



# 大豆 *Glyma03g263000* 基因克隆、原核表达及纯化

刘 鑫, 李文辰, 康 越, 齐泽铮, 于 璐, 王 芳

(齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院/抗性基因工程与寒地生物多样性保护黑龙江省重点实验室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**摘 要:**大豆 *Glyma03g263000* 基因编码 1 个 RING-H2 zinc finger 蛋白, 其表达水平受大豆胞囊线虫侵染影响。为促进该基因在抗线虫研究中的应用, 利用生物信息学和 PCR 方法对该基因序列进行分析, 并从抗病大豆品种中克隆基因 CDS 区。构建 pET30a-*Glyma03g263000* 原核表达载体, 转化至大肠杆菌 Rosetta( DE3 ) 菌株中, 并诱导 *Glyma03g263000* 蛋白表达, 设置不同菌液浓度、IPTG 浓度、温度及诱导时间, 并采用 SDS-PAGE 电泳方法进行检测, 分析诱导该蛋白表达的较好条件。结果显示: *Glyma03g263000* 基因编码 260 个氨基酸, 蛋白分子质量为 27.88 kDa, 在 102 ~ 145 个氨基酸区间具有 1 个 RING 保守结构域。温度是影响该蛋白表达的主要因素。该蛋白是不溶于水的包涵体蛋白, 经变性裂解等试剂处理后可获得纯化蛋白。研究结果为 *Glyma03g263000* 蛋白的功能分析奠定了理论及材料基础。

**关键词:**大豆; *Glyma03g263000*; 原核表达; 纯化蛋白; RING 型 E3 泛素连接酶

## Cloning, Prokaryotic Expression and Purification of *Glyma03g263000* Gene in Soybean

LIU Xin, LI Wen-chen, KANG Yue, QI Ze-zheng, YU Lu, WANG Fang

(College of Life Sciences and Agroforestry, Qiqihar University/Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Resistance Gene Engineering and Protection of Biodiversity in Cold Areas, Qiqihar 161006, China)

**Abstract:** The soybean *Glyma03g263000* gene encodes a RING-H2 zinc finger protein, its expression level is affected by soybean cyst nematode infection. In order to provide references for further clarifying its function in nematode resistance, this study performed a bioinformatic analysis and cloned CDS region of the gene from a disease-resistant soybean variety by PCR method. To obtain the purified target protein, prokaryotic expression vector pET30a-*Glyma03g263000* was constructed and transformed into *E. coli* Rosetta ( DE3 ) strain, we set different bacterial concentration, IPTG concentrations, temperatures and inducing times, and detected the target protein by SDS-PAGE electrophoresis to analyze the conditions for inducing the expression of this protein. Bioinformatic analysis showed that the gene encodes 260 amino acids with a molecular mass of 27.88 kDa and a RING conserved domain in the 102-145 amino acid region. Through the analysis of induced expression conditions, it was found that temperature was the main factor affecting protein expression. *Glyma03g263000* protein is a water-insoluble inclusion body protein, which can be obtained after treatment with reagents such as denaturation and cleavage. The results of this study laid a theoretical and material foundation for the functional analysis of *Glyma03g263000* protein.

**Keywords:** soybean; *Glyma03g263000*; prokaryotic expression; purified protein; RING-type E3 ubiquitin ligase

泛素化(ubiquitination)修饰是一种真核生物体内的蛋白质降解过程, 介导生物与非生物胁迫反应<sup>[1]</sup>。过程主要需要 3 种酶: E1 泛素激活酶、E2 泛素结合酶和 E3 泛素连接酶。在这 3 种酶中, E3 泛素连接酶在确定泛素化的特异性方面起着核心作用<sup>[2]</sup>。目前 E3 泛素连接酶根据作用机制和结构域, 分为 HECT( Homologous to the E6-AP Carboxy Terminus ) 结构域家族、RING 结构域家族、U-box 结构域家族和 CRLs( Cullin-RING ubiquitin ligases ) 结构域家族 4 个主要的亚家族<sup>[3]</sup>。其中 RING 型结构域的泛素连接酶是分布较为广泛、种类众多的一类。

大量研究表明, RING 家族蛋白广泛参与植物的生理生化以及抗逆进程。例如, RING 型 E3 泛素连接酶 DA2 调控种子大小<sup>[4]</sup>。小麦 TaRZF70 蛋白

