

木薯 MeCML24 与 MeSAUR1 互作调控 *MeAGPS1a* 表达的功能验证

郑婉茹^{1,2}, 丁凯旋⁴, 陆小花^{1,3}, 李琳琳^{1,2}, 王超群^{1,2}, 陈银华^{1,2}, 姚远³, 陈新^{3*}, 耿梦婷^{1,2*}

1. 海南大学热带作物学院, 海南海口 570228; 2. 海南省热带生物资源可持续利用国家重点实验室培育基地, 海南海口 570228; 3. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101; 4. 海南省种子总站, 海南海口 571100

摘要: 木薯是华南地区重要的经济作物, 其块根富含淀粉。解析木薯块根淀粉合成调控机理将有助于木薯高产、高淀粉分子改良。AGPase 由大亚基和小亚基构成, 催化 1-磷酸葡萄糖和 ATP 形成腺苷二磷酸葡萄糖和焦磷酸, 其中腺苷二磷酸葡萄糖为淀粉生物合成的底物。AGPase 酶是植物淀粉合成的限速酶, 提高 AGPase 酶活性, 有利于作物淀粉的积累及产量的提高。木薯 *MeAGPS1a* 基因编码的小亚基是 AGPase 的催化中心, 前期研究表明生长素响应因子 MeSAUR1 作为转录因子正调控 *MeAGPS1a* 基因表达, 酵母双杂交筛选木薯 cDNA 文库显示钙调素类似蛋白 (CaM-like, CML) 成员 MeCML24 为 MeSAUR1 的候选互作蛋白。为了确定 MeCML24 和 MeSAUR1 的互作关系, 本研究从 ‘SC8’ 木薯品种基因组克隆了 *MeCML24* 基因, 该基因的 CDS 区长度为 492 bp, 编码 163 个氨基酸。MeCML24 蛋白的理化性质及二级结构分析显示, 该蛋白理论等电点 pI 值 4.38, 属于亲水性蛋白, α -螺旋占 52.76%, 无规则卷曲占 30.06%, β -转角结构占 11.04%。构建酵母双杂交载体 BD-*MeCML24*, 自激活实验表明 MeCML24 不具有自激活活性。酵母双杂交点对点实验发现, 共转 AD-*MeSAUR1* 和 BD-*MeCML24* 质粒的酵母菌株在 SD/TLHA+x- α -gal 培养基上变蓝, 表明 MeCML24 与 MeSAUR1 存在互作关系。采用双分子荧光互补 (BiFC) 实验, 将融合蛋白 MeSAUR1-nEYFP 和 MeCML24-cEYFP 在烟草叶片中共表达, 在激光共聚焦显微镜下检测出黄色荧光蛋白 EYFP 的荧光信号, 进一步证明了 MeCML24 与 MeSAUR1 互作。最后利用双荧光素酶实验证明 MeCML24 与 MeSAUR1 互作负调控 *MeAGPS1a* 基因表达。本研究揭示了木薯 MeSAUR1 与 MeCML24 协同调控 *MeAGPS1a* 基因表达的机制, 发现钙调素类似蛋白 MeCML24 参与调控木薯块根淀粉合成关键基因 *MeAGPS1a* 表达, 为利用分子生物学技术培育木薯优良品种提供了理论基础。

关键词: 木薯; MeCML24 蛋白; MeSAUR1 蛋白; 互作蛋白; *MeAGPS1a* 启动子; 转录调控

中图分类号: Q949.748.5 文献标识码: A

Functional Validation of Interaction Between Cassava MeCML24 and MeSAUR1 to Regulate the Expression of *MeAGPS1a*

ZHENG Wanru^{1,2}, DING Kaixuan⁴, LU Xiaohua^{1,3}, LI Linlin^{1,2}, WANG Chaoqun^{1,2}, CHEN Yinhu^{1,2}, YAO Yuan³, CHEN Xin^{3*}, GENG Mengting^{1,2*}

1. College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources, Haikou, Hainan 570228, China; 3. Institute of Tropical Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 4. Hainan Seed Station, Haikou, Hainan 571100, China

Abstract: Cassava is an important cash crop in Southern China, which is enriched with starch in the tuber roots. The analysis of the regulation mechanism of starch synthesis in cassava root would contribute to the improvement of yield

收稿日期 2022-04-13; 修回日期 2022-05-20

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31960058); 海南省研究生创新科研课题 (No. Hys2020-140)。

作者简介 郑婉茹 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 作物分子育种。*通信作者 (Corresponding author): 陈新 (CHEN Xin), E-mail: chenxin@itbb.org.cn; 耿梦婷 (GENG Mengting), E-mail: mengtingeng8908@163.com。

