

木薯 MeMinD 的互作蛋白筛选

潘 沐^{1,2}, 陆小花^{1,2*}, 姚 远², 陈银华^{1,3}, 郭建春^{2**}, 王亚杰^{2**}

1. 海南大学生命健康学院, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所/农业农村部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南海口 571101; 3. 海南大学热带农林学院, 海南海口 570228

摘 要: MinD 参与质体分裂的精细调控, 在质体形态维持中起着关键作用。实验室前期研究发现 MeMinD 蛋白参与了木薯质体的分裂, 然而与 MeMinD 蛋白协同调控木薯质体分裂的相关蛋白尚未明确。本研究构建了 pGBKT7-MeMinD 载体, 通过酵母双杂交文库筛选, 共获得 MeMinD 蛋白的 8 个候选互作蛋白, 点对点验证后发现烟酸磷酸核糖转移酶 2 (MeNAPRT2) 与 MeMinD 存在互作关系。该研究结果为进一步解析 MeMinD 参与调控木薯质体分裂的相关机制提供新的信息。

关键词: 木薯; MeMinD; MeNAPRT2; 酵母双杂交; 质体

中图分类号: S533 **文献标志码:** A

Screening of MeMinD Interacting Protein in Cassava

PAN Mu^{1,2}, LU Xiaohua^{1,2*}, YAO Yuan², CHEN Yinhua^{1,3}, GUO Jianchun^{2**}, WANG Yajie^{2**}

1. School of Life and Health Sciences, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Haikou, Hainan 571101, China; 3. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: MinD is involved in the fine regulation of plastid division and plays a key role in maintaining plastid morphology. Previous laboratory research found that the MeMinD protein is involved in the division of cassava plastids, but the related proteins that work in conjunction with MeMinD to regulate the division of cassava plastids have not been clearly identified. This study constructed the pGBKT7-MeMinD vector and, through yeast two-hybrid library screening, a total of 8 candidate interacting proteins of MeMinD were obtained; after point-to-point verification using the yeast two-hybrid system, it was found that the nicotinate phosphoribosyltransferase 2 (MeNAPRT2) interacts with MeMinD. The results of this study would provide new information for further analysis of the mechanism of MeMinD's participation in the regulation of cassava plastid splitting.

Keywords: cassava; MeMinD; MeNAPRT2; yeast two-hybrid; plastid

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.10.006

植物质体（叶绿体、淀粉体等）的分裂由一系列蛋白协同完成^[1]。MinD 参与质体分裂的精细调控, 在质体形态维持中起着关键作用。MinD 有 2 个重要的结构域: MinC 和 MinE 结合结构域。

MinC 基因所编码的 MinC 蛋白是细胞分裂抑制因子, 在 MinD 的 ATPase 活性催化下, 与其相互作用并结合形成复合物 MinCD, 之前, 充当“钟摆”功能的 MinE 在两极之间来回移动, 驱动 MinCD

收稿日期 2024-03-07; **修回日期** 2024-04-19

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 320RC709); 国家自然科学基金项目 (No. 32301740); 国家木薯产业技术体系项目 (No. CARS-11-HNGJC)。

作者简介 潘 沐 (1997—), 女, 硕士, 研究方向: 作物分子育种; *同等贡献作者: 陆小花 (1994—), 女, 博士研究生, 研究方向: 作物分子育种。 **通信作者 (Corresponding author): 郭建春 (GUO Jianchun), E-mail: guojianchun@itbb.org.cn; 王亚杰 (WANG Yajie), E-mail: wangyajie@itbb.org.cn。

复合物来回振荡,使 Z 环只能在中部进行组装,促进质体可以均等分裂成 2 个^[2]。当 MinD 过量表达,会让复合物 MinCD 遍布质体所有位点,抑制 Z 环形成,从而抑制质体分裂;而 MinD 的减少或缺失,使 Z 环的形成不局限在中部,形成偏离中心或多个 FtsZ 环,质体分裂发生在不适当的位置^[3-4]。

