

酵母双杂交筛选小麦 TaMBD2 互作蛋白

凌娜¹,杨艳敏¹,侯江涛¹,孟凡荣^{2*}

(1.商丘学院 风景园林学院,河南 商丘 476000; 2.河南农业大学 生命科学学院,河南 郑州 450002)

摘要:为探讨小麦甲基结合域蛋白(TaMBD2)在植物生长发育过程中的调控功能,以 TaMBD2 基因的全长 cDNA 为模板,构建诱饵载体 pGBKT7-TaMBD2,利用酵母双杂交系统从小麦 cDNA 文库中筛选 TaMBD2 互作蛋白。结果共筛选到 91 个菌斑显蓝色的克隆,对其进行菌液 PCR 检测并测序,然后在 NCBI 上进行 BLAST 比对分析,共获得 8 个可能与 TaMBD2 互作的蛋白,分别为二磷酸核苷激酶(NDPK)、ENTH 结构域蛋白、SIAN 蛋白、Agenet 结构域蛋白、C₂H₂ 型锌指蛋白、磷酸激酶和 2 个假定蛋白,其中最有可能的 TaMBD2 互作蛋白为 NDPK。这些候选蛋白主要参与细胞信号传导、抗逆、能量代谢和蛋白质运输等。其中,检测结果中参与植物抗逆胁迫的蛋白质为主要互作蛋白,所占比例为 54.9%;参与蛋白质运输的互作蛋白所占比例为 25.3%,其余互作蛋白所占比例较小。因此,推测 TaMBD2 可能主要参与植物对干旱、低温和高盐等非生物胁迫逆境的响应及调控。

关键词:小麦;酵母双杂交;TaMBD2;互作蛋白

中图分类号:S512.1;Q78 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-3268(2017)08-0007-06

Screening of Interacted Proteins of TaMBD2 in Wheat by Yeast Two-hybrid System

LING Na¹,YANG Yanmin¹,HOU Jiangtao¹,MENG Fanrong^{2*}

(1. College of Landscape Architecture,Shangqiu University,Shangqiu 476000,China;
2. College of Life Science,Henan Agricultural University,Zhengzhou 450002,China)

Abstract:In order to understand more regulatory functions of methyl-binding domain protein TaMBD2 during the growth and development in wheat,bait vector pGBKT7-TaMBD2 was constructed with the full length cDNA of TaMBD2 gene as template,and the interacted proteins of TaMBD2 from wheat cDNA library were screened by yeast two-hybrid system. The result showed that a total of 91 blue clones were screened,which were analyzed through PCR and homology analysis using the BLAST in NCBI,and eight possible interacted proteins of TaMBD2 were obtained,which were nucleoside diphosphate kinase (NDPK),epsin N-terminal homology domain-containing protein,seven in absentia family protein,Agenet domain-containing protein,zinc finger C₂H₂ type family protein,phosphate kinase and two hypothetical proteins. The most likely interacted protein of TaMBD2 was NDPK. These candidate proteins were related to mediate cell signal transduction,stress resistance,energy metabolism and protein transport,etc. Among them,the proteins involved in resistance to plant stress were the main interacted protein,the proportion was 54.9%;the proportion of proteins participated in protein transport was 25.3%,and the proportion of the rest interacted proteins was smaller. Therefore,TaMBD2 may mainly participate in response and regulation to abiotic stress,such as drought,low temperature and high salt.

