTR1 在体外能多泛素化修饰 AtCPK28 和 AtCPK32. 结果表明 AtCPK28 和 AtCPK32 可能是 AtTR1 调控植物抗逆信号中的下游靶蛋白.

**关键词:** 拟南芥; AtTR1; AtCPK28; AtCPK32; 泛素化

**中图分类号:** Q946.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0490-6756(2017)03-0617-06

## Investigation on ubiquitination of AtCPK28 and AtCPK32 by AtTR1 *in vitro*

FAN Li-Juan, CHEN Cai-Li, ZHU Xu-Hui, HUANG Kui,

YAO Run-Dong, WANG Jian-Mei

(Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of MOE,  
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

**Abstract:** In order to analyze the relationship between E3 ligase AtTR1 and abiotic stress response related proteins AtCPK28 and AtCPK32, we prepared the prokaryotic expression plasmids pET28a-AtCPK28 and pET28a-AtCPK32, and produced the AtTR1, AtCPK28 and AtCPK32 recombinant proteins in *Escherichia coli* using RT-PCR and molecular approaches. The recombinant proteins was also purified by Affinity Chromatography. In the presence of ATP, E1, E2 and AtTR1, Poly ubiquitination band was observed in the presence of purified AtCPK28 or AtCPK32 by western blot. The results showed that the AtCPK28 and AtCPK32 were multi-ubiquitylated by AtTR1 *in vitro*. It indicated that the AtCPK28 and AtCPK32 are potential downstream targets of AtTR1 in the regulation of stress resistance signaling pathways.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*; AtTR1; AtCPK28; AtCPK32; Ubiquitination

收稿日期: 2016-01-21

基金项目: 国家自然科学基金(31271758)

作者简介: 樊莉娟(1990-), 女, 四川资阳人, 硕士研究生, 研究方向为生物工程. E-mail: fanlijuan512@163.com

通讯作者: 王健美. E-mail: wangjianmei@scu.edu.cn

## 1 引言

TR1 是从从甘蓝型油菜中克隆出的一个可提高植物和微生物对热胁迫的抗性的耐热基因(定名为 BnTR1, *Braasica napus* Thermal Resistant gene 1). 研究证实 BnTR1 定位于细胞膜上, 是一个全新的、在植物中未见任何报道的 E3 连接酶, 它属于泛素化 E3 连接酶 RING 家族<sup>[1]</sup>. 在对 BnTR1 作用机制的研究上, 证实 BnTR1 能够增加细胞膜钙离子通道的活性<sup>[2]</sup>, 推测胁迫信号有可能通过诱导 TR1 的表达, 然后 TR1 通过 E3 连接酶活性对钙通道蛋白进行泛素化修饰, 影响钙通道活性, 从而导致细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的变化, 最终引起胁迫应答. 因此, TR1 很可能是植物非生物胁迫信号途径中的一个关键调控基因. AtTR1 基因全长 864bp, 编码 288 个氨基酸, 包含两个结构域, N 端的锌指结构域和 C 端的跨膜结构域. AtTR1 蛋白含有 RINGv 锌指结构域, 是一个 C3HC4 型锌指蛋白, 在体外有 E3 泛素化活性, 参与多种生物信号途径.

长期的研究发现, 钙离子广泛参与植物的生长发育以及逆境胁迫的应答, 是体内重要的第二信使. 细胞内钙离子浓度的变化通过  $\text{Ca}^{2+}$  信号感受蛋白进一步将信号传递到下游, 从而使细胞出现分裂伸长、对各种胁迫应答等<sup>[3]</sup>. 目前发现植物中有三类钙信号感受蛋白, 包括钙调素(CaM)、钙调磷酸酶 B 类蛋白(CBL)和钙依赖蛋白激酶(CDPK). 在所有钙感受蛋白中, 钙依赖蛋白激酶具有独特性, 它既可以感知  $\text{Ca}^{2+}$  信号, 也能够对  $\text{Ca}^{2+}$  信号作出应答<sup>[4,5]</sup>. 钙依赖蛋白激酶在钙信号的传递和转导中起重要作用, 参与植物受到各种刺激的应答响应中, 如干旱、高盐、冷冻和病害等胁迫应答. 研究 CDPK 在各种逆境胁迫下的调控作用对提高植物的抗逆能力有重要的科学价值.

