

胡健健,梅文聪,张文慧,等.SCF泛素连接酶的体外泛素化体系构建与检测[J].华中农业大学学报,2024,43(2):273-279.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.02.030

SCF泛素连接酶的体外泛素化体系构建与检测

胡健健,梅文聪,张文慧,刘主

作物遗传改良全国重点实验室/湖北洪山实验室/华中农业大学生命科学技术学院,武汉 430070

摘要 为研究蛋白质的体外泛素化过程,利用大肠杆菌表达系统异源表达和纯化 APPBP1/UBA3 (E1)、UBC12 (E2)、Cullin1-Rbx1 (E3)和 Nedd8 (neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 8)蛋白,制备 FITC-Cysteine 绿色荧光素标记的泛素 Ub(Ubiquitin),构建了 SCF 泛素连接酶的体外泛素化体系,同时实现快速检测 SCF 泛素连接酶中 Cullin1 蛋白的自泛素化修饰。结果表明,建立的体外 SCF E3 自泛素化活性反应体系具有较高的可操作性和便利性。

关键词 SCF 泛素连接酶; 泛素化修饰; Cullin1 蛋白; 荧光标记

中图分类号 Q814 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)02-0273-07

SCF 复合物 (multisubunit SKP1/Cullin1/F-box, SCF)是一种被广泛研究的多亚基 E3 泛素连接酶,该复合物是最大的一个泛素化连接酶蛋白家族,由 SKP1、Cullin1 和 F-box 蛋白组成,这些蛋白质相互连接并执行不同的功能。人类、秀丽隐杆线虫和植物中分别有约 70、300 和 1 000 种 SCF 泛素连接酶^[1]。SCF 泛素连接酶在调节植物生长发育和生理机制等方面起着关键的作用,目前已有较多文献报道了它参与植物次生代谢、植物胁迫、植物激素信号传导和植物光形态建成等过程^[2-5]。当植物面临病原体的威胁时,利用 SCF 泛素连接酶复合物降解其自身防御反应的负调节蛋白或者病原体的蛋白质,从而抑制病原体入侵^[6-7]。SCF E3 连接酶在几种关键植物激素的感知和信号转导中起着重要作用,包括生长素、茉莉酸、三萜内酯、赤霉素和乙烯。例如,在水稻的独脚金内酯(strigolactone, SL)信号通路中,稳定的抑制显性矮秆突变体蛋白 DWARF53(D53)及其同系物在缺少 SLs 的情况下可以募集植物辅抑制因子 TPL/TPR 蛋白并抑制下游反应,在 SL 存在的情况下,独角金内酯受体 DWARF14(D14)蛋白感知 SLs 信号,触发 SCF 泛素连接酶介导 D53 蛋白泛素化,随后被蛋白酶体系统

降解,解除对下游反应的抑制^[8-10]。

蛋白质合成和降解之间的平衡对细胞生存和发育至关重要^[11-12]。蛋白质降解有 2 种主要途径:自噬和泛素蛋白酶体系统 (autophagy and ubiquitin-proteasome system)^[13]。自噬功能以溶酶体依赖的方式降解细胞中过量或异常的蛋白质,而泛素蛋白酶体系统以蛋白酶体依赖的方式特异性泛素化并降解错误折叠和受损的蛋白质。泛素蛋白酶体系统在真核生物中高度保守,对许多生物过程有重要作用。ATP 依赖的泛素偶联途径包括泛素激活酶 (ubiquitin activating enzyme, E1)、泛素偶联酶 (ubiquitin conjugating enzyme, E2) 和泛素蛋白连接酶 (ubiquitin ligase, E3),然后通过 26S 对蛋白进行降解^[14-16]。在所有真核生物中,SCF 泛素连接酶具有相似的模块化结构,Cullin 蛋白 (植物中的 Cullin1、Cullin3 和 Cullin4) 具有一个细长支架结构,在其一端与催化亚基 RBX1 相互作用,在另一端与底物受体亚基相互作用^[17-19]。SCF E3 复合物的关键特征是 Cullin 蛋白 C 末端一个保守的赖氨酸被 Nedd8 (neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 8) 共价修饰。SCF 复合物的形成和激活是一个受调控的过程,首先 SCF 复合物中的 Cullin 蛋白被 Ned-

收稿日期: 2023-03-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32071226)