Key words:wheat; yeast two-hybrid; TaMBD2; interacted proteins

收稿日期:2017-04-10
基金项目:国家自然科学基金项目(30300195)
作者简介:凌娜(1986-),女,河南商丘人,讲师,硕士,主要从事植物遗传育种研究。E-mail:lingnas1985@163.com
* 通讯作者:孟凡荣(1973-),女,河南郑州人,教授,博士,主要从事植物表观遗传学研究。
E-mail:mengfanrong73@yahoo.com.cn

DNA 甲基化是生物体普遍存在的一种基因修饰现象,其与基因表达调控等密切相关^[1]。有关其调控机制的研究表明,甲基化 DNA 能特异结合甲基结合域蛋白(methy-binding domain protein,MBD)等反式作用因子,从而参与植物生长发育过程中依赖于 DNA 甲基化的基因的表达调控^[2]。

目前,关于植物 MBD 的研究表明,拟南芥 AtMBD11 被沉默表达后,植物体会发生一系列的表型变化,如叶片锯齿状、开花延迟以及花器易位等^[3]。MBD 等调控蛋白必须与其他调控因子共同作用才能行使其生物学功能。Scebba 等^[4]利用酵母双杂交系统筛选发现,拟南芥 AtMBD7 与 AtPRMT11 存在互作关系,AtPRMT11 可以对 AtMBD7 进行翻译后甲基化修饰。Yano 等^[5]研究发现,在细胞分裂期间 AtRNA2 协助 AtMBD7 结合到染色质上并维持染色质结构。

随着植物生物化学与分子生物学的发展,更多植物 MBD 基因将会被分离鉴定,小麦是重要的粮食作物,探讨 MBD 在小麦生长发育过程中的调控机制具有重要意义。Li 等^[6]以小麦为材料首次克隆得到了 6 个小麦 MBD 基因,命名为 *TaMBD1* - *TaMBD6*。孟凡荣等^[7]利用 RACE 技术获得了 *TaMBD2* 的全长 cDNA 序列,并通过 RT-PCR 分析发现,*TaMBD2* 基因在小麦不同叶龄叶片及种子形成过程中差异表达。目前,有关 *TaMBD2* 的具体功能研究还未见报道。为此,利用酵母双杂交系统从小麦 cDNA 文库中初步筛选 *TaMBD2* 的互作蛋白,为探讨 *TaMBD2* 在小麦生长发育中的生物学功能及调控机制积累重要资料。

1 材料和方法

1.1 试验材料

酵母菌株 Y2HGold、Y187 和酵母表达载体 pGBKT7-BD、pGBKT7-AD 及酵母转化试剂盒、YPDA、各种营养缺陷型培养基均购于 Clontech 公司,大肠杆菌 DH5 α 为国家小麦工程技术研究中心保存,DNA 连接酶、限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 酵母双杂交诱饵载体 pGBKT7-TaMBD2 的构建 根据已知的 *TaMBD2* 基因全长 cDNA 序列,设计带有 *Nco* I 和 *Sal* I 酶切位点的引物 TaMBD2-1 (5'-CTTGCAGAATCCATGGACAG-3') 和 TaMBD2-2 (5'-TCGATGTCGACCACTGGGTA-3'),以实验室保存的 pBS-TaMBD2 质粒为模板进行 PCR 扩增,回收目的片段,连接 pGEM-T 载体并转化大肠杆

菌 DH5 α 感受态细胞,PCR 扩增鉴定阳性克隆,然后提取质粒;利用内切酶 *Nco* I 和 *Sal* I 双酶切重组质粒 pGEM-TaMBD2 和酵母表达载体 pGBKT7-BD,纯化产物经连接后转化 DH5 α 感受态细胞,阳性克隆经 PCR 扩增及酶切鉴定正确后,进行测序分析。

1.2.2 Western blot 检测诱饵蛋白 TaMBD2 的表达

将 pGBKT7-TaMBD2 诱饵载体转化到 Y2HGold 酵母感受态细胞中,30℃培养 3 d,挑取单菌落利用酵母表达载体 pGBKT7-BD 的通用引物 pGBKT7-1 (5'-TCATCGGAAGAGAGTAGT-3') 和 pGBKT7-2 (5'-GAGTCACTTTAAATTTGTAT-3') 进行 PCR 鉴定,鉴定正确的单克隆接种于 5 mL 的液体培养基 SD/-Trp 中,30℃、220 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6,采用 Urea/SDS 法提取酵母蛋白质,进行 Western blot 检测。