and high starch molecular in cassava. AGPase is composed of large subunit and small subunit, and it catalyzes G-1-P and ATP to form ADPG and PPi, in which ADPG is the substrate of starch biosynthesis. Therefore, AGPase is a rate-limiting enzyme in plant starch synthesis, and improving the activity of AGPase is beneficial for the accumulation of crop starch and the improvement of yield. The small subunit encoded by *MeAGPS1a* is the catalytic center of AGPase in cassava. Previous studies have shown that the growth response factor MeSAUR1 as a transcription factor positively regulates the expression of *MeAGPS1a* gene, and yeast two-hybrid screening of a cassava cDNA library revealed that the calmodulin-like (CML) member MeCML24 is a candidate interacting protein of MeSAUR1. To determine the interaction between MeCML24 and MeSAUR1, and *MeCML24* was cloned from the genome of SC8 cassava variety in this study. The length of CDS region of *MeCML24* was 492 bp, encoding 163 amino acids. The physicochemical properties and secondary structure analysis of MeCML24 showed that the value of theoretical pI was 4.38, which belonging to hydrophilic protein with α -helix accounting for 52.76%, random coil accounting for 30.06%, and beta turn accounting for 11.04%. Yeast two-hybrid vector BD-*MeCML24* was constructed, and the self-activation experiment showed that MeCML24 had no self-activation. Yeast two-hybrid point-to-point experiment revealed that yeast strains co-transfected with AD-*MeSAUR1* and BD-*MeCML24* plasmids turned blue on nutrient medium with SD/TLHA+x- α -gal, indicating that MeCML24 interacted with MeSAUR1. The fusion protein MeSAUR1-nEYFP and MeCML24-cEYFP were co-expressed in tobacco leaves by bimolecular fluorescence complementation (BiFC) experiment, and the fluorescence signal of yellow fluorescent protein EYFP was detected under laser confocal microscope, which further proved the interaction between MeCML24 and MeSAUR1. Finally, the interaction between MeCML24 and MeSAUR1 negatively regulated the expression of *MeAGPS1a* by double luciferase experiment. The study revealed the mechanism of MeSAUR1 and MeCML24 synergistically regulating *MeAGPS1a* gene expression in cassava, and found that the calmodulin-like protein MeCML24 regulating the expression of *MeAGPS1a*, a key gene for starch synthesis in cassava root. This study would provide a theoretical basis for cultivating excellent cassava varieties by molecular biology technology.

Keywords: cassava; MeCML24 protein; MeSAUR1 protein; interacting protein; *MeAGPS1a* promoter; transcriptional regulation

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.01.001

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 根部膨大形成富含淀粉的储藏根, 淀粉含量约占干质量的 70%~80%, 占鲜质量的 20%~30%^[1], 是全球第六大粮食作物, 与马铃薯、红薯并列为世界三大薯类作物, 也是我国重要的工业和生物能源原料^[2]。参与淀粉生物合成的酶包括腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (ADP-glucose pyrophosphorylase, AGPase), 淀粉合酶 (starch synthase, SS), 淀粉分支酶 (starch branching enzyme, SBE) 及去分支酶 (starch debranching enzyme, DBE) 等四大类^[3]。AGPase 是淀粉合成的关键酶和限速酶, 其催化 G-1-P 和 ATP 生成淀粉生物合成的底物 ADPG 和 PPi^[4]。AGPase 酶活性是影响淀粉类作物产量的重要因素。

AGPase 酶由大亚基和小亚基构成。木薯 *MeAGPS1a* 基因编码的小亚基是 AGPase 的催化中心。实验室前期研究表明生长素响应因子 MeSAUR1 作为转录因子, 可结合 *MeAGPS1a* 基因翻译起始位点上游-201~400 bp 的启动子区, 正调控 *MeAGPS1a* 基因的表达^[5]。SAUR (small auxin-up RNA) 是生长素响应因子之一, 也是最

大的一类生长素反应因子, 在大多数植物中约有 60~140 个基因^[6]。本实验室通过酵母双杂交筛选木薯 cDNA 文库, 结果显示钙调素类似蛋白 MeCML24 为 MeSAUR1 的候选互作蛋白 (未发表)。钙调素类似蛋白 (CaM-like, CML) 是一类重要的钙信号传感蛋白, 具有植物发育、逆境胁迫反应、离子吸收、转录调控等多种生物学功能。为了确定木薯的 MeCML24 是否与 MeSAUR1 存在互作关系, 本研究克隆了 *MeCML24* 基因, 通过酵母双杂交点对点实验、双分子荧光互补 (BiFC) 实验进行互作验证; 利用双荧光素酶实验分析 MeCML24 参与 MeSAUR1 对 *MeAGPS1a* 基因表达的调控功能。揭示木薯 MeCML24 和 MeSAUR1 协同调控 *MeAGPS1a* 基因表达的功能, 有利于进一步了解木薯块根淀粉积累过程中的分子调控网络, 也为木薯分子育种提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

‘SC8’木薯 (*Manihot esculenta* Crantz)、烟草本生烟 (*Nicotiana benthamiana*) 由本实验室提

供; 大肠杆菌菌株 Trans5 α 、农杆菌感受态细胞 GV3101 (pSoup-p19) 购自上海唯地生物技术有限公司, 酵母菌株 AH109 由本实验室提供; 酵母双杂交载体质粒 pGBKT7-laminc、pGADT7-LargeT、pGBKT7、pGADT7、pGBKT7-MeSAUR1、pGBKT7-p53; 双分子荧光互补载体 pNC-BiFC-Enc 及 pNC-BiFC-Ecc、双荧光素酶实验载体 CaMV35S::MeSAUR1-MeAGPS1a pro::LUC 和 MeAGPS1a pro::LUC 均由海南大学生物资源可持续利用生物重点实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 MeCML24 基因的克隆及生物信息学分析 根据 phytozome 数据库中获得 MeCML24 蛋白的编码基因信息, 采用 Premier 5.0 软件设计 MeCML24 基因的克隆及酵母双杂交验证引物(表 1), 在上海生工生物技术公司合成。以 ‘SC8’ 木薯 cDNA 为模板, 采用 RT-PCR 方法扩增 MeCML24 基因的编码区序列。PCR 扩增体系如下: PrimerSTART Mix 25 μ L, 10 mmol/L 上下游引物各 2 μ L, 木薯 cDNA 2 μ L, 去离子水补足至 50 μ L。反应程序设置如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 35 个循环包括 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min; 最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测、凝胶回收试剂盒切胶回收, 送深圳华大基因科技有限公司测序, 分析 MeCML24 基因序列。利用 ExPASy 软件分析木薯 MeCML24 的生理生化性质, 利用 SOPMA 软件分析 MeCML24 蛋白的二级结构。

