

木薯 MeVINV1 互作蛋白的筛选及验证

符东青^{1,2,3}, 王祥文^{1,2,3}, 葛玉建^{1,2,3}, 沈 晨^{2,3,4}, 陈津蓬^{1,3}, 姚 远^{2,3}, 耿梦婷¹,
陆小花^{2,3*}, 王亚杰^{2,3*}

1. 海南大学热带农林学院, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所/海南热带农业资源研究院, 海南海口 571101; 3. 中国热带农业科学院三亚研究院, 海南三亚 572000; 4. 华中农业大学植物科学技术学院, 湖北武汉 430070

摘 要: 木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 作为“淀粉之王”, 是一种重要的热带粮食作物, 是全球十亿人的主食。木薯液泡转化酶 (MeVINV1) 通过将蔗糖不可逆地分解为葡萄糖和果糖, 参与植物的生长发育和逆境防御。为探究 MeVINV1 的基因功能和分子调控网络, 本研究利用酵母双杂交实验从木薯 SC8 cDNA 酵母文库中筛选出与 MeVINV1 互作的 8 个候选蛋白。进一步利用酵母点对点验证发现 MeVINV1 与 MeUN-3、MeMTP1、MeCASP4A3、MePIRL3 存在互作关系, 且与 MeMTP1 的互作更强, 后续通过双分子荧光互补和荧光素酶互补实验, 验证了木薯 MeVINV1 与 MeMTP1 的互作关系。因此推测, MeVINV1 与 MeMTP1 协同调控液泡蔗糖代谢和金属离子的转运, 参与调控木薯对金属离子胁迫的响应。本研究结果为木薯抗逆育种提供新的基因资源和逆境调控分子机制提供科学依据。

关键词: 木薯; MeVINV1; 酵母双杂交; 互作蛋白验证

中图分类号: S533 文献标志码: A

Screening and Validation of MeVINV1 Interacting Proteins in Cassava

FU Dongqing^{1,2,3}, WANG Xiangwen^{1,2,3}, GE Yujian^{1,2,3}, SHEN Chen^{2,3,4}, CHEN Jinpeng^{1,3}, YAO Yuan^{2,3},
GENG Mengting¹, LU Xiaohua^{2,3*}, WANG Yajie^{2,3*}

1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Hainan Institute for Tropical Agricultural, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572000, China; 4. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China

Abstract: Cassava (*Manihot esculenta* Crantz), the “king of starch”, is an important tropical food crop and a staple food for one billion people worldwide. Cassava vacuolar invertase (MeVINV1) is involved in plant growth and development and stress defense by irreversibly breaking down sucrose into glucose and fructose. Eight candidate proteins interacting with MeVINV1 were screened from the cassava SC8 cDNA yeast library by yeast two-hybrid experiment to explore the gene function and molecular regulatory network of MeVINV1. Furthermore, yeast point-to-point verification found that MeVINV1 interacted with MeUN-3, MeMTP1, MeCASP4A3 and MePIRL3, and the interaction with MeMTP1 was stronger. Therefore, it is speculated that MeVINV1 and MeMTP1 synergistically regulate vacuolar sucrose metabolism and metal ion transport, and participate in the regulation of cassava response to metal ion stress. The results of the study would provide a scientific basis for providing new genetic resources and molecular mechanisms of stress regulation in cassava stress resistance breeding.

Keywords: cassava; MeVINV1; yeast two-hybrid; interaction protein validation

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.06.003

收稿日期 2025-01-20; 接受日期 2025-02-12

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 324QN318); 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. CARS11-HNGJC)。

作者简介 符东青 (1998—), 男, 硕士, 研究方向: 作物遗传育种。*通信作者 (Corresponding author): 陆小花 (LU Xiaohua), E-mail: 18789085180@163.com; 王亚杰 (WANG Yajie), E-mail: wangyajie@itbb.org.cn。

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 是大戟科木薯属的多年生灌木, 原产于南美洲, 目前在亚洲、非洲及拉丁美洲广泛种植^[1], 是世界六大粮食作物之一, 也是许多工业生产的原材料。木薯具有较强的生长适应性, 但在干旱、低温等逆境条件下, 作物的生长和产量会受到显著影响^[2-3]。长期的干旱会导致木薯植株死亡或贮藏根产量大幅下降, 限制木薯的生长及产量^[4]。木薯一般种植于南、北纬 30°以内的温暖地区, 低温是限制木薯生长及区域种植的一个重要因素^[5-6], 温度低于 15 °C 会影响木薯的生长甚至引起木薯死亡。提高木薯的抗逆性是木薯育种的重要目标之一, 研究木薯抗逆机制对于木薯抗逆育种具有重要的意义。

蔗糖转化酶 (invertase, Inv) 是植物分解蔗糖的关键酶之一, 将蔗糖不可逆地分解为葡萄糖和果糖, 参与植物器官发育、碳水化合物分配、糖信号传导以及逆境应答等过程^[7-9]。转化酶在植物不同组织中存在不同形式的同工酶, 分别为细胞壁转化酶、可溶性液泡转化酶和中性/碱性转化酶^[10-11]。1990 年在胡萝卜中克隆出编码细胞壁 β -果糖苷酶的全长 cDNA, 这是第一个克隆分离出的植物转化酶基因^[12]。此后, 拟南芥、烟草、甘蔗、玉米、大麦、甘薯、水稻、竹子、梨树、杨树、苹果、小麦和木薯等不同植物的转化酶基因均被鉴定分离出来。液泡转化酶 (vacuolar invertase, VINV) 是定位在液泡的转化酶, 属于 β -呋喃果糖苷酶, 能够水解 β -1,2-糖苷键, 包含水解糖苷酶家族 32 (GH32) 的 NDPNG、FRDP 和 WECPD 三个保守基序。液泡转化酶通过直接调节细胞液泡的渗透势, 参与植物细胞的抗逆反应; 也可以通过促进糖代谢, 参与植物的生长发育。干旱条件下拟南芥保卫细胞的液泡转化酶活力降低诱导气孔关闭从而提高植物保水抗旱的能力^[13]。黄瓜液泡转化酶基因 CsVI2 过量表达使黄瓜叶片中蔗糖积累轻度降低和己糖显著增加, 表现出较强耐旱性^[14]。通过 RNAi 干扰马铃薯液泡转化酶基因 VINV 和突变液泡转化酶第二内含子增强子 VInvIn2En 能显著降低己糖的积累, 避免马铃薯低温糖化现象^[15-16]。番茄液泡转化酶参与果实成熟过程, 最终影响果实品质^[17]。通过数量性状位点 (QTL) 分析和突变体分析, 发现拟南芥液泡转化酶活性与根长呈现正相关^[18]。棉花液泡转化酶 GhVIN1 可以促进棉纤维的伸长发育^[19]。本课题组发现木薯有 3 个液泡转化酶成员^[20], 其中