具有 4 个 RING-H2 结构, 参与干旱响应<sup>[5]</sup>。大豆 GmAIRP1 具有典型的 RING-finger 结构域, 在植物响应高盐和干旱胁迫中发挥正调控作用<sup>[6]</sup>。RING-finger 蛋白具有 E3 泛素连接酶活性, 可以降解蛋白, 调控植物对生物胁迫的响应。近年来的研究表明许多 E3 泛素连接酶基因在植物抗病免疫过程中发挥了重要作用。水稻 RING 型 E3 泛素连接酶 XB3 与受体样激酶( RLK ) 蛋白 XA21 相互作用, 该蛋白对水稻白叶枯菌( *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ) 引起的细菌性枯萎病具有抗性<sup>[7]</sup>。拟南芥 RING 型 E3 泛素连接酶 MIEL1 负调控植物抗病性<sup>[8]</sup>。ATL( *Arabidopsis* Tóxicos en Levadura E3 Ligase ) 是 RING 家族中较为特殊的一类, 具有 RING-H2 结构, 是位于 N 端的疏水结构域和 GLD

收稿日期: 2022-12-08

基金项目: 国家自然科学基金( 31801725 ); 黑龙江省教育厅基本科研业务费科研项目( 135309361 ); 齐齐哈尔大学研究生创新科研项目。

第一作者: 刘鑫( 1999— ), 女, 硕士研究生, 主要从事植物抗病性研究。E-mail: lx19991120j3@163.com。

通讯作者: 王芳( 1981— ), 女, 博士, 副教授, 主要从事植物抗病分子机制研究。E-mail: wangfangnd@hotmail.com。

区域,在植物诱导子介导的信号转导中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。拟南芥中的一些其他 ATL 成员,包括 ATL1、ATL6、ATL9 和 ATL55/RING1,在植物免疫中发挥作用<sup>[10-13]</sup>。紫花苜蓿 ATL 基因 OsBIRF1 参与对烟草花叶病毒和 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 的防御反应<sup>[14]</sup>。然而目前尚鲜有关于大豆 RING 家族蛋白参与防御反应的相关报道。

本课题组前期研究中发现大豆 *Glyma03g-263000* 基因受大豆胞囊线虫 (Soybean Cyst Nematode, SCN, *Heterodera glycines* Ichinohe) 诱导后显著表达<sup>[15]</sup>,推断该基因可能在大豆抗 SCN 方面发挥作用。本研究以灰皮支黑豆为材料,克隆 *Glyma03g263000* 基因 CDS 区域,构建 His 标签原核表达载体并在大肠杆菌中表达,进而获得纯化蛋白,并优化 IPTG 浓度、温度及诱导时间等蛋白表达诱导条件。本研究为检测 *Glyma03g263000* 蛋白在植物体内、外的活性及其生物学功能研究奠定理论及材料基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试大豆品种为灰皮支黑豆(沈阳农业大学北方线虫研究所赠送)。

宿主菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  由本试验室保存,宿主菌 Rosetta( DE3)购自天根生化科技(北京)有限公司。

克隆载体 pGEM-T easy Vector 购自普洛麦格生物技术有限公司,原核表达载体 pET30a 购自杭州宝赛生物科技有限公司。限制性内切酶 *Hind* III (Code No. 1060S)和 *Xho* I(Code No. 1094S)、DNA Ligation Kit Ver. 2. 1 (Code No. 6022Q)均购自宝日医生物技术(北京)有限公司。琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(增强型)TIANGel Purification Kit (DP219-02)购自天根生化科技(北京)有限公司,质粒小量提取试剂盒 Plasmid Extraction Mini Kit (D100-50T) 购自北京索莱宝科技有限公司,His 标签蛋白纯化试剂盒(耐变性剂型型) His-tag Protein Purification Kit (Denaturant-resistant) 购自碧云天生物技术。低分子量蛋白 marker 购自赛文创新北京科技有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 在 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 查找 *Glyma03g263000* 基因编码的氨基酸序列,利用 ExPASy-ProtParam tool 在线软件分析 *Glyma03g263000* 蛋白质分子质量 (<http://web.expasy.org/protparam/>);采用 SMART 在线软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测蛋白保守结构域;利用 SWISS-MODEL([\[model.expasy.org/\]\(https://www.expasy.org/\)\) 分析蛋白三级结构。

