

水稻 U-Box 蛋白质在不同发育时期的表达分析*

陈浩¹⁾ 李莉云¹⁾ 白辉^{2, 3)} 曹英豪¹⁾ 王宪云¹⁾ 刘国振^{1, 2)**}

(¹⁾河北农业大学生命科学学院, 保定 071001; ²⁾中国科学院北京基因组研究所, 北京 100029; ³⁾中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 真核生物基因组中广泛存在 U-Box 基因, 其编码蛋白大部分是泛素系统中决定底物特异性识别的 E3 蛋白, 其构象与 RING-finger 极其相似。U-Box 蛋白质能促进底物蛋白泛素化降解, 对细胞内异常蛋白的降解及质量控制方面发挥着重要的作用。水稻基因组中有 77 个 U-Box 蛋白质, 系统了解它们的表达可为功能研究提供数据。制备针对水稻 U-Box 蛋白质的抗体, 了解水稻中 U-Box 蛋白质在不同发育时期的表达信息, 为功能研究积累数据。选取了 4 个水稻 U-Box 蛋白质, 其共同结构特点为 U-Box 结构在 N 端, C 端有 ARM 结构。用计算机软件预测抗原决定簇, 细菌体系体外表达、纯化 U-Box 蛋白质的片段, 免疫动物制备多克隆抗体, 用 Western blotting 检测 U-Box 蛋白质在水稻品种 93-11 苗期地上部和地下部、分蘖期根和茎、孕穗期剑叶和幼穗、开花期剑叶和穗子、成熟期剑叶和种子中的表达, 并与 EST 数据库中公布的 U-Box 蛋白质 EST 数据进行了比较分析。体外克隆表达后, 获得了纯化的蛋白质, 制备的抗体特异性强, 蛋白质印迹(Western blotting)检测可见一条明显的主带, 其中 Os06g01304 和 Os12g38210 两个蛋白质的表观分子质量与预测分子质量相符, Os01g66130 和 Os08g01900 两个蛋白质的表观分子质量低于预测分子质量。4 个 U-Box 蛋白质在水稻生长发育的不同时期或部位基本上是组成型表达, 且表达量接近。对 NCBI 上公布的来自 274 个文库 100 万条以上的 EST 进行分析, 可以看出 4 个 U-Box 蛋白质 EST 的数量分布大致均匀, 与 Western blotting 结果揭示的组成型表达平行, 与 ATPase、HSP81-3、EGF-1 alpha 和 RuBisCo 等对照基因相比, U-Box 基因的 EST 数目相对很少, 说明它们属于低丰度转录的基因。选取了 4 个水稻 U-Box 蛋白质, 通过抗原决定簇预测, 表达片段蛋白, 制备了特异性抗体, 证明了这一技术路线的可行性。利用抗体对水稻不同发育时期材料进行蛋白质表达谱研究, 发现这些 U-Box 蛋白质呈组成型表达, 与 EST 数据揭示的结果具有平行性。所制备的抗体也为相关功能研究, 如免疫共沉淀、ChIP-on-chip、Pull-down 以及在抗病、抗逆反应中 U-Box 蛋白质的表达等, 积累了资源。

关键词 水稻, U-Box, 蛋白质表达, 蛋白质印迹

学科分类号 Q5, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00075

水稻(*Oryza sativa* L.) 是世界上最重要的粮食作物之一, 是世界上约一半人口的主要食物, 水稻也是研究作物产量、转基因、杂种优势、植物病虫害抗性和其他逆境的重要遗传材料和模式植物。系统获得基因组序列^[1]、转录谱和蛋白质表达信息以及它们之间的相互关系将是了解水稻基因功能的重要步骤。

真核生物基因组中广泛存在 U-Box 基因, 其编码蛋白大部分是泛素系统中决定底物特异性识别的一种新型 E3 蛋白, 也有部分 U-Box 蛋白质属于泛素链聚集因子 E4^[2], 其构象与 RING-finger 极其相似, 两者都能促进底物蛋白泛素化降解, 在细胞内异常蛋白的降解及质量控制方面发挥着重要的作用。据报道, 植物 U-Box 蛋白质在抵抗干旱、高