MeVINV1 可以通过调控葡萄糖和果糖含量, 参与木薯对逆境的响应^[21], 但具体的作用机制尚未明确。本研究构建 MeVINV1 的诱饵载体并进行酵母双杂交筛选 MeVINV1 的互作蛋白, 使用多种实验手段验证它们的互作关系, 为解析液泡转化酶 MeVINV1 酶活性调节机制提供新的候选基因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 种子为本实验室保存, 用于双分子荧光互补实验和荧光素酶互补实验。木薯 (*Manihot esculenta*) 华南 8 号 (SC8) 组培苗为本实验室保存, 用于木薯 RNA 的提取。

1.1.2 载体及菌株 试验所用 SC8 木薯 cDNA 酵母双杂交质粒文库、pGBKT7、pGADT7、pGADT7-T、pGBKT7-p53、pGBKT7-Lam、pNC-BiFC-Ecc、pNC-BiFC-Enc、pCambia 1300-cLuc 和 pCambia 1300-nLuc 载体均为本实验室保存。大肠杆菌 DH5 α 、酵母菌 AH109 和农杆菌 GV3101 (pSoup-p19) 感受态均购自上海唯地生物技术有限公司。

1.1.3 主要试剂 植物总 RNA 提取试剂盒和同源重组连接酶均购自聚合美公司; 反转录试剂盒购自莫纳 (Monad) 公司; PrimeSTAR HS (Premix) DNA Polymerase 高保真酶和限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司; 纯化回收试剂盒和质粒小量提取试剂盒均购自 OMEGA 公司; 酵母缺陷培养基购自 Coolaber 公司; X- α -gal 和 D-虫荧光素钾盐购自北京索莱宝公司; Nimble Cloning 试剂盒购自海南你行生物科技有限公司。引物 (表 1) 合成和测序服务由擎科生物科技股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 诱饵载体 pGBKT7-MeVINV1 构建 使用 SC8 木薯组培苗提取总 RNA 并反转录成 cDNA。根据木薯基因组数据库网站 (简称 JGI, <https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) 公布的 MeVINV1 基因序列 (MANES.02G035900) 设计含有 pGBKT7 载体的同源臂特异性引物, 以 SC8 木薯 cDNA 为模板, PrimeSTAR HS (Premix) DNA Polymerase 高保真酶克隆 MeVINV1 基因。经凝胶电泳检测, 对条带符合的 PCR 产物进行纯化回收备用。

利用 EcoR I 和 Sal I 双酶切 pGBKT7 空载体并纯化回收, 将 MeVINV1 基因重组到线性化 pGBKT7 载体上, 转化 DH5 α 感受态。挑取单菌

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')
BD 检测-F/R	GTGCGACATCATCATCGGAAG CCGGAATTAGCTTGCTGC
AD 检测-F/R	AATACCACTACAATGGATGATG GAGATGGTGCACGATGCACAGT
BD-VINV1-F/R	catatggccatggaggccgaaATGGCAGACCCCAACCC ATTTC tagttatgcggccgctgcaggCTACCGGATATTTGGATA GGGA
AD-UN-1-F/R	ccatggaggccagtgaattcATGCTGAAAAGTGGTGGA CAT agctcgagctcgatggatccTTACTGAGACCAAAATTT CAC
AD-PPI1-F/R	ccatggaggccagtgaattcATGGGCGTGGAGGTTATG GGA agctcgagctcgatggatccTCAAAGAAAATAATAATA ATAAT
AD-UN-2-F/R	ccatggaggccagtgaattcATGGACTCCTCGTCGTCT TCT agctcgagctcgatggatccCTAAAAGATTTCAGCAT CTT
AD-UN-3-F/R	ccatggaggccagtgaattcATGGAAACAGAGGTTGA AGTT agctcgagctcgatggatccTTACAAGTATCCTGATTGT TT
AD-MTP1-F/R	ccatggaggccagtgaattcATGGAAGCTCGAAATCCT CAA agctcgagctcgatggatccCTAACGCTCGATCTGGAT GGT
AD-CASP4A3-F/R	ccatggaggccagtgaattcATGGAAACCAAATCCAA ACC agctcgagctcgatggatccTTAAGTTAGCCATTGT TGT
AD-FBA-F/R	ccatggaggccagtgaattcATGTCGGCCTTTGTTGGA AAA agctcgagctcgatggatccCTAGTACTTGATCCCTTA AC
AD-PIRL3-F/R	ccatggaggccagtgaattcATGGATCAAACCCAGAA GGAT agctcgagctcgatggatccTCAAAGCTGCTGGTCCA GATA
BiFC-VINV1-F/R	agtgtctctgtccagtcctATGGCAGACCCCAACCCAT TTC ggctctcagcagaccacaagtCCGGATATTTGGATAGGGA
BiFC-MTP1-F/R	agtgtctctgtccagtcctATGGAAGCTCGAAATCCTCA ggctctcagcagaccacaagtACGCTCGATCTGGATGGT
LCA-VINV1-F/R	gcgtccgggggcGGTACCCGGATGGCAGACCCCA ACCCATT ATACGAACGAAAGCTCTGCAGGCTACCGGAT ATTTGGATAGGG
LCA-MTP1-F/R	cgagctcggtaccgggatccATGGAAGCTCGAAATCC TCA cgcgtacgagatctggtcgacACGCTCGATCTGGATGG TAA
ProF	GCATTCTACTTCTATTGCAGC
CR	GTCCGCCGATGGGGGTGTTCT
PEGFP-N3	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAAG
cLuc 检测-F/R	GGAGTTGTGTTTGTGGACGA AGTAGGATTCTGGTGTGTGC
nLuc 检测-F/R	CACTATCCTTCGCAAGACCC AGGAACCAGGGCGTATCTCT

