

泛素样小蛋白 4(SUMO4)的克隆、 原核表达、纯化及鉴定

单黎然^{1,2}, 杨 振^{1,2}, 安 宁^{1,2}, 宋 振^{1,2}, 郭泽坤^{1,2}

(1 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100; 2 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 【目的】为人类泛素样小蛋白 4(SUMO4)多克隆抗体制备和疾病研究奠定基础。【方法】根据 GenBank 提供的核酸序列, 设计 7 条单链 DNA, 采用重叠延伸 PCR 方法, 合成 SUMO4 基因编码区。基因片段经限制性内切酶双酶切, 构建到表达载体 pGEX-4T-1 中。酶切、测序鉴定后, 将重组子转染 BL21 RIL 菌株, 表达及纯化融合蛋白。用 SDS-PAGE 和 Western blot 检测纯化效果, 鉴定表达产物。【结果】成功合成了长度约为 280 bp 的 SUMO4 基因, 经双酶切鉴定, SUMO4 原核表达载体构建成功, 插入片段测序正确。GST-SUMO4 融合蛋白在终浓度 1 mmol/L IPTG, 28 °C 诱导 5 h 后产量达到高峰, SDS-PAGE 证实表达产物以可溶形式存在, 分子量约为 37 ku, GST 亲和层析的纯化效果良好, Western blot 验证融合蛋白分子量与预期值相符。【结论】SUMO4 蛋白在大肠杆菌中高效表达, 并以可溶性蛋白形式存在。

[关键词] 人类泛素 SUMO4; 重叠延伸 PCR; 原核表达; 蛋白纯化

[中图分类号] Q785; Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)09-0011-06

Cloning, prokaryotic expression, purification and identification of human small ubiquitin-related modifier 4 (SUMO4)

SHAN Li-ran^{1,2}, YANG Zhen^{1,2}, AN Ning^{1,2}, SONG Zhen^{1,2}, GUO Ze-kun^{1,2}

(1 Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】Homo-SUMO4 was artificially synthesized and expressed to provide a basis of related medical research and preparation of polyclonal antibody against SUMO4. 【Method】Based on the DNA sequence from GenBank, seven single-strand DNA were designed for amplification of SUMO4 through SOE PCR (gene splicing by overlap extension PCR). The fragment was digested with restriction endonucleases, recombined into pGEX-4T-1. After restricting enzyme identification and sequencing, expression of fusion protein was induced after transformation into the *E. coli* strain BL21 RIL, followed by purification through affinity chromatography. SDS-PAGE and Western blot were then employed to identify target protein. 【Result】SUMO4 prokaryotic expression vector was successfully constructed with correct sequence. The molecular mass and solubility of GST-SUMO4 were proved by SDS-PAGE and Western blot. The purification effect was good. 【Conclusion】SUMO4 could be highly expressed in *E. coli* as soluble protein.

Key words: SUMO4; SOE PCR; prokaryotic expression; protein purification

* [收稿日期] 2007-10-09

[作者简介] 单黎然(1985—), 女, 浙江新昌人, 在读硕士, 主要从事蛋白质翻译后修饰研究。E-mail: maoqiu2002@hotmail.com

[通讯作者] 郭泽坤(1969—), 男, 黑龙江齐齐哈尔人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事动物分子细胞生物学研究。E-mail: gzk@nwsuaf.edu.cn

糖尿病分为 I 型和 II 型。I 型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)是一种在遗传与环境相互作用下,以 T 细胞介导的特异性胰岛 β 细胞自身免疫性破坏为主要发病机制的疾病^[1]。II 型糖尿病成因比较多样化。尽管两种糖尿病在病理学上有明确的分界,但在遗传方面二者都含有多易感位点基因,疾病的发生都是多种基因互相作用、互相影响的结果^[2-4]。