CDPKs 全称为钙依赖蛋白激酶 ( $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinases), 是一个多基因家族, 迄今为止发现它分布于全部的植物、绿藻以及部分原生动中. 目前研究发现在拟南芥中有 34 个成员, 分为 4 个亚家族, 广泛分布于植物的根、茎、叶、花、果实和种子等<sup>[4,6,7]</sup>. 大量转录分析显示, 每个亚家族具有不同的表达模式, 这可能与每种亚家族功能的特异性有关<sup>[8,9]</sup>. CDPKs 是典型的 Thr/Ser 蛋白激酶, 从 N 端到 C 端可以分为四个区域, 依次为 N 末端可变区、催化区、连接区和调控区<sup>[4,10,11]</sup>.

TR1 和 CDPK 都参与植物非生物胁迫的调控, 并且都和  $\text{Ca}^{2+}$  相关. 为了分析 AtTR1 和 AtCPK28、AtCPK32 之间以及在  $\text{Ca}^{2+}$  信号通路中的关系, 本研究以拟南芥 AtTR1 (基因 ID: At3g47550) 和拟南芥 AtCPK28 (基因 ID: At5g66210) 和 AtCPK32 (基因 ID: At3g57530) 为研究对象, 构建原核表达载体, 体外表达重组蛋白, 用体外泛素化试验进行相互作用分析.

## 2 材料与方法

### 2.1 材料与试剂

克隆菌株 DH5 $\alpha$ 、表达菌株 Rosetta (DE3)、表达载体 pET28a (保存于 DH5 $\alpha$  中)、pET28a-AtTR1 质粒(保存于 DH5 $\alpha$  中)均为本实验室保存的菌株.

PrimeSTAR Max DNA Polymerase (TaKaRa), 离心柱型 DNA 纯化回收试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司), 限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、*Sal* I (TaKaRa), IPTG, 丙烯酰胺, N, N-亚甲基双丙烯酰胺, 硫酸卡那霉素, T4 DNA 连接酶(Fermentas), 胰蛋白酶、酵母提取物(Amersco), Ub 抗体、Flag 抗体 (Abcam), Western blotting 化学发光 HRP 底物(Millipore), Ub、E1、E2(Boston Biochem), 超滤管(Millipore). 其它试剂均为分析纯.

### 2.2 实验方法

2.2.1 高保真 PCR 获取目的基因片段 首先检索蛋白一级结构信息. 根据基因名称或者基因号在 NCBI 的 Gene 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) 或者拟南芥信息资源中心 (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>) 中进行检索, 获取基因全部 CDS 序列.

用 Primer 设计好 AtCPK28 和 AtCPK32 的上下游引物及酶切位点(表 1), 其中, 在 AtCPK28-F、AtCPK32-F 的上游引物加入 flag-tag 序列 (ATGGCAAGCGACTACAAAGATGACGACGATAAAAAGCGGC).

选取正常条件下培养的较健壮的哥伦比亚型拟南芥植株, 提取总 mRNA, 并用反转录试剂盒进行反转得到 cDNA. PCR 反应以拟南芥的 cDNA 为模板, 分别以 AtCPK28-F、AtCPK32-F 为上游引物, 以 AtCPK28-R、AtCPK32-R 为下游引物, 用 PrimerStart MAX 高效率高保真 DNA 聚合酶扩增出目的基因片段.

表 1 引物名称及序列

Tab. 1 Primer name and sequences

引物名称	引物序列(5'-3')
AtCPK28-F	CG <u>GGATCC</u> ATGGCAAGCGACTACAAAGATGACGACGATAAAAAGCGGCATGGGTGTCTGTTTCTCC
AtCPK28-R	CCC <u>AAGCTT</u> TTCGAAGATTCTCTGTGAC
AtCPK32-F	CG <u>GGATCC</u> ATGGCAAGCGACTACAAAGATGACGACGATAAAAAGCGGCATGGGTAATTGTTGCGGAA
AtCPK32-R	ACGC <u>GTCGACT</u> CATCTTGTATCACCATTGACCTG

注:下划线标记的序列为限制性内切酶切位点.