1.2.2 MeSAUR1 与 MeCML24 蛋白的酵母双杂点对点验证 采用限制性内切酶 EcoRI 和 SalI, 双酶切 pGBKT7 (BD) 空载质粒, 纯化回收载体框架, 用 T4 DNA 连接酶将 MeCML24 克隆到 BD 载体上, 构建 BD-MeCML24 载体。将连接产物转化大肠杆菌 Trans5 α 感受态细胞, 进行单克隆菌落 PCR, 筛选阳性克隆送深圳华大基因科技有限公司测序进一步验证。提取测序正确的 BD-MeCML24 质粒与 AD 空载质粒共转 AH109 酵母菌株, 并在 SD/TL, SD/TLHA, SD/TLHA+x- α -gal 培养基平板上, 检测 MeCML24 蛋白是否具有自激活活性。将 BD-MeCML24 质粒和 AD-MeSAUR1 质粒共转 AH109 酵母菌株, 在 SD/TL、SD/TLHA 和 SD/TLHA+x- α -gal 培养基平板上生长, 验证 MeSAUR1 与 MeCML24 蛋白的互作关系。酵母双杂阳性对照为共转 AD-largeT

和 BD-p53 的 AH109 酵母菌株、阴性对照为共转 AD-largeT 和 BD-laminc 的 AH109 酵母菌株。

1.2.3 双分子荧光互补 (BiFC) 实验进行植物体内验证 使用 PrimerSTART 高保真酶, 以 1.2.1 获得的 MeCML24 基因编码区为模板, PCR 扩增 MeCML24 基因, 通过同源重组的方式将 MeSAUR1 克隆到 pNC-BiFC-Enc 载体, MeCML24 克隆到 pNC-BiFC-Ecc, 转化大肠杆菌 Trans5 α 感受态, 进行菌落 PCR 检测, 挑选阳性克隆并送深圳华大基因科技有限公司测序验证。将构建成功的重组质粒 pNC-BiFC-Enc-MeSAUR1 和 pNC-BiFC-Ecc-MeCML24 分别转化 GV3101 (pSoup-p19) 农杆菌菌株, 注射侵染生长 30 d 本氏烟草叶片。避光培养 3 d 后在激光共聚焦显微镜下观察侵染叶片是否产生 YFP 荧光。

1.2.4 MeSAUR1 和 MeCML24 互作对 MeAGPS1a 基因的调控效应 本实验室前期已构建了双荧光素酶实验载体 CaMV35S::MeSAUR1-MeAGPS1a pro::LUC (简化命名为 MeSAUR1-pMeAGPS1a) 和 MeAGPS1a pro::LUC (简化命名为 pMeAGPS1a), 验证了 MeSAUR1 对 MeAGPS1a 基因启动子的正调控功能。本研究使用 PrimerSTART 高保真酶扩增 MeCML24 基因。回收扩增片段, 通过同源重组的方式将 MeCML24 克隆到 CaMV35S::MeSAUR1-MeAGPS1a pro::LUC 质粒中 MeSAUR1 基因的下游, 形成 CaMV35S::MeSAUR1-T2A-MeCML24-MeAGPS1a pro::LUC (简化命名为 MeSAUR1-MeCML24-pMeAGPS1a) 载体(图 1)。2 个基因之间通过 T2A 短肽连接。在蛋白翻译过程中 T2A 连接的 2 个蛋白可以被分割成 2 个独立的蛋白, 因此可以共表达 MeSAUR1 及 MeCML24。将分别携带 MeSAUR1-MeCML24-pMeAGPS1a、MeSAUR1-pMeAGPS1a 和 pMeAGPS1a 载体的农杆菌 GV3101 (pSoup-p19) 侵染本氏烟草叶片, 利用 PierceTM Renilla-Firefly Luciferase Dual Assay Kit 进行双荧光素酶活性检测。

2 结果与分析

2.1 MeCML24 基因的克隆

根据 phytozome 数据库中获得的 MeCML24 信息(基因组编号: Manes.01G116700), 以 ‘SC8’ 木薯品种的 cDNA 为模板, 采用 RT-PCR 方法扩增 MeCML24 基因的编码区(图 2)。经测序分析,