目前关于质体的研究多以叶绿体为对象,过量表达拟南芥 *AtMinD* 会导致叶绿体增大^[5],而减少 *AtMinD* 表达量或缺失该基因的突变体,引起叶绿体不对称分裂^[4]。将 *AtMinD* 在烟草过表达,转基因植株的叶绿体大,且数目减少^[6]。这些结果都进一步证实了 MinD 在质体分裂中的关键作用。淀粉体是木薯块根淀粉积累的场所,叶绿体是叶片临时性淀粉合成和降解的细胞器。前期,本实验室克隆了木薯的 *MeMinD* 基因,异源表达于大肠杆菌可导致菌体的分裂位点错位和丝状形成,亚细胞定位分析表明 *MeMinD* 可定位于叶绿体^[7]。通过基因编辑敲除 *MeMinD* 基因,突变体木薯的叶绿体和淀粉体显著增大(待发表)。以上结果表明 *MeMinD* 蛋白参与调控木薯质体的分裂,然而与 *MeMinD* 蛋白协同调控木薯质体分裂的相关蛋白尚未明确。本研究将 *MeMinD* 构建至 pGBKT7 载体,进行酵母双杂交文库筛选实验,挖掘与 *MeMinD* 互作的质体分裂相关蛋白,为解析木薯质体分裂调控机制提供新的信息。

1 材料与方法

1.1 材料

华南 8 号木薯(SC8, *Manihot esculenta* Crantz)、木薯 cDNA 文库、酵母双杂交质粒 pGBKT7、pGADT7、pGADT7-T、pGBKT7-lam、pGBKT7-p53 由本实验室提供;大肠杆菌 DH5 α 感受态、酵母菌 AH109 感受态购自上海唯地生物技术有限公司;缺陷培养基 SD/-Trp (SD/T)、SD/-Trp-Leu (SD/TL)、SD/-Trp-Leu-His-Ade (SD/TLHA)、X- α -Gal 购自北京酷来搏科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 pGBKT7-*MeMinD* 的构建与毒性检测 将酶切纯化的诱饵载体 pGBKT7 (BD) 载体与纯化 *MeMinD* 基因片段进行同源重组,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,进行菌落 PCR,筛选阳性单克隆,构建酵母双杂交载体 pGBKT7-*MeMinD*。提取 pGBKT7-*MeMinD* 重组质粒和 pGBKT7 (BD)

空载质粒并分别转化酵母菌 AH109,将阳性克隆用 SD/T 液体培养基扩大培养,将 OD₆₀₀ 控制在 0.8~1.0,再将菌液按 1、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 浓度梯度进行稀释,分别点在 SD/T 平板上,30 °C 培养 2~3 d,观察菌落生长情况。

1.2.2 自激活检验 将 pGBKT7-*MeMinD* 质粒与 pGADT7 (BD) 空载质粒共转入 AH109 酵母菌株,将阳性酵母液体培养基扩大培养,分别点在 SD/TL、SD/TLHA、SD/TLHA+X- α -Gal 三种平板上培养,观察实验组 (pGADT7+pGBKT7-*MeMinD*) 和对照组 (阳性对照: pGBKT7-p53+pGADT7-T, 阴性对照: pGBKT7-lam+pGADT7-T) 的酵母菌在 3 种平板上的生长情况,以此确定 *MeMinD* 蛋白是否存在自激活现象。

1.2.3 *MeMinD* 互作蛋白筛选 参照仇婷婷^[8]的方法进行酵母双杂交文库筛选 *MeMinD* 的候选互作蛋白。将变蓝的酵母菌斑进行 PCR 检测,PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,再利用 NCBI Blast 软件进行序列比对,筛选出木薯 *MeMinD* 可能互作的蛋白并进行功能注释。

1.2.4 酵母双杂交点对点验证 设计候选互作蛋白的基因扩增引物(表 1),克隆其编码区并连接到 pGADT7 载体。PCR 筛选阳性克隆并测序验证。将候选互作蛋白基因的 pGADT7 重组质粒与 pGBKT7-*MeMinD* 质粒共转 AH109 酵母菌株,进行酵母双杂交点对点验证,筛选 *MeMinD* 的互作蛋白。

2 结果与分析

2.1 诱饵载体 pGBKT7-*MeMinD* 的构建

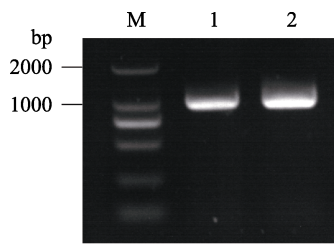
以 SC8 木薯 cDNA 为模板,PCR 扩增 *MeMinD* 的编码区序列。电泳检测结果显示扩增片段与预期大小 (987 bp) 一致(图 1)。将 *MeMinD* 基因片段与线性化的 pGBKT7 载体重组连接,转化大肠杆菌感受态细胞。挑取 5 个单菌落进行菌落 PCR 鉴定,获得 4 个阳性克隆并进行测序验证(图 2)。提取测序正确的 pGBKT7-*MeMinD* 诱饵载体,用于后续酵母双杂交文库筛选。

