

· 技术方法 ·

## 植物蛋白SUMO化修饰检测方法

曲高平\*, 金京波

中国科学院植物研究所, 植物分子生理学重点实验室, 北京 100093

**摘要** SUMO化是一种重要的蛋白质翻译后修饰, 对植物正常生长发育不可或缺。到目前为止已筛选到上千个可能的SUMO底物, 但由于SUMO化修饰水平普遍很低, 其生物学功能研究相对较少。该文详细描述了检测蛋白SUMO化修饰的常用方法, 包括体外和体内SUMO化实验, 以及SUMO化修饰位点的检测方法, 旨在为深入研究植物蛋白SUMO化修饰提供技术支持。

**关键词** 拟南芥, SUMO, SUMO化修饰, 检测方法

曲高平, 金京波 (2020). 植物蛋白SUMO化修饰检测方法. 植物学报 55, 83–89.

SUMO (small ubiquitin-like modifier)是一类约11 kDa的多肽, 具有与泛素(ubiquitin)类似的三维结构。前体SUMO (preSUMO)需要在SUMO蛋白酶(SUMO protease)的作用下, 切割C-末端序列, 暴露出保守的甘氨酸-甘氨酸基序(Gly-Gly, GG), 形成成熟的SUMO分子。随后, 在SUMO激活酶E1 (SUMO activating enzyme, SAE)、SUMO结合酶E2 (SUMO conjugating enzyme, SCE)以及SUMO连接酶E3 (SUMO E3 ligase)的依次作用下共价结合到底物蛋白的赖氨酸(K, Lys)上, 完成SUMO化修饰。由于SUMO结合酶E2可直接与底物蛋白互作, 体外SUMO化反应通常不需要添加E3连接酶, 但SUMO连接酶E3在体内可提高SUMO化修饰的效率和特异性(Bernier-Villamor et al., 2002)。SUMO化修饰过程可逆, 在SUMO蛋白酶的作用下SUMO可从底物上切割下来。

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)有8个SUMO编码基因, 即SUM1 (SUMO1)–SUM8, 其中SUM4、SUM6、SUM7和SUM8转录水平很低, 可能在特异发育阶段或组织中起作用。SUMO1和SUMO2的氨基酸序列相似性高达93%, sum1-1/sum2-1双突变体胚胎发育畸形, 不能结实(Saracco et al., 2007)。SUMO3和SUMO5与SUMO1的氨基酸序列相似性仅为50%, 并且目前SUMO3和SUMO5的功能研究相对较少

(Saleh et al., 2015)。拟南芥SUMO激活酶E1含有大、小两个亚基, 小亚基有2个编码基因(即SAE1a和SAE1b), 大亚基只有1个编码基因SAE2; SUMO结合酶E2只有1个编码基因SCE1; SUMO连接酶E3有2个编码基因, 即SIZ1 (SAP (scaffold attachment factor, acinus, PIAS), and MIZ1 (Mx2-interacting zinc finger))和MMS21 (methyl methanesulfonate-sensitivity protein 21)。其中, 绝大部分底物的SUMO化修饰由SIZ1介导(Rytz et al., 2018)。SUMO化修饰过程中, 任何关键酶的缺失均会导致胚胎致死, 或者植株矮小和结实率低等异常发育表型, 说明SUMO化修饰在调控植物正常生长发育过程中起着重要作用(Catala et al., 2007; Saracco et al., 2007; 徐庞连等, 2008; Ishida et al., 2012; Rytz et al., 2018)。此外, 还有2个催化SUMO链形成的酶PIAL1 (protein inhibitor of activated stat like 1)和PIAL2, 称为E4连接酶(Tomanov et al., 2014)。它们与SIZ1和MMS21都含有保守的SP (SIZ-PIAS)-RING结构域。拟南芥含有多个SUMO蛋白酶, 分别为ESD4 (early in short days 4) (Murtas et al., 2003)、ELS1 (ESD4-like SUMO protease 1) (Hermkes et al., 2011)、OTS1 (overly tolerant to salt 1)、OTS2 (Conti et al., 2008)、ASP1 (*Arabidopsis* SUMO protease 1)/SPF1 (SU-

