

· 特邀专家方法 ·

植物蛋白质SUMO化修饰体外高效检测系统

黄俊文[†], 冯琦伊[†], 郑凯勇[†], 黄俊杰, 王林博, 赖瑞强, 赖建彬, 阳成伟^{*}

华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631

摘要 蛋白质SUMO化修饰是一种调控蛋白命运的关键修饰方式, 广泛参与植物生长发育及逆境胁迫响应。SUMO化修饰过程主要由激活酶(E1)-结合酶(E2)-连接酶(E3)组成的级联酶促反应催化, 其关键酶组分将SUMO分子缀合至底物蛋白的赖氨酸残基, 形成共价异肽键以完成SUMO化修饰过程。该文报道了1种植物蛋白质SUMO化修饰体外高效检测系统, 通过在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中构建拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) SUMO化修饰的关键通路实现对底物蛋白的SUMO化修饰, 结果可通过免疫印迹进行检测。该系统可以简化植物蛋白质SUMO化修饰的检测流程, 为植物细胞SUMO化修饰的功能研究提供了有力工具。

关键词 SUMO化修饰, 体外, 检测系统, 植物

黄俊文, 冯琦伊, 郑凯勇, 黄俊杰, 王林博, 赖瑞强, 赖建彬, 阳成伟 (2022). 植物蛋白质SUMO化修饰体外高效检测系统. 植物学报 57, 490–499.

蛋白质翻译后修饰普遍存在于真核生物中, 是调控蛋白质功能的一种重要途径(Dai et al., 2018)。翻译后修饰通过影响蛋白质的构象、稳定性和亚细胞定位等方式调控生命活动的承担者——蛋白质的活性及其积累水平, 使植物蛋白质组始终处于相对动态平衡, 从而对生命活动进行精细调控(Han et al., 2021)。蛋白质SUMO化修饰(SUMOylation)是一种广泛存在于真核生物细胞中的翻译后修饰, 其修饰靶蛋白的过程及其分子结构均类似于泛素化修饰, 因此SUMO分子被命名为小类泛素化修饰分子(small ubiquitin-like modifier, SUMO) (Augustine and Vierstra, 2018)。

SUMO化修饰通过类似于泛素化修饰的激活酶E1 (activating enzyme E1)-结合酶E2 (conjugating enzyme E2)-连接酶E3 (ligase E3)级联酶促反应系统对底物蛋白进行修饰(韩丹璐等, 2018)。在发生修饰前, 前体SUMO分子被SUMO特异性蛋白酶加工切割, 使其C末端暴露出2个甘氨酸残基(Gly-Gly, GG), 形成可用于修饰的成熟形式的SUMO分子SUMO-GG。单个SUMO-GG被激活酶识别并激活后, 在结合

酶和连接酶的有序协作中被精确地通过异肽键共价修饰于底物蛋白的赖氨酸(Lys, K)残基上, 从而完成整个修饰过程(Roy and Sadanandom, 2021)。此外, SUMO分子可通过连接酶E4 (ligase E4)的催化形成多聚SUMO链进而对靶蛋白进行修饰(Okada et al., 2009)。SUMO化修饰始终处于动态平衡之中, SUMO化修饰水平受SUMO蛋白酶(ubiquitin-like protein specific protease, ULP)的调控, SUMO蛋白酶可通过与SUMO化修饰后的底物蛋白相互作用, 将所修饰的SUMO分子切割, 使该蛋白被去SUMO化修饰, 被切下的SUMO分子仍可以循环参与SUMO化修饰(Morrell and Sadanandom et al., 2019)。正是由于SUMO化修饰相关组分受到精细调控, SUMO化修饰/去修饰循环有序进行, 植物的SUMO化修饰水平始终处于相对平衡以参与生命活动的精细调控。

SUMO化修饰广泛参与植物发育过程, SUMO化修饰相关组分的功能受阻或缺失都可能影响植物生长发育(Jiang et al., 2021)。例如, *AtSUMO1/2*双突变植物胚胎致死(Saracco et al., 2007)。结合酶AtSCE1

收稿日期: 2022-04-12; 接受日期: 2022-06-23

基金项目: 国家自然科学基金(No.31871222)

[†] 共同第一作者

^{*} 通讯作者。E-mail: yangchw@scnu.edu.cn

(SUMO Conjugating Enzyme 1)的C94S替换(半胱氨酸突变为丝氨酸)使植物矮小(Kong et al., 2020), 而其缺失则会导致胚胎死亡(Saracco et al., 2007)。连接酶基因*AtSIZ1* (*SAP AND MIZ1 DOMAIN-CONTAINING LIGASE 1*)和*AtMMS21* (*METHYL METHANE SULFONATE SENSITIVITY 21*)突变均会导致植物出现生长发育缺陷的表型(Huang et al., 2009; Miura et al., 2010)。此外, *AtMMS21*通过*AtDpa*促进细胞周期的转换以维持主根发育(Liu et al., 2016), *AtMMS21*介导的SUMO化修饰提高了*AtBRM1* (*BRAHMA-INTERACTING PROTEIN 1*)的稳定性以参与主根发育的调控(Zhang et al., 2017)。*AtSIZ1*介导*AtFLD* (*FLOWERING LOCUS D*)的SUMO化修饰, 影响植物的成花过程(Jin et al., 2008)。在抗逆过程中, SUMO化修饰也具有重要作用。例如, *AtBAG7* (*BCL-2-ASSOCIATED ATHANOGENE 7*)和*AtDREB2A* (*DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN 2A*)的SUMO化均增强植物的耐热性(Li et al., 2017; Wang et al., 2020), 而*AtICE1* (*INDUCER OF CBF EXPRESSION 1*)的SUMO化修饰则增强其在冷胁迫响应中的活性(Miura et al., 2007); *AtSIZ1*通过*AtMYB30* (*MYB DOMAIN PROTEIN 30*)的SUMO化正向调控植物的耐盐性(Zheng et al., 2012), *AtSIZ1*介导*AtSTOP1* (*SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY 1*)的SUMO化修饰, 参与植物对铝毒的耐受性调控(Xu et al., 2021); *AtNPR1* (*NONEXPRESSER OF PR GENES 1*)、*AtTPR1* (*TOPLESS-RELATED 1*)和*AtWRKY33* (*WRKY DNA-BINDING PROTEIN 33*)的SUMO化修饰参与植物免疫响应调控(Saleh et al., 2015; Niu et al., 2019; Verma et al., 2021)。因此, 深入研究SUMO化修饰在植物发育及胁迫响应中的分子机制有利于解析并完善植物发育及逆境调控网络, 为分子育种提供参考。