表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Primers for this study

上游序列 (5'-3') Forward sequence (5'-3')	下游序列 (5'-3') Reverse sequence (5'-3')	用途 Use
GGAATTCATATGATGGCGAGATCAGGGCC TACG	CGGAATTCCTTACAGTAATCCGTTAGTCAT CATC	克隆 <i>MeCML24</i> 基因及构建酵母双杂交载体 BD- <i>MeCML24</i>
AGTGGTCTCTGTCCAGTCCTATGGCGAGAT CAGGGCCT	GGTCTCAGCAGACCACAAGTCAGTAATC CGTTAGTCATCATCTTC	构建 BiFC 载体 pNC-BiFC-Ecc- <i>MeCML24</i>
AGTGGTCTCTGTCCAGTCCTATGGCGATCA GGAAATCAAC	GGTCTCAGCAGACCACAAGTGTCTCTAA CATCCATGCTCAGA	构建 BiFC 载体 pNC-BiFC-Enc- <i>MeSAUR1</i>
AATCCCGGCCCTGAGCTCATGGCGAGATCA GGGCCT	TTCATCTTTCATCTTCATATCTGCAGCAGTA ATCCGTTAGTCATCATCTTC	构建双荧光素酶载体 <i>MeSAUR1-MeCML24-pMeAGPS1a</i>

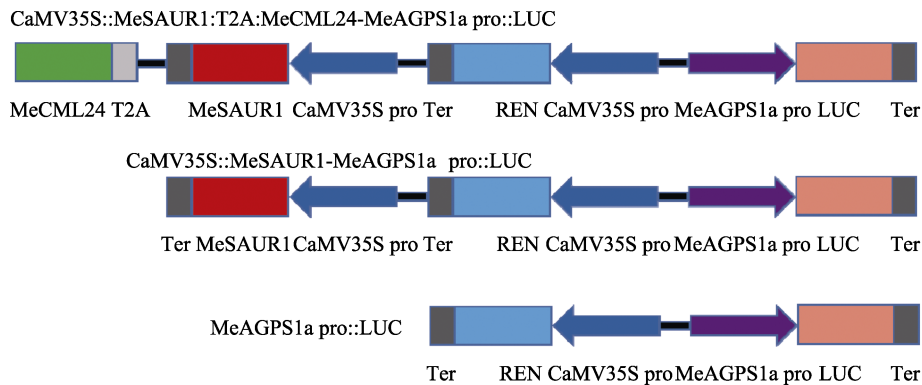
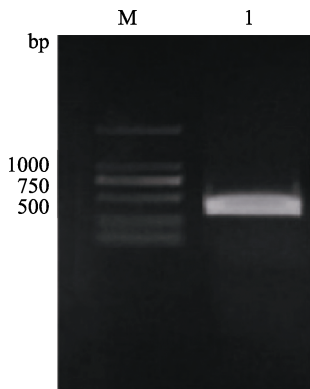


图 1 双荧光素酶载体构建示意图

Fig. 1 Schematic diagram of double luciferase vector construction



M: DL2000 DNA marker.

图 2 PCR 扩增 *MeCML24* 基因

Fig. 2 PCR amplification of *MeCML24*

MeCML24 (基因组编号: Manes.01G116700) 的编码区长度为 492 bp, 可编码 163 个氨基酸。

2.2 *MeCML24* 的生物信息学分析

2.2.1 *MeCML24* 的理化性质分析 利用 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件对木薯 *MeCML24* 蛋白的理化性质进行分析, 结果表明该蛋白的理化分子式为 $C_{768}H_{1227}N_{211}O_{265}S_{13}$, 氨基酸数量为 163, 分子量为 18 073.23 Da, 原子总数为 2484, 理论等电点 pI 值约为 4.38。 *MeCML24* 蛋白富含天冬氨酸 Asp (13.5%), 甘

氨酸 Gly (11.7%), 赖氨酸 Lys (8.0%), 异亮氨酸 Ile (7.4%), 亮氨酸 Leu (7.4%), 谷氨酸 Glu (6.7%)。 *MeCML24* 蛋白带负电荷的残基总数 (Asp+Glu) 为 33, 正电荷残基总数 (Arg+Lys) 为 19, 脂溶指数为 70.55, 不稳定性指数 (II) 为 30.80, 表明该蛋白质归类为稳定蛋白。 *MeCML24* 蛋白亲水性总平均值为 -0.569 (负值表示亲水性, 正值表示疏水性) (图 3), 表明该蛋白亲水性较高。采用 TMHMM Server 软件进行跨膜分析发现, *MeCML24* 没有跨膜结构, 因此该蛋白不属于跨膜蛋白。

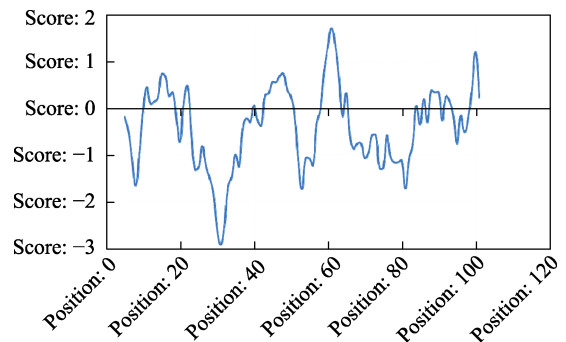


图 3 木薯 *MeCML24* 蛋白亲水性分析

Fig. 3 Hydropilia analysis of *MeCML24* from cassava

2.2.2 MeCML24 的蛋白二级结构分析 采用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 在线工具分析预测 MeCML24 蛋白的二级结构。结果表明 MeCML24 蛋白的结构中, α -螺旋 (alpha helix)

占 52.76%, 含有 86 个氨基酸, 无规则卷曲 (random coil) 占 30.06%, 含有 49 个氨基酸, β -转角结构 (beta turn) 占 11.04%, 含有 18 个氨基酸, 延伸链 (Extended strand) 占 6.13%, 含有 10 个氨基酸 (图 4)。