2.2 毒性检测 and 自激活检测

将 pGBKT7-*MeMinD* 和 pGBKT7 空载分别转化酵母感受态 AH109,将菌液稀释不同浓度 (1、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴) 后在 SD/TL 培养基上培养。结果显示转 pGBKT7-*MeMinD* 和 pGBKT7 空

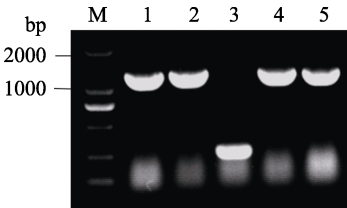
表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
pGBKT7- <i>MeMinD</i> -F	<u>gccatggaggccgaattc</u> ATGATATCTCTCAAACCCCTTCC
pGBKT7- <i>MeMinD</i> -R	<u>ggccgctgcaggtcgac</u> TTACTCTCAAACAAGGAAAAAAC
pGADT7- <i>MeFBA1-1</i> -F	<u>catggaggccagtgaattc</u> ATGGCCTCAGCATCACTTCTCA
pGADT7- <i>MeFBA1-1</i> -R	<u>ctcgagctcgatggatcc</u> TTAGTACACGTAGCCCTTGACGAAC
pGADT7- <i>MeFBA1-2</i> -F	<u>catggaggccagtgaattc</u> ATGGCCTCTGCTTCTCTCCTC
pGADT7- <i>MeFBA1-2</i> -R	<u>ctcgagctcgatggatcc</u> CTAGTAAACATAGCCCTTCACAAAC
pGADT7- <i>MeNAPRT2</i> -F	<u>catggaggccagtgaattc</u> ATGGAGGTGAAAGACTATGGTCT
pGADT7- <i>MeNAPRT2</i> -R	<u>ctcgagctcgatggatcc</u> CTATTGTAGCTCTCCAACAGGC
pGADT7- <i>MeALDH2B4</i> -F	<u>catggaggccagtgaattc</u> ATGGCAGCTCGCAGGAC
pGADT7- <i>MeALDH2B4</i> -R	<u>cagctcgagctcgatggatcc</u> TTATAACCAGGCTGGATTCTTAATGG



M: DL2000 DNA marker.

图 1 *MeMinD* 基因的克隆
Fig. 1 Cloning of *MeMinD* gene



M: DL2000 DNA marker; 1~5: 大肠杆菌。

M: DL2000 DNA marker; 1~5: Coliforms.

图 2 pGBKT7-*MeMinD* 载体的构建
Fig. 2 Construction of pGBKT7-*MeMinD* Vector

载的酵母菌生长状态无差异(图 3),说明 *MeMinD* 对 AH109 酵母菌无毒性,可进行后续实验。

将 pGBKT7-*MeMinD* 和 pGADT7 空载共转酵母菌株进行自激活检测。在 SD/TL 培养基上,共转 pGBKT7-*MeMinD* 和 pGADT7 空载的酵母菌、阳性对照(pGBKT7-*p53*+pGADT7-*T*)和阴性对照(pGBKT7-*lam*+pGADT7-*T*)的酵母菌在 SD/TL

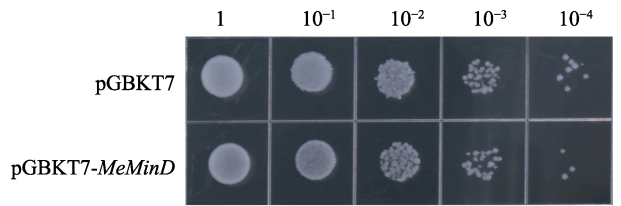


图 3 *MeMinD* 蛋白毒性检测

Fig. 3 Toxicity detection of *MeMinD* protein detection

培养基上均能正常生长,但在 SD/TLHA 和 SD/TLHA+X-α-Gal 培养基上只有阳性对照的酵母菌生长,且阳性对照在 SD/TLHA+X-α-Gal 培养基上的酵母菌落变蓝。此结果表明 *MeMinD* 蛋白不具有自激活活性,可用于酵母双杂交筛选木薯 cDNA 文库(图 4)。