对SUMO化修饰的检测是深入研究蛋白质SUMO化修饰不可或缺的实验技术之一, 通过该实验确定候选蛋白是否具有SUMO化修饰及其发生修饰的位点(Liu et al., 2016)。常用的SUMO化修饰体内检测方法为免疫沉淀法: 在植物体内表达候选蛋白, 通过免疫沉淀纯化该候选蛋白并采用SUMO分子特异

性抗体对其进行检测(Zhou et al., 2019)。该方法最为直接, 但某些条件下体内SUMO化修饰水平较低, 因此需要摸索相应的实验条件, 从而使SUMO化修饰达到检出水平。有些蛋白的SUMO化修饰可能直接决定其命运, 如SUMO化修饰可能会促进其降解, 因此其SUMO化修饰难以被检测到(Perry et al., 2008; Wang and Prelich, 2009)。植物体内含有的SUMO蛋白酶也是影响SUMO化修饰能否被检出的重要因素。蛋白质的SUMO化修饰是高度动态的, 在某种条件下SUMO化修饰会被SUMO蛋白酶去SUMO化修饰, 而环境因素也参与SUMO蛋白酶对SUMO化修饰的调控(Fang et al., 2020)。例如, 植物响应铝毒胁迫中, *AtSIZ1*介导*AtSTOP1*的SUMO化修饰, 而SUMO蛋白酶*AtESD4* (*EARLY IN SHORT DAYS 4*)介导其去SUMO化修饰。此外, 瞬时转化表达成本较高且条件相对不稳定, 可能会对植物细胞造成胁迫而影响实验结果; 而获得转基因材料进行实验虽然可以避免植物细胞培养的不稳定因素, 但耗时较长。因此, 建立一套高效的检测系统有利于深入研究SUMO化修饰。

SUMO化修饰过程已被阐明, 通过纯化SUMO化修饰所需的组分并在体外缓冲环境中模拟SUMO化修饰是一种行之有效的体外检测方法(曲高平和金京波, 2020)。此方法可有效避免植物内源SUMO蛋白酶等因素对SUMO修饰的影响, 但输入系统的SUMO分子、激活酶E1、结合酶E2及底物蛋白均需分别诱导及纯化, 实验所需的成本较高。而且连接酶E3负责修饰底物的特异性选择及促进蛋白质的SUMO化修饰, 在缺少连接酶E3的条件下其SUMO化修饰水平较低, 难以检测到甚至可能造成假阴性。为进一步降低实验条件及检测成本, 通过合成生物学方法在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中构建植物SUMO化修饰通路是一种行之有效的解决策略。SUMO化修饰只存在于真核细胞中, 原核生物缺乏SUMO化修饰所需的组分, 因此可避免内源组分对SUMO化修饰及去SUMO化修饰的影响。此外, 大肠杆菌分裂繁殖效率高, 蛋白产量高, 且已有较好的遗传操作基础, 是构建植物SUMO化修饰通路的理想底盘(Okada et al., 2009)。据此, 本文报道了一种植物蛋白质SUMO化修饰体外高效检测系统, 以为植物SUMO化修饰的深入研究提供技术支持。

1 实验材料

1.1 菌株

大肠杆菌(*Escherichia coli*) 菌株: BL21 (DE3)。

1.2 质粒

- pET28-AtSAE1a-His₆-AtSAE2 (E1) (卡那霉素抗性, Kan^R)
- pACYC-Duet-1-(MYC-SUMO1-GG) (-E2) (氯霉素抗性, Cm^R)
- pACYC-Duet-1-(His₆-SCE1)-(MYC-SUMO1-GG) (+E2) (氯霉素抗性, Cm^R)
- pCDF-Duet-1-His₆-DREB2A(WT)-Flag (链霉素抗性, Str^R)
- pCDF-Duet-1-His₆-DREB2A(K163R)-Flag (链霉素抗性, Str^R)
- pCDF-Duet-1-His₆-ACR4-Flag (链霉素抗性, Str^R)
- pCDF-Duet-1-His₆-PHR1-Flag (链霉素抗性, Str^R)
- pCDF-Duet-1-(HA-SIZ1)-(His₆-PHR1-Flag) (链霉素抗性, Str^R)
- pCDF-Duet-1-His₆-MYB30-Flag (链霉素抗性, Str^R)
- pCDF-Duet-1-(HA-SIZ1)-(His₆-MYB30-Flag) (链霉素抗性, Str^R)

2 试剂及耗材

- 细菌培养相关: 酵母提取物(OXOID, Cat No. LP0021B)、胰蛋白胨(OXOID, Cat No. LP0042B)、氯化钠(广州广试, Cat No. BC13)、琼脂(北京康润, Cat No. VA15092)、卡那霉素(北京康润, Cat No. B120)、氯霉素(北京康润, Cat No. B119)、链霉素(上海生工, Cat No. A610494)、高效感受态细胞制备试剂盒(上海生工, Cat No. B529305)和IPTG (北京康润, Cat No. B117)。
- 免疫印迹相关: SDS (Sigma, Cat No. A600485)、Tris-base (上海生工, Cat No. A501492)、盐酸(广州广试, Cat No. CB21)、甘氨酸(上海生工, Cat No. A502065)、甘油(广州广试, Cat No. HC05)、溴酚蓝(上海生工, Cat No. A500922)、甲醇(广州广试, Cat No. HB05)、PVDF膜(Merck Millipore, Cat No. IPVH-00010)、Tween 20 (北京索莱宝, Cat No. T8220)、