盐、异常温度等非生物胁迫时发挥作用, 也有越来越多的证据表明 U-Box 蛋白质与植物的抗病相关。拟南芥的 *AtPUB9* 与 ABA(abscisic acid)信号相关^[3]; *CMPG1* 在烟草(*Nicotiana benthamiana*)与番茄(*Solanum lycopersicum*)中参与多个抗病基因介导的抗性反应^[4]; 超表达拟南芥的 *PUB22* 和 *PUB23* 使其对干旱胁迫的敏感性增加^[5]; *CaPUB1* 是辣椒

* 国家自然科学基金(30730007, 30670175, 30221004)和国家重点基础研究发展计划(973)(2006CB101706)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0312-7528787, E-mail: gzhlui@genomics.org.cn

收稿日期: 2009-02-10, 接受日期: 2009-03-27

(*Capiscum annuum*) 中一个 U-Box 蛋白质, 在拟南芥中超表达后植株的耐盐性增加^[6]。

对基因组序列信息的分析揭示出在水稻中有 77 个带有 U-Box 结构的基因^[7], 为了对水稻中 U-Box 蛋白质的表达有所了解, 进而探讨其功能, 本文针对 4 个 U-Box 蛋白质, 表达纯化了预测的抗原决定簇片段, 制备了相应的抗体, 用 Western blotting 技术获得了水稻不同发育时期 U-Box 蛋白质的表达信息。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻(品种 93-11), 水稻 cDNA 文库, pET-30a 表达载体, 大肠杆菌菌株 DH5 α 、ER2566 等由河北农业大学生命科学院分子生物学实验室保存, 限制性内切酶 *Eco*R I、*Bgl* II、*Hind* III 购自 NEB 公司, Ex Taq DNA 聚合酶购自 TAKARA 公司。

1.2 抗原决定簇预测及 PCR 扩增

用 BEPITOPE 软件对候选基因编码的蛋白质进行抗原决定簇的预测, 选出抗原决定簇峰值较高的片段后, 用 BLASTP 对水稻蛋白质库进行唯一性检测后选出目标片段。根据 TIGR 数据库公布的待克隆目标片段序列设计引物, 所用引物序列如下(下划线是外加的酶切位点): Os01g66130F, GGAAATTCCCTGTAAACTCTTGAGTTTG; Os01g66130R, CCCAAAGCTTTGCATTGATGTCACCTTGATGCT; Os06g01304F, GGAAATTCGCGCTCCCGGAGCCGCGTGG; Os06g01304R, CCCAAAGCTTCAGCTTGTGAGAGATCCTGGTGAG; Os08g01900F, GGAAATTCATGGAAAATTTCTCCCCGAGA; Os08g01900R, CCCAAAGCTTTCAATAAAGGTCAGCTTCCGG; Os12g38210F, GAAGATCTGATGAAAAAGTTTCAGGGAGTAAT; Os12g38210R, CCCAAAGCTTTCATACAACCATAGGGTATTGAG。PCR 的反应体系为 50 μ l, 包括: cDNA 文库质粒或基因组 DNA 约 10 ng, 10 $\times$ Ex Taq 缓冲液 5 μ l, dNTPs 0.25 mmol/L, 引物 0.1 μ mol/L, Ex Taq 酶 1 U。扩增的程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 PCR 产物 2 μ l 检测。

1.3 基因克隆及蛋白质表达纯化

将 PCR 产物与载体 pET-30a 分别进行双酶切, 胶回收酶切产物、连接转化大肠杆菌 DH5 α , 质粒

酶切验证后送北京华大基因研究中心进行测序验证。测序正确的重组子质粒转化表达菌 ER2566, 将平板在 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 16 h, 挑取单菌落到 LB+Kan50(Kan 含量为 50 mg/L)液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养, 次日按 1:100 的比例将过夜菌转接至 LB+Kan50+1%葡萄糖液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 A_{600} 为 0.7, 加入 0.1 mol/L IPTG 于 37 $^{\circ}$ C 震荡培养 2 h, 取诱导的菌液检测表达情况, 然后进行融合蛋白的大量表达及纯化。

