

木薯异淀粉酶 MeISA2 的互作蛋白筛选

葛玉建^{1,2,3}, 符东青^{1,2,3}, 王祥文^{1,2,3}, 沈 晨^{2,3,4}, 李雨恒^{1,2}, 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/农业农村部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室/海南热带农业资源研究院/海南省热带农业生物资源保护与利用重点实验室, 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: 异淀粉酶 (isoamylase, ISA) 催化 α -1,6 连接键水解, 影响淀粉的分支结构, 促进结晶化和颗粒形成。为了挖掘协同 MeISA2 影响木薯淀粉积累的新蛋白, 本研究利用酵母双杂交筛选 MeISA2 的互作蛋白。本研究构建了 pGBKT7-MeISA2 诱饵蛋白载体, 证明 MeISA2 不具有自激活活性, 且对酵母细胞无毒害作用。通过酵母双杂交筛选 cDNA 文库, 共获得 7 个候选互作蛋白。通过点对点酵母双杂交回转变验证实验, 验证了 MeISA2 与 MePsbO1 存在互作关系。MePsbO1 属于光系统 II 产氧增强蛋白 (photosystem II oxygen-evolving enhancer protein, PsbO), 该类蛋白可促进光合作用电子传递过程的高效运行。生物信息学分析发现, MePsbO1 与同属大戟科的橡胶树 HbPsbO1 的亲缘关系最近, 相似性达到 90.12%, 而与拟南芥 AtPsbO1 的相似性仅为 77.71%。预测 MePsbO1 定位于叶绿体, 且 MePsbO1 基因主要在叶片中表达。植物 ISA 参与叶片临时性淀粉的合成, 因此推测 MePsbO1 和 MeISA2 可能通过互作协同调控光合作用速率以及叶片临时性淀粉的积累。本研究结果为 MeISA2 基因参与木薯源器官的光合产物积累和分配机制研究提供新线索。

关键词: 木薯; MeISA2; 酵母双杂交; MePsbO1

中图分类号: S533 **文献标志码:** A

Screening of Interacting Proteins of Cassava Isoamylase MeISA2

GE Yujian^{1,2,3}, FU Dongqing^{1,2,3}, WANG Xiangwen^{1,2,3}, SHEN Chen^{2,3,4}, LI Yuheng^{1,2}, 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 / Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Hainan Institute for Tropical Agricultural Resources / Key Laboratory for Biology and Genetic Resources of Tropical Crops of Hainan Province, 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: Isoamylase (Isoamylase, ISA) catalyzes the hydrolysis of α -1,6 linkages, thereby affecting the branching structure of starch and promoting crystallization and granule formation. The study utilized yeast two-hybrid screening to identify proteins interacting with MeISA2 to explore new proteins that may interact with MeISA2 to influence cassava starch accumulation. A bait protein vector pGBKT7-MeISA2 was constructed, and it was demonstrated that MeISA2 did not possess autoactivation activity and was non-toxic to yeast cells. Through yeast two-hybrid screening of a cDNA library, a total of 7 candidate interacting proteins were obtained. Point-to-point yeast two-hybrid re-validation experiments confirmed the interaction between MeISA2 and MePsbO1. MePsbO1 belongs to the Photosystem II oxygen-evolving enhancer protein (PsbO) family, which facilitates the efficient operation of the photosynthetic electron

收稿日期 2025-01-21; **接受日期** 2025-02-17

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32460458); 国家木薯产业技术体系项目 (No. CARS11-HNCYH)。

作者简介 葛玉建 (1998—), 男, 硕士研究生, 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。

transfer process. Bioinformatics analysis revealed that MePsbO1 had the closest phylogenetic relationship with HbPsbO1 from *Hevea brasiliensis*, a member of the Euphorbiaceae family, with a similarity of 90.12%, while its similarity to *Arabidopsis thaliana* AtPsbO1 was only 77.71%. It is predicted that MePsbO1 is localized in the chloroplast, and the *MePsbO1* gene is predominantly expressed in leaves. Plant ISA is involved in the synthesis of transient leaf starch, thus it is hypothesized that MePsbO1 and MeISA2 may interact to jointly regulate the rate of photosynthesis and the accumulation of transient leaf starch. The results study would provide new insights into the mechanism by which the *MeISA2* gene participates in the accumulation and distribution of photosynthetic products in cassava source organs.