PAGE 凝胶快速制备试剂盒(上海雅酶, Cat No. PG112)、Flag抗体(北京全式金, Cat No. HT201)和脱脂奶粉(上海生工, Cat No. A600669)。

3 试剂配方

- LB培养基: 5 g 酵母提取物, 10 g 胰蛋白胨, 10 g 氯化钠, 溶解于去离子水中并定容至1 L。固体培养基添加15 g 琼脂。
- 4× PSB蛋白上样缓冲液: 0.8 g SDS, 4 mg 溴酚蓝, 4 mL 甘油, 2.4 mL 1 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH6.8), 用去离子水定容至10 mL。
- 5× Tris-甘氨酸电泳缓冲液: 15.1 g Tris-base, 94 g 甘氨酸, 5 g SDS, 溶解于去离子水中并定容至1 L。
- 转膜缓冲液: 5.8 g Tris-base, 2.9 g 甘氨酸, 0.37 g SDS, 200 mL 甲醇, 用去离子水定容至1 L。
- TBST缓冲液: 8.8 g 氯化钠, 20 mL 1 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH8.0), 0.5 mL Tween 20, 用去离子水定容至1 L。
- 封闭缓冲液: 2.5 g 脱脂奶粉, 使用TBST溶解并定容至50 mL。

4 设备

所用设备包括冷冻高速离心机、恒温水平摇床、水平脱色摇床、电泳仪、转膜仪和化学发光成像仪。

5 实验设计思路

假定候选蛋白A (A为候选蛋白的代称, 不特指某种蛋白, 下同)具有SUMO化修饰, 可使用本系统对A蛋白进行SUMO化修饰体外检测。检测包括E2存在与缺失对A蛋白SUMO化的修饰水平及对A潜在SUMO化位点突变后的修饰水平进行分析。

构建载体前, 需要对A蛋白进行基本的生物信息学分析, 包括所属家族、保守结构域及亚细胞定位等。亚细胞定位可能会对SUMO化修饰检测产生影响。若A蛋白为跨膜蛋白, 需考虑其可能发生SUMO化修饰的区段, 可将该区段截取进行SUMO化修饰检测。若A蛋白为分泌蛋白, 在使用本系统检测其SUMO化修饰时可考虑将其分泌信号肽失活, 使其在胞内积累并发生SUMO化修饰。

其次, 在构建pCDF-Duet-1载体时, 需考虑标签位置对SUMO化修饰的影响, 可将标签分别融合在A蛋白的N端或C端进行检测。

6 实验流程

6.1 体外SUMO化修饰检测

体外SUMO化修饰检测系统包含输入-激活-连接3个步骤(图1A), 检测流程主要包括6个步骤(图1B), 具

体包括以下9个操作步骤。

(1) 感受态细胞制备: 将pACYC-Duet-1-(MYC-AtSUMO1-GG) (-E2)和pACYC-Duet-1-(His₆-AtSCE1)-(MYC-AtSUMO1-GG) (+E2)质粒分别与pET28-AtSAE1a-His₆-AtSAE2 (E1)质粒共转至BL21 (DE3)中, 依次标记为SUMO1-E2和SUMO1+E2菌株, 涂布于卡那霉素和氯霉素双抗性LB平板培养及筛选。得到菌株后使用试剂盒制备感受态细胞, 保存于-80°C冰箱, 待用。