1.4 多克隆抗体制备

将纯化的融合蛋白送北京华大蛋白质研发中心有限公司免疫新西兰大白兔, 耳静脉取血测效价, 效价达要求后颈动脉取血, 离心收集多抗血清。

1.5 水稻蛋白质的提取及 Western blotting 检测

用液氮研磨新鲜水稻组织至粉末状, 分装到预冷离心管中, 每 300 μ l 粉末加入 800 μ l 蛋白质裂解液(62.5 mmol/L pH7.4 Tris $\cdot$ HCl, 10% 甘油, 2% SDS, 20 mmol/L NaF, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF, 5% β -巯基乙醇), 迅速混匀并置于冰上, 冰水混合物中孵育 10 min, 期间震荡混匀 4~5 次, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 转移到新的 1.5 ml 离心管中, -70 $^{\circ}$ C 保存。将提取的水稻蛋白质进行 SDS-PAGE 后电转移到 PVDF 膜上, 用 5%脱脂奶粉封闭 PVDF 膜, 用制备的抗体室温孵育 3 h, TTBS(2 mmol/L Tris $\cdot$ HCl pH7.6, 13.6 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20)洗膜 3 次, 每次 5 min, 之后加入羊抗兔二抗室温孵育 1 h, TTBS 洗膜 3 次, 每次 5 min, 加 ECL Plus 检测液检测, 暗室曝光 5 min。用针对靶蛋白的抗体完成检测后, 加入 HSP82 单克隆抗体, 之后用羊抗鼠二抗检测作为等量加样的标准。

1.6 水稻 4 个 U-Box 基因的 EST 测序结果分析

与 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) EST (expressed sequence tags)数据库进行比对, 分析了 4 个 U-Box基因及对照基因的转录情况, 选定目标 EST 标准如下^[8]: a. EST 匹配长度大于 EST 长度的 80%; b. EST 完全匹配上的长度不小于匹配长度的 97%; c. 匹配中不能含连续 3 个 gaps。

1.7 Western blotting 的相对定量分析

用 ImageMaster 2D Platinum 软件采集 Western blotting 图像信号, 获得目标条带信号强度与 HSP82 信号强度的比值, 将最大值设为 100, 比较得到其他样品的相对数值作图。

2 结 果

2.1 水稻 U-Box 基因序列的获得和抗原决定簇预测

在 TIGR 水稻数据库上筛选 U-Box 结构(Pfam Acc: PF04564)的蛋白质, 挑取了 4 个 U-Box 蛋白质, LOCUS 号分别为: Os01g66130、Os06g01304、

Os08g01900 和 Os12g38210, 它们的共同结构特点为 U-Box 结构在 N 端, C 端有 ARM 结构. 各蛋白质抗原决定簇的选择如图 1 所示, 最终确定克隆的片段在 CDS 上的位置依次为: Os01g66130, 901~1 350 bp, Os06g01304, 30~480 bp, Os08g01900, 1~1 050 bp, Os12g38210, 100~480 bp.

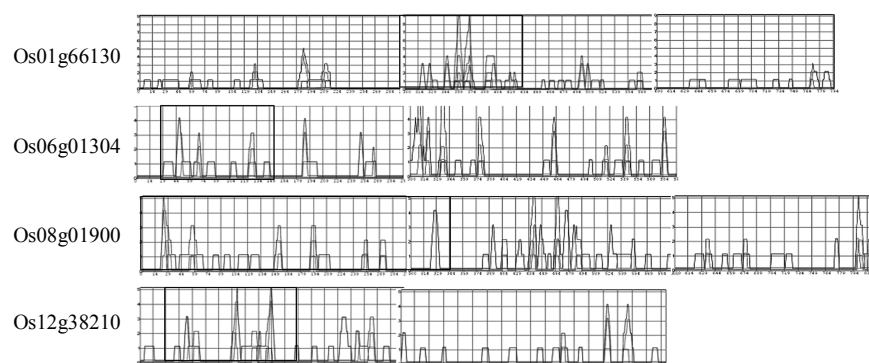


Fig. 1 The epitope prediction and fragment selection of U-Box proteins

Fragments being selected were indicated by boxed region.