Keywords: cassava; MeISA2; yeast two-hybrid; MePsbO1

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.06.005

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 是大戟科双子叶植物, 广泛种植于非洲、美洲、亚洲等热带和亚热带地区^[1]。木薯的主要营养器官是块根, 淀粉是块根的主要成分, 同时也是木薯生长发育主要的营养来源^[2]。木薯有耐贫瘠、抗旱和高产等种植特性, 其块根中的淀粉是理想的工业原料, 且是全球 10 亿人口的主要粮食作物^[3]。木薯淀粉常用作增稠剂、稳定剂和凝胶剂, 适用于糕点、面包和无麸质食品。纺织与造纸工业中, 木薯淀粉用于提高纤维的强度和抗磨损能力, 改进纸张的表面光滑度和强度。

淀粉由直链淀粉和支链淀粉组成, 木薯块根中直链淀粉和支链淀粉的含量比例对木薯淀粉的品质和食用口感具有重要影响^[4]。淀粉脱支酶 (debranching enzyme, DBE)、可溶性淀粉合成酶 (starch synthases, SS) 和淀粉分支酶 (starch-branching enzymes, SBE) 对支链淀粉的合成具有催化作用^[5]。可溶性淀粉合成酶主要由可溶性淀粉合成酶 I (SS I)、可溶性淀粉合成酶 II (SS II-1、SS II-2)、可溶性淀粉合成酶 III (SS III-1、SS III-2)、可溶性淀粉合成酶 IV (SS IV) 和可溶性淀粉合成酶 V (SS V) 组成, 在生物淀粉合成中的支链淀粉合成中发挥关键作用, SS 活性影响淀粉颗粒形态、结构和理化特性; 淀粉分支酶具有 SBE I、SBE II 和 SBE III 三种类型, 在淀粉生物合成中催化外部和内部的 α -1,6 键转化成 α -1,4-线性葡聚糖, 也是唯一作用于葡聚糖并通过 α -1,6-糖苷键连接产生分支的酶^[6]。淀粉脱支酶包括异淀粉酶 (isoamylase, ISA) 和普鲁兰酶 (pullulanase), ISA 在植物淀粉结构的合成和数量上具有重要的作用, 影响木薯支链淀粉和直链淀粉的比例^[7]。

ISA 专门催化支链淀粉、 β -极限糊精和糖原中 α -1,6 连接键的水解, 但无法水解普鲁兰^[8]。植物有 3 种异淀粉酶亚型 (ISA1、ISA2 和 ISA3),

其中 ISA1 和 ISA2 在植物淀粉合成中具有重要影响。目前, 在水稻、大麦、马铃薯、玉米作物中均被证明当 ISA 基因缺失时, 均会影响其淀粉颗粒的形成^[9-11]。ISA1 和 ISA2 负责去除支链淀粉合成中产生的支链, 而 ISA3 则专门降解支链淀粉中的支链 α -葡聚糖^[12]。ISA1 既能与自身形成同源复合物, 又能与 ISA2 结合形成异源复合物, 在异源复合物中 ISA1 起催化作用, ISA2 由于其活性位点失去了所有 3 个催化残基而成为非催化蛋白, 发挥调节作用^[13]。异淀粉酶处理木薯淀粉, 可水解淀粉中的 1,6- α -D-糖苷键, 降解支链淀粉并释放线性短链糖, 这导致直链淀粉比率提高, 同时生成更多的还原糖^[14]。PANPETCH 等^[15]克隆了 KU50 木薯品种的 *MeISA1* 和 *MeISA2* 基因, 原核表达其重组蛋白, 证明 *MeISA1* 和 *MeISA2* 蛋白同时存在时才能具有出脱分支酶活性, 并分析了其酶学特性。本研究克隆了我国木薯主栽品种 SC8 的 *MeISA2* 基因, 通过酵母双杂交实验筛选 *MeISA2* 的互作蛋白, 以期为深入探讨 *MeISA2* 在淀粉合成过程中的功能提供新的信息。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料为华南 8 号木薯 (SC8)。酵母感受态 AH109 和大肠感受态 DH5 α 均购自上海唯地生物技术有限公司; RNA 反转录试剂盒 (MonSCRIPTTM RT III All-in-One-Mix With dsDNase) 和 qRT-PCR 试剂盒 (ChemoHS qPCR Mix) 购自武汉莫纳公司; 酵母双杂交载体 pGADT7、pGADT7-T、pGBKT7、pGBKT7-p53 均由本实验室保存。; PrimeSTAR HS (Premix) DNA Polymerase 酶购自 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒和纯化试剂盒购自 OMEGA 生物试剂公司; RNA 提取试剂盒购自北京聚合美生物科技有限公司; X- α -gal 酵母显色底

物购自北京索莱宝科技有限公司；酵母缺陷培养基和 2×Rapid Tap MasterMix 酶分别购自 clontech 公司和南京诺唯赞生物科技股份有限公司；限制性核酸内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I 购自赛默飞世尔科技公司。

1.2 方法

1.2.1 诱饵载体 pGBKT7-*MeISA2* 构建及检测
根据木薯基因组数据库信息，设计 *MeISA2* 基因克隆引物（表 1），以 SC8 木薯 cDNA 模板进行

PCR 扩增，通过 1%凝胶电泳检测 PCR 扩增产物，纯化备用。将纯化的 *MeISA2* 片段与酶切纯化 pGBKT7 空载体（酶切位点 *EcoR* I 和 *Bam*H I）进行同源重组。将同源重组产物转化到 DH5α 大肠杆菌中，利用 pGBKT7 通用检测引物（表 1）进行菌液 PCR 鉴定，筛选阳性菌液进行 Sanger 测序，提取测序结果比对正确的菌液中的重组质粒，于-20℃冰箱保存备用。