1.2.2 基因 CDS 区克隆 根据 NCBI 中大豆参考序列 XM\\_003521788,使用 SnapGene 在线软件 \(\[HTTPS://WWW. SNAPGENE. COM/SNAPGENE-VIEWER\]\(https://www.snapgene.com/snapgene-viewer\)\) 设计基因特异性扩增引物\(上游引物: 5'-ccAAGCTTATGGGTGACTCTTCCGC-3', 下游引物: 5'-ccgCTCGAGGCTCCCTGATCCTGGTTG-3'\),下划线部分分别代表 \*Hind\* III、\*Xho\* I 酶切位点。以 cDNA 为模板扩增目的序列,PCR 扩增体系:模板、上下游引物各 2  \$\mu\$ L、\*Taq\* 酶 25  \$\mu\$ L、ddH<sub>2</sub>O 19  \$\mu\$ L。PCR 反应程序为:94  \$^{\circ}\$ C 预变性 2 min;94  \$^{\circ}\$ C 变性 30 s,58  \$^{\circ}\$ C 退火 30 s,72  \$^{\circ}\$ C 延伸 90 s,38 个循环;72  \$^{\circ}\$ C 延伸 10 min。PCR 产物经胶回收后克隆到 pGEM-T easy 载体中,将阳性质粒送交生工生物工程\(上海\)股份有限公司测序。](https://swiss</a></p></div><div data-bbox=)

1.2.3 原核表达载体构建 用 *Hind* III 和 *Xho* I 将测序正确的阳性克隆质粒与原核表达载体 pET30a 进行双酶切,经琼脂糖凝胶电泳后回收目的片段,将其连接到表达载体上,构建重组原核表达载体 pET30a-*Glyma03g263000*。将重组质粒转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,经菌液 PCR 以及质粒双酶切鉴定为阳性后送至生工生物(上海)股份有限公司测序,测序正确的阳性菌株保存备用。

1.2.4 重组蛋白诱导表达条件优化 将测序后的重组质粒 pET30a-*Glyma03g263000* 转化 Rosetta (DE3)感受态细胞,挑取单菌落接种于 LB 液体培养基(含有 50  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup> Kan)中,37  $^{\circ}$ C,200 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>,过夜培养菌液。按菌体体积分数 1% 将菌液接种于 50 mL LB 液体培养基(含有 50  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup> Kan),37  $^{\circ}$ C,180 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.4~0.6,加入终浓度分别为 0.1,0.2,0.5 和 1.0 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 的 IPTG,37  $^{\circ}$ C 振荡培养 4 h,进行 SDS-PAGE 电泳。同时,在菌液 OD<sub>600</sub> 分别为 0.6,0.8,1.0 时加入终浓度为 1.0 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 的 IPTG,分别在 28 和 37  $^{\circ}$ C 时诱导,在 0,2,4,6 h 取样并进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.5 蛋白可溶性鉴定 取 1 mL 诱导和未诱导的菌液,4  $^{\circ}$ C 保存备用,剩余诱导菌液于 4  $^{\circ}$ C,5 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 20 min,收集菌体沉淀。菌体用 1 $\times$  PBS 缓冲液重悬,冰上超声破碎,4  $^{\circ}$ C,5 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 15 min,收集上清与沉淀。分别进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.6 重组蛋白纯化 向培养的菌体中加入变性裂解液重悬;冰上超声破碎细胞;4  $^{\circ}$ C,10 000 g 离心 30 min,保留 20  $\mu$ L 上清,用于后续检测,收集余下上清置于冰上;取 30  $\mu$ L 混合均匀的 50% 变性凝胶,平衡凝胶 3 次后加入上清液,4  $^{\circ}$ C 缓慢摇动,使上清与凝胶充分结合;混合液装入空柱管中,打开

底部盖子使液体流出,收集穿流液;用 1 mL 变性裂解液反复洗柱 5 次;加入 1 mL 变性洗涤液洗柱 5 次;加入 500  $\mu$ L 变性洗脱液洗脱蛋白 5 次。对收集到的样品进行 SDS-PAGE 电泳分析。

2 结果与分析

2.1 Glyma03g263000 蛋白生物信息学分析

分析结果显示, *Glyma03g263000* 基因编码 260 个氨基酸,蛋白分子质量为 27.88 kDa,该蛋白包含 1 个 RING 保守结构域,位于第 102 ~ 145 个氨基酸(图 1)。*Glyma03g263000* 蛋白三级结构预测结果如图 2 所示。