人类泛素样小蛋白 4 (small ubiquitin-related modifier 4, SUMO4) 是 2004 年新发现的 SUMO 家族蛋白,因其定位于染色体 6q25 上的 I 型糖尿病易感基因区内,故其第 55 位氨基酸的突变体 M55V (第 55 位甲硫氨酸突变为缬氨酸)与 I 型糖尿病关系密切^[5-7]。对高加索及东亚人种的群体分析表明,该群体糖尿病患者 SUMO4 基因的上述突变大大高于正常人^[8-9]。此外,许多研究也分析了 SUMO4 突变与 II 型糖尿病的关系,得到了类似结论^[4,10-14]。

关于 SUMO4 的功能,目前推测与 NF κ B 有关。NF κ B 是一个广泛存在于哺乳动物细胞中的重要转录因子,主要参与机体免疫、炎症、应激反应等生理及病理过程,与糖尿病,特别是 I 型糖尿病密切相关^[15]。SUMO4 可以通过修饰 I κ B α 下调 NF κ B 的转录活性,而 SUMO4 突变体 M55V 对 I κ B α 的修饰作用明显减弱,导致 NF κ B 转录活性增强及白细胞介素-12(IL-12)分泌的增强^[5]。目前,有关 SUMO4 的作用机制还处于探索之中。探明该基因的分子基础有助于从一个方面了解糖尿病的发病机制,从而对疾病的预防和治疗产生积极意义。本研究在人工合成 SUMO4 基因的基础上,对该蛋白进行原核表达和亲和纯化,以期多克隆抗体的制备及分子、细胞水平的研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

pGEX-4T-1 载体、大肠杆菌菌株 XG-Blue、BL21 RIL,均由西北农林科技大学陕西省农业分子生物学重点实验室保存。限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I,均购自 TaKaRa 公司;Pfu DNA 聚合酶、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶,均为 Fermentas 公司产品。质粒快速提取试剂盒、DNA 片段快速回收试剂盒、DNAase、RNAaseA,均购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司。GST 亲和层析柱来源于 Amersham 公司。硝酸纤维素膜为 Whatman 公司制造。一抗小鼠谷胱甘肽转移酶

(GST)单克隆抗体、二抗辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG,分别购自北京天根生化科技有限公司和武汉博士德生物工程有限公司,发光底物试剂盒为 Pierce 公司产品。其他常规试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方 法

1.2.1 SUMO4 基因的合成 根据 GenBank 中人类 SUMO4 基因 (GeneID: 387082) mRNA 288 bp DNA 序列前 279 个核苷酸(即表达产物暴露双甘氨酸的活化形式,详见讨论部分),设计并合成了 7 段引物(由上海生工生物工程技术有限公司合成),将其分别命名为 S4-1-*Bam*H I、S4-2、S4-3、S4-4、S4-5、S4-6、S4-7-*Xho* I,两相邻片段之间的重叠区域为 11~13 bp,并在引物 S4-1 和 S4-7 上分别引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点。各片段的核苷酸序列如下(下划线示酶切位点)。

S4-1-*Bam*H I: 5'-CGT GGA TCCATG GCC AAC GAA AAG CCC ACA GAA GAA GTC AAG ACT GAG AAC AAC-3';

S4-2: 5'-CAC CAC AGA ACC ATC CTG TCC CGC CAC CTT CAA ATT AAT ATG ATT GTT GTT CTC AG-3';

S4-3: 5'-GGT TCT GTG GTG CAG TTT AAG ATT AAG AGG CAG ACA CCA CTT AGT AAA CTA ATG-3';

S4-4: 5'-CTG ATC TGC TTC ACT GAC AAT CCC CGT GGT TCA CAA TAG GCT TTC ATT AGT TTA C-3';

S4-5: 5'-GAA GCA GAT CAG ATT CCG ATT TGG TGG GCA ACC AAT CAG TGG AAC AGA C-3';

S4-6: 5'-CAA TTG TAT CTT CAT CTT CCA TTT CCA ACT GTG CAG GTT TGT CTG TTC CAC-3';

