

羽衣甘蓝ARC1 蛋白的原核表达、纯化及泛素连接酶活性分析

蓝兴国, 李晓屿, 杨佳, 李玉花

(东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040)

Prokaryotic Expression, Purification and in Vitro Ubiquitination Assay of *BoARC1* from Ornamental Kale

LAN Xing-Guo, LI Xiao-Yu, YANG Jia, LI Yu-Hua

(College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

- 摘要
- 参考文献
- 相关文章

Download: [PDF \(403KB\)](#) [HTML \(1KB\)](#) Export: [BibTeX](#) or [EndNote \(RIS\)](#) [Supporting Info](#)

摘要 ARC1 是植物特有的一类含有U-box/ARM 结构域的蛋白, 在芸薹属植物自交不亲和 (self-incompatibility, SI) 信号转导中起着正向调控因子的作用。将羽衣甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *acephala*) BoARC1 编码区的序列连接到原核表达载体pET-14b 上, 通过酶切鉴定和测序分析, 构建pET-14b-BoARC1 表达质粒; 将获得的阳性表达质粒转化到大肠杆菌表达菌株BL21 (DE3) pLysS 中, 利用IPTG 进行诱导表达。SDS-PAGE 结果显示, 在分子量69 kD 处有BoARC1 蛋白特异性地诱导表达; 利用Ni²⁺-NTA 树脂通过亲和层析的方法获得BoARC1 融合蛋白。在泛素激活酶 (E1)、泛素结合酶UBC7 (E2) 和泛素体外泛素化反应后, 通过免疫印迹的方法检测, 显示出BoARC1 融合蛋白能够将底物进行多泛素化修饰; 当U-box 中保守位点第323 位Pro 突变为Ala 或其他泛素化组分缺少时, 底物不能被泛素化修饰。

关键词: 羽衣甘蓝 自交不亲和性 ARC1 原核表达 泛素连接酶

Abstract: ARC1, which belonging to the plant-specific U-box/ARM protein, acts as a positive mediator of self-incompatibility signaling in Brassica. Here, the BoARC1 coding region sequence was amplified and inserted into the prokaryotic expression vector pET-14b. The pET-14b-BoARC1 constructs were confirmed by the double restriction enzyme and sequencing analysis. The *E. coli* BL21 (DE3) pLysS cell was transformed pET-14b-BoARC1. SDS-PAGE results showed that the recombinant BoARC1 fusion protein about 69 kD was induced by IPTG and purification by affinity chromatography using Ni²⁺-NTA resin. In vitro ubiquitination assays were performed using a yeast E1 enzyme, a E2 enzyme His6-UBC7, ubiquitin and His6-BoARC1. Western blot results showed that His6-BoARC1 mediated the polyubiquitination of proteins with anti-ubiquitin antibodies. Further, a point mutation of U-box domain at amino acid position 323 substituting Pro for Ala or omission of any of the components resulted in a loss of protein ubiquitination.

Keywords: *Brassica oleracea* var. *acephala*, self-incompatibility, ARC1, prokaryotic expression, ubiquitin ligase

E3

引用本文:

蓝兴国, 李晓屿, 杨佳等. 羽衣甘蓝ARC1 蛋白的原核表达、纯化及泛素连接酶活性分析[J] 园艺学报, 2013, V40(12): 2472-2478

蓝Xing-Guo, LI Xiao-Yu, YANG Jia etc. Prokaryotic Expression, Purification and in Vitro Ubiquitination Assay of *BoARC1* from Ornamental Kale[J] ACTA HORTICULTURAE SINICA, 2013, V40(12): 2472-2478

链接本文:

<http://www.ahs.ac.cn/CN/> 或 <http://www.ahs.ac.cn/CN/Y2013/V40/I12/2472>

没有本文参考文献

[1] 李慧^{1,2,*}, 李刚波^{1,3,*}, 丛郁⁴, 常有宏^{1,2,**}, 蔺经¹, 盛宝龙¹. 杜梨类钙调磷酸酶B亚基蛋白基因*PbCBL2*的克隆和功能初探[J]. 园艺学报, 2013, 40(8): 1445-1455

Service

- ▶ 把本文推荐给朋友
- ▶ 加入我的书架
- ▶ 加入引用管理器
- ▶ Email Alert
- ▶ RSS

作者相关文章

- ▶ 蓝兴国
- ▶ 李晓屿
- ▶ 杨佳
- ▶ 李玉花

- [2] 杨国峰, 沈文涛, 言 普, 黎小琪, 周 鹏. 原核表达的PRSV HC-Pro 基因同源dsRNA 诱导番木瓜抗性的研究[J]. 园艺学报, 2013,40(7): 1269-1277
- [3] 邢爱佳¹, 马小军^{2,3,*}, 莫长明^{1,3}, 潘丽梅^{3,4}, 韦鹏霄¹, 唐春风^{3,4}, 唐 其^{3,4,*}. 罗汉果葡萄糖基转移酶基因的克隆及原核表达[J]. 园艺学报, 2013,40(6): 1
- [4] 施 艳, 王振跃, 袁 媛, 刘珊珊, 孙 虎, 古勤生. 瓜类褪绿黄化病毒p22 基因在大肠杆菌中的表达及抗血清的制备[J]. 园艺学报, 2013,40(4): 762-
- [5] 陈 秀, 饶雪琴, 阮小蕾, 刘福秀, 李华平. 香蕉线条病毒衣壳蛋白功能域基因的原核表达及抗血清制备[J]. 园艺学报, 2013,40(12): 2401-2408
- [6] 许俊强, 孙梓健, 宋 明, 汤青林, 王志敏, 王小佳. 甘蓝花粉管钙感应蛋白CaM 与SRK 相互作用研究[J]. 园艺学报, 2013,40(12): 2429-2440
- [7] 陈新, 梁丽松, 马庆华, 赵天田, 刘庆忠, 王贵禧. 平榛脱水素基因的克隆与表达分析[J]. 园艺学报, 2013,40(1): 32-40
- [8] 赵芹, 李华平, 谢大森, 何晓明, 张曙光, 罗少波. 番木瓜环斑病毒外壳蛋白基因原核表达蛋白的抗血清制备及其检测应用[J]. 园艺学报, 2012,39(8): 1457-
- [9] 董银行, 郭家选. 葡萄果实β-葡萄糖苷酶基因克隆、原核表达及活性检测[J]. 园艺学报, 2012,39(6): 1073-1080