1.2.3 酵母双杂交诱饵蛋白 TaMBD2 的毒性和诱饵载体 pGBKT7-TaMBD2 的自激活检测

将诱饵载体 pGBKT7-TaMBD2 和空载体 pGBKT7-BD 分别转化酵母 Y2HGold 感受态细胞。转化产物分别涂布在 SD/-Trp、SD/-Trp/X- α -Gal (SD/X)、SD/-Trp/X- α -Gal/AbA (SD/X/A) 培养基上,30℃培养 3 d,观察平板上的菌斑生长情况以判断诱饵载体在酵母细胞中是否有自激活作用和诱饵蛋白是否有毒性作用。

1.2.4 酵母双杂交筛选 TaMBD2 互作蛋白

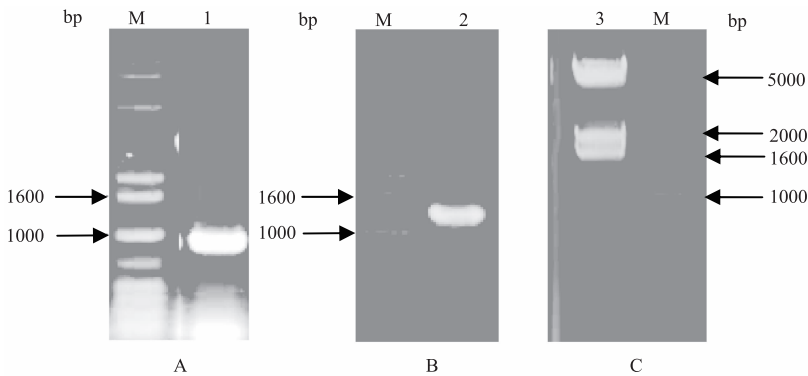
从含有 pGBKT7-TaMBD2 的酵母 Y2HGold 培养平板 SD/-Trp 上挑取 1 个单克隆于 50 mL SD/-Trp 培养基中,30℃、220 r/min 培养至 OD₆₀₀ 达到 0.8,吸取 4~5 mL 培养液和 1 mL Y187 小麦 cDNA 文库置于 50 mL 含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 2 \times YPDA 液体培养基中,30℃、50 r/min 培养 24 h,用相差显微镜(40 \times)检测培养液,观察合子的出现,将培养液分别涂布 SD/-Trp 平板 5~10 个、SD/-Leu 平板 5~10 个、SD/-Leu/-Trp (DDO) 平板 5~10 个、SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp (QDO) 平板 50~60 个,30℃培养 3~5 d,从 QDO 平板上挑选白色菌斑划线培养于 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA (QDO/X/A) 平板上,30℃培养 3~5 d。用酵母表达载体 pGBKT7-AD 通用性引物 pGADT7-1 (5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCCACCAAACCCA-3') 和 pGADT7-2 (5'-GTGAAGTTCGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGATT-3') 对蓝色菌斑进行菌液 PCR 扩增,测序,在 NCBI 上对 TaMBD2 互作蛋白序列用 BLAST 进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 pGBKT7 - TaMBD2 的构建和鉴定

以 pBS - TaMBD2 质粒为模板, TaMBD2 - 1 和 TaMBD2 - 2 为引物进行 PCR 扩增, 在目的基因中引入 *Nco* I 和 *Sal* I 酶切位点, 然后连接 pGEM - T 载体构建 pGEM - TaMBD2 质粒载体并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑选阳性克隆进行 PCR 鉴定, 获得了约为 991 bp 的 DNA 片段(图 1A)。经测序分析显示, pGEM - TaMBD2 载体中 *TaMBD2* 基因序