表 1 引物序列信息
Tab. 1 Primers sequence information

引物名称 Primer name	引物序列（5'-3'） Primer sequence (5'-3')	用途 Purpose
BD 检测-F/R	F: GTGCGACATCATCATCGGAAG R: TAAGAGTCACTTTAAAAATTTGTATAC	pGBKT7 载体检测引物
AD 检测-F/R	F: AATACCACTACAATGGATGATG R: GAGATGGTGCACGATGCACAGT	pGADT7 载体检测引物
BD-ISA2-F/R	F: GCCATGGAGGCCGAATTCATGGCAACACTTCTTCTTCC R: CTGCAGGTCGACGGATCCTCAACCACCAAGGCTAGTGG	诱饵载体构建
AD- MePsbO1-F/R	F: ATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGCAGCCACACCACAAGC R: ATCTGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCCTACGACTCAAGCTGAGCAT	点对点验证
AD-MeGEBG12-F/R	F: ATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGAGCGTAGTTTCATCTC R: ATCTGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCTCAATATCCTGTGGGAAACT	
AD-MeCAT2-F/R	F: ATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGATCCTTGCAAGTTCCG R: ATCTGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCTCATATATTTGGCCTCACGT	
AD-MePIP7a-F/R	F: ATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGAGGGCAAGGAAGAAGA R: ATCTGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCTCACTTCTTGAAAGGAATGG	
AD-MeCYP1-F/R	F: ATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGATGGGCCTGTTTGGATC R: ATCTGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCCTAAGCACTGCTCTTCTTGG	
AD- MeCLP2-F/R	F: ATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGAGGCCAGAAATTGTGT R: ATCTGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCTCAAGAAGATGATGAAGAGG	
AD- MeATP1-F/R	F: ATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGCTTCCATGAGCAACCT R: ATCTGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCCTAAGCTGGAACAGGTTCTG	

1.2.2 pGBKT7-*MeISA2* 诱饵蛋白的毒性检测
将 pGBKT7 空载和 pGBKT7-*MeISA2* 重组质粒分别转化到 AH109 酵母感受态，涂布于 SD/-Trp 固体培养基上，30℃倒置培养 2~3 d。挑取菌斑至含有 2×Rapid Master Mix 的 PCR 管中，使用 BD 检测引物进行菌斑 PCR 鉴定，筛选酵母阳性菌株。将筛选出的阳性 pGBKT7 空载酵母菌株和 pGBKT7-*MeISA2* 酵母菌株分别接种到 SD/-Trp 液体培养基中，30℃培养至 OD₆₀₀=0.6。将酵母菌液按照 1：1、1：10、1：100、1：1000、1：10 000 稀释后，分别吸取 5 μL 点板于 SD/-Trp 固体培养基上，30℃倒置培养 2~3 d，观察菌落生长情况。

1.2.3 pGBKT7-*MeISA2* 诱饵蛋白的自激活检验
将 pGADT7 空载和 pGBKT7-*MeISA2* 重组质粒共转到 AH109 酵母感受态中，均匀涂布于 SD/-Trp-Leu 固体培养基上，30℃培养 2~3 d，挑取单菌落分

别使用 AD 检测-F/R、BD 检测-F/R 进行 PCR 检测，筛选阳性菌株。将筛选的阳性菌株接种到 SD/-Trp-Leu 液体培养基中扩大培养，分别吸取菌液 5 μL 点到 SD/-Trp-Leu、SD/-Trp-Leu-His-Ade、SD/-Trp-Leu-His-Ade+X-α-gal 固体培养基上，将本实验室保存的 pGBKT7-p53+pGADT7-*T*（阳性对照）和 pGBKT7-*lam*+pGADT7-*T*（阴性对照）点板在上述固体培养基上，30℃培养 2~3 d，观察酵母菌落生长情况。

1.2.4 *MeISA2* 互作蛋白筛选
将 30 μg SC8 木薯 cDNA 文库质粒与 pGBKT7-*MeISA2* 重组质粒共转到 AH109 酵母感受态，并涂布于 SD/-Trp-Leu-His 固体培养基，30℃倒置培养 2~3 d。挑取酵母菌斑在 20 μL 0.9% NaCl 溶液中吸打混匀，吸取 5 μL 点板于 SD/-Trp-Leu-His-Ade+X-α-gal 培养基上，倒置培养 2~3 d，观察酵母菌斑生长情况。挑取培