胡健健, E-mail: hujianjian1130@foxmail.com

通信作者: 刘主, E-mail: liuzhu@mail.hzau.edu.cn

dylaton 修饰,被修饰后 SCF E3 复合物才能被激活^[20-21]。与泛素化过程一样,Neddylaton8 修饰与 Cullin 蛋白的结合是通过 E1 (APPBP1/UBA3)、E2 (UBC12)和 E3 (Cullin-Rbx)多酶级联来实现的^[22]。遗传学研究表明,Neddylaton8 修饰对体内 SCF E3 复合物的活性有重要影响^[22-24]。

建立体外泛素化修饰检测系统对于研究 E3 泛素连接酶在生长发育中的分子机制十分重要。然而,由于多亚基 SCF E3 泛素连接酶的组成比较复杂,获得具有活性的 E3 复合体组分存在较大困难,迄今为止,多亚基 SCF E3 泛素连接酶的体外活性检测体系尚不成熟。本研究构建 SCF 泛素连接酶的体外泛素化体系,实现快速检测 SCF 泛素连接酶中 Cullin1 蛋白的自泛素化修饰,旨在为研究 E3 连接酶的机制提供基础平台。

1 材料与方法

1.1 菌株

所用菌株为大肠杆菌 BL21(λ DE3)和 DH5 α ,其中目标蛋白的异源表达使用大肠杆菌 BL21(λ DE3),表达质粒的扩繁使用大肠杆菌 DH5 α 。

1.2 分子克隆

引物合成和重组质粒测序由武汉擎科生物有限公司完成,dNTP 购买于 New England Biolabs 公司,用于分子克隆的 *Pfu* 和 *Taq* 酶由华中农业大学作物遗传改良全国重点实验室蛋白质团队提供^[24]。DNA 产物回收试剂盒 (DP204-02)和质粒小提试剂盒 (DP103-02)购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.3 蛋白纯化试剂

1)镍亲和层析纯化缓冲液。

(1)细胞裂解液:25 mmol/L Tris (pH 8.0),150 mmol/L NaCl。

(2)漂洗缓冲液:25 mmol/L Tris (pH 8.0),150 mmol/L NaCl,15 mmol/L Imidazole (pH 8.0)。

(3)洗脱缓冲液:25 mmol/L Tris (pH 8.0),250 mmol/L Imidazole (pH 8.0)。

(4)再生缓冲液:500 mmol/L Imidazole (pH 8.0),500 mmol/L NaCl。

2)离子交换柱层析与分子筛试剂。

(1)高盐缓冲液 A buffer:25 mmol/L Tris pH 8.0,1mol/L NaCl。

(2)无盐缓冲液 B buffer:25 mmol/L Tris pH 8.0。

3)离子交换柱层析(Source Q10-100)纯化参数。在蛋白纯化仪(AKTA™ pure 25,GE Healthcare)上用 A buffer 和 B buffer 交替平衡层析柱,根据蛋白样品体积设置上样体积,将蛋白样品泵入层析柱,随后 A buffer 流洗 15 mL,设置洗脱体积为 100 mL,B buffer 范围为 0~100%,用 1.5 mL EP 收集蛋白样品并进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析。

4)分子筛(Superdex 200)纯化参数。35 mL 分子筛缓冲液(25 mmol/L Tris pH 8.0,200 mmol/L NaCl)平衡分子筛,将蛋白样品浓缩至 1 mL 后用 1 mL 注射器加入 loop 环中。运行蛋白纯化仪的程序,分子筛缓冲液流出 7 mL 后用 1.5 mL EP 收集蛋白样品并进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析。

1.4 FITC 标记 Ub 的制备

利用大肠杆菌表达系统表达与纯化 N 端融合 MSAC 4 个氨基酸的 Ub,将 FITC-Cysteine 绿色荧光素标记到 Ub 泛素链接到融合氨基酸的 Cys 残基上,泛素化修饰反应过程中 FITC-Ub 被转移到目标蛋白上,使用荧光扫描仪扫描体外泛素化反应蛋白的 SDS-PAGE 凝胶,实现对反应后 Ub 修饰情况的可视化表征。FITC 标记 Ub 的制备方法来自华中农业大学作物遗传改良全国重点实验室蛋白质团队,利用马来亚酰胺-巯基特异性的化学反应,其标记效率高、接近 100%^[26]。首先,表达纯化需要标记的 Ub 蛋白,切掉并去除纯化标签,更换缓冲液条件。将 Ub 蛋白脱盐至荧光标记缓冲液(磷酸缓冲液 pH 7.2~7.3),并对蛋白进行定量。其次,将终浓度为 300 μ mol/L 的 FITC-Cysteine 染料与终浓度为 100 μ mol/L 的 Ub 蛋白按照物质的量 3:1 的比例混合孵育,于 25 °C 标记 2 h 后加入 10 mmol/L DTT 终止反应。通过脱盐柱处理去除多余荧光染料,同时将 FITC 标记的 Ub 转移至后续反应的缓冲液条件中,进行蛋白浓度定量。