S4-7-*Xho* I: 5'-GTG CTC GAGTTA ACC TCC CGT AGG CTG TTG AAA CAC ATC AAT TGT ATC TTC-3'。

在进行重叠延伸 PCR 合成 SUMO4 基因时,2 个或 3 个临近的片段互为引物进行第一轮 PCR 扩增,再以 2 个临近的 PCR 产物为模板,以这两个 PCR 产物最外侧的两个 DNA 片段为引物进行下一轮扩增,以此类推,最后通过 3 轮 PCR 合成 SUMO4 编码序列(图 1)。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C(第一轮)/60 $^{\circ}$ C(第二轮)/62

℃(第三轮) 30 s, 72 ℃ 1 min, 29 个循环;最后 72 ℃ 延伸 4 min。对各部扩增产物进行电泳鉴定,最后一轮 PCR 产物经胶回收试剂盒纯化,以备酶切。

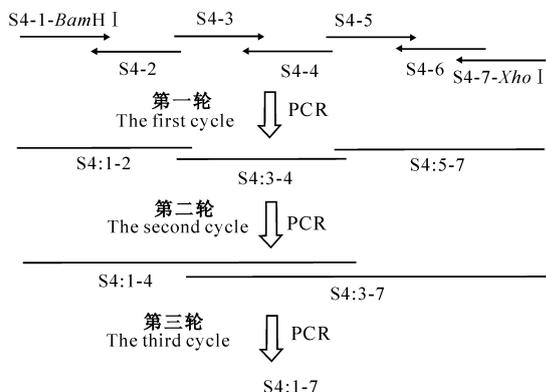


图 1 SUMO4 基因的合成示意图

Fig. 1 Amplification of SUMO4 gene

1.2.2 SUMO4 基因原核表达载体的构建 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切 pGEX-4T-1 载体及 SUMO4 基因片段,酶切后进行产物回收,在 T4 DNA 连接酶的作用下做定向连接。连接产物转化至 XG-Blue 感受态细胞,涂板、挑选单克隆进行菌落 PCR。PCR 反应参数为:94 ℃ 4 min;94 ℃ 30 s,62 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,24 个循环;最后 72 ℃ 延伸 4 min。对于能扩增出正确分子量条带的单克隆进行扩大培养,抽提质粒,用 *Bam*H I、*Xho* I 进行双酶切验证。菌落 PCR、酶切验证均为阳性的克隆即为含有目的重组子 pGEX-4T-1-SUMO4 的阳性克隆。选取一个阳性克隆送至上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

1.2.3 SUMO4 的诱导表达 以 pGEX-4T-1 空质粒转化菌为对照,将测序鉴定后的重组质粒转入 BL21 RIL 感受态细胞中,在含 100 mg/L 氨苄青霉素(Amp)的 LB 培养板上,37 ℃ 下培养过夜。次日,从 LB 培养板上挑取含有重组质粒的转化菌及空质粒转化菌各一个,分别接种到 5 mL LB 培养液中(含 100 mg/L Amp),37 ℃ 摇床培养。待菌液 $A_{600\text{ nm}}=0.4$ 时,加入异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度 1 mmol/L,诱导表达 GST 蛋白或 GST-SUMO4 融合蛋白。28 ℃、200 r/min 培养 5 h,离心收集菌体,进行 SDS-PAGE 鉴定。

1.2.4 SUMO4 蛋白的纯化 取重组菌,于 250 mL LB 液体培养基(含 100 mg/L Amp)中进行放大培养,过夜诱导。4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,收集菌体沉淀,并将收集的菌体置于-80 ℃超低温