列无异常且引入了 *Nco* I 和 *Sal* I 酶切位点。
利用 *Nco* I 和 *Sal* I 双酶切 pGEM - TaMBD2 和 pGBKT7 载体, 酶切产物回收并用 T4 连接酶连接, 构建重组载体 pGBKT7 - TaMBD2, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取单克隆进行培养, 用引物 pGBKT7 - 1 和 pGBKT7 - 2 进行阳性鉴定(图 1B), 将阳性菌液送至测序公司进行测序, 提取阳性质粒, 用 *Hind* III 酶切后, 获得大小约为 1 498、1 881、4 938 bp 的 3 个片段(图 1C), 证明诱饵载体 pGBKT7 - TaMBD2 构建成功。



A. pGEM - TaMBD2 菌液 PCR 鉴定结果; B. pGBKT7 - TaMBD2 菌液 PCR 鉴定结果;
C. pGBKT7 - TaMBD2 质粒 *Hind* III 酶切结果; M. 1 kb plus DNA ladder
图 1 pGEM - TaMBD2 和诱饵载体 pGBKT7 - TaMBD2 的鉴定结果

2.2 Western blot 检测诱饵蛋白 TaMBD2 的表达

采用 Urea/SDS 法分别提取转化 pGBKT7 - TaMBD2、阳性对照 pGBKT7 - AtMBD7 的酵母细胞和未转化诱饵载体(空白对照)的酵母细胞总蛋白质, Western blot 检测结果显示, pGBKT7 - TaMBD2 能够正常表达目的蛋白 TaMBD2, 且目的蛋白约为 57 ku(图 2)。



M. 蛋白质 Marker; 1. 阳性对照 pGBKT7 - AtMBD7;
2. 空白对照; 3. pGBKT7 - TaMBD2

图 2 Western blot 检测诱饵蛋白 TaMBD2 的表达情况

2.3 诱饵蛋白毒性和诱饵载体自激活检测

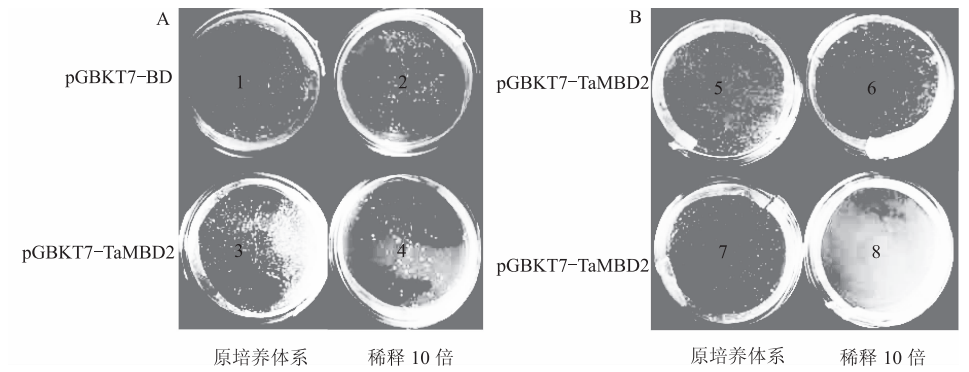
将空载体 pGBKT7 - BD 和 pGBKT7 - TaMBD2 分别转化酵母 Y2HGold 感受态细胞, 转化产物涂布

在 SD/ - Trp 培养基上, 30 ℃ 培养 3 d, 结果(图 3A)显示, 含 pGBKT7 - TaMBD2 载体酵母的培养平板上长出的菌斑与含空载体酵母的培养平板上长出的菌斑大小相差不多, 说明诱饵蛋白 TaMBD2 对 Y2HGold 酵母细胞没有毒性。

将诱饵载体 pGBKT7 - TaMBD2 转化到酵母 Y2HGold 感受态细胞中, 将 100 μ L 转化体系稀释 10 倍, 分别涂布在 SD/ - Trp、SD/X、SD/X/A 培养基上, 30 ℃ 倒置培养 3 d, 结果(图 3B)显示, 在 SD/ - Trp 和 SD/X 上长出的菌斑为白色, 没有蓝色菌斑出现, 而在 SD/X/A 上没有任何菌斑生长, 说明诱饵载体在 Y2HGold 酵母细胞中不能自发激活报告基因的表达。