落使用 BD 检测-F/R 引物进行 PCR 鉴定, 选取阳性克隆进行测序比对, 获得诱饵载体 pGBKT7-MeVINV1。

1.2.2 pGBKT7-MeVINV1 诱饵载体的毒性与自激活检测 pGBKT7-MeVINV1 诱饵载体和 pGBKT7 空载体分别转化酵母菌 AH109 感受态, 转化成功的酵母菌扩大培养至 OD₆₀₀=0.8, 分别以 1 : 1、1 : 10、1 : 100、1 : 1000 和 1 : 10 000 比例稀释后各吸取 5 μL 酵母菌液点在 SD/-Trp 平板上, 30 ℃ 静置培养 2~3 d, 观察酵母菌落的生长情况。

将共转化酵母菌 (pGBKT7-MeVINV1+pGADT7), 阳性对照 (pGBKT7-p53+pGADT7-T, CK⁺) 以及阴性对照 (pGBKT7-Lam+pGADT7-T, CK⁻) 培养至 OD₆₀₀=0.8, 各吸取 5 μL 酵母菌液点在 SD/-Trp-Leu、SD/-Trp-Leu-His-Ade、SD/-Trp-Leu-His-Ade+ X-α-gal 平板上, 30 ℃ 静置培养 3~4 d, 观察酵母菌落的生长情况。

1.2.3 MeVINV1 互作蛋白的筛选 将诱饵载体 pGBKT7-MeVINV1 酵母菌在 SD/-Trp 平板划线活化, 并制备感受态细胞。在感受态细胞中加入 30 μg 木薯酵母双杂交质粒文库、40 μL 预变性的 Carrier DNA 和 5 mL PEG/LiAc 溶液进行转化。转化后的菌液涂布于 30 个 SD/-Trp-Leu-His 平板上, 30 ℃ 静置培养。挑取单菌落至 0.9% NaCl 溶液重悬, 点在 SD/-Trp-Leu、SD/-Trp-Leu-His-Ade 和 SD/-Trp-Leu-His-Ade+X-α-gal 平板上, 利用 AD 检测-F/R 引物对变蓝的菌斑进行 PCR 鉴定, 选取阳性克隆进行测序比对, 获得 MeVINV1 的候选互作蛋白信息。

1.2.4 酵母双杂交的点对点验证 根据候选互作蛋白的测序信息, 从 NCBI 获得相应的基因序列, 设计连接 pGADT7 载体的同源臂引物, 克隆出候选互作蛋白的基因。利用 BamH I 和 EcoR I 双酶切 pGADT7 载体并纯化回收, 将候选互作蛋白的基因重组到 pGADT7 载体上, 挑取单菌落进行 PCR 鉴定及测序比对, 获得重组猎物载体。

将 pGBKT7-MeVINV1 诱饵载体和重组猎物载体两两共转 AH109 感受态, 涂布于 SD/-Trp-Leu 平板上, 挑取单菌落进行 PCR 鉴定。鉴定成功的酵母菌同阳性对照 CK⁺、阴性对照 CK⁻ 分别点在 SD/-Trp-Leu、SD/Trp-Leu-His-Ade 和 SD/-Trp-Leu-His-Ade+X-α-gal 平板上静置培养, 观察菌落的生长及显色情况, 判断 MeVINV1 与候选互作蛋白是否存在互作关系。

1.2.5 双分子荧光互补验证 (BiFC) 设计 MeVINV1 和 MeMTP1 的 BiFC 接头引物 (表 1) 克隆出接头基因, 通过 Nimble Cloning 技术将 MeVINV1 重组到 pNC-BiFC-Ecc 载体, MeMTP1 重组到 pNC-BiFC-Enc 载体, 使用 ProF 和 CR 引物 (表 1) 检测 pNC-BiFC-Ecc 重组载体, ProF 和 PEGFP-N3 引物检测 pNC-BiFC-Enc 重组载体。将构建成功的重组载体 MeVINV1-cEYFP、MeMTP1-nEYFP 和 cEYFP、nEYFP 载体分别转化农杆菌 GV3101 (pSoup-p19) 感受态, 选择 PCR 鉴定成功的农杆菌扩大培养。MeVINV1-cEYFP+MeMTP1-nEYFP 作为实验组, MeVINV1-Ecc+nEYFP、cEYFP+MeMTP1-nEYFP、cEYFP+nEYFP 作为对照组, 农杆菌菌液两两等体积混合后分别注射烟草叶片, 置于培养室培养 2 d 后在激光共聚焦显微镜下观察荧光信号。

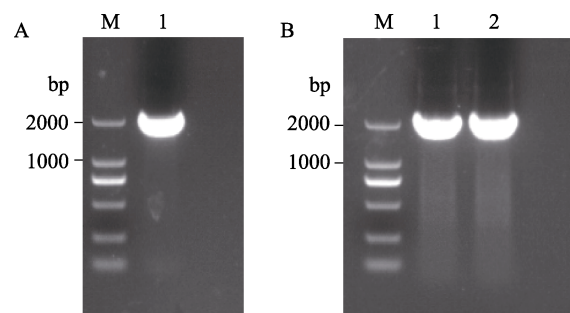
1.2.6 荧光素酶互补验证 (LCA) 设计 MeVINV1 和 MeMTP1 的 LCA 同源臂引物 (表 1), 利用 *Bam*H I 和 *Sal* I 分别双酶切 pCAMBIA 1300-cLuc 和 pCAMBIA 1300-nLuc 载体, 通过同源重组技术将 MeVINV1 片段重组到 pCAMBIA 1300-cLuc 载体上, MeMTP1 片段重组到 pCAMBIA 1300-nLuc 载体上, 使用 cLuc 检测-F/R 引物 (表 1) 检测 pCAMBIA 1300-cLuc 重组载体, nLuc 检测-F/R 引物 (表 1) 检测 pCAMBIA 1300-nLuc 重组载体。将构建成功的 pCAMBIA 1300-MeVINV1-cLuc、pCAMBIA 1300-MeMTP1-nLuc 和 pCAMBIA 1300-cLuc、pCAMBIA 1300-nLuc 载体分别转化农杆菌 GV3101 (pSoup-p19) 感受态, 选择 PCR 鉴定成功的农杆菌培养。MeVINV1-cLuc+MeMTP1-nLuc 作为实验组, MeVINV1-cLuc+nLuc、cLuc+MeMTP1-nLuc、cLuc+nLuc 作为对照组, 农杆菌菌液两两等体积混合后分别注射

同一烟草叶片的 4 个区域, 置于培养室 16 h 光照/8 h 黑暗的条件下培养 48 h 后, 在原先注射的部位注入 150 μ g/mL D-虫荧光素钾盐, 使用植物活体成像系统检测烟草叶片发光情况。

2 结果与分析

2.1 pGBKT7-MeVINV1 诱饵载体的构建

木薯 MeVINV1 基因 CDS 区全长为 2040 bp, 以 SC8 木薯 cDNA 为模板, 克隆 MeVINV1 基因片段, 凝胶电泳检测结果显示 PCR 产物的大小符合预期, 且无非特异条带 (图 1A)。利用同源重组技术将纯化的 MeVINV1 基因片重组到 pGBKT7 载体, PCR 鉴定结果显示在 2000 bp 处存在单一明亮条带, 表明成功获得阳性克隆 (图 1B)。测序分析阳性克隆, 获得 pGBKT7-MeVINV1 诱饵载体。



M: DL 2000 DNA marker.