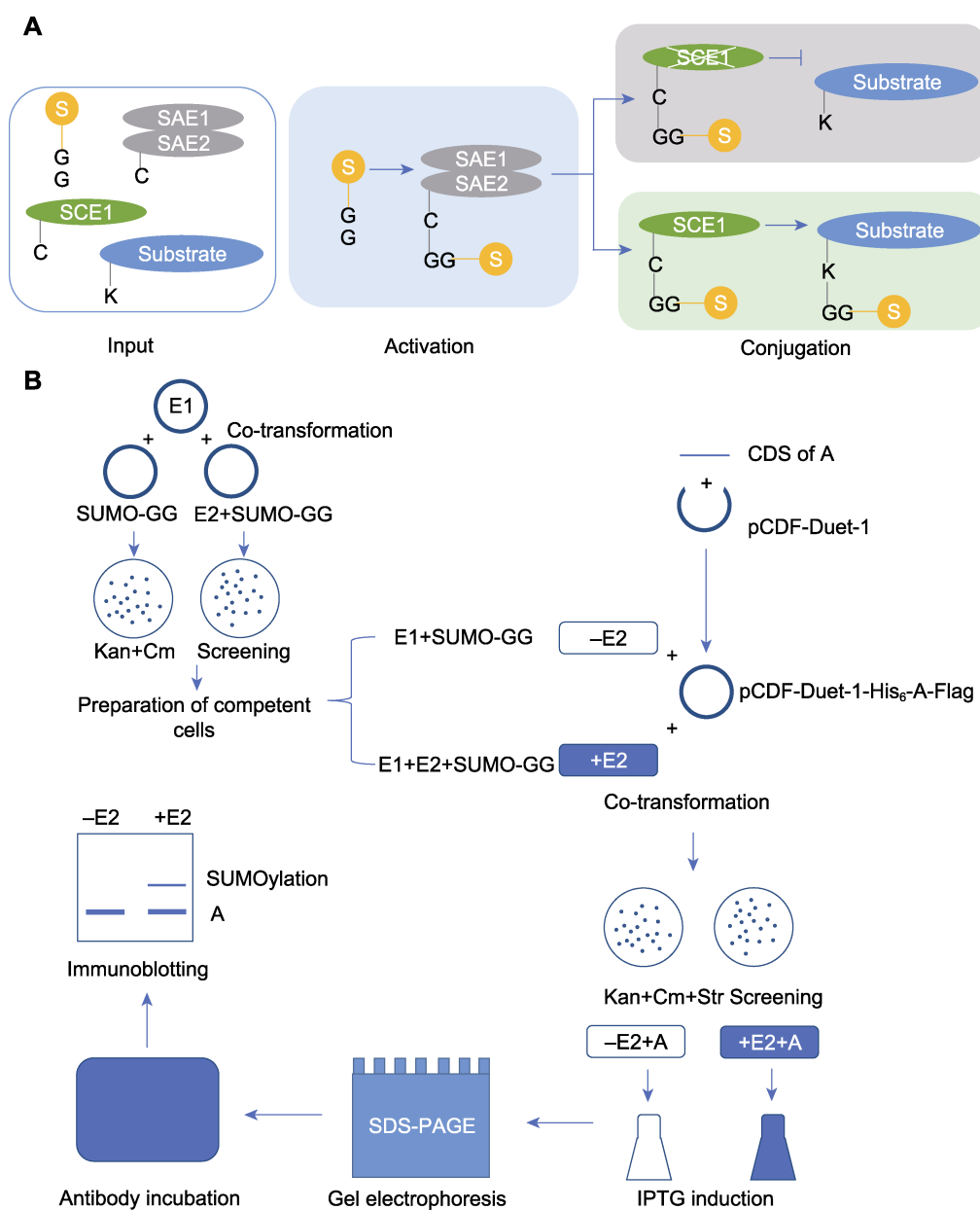


图1
Figure 1

图1 体外SUMO化修饰检测流程

(A) 体外SUMO化修饰检测过程(输入: 将SUMO修饰关键组分基因和候选底物蛋白基因导入大肠杆菌表达; 激活: E1结合以激活SUMO分子参与修饰; 结合: E2将E1激活后的SUMO分子连接至底物完成修饰); **(B)** 体外SUMO化修饰检测实验流程(共转化: 将SUMO化修饰关键组分载体导入大肠杆菌, 通过卡那霉素和氯霉素平板筛选阳性克隆; 制备感受态细胞: 将获得的阳性克隆制备成感受态细胞; 共转化: 将构建好的底物蛋白表达载体导入感受态细胞, 通过卡那霉素、氯霉素和链霉素平板筛选阳性克隆; 诱导: 通过IPTG诱导蛋白表达; 凝胶电泳: 将获得的菌体样品裂解变性后通过SDS-PAGE凝胶电泳将不同分子量的蛋白分离, 将蛋白从凝胶转移至PVDF膜上; 抗体孵育: 将封闭后的PVDF膜与抗体进行孵育; 显影: 观察并记录实验结果)

Figure 1 The process of *in vitro* SUMOylation analysis

(A) The process diagram of *in vitro* SUMOylation detection (Input: the key component genes of SUMO modification and the candidate substrate protein gene were introduced into *Escherichia coli* for expression; Activating: E1 activates SUMO molecules to participate in the modification; Conjugating: E2 attaches the activated SUMO molecules to the substrate); **(B)** The experimental procedure of *in vitro* SUMOylation detection (Co-transformation: The plasmids for expressing key SUMOylation components were introduced into *E. coli*, and the positive colonies were screened on LB agar plates containing kanamycin and chloramphenicol; Preparation of competent cells: The obtained positive colonies were prepared into competent cells; Co-transformation: The constructed plasmid for substrate protein expression was introduced into the competent cells mentioned above, and positive colonies were screened on LB agar plates by kanamycin, chloramphenicol and streptomycin; Induction: Protein expression was induced by IPTG; Gel electrophoresis: After lysed and denatured, samples were separated by SDS-PAGE. Then the proteins were transferred from gel to PVDF membrane; Antibody incubation: The blocked PVDF membrane was incubated with antibody; Immunoblotting: Observation and recording of the experimental results)

(2) 候选蛋白质粒构建: 扩增候选A蛋白的编码框, 融合Flag标签, 插入pCDF-Duet-1载体中。测序正确后保存于 -20°C 冰箱, 待用。

(3) 候选蛋白A质粒转化: 将候选蛋白质粒分别转入步骤(1)中所制备的 $-E2$ 和 $+E2$ 菌株中, 并标记为SUMO1-E2+A和SUMO1+E2+A菌株, 涂布于卡那霉素、氯霉素和链霉素的LB平板进行培养及筛选。

(4) 蛋白诱导: 挑单克隆于5 mL含有卡那霉素(Kan)、氯霉素(Cm)和链霉素(Str)的LB液体培养基中过夜培养作为菌种。次日, 将菌种接种至20 mL含卡那霉素(Kan)、氯霉素(Cm)和链霉素(Str)的LB液体培养基, 在培养基中加入菌液使其 A_{600} 为0.1, 然后于 37°C 摇床培养至其 A_{600} 为0.5 (约需1.5小时), 最后加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG), 使IPTG终浓度为 $1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

(5) 取样: 取含有等量菌体的菌液置于冷冻高速离心机中, 4°C 、 $4\ 000\times g$ 离心5分钟, 用移液器移除上清, 保留菌体, 在液氮中速冻后保存于 -80°C 冰箱, 待用。

(6) 裂解和变性: 取不同菌株等量的菌体, 加入等量 $2\times$ PSB上样缓冲液, 移液器吸打重悬菌体混匀, 然后沸水浴5分钟, 使菌体裂解、蛋白质变性, 将变性后的蛋白样品置于冰上保存。

(7) 免疫印迹: 通过SDS-PAGE凝胶电泳分离样品; 使用转膜系统将蛋白条带转印至甲醇处理过的PVDF膜上, 使用封闭缓冲液封闭1.5小时。

(8) 抗体孵育: 封闭完成后, 使用TBST清洗印迹膜, 使用Anti-Flag抗体孵育印迹膜1小时, 孵育后洗膜, 使用识别对应抗原的二抗进行孵育。

(9) 检测条带: 抗体孵育完毕后, 使用TBST清洗印迹膜, 在化学发光系统内检测蛋白条带并判断其修饰情况。

6.2 E3连接酶介导的体外SUMO化修饰检测

E3连接酶负责对底物的选择, 通过促进SUMO分子从E2到底物间的传递而介导修饰。在本检测系统中, 增加E3连接酶不仅可促进候选底物蛋白的SUMO化修饰, 而且也可作为验证候选底物蛋白的SUMO化修饰由该E3连接酶所介导的辅助证据(图2A)。