冰箱冷冻 2 h。取出冻实的菌体,加入 100 μ L 苯甲基磺酰氟(PMSF),10 mL PBS buffer(pH 7.4),50 μ L Triton-X100 及 200 μ L 溶菌酶,搅拌裂解菌体至粘稠。加入 DNAase、RNAaseA 各 100 μ L,搅拌消化 DNA、RNA 至粘稠消失。将处理后的菌液于 4 ℃、12 000 r/min 离心 30 min,充分沉淀细胞碎片,过滤上清液,即得可溶性蛋白。取 100 μ L 样品用 SDS-PAGE 检测蛋白可溶性。其余液体加入二硫苏糖醇(DDT)使其终浓度为 1%(体积比),用 GST 亲和层析柱(Amersham)对融合有 GST 标签的 SUMO4 蛋白进行纯化,纯化后蛋白于-70 ℃储存备用。

1.2.5 Western blot 验证分子量 将样品 SDS-PAGE 电泳后以 60 V,2 h 电转移至硝酸纤维素膜上。用含 0.1 g/mL 脱脂奶粉的 TBS 室温封闭 1.5 h。一抗 1:1 000 稀释,于室温下与蛋白结合 2 h;二抗 1:1 000 稀释,于室温下与蛋白结合 2 h 后,用发光底物试剂盒进行显色。

2 结果与分析

2.1 SUMO4 基因的合成及其原核表达载体的鉴定

由图 2 可知,合成的 SUMO4 基因长度约为 280 bp,与预期结果一致。将合成的 SUMO4 基因克隆入 pGEX-4T-1 载体,通过 *Bam*H I、*Xho* II 双酶切鉴定,重组质粒被切出约 280 bp 的片段,与预期目的片断大小相符(图 3)。对重组子 pGEX-4T-1-SUMO4 测序结果表明,合成的 SUMO4 基因序列正确,对应编码氨基酸以双甘氨酸结尾,并保持正确的读码框架。

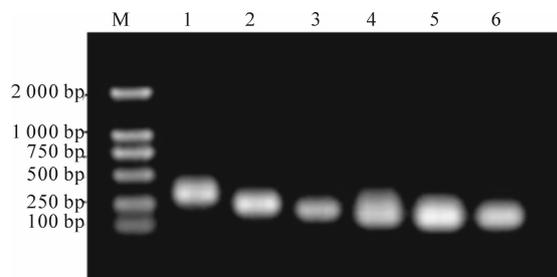


图 2 SUMO4 基因合成的电泳鉴定结果

M. DNA 分子量标样;1. 第三轮 PCR 产物(SUMO4 基因);
2~3. 第二轮 PCR 产物;4~6. 第一轮 PCR 产物

Fig. 2 Electrophoresis analysis of synthesized SUMO gene
M. DNA Marker;1. PCR product of the third circle (SUMO4 gene);

2~3. PCR products of the second cycle;

4~6. PCR products of the first cycle

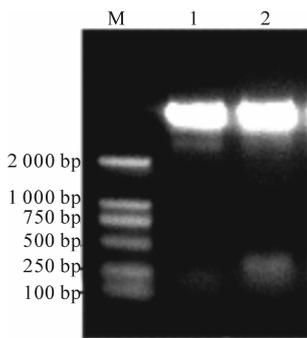


图 3 重组载体的 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切鉴定结果
M. DNA 分子量标样; 1. 空载体 pGEX-4T-1; 2. 重组载体

Fig. 3 Digestion analysis of the recombinant
M. DNA Marker; 1. Negative control; 2. Digestion fragment
of the recombinant vector