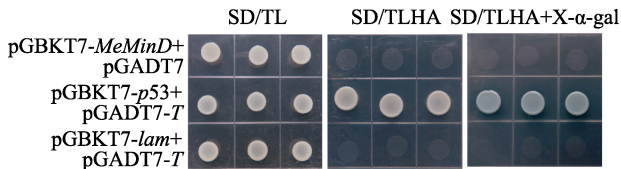
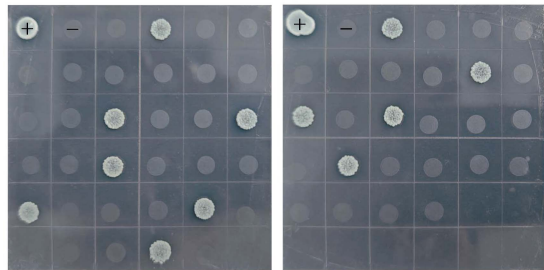


图 4 *MeMinD* 蛋白自激活检测

Fig. 4 Self-activation detection of *MeMinD* protein detection

2.3 *MeMinD* 互作蛋白筛选

将本实验室前期制备的木薯酵母双杂交质粒文库大规模转化到含有诱饵载体 pGBKT7-*MeMinD* 的 AH109 酵母感受态。转化后的酵母菌液涂布于 SD/TLHA 固体培养基上培养,获得单克隆酵母菌,并分别点在 SD/TLHA+X-α-Gal 培养基上进行培养(图 5)。将变蓝的阳性菌落用于 PCR 扩增插入片段并测序,最终获得 8 个候选互作蛋白(表 2)。这些蛋白功能涉及卡尔文循环、细胞代谢、NAD(P)H 再生和细胞热耐受等多种生物学过程。



SD/TLHA+X-α-gal SD/TLHA+X-α-gal

“+”: 阳性对照; “-”: 阴性对照。

“+”: Positive control; “-”: Negative control.

图 5 酵母双杂交筛选阳性克隆

Fig. 5 Positive clones were screened by yeast two-hybridization

表 2 MeMinD 候选互作蛋白注释
Tab. 2 Annotation of MeMinD candidate interacting proteins

编号 No.	GeneBank 登录号 GenBank login number	基因注释 Gene annotation	蛋白名称 Protein name
1	XP_021592298.1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex subunit 5	MeMT-ND
2	XP_021609330.1	Fructose-bisphosphate aldolase 1	MeFBA1-1
3	XP_021604034.1	Fructose-bisphosphate aldolase 1	MeFBA1-2
4	XP_021628049.1	17.4 kDa class III heat shock protein	MeHSP
5	XP_043811339.1	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	MeEIF3
6	XP_043809748.1	Ribulose bisphosphate carboxylase small subunit	MeRubisco
7	XP_021631093.1	Nicotinate phosphoribosyltransferase 2	MeNAPRT2
8	XP_021592138.1	Aldehyde dehydrogenase family 2 member B4	MeALDH2B4

2.4 MeMinD 互作蛋白点对点验证

根据候选蛋白的注释结果，挑选出 4 个候选蛋白进行酵母双杂交点对点验证，包括 MeFBA1-1、MeFBA1-2、MeNAPRT2、MeALDH2B4。以 SC8 木薯品种 cDNA 为模板，PCR 扩增出 4 个候选互作蛋白基因的 CDS 序列，将其分别构建到 pGADT7 载体。将诱饵载体和猎物载体共转酵母。结果显示，pGBKT7-MeMinD+pGADT7-MeFBA1-1、pGBKT7-MeMinD+pGADT7-MeFBA1-2、pGBKT7-MeMinD+pGADT7-MeALDH2B4、pGBKT7-MeMinD+pGADT7-MeNAPRT2 以及对对照组在 SD/TL 上均可以长出菌斑并正常生长（图 6），说明质粒共转化酵母成功。酵母双杂交验证结果显示，仅有 pGBKT7-MeMinD+pGADT7-MeNAPRT2 能在 SD/TLHA 上生长出菌斑且在 SD/TLHA+X-α-Gal 上变蓝，表明在酵母细胞内 MeMinD 与 MeNAPRT2 蛋白存在相互关系。

3 讨论

淀粉体和叶绿体均属于质体，由前质体发育而来，具有相似的分裂机制。植物质体的分裂过程，包括 FtsZ 蛋白组装形成 Z 环，MinD1 和 MinE1 互作形成复合体，Min 复合体与 ARC3 蛋白协同调控 Z 环精准定位于质体的中部，Z 环形成后招募更多的质体分裂相关蛋白，Z 环在多种蛋白的作用下引导质膜收缩，最终导致质体分裂。过量或减少拟南芥 *AtMinD1* 的表达都会影响叶绿体的分裂，从而影响叶绿体的大小^[9]。