首先, 通过6.1节所述方法对候选底物蛋白进行初步的SUMO化修饰检测, 明确候选底物蛋白的SUMO化修饰水平。其次, 利用本系统在增加E3连接酶的条件下对候选底物蛋白进行SUMO化修饰检测, 以缺少E3连接酶条件下的修饰水平作为对照, 明确E3连接酶对候选底物蛋白SUMO化修饰的影响(图2B)。

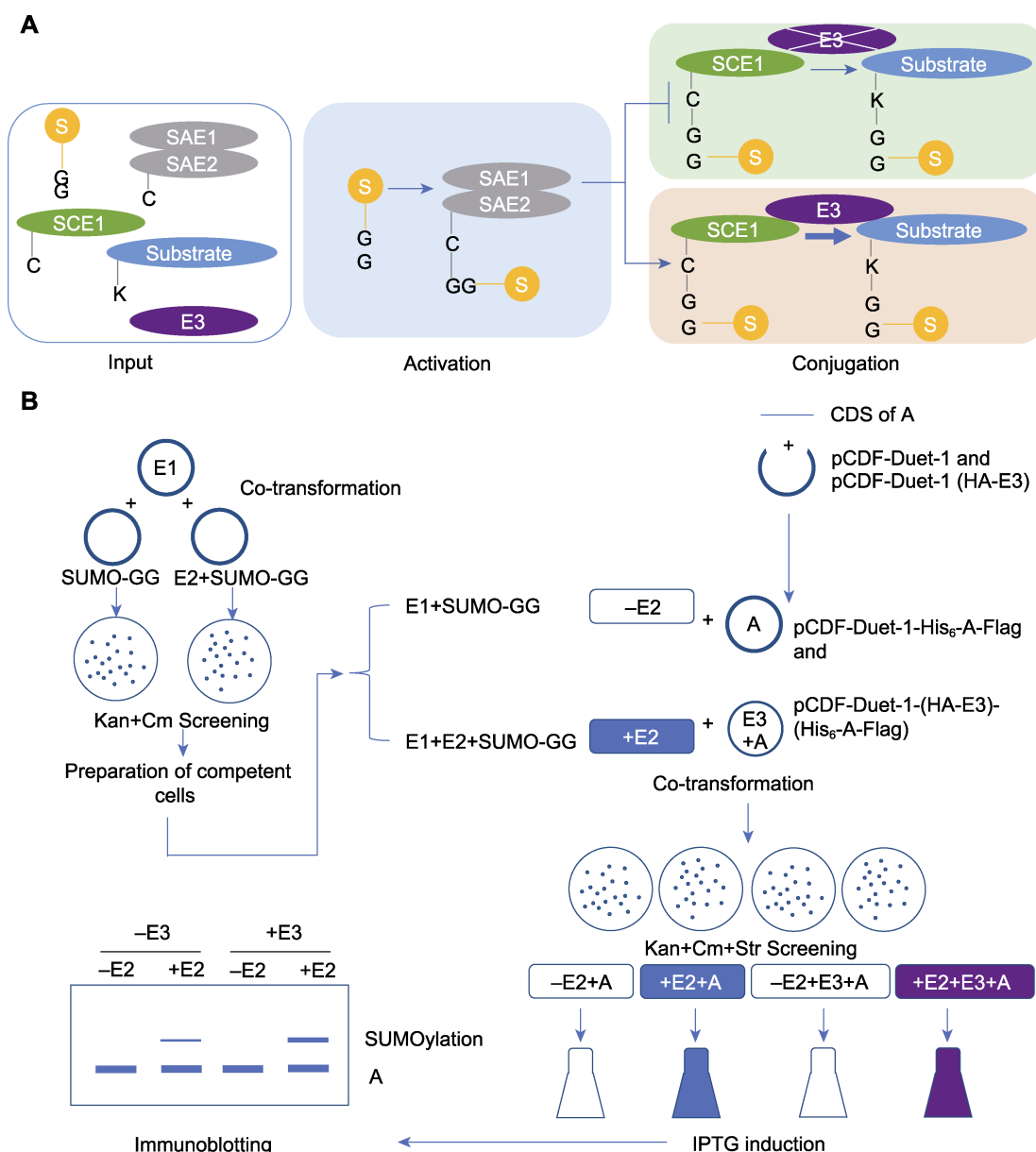


图2 E3连接酶介导的体外SUMO化修饰检测

(A) E3连接酶介导的体外SUMO化修饰检测过程(输入: 将SUMO化修饰关键组分基因和候选底物蛋白基因导入大肠杆菌表达; 激活: E1结合以激活SUMO分子参与修饰; 结合: E2将E1激活后的SUMO分子连接至底物完成修饰, 在E3存在的条件下, E3促进了SUMO分子从E2到底物蛋白的连接); (B) E3连接酶介导的体外SUMO化修饰检测实验流程(共转化: SUMO关键组分载体导入大肠杆菌, 通过卡那霉素和氯霉素平板筛选阳性克隆; 制备感受态细胞: 将获得的阳性克隆制备成感受态细胞; 共转化: 将构建好的底物蛋白表达载体(带有独立的E3表达框)导入感受态细胞, 通过卡那霉素、氯霉素和链霉素平板筛选阳性克隆; 诱导: 通过IPTG诱导蛋白表达; 免疫印迹: 通过SDS-PAGE凝胶电泳将不同分子量的蛋白分离, 将蛋白从凝胶转移至PVDF膜上, 将封闭后的PVDF膜与抗体进行孵育, 通过显影观察并记录实验结果)