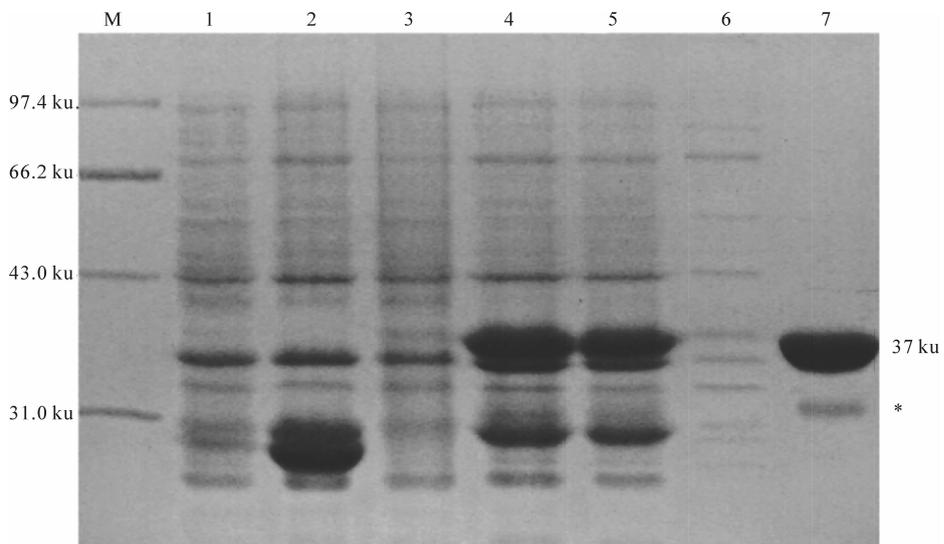


图 4 GST-SUMO4 蛋白的诱导表达及纯化产物的 SDS-PAGE 电泳结果

M. 蛋白分子量标样; 1. 未诱导 pGEX-4T-1 空载体; 2. 诱导空载体; 3. 未诱导 pGEX-4T-1-SUMO4; 4. 载体 IPTG 诱导后的总蛋白;
5. 可溶性蛋白; 6. 未与 GST 亲和和层析柱结合的蛋白; 7. 纯化的 GST-SUMO4 融合蛋白; * . 融合蛋白有少量降解

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the expression and purification products of GST-SUMO4

M. Protein Marker; 1. Non-induced pGEX-4T-1; 2. Induced pGEX-4T-1; 3. Non-induced pGEX-4T-1-SUMO4; 4. Induced
pGEX-4T-1-SUMO4; 5. Soluble protein extracts; 6. Unwanted protein which could not combine with the column; 7. Purified
GST-SUMO4; * Very little degradation product of fusion protein

2.4 Western blot 检测结果

将图 4 中的样品顺序点样, 转膜, 进行 Western blot 检测, 结果见图 5。由图 5 可知, 在常规的大肠杆菌中, *lacI* 阻遏蛋白的表达量不高, 不一定能满足细胞内的 *lac* 操纵子, 导致非诱导条件下有时会出现一定程度的本底表达, 而这种微弱的本底表达会在灵敏度高的 Western blot 检测中反映出来。

3 讨论

2004 年的诺贝尔化学奖授予了发现泛素介导蛋白降解的阿夫拉姆等科学家。自此, 与泛素相关

2.2 SUMO4 蛋白的诱导表达

GST-SUMO4 融合蛋白在终浓度 1 mmol/L IPTG、28 °C 诱导 5 h 后产量达到高峰(图 4)。通过总蛋白和可溶性蛋白的 SDS-PAGE 检测可以看出, 目的蛋白以可溶形式存在, 分子量约为 37 ku(GST 26 ku + SUMO4 11 ku), 与预期值相符, 而空载体仅能诱导出 GST 蛋白(图 4)。

2.3 表达产物 SUMO4 蛋白的纯化

用 GST 亲和和层析的方法进行纯化, pH 8.0 缓冲液(10 mmol/L GSH, 50 mmol/L Tris-HCl)洗脱蛋白得到目的蛋白, 且纯化效果较好, 除有融合蛋白少量的降解产物外, 没有其他蛋白的存在(图 4)。