2.4 TaMBD2 互作蛋白的筛选

将含有 pGBKT7 - TaMBD2 的酵母 Y2HGold 与含有小麦 cDNA 文库的酵母 Y187 进行杂交。取杂交产物 200 μ L 涂布在直径为 150 mm 的 QDO 平板上, 共涂布 58 个平板, 30 ℃ 培养 3 d 后长出 64 个白色菌斑(图 4), 30 ℃ 继续培养至 5 d, 共长出 118 个白色菌斑, 最后 2 d 长出的菌斑较小, 直径在 0.5 ~ 1.0 mm。



A. 诱饵蛋白毒性检测;B. 诱饵载体自激活检测;1—6. SD/- Trp 培养基;7. SD/X 培养基;8. SD/X/A 培养基

图 3 诱饵蛋白毒性和诱饵载体自激活检测

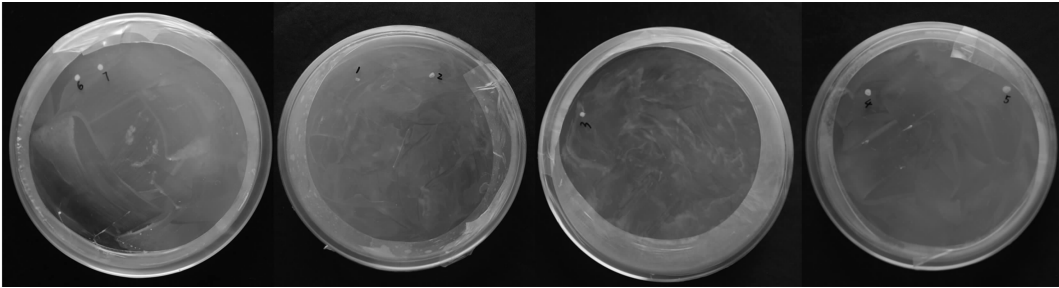


图 4 SD/- Ade/- His/- Leu/- Trp 筛选

将 118 个候选克隆在 QDO/X/A 培养基上进一步筛选(图 5),30 ℃ 培养 3 d 后,其中 91 个长出的菌斑为蓝色,说明筛选到互作蛋白,而且蓝色菌斑的

颜色深浅程度不同,说明互作蛋白的相互作用强度可能存在差异;另外有 17 个长出白色菌斑,10 个基本未长出菌斑,说明没有筛选到互作蛋白。

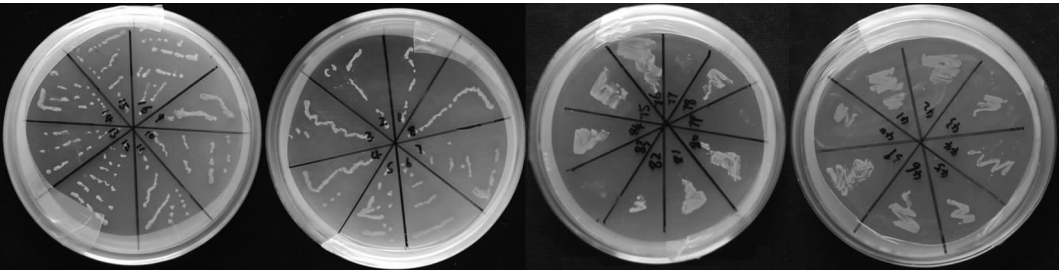
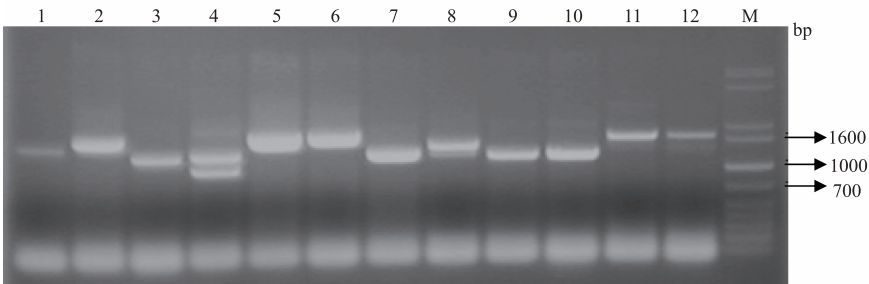