2.2 目标蛋白的表达及抗体鉴定

以水稻基因组或 cDNA 文库质粒为模板, 用设计的引物进行 PCR 扩增, 扩增产物的大小符合预期, 将扩增产物克隆后, 再经测序确认. 将表达质粒转入大肠杆菌 ER2566, IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 分离, 图 2a, b 所示为 4 个蛋白质的诱导、表达和纯化结果, 由图 2 可见, 4 个纯化蛋白

质的纯度在 95% 以上, 洗脱后浓度约为 2 g/L, 可以满足制备抗体的要求. 为了验证抗体的特异性和结合强度, 用抗体对重组抗原进行了 Western blotting 检测(图 2c), 结果表明, 所制备的抗体均能正确、特异地识别重组抗原, 抗体使用浓度在 1:5 000~1:2 500 之间, 证明抗体可用.

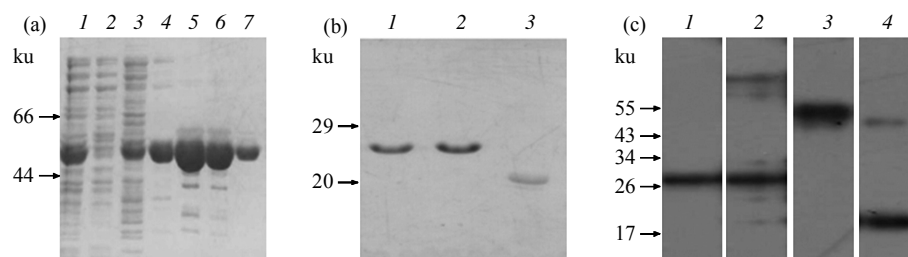


Fig. 2 The purification and Western blotting verification of rice U-Box proteins fragments

(a) Purification of Os08g01900 protein fragment. 1: Lysate; 2: Effluent; 3: Eluted with 15 mmol/L imidazole; 4: Eluted with 60 mmol/L imidazole; 5~7: Eluted with 300 mmol/L imidazole. (b) Purifications of U-Box protein fragment. 1: Os01g66130; 2: Os06g01304; 3: Os12g38210. (c) Western blotting verification of U-Box protein-specific antibodies. 1: Os01g66130; 2: Os06g01304; 3: Os08g01900; 4: Os12g38210.

2.3 水稻不同发育时期 U-Box 蛋白质的表达分析

选取水稻 93-11 不同发育阶段和不同部位的组织, 提取总蛋白后, 利用制备的抗体进行 Western

blotting 检测. 选取的水稻组织为: 苗期地上部和地下部、分蘖期根和茎、孕穗期剑叶和幼穗、开花期剑叶和穗子、成熟期剑叶和种子, 用针对 HSP82

蛋白抗体的 Western blotting 结果作为等量加样的内标。

用 Os01g66130 抗体检测水稻不同组织的蛋白质表达(图 3a), Western blotting 可见一条表观分子质量约 70 ku 的条带, 预测的 Os01g66130 编码蛋白质分子质量为 87 ku。该蛋白质在分蘖期的根和茎中的表达量最高, 在苗期和成熟期表达量较低, 此外, 在开花期穗子中, 有一条分子质量较低的条带, 可能是 Os01g66130 基因的一个分子质量较小的转录本。

用 Os06g01304 抗体检测水稻不同组织的蛋白质表达(图 3b), Western blotting 可见一条分子质量约为 65 ku 的主带, 与预测的蛋白质分子质量吻合, 在苗期地上部、分蘖期茎、孕穗期幼穗和开花期穗子表达量比较接近, 而在开花期的剑叶中表达量极低, 但较低分子质量的条带信号较强。