1.5 主要仪器

蛋白纯化仪(AKTA™ pure 25,GE Healthcare)、低温超高压细胞破碎机(广州聚能生物科技股份有限公司,JN-02)、高速冷冻离心机(贝克曼库尔特公司,Avanti JXN-26)、大容量离心机(美国 Beckman Coulter 公司,J6-M1)、蛋白垂直电泳仪(Bio-Rad,Mini-PROTEAN)、激光共聚焦成像仪(美国 cytiva)。

1.6 大肠杆菌培养

从 -80 °C 冰箱取出 BL21(λ DE3)加入 1 μ L 重组

质粒混匀,冰上孵育 30 min,42 °C 热激 90 s,加入 200 μ L 复苏液于 37 °C、200 r/min 复苏 1 h。后接入 10 mL 具有载体抗性的液体培养基中,培养过夜;第 2 天将 50% 的甘油和菌液以 1:1 的体积比混合,-80 °C 冻存,保存菌株。剩余菌液按照菌液:培养基以 1:100 的体积比于 37 °C、200 r/min 培养 4.0~4.5 h。大肠杆菌培养至 $OD_{600}=1\sim 1.2$ 时,培养温度调至 16 °C,1 h 后加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG,过夜培养 14~16 h。

1.7 蛋白纯化

经过 IPTG 诱导的大肠杆菌 3 300 r/min 离心 20 min,弃上清保留沉淀,每 1 L 菌液的沉淀用 20~30 mL 细胞裂解液悬浮。用高压细胞破碎仪破碎菌体,重复进行 2 次。破碎的菌液加入 BeckMan 高速离心管中,4 °C 14 000 r/min 离心 1 h,取上清。表达的蛋白 N 端融合 6 \times His 标签蛋白,用 Ni 柱亲和层析对目的蛋白进行初步纯化,随后进一步使用 SourceQ 10-100 进行纯化。纯化的蛋白用于体外泛素化反应。

1.8 体外自泛素化反应

1) Cullin1-Rbx1 复合物 Nedd8 修饰。按照表 1 将蛋白加入到反应体系中,Nedd8 加入蛋白量为 Cullin1-Rbx1 的 2 倍。反应总体积为 200 μ L,于室温反应 30 min,随后将反应产物经离子交换层析 Source Q10-100 和分子筛 Superdex 200 纯化得到 Nedd8 修饰的 Cullin1-Rbx1 复合物,收集蛋白用于 Cullin1-Rbx1 复合物的自泛素化修饰反应。

表 1 Cullin1-Rbx1 复合物 Nedd8 修饰反应体系

Table 1 Nedd8 modified Cullin1-Rbx1 complex

反应组分 Reaction components	终浓度/ $(\mu\text{mol/L})$ Final concentration
APPBP1/UBA3	0.4
UBC12	2.0
Cullin1-Rbx1	5.0
Nedd8	10.0
ATP	5 000
MgCl ₂	10 000

2) Cullin1-Rbx1 复合物泛素化修饰。按照表 2 将 Nedd8 修饰的 Cullin1-Rbx1 复合物以及其他蛋白加入到反应体系中,总体积为 100 μ L,37 °C 反应,分别在反应 0、15、30、60、90 min 取样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,随后使用激光共聚焦成像仪对蛋白胶进行扫描分析。

表 2 Cullin1-Rbx1 复合物自泛素化修饰反应体系

Table 2 Self-ubiquitination of the Cullin1-Rbx1 complex

反应组分 Reaction components	终浓度/ $(\mu\text{mol/L})$ Final concentration
UBA1	1
UBCH7	1
N8-Cullin3-Rbx1	2
FITC-Ub	4
ATP	5 000
MgCl ₂	10 000