收稿日期: 2019-10-30; 接受日期: 2019-12-11

基金项目: 国际自然科学基金(No.31670186)

\* 通讯作者。E-mail: qu20140701@ibcas.ac.cn

MO protease related to fertility 1)及SPF2 (Kong et al., 2017; Liu et al., 2017)。目前, 通常认为SUMO蛋白酶具有底物特异性, 在调控底物SUMO化修饰水平方面发挥重要作用(Yates et al., 2016)。

SUMO1和SUMO2的N端含有多个赖氨酸, 可形成SUMO链(polySUMOylation)。polySUMOylation或多位点SUMO化修饰(multiSUMOylation or multiple monoSUMOylation)可以招募含有SIM基序(SUMO interacting motif)的蛋白, 介导蛋白-蛋白的非共价结合。SUMO化修饰除了影响蛋白-蛋白互作外, 还调控底物蛋白的亚细胞定位、活性或稳定性等。截至目前, 通过酵母双杂交(yeast two-hybrid)和质谱分析(mass spectrometry)等方法, 已鉴定出上千个可能的SUMO底物(Elrouby and Coupland, 2010; Miller et al., 2010; Rytz et al., 2018)。但由于体内SUMO化修饰水平很低, 且处于动态变化中(Sadanandom et al., 2015; Lin et al., 2016), 鉴定特定底物的SUMO化修饰较为困难。本文仅介绍检测植物蛋白SUMO化修饰的常用方法。若想了解更多关于SUMO化修饰的研究方法, 可参阅文献Rodriguez (2016)。

## 1 实验材料

### 1.1 菌株

所用菌株为大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达菌株BL21 (DE3)和根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)侵染菌株GV3101。

### 1.2 载体

(1) 体外SUMO反应: *pGEX-5X-protein X-Myc* (GST-protein X-Myc)、*pRQ30-SAE1b-SAE2* (His-SUMO E1) (Colby et al., 2006)、*pRSET-A-SCE1* (His-SUMO E2)、*pRSET-A-SUMO1<sup>GG</sup>* (His-SUMO1<sup>GG</sup>)和*pRSET-A-SUMO1<sup>AA</sup>* (His-SUMO1<sup>AA</sup>)。

(2) 本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)中检测SUMO化修饰: *pBI121-GFP-protein X*、*pBI121-FLAG-SUMO1<sup>GG</sup>*和*pBI121-FLAG-SUMO1<sup>AA</sup>*。

(3) 原生质体中检测SUMO化修饰: *326-FLAG-SUMO1<sup>GG</sup>*和*326-FLAG-SUMO1<sup>AA</sup>*。

(4) SUMO化修饰位点的检测: *pBI121-Myc-protein X*、*pBI121-Myc-protein X<sup>K1R</sup>*、*pBI121-Myc-protein*

*X<sup>K2R</sup>*、*pBI121-Myc-protein X<sup>2KR</sup>*、*pBI121-FLAG-SUMO1<sup>GG</sup>*和*pBI121-FLAG-SUMO1<sup>AA</sup>*。

### 1.3 植物材料

实验材料为本氏烟草(*Nicotiana benthamiana* D.)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)。

## 2 试剂

试剂包括Tris-Cl (pH7.5)、HEPES (pH7.5)、MES (pH5.7)、EDTA (pH8.0)、KCl、NaCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgCl<sub>2</sub>、ATP、DTT、Triton X-100、Tween 20、Glycerol、PMSF、NEM (N-ethylmaleimide)、乙酰丁香酮、Protease Inhibitor Cocktail (Roche)和MG132 (Sigma或Abcam)。

## 3 试剂配方

- 1×PBS缓冲液: 2.7 mmol·L<sup>-1</sup> KCl、140 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、10 mmol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.8 mmol·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>和1 mmol·L<sup>-1</sup> PMSF (现用现加)。
- 10×SUMO反应缓冲液: 200 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES (pH7.5)、50 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>和20 mmol·L<sup>-1</sup> ATP。
- 蛋白提取缓冲液: 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-Cl (pH7.5)、150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA (pH8.0)、1 mmol·L<sup>-1</sup> DTT、1% Triton X-100、10% Glycerol、1× Protease Inhibitor Cocktail (现用现加)、50 μmol·L<sup>-1</sup> MG132 (现用现加)和20 mmol·L<sup>-1</sup> NEM (现用现加)。
- 侵染缓冲液: 10 mmol·L<sup>-1</sup> MES (pH5.7)和10 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>。