木薯块根富含的淀粉和叶片临时性淀粉的合成和贮存均在质体完成，挖掘鉴定木薯质体分裂相关基因的功能，解析淀粉体和叶绿体的分裂机制将有助于提高木薯产量和淀粉品质。GENG 等^[10]克隆了木薯 FtsZ 蛋白的 3 个基因，*MeFtsZ1*、

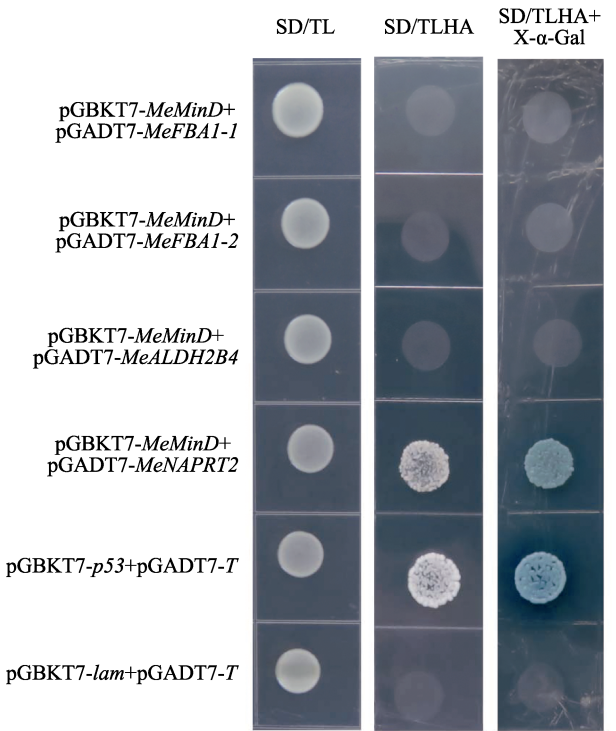


图 6 酵母转化菌在缺陷平板上的生长情况
Fig. 6 Growth of yeast transforming bacteria on defective plates

MeFtsZ2-1 和 *MeFtsZ2-2*。MeFtsZ 蛋白均能定位在叶绿体中，并形成 Z 环结构。*MeFtsZ2-1* 和 *MeFtsZ2-2* 在块根的表达量显著高于 *MeFtsZ1*。过表达 *MeFtsZ2-1* 和 *MeFtsZ2-2* 的拟南芥叶绿体增大，数目减少。WANG 等^[11]克隆了木薯 *MeMinE* 基因，MeMinE-GFP 在木薯原生质体中的瞬时表达表明，MeMinE 蛋白位于叶绿体中。MeMinE 蛋白在木薯叶肉细胞原生质体中的过表达，可导致叶绿体分裂异常，叶绿体数目减少，面积变小。KE 等^[7]克隆了木薯的 *MeMinD* 基因，该基因在叶片中的表达量较高，MeMinD 定位于叶绿体，在大肠杆菌异源表达可导致菌体的分裂位点错位和

丝状形成。通过基因编辑敲除 *MeMinD* 基因, 突变体木薯的叶绿体和淀粉体显著增大(数据待发表)。解析 *MeMinD* 参与调控木薯质体分裂的机制, 将有助于利用分子生物技术培育高产、高淀粉木薯新品种。

目前, 与 *MeMinD* 蛋白互作, 协同调控木薯质体分裂的蛋白尚未明确。本研究采用酵母双杂交技术对 *MeMinD* 进行了互作蛋白的筛选, 发现 *MeMinD* 与 *MeNAPRT2* 存在互作关系。*NAPRT2* (nicotinate phosphoribosyl transferase 2) 在植物中参与烟酸(nicotinic acid)的磷酸核糖基转移反应, 这是烟酸转化为 NAD(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)途径中的关键步骤^[12]。NAD 是细胞内重要的辅酶, 参与多种代谢过程, 包括能量代谢和信号传导^[13-15]。NAD⁺(NAD 的氧化形式)在氧化还原反应中接受电子和质子, 形成 NADH。NADH 随后在电子传递链中将电子传递给氧气, 最终产生 ATP。*MinD* 蛋白是一种 ATPase, 通过 ATP 的水解, *MinD* 蛋白能够在质膜上形成动态的极性模式, 与 *MinE* 和 *MinC* 蛋白相互作用, 共同调控质体的分裂过程。*MeMinD* 与 *MeNAPRT2* 的互作表明能量代谢可能参与木薯质体的分裂过程。水稻 *OsNAPRT1* 基因突变会导致植株矮化, 叶片过早枯萎^[16]。目前, 尚无 *NAPRT2* 参与质体分裂的研究报道。后续将通过双分子荧光互补试验进一步验证 *MeMinD* 与 *MeNAPRT2* 的互作关系, 利用转基因或基因编辑技术探究其在木薯质体分裂过程中的功能。