图 1 MeVINV1 基因克隆 (A) 及 pGBKT7-MeVINV1 载体的构建 (B)

Fig. 1 MeVINV1 gene cloning (A) and construction of pGBKT7-MeVINV1 vector (B)

2.2 pGBKT7-MeVINV1 诱饵载体的毒性和自激活检测

2.2.1 pGBKT7-MeVINV1 诱饵载体毒性检测 结果显示 2 种酵母菌的生长状态及数量大致相同 (图 2), 表明 pGBKT7-MeVINV1 对 AH109 酵母细胞无毒性。

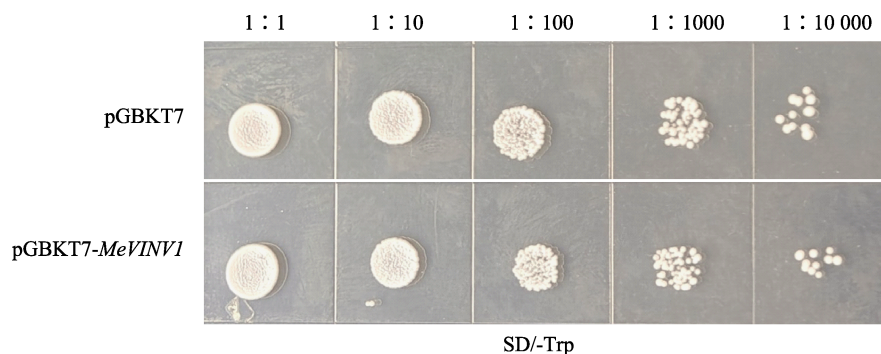


图 2 诱饵载体 pGBKT7-MeVINV1 的毒性检测

Fig. 2 Toxicity detection of bait vector pGBKT7-MeVINV1

2.2.2 pGBKT7-MeVINV1 诱饵载体自激活检测
由图 3 可知，3 种酵母菌在 SD/-Trp-Leu 平板上均正常生长，只有阳性对照在 SD/-Trp-Leu-

His-Ade 平板上生长，并在 SD/-Trp-Leu-His-Ade+X- α -gal 平板上生长变蓝,表明诱饵载体无自激活。

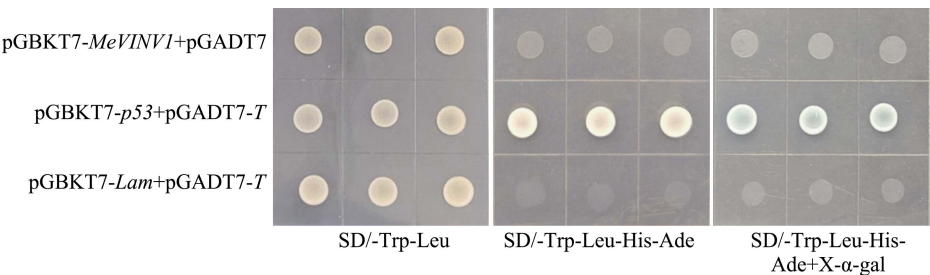


图 3 诱饵载体 pGBKT7-MeVINV1 自激活检测
Fig. 3 Self-activation detection of pGBKT7-MeVINV1

2.3 MeVINV1 互作蛋白的筛选

利用 SC8 木薯 cDNA 文库筛选与 MeVINV1 互作的蛋白，在 SD/-Trp-Leu-His 平板上生长的单菌落点在 SD/-Trp-Leu-His-Ade+X- α -gal 平板，5 d 后观察酵母生长及显色情况（图 4）。PCR 鉴定变蓝的酵母菌落，将 PCR 产物进行测序，测序成功的样本序列在 GeneBank 数据库中进行比对，获得 8 个候选互作蛋白（表 2）。

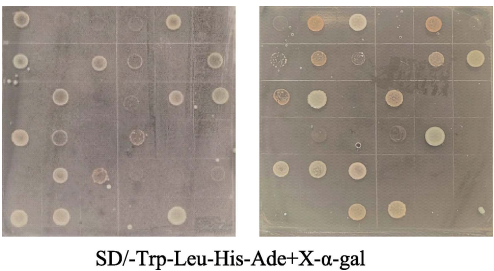


图 4 候选互作蛋白酵母菌斑筛选
Fig. 4 Candidate positive plaque screening

表 2 MeVINV1 候选互作蛋白信息
Tab. 2 Information of MeVINV1 candidate interacting proteins