2.2.2 构建原核表达载体 pET28a 质粒用质粒小提试剂盒提取,提取方法步骤参考试剂盒操作说明书.用  $\text{CaCl}_2$  法制备感受态细胞 DH5 $\alpha$  备用.将 PCR 扩增后得到的基因片段和 pET28a 质粒用限制性内切酶进行 37 $^\circ\text{C}$  酶切过夜,其中 AtCPK28 用 *Bam*H I 和 *Hind* III, AtCPK32 用 *Bam*H I 和 *Sal* I.将过夜酶切的 PCR 片段和质粒跑 1% 的琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下观察酶切结果后,用 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的基因片段和质粒.将基因片段和质粒按照摩尔比为 3 : 1 加入连接酶在 16 $^\circ\text{C}$  连接 4h,连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,在含有 Kana 抗性的平板上 37 $^\circ\text{C}$  过夜培养,进行阳性筛选.挑取阳性单克隆菌落接种到含 Kana 抗性的 LB 液体培养基,37 $^\circ\text{C}$  过夜培养,用质粒小提试剂盒提取质粒,用相应的限制性内切酶进行双酶切验证.

2.2.3 蛋白质原核表达 将测序成功的质粒转化表达菌株 Rosetta(DE3).挑取单克隆菌落接种到含 Kana 抗性的 LB 液体培养基中,37 $^\circ\text{C}$  过夜培养进行菌种活化.将活化的菌种以 1 : 100 的比例接种的新鲜的含有 Kana(终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的液体培养基中,37 $^\circ\text{C}$ 、200r/min 培养 3~4h 左右.当培养液 OD<sub>600</sub> 值达到 0.6~0.8 之间,加入 IPTG 至终浓度为 0.5mM IPTG,置于 16 $^\circ\text{C}$  摇床继续过夜培养.次日收集 1mL 诱导后的细菌培养液,SDS-PAGE 检测蛋白质表达情况.纯化蛋白时,将诱导后的菌液高速离心收集菌体,加入生理盐水重悬,然后高速离心,收集菌体,重复两次,加入 binding buffer 重悬菌体,超声波破碎菌体,低温高速离心分离上清和沉淀,将上清通过直径为 0.45 $\mu\text{m}$  的滤头过滤.蛋白纯化柱,填料为 Ni-NTA,将滤过的上清进行挂柱,用 20mM 咪唑洗脱杂蛋白,用 250mM 咪唑洗脱目的蛋白,SDS-PAGE 检测蛋白质纯化结果.

2.2.4 体外泛素化 将 4 $\mu\text{g}$  的 AtTR1 和 150ng 的 AtCDPK28 蛋白或 AtCDPK32 加入到在含有

2 $\mu\text{g}$  E1、4 $\mu\text{g}$  E2 和 2 $\mu\text{g}$  泛素的 buffer 中,其中 buffer 组分为 20 mM Tris-HCl(pH8.0),20 mM  $\text{MgCl}_2$ ,4 mM ATP,4 mM DTT,总体积为 20  $\mu\text{L}$ ,30 $^\circ\text{C}$  反应 4 h,反应结束后加入 5  $\mu\text{L}$  5 $\times$  SDS-PAGE 上样缓冲液,95 $^\circ\text{C}$  处理 10 min,样品用于 western blotting 检测.

### 3 研究结果

#### 3.1 AtCPK28 和 AtCPK32 原核表达载体的构建

原核表达载体选用常见的 pET28a,设计引物时加入了 flag 标签(图 1 A).PCR 反应结果用琼脂糖凝胶电泳检测,与 DNA Marker 大小比对后,确定 PCR 扩增出的目的基因大小与其理论大小一致(图 1 B).将 PCR 扩增后得到的目的基因片段和 pET28a 质粒进行双酶切后,用连接酶将基因片段与质粒进行连接后转化大肠杆菌感受态 DH5 $\alpha$ .用相应的限制性内切酶进行双酶切验证阳性单克隆菌落(图 1 C),阳性克隆载体均能切出两条条带,且两条条带与理论值一致.将筛选出来的阳性克隆的重组质粒送往华大基因进行测序,进一步验证基因有无缺失和突变,测序结果与目的基因 CDS 序列一致,pET28a-AtCPK28 和 pET28a-AtCPK32 重组质粒构建成功,并成功转化克隆菌.