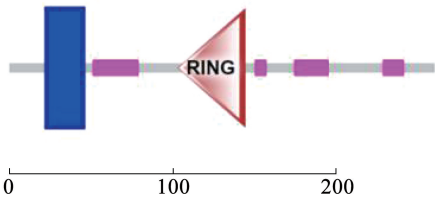
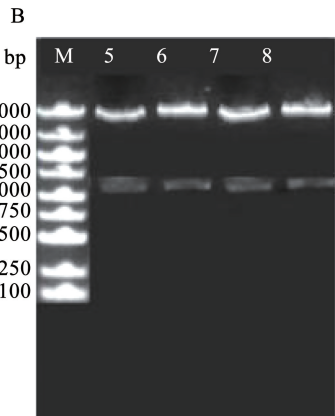
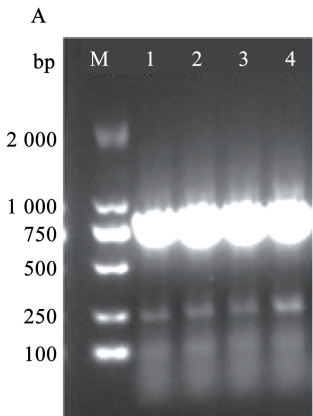


图 1 Glyma03g263000 蛋白保守结构域示意图  
Fig.1 Schematic diagram of Glyma03g263000 protein conserved domain

2.2 Glyma03g263000 基因 CDS 区克隆

以灰皮支黑豆根的 cDNA 为模板,PCR 扩增得到 1 条约 780 bp 的条带(图 3),测序结果与 NCBI 数据库检索的序列一致,表明成功扩增出 *Glyma03g263000* 基因。



注:M. Marker;1~4. 菌液 PCR;5~8. pET30a-*Glyma03g263000* 质粒双酶切。  
Note:M. Marker; 1-4. Bacterial liquid PCR; 5-8. pET30a-*Glyma03g263000* plasmid double enzymes digestion.

图 4 重组质粒菌液 PCR 及双酶切验证

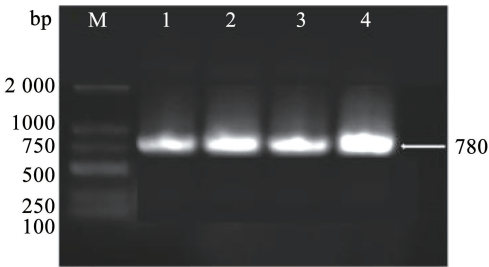
Fig.4 Bacterial solution PCR and double enzymes digestion of recombinant plasmid

2.4 重组蛋白表达条件筛选

将重组质粒 pET30a-*Glyma03g263000* 转化到 Rosetta( DE3) 菌株中,扩大培养至菌液 OD<sub>600</sub> 达到 0.6 时,分别加入终浓度为 0.1,0.2,0.5 和 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG,37  $^{\circ}$ C 诱导 4 h,分析不同 IPTG 诱导浓度对蛋白表达的影响。结果显示,不同处理均在约 34 kDa 处有目的蛋白条带,在 IPTG 浓度为 1 mmol·L<sup>-1</sup> 时



图 2 Glyma03g263000 蛋白三级结构预测  
Fig.2 Prediction of the tertiary structure of Glyma03g263000 protein



注:M. DL2000 Marker; 1~4. 目的基因 PCR 产物。  
Note:M. DL2000 DNA Marker; 1-4. PCR products of target gene.

图 3 PCR 扩增片段电泳检测

Fig.3 Electrophoresis of PCR amplified fragments

2.3 pET30a-*Glyma03g263000* 重组质粒构建

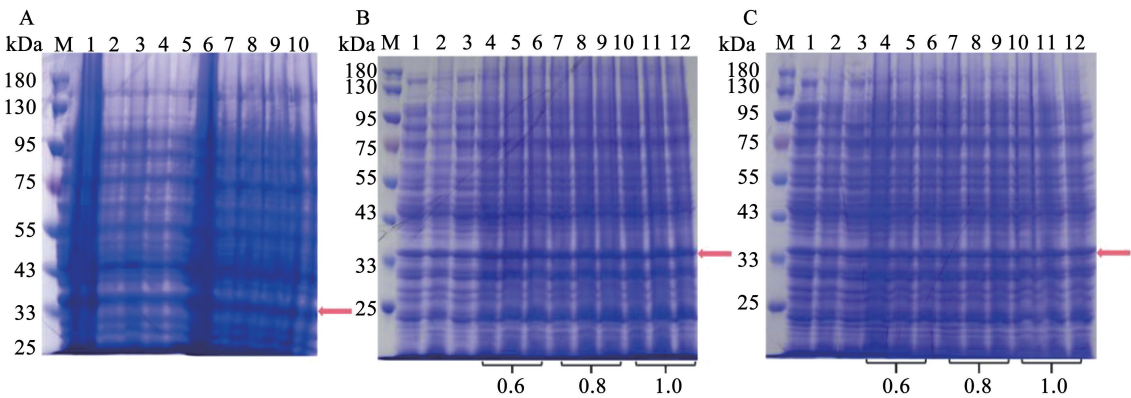
利用 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切位点将 *Glyma03g-263000* 基因连接到原核表达载体 pET30a 上,菌液 PCR(图 4A)与质粒双酶切电泳表明该基因成功与 pET30a 载体连接(图 4B)。