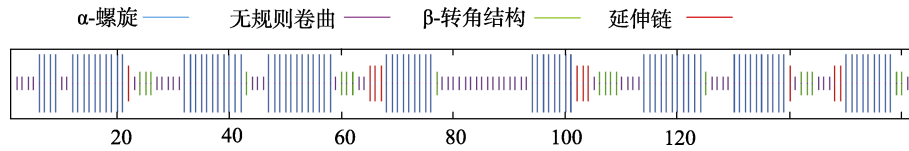


图 4 木薯 MeCML24 的蛋白二级结构分析

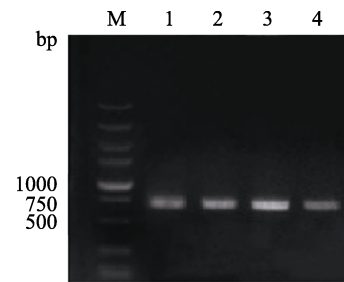
Fig. 4 Protein secondary structure analysis of MeCML24 from cassava

2.3 MeSAUR1 与 MeCML24 的酵母双杂交点对点验证

将 pGBKT7 (BD) 载体与 *MeCML24* 连接, 转化大肠杆菌 Trans5 α 感受态细胞, 进行菌落 PCR 筛选阳性克隆, 构建酵母双杂交载体 BD-*MeCML24*。PCR 产物电泳结果显示, 目的条带单一, 且大小与预期一致 (图 5)。阳性克隆菌液送深圳华大基因科技有限公司测序, 证明 *MeCML24* 已成功构建至 pGBKT7 载体。提取 BD-*MeCML24* 载体质粒, 用于转酵母进行自激活分析及酵母双杂交验证实验。

在酵母双杂交实验前, 利用构建成功的 BD-*MeCML24* 载体进行自激活检测。在 SD/TL 平板上实验组酵母菌 (共转 AD+BD-*MeCML24*) 和对照组酵母菌 (阳性对照 AD-largeT+BD-p53、阴

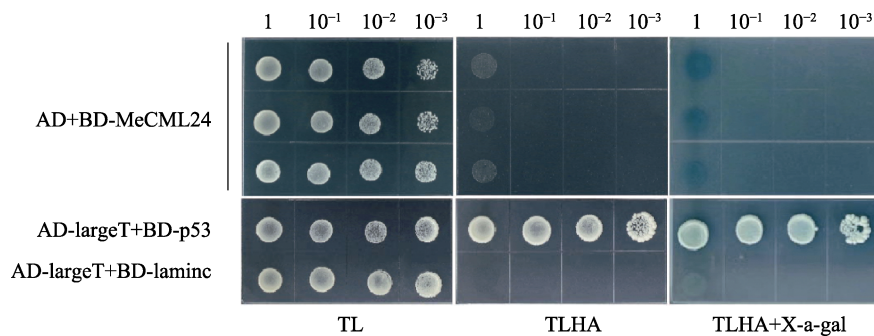
性对照 AD-largeT+BD-laminc) 均能正常生长, 在 SD/TLHA 平板上只有阳性酵母生长, 且在 SD/TLHA+x-a-gal 平板上阳性酵母菌落变蓝, 实验组和阴性对照不生长。此结果表明候选互作蛋白 MeCML24 不具有自激活活性 (图 6)。



M: DL5000 DNA marker.

图 5 筛选阳性克隆

Fig. 5 Screening of positive clones



1、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 为酵母菌液的原液及不同稀释倍数; TL: 二缺培养基; TLHA: 四缺培养基。

1、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} were the original solution and different dilution multiples of yeast solution;

TL: Two deficient medium; TLHA: Four deficient medium.

图 6 MeCML24 的自激活检测

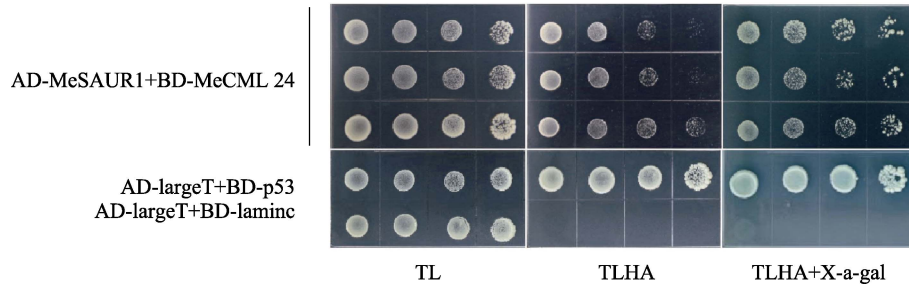
Fig. 6 Self-activation test of MeCML24

在 MeCML24 没有自激活的基础上, 本研究进一步通过酵母双杂交点对点实验, 验证 MeSAUR1 与 MeCML24 是否存在互作关系。将 AD-*MeSAUR1*+BD-*MeCML24* 共转 AH109 酵母

菌, 接着将转基因酵母菌分别于 SD/TL、SD/TLHA 和 SD/TLHA+x- α -gal 培养基平板上生长。结果发现只有阴性对照酵母菌 (AD-largeT+BD-laminc) 在 SD/TLHA 平板上不生长, AD-*MeSAUR1*+BD-

MeCML24 酵母菌株和阳性对照菌 (AD-largeT+BD-p53) 均能生长, 并且在 SD/TLHA+x- α -gal 平板

上的酵母菌落会变蓝。此结果表明, *MeCML24* 候选蛋白与 *MeSAUR1* 蛋白存在互相作用 (图 7)。



1、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 为酵母菌液的原液及不同稀释倍数; TL: 二缺培养基; TLHA: 四缺培养基。

1、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} were the original solution and different dilution multiples of yeast solution;

TL: Two deficient medium; TLHA: Four deficient medium.