#### 3.2 AtTR1、AtCPK28 和 AtCPK32 蛋白质的诱导表达和纯化

将测序成功的 pET28a-AtCPK28, pET28a-AtCPK32, pET28a-AtTR1 重组质粒转化大肠杆菌表达感受态 Rosetta(DE3),挑取单克隆菌落进行活化和扩大培养后,加入诱导剂 IPTG 诱导目的蛋白的表达.因重组蛋白中带有 his-tag 标签,且目的蛋白为分泌型蛋白,采用了镍柱亲和层析纯化目的蛋白.纯化出来的目的蛋白再进行超滤,去除洗脱液中的咪唑及浓缩目的蛋白.通过 SDS-PAGE 检测(图 2),纯化出来的目的蛋白与理论大小一致,且无明显杂蛋白,能够用于下一步体外相互作用试验.

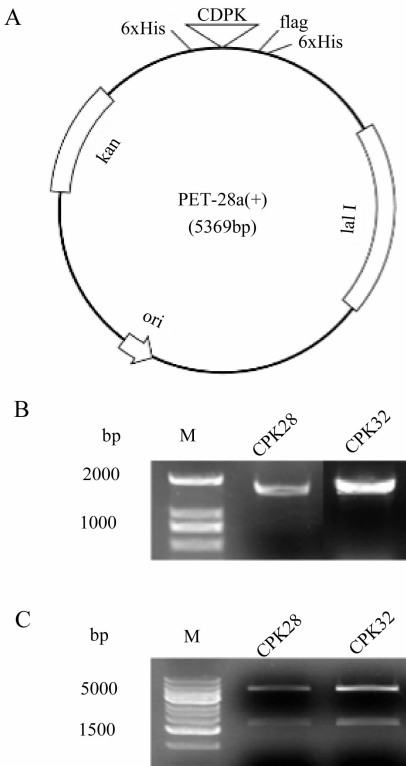


图 1 构建 pET28a-AtCPK28、pET28a-AtCPK32 载体 A. 载体示意图 B. AtCPK28、AtCPK32 的 PCR 琼脂糖凝胶电泳分析 C. pET28a-AtCPK28、pET28a-AtCPK32 的双酶切凝胶电泳图

Fig. 1 constructed pET28a-AtCPK28, pET28a-AtCPK32 vectors

A. vectors map B. Analysis PCR result of AtCPK28, AtCPK32 with agarose gel electrophoresis C. pET28a-AtCPK28, pET28a-AtCPK32 double digested gel electrophoresis

### 3.3 AtTR1 在体外对 AtCPK28 和 AtCPK32 进行多泛素化修饰

TR1 蛋白是拟南芥中的一个含有 RING 锌指结构域的 E3 泛素连接酶,参与泛素-蛋白酶体降解途径.将纯化出来的 AtTR1、AtCPK28 和 AtCPK32 蛋白进行体外泛素化试验并通过 Weston-blot 检测.用 Flag 抗体杂交,试验组 AtCPK28 出现多条泛素化条带,而相应的缺少泛素(Ub)、泛素激活酶(E1)、泛素结合酶(E2)或者泛素连接酶(E3,这里为 AtTR1)的阴性对照则没有泛素化条带(图 3 A).用 Ub 抗体杂交,也只有试验组检测能检测到泛素化条带(图 3 B).说明在体外,AtTR1 能够多泛素化 AtCPK28,即 AtCPK28 蛋白与 AtTR1 蛋白有相互作用.同样 AtTR1 也能够多泛素化 AtCPK32(图 3 C,D),即 AtCPK32 蛋白与 AtTR1 蛋白也有相互作用.