的蛋白, 特别是 SUMO、NEDD8 等受到广泛关注。目前, 已发现的人类 SUMO 蛋白有 4 种。与 SUMO-1、2、3 不同, SUMO4 并非广泛表达于各类细胞, 其功能也不在于指导蛋白亚细胞定位、核输入及参与染色体组稳定性维持, SUMO4 的表达具有组织特异性, 主要集中在淋巴结、脾脏、肾脏等处, 与负性免疫应答紧密相关^[16-18]。SUMO4 第 55 位的甲硫氨酸, 位于蛋白激酶 C 磷酸化位点处, 保守存在于许多物种中, 其氨基酸的突变会引起 SUMO4 分子构象并影响其生物学活性^[19]。

基于不同人种的群体调查显示, SUMO4 主要

与 I 型、II 型糖尿病相关,与类风湿性关节炎也有一定联系^[19];但对其他免疫疾病,如系统性红斑狼疮、阿狄氏病等,尚未发现患者 SUMO4 基因有显著异常^[20-21]。这说明 SUMO4 对免疫系统的影响具有特异性。其作用机理有待进一步深入研究,及群体对照实验的拓展。

SUMO 蛋白在体内首先是以无活性的形式出现,然后在特异性蛋白酶的作用下暴露 C 端的双甘氨酸位点,成熟化^[17]。为了给 SUMO4 分子水平及细胞水平的研究奠定基础,本试验人工合成了 SUMO4 基因。参照 SUMO-1、2、3 基因的克隆方法^[22-23],本试验扩增的 SUMO4 片段为暴露双甘氨酸的活化形式(SUMO4 GG),长度 279 bp,而非该基因全长 288 bp。

本研究合成 SUMO4 基因片段时采用了循环延伸 PCR 技术。该技术适用于已知核酸序列,却又找不到合适模板的小基因(<400 bp)的克隆,也适用于多位点突变及密码子优化等基因的改造^[24]。值得注意的是,在用该技术合成基因时,引物片段应控

制在 50~65 bp,相邻片段互补/重叠区为 11~13 bp,且避免富含 AT。引物过短,会增加反应次数和合成成本,过长则不能保证保真度。由于一轮 PCR 的产物会成为下一轮的模板,所以提高扩增特异性显得十分关键。除摸索各轮 PCR 合适的退火温度外,本试验待反应体系在预变性阶段温度升至 94 ℃ 后再加入 *Pfu* DNA 聚合酶,有效地减少了引物二聚体的形成,提高了扩增特异性。

本试验选用了目前常用的、高效的大肠杆菌克隆表达载体 pGEX-4T-1。该载体在目的基因的一端融合了 GST 标签。GST 的融合既能稳定目的蛋白和增加可溶性,又能方便纯化,还可以帮助鉴定蛋白^[25]。如果后续工作是抗体制备,GST 标签不用切割,可增加目的蛋白,特别是小蛋白的免疫原性,如果纯化产物要直接进行功能研究,则可以用凝血酶切除 GST。总体而言,pGEX-4T-1 与表达菌株 BL21 RIL 的协调作用,优化了特异靶蛋白的表达。从 SDS-PAGE 和 Western blot 的结果可以看出,目的蛋白的表达量和纯化效果都很理想。