Figure 2 The process of *in vitro* SUMOylation analysis mediated by an E3 ligase

(A) The process diagram of the E3 ligase-mediated *in vitro* SUMOylation detection (Input: The key component genes of SUMO modification and the candidate substrate protein gene were introduced into *Escherichia coli* for expression; Activating: E1 activates SUMO molecules to participate in the modification; Conjugating: E2 attaches the activated SUMO molecules to the substrate. In the presence of E3, E3 facilitates the attachment of SUMO molecules from E2 to the substrate protein); (B) The experimental procedure of the E3 ligase-mediated *in vitro* SUMOylation detection (Co-transformation: The plasmids for ex-

pression of key SUMOylation components were introduced into *E. coli*, and the positive colonies were screened on LB agar plates containing kanamycin and chloramphenicol; Preparation of competent cells: The obtained positive colonies were transformed into competent cells; Co-transformation: The constructed plasmid for substrate protein expression (with independent E3 expression cassette) was introduced into the competent cells mentioned above, and the positive colonies were screened by LB agar plates containing kanamycin, chloramphenicol and streptomycin; Induction: Protein expression was induced by IPTG; Immunoblotting: After lysed and denatured, samples were separated by SDS-PAGE gel electrophoresis, then the proteins were transferred from gel to PVDF membrane, the blocked PVDF membrane was incubated with antibody, the result was observed and recorded by immunoblotting).

6.3 实例一: DREB2A蛋白的SUMO化修饰检测及修饰位点的确定

AtDREB2A是植物对于干旱及高温胁迫响应的关键因子(Sakuma et al., 2006)。本课题组已阐明AtSCE1在高温下促进拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) AtDREB2A在K163处的SUMO化修饰使其稳定进而提高植物热胁迫耐受性的分子机制(Wang et al., 2020)。以该蛋白为例, 阐述使用本系统对蛋白质SUMO化修饰的检测及其修饰位点鉴定的过程。

对AtDREB2A蛋白进行生物信息学分析, 发现其可能发生SUMO化修饰, 其潜在的修饰位点为K163。构建pCDF-Duet-1-His₆-DREB2A(WT)-Flag, 通过拼接PCR引入点突变构建pCDF-Duet-1-His₆-DREB2A-

(K163R)-Flag载体。将上述载体转入本检测系统, 获得菌株SUMO1-E2+DREB2A(WT)、SUMO1+E2+DREB2A(WT)、SUMO1-E2+DREB2A(K163R)和SUMO1+E2+DREB2A(K163R)。将4种菌株分别诱导进行蛋白表达, 按照6.1节所述流程进行检测。结果显示, 当E2缺失时, AtDREB2A上方未出现条带; 当E2存在时, AtDREB2A上方出现修饰条带, 因此可判断AtDREB2A具有SUMO化修饰(图3A)。当AtDREB2A蛋白的第163位赖氨酸(K163)突变为精氨酸(K163R)后, 其蛋白大小未发生变化, 但其SUMO化修饰水平与正常AtDREB2A蛋白相比则显著降低, 表明K163是AtDREB2A的SUMO化修饰位点(图3A)。

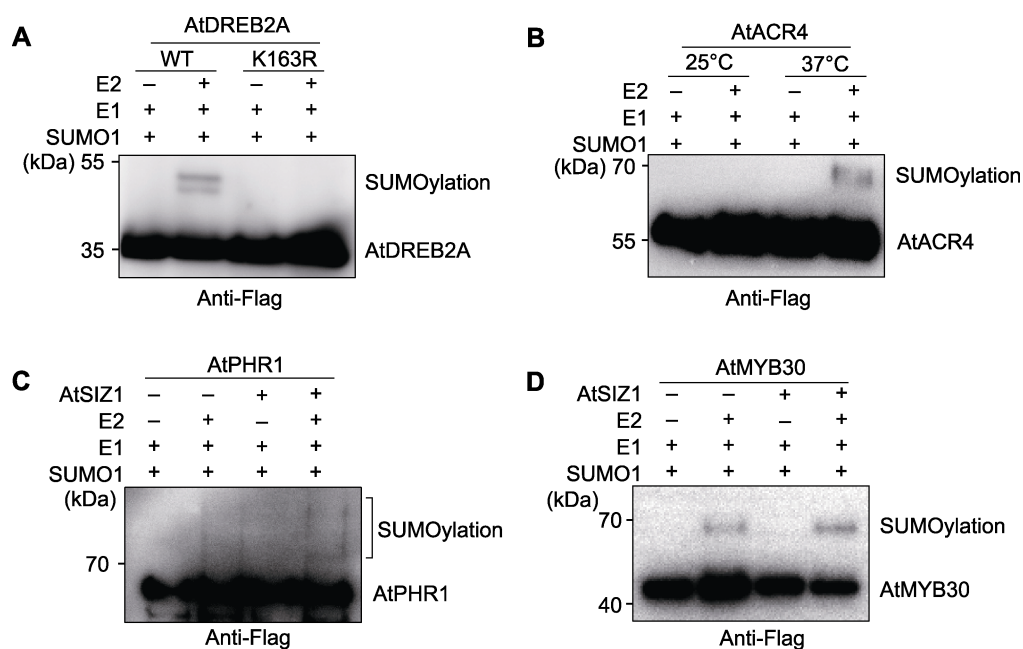


图3 检测实例

(A) AtDREB2A蛋白SUMO化修饰检测; (B) 温度影响AtACR4蛋白的SUMO化修饰水平; (C) E3连接酶AtSIZ1促进AtPHR1蛋白的SUMO化修饰; (D) E3连接酶AtSIZ1促进AtMYB30蛋白的SUMO化修饰

Figure 3 Experimental cases

(A) SUMOylation test of AtDREB2A; (B) Temperature affects SUMOylation of AtACR4; (C) The E3 ligase AtSIZ1 facilitates SUMOylation of AtPHR1; (D) The E3 ligase AtSIZ1 facilitates SUMOylation of AtMYB30