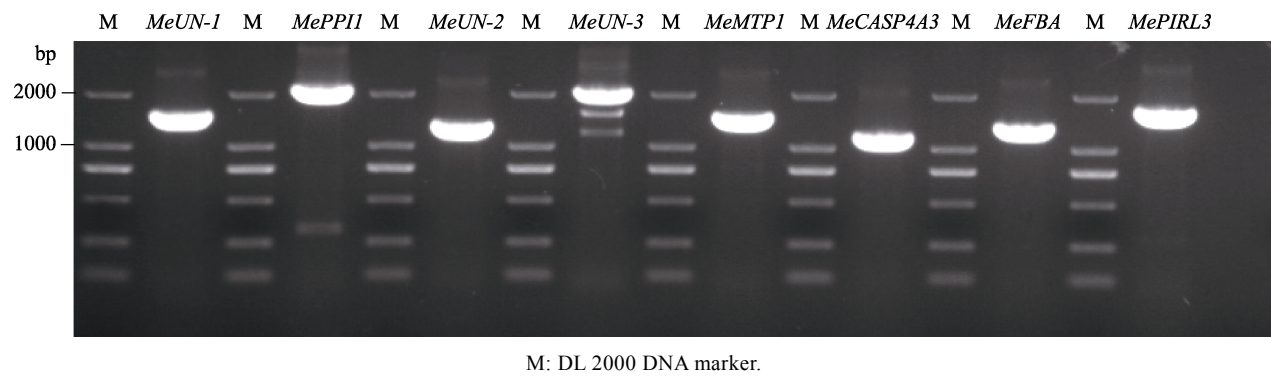
编号 No.	GenBank 登录号 GenBank login number	基因注释 Gene annotation	蛋白名称 Protein name
1	XM_043961324.1	未知蛋白 uncharacterized	MeUN-1
2	XM_021738823.2	质子泵相互作用器 1 proton pump-interactor 1	MePPI1
3	XM_043952100.1	未知蛋白 uncharacterized protein	MeUN-2
4	XM_043961705.1	未知蛋白 uncharacterized protein	MeUN-3
5	XM_021757649.2	金属耐受蛋白 1 metal tolerance protein 1	MeMTP1
6	XM_021736665.2	CASP 样蛋白 4A3 CASP-like protein 4A3	MeCASP4A3
7	XM_021757042.2	果糖二磷酸醛缩酶 fructose-bisphosphate aldolase	MeFBA
8	XM_021777278.2	植物细胞内 Ras 基团相关的 LRR 蛋白 3 plant intracellular Ras-group-related LRR protein 3	MePIRL3

根据候选互作蛋白的序列信息，分别命名为 MeUN-1、MePPI1、MeUN-2、MeUN-3、MeMTP1、MeCASP4A3、MeFBA、MePIRL3。设计候选互作蛋白的特异性引物（表 1），以 SC8 木薯品种的 cDNA 为模板克隆出候选互作蛋白基因片段（图 5），将片段与线性化 pGADT7 载体连接，PCR 鉴定阳性菌落，测序获得猎物载体。

2.4 MeVINV1 互作蛋白的点对点验证

将 pGBKT7-MeVINV1 诱饵载体分别与 8 个猎

物载体两两共转酵母 AH109 感受态细胞，选择阳性菌液进行酵母双杂交点对点验证，结果如图 6 所示，共转 pGBKT7-MeVINV1+pGADT7-MeUN-3、pGBKT7-MeVINV1+pGADT7-MeMTP1、pGBKT7-MeVINV1+pGADT7-MeCASP4A3、pGBKT7-MeVINV1+pGADT7-MePIRL3 的酵母菌在 SD/-Trp-Leu 和 SD/Trp-Leu-His-Ade 平板上正常生长，且在 SD/-Trp-Leu-His-Ade+X- α -gal 平板上变蓝，说明 MeVINV1 与 MeUN-3、MeMTP1、MeCASP4A3、



M: DL 2000 DNA marker.
图 5 候选互作蛋白的基因克隆
Fig. 5 Gene cloning of candidate interaction proteins

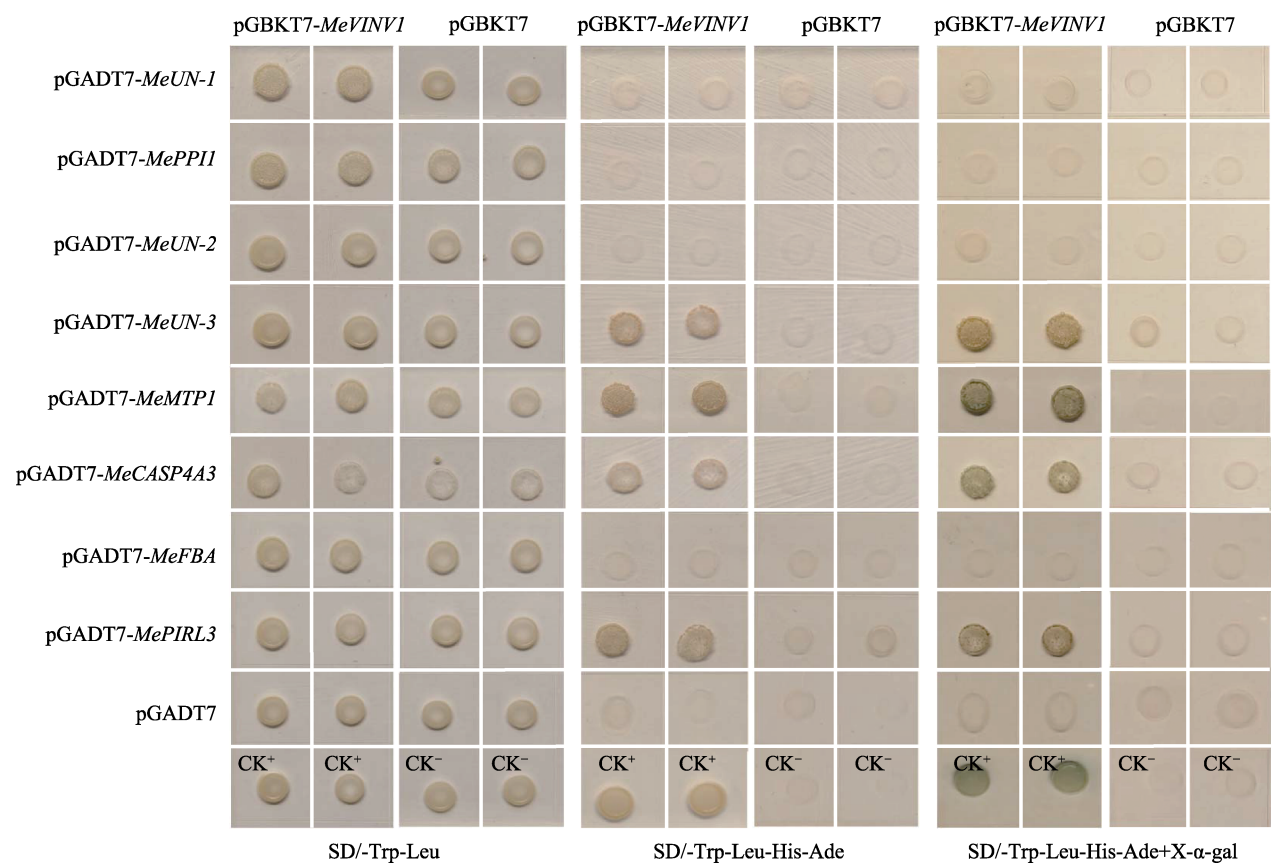


图 6 MeVINV1 和候选互作蛋白的点对点验证
Fig. 6 Point-to-point validation of MeVINV1 and candidate interacting proteins