图 7 酵母双杂交验证

Fig. 7 Validation of yeast two-hybrid system

2.4 双分子荧光互补 (BiFC) 体内验证 *MeSAUR1* 与 *MeCML24* 互作关系

由于酵母双杂交实验存在一定的假阳性可能性, 本研究采用双分子荧光互补技术 (BiFC) 进一步鉴定 *MeSAUR1* 与 *MeCML24* 的互作关系。将 *MeSAUR1* 克隆到 pNC-BiFC-Enc 载体上, 构建 pNC-BiFC-Enc-*MeSAUR1* 载体, 融合表达 *MeSAUR1*-nEYFP 蛋白; 将 *MeCML24* 克隆到 pNC-BiFC-Ecc 载体上, 构建 pNC-BiFC-Ecc-*MeCML24*, 融合表达 *MeCML24*-cEYFP 蛋白。如果 *MeSAUR1* 与 *MeCML24* 互作, 黄色荧光蛋白 EYFP 的 N 端区域 (nEYFP) 和 C 端区域 (cEYFP) 将在空间上相互靠近互补, 恢复 EYFP 的功能。将携带 pNC-BiFC-Enc-*MeSAUR1* 载体和 pNC-BiFC-Ecc-*MeCML24* 载体的农杆菌混合注射烟草, 72 h 后在激光共聚焦显微镜观察黄色荧光蛋白 EYFP 的发光情况。结果发现, *MeSAUR1* 与 *MeCML24* 互作, 在烟草细胞膜、细胞核和细胞质上有黄色荧光信号; 对照组在相同条件下没有荧光信号 (图 8)。

2.5 双荧光素酶实验分析 *MeSAUR1* 与 *MeCML24* 互作对 *MeAGPS1a* 基因表达的调控效应

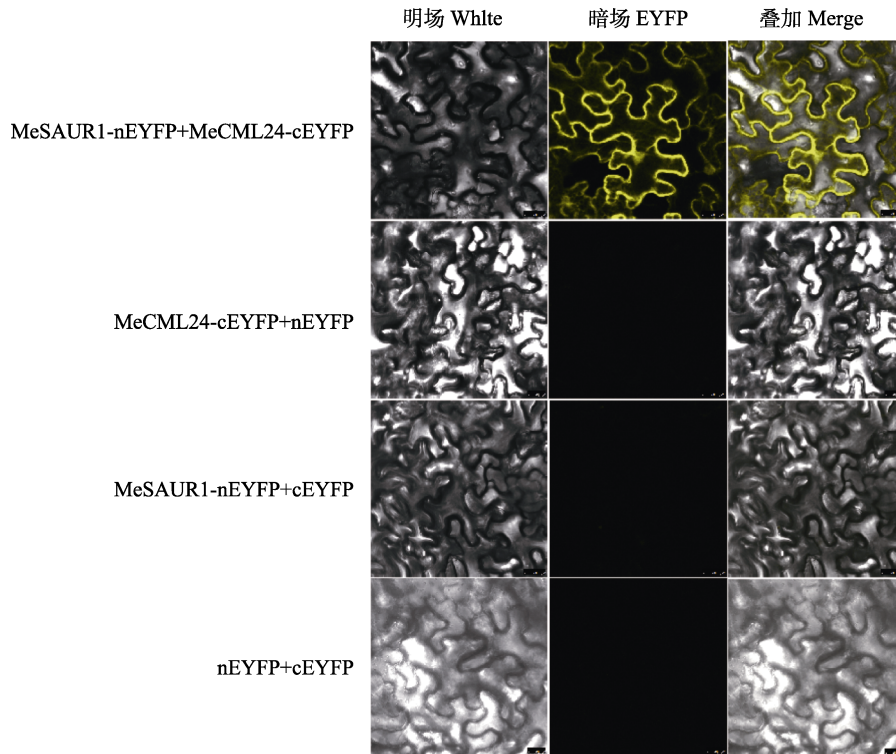
构建双荧光素酶载体 *MeSAUR1-MeCML24-pMeAGPS1a*, 该载体可以共表达 *MeSAUR1* 和 *MeCML24* 蛋白, 以分析这 2 个蛋白互作对 *pMeAGPS1a* 启动子活性的影响。采用 2 个对照载体: *pMeAGPS1a* 载体是仅有 *pMeAGPS1a* 启动子的双荧光素酶载体, 用于分析该启动子的本底表

达; *MeSAUR1-pMeAGPS1a* 载体可表达 *MeSAUR1* 蛋白, 正调控 *pMeAGPS1a* 启动子。将分别携带 *MeSAUR1-MeCML24-pMeAGPS1a*、*MeSAUR1-pMeAGPS1a* 和 *pMeAGPS1a* 载体的农杆菌 GV3101 (pSoup-p19) 侵染本氏烟草叶片, 进行双荧光素酶活性检测。结果显示双荧光素酶载体表达 *MeSAUR1* 后, *pMeAGPS1a* 启动子活性上升了 44.43%, 而共表达 *MeSAUR1* 和 *MeCML24* 后, *pMeAGPS1a* 启动子活性仅为单独表达 *MeSAUR1* 的 31.26%, 是 *pMeAGPS1a* 启动子本底表达活性的 45.15%。因此 *MeCML24* 与 *MeSAUR1* 互作后可抑制 *MeAGPS1a* 基因表达 (图 9)。