6.4 实例二: AtACR4蛋白的SUMO化修饰检测及温度对其修饰水平的影响

在对SUMO化修饰底物进行不断筛选的过程中,我们发现AtACR4蛋白的修饰水平受诱导温度影响,以此作为实例进行说明,旨在为同行提供参考。通过本系统对AtACR4蛋白进行检测发现:在25°C诱导时,AtACR4蛋白的SUMO化修饰难以被检出(图3B);而当诱导温度为37°C时,AtACR4蛋白的SUMO化修饰可被检出,且其修饰水平较高(图3B),表明温度可能影响系统候选蛋白SUMO化修饰水平,因此在实际检测中可以通过改变诱导温度以优化检出的修饰水平。

6.5 实例三: E3连接酶AtSIZ1介导的体外SUMO化修饰检测

植物体内SUMO连接酶E3主要通过同时与底物及结合酶E2相互作用,从而执行其对底物的特异性选择及促进分子从结合酶E2向底物传递以促进修饰。有些蛋白质不直接与结合酶AtSCE1互作,而是依赖于E3连接酶的介导,因此在缺少连接酶E3的体外系统中,候选蛋白的SUMO化修饰水平可能较低,难以检测甚至可能造成假阴性。

本研究通过将连接酶AtSIZ1基因导入pCDF-Duet-1载体中,构建E3连接酶AtSIZ1介导的体外SUMO化修饰检测系统。若候选蛋白的SUMO化修饰是由AtSIZ1介导,则其修饰水平在AtSIZ1存在组中较缺少组中高。我们选择已被鉴定的AtSIZ1靶蛋白AtPHR1 (PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1) (Miura et al., 2005)和AtMYB30 (Zheng et al., 2012)进行实例检测,以验证本系统中AtSIZ1具有提高靶蛋白SUMO化修饰水平的能力。

在AtSIZ1缺少组中,AtPHR1的SUMO化修饰水平较低,而其修饰水平在AtSIZ1增加组中较高,表明AtSIZ1促进了AtPHR1在系统中的SUMO化修饰(图3C)。AtMYB30的结果与AtPHR1类似,虽然在AtSIZ1缺少组中其修饰水平较高,但增加AtSIZ1后其修饰水平明显提高,表明本系统中AtSIZ1也促进了AtMYB30的SUMO化修饰(图3D)。综上,本研究建立了E3连接酶AtSIZ1介导的体外SUMO化检测系统,可用于AtSIZ1靶蛋白SUMO化修饰水平的检测及辅助证明候选蛋白的SUMO化修饰为AtSIZ1所介导。

7 注意事项

- (1) 诱导蛋白表达的条件因候选蛋白而异,本研究实例并非适合所有候选蛋白的诱导。若未成功表达候选蛋白,可从诱导时间、温度和IPTG浓度等多方面优化诱导条件以表达候选蛋白。
- (2) 若所诱导蛋白的产量较低且无法通过优化诱导条件改善,可通过纯化的方法富集后进行免疫印迹检测。pCDF-Duet-1载体自带His₆标签,可将菌体裂解后通过Ni-beads富集待测蛋白。
- (3) 尽量选择对候选蛋白影响较小且赖氨酸含量较低的融合标签。此前有研究表明,GST标签存在较低水平的SUMO化修饰并影响候选蛋白的真实SUMO化修饰水平(Okada et al., 2009),需谨慎使用。
- (4) 若通过生物信息学预测系统无法预测候选蛋白的SUMO化修饰位点,可采用本系统获得发生SUMO化修饰的候选蛋白进行质谱鉴定,以确定其SUMO分子的修饰位点。
- (5) 体外检测系统需要结合体内实验(曲高平和金京波, 2020)的结果相互佐证。

参考文献

- 韩丹璐, 赖建彬, 阳成伟 (2018). SUMO E3连接酶在植物生长发育中的功能研究进展. *植物学报* **53**, 175–184.
- 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.
- Augustine RC, Vierstra RD (2018). SUMOylation: re-wiring the plant nucleus during stress and development. *Curr Opin Plant Biol* **45**, 143–154.
- Dai Vu L, Gevaert K, De Smet I (2018). Protein language: post-translational modifications talking to each other. *Trends Plant Sci* **23**, 1068–1080.
- Fang Q, Zhang J, Zhang Y, Fan N, van den Burg HA, Huang CF (2020). Regulation of aluminum resistance in *Arabidopsis* involves the SUMOylation of the zinc finger transcription factor STOP1. *Plant Cell* **32**, 3921–3938.
- Han DL, Lai JB, Yang CW (2021). SUMOylation: a critical transcription modulator in plant cells. *Plant Sci* **310**, 110987.
- Huang LX, Yang SG, Zhang SC, Liu M, Lai JB, Qi YL, Shi SF, Wang JX, Wang YQ, Xie Q, Yang CW (2009). The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase AtMMS21, a homologue of NSE2/MMS21, regulates cell proliferation in the root.