培养基上变蓝的菌斑,使用 AD 检测-F/R 进行 PCR 检测, Sanger 测序, 获得候选互作蛋白信息。

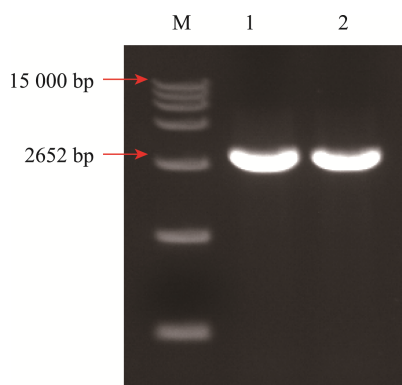
1.2.5 候选互作蛋白的酵母双杂交回转变验证 根据候选互作蛋白信息搜索木薯基因库数据, 获得候选蛋白的 CDS 序列。设计带有同源重组接头的特异性引物(表 1), 以 SC8 木薯 cDNA 为模板扩增候选蛋白基因编码区。通过同源重组技术将候选互作蛋白克隆到 pGADT7 空载体上。将 pGBKT7-*MeISA2* 诱饵蛋白载体与含有候选蛋白基因的 pGADT7 载体分别共转到 AH109 酵母感受态, 并点板到 SD/-Trp-Leu、SD/-Trp-Leu-His-Ade、SD/-Trp-Leu-His-Ade+X- α -gal 固体培养基上, 30 °C 倒置培养 2~3 d, 观察酵母生长情况。

1.2.6 *MePsbO1* 基因在木薯各组织的表达分析 利用本实验室已经完成的 SC8 木薯的体胚、愈伤、韧皮部、木质部、须根、茎、嫩叶、成熟叶的转录组信息分析互作蛋白基因在木薯各组织或器官的表达情况。

2 结果与分析

2.1 pGBKT7-*MeISA2* 诱饵蛋白载体的构建

以 SC8 木薯的 cDNA 为模板, PCR 扩增 *MeISA2* 基因的 CDS 区, 凝胶电泳检测显示获得约 2600 bp 的条带, 且条带明亮单一(图 1), 符合预期的 *MeISA2* 基因长度(2652 bp)。纯化 PCR 产物, 通过同源重组技术将 *MeISA2* 基因克隆到 pGBKT7 载体上。PCR 筛选阳性菌落, 测序, 提取序列比对正确的 pGBKT7-*MeISA2* 诱饵载体质粒备用。



M: DL15 000 DNA marker; 1~2: *MeISA2* 基因。

M: DL15 000 DNA marker; 1~2: *MeISA2* gene.

图 1 *MeISA2* 基因 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplification of *MeISA2* gene

2.2 *MeISA2* 诱饵蛋白的毒性检测

将构建成功的 pGBKT7-*MeISA2* 诱饵载体与 pGBKT7 空载分别转到 AH109 酵母感受态中, PCR 鉴定阳性菌株。梯度稀释后点板于 SD/-Trp 固体培养基培养。结果显示, 含有 pGBKT7-*MeISA2* 和 pGBKT7 的酵母菌株生长情况类似(图 2), 表明 pGBKT7-*MeISA2* 表达蛋白不具有毒性, 酵母菌株能正常生长。

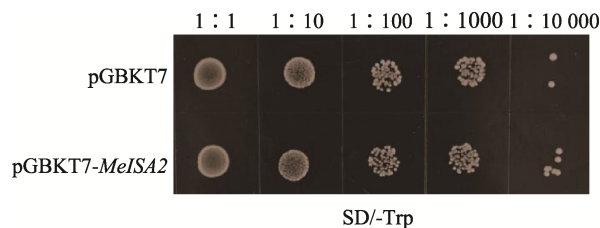


图 2 pGBKT7-*MeISA2* 诱饵蛋白载体的毒性检测

Fig. 2 Toxicity detection of pGBKT7-*MeISA2* bait protein vector

2.3 *MeISA2* 诱饵蛋白的自激活检测

为了验证诱饵蛋白 *MeISA2* 是否具有自激活能力, 将 pGBKT7-*MeISA2* 诱饵载体与 pGADT7 空载共转 AH109 酵母菌株进行自激活检测。结果如图 3 所示, pGBKT7-p53+pGADT7-T (阳性对照) 和 pGBKT7-*lam*+pGADT7-T (阴性对照) 酵母菌株和阳性菌株均能在 SD/-Trp-Leu 培养基上正常生长; 而在 SD/-Trp-Leu-His-Ade、SD/-Trp-Leu-His-Ade+X- α -gal 培养基上只有阳性对照酵母菌株能正常生长, 且在 SD/-Trp-Leu-His-Ade+X- α -gal 培养基上变蓝; 含有 pGBKT7-*MeISA2* 质粒的菌株和阴性对照菌株均不能生长(图 3)。此结果表明 *MeISA2* 诱饵蛋白无自激活能力。

2.4 *MeISA2* 互作蛋白筛选

使用实验室保存的 SC8 cDNA 文库质粒筛选 *MeISA2* 的互作蛋白, 在 SD/-Trp-Leu-His-Ade+X- α -gal 培养基上共获得 7 个变蓝的酵母菌斑, 表明 7 个变蓝的酵母菌斑所表达的蛋白可能与 *MeISA2* 蛋白存在互作关系。对变蓝菌斑进行 PCR 检测并进行 Sanger 测序, 通过 NCBI 网站序列比对共获得 7 个候选蛋白信息(表 2)。

2.5 *MeISA2* 与候选蛋白点对点验证

为进一步验证候选蛋白是否与 *MeISA2* 蛋白存在互作关系, 将上述 7 个含有候选蛋白基因的 pGADT7 载体分别与 pGBKT7-*MeISA2* 诱饵载体共转到 AH109 酵母菌株。将酵母菌株点到 SD/-