## 4 仪器设备

仪器设备有离心机(普通、4°C、水平)、电泳仪、转膜仪、化学发光成像仪、分光光度计、PCR仪和超声波细胞破碎仪。

## 5 实验程序

### 5.1 体外SUMO化实验

体外SUMO化实验是一种快速地检测体系, 广泛应用于底物SUMO化修饰检测。

5.1.1 蛋白表达

挑选单克隆, 摇菌, 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导SUMO相关蛋白表达, 具体诱导条件见表1。

表1 SUMO反应相关蛋白的诱导条件

Table 1 Expression of SUMO reaction related proteins

Proteins	IPTG concentration (mmol·L <sup>-1</sup> )	Induction time
His-SUMO E1	1	16–20 h (16°C)
His-SUMO E2	1	3–5 h (28°C)
His-SUMO1 <sup>GG</sup>	1	16–20 h (16°C)
His-SUMO1 <sup>AA</sup>	1	16–20 h (16°C)
GST-protein X-Myc	1	3–5 h (28°C)

为提高western blot检测特异性, 可在目的条带的C端加1个6×Myc标签。IPTG: 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷

To enhance the western blot detection, 6×Myc tag was fused to the C-terminus of the target protein. IPTG: Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside

5.1.2 蛋白纯化

- (1) 4°C, 2 000 ×g离心10分钟, 集菌;
- (2) 弃上清, 加入30 mL预冷的1× PBS缓冲液重悬菌体;
- (3) 5"–5", 5分钟, 超声破碎菌体;
- (4) 将菌液转移至50 mL高速离心管中, 4°C条件下, 13 000 ×g离心10分钟;
- (5) 将上清转移到新的50 mL离心管中, 加入100 μL PBS缓冲液平衡好的beads, 4°C上下颠倒孵育过夜结合;
- (6) 4°C, 200 ×g离心2分钟, 弃上清, 把beads转移到1.5 mL离心管中;
- (7) 用预冷的PBS缓冲液上下颠倒清洗beads 3–4次, 每次3–5分钟;
- (8) 4°C, 200 ×g离心2分钟, 吸弃上清;
- (9) 加入150 μL含有200 mmol·L<sup>-1</sup>咪唑的PBS洗脱液, 冰上静置20分钟, 期间不断重悬beads;
- (10) 4°C, 200 ×g离心2分钟, 将蛋白洗脱液转移到新的1.5 mL离心管中, 备用;
- (11) 目的蛋白用Glutathione beads按相似方法纯化。

5.1.3 体外SUMO化反应

- (1) 每个反应按5 μL 10×SUMO反应缓冲液、100 ng His-SUMO E1 (AtSAE1b+AtSAE2)、100 ng His-SUMO E2 (AtSCE1)、8 μg His-SUMO1<sup>GG</sup>和1 μg

GST-protein X-Myc底物构建混合体系(His-SUMO1<sup>AA</sup>作为阴性对照, 或分别缺SUMO E1、SUMO E2等成分作阴性对照), 加ddH<sub>2</sub>O补足至50 μL, 混匀;  
(2) 30°C反应3小时。

5.1.4 Western blot检测

为提高western blot检测特异性, 目的蛋白需用Glutathione beads进一步纯化。Western blot, 标签抗体仅在实验组(His-SUMO1<sup>GG</sup>)检测到目的条带上方间隔×15 kDa (His-SUMO1约15 kDa)处有1条或多条条带, 且这些条带能被anti-SUMO1抗体识别, 说明目的蛋白体外能被SUMO化修饰, 可能是SUMO底物。如图1所示, 只有当同时含有His-SUMO E1、His-SUMO E2和His-SUMO1<sup>GG</sup>时, 用anti-Myc抗体在GST-protein X-Myc主带上方检测到特异的修饰条带, 并且该条带能被anti-SUMO1抗体识别, 说明GST-protein X-Myc体外能被SUMO化修饰。