表达量最高(图 5A),说明此浓度更适合重组蛋白的表达。

在菌液 OD<sub>600</sub> 分别为 0.6,0.8,1.0 时加入终浓度为 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> 的 IPTG,分别在 28 和 37  $^{\circ}$ C 时诱导,在 0,2,4,6 h 取样并进行 SDS-PAGE 电泳。在 28  $^{\circ}$ C 诱导 4 h 表达量最高(图 5B)。在 37  $^{\circ}$ C,不同菌液 OD<sub>600</sub> 处理间差异不明显(图 5C)。结果说明,



28 ℃ 诱导 4 h 更适合 pET30a-Glyma03g263000 重组蛋白的表达。



注：A. 不同 IPTG 诱导浓度对蛋白表达的影响；M. 蛋白分子量 marker；1. 未诱导空载；2~5. 浓度 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG 诱导的空载；6. 未诱导重组蛋白；7~10. 浓度 0.1, 0.2, 0.5, 1 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG 诱导的重组蛋白。B. 28 ℃ 下不同 OD<sub>600</sub> 值以及诱导时间对蛋白表达的影响；1. 未诱导空载；2. 诱导空载；3. 未诱导重组蛋白；4~6. OD<sub>600</sub> 为 0.6 时诱导 2, 4, 6 h 的重组蛋白；7~9. OD<sub>600</sub> 为 0.8 时诱导 2, 4, 6 h 的重组蛋白；10~12. OD<sub>600</sub> 为 1.0 时诱导 2, 4, 6 h 的重组蛋白。C. 37 ℃ 下不同 OD<sub>600</sub> 值以及诱导时间对蛋白表达的影响, 其它序号同 B 图。

Note: A. Protein expression induced by different IPTG concentration; M. Protein molecular weight marker; 1. Empty plasmid uninduced; 2-5. Empty plasmid induced by 0.1, 0.2, 0.5, and 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG; 6. Recombinant protein uninduced; 7-10. Recombinant protein induced by 0.1, 0.2, 0.5, and 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG. B. Protein expression at 28 ℃ induced by different OD<sub>600</sub> value and times; 1. Empty plasmid uninduced; 2. Empty plasmid induced; 3. Uninduced recombinant protein; 4-6. Recombinant protein induced for 2, 4, and 6 h with OD<sub>600</sub> at 0.6; 7-9. Recombinant protein induced for 2, 4, 6 h with OD<sub>600</sub> at 0.8; 10-12. Recombinant protein induced for 2, 4, and 6 h with OD<sub>600</sub> at 1.0. C. Protein expression at 37 ℃ induced by different OD<sub>600</sub> value and times, others are the same as B.

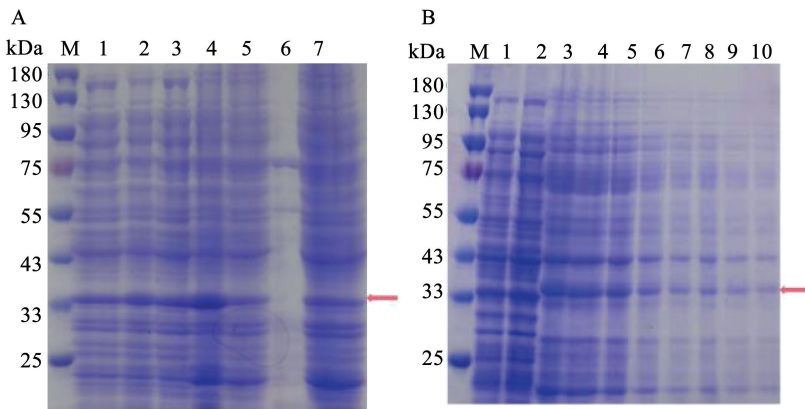
图 5 Glyma03g263000 蛋白诱导表达条件筛选

Fig. 5 Screening of the inducing expression conditions of Glyma03g263000 protein

2.5 Glyma03g263000 蛋白可溶性鉴定与蛋白纯化

对 Glyma03g263000 重组蛋白的可溶性进行鉴定显示, 上清液中无目的蛋白, 而沉淀中包含目的蛋白, 推断重组蛋白 Glyma03g263000 为不可溶的包涵体蛋白 (图 6A)。将沉淀中的蛋白纯化, His