2 结果与分析

2.1 蛋白的表达纯化

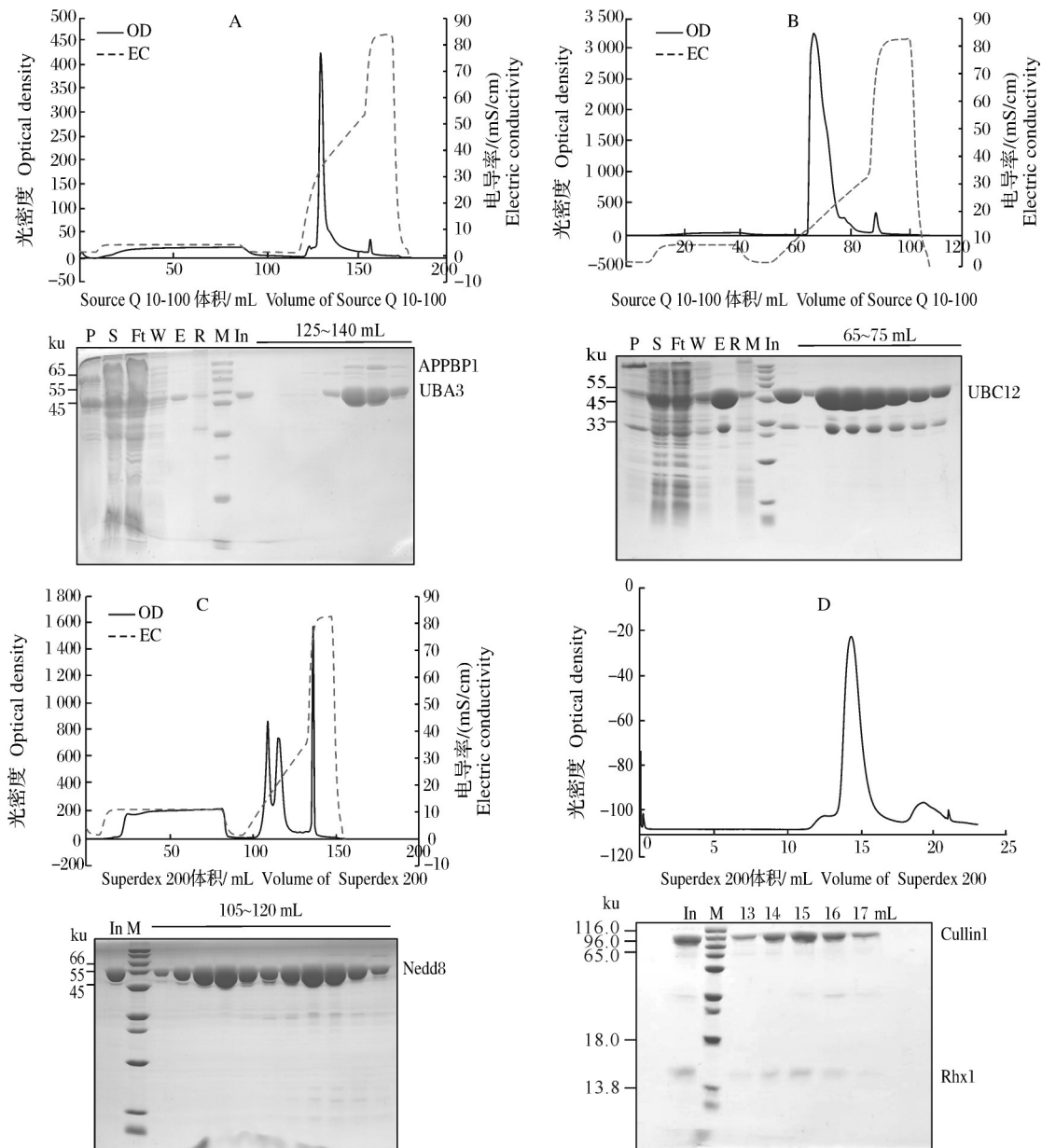
大肠杆菌表达系统异源表达纯化 Cullin1-Rbx1 复合物的自泛素化修饰所需的 APPBP1/UBA3、UBC12、Cullin1-Rbx1 和 Nedd8 4 种蛋白如图 1 所示,大肠杆菌表达的蛋白经镍柱亲和层析和离子交换层析(Source Q 10-100)纯化,4 种蛋白纯度较高、性质稳定,可用于 Cullin1-Rbx1 复合物的体外自泛素化修饰反应。