图 5 SD/- Ade/- His/- Leu/- Trp/X-α-Gal/AbA 筛选

对 91 个菌斑为蓝色的克隆进行菌液 PCR 检测(图 6),PCR 扩增出的目的条带介于 900 ~ 3 000 bp,回收目的条带,用连接酶与 T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,测序。将测得序列在 NCBI 网站上采用 BLAST 进行比对分析,去除重复序列

后,共获得 8 个与 TaMBD2 互作的候选蛋白(表 1),即二磷酸核苷激酶(nucleoside diphosphate kinase,NDPK)、ENTH 结构域蛋白、SIAN 蛋白、Agenet 结构域蛋白、C₂H₂ 型锌指蛋白、磷酸激酶和一些假定蛋白。



M. 1 kb plus DNA ladder;1—12. SD/- Ade/- His/- Leu/- Trp/X-α-Gal/AbA 平板上显蓝菌斑的菌液 PCR 鉴定结果

图 6 TaMBD2 互作蛋白的菌液 PCR 鉴定结果

表 1 TaMBD2 互作蛋白序列分析结果

克隆个数	基因片段大小/bp	GenBank 号	E 值	编码蛋白	预测蛋白功能
35	1 200	NP_192839.1	6e-112	二磷酸核苷激酶 (NDPK)	通过影响细胞骨架,从而使 G 蛋白激活
23	1 400	NP_56559.1	2e-135	ENTH 结构域蛋白	参与膜运输功能
2	900	XP_002881813.1	9e-88	SIAN 蛋白	识别参与泛素化降解过程中的作用底物
2	1 600	NP_191789.2	2e-123	Agenet 结构域蛋白	维持染色质结构
4	1 300	NP_195295.1	4e-85	C ₂ H ₂ 型锌指蛋白	参与植物对冷和高盐胁迫的应答,提高植物耐受能力
6	1 500	NP_001154541.1	7e-101	假定磷酸载体蛋白	参与磷酸转移
4	1 500	NP_568173.2	9e-88	假定转运蛋白	促使氨基酸等多肽物质在内膜之间的转运
15	3 000	NP_192839.1	8e-107	磷酸激酶	介导微管的聚合和解聚过程中磷酸作用

TaMBD2 最有可能的互作蛋白为 NDPK (NP_192839.1), 其在 91 个候选蛋白序列中出现了 50 次。NDPK 是生物体中广泛存在的一类酶, 存在于细胞质、叶绿体和线粒体中, 主要功能是在细胞的新陈代谢过程中维持 ATP 和其他三磷酸核苷 (NTPs) 之间的平衡, 并通过催化 NDP 和 NTP 之间磷酸基的转移反应来维持细胞内 NTP 浓度。近年来的研究发现, NDPK 可以调节细胞增殖、分化、发育、凋亡, 在高盐和低温等非生物胁迫响应中发挥重要作用; 还可以介导细胞内吞过程, 激活 G 蛋白活性, 参与多条信号转导途径^[8]。

保守结构域分析发现, 有 23 个候选蛋白序列含有典型的 ENTH 结构域, 其由位于 N 末端的大约 150 个氨基酸通过 α-螺旋形成球状结构。ENTH 结构域蛋白在植物中广泛分布, 参与招募泛素化蛋白结合在特异位点。