用 Os08g01900 抗体检测水稻不同组织的蛋白质表达(图 3c), Western blotting 可见一条分子质量

约为 50 ku 的条带, 而预测的目的蛋白分子质量为 89 ku, 目标蛋白在参试各材料中都有表达且表达量大致接近, 而在穗子及种子中表达量稍高。

用 Os12g38210 抗体检测水稻不同组织的蛋白质表达(图 3d), Western blotting 可见一条分子质量约为 60 ku 的条带, 与预测的目的蛋白分子质量吻合, 该蛋白质在根中表达量较高, 在开花期剑叶中表达量极低, 但可检测到一条分子质量较高的弱带, 可能是该蛋白质的修饰产物或其他转录本。

从上述 Western blotting 结果来看, 所制备的 4 个抗体在水稻蛋白质有很高的特异性, 获得的信号基本上都是一条比较清晰的主带。从 4 个 U-Box 蛋白质的表达来看, 它们在水稻生长发育的不同时期或部位基本上是组成型表达, 且表达量也基本接近。Western blotting 检测的表观分子质量与预测分子质量不同可能有几种原因, 如品种间的差异、蛋白质的修饰、不同的转录本甚至蛋白质的降解产物等。

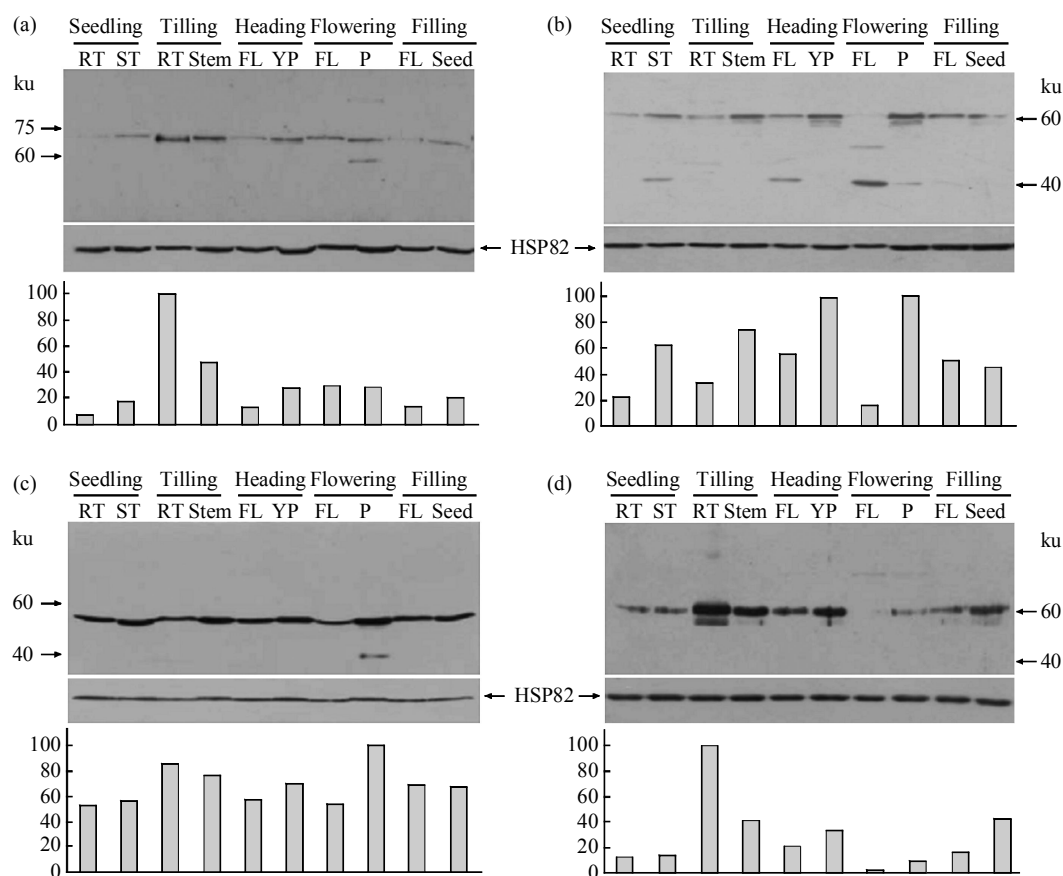


Fig. 3 The Western blotting detection of U-Box proteins at different developmental stages

(a)Os01g66130, (b)Os06g01304, (c)Os08g01900, (d)Os12g38210. RT: Root; ST: Shoot; FL: Flag leaf; YP: Young panicle; P: Panicle. Upper panel: Western blot detection by U-Box protein specific antibodies. Middle panel: Western blot detection by HSP-82 specific antibody. Lower panel: Quantity analysis based on upper panel.