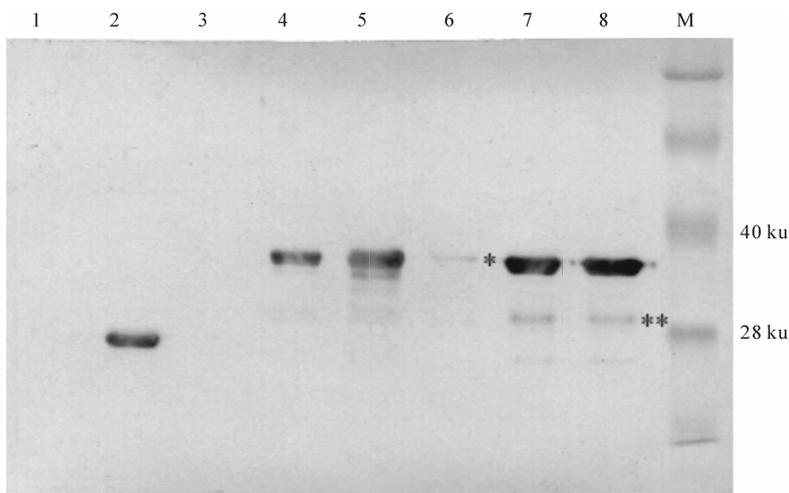


图5 GST-SUMO4 诱导表达及纯化产物的 Western blot 检测结果

1. 未诱导 pGEX-4T-1 空载体;2. IPTG 诱导空载体;3. 未诱导表达载体 pGEX-4T-1-SUMO4;4. pGEX-4T-1-SUMO4 诱导后的总蛋白;
5. 可溶性蛋白;6. 杂蛋白;7~8. 纯化后的 GST-SUMO4;M. 蛋白分子量标样;*. 未诱导时的少量本底表达;*. 融合蛋白有少量降解

Fig. 5 Western blot test of the expression and purification products of GST-SUMO4

1. Non-induced pGEX-4T-1;2. Induced pGEX-4T-1;3. Non-induced expression vector;4. Whole cellular protein after induction;5. Soluble protein extracts;6. Unwanted protein;7-8. Purified GST-SUMO4;M. Protein Marker;*. Background expression at low level without induction;*. Degradation product of fusion protein

4 结论

用循环延伸 PCR 法可以成功合成长度约 280 bp 的人 SUMO4 基因。重组子 pGEX-4T-1 在大肠杆菌表达株系 BL21 RIL 中,28 ℃ 200 r/min 经 1 mmol/L IPTG 诱导 5 h,可以大量表达可溶性的

GST-SUMO4 融合蛋白。该融合蛋白可通过 GST 亲和层析柱一步纯化,且纯化效果良好。

[参考文献]

- [1] 沈洁,谷卫.新发现的 I 型糖尿病相关基因[J].国内内分泌代谢杂志,2006,26(1):40-42.

Shen J,Gu W. New genes associated with type 1 diabetes [J].