- Plant J* **60**, 666–678.
- Jiang JM, Xie Y, Du JJ, Yang CW, Lai JB** (2021). A SUMO ligase OsMMS21 regulates rice development and auxin response. *J Plant Physiol* **263**, 153447.
- Jin JB, Jin YH, Lee J, Miura K, Yoo CY, Kim WY, Van Oosten M, Hyun Y, Somers DE, Lee I, Yun DJ, Bressan RA, Hasegawa PM** (2008). The SUMO E3 ligase, *AtSIZ1*, regulates flowering by controlling a salicylic acid-mediated floral promotion pathway and through affects on *FLC* chromatin structure. *Plant J* **53**, 530–540.
- Kong XF, Hong YC, Hsu YF, Huang H, Liu X, Song Z, Zhu JK** (2020). SIZ1-mediated SUMOylation of ROS1 enhances its stability and positively regulates active DNA demethylation in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **13**, 1816–1824.
- Li YR, Williams B, Dickman M** (2017). *Arabidopsis* B-cell lymphoma2 (Bcl-2)-associated athanogene 7 (BAG7)-mediated heat tolerance requires translocation, SUMOylation and binding to WRKY29. *New Phytol* **214**, 695–705.
- Liu YY, Lai JB, Yu MY, Wang FG, Zhang JJ, Jiang JM, Hu H, Wu Q, Lu GH, Xu PL, Yang CW** (2016). The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase AtMMS21 dissociates the E2Fa1/DPa complex in cell cycle regulation. *Plant Cell* **28**, 2225–2237.
- Miura K, Jin JB, Lee J, Yoo CY, Stirn V, Miura T, Ashworth EN, Bressan RA, Yun DJ, Hasegawa PM** (2007). SIZ1-mediated SUMOylation of ICE1 controls *CBF3/DREB1A* expression and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 1403–1414.
- Miura K, Lee J, Miura T, Hasegawa PM** (2010). *SIZ1* controls cell growth and plant development in *Arabidopsis* through salicylic acid. *Plant Cell Physiol* **51**, 103–113.
- Miura K, Rus A, Sharkhuu A, Yokoi S, Karthikeyan AS, Raghothama KG, Baek D, Koo YD, Jin JB, Bressan RA, Yun DJ, Hasegawa PM** (2005). The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 7760–7765.
- Morrell R, Sadanandom A** (2019). Dealing with stress: a review of plant SUMO proteases. *Front Plant Sci* **10**, 1122.
- Niu D, Lin XL, Kong XX, Qu GP, Cai B, Lee J, Jin JB** (2019). SIZ1-mediated SUMOylation of TPR1 suppresses plant immunity in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **12**, 215–228.
- Okada S, Nagabuchi M, Takamura Y, Nakagawa T, Shinmyozu K, Nakayama JI, Tanaka K** (2009). Reconstitution of *Arabidopsis thaliana* SUMO pathways in *E. coli*: functional evaluation of SUMO machinery proteins and mapping of SUMOylation sites by mass spectrometry. *Plant Cell Physiol* **50**, 1049–1061.
- Perry JJP, Tainer JA, Boddy MN** (2008). A SIM-ultaneous role for SUMO and ubiquitin. *Trends Biochem Sci* **33**, 201–208.
- Roy D, Sadanandom A** (2021). SUMO mediated regulation of transcription factors as a mechanism for transducing environmental cues into cellular signaling in plants. *Cell Mol Life Sci* **78**, 2641–2664.
- Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2006). Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 18822–18827.
- 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.
- Verma V, Srivastava AK, Gough C, Campanaro A, Srivastava M, Morrell R, Joyce J, Bailey M, Zhang CJ, Krysan PJ, Sadanandom A** (2021). SUMO enables substrate selectivity by mitogen-activated protein kinases to regulate immunity in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **118**, e2021351118.
- Wang FG, Liu YY, Shi YQ, Han DL, Wu YY, Ye WX, Yang HL, Li GW, Cui F, Wan SB, Lai JB, Yang CW** (2020). SUMOylation stabilizes the transcription factor DREB2A to improve plant thermotolerance. *Plant Physiol* **183**, 41–50.
- Wang Z, Prelich G** (2009). Quality control of a transcriptional regulator by SUMO-targeted degradation. *Mol Cell Biol* **29**, 1694–1706.
- Xu JM, Zhu JY, Liu JJ, Wang JX, Ding ZJ, Tian HY** (2021). SIZ1 negatively regulates aluminum resistance by mediating the STOP1-ALMT1 pathway in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol* **63**, 1147–1160.
- Zhang JJ, Lai JB, Wang FG, Yang SG, He ZP, Jiang JM, Li QL, Wu Q, Liu YY, Yu MY, Du JJ, Xie Q, Wu KQ, Yang CW** (2017). A SUMO ligase AtMMS21 regulates the stability of the chromatin remodeler BRAHMA in root development. *Plant Physiol* **173**, 1574–1582.
- Zheng Y, Schumaker KS, Guo Y** (2012). SUMOylation of transcription factor MYB30 by the small ubiquitin-like modifier E3 ligase SIZ1 mediates abscisic acid response

in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 12822–12827.

Zhou LJ, Zhang CL, Zhang RF, Wang GL, Li YY, Hao YJ

(2019). The SUMO E3 ligase MdSIZ1 targets MdbHLH104 to regulate plasma membrane H⁺-ATPase activity and iron homeostasis. *Plant Physiol* **179**, 88–106.

An Effective *in Vitro* SUMOylation Detection System for Plant Proteins

Junwen Huang[†], Qiyi Feng[†], Kaiyong Zheng[†], Junjie Huang, Linbo Wang, Ruiqiang Lai
Jianbin Lai, Chengwei Yang

Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

Abstract Protein SUMOylation is a key modification for regulating the fate of proteins and it is widely involved in plant development and stress responses. The SUMO molecules are conjugated to the lysine residues of substrate proteins via isopeptide bonds by enzyme reaction. SUMOylation is mediated by an enzyme cascade composed of a SUMO activating enzyme complex (E1), a SUMO-conjugating enzyme (E2) and usually a SUMO ligase (E3). Here, we report an efficient *in vitro* detection system for SUMOylation of plant proteins. We established a system for SUMOylation detection of plant proteins by reconstructing the *Arabidopsis* SUMOylation enzyme cascade in *Escherichia coli*. Using this system, SUMOylation of several substrates were detected via immunoblotting. Therefore, this system simplifies the SUMOylation detection of plant protein substrates and provides a powerful tool for functional analysis of SUMOylation in plant cells.

Key words SUMOylation, *in vitro*, detection system, plant

Huang JW, Feng QY, Zheng KY, Huang JJ, Wang LB, Lai RQ, Lai JB, Yang CW (2022). An effective *in vitro* SUMOylation detection system for plant proteins. *Chin Bull Bot* **57**, 490–499.

[†] These authors contributed equally to this paper

* Author for correspondence. E-mail: yangchw@scnu.edu.cn

(责任编辑: 朱亚娜)