3 讨论

木薯的光合速率比较高, 蔗糖合成能力也比较强, 但木薯块根的淀粉含量低于理论值^[7]。AGPase 是淀粉合成的关键酶和限速酶, 淀粉的含量和产量都与 AGPase 酶的活性有很大的关联, 因此以 AGPase 酶为切入点, 开展作物遗传改良, 对提高作物产量及淀粉含量具有重要的意义。木薯 *MeAGPS1a* 基因编码的小亚基是 AGPase 的催化中心, 无论在叶片还是块根中的表达量均高于其他 *MeAGPase*^[8]。本实验室前期研究发现, *MeSAUR1* 转录因子可结合在 *MeAGPS1a* 基因翻译起始位点上游 -201~400 bp 的启动子区, 正调控 *MeAGPS1a* 基因的转录。通过酵母双杂交文库筛选, 发现 *MeCML24* 可能是 *MeSAUR1* 的候选互作蛋白 (未发表)。

钙调素类似蛋白 (CaM-like, CML) 是一类重



MeSAUR1-nEYFP+MeCML24-cEYFP: MeSAUR1-nEYFP 和 MeCML24-cEYFP 在烟草叶肉细胞共表达; MeCML24-cEYFP+nEYFP: MeCML24-cEYFP 和 nEYFP 在烟草叶肉细胞共表达; MeSAUR1-nEYFP+cEYFP: MeSAUR1-nEYFP 和 cEYFP 在烟草叶肉细胞共表达; nEYFP+cEYFP: nEYFP 和 cEYFP 在烟草叶肉细胞共表达。
 MeSAUR1-nEYFP+MeCML24-cEYFP: MeSAUR1-nEYFP and MeCML24-cEYFP were co-expressed in tobacco mesophyll cells; MeCML24-cEYFP+nEYFP: MeCML24-cEYFP and nEYFP were co-expressed in tobacco mesophyll cells; MeSAUR1-nEYFP+cEYFP: MeSAUR1-nEYFP and cEYFP were co-expressed in tobacco mesophyll cells; nEYFP+cEYFP: nEYFP+cEYFP were co-expressed in tobacco mesophyll cells.

图 8 烟草 BiFC 验证 MeSAUR1 与 MeCML24 蛋白互作

Fig. 8 Bimolecular fluorescence complementation assays for MeSAUR1-MeCML24 interaction in tobacco leaves

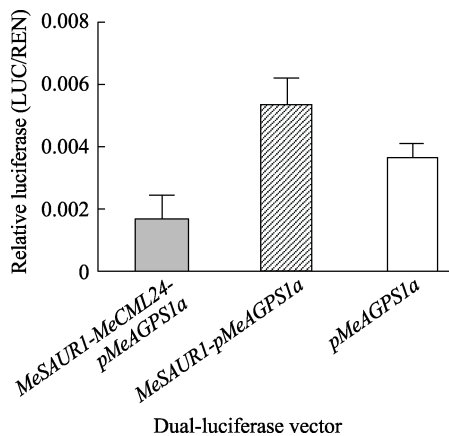


图 9 双荧光素酶实验分析 MeSAUR1-MeCML24 互作对 *MeAGPS1a* 基因表达的调控效应

Fig. 9 Dual-luciferase assay to analyze the regulatory effect of MeSAUR1-MeCML24 on the expression of *MeAGPS1a* gene

要的钙信号传感蛋白，具有植物发育、逆境胁迫反应、离子吸收、转录调控等多种生物学功能。在植物响应各种生理刺激时，Ca²⁺参与调节植物

的多种生长发育和胁迫适应过程，在这些过程中，Ca²⁺信号带有特异性标签，通过 Ca²⁺结合蛋白及其下游靶蛋白感知不同刺激并翻译成响应的细胞反应，钙调素 (CaM) 和钙调素类蛋白 (CML) 是 Ca²⁺主要的感受器，通过调节不同靶蛋白的活性调控多种细胞功能^[9]。植物钙调素类蛋白 (CML) 在钙信号转导中发挥重要作用，拟南芥 CML37 可调节植物多种胁迫反应，促进干旱诱导的 ABA 合成^[10]，且 Ca²⁺敏感蛋白 CML37 在拟南芥中起着正向防御调节作用，通过促进 JAR1 的活性来增强茉莉酸途径，从而激活下游防御^[11]。CML20 是响应胞质内钙离子的下游负调控因子，参与介导 ABA 调控气孔运动过程，影响植物抗旱能力^[12]；拟南芥 CML24 参与调控花粉萌发和花粉管长度并影响果荚的结实率^[13]。研究木薯钙信号相关受体 (CaM、CML、CBL) 的表达模式，发现钙信号在木薯响应干旱胁迫和抗采后生理性变质过程中具有关键作用^[14]。然而，CML 参与调