- Intern J Endocrinol Metab, 2006, 26(1): 40-42. (in Chinese)
- [2] Ikegami H, Oghihara T. Genetics of insulin-dependent diabetes mellitus [J]. *Endocr J*, 1996, 43: 605-613.
- [3] Paterson A D. Genetic epidemiology of type 1 diabetes [J]. *Curr Diab Rep*, 2006, 6(2): 139-146.
- [4] Noso S, Fujisawa T, Kawabata Y, et al. Association of small ubiquitin-like modifier 4 (SUMO4) variant, located in IDDM5 locus with type 2 diabetes in the Japanese population [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(6): 2358-2362.
- [5] Guo D, Li M, Zhang Y, et al. A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes [J]. *Nat Genet*, 2004, 36: 837-841.
- [6] Wang C Y, Yang P, She J X. Assessing the validity of the association between the SUMO4 M55V variant and risk of type 1 diabetes [J]. *Nat Genet*, 2005, 37: 112-113.
- [7] Noso S, Ikegami H, Fujisawa T, et al. Genetic heterogeneity of SUMO4 M55V variant with susceptibility to type 1 diabetes [J]. *Diabetes*, 2005, 54(12): 3582-3586.
- [8] Ikegami H, Fujisawa T, Kawabata Y, et al. Genetics of type 1 diabetes; similarities and different between Asian and Caucasian population [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1079: 51-59.
- [9] Noso S, Ikegami H, Fujisawa T, et al. Association of SUMO4, as a candidate gene for IDDM5, with susceptibility to type 1 diabetes in Asian populations [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1079: 41-46.
- [10] Doheny K F, Pugh E W, Chines P, et al. A large set of finnish affected sibling pair families with type 2 diabetes suggests susceptibility loci on chromosomes 6, 11, and 14 [J]. *Diabetes*, 2004, 53: 821-829.
- [11] Xiang K, Wang Y, Zheng T, et al. Genome-wide search for type 2 diabetes/impaired glucose homeostasis susceptibility genes in the Chinese: significant linkage to chromosome 6q21-q23 and chromosome 1q21-q24 [J]. *Diabetes*, 2004, 53: 228-234.
- [12] Sale M M, Freedman B I, Langefeld C D, et al. A genome-wide scan for type 2 diabetes in African-American families reveals evidence for a locus on chromosome 6q [J]. *Diabetes*, 2004, 53: 830-837
- [13] Duggirala R, Blangero J, Almasy L, et al. A major locus for fasting insulin concentrations and insulin resistance on chromosome 6q with strong pleiotropic effects on obesity-related phenotypes in nondiabetic Mexican Americans [J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 68: 1149-1164.
- [14] Lin H Y, Wang C L, Hsiao P J, et al. SUMO4 M55V Variant is associated with diabetic nephropathy in type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2007, 56: 1177-1180.
- [15] Liu D, Cadozo A K, Darville M I, et al. Double-stranded RNA cooperates with interferon-gamma and IL-1 β to induce both chemokine expression and nuclear factor-kappaB-dependent apoptosis in pancreatic beta-cells; potential mechanisms for viral-induced insulinitis and β -cell death in type I diabetes mellitus [J]. *Endocrinology*, 2002, 143: 1225-1234.
- [16] Kroetz M B. SUMO; a ubiquitin-like protein modifier [J]. *Yale J Biol Med*, 2005, 78(4): 197-201.
- [17] Hilgarth R S, Murphy L A, Skaggs H S, et al. Regulation and function of SUMO modification [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(52): 53899-53902.
- [18] 向 斌, 周志广. 人类泛素蛋白 4 与 1 型糖尿病 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2006, 26(5): 436-439.
- Xiang B, Zhou Z G. SUMO4 and type 1 diabetes [J]. *International Journal of Pathology and Clinical Medicine*, 2006, 26(5): 436-439. (in Chinese)
- [19] Gibbons L J, Thomson W, Zeggini E, et al. The type 1 diabetes susceptibility gene SUMO4 at IDDM5 is not associated with susceptibility to rheumatoid arthritis or juvenile idiopathic arthritis [J]. *Rheumatology*, 2005, 44(1): 1390-1393.
- [20] Orozco G, Sanchez E, Gomez L M, et al. Study of the role of functional variants of SLC22A4, RUNX1 and SUMO4 in systemic lupuserythematosus [J]. *Ann Rheum Dis*, 2006, 65(6): 791-795.
- [21] Jennings C E, Owen C J, Wilson V, et al. No association of the codon 55 methionine to valine polymorphism in the SUMO4 gene with Graves' disease [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2005, 62(3): 362-365.
- [22] Mukhopadhyay D, Ayaydin F, Kolli N, et al. SUSP1 antagonizes formation of highly SUMO2/3-conjugated species [J]. *J Cell Biol*, 2006, 174(7): 939-949.
- [23] Hecker C M, Rabiller M, Haqlund K, et al. Specification of SUMO1 and SUMO2 interacting motifs [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(23): 16117-16127.
- [24] 杨 宇, 吴元华, 郑雅楠. 利用重叠延伸 PCR 技术进行 DNA 的人工合成 [J]. *安徽农业科学*, 2006, 34(9): 1810-1811.
- Yang Y, Wu Y H, Zheng Y N. Amplification of DNA sequence with overlap-extension PCR [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2006, 34(9): 1810-1811. (in Chinese)
- [25] 李永进, 陈媛媛, 毕利军. 融合标签技术及应用 [J]. *生物工程学报*, 2006, 22(4): 523-527.
- Li Y J, Chen Y Y, Bi L J. Fusion tags technology and their applications [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, 22(4): 523-527. (in Chinese)