SIAN 蛋白 (XP_002881813.1) 含有 305 个氨基酸残基, 第 171—299 个氨基酸是一个 SINA 结构域。E3 是泛素化降解中重要的泛素连接酶, E3 连接酶就是典型的 SINA 结构域蛋白, 其协同 E2 将泛素蛋白连接到底物蛋白上, 使底物蛋白通过蛋白酶途径降解来调控这一途径。

Agenet 结构域蛋白 (NP_191789.2) 含 722 个氨基酸残基, 保守结构域分析发现, 其含有 4 个邻近的 Agenet 结构域。其主要功能为特异结合 RNA, 参与 DNA 损伤应答的早期反应。

C₂H₂ 型锌指蛋白是一类含有一到多个由大约 30 个氨基酸组成的“手指”型多肽结构的蛋白, 是真核生物中具有重要调控作用的一类核酸结合蛋白, 其可以通过指型结构的 α-螺旋与 DNA 双螺旋大沟上的特异碱基序列接触, 进而与 DNA 稳定结合。

此外, TaMBD2 互作的候选蛋白中还有 1 个磷酸激酶, 其介导微管的聚合和解聚过程中磷酸作用; 2 个假设蛋白, 功能推测其分别为假设磷酸载体蛋白和假设转运蛋白, 参与磷酸转移和促使氨基酸等多肽物质在内膜之间的转运等。

综上, 这些 TaMBD2 互作的候选蛋白主要参与细胞信号传导、抗逆、能量代谢和蛋白运输等。其中, 参与植物抗逆胁迫的蛋白为主要互作蛋白, 所占比例为 54.9%; 参与蛋白运输的互作蛋白所占比例为 25.3%; 其余互作蛋白所占比例较小, 其中还有 10.2% 的假设蛋白。

3 结论与讨论

蛋白质是体内多种生命活动都必须依赖的物质基础, 研究生物体内蛋白质与核酸、蛋白质与蛋白质间的相互作用, 有助于揭示生命的本质。Fields 等^[9]在 1989 年创立了能迅速、灵敏地研究蛋白质相互作用的酵母双杂交技术。本研究以小麦 TaMBD2 为诱饵蛋白, 利用酵母双杂交筛选小麦 cDNA 文库, 得到与其互作的候选蛋白, 为进一步研究 TaMBD2 在小麦生长发育过程中的作用机制奠定基础。

孟凡荣等^[7]利用 RT-PCR 研究发现, TaMBD2 基因在叶片和种子的不同发育时期差异表达, 推断该基因在小麦生长发育及种子形成过程中发挥着某种调控功能。拟南芥 MBD 家族的 13 个成员 AtMBD1—AtMBD13 可以通过招募染色体修饰因子、去乙酰化酶和组蛋白甲基转移酶等抑制转录复合体, 从而引起转座子基因沉默等表达抑制^[10]。

本试验筛选到与 TaMBD2 互作的主要候选蛋白有 NDPK、ENTH 结构域蛋白、SIAN 蛋白、Agenet 结构域蛋白和 C₂H₂ 型锌指蛋白, 其中最有可能的 TaMBD2 互作蛋白为 NDPK。NDPK 蛋白可能在高盐和低温胁迫响应中发挥重要作用^[8]。Kalthoff 等^[11]推测 ENTH 结构域蛋白作用方式可能是使多个作用因子聚合在一起。Riezman^[12]研究发现, SIAN 蛋白参与泛素化途径中招募泛素化蛋白结合在特定位点。Xie 等^[13]研究发现, 拟南芥 SINA5 结合转录因子 NAC1 影响侧根形成。拟南芥 SINA2 作用于转录因子 AtRAP2.2, 参与胡萝卜素的形成^[14]。拟南芥 STZ 基因 (C₂H₂ 型锌指蛋白) 参与冷和高盐胁迫应答^[15]。综上可见, TaMBD2 互作候选蛋白大