2.2 Cullin1-Rbx1 复合物的 Nedd8 修饰

Cullin1-Rbx1 复合物功能的活化需要其核心亚基 Cullin1 发生 Nedd8 修饰,Cullin1 蛋白 C 端保守的赖氨酸位点被类泛素小分子 Nedd8 修饰,从而改变 Cullin1-Rbx1 复合物的构象并激活其泛素连接酶的活性。反应体系中加入 Cullin1-Rbx1 复合物、E1(APPBP1/UBA3)、E2(UBC12)、Nedd8 蛋白以及 ATP、MgCl₂,室温反应 30 min。其 SDS-PAGE 结果显示,Cullin1-Rbx1 复合物中的 Cullin1 蛋白被 Nedd8 修饰,被修饰的 Cullin1-Rbx1 复合物经过阴离子交换层析(Source Q 10-100)和分子筛(Superdex 200)纯化后得到蛋白性质稳定、纯度较高的 Nedd8 修饰 Cullin1-Rbx1 复合物。

2.3 Cullin1-Rbx1 复合物的自泛素化修饰

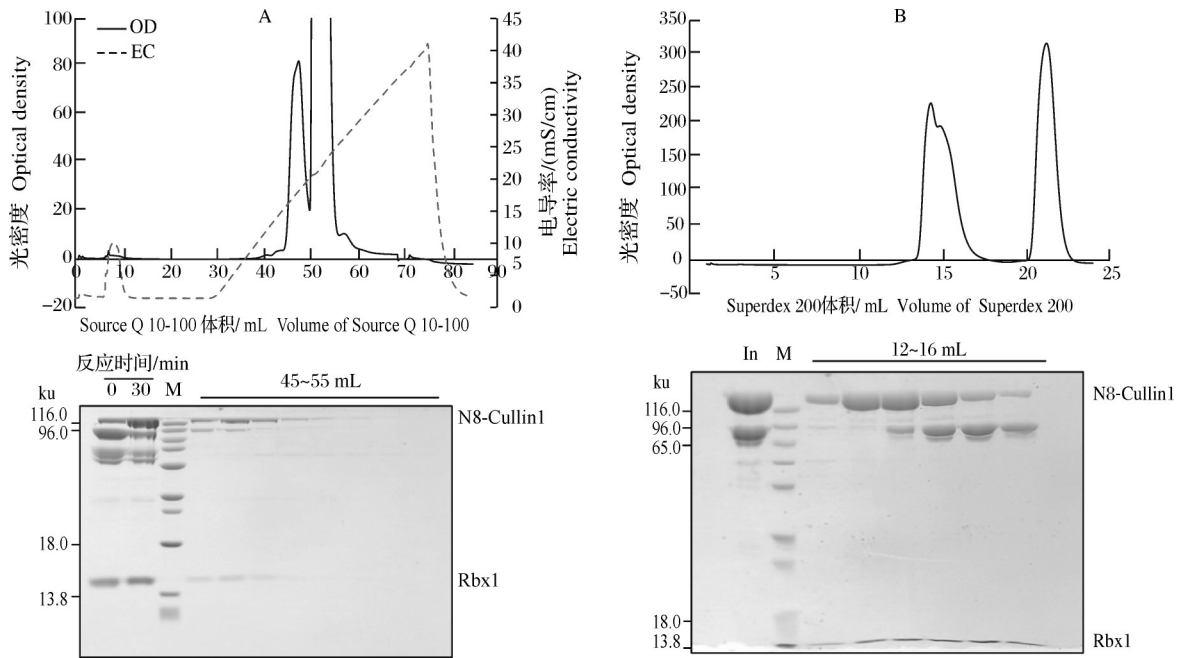
为了实现对 N8-Cullin1-Rbx1 复合物自泛素化修饰的可视化表征,反应体系中使用 FITC 标记的 Ub。SDS-PAGE 凝胶考马斯亮蓝染色结果以及激光共聚焦成像仪扫描的 SDS-PAGE 凝胶荧光图显示,随着反应时间延长,反应体系中 N8-Cullin1-Rbx1 复合物的单泛素化水平显著升高,而阴性对照组(CK 组,反应体系中未加 ATP,反应 90 min)却没有被泛素化修饰的现象。表明本研究在体外成功构