2.4 与 U-Box 基因 EST 测序结果的比较

对 NCBI 上公布的来自 274 个文库的 100 万条以上的 EST 进行分析(表 1), 可以看出, 除来自根、花和种子的文库中没有检出 U-Box 基因 Os01g66130、Os08g01900 对应的 EST 外, 在其他文库中都有少量数目的 EST, EST 的数量分布大致

均匀, 与 Western blotting 结果揭示的组成型表达相符合, 与 ATPase、HSP81-3、EGF-1 alpha 和 RuBisCo 等对照基因相比, 这几个 U-Box 基因的 EST 数目很少, 说明它们都属于低丰度转录的基因, 但目前的 Western blotting 结果还难以对这几个 U-Box 蛋白质在水稻中的表达丰度进行推测。

Table 1 EST sequencing results of U-box genes

Tissue	Loc numbers of target genes				Loc numbers of control genes				Number of ESTs	Number of libraries
	Os01g66130	Os06g01304	Os08g01900	Os12g38210	Os04g56160	Os09g30412	Os08g08010	Os12g17660		
	Ubox	Ubox	Ubox	Ubox	ATPase	HSP81-3	EF-1-alpha	RuBisCo		
Whole plant	1	1	0	1	11	52	103	16	62 906	17
Leaf	5	6	6	5	140	298	260	1 443	197 264	82
Root	0	2	0	3	156	183	72	3	79 909	40
Stem	2	4	9	6	166	72	80	394	146 414	17
Panicle	0	4	1	1	156	245	452	7	148 213	39
Callus	11	3	10	4	200	582	297	32	188 217	41
Flower	2	1	1	1	198	84	72	10	143 661	25
Seed	2	1	0	2	112	32	14	8	37 958	13
Total	23	22	27	23	1 139	1 548	1 350	1 913	1 004 542	274

3 讨 论

一般来讲, 抗体制备可以用全长的蛋白质、片段蛋白或合成多肽做免疫原, 全长蛋白质克隆难度较大, 甚至有些蛋白质很难表达, 与全长蛋白质相比, 本实验中选取片段蛋白质进行克隆表达, 进而获得纯化的蛋白质。实验表明, 采用这一路线可以比较容易地获得足量的高纯度的蛋白质用于动物免疫。而合成多肽的路线目前成本还比较高。本实验中, 我们从 4 个 U-Box 蛋白质出发, 通过抗原决定簇预测, 表达片段蛋白, 制备了特异性抗体, 证明了这一路线的可行性。

U-Box 蛋白质作为一种 E3 蛋白, 广泛存在于酵母到人类的大量真核生物中^[9]。在植物中, U-Box 经常与 ARM(armadillo repeat)重复耦联形成 U-Box/ARM 结构, 独立或共同与其他蛋白质发生相互作用, 参与信号传导级联反应。烟草的 *ACRE276* 与拟南芥 *PUB17* 同源, 编码 E3 泛素连接酶, 对其细胞死亡与抗性功能来讲, U-Box 结构是必需的^[10]。在茄科与芸苔属中, 具有 U-Box/ARM 耦合结构的 E3 泛素连接酶对于抗病和细胞死亡具有正调控的作用。拟南芥的 *AtCHIP* 基因编