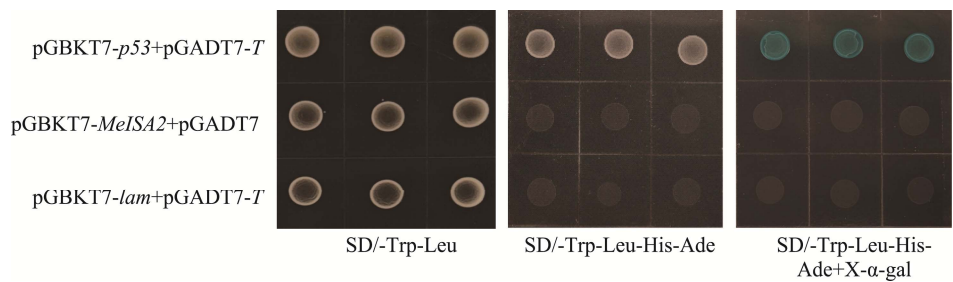


图 3 pGBKT7-MeISA2 诱饵蛋白载体的自激活检测
Fig. 3 Self-activation detection of pGBKT7-MeISA2 bait protein vector

表 2 MeISA2 候选互作蛋白信息			
Tab. 2 MeISA2 candidate interacting protein information			
编号 No.	蛋白名称 Protein name	GenBank 登录号 GenBank login number	基因注释 Gene annotation
1	MePsbO1	LOC110630259	photosystem II oxygen-evolving enhancer protein 1 光系统 II 产氧增强蛋白 1
2	MeGEBG12	LOC110627304	glucan endo-1,3-beta-glucosidase 1 葡聚糖内切-1,3-β-葡萄糖苷酶 12
3	MeCAT2	LOC110606601	catalase isozyme 2 过氧化氢酶同工酶 2
4	MePIP7a	LOC110619660	probable aquaporin PIP-type 7a 水通道蛋白 PIP 型 7a
5	MeCYP1	LOC110606381	low-temperature-induced cysteine proteinase 低温诱导的半胱氨酸蛋白酶
6	MeCLP2	LOC110601114	chitinase-like protein 2 几丁质酶样蛋白 2
7	MeATP1	LOC110601752	ATP sulfurylase 1 ATP 硫酸化酶 1

Trp-Leu、SD/-Trp-Leu-His-Ade、SD/-Trp-Leu-His-Ade+X-α-gal 固体培养基上培养。结果显示，所有酵母菌株均能在 SD/-Trp-Leu 培养基上正常生长，而含 pGBKT7-MeISA2 诱饵载体、pGADT7-MePsbO1 载体的酵母菌和 pGBKT7-p53+pGADT7-T(阳性对照)在 SD/-Trp-Leu-His-Ade、SD/-Trp-Leu-His-Ade+X-α-gal 固体培养基上均能正常生长，且在 SD/-Trp-Leu-His-Ade+X-α-gal 固体培养基上变蓝(图 4)。此结果表明 MePsbO1 与 MeISA2 存在互作关系。

2.6 MePsbO1 基因的生物信息学分析

生物信息学分析结果显示，MePsbO1 基因开放阅读框长度为 1005 bp，由 2 个外显子和 1 个内含子组成(图 5)，编码 334 个氨基酸残基，分子质量为 35 397.84 Da。其中，亮氨酸丙氨酸(Ala)和苏氨酸(Thr)的数量最多，均为 33 个氨基酸，

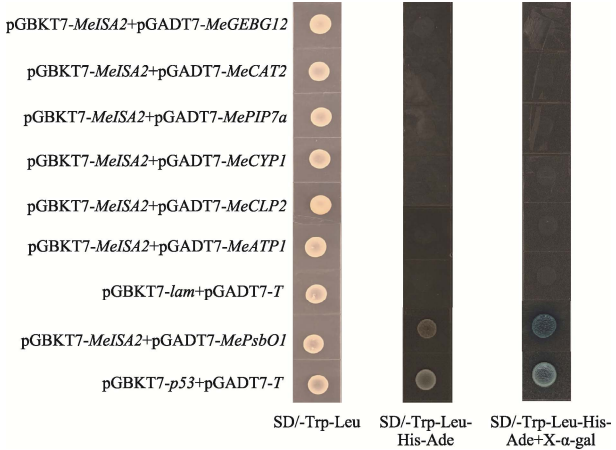


图 4 MeISA2 基因酵母双杂交点对点验证
Fig. 4 Yeast two-hybrid point-to-point verification of MeISA2 gene