A、B、C和D分别是E1(APPBP1/UBA3, APPBP1和UBA3分子质量分别为86、52 ku)的离子交换层析峰图和SDS-PAGE胶图、E2(UBC12,分子质量为21 ku)的离子交换层析峰图和SDS-PAGE胶图、Nedd8蛋白(分子质量为48.6 ku)的离子交换层析峰图和SDS-PAGE胶图、Cullin1-Rbx1(Cullin1分子质量为90 ku,Rbx1分子质量为12.3 ku)复合物的分子筛图和SDS-PAGE胶图。P:大肠杆菌裂解离心的沉淀;S:大肠杆菌裂解离心的上清;Ft:菌液穿流后的样品;W:流洗的杂蛋白;E:洗脱的蛋白样品;R:重悬介质的样品;In:纯化前的蛋白;M:蛋白 marker。A、B、C和D are E1 (APPBP1/UBA3) in ion exchange chromatography peak image and SDS PAGE (The molecular weight of APPBP1/UBA3 was 86/52 ku), E2 (UBC12) in ion exchange chromatography peak image and SDS PAGE (The molecular weight of UBC12 was 21 ku), Nedd8 protein in ion exchange chromatography peak image and SDS PAGE (The molecular weight of Nedd8 was 48.6 ku), Cullin1-Rbx1 in size exclusion chromatography peak image and SDS PAGE (The molecular weight of Cullin1-Rbx1 was 102.3 ku), respectively. P represents the precipitate after lysis of *Escherichia coli*; S represents the supernatant obtained after lysis of *E. coli*; Ft represents the sample after bacterial liquid flow through; W represents the sample obtained when eluting impurity proteins; E represents the eluted protein sample; R indicates samples in resuspended medium; In indicates samples before purification; M indicates protein marker.

图1 Cullin1-Rbx1复合物的自泛素化修饰所需蛋白的体外表达纯化

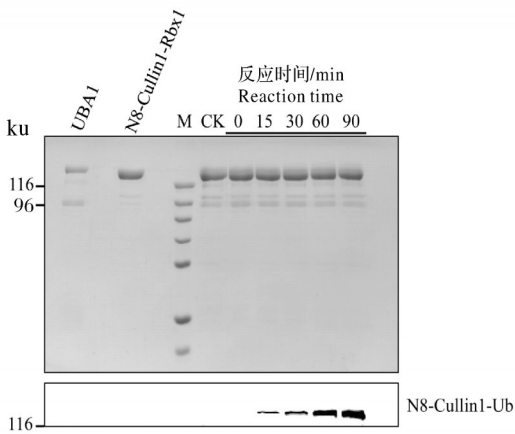
Fig.1 *In vitro* expression and purification of messenger molecule synthase



A: Neddylated modified Cullin1-Rbx1 complex in ion exchange chromatography peak image and SDS PAGE gel image (The molecular weight of Neddylated modified Cullin1-Rbx1 was 138.6 ku); B: Neddylated modified Cullin1-Rbx1 complex in size exclusion chromatography peak image and SDS PAGE; In indicates samples before purification ;M indicates protein marker.

图 2 Neddylated 修饰的 Cullin1-Rbx1 复合物纯化

Fig.2 Purification of Neddylated modified Cullin1-Rbx1 complex



上图为 Cullin1-Rbx1 复合物的自泛素化修饰的 SDS-PAGE 胶图 (N8-Cullin1-Rbx1-Ub 分子质量为 147.2 ku), 下图为 Cullin1-Rbx1 复合物的自泛素化修饰的荧光扫描图; M: 蛋白 marker。Self-ubiquitination of the Cullin1-Rbx1 complex in SDS-PAGE (illustrated above); Self-ubiquitination of the Cullin1-Rbx1 complex in immunofluorescence (image below); M indicates protein marker.