5.2 体内SUMO化实验

体外SUMO化实验具有一定的假阳性, 故还需进行体内验证。常用的体内验证方法主要有利用烟草、原生质体和转基因材料等进行体内SUMO化实验。

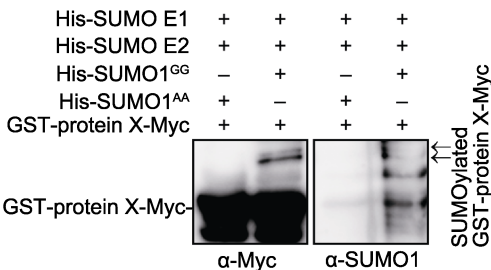


图1 Protein X体外SUMO化修饰

GST-protein X-Myc分别与His-SUMO E1、His-SUMO E2和His-SUMO1<sup>GG</sup> (His-SUMO1<sup>AA</sup>作为阴性对照), 进行体外SUMO化反应。反应后用Glutathione beads进一步纯化。Western blot, 分别用anti-Myc和anti-SUMO1抗体进行检测。箭头指示SUMO化修饰的GST-protein X-Myc。

Figure 1 Protein X can be SUMOylated *in vitro*

GST-protein X-Myc was incubated with His-SUMO E1, His-SUMO E2 and His-SUMO1<sup>GG</sup> (His-SUMO1<sup>AA</sup> was used as a negative control) at 30°C for 3 h. After reaction, GST-protein X-Myc was purified with Glutathione beads and detected with anti-Myc and anti-SUMO1 antibodies. Arrows represent SUMOylated GST-protein X-Myc.

### 5.2.1 烟草中检测SUMO化修饰方法

(1) 农杆菌转化 将含有p19、目的基因*GFP-protein X*、*FLAG-SUMO1<sup>GG</sup>*或*FLAG-SUMO1<sup>AA</sup>*的真核表达载体各1  $\mu\text{g}$ 加入到农杆菌感受态细胞GV3101中, 冰上静置孵育30分钟。液氮低温处理5分钟, 37°C热击5分钟, 之后冰上静置2分钟。加至800  $\mu\text{L}$  LB液体培养基中, 28°C活化培养3–5小时。将菌液均匀涂布在Ka<sup>+</sup>Rif<sup>r</sup>抗性的LB固体培养基上, 28°C倒置培养2天。

(2) 摇菌 挑取单克隆到2 mL Ka<sup>+</sup>Rif<sup>r</sup>抗性的LB液体培养基中, 28°C过夜振荡培养。将过夜培养的菌液转接至15 mL Ka<sup>+</sup>Rif<sup>r</sup>抗性的LB液体培养基中, 28°C振荡培养6–8小时。室温条件下, 2 000  $\times g$ 离心10分钟, 弃上清。用5 mL侵染缓冲液重悬菌体, 并用分光光度计检测菌液浓度, 记录OD<sub>600</sub>值。

(3) 注射烟草 将含有目的基因的菌液分别与含有*FLAG-SUMO1<sup>GG</sup>*或*FLAG-SUMO1<sup>AA</sup>*的菌液混合, 加入p19菌液(促进基因表达), 使每种菌液的终浓度为OD<sub>600</sub>=0.5–1.0。按1:1 000的比例加入200 mmol·L<sup>-1</sup>乙酰丁香酮, 28°C振荡培养3小时, 活化菌株。从烟草叶片背面注射菌液(侵染烟草), 3天后取样。液氮预冷磨样, 取500  $\mu\text{L}$ 粉末加入到1.5 mL离心管中。