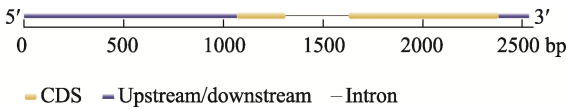


图 5 MePsbO1 基因结构示意图
Fig. 5 Schematic diagram of MePsbO1 gene structure

占总量的 9.3%；色氨酸(Trp)的含量最低，只有 1 个，仅占 0.3%。有 38 个带负电荷的 Asp 和 Glu 残基，以及 36 个带正电荷的 Arg 和 Lys 残基，理论等电点(pI)为 5.57，表明 MePsbO1 是一种酸性蛋白。亚细胞定位预测 MePsbO1 定位于叶绿体。系统进化树分析发现，MePsbO1 与橡胶树的 HbPsbO1 亲缘关系最近，与拟南芥 AtPsbO1 的亲缘关系最远(图 6)。蛋白的多序列结果比对显示，MePsbO1 和 HbPsbO1 的相似性为 90.12%，与 AtPsbO1 的相似性仅为 77.71%(图 7)。

2.7 MePsbO1 基因在木薯组织器官的表达分析

分析 SC8 木薯品种各组织器官转录组数据，探究 MePsbO1 基因表达的模式，结果发现 MePsbO1 基因在木薯嫩叶中的表达量最高，其次是成熟叶，在茎中也具有较高的表达量，但是在

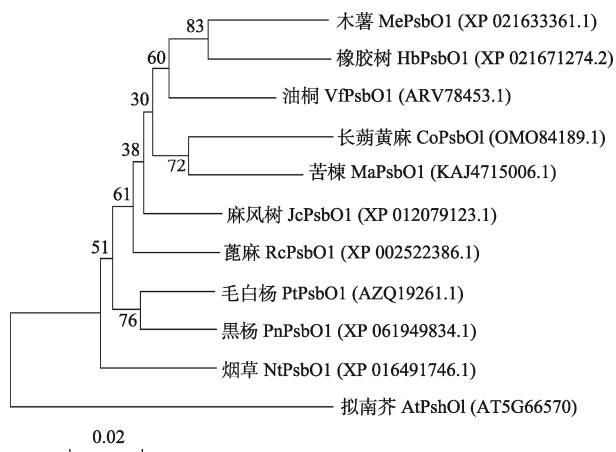


图 6 木薯以及其他物种 PsbO1 的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of PsbO1 in cassava and other species



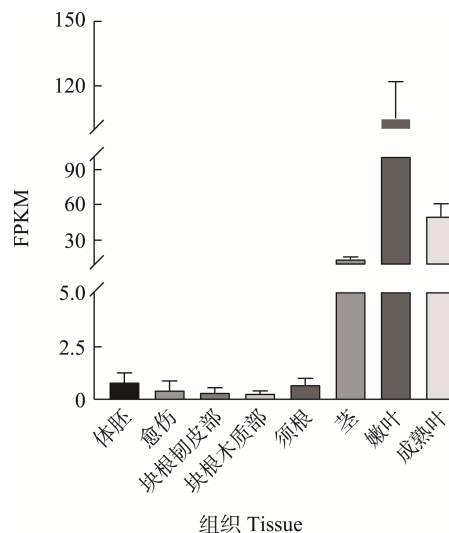
图 7 木薯、橡胶树、拟南芥 PsbO1 的蛋白序列比对

Fig. 7 Protein sequence alignment of PsbO1 from cassava, rubber tree and *Arabidopsis thaliana*

体胚、愈伤、块根韧皮部、块根木质部、须根中的表达量极低(图8)。此表达模式符合植物 *PsbO1* 基因参与叶片光合作用的功能特征。

3 讨论

异淀粉酶参与淀粉颗粒的形成和降解^[16]。在马铃薯的研究中发现, ISA1 和 ISA2 结合形成异二聚酶参与淀粉的合成^[17]。ISA1 和 ISA2 除了能结合形成异多聚体, ISA1 还能形成有活性的同源多聚酶复合物^[13], ISA2 则是非催化亚基, 多种植物证明 ISA2 蛋白活性位点有氨基酸的替换^[11]。研究发现 ISA3 与 ISA1、ISA2 形成的多聚体未存在密切关联, 认为 ISA3 是以单体或与其他蛋白结



FPKM: 每百万个比对的读取片段中每千个碱基进行转录。

FPKM: Transcription per thousand bases per million mapped read fragments.

图 8 *MePsbO1* 基因在木薯组织器官的表达分析

Fig. 8 Expression analysis of *MePsbO1* gene in cassava tissues and organs

合发挥作用^[17]。与野生型相比,拟南芥 *AtISA1*、*AtISA2* 和双突变体淀粉含量的积累减少,但可溶性葡萄糖增加^[18]。单子叶植物玉米中发现在 *ISA1* 和 *ISA2* 突变体中, *ISA1* 突变导致支链淀粉的合成产生了显著变化,而在 *ISA2* 突变体对支链淀粉的合成影响不大^[19]。由此推测 *ISA1* 和 *ISA2* 是双子叶植物中 *ISA* 活性所需要的,但在单子植物中, *ISA2* 不是 *ISA* 活性所必需的。