码的蛋白质具有一个 U-Box 结构域, 体外实验证明, 有泛素连接酶活性, 它的转录水平受环境温度的影响, 过量表达会增加植物对低 / 高温的敏感性, 说明该基因在温度逆境的耐受性方面扮演重要角色^[11]。ARC1 是在芸苔属植物雌蕊中表达的一个 U-Box 蛋白质, 它能够和它下游的 SRK(S-receptor kinase)结合, ARC1 具有 E3 泛素连接酶活性, SRK 可磷酸化 ARC1 蛋白, 磷酸化的 ARC1 与胞质或是核中的底物结合, 结合底物的 ARC1 蛋白再与同源的 E2 酶结合, 使得底物蛋白被泛素化降解, 从而导致花粉的自交不亲和性^[12]。水稻的 SPL11 也是一个 U-Box/ARM 蛋白, 该蛋白质与自发性细胞死亡及对细菌与真菌的抗性增强有关, 在水稻 - 稻瘟病菌间的抗感反应中, 该基因均被诱导表达^[13], SPL11(即为本研究中的 Os12g38210)抗体的获得为了解抗感反应过程中蛋白质表达的变化奠定了基础。此外, 水稻中的 XB3(XA21-binding protein 3)也编码一个泛素连接酶, 被证明在白叶枯病抗性基因 *Xa21* 介导的抗病反应中发挥作用^[14]。

在获得抗体的基础上, 本实验对水稻不同发育时期蛋白质表达谱进行了初步研究, 获得了蛋白质在不同发育阶段的表达信息, 为了解基因的表达和

功能奠定了基础. 除转录谱研究外, 抗体也为后续功能相关的研究, 如免疫共沉淀、ChIP-on-chip, Pull-down 以及在抗病、抗逆反应中 U-Box 蛋白质的表达研究提供了重要资源. 随着水稻基因组序列信息的阐释和转录谱数据的积累, 基于抗体的蛋白质组学研究将成为现实.

参 考 文 献

- 1 Sasaki T, Burr B. International Rice Genome Sequencing Project: the effort to completely sequence the rice genome. *Plant Biol*, 2000, **3**(2): 138~141
- 2 Andersen P, Kragelund B B, Olsen A N, *et al.* Structure and biochemical function of a prototypical *Arabidopsis* U-Box domain. *J Biol Chem*, 2004, **279**(38): 40053~40061
- 3 Samuel M A, Mudgil Y, Salt J N, *et al.* Interactions between the S-domain receptor kinases and AtPUB-ARM E3 ubiquitin ligases suggest a conserved signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2008, **147**(4): 2084~2095
- 4 Lamothe R G, Tsitsigiannis D I, Ludwig A A, *et al.* The U-Box protein CMPG1 is required for efficient activation of defense mechanisms triggered by multiple resistance genes in tobacco and tomato. *Plant Cell*, 2006, **18**(4): 1067~1083
- 5 Cho S K, Ryu M Y, Song C, *et al.* *Arabidopsis* PUB22 and PUB23 are homologous U-Box E3 ubiquitin ligases that play combinatory roles in response to drought stress. *Plant Cell*, 2008, **20**(7): 1899~1914
- 6 Cho S K, Chung H S, Ryu M Y, *et al.* Heterologous expression and molecular and cellular characterization of *CaPUB1* encoding a hot pepper U-Box E3 ubiquitin ligase homolog. *Plant Physiology*, 2006, **142**(4): 1664~1682
- 7 Zeng L R, Park C H, Venu R C, *et al.* Classification, expression pattern, and E3 ligase activity assay of rice U-Box -containing proteins. *Molecular Plant*, 2008, **5**(1): 800~815
- 8 Mudgil Y, Shiu S H, Stone S L, *et al.* A large complement of the predicted *Arabidopsis* ARM repeat proteins are members of the U-Box E3 ubiquitin ligase family. *Plant Physiology*, 2004, **134**(1): 59~66
- 9 靳苗静, 刘国振, 刘 茜, 等. U-Box 蛋白质的结构及其功能研究进展. *中国农学通报*, 2007, **23**(4): 119~123
- 10 Jin M J, Liu G Z, Liu Q, *et al.* *Chin Agricul Sci Bull*, 2007, **23**(4): 119~123
- 10 Cheng W Y, Lamothe R G, Ewan R A, *et al.* The E3 ubiquitin ligase activity of *Arabidopsis* PLANT U-BOX17 and its functional tobacco homolog ACRE276 are required for cell death and defense. *Plant Cell*, 2006, **18**(4): 1084~1098
- 11 Yan J, Wang Q J, Li Q T, *et al.* AtCHIP, a U-Box-containing E3 ubiquitin ligase, plays a critical role in temperature stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2003, **132**(2): 861~869
- 12 Stone S L, Anderson E M, Mullen R T, *et al.* ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen. *Plant Cell*, 2003, **15**(4): 885~898
- 13 Zeng L R, Qu S H, Bordeos A, *et al.* *Spotted leaf11*, a negative regulator of plant cell death and defense, encodes a U-Box/armadillo repeat protein endowed with E3 ubiquitin ligase activity. *Plant Cell*, 2004, **16**(10): 2795~2808
- 14 Wang Y S, Pi L Y, Chen X H, *et al.* Rice XA21 binding protein 3 is a ubiquitin ligase required for full Xa21-mediated disease resistance. *Plant Cell*, 2006, **18**(12): 3635~3646