(4) 免疫沉淀(immunoprecipitation, IP) 加入1 mL预冷的蛋白提取缓冲液, 混匀。2"–3", 30秒, 超声破碎细胞。随后, 4°C上下颠倒孵育30分钟, 使细胞充分裂解。4°C, 16 000  $\times g$ 离心30分钟, 将上清转移至新的预冷的1.5 mL离心管中。取60  $\mu\text{L}$ 转移到新的1.5 mL离心管中作为Input, 剩余液体加入20  $\mu\text{L}$ 蛋白提取缓冲液平衡好的anti-GFP antibody-conjugated beads, 4°C条件下, 上下颠倒孵育结合3小时。用蛋白提取缓冲液上下颠倒清洗beads 3–4次, 每次3–5分钟。4°C条件下, 200  $\times g$ 离心1分钟, 弃上清。

(5) Western blot检测 用30  $\mu\text{L}$  2 $\times$ SDS上样缓冲液重悬beads, 100°C煮沸5分钟, 瞬时离心, 混匀。1 000  $\times g$ 离心3分钟, 上样。Western blot, anti-FLAG抗体仅在实验组(FLAG-SUMO1<sup>GG</sup>)检测到目的条带上, 间隔 $\times 15$  kDa (FLAG-SUMO1大约15 kDa)处有1条或多条条带, 说明目的蛋白在烟草中能够被SUMO化修饰。如图2所示, 只有与FLAG-SUMO1<sup>GG</sup>共表达时, anti-FLAG抗体才能够检测到SUMO化修饰的GFP-protein X, 说明GFP-protein X是SUMO底物。

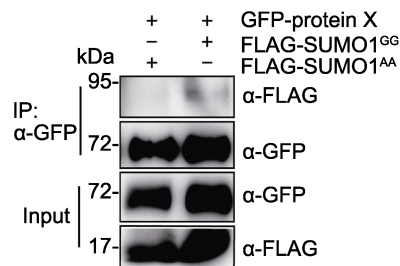


图2 烟草中检测GFP-protein X的SUMO化修饰

GFP-protein X分别与FLAG-SUMO1<sup>GG</sup>或FLAG-SUMO1<sup>AA</sup>在烟草叶片中共表达, IP (anti-GFP)产物分别用anti-GFP和anti-FLAG抗体检测。

Figure 2 SUMOylation of GFP-protein X in *Nicotiana benthamiana*

GFP-protein X was transiently co-expressed with FLAG-SUMO1<sup>GG</sup> or FLAG-SUMO1<sup>AA</sup> in *Nicotiana benthamiana* leaves. GFP-protein X was immunoprecipitated with anti-GFP antibody, and IP products were detected with anti-FLAG antibody.

### 5.2.2 拟南芥原生质体中检测SUMO化修饰方法

拟南芥原生质体中检测SUMO化修饰与烟草相似。

(1) 原生质体转化 将含有目的基因和*FLAG-SUMO1<sup>GG</sup>*或*FLAG-SUMO1<sup>AA</sup>*的质粒共转化拟南芥原生质体, 具体方法参照文献Yoo等(2007)。光下培养12–24小时。室温, 100  $\times g$ 离心5分钟, 吸弃上清, 原生质体沉淀置于冰上。

(2) 免疫沉淀 具体操作同5.2.1节烟草中检测SUMO化修饰方法步骤(4)。

(3) Western blot检测 用30  $\mu\text{L}$  2 $\times$ SDS上样缓冲液重悬beads, 100°C煮沸5分钟, 瞬时离心, 混匀。1 000  $\times g$ 离心3分钟, 上样。Western blot, anti-FLAG抗体仅在实验组(FLAG-SUMO1<sup>GG</sup>)检测到目的条带上, 间隔 $\times 15$  kDa处有1条或多条条带, 说明目的蛋白能被SUMO化修饰。

### 5.2.3 植物体中检测SUMO化修饰方法

利用转基因材料检测SUMO化修饰是最接近生理条件的一种方法, 结果最可靠。但体内SUMO化修饰水平很低, 检测具有一定难度。

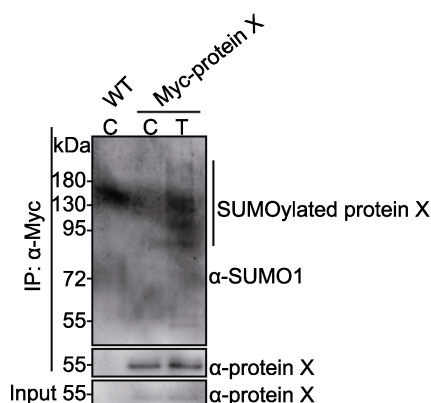
(1) 取样 取相应生长期的拟南芥转基因材料(野生型作为阴性对照)。液氮预冷磨样, 取500  $\mu\text{L}$ 粉末加入到1.5 mL离心管中。