## 4 讨论

拟南芥 TR1 同油菜 TR1 的功能相同,都可以提高植物乃至微生物的耐热性,研究 TR1 的分子作用机理对全球变暖的今天有重要的研究意义及广阔的应用前景,但是至今还没有研究报道它的耐热机制.罗勤、张亚等人利用酵母双杂、pull-down 和泛素分裂系统筛选与 AtTR1 相互作用蛋白质,筛选出了 PATL6 及 HMA 等潜在相互作用蛋白,为 AtTR1 作用机理研究奠定了一定基础<sup>[12,13]</sup>.

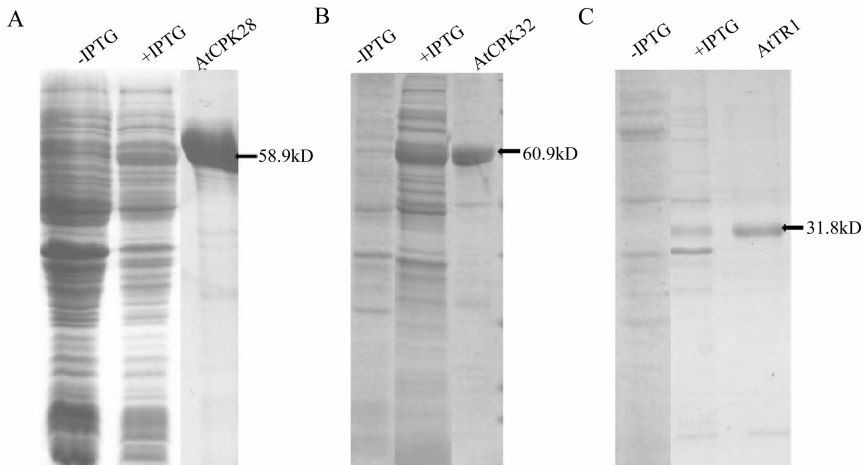


图 2 重组子蛋白纯化及 SDS-PAGE 分析

A. AtCPK28 蛋白纯化 SDS-PAGE 检测 B. AtCPK32 蛋白纯化 SDS-PAGE 检测 C. AtTR1 蛋白纯化 SDS-PAGE 检测(第一条泳道为不加诱导剂 IPTG 的全菌,第二泳道为加诱导剂 IPTG 的全菌,第三泳道为纯化后的目的蛋白)

Fig. 2 analysis of recombinant plasmid and purified recombinant protein

A. SDS-PAGE of AtCPK28 protein purified B. SDS-PAGE of AtCPK32 protein purified C. SDS-PAGE of AtTR1 protein purified(The first lanes without IPTG to the whole cell, a second lane with adding IPTG to whole cell, third lanes for the purpose protein of the purified)