标签的 pET30a-Glyma03g263000 重组蛋白经纯化后, 进行 SDS-PAGE 电泳检测, 在变性裂解液洗涤后非特异结合蛋白基本洗除, 在洗脱液泳道出现目的条带, 回收后可获得纯化的 Glyma03g263000 蛋白 (图 6B)。



注：A. 可溶性鉴定；M. 蛋白分子量 marker；1. 空载未诱导；2. 空载诱导；3. 重组未诱导；4. 重组诱导；5. 重组诱导的全菌液；6. 重组诱导的上清；7. 重组诱导的沉淀。B. 蛋白纯化；1. 空载；2. 重组蛋白未诱导；3. 细菌裂解液；4. 上样穿流液；5~6. 变性裂解液洗涤；7~10. 洗脱液。

Note: A. Solubility identification; M. Protein molecular weight marker; 1. Uninduced empty plasmid; 2. Induced empty plasmid; 3. Uninduced recombinant plasmid; 4. Induced recombinant plasmid; 5. Induced recombinant bacterial liquid; 6. Induced recombinant supernatant; 7. Induced recombinant sediment. B. Protein purification; 1. Empty plasmid; 2. Uninduced recombinant protein; 3. Bacterial lysate; 4. Passing through liquid of sample; 5-6. Washed with denatured lysate; 7-10. Eluent.

图 6 Glyma03g263000 蛋白的可溶性鉴定及纯化

Fig. 6 Solubility identification of Glyma03g263000 protein and purification

3 讨论

RING 结构域是 1 个 zinc finger(ZF)型蛋白质结构区域,包含 40~60 个氨基酸残基,其一致序列为 Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>(9-39)</sub>-Cys-X<sub>(1-3)</sub>-His-X<sub>(2-3)</sub>-Cys/His-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>(4-48)</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys<sup>[16]</sup>。越来越多研究表明,含 RING 结构域蛋白通常具有 E3 泛素连接酶活性,它们在其泛素化的靶蛋白中发挥作用,调节多种细胞活动,包括生长素信号传导、防御信号传导、多种非生物胁迫反应等<sup>[17-18]</sup>。其中,RING-H2 是 RING-ZF 中的典型蛋白,到目前为止,关于植物中含有 RING-H2 结构域的 ATL 蛋白功能研究主要包括病原物防御和植物的生长发育<sup>[19-20]</sup>。

真核生物和原核生物表达系统均可用于表达融合蛋白。无论使用哪种表达系统,对于载体和宿主菌的选择都至关重要。由于原核表达系统因为具有试验周期短、蛋白得率高的特点,被广泛应用<sup>[21]</sup>。其中,在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达蛋白是获得目的蛋白最简便快速的方法,且成本较低。在实际试验中,通常根据不同的需要,选择不同的表达菌株。在大肠杆菌中,由于 tRNA 的种类和数量的不同会造成对某些密码子的偏爱性。被频繁使用的为偏爱密码子,而不被经常使用或利用率低的为稀有密码子<sup>[22-23]</sup>。*Glyma03g263000* 基因稀有密码子较多,偏爱密码子较少。鉴于此,本研究选择 Rosetta(DE3)菌株表达目的蛋白,该菌株补充大肠杆菌缺乏的 6 种稀有密码子(AUA、AGG、AGA、CUA、CCC、GGA)对应的 tRNA,提高真核基因在原核系统中的表达水平。

本研究将大豆 *Glyma03g263000* 基因构建到原核表达载体 pET30a 上,该载体在 MCS 区 C 端和 N 端各包含 6 个连续的 His 标签。预计表达产物 N 端含 pET30a 载体序列编码表达的 59 个氨基酸,C 端含有 *Glyma03g263000* 序列编码表达的 260 个氨基酸,分子量大小为 34.37 kDa,本研究结果显示 *Glyma03g263000* 目的条带分子量约为 34 kDa,表达产物与理论值相符。IPTG 诱导条件优化结果表明,1 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG 诱导下蛋白表达量最高,但与其他诱导浓度下的表达量相差不多,与前人的研究结果相似<sup>[24]</sup>。不同 *OO*<sub>600</sub> 值对于蛋白表达的影响不大。*Glyma03g263000* 蛋白的表达和形成快慢受温度影响较大,在 28℃ 诱导下表达量较高。蛋白可溶性鉴定结果表明该蛋白以包涵体形式存在,可能由于重组蛋白是大肠杆菌的异源蛋白,且蛋白诱导表达太快,重组蛋白未能及时折叠而形成蛋白颗粒<sup>[25]</sup>。