多参与植物非生物胁迫的应答。

植物体在应对温度、干旱、盐渍、高压等环境胁迫时,为了适应环境变化会诱导某些能够抵抗逆境的基因表达。Kovarík 等^[16]和 Steward 等^[17]发现,烟草和玉米受到冷胁迫后,其基因组甲基化水平都有所下降,由此看来,植物在生长发育过程中对环境变化的适应与甲基化水平密切相关。MBD 作为能特异结合甲基结合域的反式作用因子,也必将参与 DNA 甲基化在植物应答非生物胁迫中的基因表达调控。因此,推测 TaMBD2 可能主要参与植物对于旱、低温和高盐等非生物胁迫逆境的响应及调控,但具体的作用机制及生物学功能有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Finnegan E J, Genger R K, Peacock W J, *et al.* DNA methylation in plants[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1998, 49: 223-247.
- [2] Jorgensen H F, Bird A. MeCP2 and other methyl-CpG binding proteins[J]. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 2002, 8: 87-93.
- [3] Berg A, Meza T J, Mahic M, *et al.* Ten members of the *Arabidopsis* gene family encoding methyl-CpG binding domain proteins are transcriptionally active and at least one, AtMBD11, is crucial for normal development[J]. Nuc Acids Res, 2003, 31(5): 5291-5304.
- [4] Scebbba F, De Bastiani M, Bernacchia G, *et al.* PRMT11: A new *Arabidopsis* MBD7 protein partner with arginine methyltransferase activity[J]. The Plant Journal, 2007, 52(2): 210-222.
- [5] Yano A, Kodama Y, Koike A, *et al.* Interaction between methyl CpG-binding protein and ran GTPase during cell division in tobacco cultured cells[J]. Annals of Botany, 2006, 98(6): 1179-1187.
- [6] Li Y C, Meng F R, Yin J, *et al.* Isolation and comparative expression analysis of six MBD genes in wheat[J]. Biochimica Biophysica Acta, 2008, 1779(2): 90-98.
- [7] 孟凡荣, 李占英, 凌娜, 等. TaMBD2 基因 cDNA 全长的克隆及其在小麦叶片和种子中的表达[J]. 麦类作物学报, 2010, 30(1): 6-10.
- [8] Im Y J, Kim J I, Shen Y, *et al.* Structural analysis of *Arabidopsis thaliana* nucleoside diphosphate kinase-2 for phytochrome-mediated light signaling[J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 343(3): 659-670.
- [9] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein interactions[J]. Nature, 1989, 340: 245-246.
- [10] Zemach A, Grafi G. Characterization of *Arabidopsis thaliana* methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins[J]. Plant J, 2003, 34: 565-572.
- [11] Kalthoff C, Alves J, Urbanke C, *et al.* Unusual structural organization of the endocytic proteins API80 and epsin 1[J]. Biol Chem, 2002, 277(10): 8209-8216.
- [12] Riezman H. Cell biology: The ubiquitin connection[J]. Nature, 2002, 416(2): 451-455.
- [13] Xie Q, Guo H S, Dallman G, *et al.* SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals[J]. Nature, 2002, 419: 167-170.
- [14] Welsch R, Maass D, Voegel T, *et al.* Transcription factor RAP2. 2. and its interacting partner SINAT2: Stable elements in the carotenogenesis of *Arabidopsis* leaves[J]. Plant Physiol, 2007, 145(3): 1073-1085.
- [15] Sakamoto H, Araki T, Meshi T, *et al.* Expression of a subset of the *Arabidopsis* Cys(2)/His(2)-type zinc-finger protein gene family under water stress[J]. Gene, 2004, 340(1/2): 23-30.
- [16] Kovarik A, Koukalova B, Bezdek M, *et al.* Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 95(1): 301-306.
- [17] Steward N, Ito M, Yamaguchi Y, *et al.* Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277: 37741-37746.