MePIRL3 存在互作关系，鉴于 MeVINV1 和金属耐受蛋白 MeMTP1 互作的酵母在四缺培养基上最蓝，后续实验将进一步验证二者的互作关系。

2.5 双分子荧光互补验证 MeVINV1 与 MeMTP1 互作

双分子荧光互补验证结果显示，对照组均无荧光信号，实验组 MeVINV1-cEYFP+MeMTP1-nEYFP 检测出荧光信号，证明 MeVINV1 和 MeMTP1 存在互作关系（图 7）。

2.6 荧光素酶互补试验验证 MeVINV1 与 MeMTP1 互作

荧光素酶互补试验验证结果如图 8 所示，对照组均未检测到荧光信号。MeVINV1-cLuc+MeMTP1-nLuc 实验组共表达后发出荧光信号，表明 MeVINV1 和 MeMTP1 存在互作关系。

3 讨论

液泡转化酶（VIN）主要存在于液泡中，可

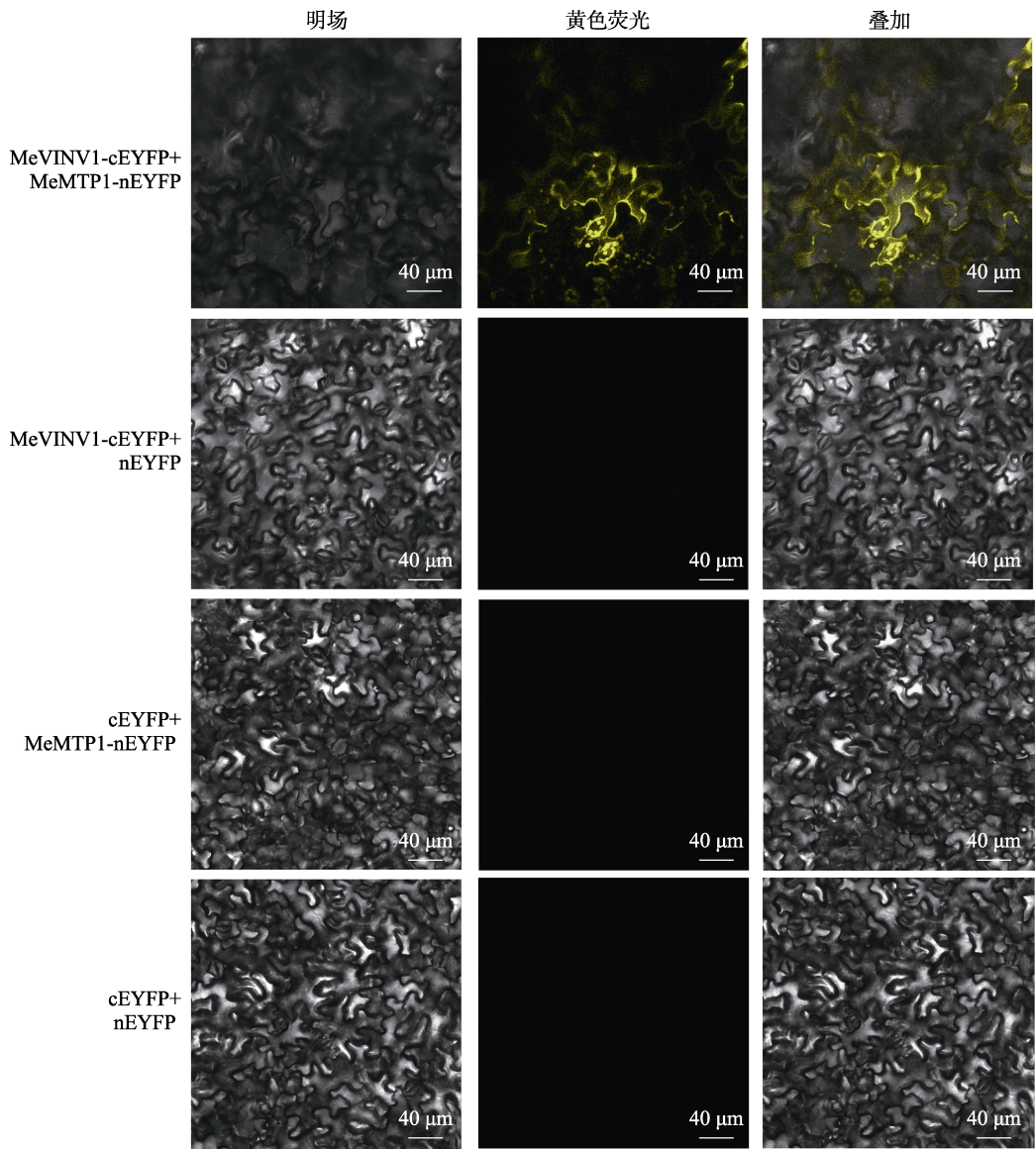


图 7 BiFC 验证 MeVINV1 与 MeMTP1 蛋白互作

Fig. 7 BiFC validation of interaction between MeVINV1 and MeMTP1

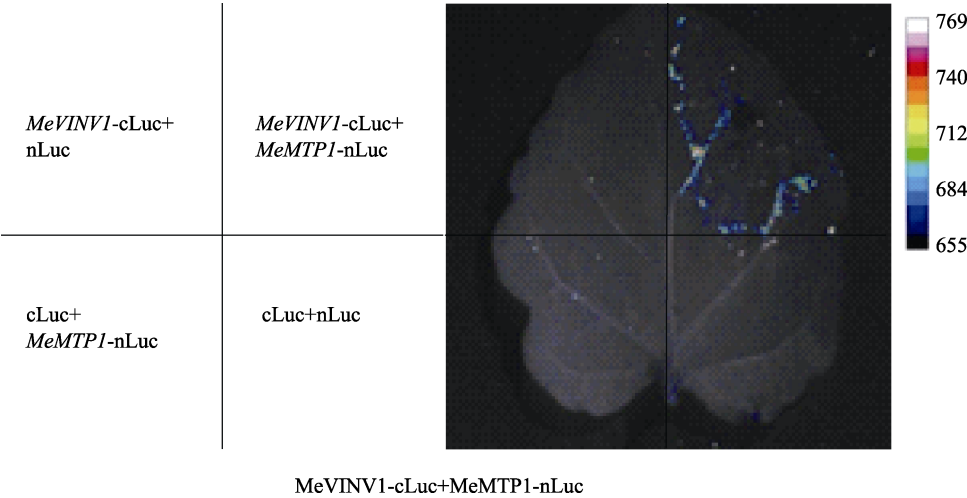


图 8 LCA 验证 MeVINV1 与 MeMTP1 蛋白互作

Fig. 8 LCA validation of interaction between MeVINV1 and MeMTP1

以将蔗糖不可逆地分解成葡萄糖和果糖。VIN 已被报道可以调节植物的生长和发育, 并对于干旱和寒冷等非生物胁迫做出反应^[22]。然而与 VIN 蛋白协同调控蔗糖代谢的互作蛋白研究比较少, 液泡转化酶抑制子 (VIF) 可以与 VIN 互作, 抑制其酶活性。这种抑制作用在调节植物果实中的糖含量方面非常重要。在番茄中, 过表达 VIF 基因会导致果实中蔗糖含量升高而已糖含量降低^[23]。多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白 PpPGIP1 与 PpVIN2 互作, 正向调节 PpVIN2 的活性, 从而促进桃果实中蔗糖的快速分解^[24]。

为了探究木薯液泡转化酶 MeVINV1 是否参与木薯的逆境响应, 本研究利用酵母双杂交实验证明 MeVINV1 与 MeMTP1 存在互作关系, 后续通过双分子荧光互补验证和荧光素酶互补验证进一步证明了二者的互作关系, 并发现可能在液泡膜上协同调控作用。金属耐受蛋白 (MTP) 主要负责转运 Zn^{2+} , 同时也转运 Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} 等金属离子。拟南芥 AtMTP1 定位于液泡膜中, 介导解毒并驱动叶片锌积累^[25]。水稻 OsMTP1 和大麦 HvMTP1 具有较高的蛋白相似性, 都定位于液泡膜, 增强液泡金属隔离的解毒作用^[26-27]。

水稻 OsMTP11 促进镉在叶片维管细胞液泡贮存, 以限制镉转运到水稻籽粒^[28]。茶树 CsMTP4 定位于质膜, 异源表达 CsMTP4 可特异性增强酵母对锌过量的耐受性, CsMTP4 的过表达在缺锌条件下刺激了茶树毛状根的锌吸收, 表明 CsMTP4 在调节茶树锌稳态中起着关键作用^[29]。

蔗糖代谢的调控对于维持植物根系生长和重金属耐受性起着重要作用^[30]。酸性转化酶和蔗糖合成酶的上调可导致可溶性糖的积累, 为植物生长和应激适应提供必须的能量和碳源, 有助于植物应对非生物胁迫。重金属离子 (Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 等) 可以调节碳水化合物代谢酶 (如酸性转化酶和蔗糖合成酶) 的活性, 酸性转化酶催化位点含有巯基, 活性受到重金属离子抑制^[31]。镉胁迫下, 刺槐和紫葳的叶片可溶性糖含量显著增高^[32-33]。豆科植物根系分泌的可溶性糖能直接与铅形成无毒化合物^[34]。本研究通过酵母双杂交、双分子荧光互补、荧光素酶互补实验, 验证了木薯 MeVINV1 与 MeMTP1 的互作关系。因此推测, MeVINV1 与 MeMTP1 协同调控液泡蔗糖代谢和金属离子的转运, 参与调控木薯对金属离子胁迫的响应。

参考文献

- [1] LÉOTARD G, DUPUTIÉ A, KJELLBERG F, DOUZERY E J, DEBAIN C, DE GRANVILLE J J, MCKEY D. Phylogeography and the origin of cassava: new insights from the northern rim of the Amazonian basin[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2009, 53(1): 329-334.