(2) 免疫沉淀 具体操作同5.2.1节烟草中检测SUMO化修饰方法步骤(4)。

(3) Western blot检测 用30  $\mu$ L 2 $\times$ SDS上样缓冲液重悬beads, 100 $^{\circ}$ C煮沸5分钟, 瞬时离心, 混匀。1 000  $\times$ g离心3分钟, 上样。Western blot, anti-SUMO1抗体仅在实验组(转基因材料)检测到目的条带上, 间隔 $\times$ 11 kDa (SUMO1大约11 kDa)处有1条或多条条带, 说明目的蛋白在拟南芥中能被SUMO化修饰。如图3所示, *Myc-protein X*过表达材料, IP (anti-Myc)产物用anti-SUMO1抗体能在处理组(T)特异检测到SUMO化修饰的*Myc-protein X*, 但在对照组(C)未检测到SUMO化修饰的*Myc-protein X*, 这说明*Myc-protein X*仅在特定处理条件下才被SUMO化修饰。因此, 需结合表型, 选择植物特定发育阶段、特定生长条件或特定处理条件进行SUMO化修饰鉴定(Sadanandom et al., 2015; Lin et al., 2016)。

### 5.3 SUMO化修饰位点的检测

SUMO底物通常含有保守的 $\Psi$ KXD/E序列, 其中 $\Psi$ 代表疏水性氨基酸, K是SUMO分子共价结合的赖氨酸, X为任意氨基酸, D/E为酸性氨基酸(天冬氨酸(D)或谷氨酸(E))。SUMO结合酶E2可识别 $\Psi$ KXD/E基序, 介导底物SUMO化修饰(Bernier-Villamor et al., 2002)。常用的SUMO化修饰分析软件有GPS-SUMO (Zhao



**图3** 转基因材料中检测*Myc-protein X*的SUMO化修饰  
*Myc-protein X*转基因材料和野生型(WT)在对照条件(control, C)或处理条件(treatment, T)下生长3天。*Myc-protein X*和SUMO化修饰的*Myc-protein X*分别用anti-protein X和anti-SUMO1抗体检测。竖线指示SUMO化修饰的*Myc-protein X*。

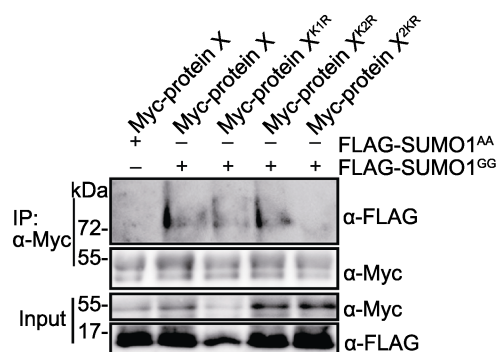
**Figure 3** SUMOylation of *Myc-protein X* in transgenic plants  
*Myc-protein X* transgenic plants and wild-type (WT) were grown in control (C) or treatment (T) conditions for 3 days. *Myc-protein X* and SUMOylated *Myc-protein X* were detected with anti-protein X and anti-SUMO1 antibodies, respectively. Vertical line indicates SUMOylated *Myc-protein X* bands.

et al., 2014)、SUMOplot (<http://www.abgent.com/umoplot>)以及JASSA (<http://www.jassa.fr/index.hp?jassa>)。但由于SUMO化修饰位点并非均是保守的 $\Psi$ KXD/E基序, 故还需要结合质谱检测进行分析。为提高质谱检测效率, 通常使用SUMO1<sup>H89R</sup>检测底物的SUMO化修饰位点(Miller et al., 2010)。