本研究对含 His 标签的 pET30a-Glyma03g-

263000 重组蛋白进行纯化,在变性裂解液洗涤后非特异结合蛋白基本洗除,在洗脱液泳道出现纯化蛋白目的条带。绝大多数 RING 和 U-box 结构域纯化蛋白经体外泛素化检测,具有 E3 活性<sup>[26]</sup>。本研究通过原核表达获得纯化蛋白,这将有助于进一步了解该蛋白的基本特性,为体外泛素化研究试验奠定基础。同时研究结果为 *Glyma03g263000* 蛋白酶学功能鉴定及蛋白体外互作等研究奠定了基础。

4 结论

本研究利用 RT-PCR 的方法从大豆中克隆了 *Glyma03g263000* 的完整编码框。该基因编码 260 个氨基酸,蛋白分子质量为 27.88 kDa,该蛋白在第 102~145 个氨基酸包含 1 个 RING 保守结构域。成功构建 pET30a-*Glyma03g263000* 融合表达载体,其在大肠杆菌中高效表达及纯化的最佳诱导条件为: IPTG 添加量为 1 mmol·L<sup>-1</sup>,28℃ 诱导 4 h。结果为研究 *Glyma03g263000* 蛋白在植物体内外的活性及生物功能奠定理论及材料基础。

参考文献

[1] LANGIN G, GOUGUET P, ÜSTÜN S. Microbial effector proteins- a journey through the proteolytic landscape [J]. Trends Microbiology, 2020, 28(7): 523-535.

[2] SERRANO I, CAMPOS L, RIVAS S. Roles of E3 ubiquitin-ligases in nuclear protein homeostasis during plant stress responses [J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 139.

[3] CRAIG A, EWAN R, MESMAR S, et al. E3 ubiquitin ligases and plant innate immunity [J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(4): 1123-1132.

[4] XIA T, LI N, DUMENIL J, et al. The ubiquitin receptor DA1 interacts with the E3 ubiquitin ligase DA2 to regulate seed and organ size in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2013, 25(9): 3347-3359.

[5] KAM J, GRESSHOFF P, SHORTER R, et al. Expression analysis of RING zinc finger genes from *Triticum aestivum* and identification of *TaRZF70* that contains four RING-H2 domains and differentially responds to water deficit between leaf and root [J]. Plant Science, 2007, 173(6): 650-659.

[6] 张雅文, 沈祥娟, 张静, 等. 大豆 E3 泛素连接酶基因 *GmAIRP1* 的同源克隆及在烟草中的功能鉴定 [J]. 植物遗传资源学报, 2019, 20(4): 1011-1019. (ZHANG Y W, SHEN X J, ZHANG J, et al. Homologous cloning of soybean E3 ubiquitin ligase gene *GmAIRP1* and its functional identification in tobacco [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(4): 1011-1019.)

[7] WANG Y, PI L, CHEN X, et al. Rice XA21 binding protein 3 is a ubiquitin ligase required for full Xa21-mediated disease resistance [J]. The Plant Cell, 2006, 18(12): 3635-3646.

[8] MARINO D, FROIDURE S, CANONNE J, et al. *Arabidopsis* ubiquitin ligase MIEL1 mediates degradation of the transcription factor MYB30 weakening plant defense [J]. Nature

Communications, 2019, 10(1): 1475.

[9] GUZMÁN P. The prolific ATL family of RING -H2 ubiquitin ligases [J]. Plant Signaling & Behavior, 2012, 7(8): 1014-1021.

[10] SERRANO I, GU Y, QI D, et al. The *Arabidopsis* EDR1 protein kinase negatively regulates the ATL1 E3 ubiquitin ligase to suppress cell death[J]. The Plant Cell, 2014, 26(11): 4532-4546.

[11] MAEKAWA S, SATO T, ASADA Y, et al. The *Arabidopsis* ubiquitin ligases ATL31 and ATL6 control the defense response as well as the carbon/nitrogen response [J]. Plant Molecular Biology, 2012, 79(3): 217-227.

[12] DENG F, GUO T, LEFEBVRE M, et al. Expression and regulation of ATL9, an E3 ubiquitin ligase involved in plant defense[J]. PLoS One, 2017, 12(11): e0188458.