图 3 Cullin1-Rbx1 复合物的自泛素化修饰

Fig.3 Self-ubiquitination modification of the Cullin1-Rbx1 complex

建了 SCF 泛素连接酶中的 Cullin1 蛋白的自泛素化体系。

3 讨论

蛋白质泛素化修饰需要 E1、E2 和 E3 的协同作用,且反应过程较为复杂。现有研究体外泛素化过程的方法主要是使用 Western blot 的方法检测蛋白质的泛素化修饰,该方法使用 Ub 抗体检测修饰在蛋白质上的 Ub。然而,Western blot 检测周期长、操作过程复杂^[27-30]。为了便于研究蛋白质的泛素化,我们以 Cullin1-Rbx1 蛋白为例,在体外重构了多亚基 SCF E3 连接酶的自泛素化活性体系,结果表明建立的体外 SCF E3 自泛素化活性反应体系具有较高的可操作性和便利性,为研究真核生物中 E3 连接酶的机制提供了实用工具。该方法可以进一步应用于研究 SCF E3 的自泛素化。SCF E3 蛋白的自泛素化修饰是为了使细胞能够快速适应不断变化的生理条件以及细胞周期的不同阶段,而关于 SCF E3 蛋白的自泛素化修饰机制的研究目前还不充分。本研究建立的方法将为探究真核生物中多亚基 SCF E3 连接酶

的自泛素化机制提供一个有利的平台,同时为研究不同的SCF E3连接酶甚至其他类型的多亚单位E3连接酶供理论依据。

参考文献References

- [1] HUA Z H, VIERSTRA R D. The cullin-RING ubiquitin-protein ligases [J]. *Annual review of plant biology*, 2011, 62: 299-334.
- [2] ABD-HAMID N A, AHMAD-FAUZI M I, ZAINAL Z, et al. Diverse and dynamic roles of F-box proteins in plant biology [J/OL]. *Planta*, 2020, 251 (3) : 68 [2023-03-30]. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03356-8>.
- [3] SAXENA H, NEGI H, SHARMA B. Role of F-box E3-ubiquitin ligases in plant development and stress responses [J]. *Plant cell reports*, 2023, 42(7):1133-1146.
- [4] STONE S L. Ubiquitin ligases at the nexus of plant responses to biotic and abiotic stresses [J]. *Essays in biochemistry*, 2022, 66(2):123-133.
- [5] 董杰, NI Weimin, YU Renbo, 等. E3泛素连接酶SCFEBF1/2通过降解PIF3促进植物的光形态建成[J]. *科学新闻*, 2018 (4) : 111. DONG J, NI W M, YU R B, et al. Light-dependent degradation of PIF3 by SCF^{EBF1/2} promotes a photomorphogenic response in *Arabidopsis* [J]. *Science news*, 2018(4) : 111 (in Chinese).
- [6] CITOVSKY V, ZALTSMAN A, KOZLOVSKY S V, et al. Proteasomal degradation in plant-pathogen interactions [J]. *Seminars in cell & developmental biology*, 2009, 20(9):1048-1054.
- [7] ZENG L R, VEGA-SÁNCHEZ M E, ZHU T, et al. Ubiquitination-mediated protein degradation and modification: an emerging theme in plant-microbe interactions [J]. *Cell research*, 2006, 16(5):413-426.
- [8] CHEN R Z, DENG Y W, DING Y L, et al. Rice functional genomics: decades' efforts and roads ahead [J]. *Science China life sciences*, 2022, 65(1):33-92.
- [9] SHABEK N, TICCHIARELLI F, MAO H B, et al. Structural plasticity of D3-D14 ubiquitin ligase in strigolactone signalling [J]. *Nature*, 2018, 563(7733):652-656.
- [10] YAO R F, MING Z H, YAN L M, et al. DWARF14 is a non-canonical hormone receptor for strigolactone [J]. *Nature*, 2016, 536(7617):469-473.
- [11] DIKIC I. Proteasomal and autophagic degradation systems [J]. *Annual review of biochemistry*, 2017, 86:193-224.
- [12] WANG Z V, HILL J A. Protein quality control and metabolism: bidirectional control in the heart [J]. *Cell metabolism*, 2015, 21(2):215-226.
- [13] CIECHANOVER A, KWON Y T. Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies [J/OL]. *Experimental & molecular medicine*, 2015, 47(3):e147 [2023-03-30]. <https://doi.org/10.1038/emmm.2014.117>.
- [14] AMBROGGIO X I, REES D C, DESHAIES R J. JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome [J]. *PLoS biology*, 2004, 2(1):113-119.
- [15] SMALLE J, VIERSTRA R D. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway [J]. *Annual review of plant biology*, 2004, 55:555-590.
- [16] WEISSMAN A M. Themes and variations on ubiquitylation [J]. *Nature reviews molecular cell biology*, 2001, 2 (3) : 169-178.
- [17] BOSU D R, KIPREOS E T. Cullin-RING ubiquitin ligases: global regulation and activation cycles [J/OL]. *Cell division*, 2008, 3:7 [2023-03-30]. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-3-7>.
- [18] DESHAIES R J. SCF and cullin/ring H2-based ubiquitin ligases [J]. *Annual review of cell and developmental biology*, 1999, 15:435-467.
- [19] PETROSKI M D, DESHAIES R J. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases [J]. *Nature reviews molecular cell biology*, 2005, 6(1):9-20.
- [20] HORI T, OSAKA F, CHIBA T, et al. Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8 [J]. *Oncogene*, 1999, 18(48):6829-6834.
- [21] PAN Z Q, KENTSIS A, DIAS D C, et al. Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction [J]. *Oncogene*, 2004, 23(11):1985-1997.
- [22] HOCHSTRASSER M. All in the ubiquitin family [J]. *Science*, 2000, 289(5479):563-564.
- [23] OU C Y, LIN Y F, CHEN Y J, et al. Distinct protein degradation mechanisms mediated by Cul1 and Cul3 controlling Ci stability in *Drosophila* eye development [J]. *Genes & development*, 2002, 16(18):2403-2414.
- [24] PINTARD L, WILLIS J H, WILLEMS A, et al. The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase [J]. *Nature*, 2003, 425(6955):311-316.
- [25] 陈传玉, 谭樊杰, 殷平, 等. 酶法体外高效制备信号分子(pp)pGpp [J]. *华中农业大学学报*, 2022, 41 (4) : 271-278. CHEN C Y, TAN F J, YIN P, et al. Efficient preparation of signal molecule (pp)pGpp *in vitro* by enzymatic method [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2022, 41 (4) : 271-278 (in Chinese with English abstract).
- [26] LIU Z, DONG X, YI H W, et al. Structural basis for the recognition of K48-linked Ub chain by proteasomal receptor Rpn13 [J/OL]. *Cell discovery*, 2019, 5:19 [2023-03-30]. <https://doi.org/10.1038/s41421-019-0089-7>.
- [27] LIU H H, LIU S M, YU H, et al. An engineered platform for reconstituting functional multisubunit SCF E3 ligase *in vitro*