植物光系统 II (PSII) 的外周蛋白是与 PSII 膜内核心复合体相连的蛋白质, 主要位于类囊体腔的一侧, 在氧气进化复合物 (oxygen evolving complex, OEC) 的功能和 PSII 的稳定性中发挥重要作用, 主要的外周蛋白包括 PsbO、PsbP、PsbQ, 其中 PsbO 是 33 kDa 锰稳定蛋白 (manganese-stabilizing protein, MSP), 是 PSII 中最主要的外周蛋白^[20]。PsbO 在光系统 II 捕捉并利用光能将水分子分解成氧气、质子和电子的过程中起辅助和强化作用, 促进光合作用电子传递过程的高效运行^[21]。PsbO 还具有多种辅助功能, 包括钙结合、锰稳定结合, 以及与 GTP 结合相关的 PSII 反应中心 D1 亚基的 GTP 依赖性降解, PsbO 可结合 GTP, 并催化 GTP 水解^[22]。拟南芥存在 2 种 PsbO 蛋白: AtPsbO1 和 AtPsbO2^[23]。AtPsbO1 缺失突变体 (*psbo1*) 的光系统 II 功能受损, 表现为生长迟缓、叶片浅绿、对光失活更敏感以及 D1 蛋白

周转速率加快^[24]。

本研究通过酵母双杂交筛选获得 MeISA2 的互作蛋白 MePsbO1, 该蛋白与同属大戟科的橡胶树 HbPsbO1 的亲缘关系最近, 相似性达到 90.12%, 而与拟南芥 AtPsbO1 的相似性仅为 77.71%。预测 MePsbO1 定位于叶绿体, 且 MePsbO1 基因主要在叶片中表达, 推测该基因在木薯光合作用中具有重要作用。叶绿体是临时性淀粉合成的主要场所, 光合作用固定的碳水化合物可以淀粉的形式贮存在叶绿体中^[25]。ISA 在植物叶片临时性淀粉的合成中起到关键作用, 通过调节淀粉的分支结构, 促进结晶化和颗粒形成^[26]。因此推测, MePsbO 和 MeISA2 可能通过互作协同调控光合作用速率以及叶片临时性淀粉的积累, 影响木薯源器官的光合产物积累和分配。本课题组在后续研究中将通过双分子荧光互补实验、荧光素酶互补实验进一步研究 MePsbO1 和 MeISA2 的互作机理, 采用过表达和基因编辑明确它们在木薯临时性淀粉合成过程的关系及作用。

参考文献

- [1] ZHEN X H, PAN R R, LU X H, GE Y J, LI R M, LIU J, WANG Y J, YI K X, LI C X, GUO J C, YAO Y, GENG M T. An anthocyanin-based visual reporter system for genetic transformation and genome editing in cassava[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(21): 11808.
- [2] UCHECHUKWU-AGUA A D, CALEB O J, OPARA U L. Postharvest handling and storage of fresh cassava root and products: a review[J]. Food and Bioprocess Technology, 2015, 8(4): 729-748.
- [3] 张慧敏, 葛玉建, 侯静怡, 梁宝娟, 任治欣, 郭建春, 姚远, 王亚杰, 耿梦婷. 木薯 MeCML42 互作蛋白筛选[J]. 热带作物学报, 2024, 45(11): 2251-2257.
ZHANG H M, GE Y J, HOU J Y, LIANG B J, REN Z X, GUO J C, YAO Y, WANG Y J, GENG M T. Screening of cassava MeCML42 interacting proteins[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(11): 2251-2257. (in Chinese)
- [4] BALAT M, BALAT H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel[J]. Applied Energy, 2009, 86(11): 2273-2282.
- [5] LLOYD J R, KÖTTING O. Starch biosynthesis and degradation in plants[M]. Manhattan: John Wiley & Sons, Ltd., 2016: 1-10.
- [6] 陆小花. 木薯可溶性淀粉合成酶 MeSS III-1 基因的功能及调控淀粉合成的研究[D]. 海口: 海南大学, 2024.
LU X H. Study on the function of soluble starch synthase MeSS III-1 gene and its regulation of starch synthesis in cassava[D]. Haikou: Hainan university, 2024. (in Chinese)
- [7] GOUS P W, FOX G P. Review: amylopectin synthesis and hydrolysis—understanding isoamylase and limit dextrinase and their impact on starch structure on barley (*Hordeum vulgare*) quality[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 62: 23-32.
- [8] LI L, ILARSLAN H, JAMES M G, MYERS A M, WURTELE E S. Genome wide co-expression among the starch debranching enzyme genes AtISA1, AtISA2, and AtISA3 in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(12): 3323-3342.
- [9] SHUFEN C, YICONG C, BAOBING F, GUIAI J, ZHONGHUA S, JU L, SHAOQING T, JIANLONG W, PEISONG H, XIANGJIN W. Editing of rice isoamylase gene ISA1 provides insights into its function in starch formation[J]. Rice Science, 2019, 26(2): 77-87.
- [10] BLENNOW A, SKRYHAN K, TANACKOVIC V, KRUNIC S L, SHAIK S S, ANDERSEN M S, KIRK H G, NIELSEN K L. Non-GMO potato lines, synthesizing increased amylose and resistant starch, are mainly deficient in isoamylase debranching enzyme[J]. Plant Biotechnology Journal, 2020, 18(10): 2096-2108.
- [11] FACON M, LIN Q, AZZAZ A M, HENNEN-BIERWAGEN T A, MYERS A M, PUTAUX J L, ROUSSEL X, D'HULST C, WATTEBLED F. Distinct functional properties of isoamylase-type starch debranching enzymes in monocot and dicot leaves[J]. Plant Physiology, 2013, 163(3): 1363-1375.
- [12] PFISTER B, ZEEMAN S C. Formation of starch in plant cells[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016, 73(14): 2781-2807.
- [13] UTSUMI Y, UTSUMI C, SAWADA T, FUJITA N, NAKAMURA Y. Functional diversity of isoamylase oligomers: the ISA1 homo-oligomer is essential for amylopectin biosynthesis in rice endosperm[J]. Plant Physiology, 2011, 156(1): 61-77.
- [14] PUSPITA P, HERMANA W, NAHROWI. Effect of isoamylase application on chemical characteristic of cassava root meal starch[J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2019, 251: 012058.
- [15] PANPETCH P, FIELD R A, LIMPASENI T. Heterologous co-expression in *E. coli* of isoamylase genes from cassava *Manihot esculenta* Crantz 'KU50' achieves enzyme-active heteromeric complex formation[J]. Plant Molecular Biology, 2018, 96(4/5): 417-427.
- [16] ZHANG P, FERREIRA S J, SENNING M, FISCHER-STETTLER M, STREB S, AST M, NEUHAUS H E, ZEEMAN S C, SONNEWALD S, SONNEWALD U. Sim-