Expression Analysis of Rice U-Box Proteins at Different Developmental Stages*

CHEN Hao¹⁾, LI Li-Yun¹⁾, BAI Hui^{2,3)}, CAO Ying-Hao¹⁾, WANG Xian-Yun¹⁾, LIU Guo-Zhen^{1,2)**}

¹⁾ College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

²⁾ Beijing Institute of Genomics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100029, China;

³⁾ Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract The U-Box domain proteins, with similar configuration to RING finger proteins, are highly conserved among eukaryotic organisms and most of them belong to the ubiquitin/proteasome system as E3 ubiquitin protein ligases, U-Box containing proteins play a key role in the recognition and selection of abnormal proteins targeted for ubiquitination and subsequent degradation, a process for the maintenances and quality control of proteins exist in living cells. There are 77 U-Box genes in rice genome and the systematic investigation of their expression will provide basic information for the functional analysis. The specific antibodies against rice U-Box proteins was prepared to investigate the expression profile of U-Box proteins at different developmental stages and accumulate basic information for functional studies. Four rice U-Box genes were chosen as their U-Box domains are located at the N-terminal and posses ARM repeats at C-terminal. Epitopes prediction were carried out by computer software and the target protein fragments were expressed and purified in *E. coli* system. Polyclonal antibodies were generated by rabbit immunization. Western blotting analysis were carried out for rice material collected at different developmental stages including shoot and root at seedling stage, root and stem at tilling stage, flag leaf and young panicle at heading stage, flag leaf and panicle at flowering stage, flag leaf and seed at filling stage. Comparison analysis was carried out with EST sequencing data. Specific antibodies were obtained by rabbit immunization of recombinant proteins expressed in *E. coli*. One major band were observed for Western blotting detection of rice U-Box proteins, the apparent molecular mass of two U-Box proteins (Os06g01304 and Os12g38210) were consistent with predicted size, while the other two proteins (Os01g66130 and Os08g01900) with apparent molecular mass smaller than that of predicted. Western blotting results indicated that the U-Box proteins were constitutively expressed with close abundance in tested tissues. EST analysis based on 1 million ESTs derived from 274 libraries from NCBI EST database revealed closed numbers of U-Box gene transcription, which is parallel with the results of constitutively expression of proteins. However, compared with the expression of ATPase, HSP81-3, EGF-1 alpha and RuBisCo, the number of ESTs for U-Box proteins were much lower, suggest the low abundance transcription of U-Box genes. Four rice U-Box proteins were chosen for the generation of specific antibodies via the expression of predicted epitope fragments, demonstrated the feasibility of the process. Western blotting analysis indicated that four U-Box proteins were constitutively expressed among tested rice tissues at different developmental stages, which is parallel with EST sequencing data. The antibodies will provide resources for functional studies, such as co-immunoprecipitation, ChIP-on-chip, Pull-down and stress response etc.

Key words Rice, U-Box, protein expression, Western blotting

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00075

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30730007, 30670175, 30221004) and National Basic Research Program of China (2006CB101706).

**Corresponding author.

Tel: 86-312-7528787, E-mail: gzhliu@genomics.org.cn

Received: February 10, 2009 Accepted: March 27, 2009