- [2] JOSHI R K, BHARAT S S, MISHRA R. Engineering drought tolerance in plants through CRISPR/Cas genome editing[J]. 3 Biotech, 2020, 10(9): 400.
- [3] DARYANTO S, WANG L X, JACINTHE P A. Drought effects on root and tuber production: a meta-analysis[J]. Agricultural Water Management, 2016, 176: 122-131.
- [4] MUIRURI S, NTUI V O, TRIPATHI L, TRIPATHI J N. Mechanisms and approaches towards enhanced drought tolerance in cassava (*Manihot esculenta*)[J]. Current Plant Biology, 2021, 28(1): 100227.
- [5] AN D, YANG J, ZHANG P. Transcriptome profiling of low temperature-treated cassava apical shoots showed dynamic responses of tropical plant to cold stress[J]. BMC Genomics, 2012, 13(1): 64.
- [6] 王惠君, 王文泉, 李文彬, 陈新, 卢诚, 黎明, 陈友. 木薯的抗寒性及北移栽栽培技术研究进展综述[J]. 热带作物学报, 2016, 37(7): 1437-1443.
WANG H J, WANG W Q, LI W B, CHEN X, LU C, LI M, CHEN Y. Research progress on cold resistance and northward cultivation techniques of cassava[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2016, 37(7): 1437-1443. (in Chinese)
- [7] RUAN Y L, JIN Y, YANG Y J, LI G J, BOYER J S. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat[J]. Molecular Plant, 2010, 3(6): 942-955.
- [8] TAUZIN A S, GIARDINA T. Sucrose and invertases, a part of the plant defense response to the biotic stresses[J]. Frontiers in Plant Science, 2014, (5): 293.
- [9] LIAO S J, WANG L, LI J, RUAN Y L. Cell wall invertase is essential for ovule development through sugar signaling rather than provision of carbon nutrients[J]. Plant Physiology, 2020, 183(3): 1126-1144.
- [10] ROITSCH T, GONZÁLEZ M C. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations[J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(12): 606-613.
- [11] KULSHRESTHA S, TYAGI P, SINDHI V, YADAVILLI K S. Invertase and its applications-A brief review[J]. Journal of Pharmacy Research, 2013, 7(9): 792-797.
- [12] STURM A, CHRISPEELS M J. cDNA cloning of carrot extracellular beta-fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection[J]. The Plant Cell, 1990, 2(11): 1107-1119.