通过软件分析和质谱检测获得可能的SUMO化修饰结合位点, 然后通过SUMO化实验进行验证。目前, 判断SUMO化修饰结合位点的主要依据是SUMO结合位点赖氨酸(K)突变成精氨酸(R)能抑制底物SUMO化修饰(Bernier-Villamor et al., 2002)。如图4所示, *Myc-protein X*和FLAG-SUMO1<sup>GG</sup>在烟草中共表达, IP (anti-Myc)产物用anti-FALG抗体能检测到SUMO化修饰的*Myc-protein X*, 说明protein X是SUMO底物。当把protein X两个可能的SUMO化修饰结合位点K1和K2单独突变后, 仍能检测到SUMO化修饰条带, 但2个位点同时突变(2KR)后, 几乎检测不到, 说明K1和K2是protein X主要的SUMO化修饰结合位点。

## 6 注意事项

(1) 蛋白容易降解, 在未注明的情况下, 所有操作均需在冰上进行。



**图4** K1和K2是protein X主要的SUMO化修饰结合位点  
*Myc-protein X*、*Myc-protein X*<sup>K1R</sup>、*Myc-protein X*<sup>K2R</sup>或*Myc-protein X*<sup>2KR</sup>分别与FLAG-SUMO1<sup>GG</sup>或FLAG-SUMO1<sup>AA</sup>在烟草中瞬时共表达。

**Figure 4** K1 and K2 are the primary SUMOylation sites of protein X  
*Myc-protein X*, *Myc-protein X*<sup>K1R</sup>, *Myc-protein X*<sup>K2R</sup> or *Myc-protein X*<sup>2KR</sup> was transiently co-expressed with FLAG-SUMO1<sup>GG</sup> or FLAG-SUMO1<sup>AA</sup> in *Nicotiana benthamiana* leaves, respectively.