- [J].Molecular plant,2022,15(8):1285-1299.
- [28] ZHOU J Z,LIANG Q,DONG M G, et al.Optimized protocol to detect protein UFMylation in cells and *in vitro* via immunoblotting[J/OL].STAR protocols,2022,3(1):101074[[2023-03-30]].<https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.101074>.
- [29] 赵庆臻,刘利静,谢旗,等.植物蛋白的体外泛素化检测方法[J].植物学报,2019,54(6):764-772.ZHAO Q Z,LIU L J,XIE Q, et al.*In vitro* ubiquitination assay for plant proteins[J].Chinese bulletin of botany,2019,54(6):764-772 (in Chinese with English abstract).
- [30] 刘利静,赵庆臻,谢旗,等.快速高效检测植物体内蛋白泛素化修饰研究方法[J].植物学报,2019,54(6):753-763.LIU L J,ZHAO Q Z,XIE Q, et al.An quick and efficient assay for *in vivo* protein ubiquitination[J].Chinese bulletin of botany,2019,54(6):753-763 (in Chinese with English abstract).

Constructing and detecting ubiquitination system of SCF E3 ligase *in vitro*

HU Jianjian,MEI Wencong,ZHANG Wenhui,LIU Zhu

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement/Hubei Hongshan Laboratory/
College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Covalent attachment of ubiquitin onto lysine residues of the substrate requires the coordinated action of three classes of enzymes: the E1 ubiquitin-activating enzymes, the E2 ubiquitin-conjugating enzymes, and the E3 ubiquitin ligases. These ubiquitination-related proteins play a pivotal role in plant development and plant physiology. The APPBP1/UBA3 (E1), UBC12 (E2), Cullin1-Rbx1 (E3) and Nedd8 were used to reconstitute SCF E3 ligase activity *in vitro* to study protein ubiquitination *in vitro*. Ub (Ubiquitin) labeled with FITC-Cysteine green fluorescein was prepared. The ubiquitination system of SCF ubiquitin ligase *in vitro* was constructed. The self-ubiquitination modification of Cullin1 protein in SCF ubiquitin ligase was rapidly detected. The results showed that the autoubiquitination active reaction system of SCF E3 *in vitro* established has high operability and convenience.

Keywords ubiquitination; SCF E3 ligase; Cullin1; fluorescence labeling

(责任编辑:张志钰)