- [13] 陈素芬. 液泡蔗糖转化酶调控拟南芥气孔运动及其抗旱作用[D]. 上海: 上海应用技术学院, 2015.
CHEN S F. Vacuolar sucrose invertase regulates stomatal movement and drought resistance in *Arabidopsis thaliana*[D]. Shanghai: Shanghai Institute of Applied Technology, 2015. (in Chinese)
- [14] CHEN L, ZHENG F H, FENG Z L, LI Y, MA M X, WANG G P, ZHAO H B. A vacuolar invertase CsVI2 regulates sucrose metabolism and increases drought tolerance in *Cucumis sativus* L.[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 23(1): 176.
- [15] BHASKAR P B, WU L, BUSSE J S, WHITTY B R, HAMERNIK A J, JANSKY S H, ROBIN BUELL C, BETHKE P C, JIANG J. Suppression of the vacuolar invertase gene prevents cold-induced sweetening in potato[J]. Plant Physiology, 2010, 154(2): 939-948.
- [16] ZHU X B, CHEN A R, BUTLER N M, ZENG Z X, XIN H Y, WANG L X, LV Z Y, ESHEL D, DOUCHES D S, JIANG J M. Molecular dissection of an intronic enhancer governing cold-induced expression of the vacuolar invertase gene in potato[J]. The Plant Cell, 2024, 36(5): 1985-1999.
- [17] ELLIOTT K J, BUTLER W O, DICKINSON C D, KONNO Y, VEDVICK T S, FITZMAURICE L, MIRKOV T E. Isolation and characterization of fruit vacuolar invertase genes from two tomato species and temporal differences in mRNA levels during fruit ripening[J]. Plant Molecular Biology, 1993, 21(3): 515-524.
- [18] SERGEEVA L I, KEURENTJES J J, BENTSINK L, VONK J, VAN DER PLAS L H, KOORNNEEF M, VREUGDENHIL D. Vacuolar invertase regulates elongation of *Arabidopsis thaliana* roots as revealed by QTL and mutant analysis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(8): 2994-2999.
- [19] WANG L, LI X R, LIAN H, NI D A, HE Y K, CHEN X Y, RUAN Y L. Evidence that high activity of vacuolar invertase is required for cotton fiber and *Arabidopsis* root elongation through osmotic dependent and independent pathways, respectively[J]. Plant Physiology, 2010, 154(2): 744-756.
- [20] 姚远. 木薯转化酶基因家族克隆、结构进化及表达分析[D]. 海口: 海南大学, 2013.
YAO Y. Cloning, structural evolution and expression analysis of cassava invertase gene family[D]. Haikou: Hainan University, 2013. (in Chinese)
- [21] 刘钊君. 木薯液泡转化酶基因 MeVINV1 的抗逆功能鉴定[D]. 海口: 海南大学, 2021.
LIU Z J. Identification of stress resistance function of cassava vacuolar invertase gene MeVINV1[D]. Haikou: Hainan University, 2021. (in Chinese)
- [22] WU Y, CHEN H N, WU M B, ZHOU Y Y, YU C Y, YANG Q H, ROLLAND F, VAN DE POEL B, BOUZAYEN M, HU N, WANG Y K, LIU M C. A vacuolar invertase gene SIVI modulates sugar metabolism and postharvest fruit quality and stress resistance in tomato[J]. Horticulture Research, 2024, 12(1): uhae283.
- [23] QIN G Z, ZHU Z, WANG W H, CAI J H, CHEN Y, LI L, TIAN S P. A tomato vacuolar invertase inhibitor mediates sucrose metabolism and influences fruit ripening[J]. Plant Physiology, 2016, 172(3): 1596-1611.
- [24] WEI Y Y, MAO Y H, GAO Y L, CHEN Y, SUN J C, WANG X X, JIANG S, XU F, WANG H F, SHAO X F. The polygalacturonase-inhibiting protein PpPGIP1, positively regulates vacuolar invertase activity via a protein-protein interaction with PpVIN2 in peach fruit[J]. Scientia Horticulturae, 2023, 320: 112209.
- [25] DESBROSSES-FONROUGE A G, VOIGT K, SCHRÖDER A, ARRIVAUULT S, THOMINE S, KRÄMER U. *Arabidopsis thaliana* MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation[J]. FEBS Letters, 2005, 579(19): 4165-4174.
- [26] RICACHENEVSKY F K, MENGUER P K, SPEROTTO R A, WILLIAMS L E, FETT J P. Roles of plant metal tolerance proteins (MTP) in metal storage and potential use in biofortification strategies[J]. Frontiers in Plant Science, 2013, 4: 144.
- [27] YUAN L Y, YANG S G, LIU B X, ZHANG M, WU K Q. Molecular characterization of a rice metal tolerance protein, OsMTP1[J]. Plant Cell Reports, 2012, 31(1): 67-79.
- [28] LIU P, SUN L, ZHANG Y, TAN Y J, ZHU Y X, PENG C, WANG J R, YAN H L, MAO D H, LIANG G H, LIANG G, LI X X, LIANG Y T, WANG F, HE Z Y, TANG W B, HUANG D Y, CHEN C Y. The metal tolerance protein OsMTP11 facilitates cadmium sequestration in the vacuoles of leaf vascular cells for restricting its translocation into rice grains[J]. Molecular Plant, 2024, 17(11): 1733-1752.
- [29] LI Q H, ZHANG X Y, ZHAO P L, CHEN Y Q, NI D J, WANG M L. Metal tolerance protein CsMTP4 has dual functions in maintaining zinc homeostasis in tea plant[J]. Journal of Hazardous Materials, 2024, 471: 134308.
- [30] XIONG Z T, WANG T, LIU K, ZHANG Z Z, GAN J H, HUANG Y, LI M J. Differential invertase activity and root growth between Cu-tolerant and non-tolerant populations in *Kummerowia stipulacea* under Cu stress and nutrient deficiency[J]. Environmental and Experimental Botany, 2008, 62(1): 17-27.
- [31] STURM A. Invertases. Primary structures, functions, and

- roles in plant development and sucrose partitioning[J]. *Plant Physiology*, 1999, 121(1): 1-8.
- [32] JIA X, ZHAO Y H, LIU T, HE Y H. Leaf defense system of *Robinia pseudoacacia* L. seedlings exposed to 3 years of elevated atmospheric CO₂ and Cd-contaminated soils[J]. *The Science of the Total Environment*, 2017(605/606): 48-57.
- [33] SU C L, JIANG Y J, LI F F, YANG Y R, LU Q Q, ZHANG T T, HU D, XU Q S. Investigation of subcellular distribution, physiological, and biochemical changes in *Spirodela polyrrhiza* as a function of cadmium exposure[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2017, 142: 24-33.
- [34] WEIGEL H J, JÄGER H J. Subcellular distribution and chemical form of cadmium in bean plants[J]. *Plant Physiology*, 1980, 65(3): 480-482.