(2) SUMO化修饰水平很低, 可通过增加植物材料的量来提高检测效率。

(3) SUMO化修饰通常发生在特定条件下, 因此需根据实际情况进行检测。

## 参考文献

- 徐庞连, 曾棉炜, 黄丽霞, 阳成伟 (2008). 植物SUMO化修饰及其生物学功能. 植物学通报 **25**, 608–615.
- Bernier-Villamor V, Sampson DA, Matunis MJ, Lima CD (2002). Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* **108**, 345–356.
- Catala R, Ouyang J, Abreu IA, Hu YX, Seo H, Zhang XR, Chua NH (2007). The *Arabidopsis* E3 SUMO ligase SIZ1 regulates plant growth and drought responses. *Plant Cell* **19**, 2952–2966.
- Colby T, Matthäi A, Boeckelmann A, Stuible HP (2006). SUMO-conjugating and SUMO-deconjugating enzymes from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **142**, 318–332.
- Conti L, Price G, O'Donnell E, Schwessinger B, Dominy P, Sadanandom A (2008). Small ubiquitin-like modifier proteases OVERLY TOLERANT TO SALT1 and -2 regulate salt stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 2894–2908.
- Elrouby N, Coupland G (2010). Proteome-wide screens for small ubiquitin-like modifier (SUMO) substrates identify *Arabidopsis* proteins implicated in diverse biological processes. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 17415–17420.
- Hermkes R, Fu YF, Nürrenberg K, Budhiraja R, Schmelzer E, Elrouby N, Dohmen RJ, Bachmair A, Coupland G (2011). Distinct roles for *Arabidopsis* SUMO protease ESD4 and its closest homolog ELS1. *Planta* **233**, 63–73.
- Ishida T, Yoshimura M, Miura K, Sugimoto K (2012). MMS21/HPY2 and SIZ1, two *Arabidopsis* SUMO E3 ligases, have distinct functions in development. *PLoS One* **7**, e46897.
- Kong XX, Luo X, Qu GP, Liu P, Jin JB (2017). *Arabidopsis* SUMO protease ASP1 positively regulates flowering time partially through regulating FLC stability. *J Integr Plant Biol* **59**, 15–29.
- Lin XL, Niu D, Hu ZL, Kim DH, Jin YH, Cai B, Liu P, Miura K, Yun DJ, Kim WY, Lin RC, Jin JB (2016). An *Arabidopsis* SUMO E3 ligase, SIZ1, negatively regulates photomorphogenesis by promoting COP1 activity. *PLoS Genet* **12**, e1006016.
- Liu LP, Jiang Y, Zhang XM, Wang X, Wang YB, Han YZ, Coupland G, Jin JB, Searle I, Fu YF, Chen FL (2017). Two SUMO proteases SUMO PROTEASE RELATED TO FERTILITY1 and 2 are required for fertility in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **175**, 1703–1719.
- Miller MJ, Barrett-Wilt GA, Hua ZH, Vierstra RD (2010). Proteomic analyses identify a diverse array of nuclear processes affected by small ubiquitin-like modifier conjugation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 16512–16517.
- Murtas G, Reeves PH, Fu YF, Bancroft I, Dean C, Coupland G (2003). A nuclear protease required for flowering-time regulation in *Arabidopsis* reduces the abundance of SMALL UBIQUITIN-RELATED MODIFIER conjugates. *Plant Cell* **15**, 2308–2319.
- Rodriguez MS (2016). SUMO: Methods and Protocols. New York: Humana Press.
- Rytz TC, Miller MJ, McLoughlin F, Augustine RC, Marshall RS, Juan YT, Charng YY, Scalf M, Smith LM, Vierstra RD (2018). SUMOylome profiling reveals a diverse array of nuclear targets modified by the SUMO ligase SIZ1 during heat stress. *Plant Cell* **30**, 1077–1099.
- Sadanandom A, Ádám É, Orosa B, Viczián A, Klose C, Zhang CJ, Josse EM, Kozma-Bognár L, Nagy F (2015). SUMOylation of phytochrome-B negatively regulates light-induced signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, 11108–11113.
- Saleh A, Withers J, Mohan R, Marqués J, Gu YN, Yan SP, Zavaliev R, Nomoto M, Tada Y, Dong XN (2015). Post-translational modifications of the master transcriptional regulator NPR1 enable dynamic but tight control of plant immune responses. *Cell Host Microbe* **18**, 169–182.
- Saracco SA, Miller MJ, Kurepa J, Vierstra RD (2007). Genetic analysis of SUMOylation in *Arabidopsis*: conjugation of SUMO1 and SUMO2 to nuclear proteins is essential. *Plant Physiol* **145**, 119–134.
- Tomanov K, Zeschmann A, Hermkes R, Eifler K, Ziba I, Grieco M, Novatchkova M, Hofmann K, Hesse H, Bachmair A (2014). *Arabidopsis* PIAL1 and 2 promote SUMO chain formation as E4-type SUMO ligases and are involved in stress responses and sulfur metabolism. *Plant Cell* **26**, 4547–4560.
- Yates G, Srivastava AK, Sadanandom A (2016). SUMO proteases: uncovering the roles of deSUMOylation in plants. *J Exp Bot* **67**, 2541–2548.
- Yoo SD, Cho YH, Sheen J (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc* **2**, 1565–1572.

Zhao Q, Xie YB, Zheng YY, Jiang S, Liu WZ, Mu WP, Liu ZX, Zhao Y, Xue Y, Ren J (2014). GPS-SUMO: a tool for

the prediction of SUMOylation sites and SUMO-interaction motifs. *Nucleic Acids Res* **42**, W325–W330.

## Detection of SUMOylation in Plants

Gaoping Qu<sup>\*</sup>, Jingbo Jin

*Key Laboratory of Plant Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China*

**Abstract** SUMOylation, a post-translational modification, is essential for plant normal growth and development. To date, thousands of possible SUMO substrates have been identified, but due to the relatively low SUMOylation level, biological significance of the SUMOylation remains largely unknown. Here, we summarized the SUMOylation detection methods, including *in vitro* and *in vivo* SUMOylation assays, which help to understand the functions of SUMOylation in plants.

**Key words** *Arabidopsis*, SUMO, SUMOylation, detection methods

**Qu GP, Jin JB** (2020). Detection of SUMOylation in plants. *Chin Bull Bot* **55**, 83–89.

---

<sup>\*</sup> Author for correspondence. E-mail: qu20140701@ibcas.ac.cn

(责任编辑: 孙冬花)