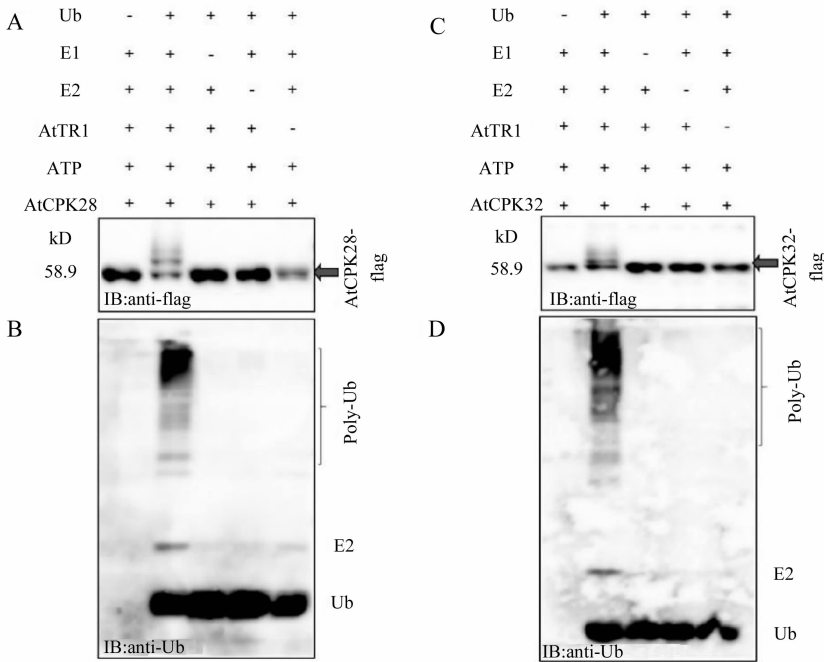


图 3 AtCPK28、AtCPK32 与 AtTR1 的体外泛素化作用

A. 以 AtTR1 为 E3 连接酶, AtCPK28 为底物的泛素化试验, 杂交抗体为 flag 抗体 B. 与 A 图相同, 杂交抗体为 Ub 抗体 C. 以 AtTR1 为 E3 连接酶, AtCPK32 为底物的泛素化试验, 杂交抗体为 flag 抗体 D. 与 C 图相同, 杂交抗体为 Ub 抗体

Fig. 3 AtCPK28 and AtCPK32 ubiquitination with AtTR1 in vitro

A. AtTR1 as E3 ligase, AtCPK28 is ubiquitinated substrates, hybrid antibodies is the antibody flag B. Same as A, but the hybrid antibody is antibody Ub. C. AtTR1 as E3 ligase, AtCPK32 is ubiquitinated substrates, hybrid antibodies is the antibody flag D. Same as A, but the hybrid antibody is antibody Ub.

AtCPK28 和 AtCPK32 分别位于第 IV 亚家族和第 III 亚家族, AtCPK28 基因在植物的根、芽和保卫细胞中表达, 蛋白亚细胞定位于质膜上<sup>[12]</sup>. AtCPK32 基因除了在根、芽和保卫细胞中表达, 还在花粉管中有表达, AtCPK32 定位于细胞膜和细胞核<sup>[13]</sup>. 目前研究发现 AtCPK28 和 AtCPK32 能够参与 ABA 和气孔调节等信号途径. AtCPK28 在用甘露醇处理的渗透胁迫中起正调控作用, 并且这是由靶蛋白调节, 而不是经由转录水平的响应<sup>[14]</sup>. 在用拟南芥微芯片分析法找出  $\text{Ca}^{2+}$  和 ABA 调控的基因, 结果发现 AtCPK32 是 34 个拟南芥 CDPK 家族中唯一一个受  $\text{Ca}^{2+}$  影响上调表达的基因, 并且具有一个与 ABRE 耦合元件<sup>[15]</sup>. 在酵母双杂交实验中研究表明, AtCPK32 能够磷酸化 ABF4, ABF4 是一个 ABA 信号通路的转录因, 说明 AtCPK32 参与 ABA 信号通路中. 此外, AtCPK32 也参与盐胁迫、伤害和黑暗等, 说明 AtCPK32 是细胞内响应各种刺激的早期应答基因.

我们以拟南芥 cDNA 为模板, 扩增出目的基因 *AtCPK28*、*AtCPK32*, 并将目的基因连接至 pET28a 载体上. 将重组质粒导入大肠杆菌进行原

核蛋白表达, 将纯化的 AtCPK28、AtCPK32 蛋白与 AtTR1 蛋白在体外进行泛素化实验. 结果表明 AtTR1 在体外能够对 AtCPK28 和 AtCPK32 进行多泛素化修饰. 泛素化是指泛素分子在一系列酶作用下, 对靶蛋白进行特异性修饰的过程. 泛素化修饰参与了细胞中的多种重要的生命活动, 包括降解蛋白质的 26S 蛋白酶体过程、细胞内陷和溶酶体标记、蛋白相互作用调控、调节亚细胞分布、调节转录、DNA 修复和跨膜信号转导等<sup>[16]</sup>. 泛素蛋白中含有七个 Lys, 每一个 Lys 都可以被泛素化. K48 位泛素化一般会导致蛋白质的降解 (26S 蛋白酶体途径), 而 K63 位的泛素化则是引起蛋白激活、DNA 修复和囊泡运输等<sup>[17, 18]</sup>. 单泛素化和多泛素化在许多生理过程中发挥重要作用, 如在信号转导中调节蛋白之间的相互作用、亚细胞组分之间的蛋白运输以及蛋白的某些生理功能<sup>[19]</sup>.