参考文献

- [1] MAPLE J, MØLLER S G. Plastid division coordination across a double membraned structure[J]. FEBS Letters, 2007, 581: 2162-2167.
- [2] DE BOER P A, CROSSLEY R E, ROTHFIELD L I. A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*[J]. Cell, 1989, 56: 641-649.
- [3] ROTHFIELD L I, JUSTICE S S, GARCÍA LARA J. Bacterial cell division[J]. Annual Review of Genetics, 1999, 33: 423-448.
- [4] ROTHFIELD L I, JUSTICE S S. Bacterial cell division: the cycle of the ring[J]. Cell, 1997, 88: 581-584.
- [5] KANAMARU K, FUJIWARA M T, KIM M H, NAGASHIMA A, NAKAZATO E, TANAKA K, TAKAHASHI H. Chloroplast targeting, distribution and transcriptional fluctuation of *AtMinD1*, a Eubacteria type factor critical for chloroplast division[J]. Plant and Cell Physiology, 2000, 41(10): 1119-1128.
- [6] DINKINS R, REDDY S M, LENG M, COLLINS G. Overexpression of the *Arabidopsis thaliana MinD1* gene alters chloroplast size and number in transgenic tobacco plants[J]. Planta, 2001, 214: 180-188.
- [7] KE L, LIANG J C, GENG M T, WANG C C, YAO Y, XIAO Y, HUANG W, LI R M, MIN Y, GUO J C. Identification and expression analysis of *MinD* gene involved in plastid division in cassava[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2019, 83(1): 76-86.
- [8] 仇婷婷. 木薯果胶甲基酯酶抑制因子 MePMEI1 功能分析及其互作蛋白的筛选[D]. 海口: 海南大学, 2020.
- [9] QIU T T. Pectin methylesterase inhibitor MePMEI1 functional analysis and screening of interacting proteins[D]. Haikou: Hainan University, 2020. (in Chinese)
- [10] FUJIWARA M T, LI D I, KAZAMA Y, ABE T, UNO T, YAMAGATA H, KANAMARU K, ITOH R. Further evaluation of the localization and functionality of hemagglutinin epitope and fluorescent protein tagged *AtMinD1* in *Arabidopsis thaliana*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2009, 73: 1693-1697.
- [11] GENG M T, MIN Y, YAO Y, CHEN X, FAN J, YUAN S, WANG L, SUN C, ZHANG F, SHANG L, WANG Y L, LI R M, FU S P, DUAN R J, LIU J, HU X W, GUO J C. Isolation and characterization of *Ftsz* genes in cassava[J]. Genes, 2017, 8(12): 391-408.
- [12] WANG C C, KE L, CAO L J, YAO Y, GENG M T, WANG Y, XIAO Y, HUANG W, LIU X H, CAO P, GUO J C, MIN Y. Overexpression of *MinE* gene affects the plastid division in cassava[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2019, 83(1): 105-115.
- [13] AUDRITO V, MESSANA V G, DEAGLIO S. NAMPT and NAPRT: two metabolic enzymes with key roles in inflammation[J]. Frontiers in Oncology, 2020, 10: 358.
- [14] GAKIÈRE B, FERNIE A R, PÉTRIACQ P. More to NAD than meets the eye: a regulator of metabolic pools and gene expression in *Arabidopsis*[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2018, 122: 86-95.
- [15] FERNIE A, HASHIDA S N, YOSHIMURA K, GAKIÈRE B, MOU Z, PÉTRIACQ P. NAD metabolism and signaling in plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 518906.
- [16] LIU Y, WU P, LI B, WANG W, ZHU B. Phosphoribosyltransferases and their roles in plant development and abiotic stress response[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(14): 11828.
- [17] WU L W, REN D, HU S K, LI G M, DONG G J, JIANG L, HU X M, YE W J, CUI Y T, ZHU L, HU J, ZHANG G H, GAO Z Y, ZENG D L, QIAN Q, GUO L B. Down regulation of a nicotinate phosphoribosyltransferase gene, *OsNAPRT1*, leads to withered leaf Tips1[J]. Plant Physiology, 2016, 171: 1085-1098.