控木薯块根积累过程的研究尚未报道。

本研究通过酵母双杂交点对点实验、BiFC 实验证实了 MeCML24 与 MeSAUR1 的互作关系。POPESCU 等^[15]通过高密度拟南芥蛋白微阵列挖掘 CML 蛋白的互作蛋白,发现拟南芥 CML9 与 SAUR_B 蛋白 (At5g20810) 存在潜在互作关系,并通过免疫共沉淀 (Co-IP) 验证了这 2 个蛋白的互作关系。然而 CML9 与 SAUR_B 互作生物学功能尚未明确。本研究利用双荧光素酶实验,证明了 MeCML24 负调控 MeSAUR1 对 *MeAGPS1a* 基因的激活作用。此研究结果说明,钙信号途径参与调控木薯淀粉的合成过程。后续工作中,将进一步利用转基因及基因编辑技术,研究 MeSAUR1 与互作蛋白 MeCML24 对 *MeAGPS1a* 基因的调控效应及对木薯淀粉合成的影响。

参考文献

- [1] ZIDENGA T, LEYVA-GUERRERO E, MOON H, SAYRE S R. Extending cassava root shelf life via reduction of reactive oxygen species production[J]. *Plant Physiology*, 2012, 159(4): 1396-1407.
- [2] ZHANG P, WANG W Q, ZHANG G L, KAMINEK M, DOBREV P, XU J, GRUISSEM W. Senescence inducible expression of isopentenyl transferase extends leaf life, increases drought stress resistance and alters cytokinin metabolism in cassava[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010, 52(7): 653-669.
- [3] LEE S K, HWANG S K, HAN M, EOM J S, KANG H G, HAN Y, CHOI S B, CHO M H, BHOO S H, AN G, HAHN T R, OKITA T W, JEON J S. Identification of the ADP-glucose pyrophosphorylase isoforms essential for starch synthesis in the leaf and seed endosperm of rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 65(4): 531-546.
- [4] BALLICORA M A. Resurrecting the ancestral enzymatic role of a modulatory subunit[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(11): 10189-10195.
- [5] MA P, CHEN X, LIU C, MENG Y H, XIA Z Q. *MeSAUR1*, encoded by a SMALL AUXIN-UP RNA gene, acts as a transcription regulator to positively regulate ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit1A gene in cassava[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017(8): 13-15.
- [6] CHEN Y, HAO X, CAO J. Small auxin upregulated RNA (SAUR) gene family in maize: identification, evolution, and its phylogenetic comparison with *Arabidopsis*, rice, and sorghum[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2014, 56(2): 133-150.
- [7] YEOH H H, TRUONG V D. Protein contents, amino acid compositions and nitrogen-to-protein conversion factors for cassava roots[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, 70(1): 51-54.
- [8] LI Z G, CHEN H W, LI Q T, TAO J J, BIAN X H, MA B, ZHANG W K, CHEN S Y, ZHANG J S. Three SAUR proteins SAUR76, SAUR77 and SAUR78 promote plant growth in *Arabidopsis*[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 1-19.
- [9] 张超, 赵芊, 张哲, 宋水山. 植物免疫应答过程中 Ca^{2+} 及 CaM/CML 的功能[J]. *生物学杂志*, 2014, 31(2): 69-72.
- [9] ZHANG C, ZHAO Q, ZHANG Z, SONG S S. Functions of Ca^{2+} and CaM/CML during plant immune response[J]. *Journal of Biology*, 2014, 31(2): 69-72. (in Chinese)
- [10] 苏智宏, 黎圣金, 田长恩, 周玉萍. 植物类钙调素 CML37 的转录激活活性分析[J]. *科技视界*, 2020, 26(59): 155-156.
- [10] SU Z H, LI S J, TIAN C E, ZHOU Y P. Analysis of transcriptional activation activity of plant calmodulin CML37[J]. *Technology Vision*, 2020, 26(59): 155-156. (in Chinese)
- [11] SCHOLZ S S, VADASSERY J, HEYER M, REICHEL T M, BENDER K W, SNEDDEN W A, BOLAND W. Mutation of the *Arabidopsis* calmodulin-like protein CML37 deregulates the jasmonate pathway and enhances susceptibility to herbivory[J]. *Molecular Plant*, 2014, 7(12): 1712-1726.
- [12] 吴晓萌, 李春龙, 钱景美, 郑昱, 张伟. 拟南芥钙调素类似蛋白 CML20 参与植物抗干旱研究[J]. *中国科技论文在线精品论文*, 2016, 9(3): 205-212.
- [12] WU X M, LI C L, QIAN J M, ZHENG Y, ZHANG W. Involvement of *Arabidopsis thaliana* calmodulin-like protein CML20 in plant drought resistance studies[J]. *China Science and Technology Paper Online Excellence Paper*, 2016, 9(3): 205-212. (in Chinese)
- [13] 杨雪. 拟南芥 CML24 调控花粉萌发及花粉管生长的功能研究[D]. 济南: 山东大学, 2015.
- [13] YANG X. Functional studies on the regulation of pollen germination and pollen tube growth by CML24 in *Arabidopsis thaliana*[D]. Jinan: Shandong University, 2015. (in Chinese)
- [14] MEDVEDEV S S. Principles of calcium signal generation and transduction in plant cells[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2018, 65(6): 771-783.
- [15] POPESCU S C, POPESCU G V, BACHAN S, ZHANG Z, SEAY M, GERSTEIN M, SNYDER M, DINESH-KUMAR S P. Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high density *Arabidopsis* protein microarrays[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(11): 4730-4735.