AtTR1 在体外多泛素化 AtCPK28 和 AtCPK32, 说明 AtTR1 能够与 AtCPK28 和 AtCPK32 发生直接的相互作用, 并且也说明 AtCPK28 和 AtCPK32 有泛素化位点. 我们猜测 AtTR1 能够泛素化修饰 AtCPK28 和 AtCPK32,

激活 AtCPK28 和 AtCPK32 或者帮助 AtCPK28 和 AtCPK32 在细胞内运输,从而参与植物对各种逆境胁迫的应答。AtTR1 泛素化修饰 AtCPK28 和 AtCPK32 可能与植物抗逆的分子机理有一定关系,这些猜测有待进一步证实。

### 参考文献:

- [1] 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 Biotechnol J*, 2014, 12(1):93.
- [2] 许发伦, 刘志斌, 杨远友, 等. (45)Ca 示踪技术对转基因油菜耐热机理的研究. [A]//中国核科学技术进展报告(第二卷)——中国核学会 2011 年学术年会论文集第 4 册(核材料分卷、同位素分离分卷、核化学与放射化学分卷)[C]. 2011.
- [3] Sander D, Pelloux J, Brownlee C. Calcium at the Crossroads of signaling [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: S401.
- [4] Cheng S H, Willmann M R, Chen H C, *et al.* Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(2): 469.
- [5] Ludwig A A, Romeis T, Jones J D G. CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(395): 181.
- [6] Harper J E, Breton G, Harmon A. Decoding Ca<sup>2+</sup> signals through plant protein kinases [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55: 263.
- [7] Harper J F, Harmon A. Plants, symbiosis and parasites: A calcium signalling connection [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2005, 6(7): 555.
- [8] Wan B, Lin Y, Mou T. Expression of rice Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases (CDPKs) genes under different environmental stresses [J]. *Febs Letters*, 2007, 581(6): 1179.
- [9] Ray S, Agarwal P, Arora R, *et al.* Expression analysis of calcium-dependent protein kinase gene family during reproductive development and abiotic stress conditions in rice (*Oryza sativa* L. ssp indica) [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2007, 278(5): 493.
- [10] Busconi M L, Busconi L. Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase(CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation [J]. *The Plant Journal*, 2000, 24(4): 429.
- [11] Boudsocq M, Sheen J. CDPKs in immune and stress signaling [J]. *Trends in Plant Science*, 2013, 18(1): 30.
- [12] 罗勤, 张亚, 谢林峰, 等. 酵母双杂交系统筛选与 At-TR1 相互作用的蛋白 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2013, 50(6): 1085.
- [13] 张亚, 罗勤, 谢林峰, 等. 利用泛素分裂系统筛选 At-TR1 相互作用蛋白质 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2013, 50(5): 1368.
- [14] Dammann C, Ichida A, Hong B, *et al.* Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from Arabidopsis [J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(4): 1840.
- [15] Choi H I, Park H J, Park J H, *et al.* Arabidopsis calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity [J]. *Plant Physiology*, 2005, 139(4): 1750.
- [16] Gao A, Wu Q, Zhang Y, *et al.* Arabidopsis calcium-dependent protein kinase CPK28 is potentially involved in the response to osmotic stress [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2014, 59(11): 1113.
- [17] Kaplan B, Davydov O, Knight H, *et al.* Rapid transcriptome changes induced by cytosolic Ca<sup>2+</sup> transients reveal ABRE-related sequences as Ca<sup>2+</sup>-responsive cis elements in Arabidopsis [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(10): 2733.
- [18] Metzger M B, Hristova V A, Weissman A M. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 3): 531.
- [19] Deng L, Wang C, Spencer E, *et al.* Activation of the IκB Kinase Complex by TRAF6 Requires a Dimeric Ubiquitin-Conjugating Enzyme Complex and a Unique Polyubiquitin Chain [J]. *Cell*, 2000, 103(2): 351.
- [20] Mazzucotelli E, Belloni S, Marone D, *et al.* The E3 Ubiquitin Ligase Gene Family in Plants: Regulation by Degradation [J]. *Current Genomics*, 2006, 7(8): 509.
- [21] D'Azio A, Bongiovanni A, Nastasi T. E3 ubiquitin ligases as regulators of membrane protein trafficking and degradation [J]. *Traffic*, 2005, 6(6): 429.