[13] LIN S S, MARTIN R, MONGRAND S, et al. RING E3 ligase localizes to plasma membrane lipid rafts to trigger FB1-induced programmed cell death in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 2008, 56(4): 550-561.

[14] LIU H Z, ZHANG H J, YANG Y, et al. Functional analysis reveals pleiotropic effects of rice RING-H2 finger protein gene *OsBIRF1* on regulation of growth and defense responses against abiotic and biotic stresses[J]. Plant Molecular Biology, 2008, 68(1-2):17-30.

[15] LI S, CHEN Y, ZHU X, et al. The transcriptomic changes of Huipizhi Heidou ( *Glycine max* ), a nematode-resistant black soybean during *Heterodera glycines* race 3 infection[J]. Journal of Plant Physiology, 2018, 220: 96-104.

[16] STONE S L, HAUKSÐÓTTIR H, TROY A, et al. Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2005, 137(1): 13-30.

[17] YANG L, MIAO M J, LYU H J, et al. Genome-wide identification, evolution, and expression analysis of RING finger gene family in *Solanum lycopersicum* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(19): 4864.

[18] SUN J, SUN Y, AHMED R I, et al. Research progress on plant RING-finger proteins[J]. Genes, 2019, 10(12):973.

[19] ZHONG C, REN Y, Q I Y, et al. PAMP-responsive ATL gene *StRFP1* and its orthologue *NbATL60* positively regulate *Phytophthora infestans* resistance in potato and *Nicotiana benthamiana*[J]. Plant Science, 2018, 270: 47-57.

[20] RAMAIAH M, JAIN A, YUGANDHAR P, et al. ATL8, a RING E3 ligase, modulates root growth and phosphate homeostasis in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2022, 179: 90-99.

[21] LIU D, QIU C Y, LIU X M, et al. Cloning and prokaryotic expression of carotenoid cleavage dioxygenases from mulberry ( *Morus notabilis* ) [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2022: 4811144.

[22] CHEN H Q, XU Z N, XU N Z, et al. High-level expression of human beta-defensin-2 gene with rare codons in *E. coli* cell-free system[J]. Protein & Peptide Letters, 2006, 13(2): 155-161.

[23] CHUMPOLKULWONG N, SAKAMOTO K, HAYASHI A, et al. Translation of ‘rare’ codons in a cell-free protein synthesis system from *Escherichia coli* [J]. Journal of Structural and Functional Genomics, 2006, 7(1): 31-36.

[24] 廖小森, 何其光, 刘耀, 等. 橡胶树炭疽菌 *CsPbs2* 基因的原核表达分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(7): 2126-2132. (LIAO X M, HE Q G, LIU Y, et al. Prokaryotic expression analysis of *CsPbs2* gene from *Colletotrichum siamense* [J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(7): 2126-2132. )

[25] 许雨晨, 吕哲, 陈保善, 等. 稻瘟病菌 *Dam1* 基因的克隆、原核表达及纯化[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(9): 2385-2389. (XU Y C, LYU Z, CHE B S, et al. Cloning, prokaryotic expression and purification of *Dam1* gene from *Magnaporthe oryzae* [J]. Genomics and Applied Biology, 2016, 35(9): 2385-2389. )

[26] ZHANG C Y, SONG L, CHOUDHARY M K, et al. Genome-wide analysis of genes encoding core components of the ubiquitin system in soybean ( *Glycine max* ) reveals a potential role for ubiquitination in host immunity against soybean cyst nematode [J]. BMC Plant Biology, 2018, 18: 149.

欢迎订阅 2023 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农业科学院主管、主办的大豆专业性学术期刊,被国内外多家重要数据库收录的核心期刊。主要刊登有关大豆遗传育种、品种资源、生理生态、耕作栽培、植物保护、营养肥料、生物技术、食品加工、药用功能及工业用途等方面的学术论文、科研报告、研究简报、国内外研究述评、学术活动简讯和新品种介绍等。

《大豆科学》为双月刊,16 开本,国内外公开发行。国内每期定价:40.00 元,全年 240.00 元,邮发代号:14-95。国外每期定价:40.00 美元(含邮资),全年 240.00 美元,国外邮发代号:Q5587。全国各地邮局均可订阅。

地 址: 哈尔滨市松北区创新三路 800 号

邮 编: 150023

电 话: 0451-51522862

网 址: <http://ddkx.haasep.cn>

E-mail: [soybeanscience@vip.163.com](mailto:soybeanscience@vip.163.com)