- ultaneous silencing of isoamylases ISA1, ISA2 and ISA3 by multi-target RNAi in potato tubers leads to decreased starch content and an early sprouting phenotype[J]. *PloS One*, 2017, 12(7): e0181444.
- [17] HUSSAIN H, MANT A, SEALE R, ZEEMAN S, HINCHLIFFE E, EDWARDS A, HYLTON C, BORNEMANN S, SMITH A M, MARTIN C, BUSTOS R. Three isoforms of isoamylase contribute different catalytic properties for the debranching of potato glucans[J]. *The Plant Cell*, 2003, 15(1): 133-149.
- [18] DELATTE T, TREVISAN M, PARKER M L, ZEEMAN S C. *Arabidopsis* mutants Atisa1 and Atisa2 have identical phenotypes and lack the same multimeric isoamylase, which influences the branch point distribution of amylopectin during starch synthesis[J]. *The Plant Journal*, 2005, 41(6): 815-830.
- [19] KUBO A, COLLEONI C, DINGES J R, LIN Q, LAPPE R R, RIVENBARK J G, MEYER A J, BALL S G, JAMES M G, HENNEN-BIERWAGEN T A, MYERS A M. Functions of heteromeric and homomeric isoamylase-type starch-debranching enzymes in developing maize endosperm[J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(3): 956-969.
- [20] FADEEVA M, KLAIMAN D, CASPY I, NELSON N. Structure of *chlorella ohadii* photosystem II reveals protective mechanisms against environmental stress[J]. *Cells*, 2023, 12(15): 1971.
- [21] XIAO Y, HUANG G, YOU X, ZHU Q, WANG W, KUANG T, HAN G, SUI S F, SHEN J R. Structural insights into cyanobacterial photosystem II intermediates associated with Psb28 and Tsl0063[J]. *Nature Plants*, 2021, 7(8): 1132-1142.
- [22] LUNDIN B, NURMI M, ROJAS-STUETZ M, ARO E M, ADAMSKA I, SPETEA C. Towards understanding the functional difference between the two PsbO isoforms in *Arabidopsis thaliana*: insights from phenotypic analyses of *psbo* knockout mutants[J]. *Photosynthesis Research*, 2008, 98(1/2/3): 405-414.
- [23] MURAKAMI R, IFUKU K, TAKABAYASHI A, SHIKANAI T, ENDO T, SATO F. Functional dissection of two *Arabidopsis* PsbO proteins[J]. *The FEBS Journal*, 2005, 272(9): 2165-2175.
- [24] LIU H, FRANKEL L K, BRICKER T M. Functional analysis of photosystem II in a PsbO-1-deficient mutant in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Biochemistry*, 2007, 46: 7607-7613.
- [25] LIU T, KAWOCHAR M A, LIU S, CHENG Y, BEGUM S, WANG E, ZHOU T, LIU T, CAI X, BOTAO S. Suppression of the tonoplast sugar transporter, *StTST3.1*, affects transitory starch turnover and plant growth in potato[J]. *The Plant Journal*, 2022, 113(2): 342-356.
- [26] LIN Q, FACON M, PUTAUX J L, DINGES J R, WATTEBLED F, D'HULST C, HENNEN-BIERWAGEN T A, MYERS A M. Function of isoamylase-type starch debranching enzymes ISA1 and ISA2 in the *Zea mays* leaf[J]. *The New Phytologist*, 2013, 200(4): 1009-1021.