

木薯 MeGBSSI 与 MeSSV 的蛋白互作验证

郑钧文^{1,2}, 陆小花², 李雨恒^{1,2}, 农宝昌^{1,2}, 葛玉建^{1,2}, 王亚杰², 姚 远²,
耿梦婷^{1*}

1. 海南大学热带农林学院/热带作物生物育种全国重点实验室, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所/中国热带农业科学院三亚研究院/农业农村部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南三亚 572000

摘 要: 颗粒结合淀粉合成酶 I (MeGBSSI) 是木薯直链淀粉合成的关键酶, 主要催化葡萄糖单元在淀粉颗粒上通过 α -1,4-糖苷键形成直链淀粉。然而, MeGBSSI 与其他淀粉合成相关酶如何协同调控淀粉生物合成的机制仍不明确。本课题组前期通过酵母双杂交技术推测可溶性淀粉合成酶 MeSSV 为 MeGBSSI 的潜在结合蛋白。本研究以木薯主栽品种华南 8 号 (SC8) 为材料, 克隆 MeGBSSI 和 MeSSV 基因, 构建酵母双杂交载体 pGBKT7-MeGBSSI 和 pGADT7-MeSSV, 通过酵母双杂交点对点试验初步验证 MeGBSSI 与 MeSSV 之间的互作关系, 并采用萤火虫荧光素酶互补 (LCA) 和双分子荧光互补 (BiFC) 技术进一步明确二者的直接蛋白互作。结果显示: MeGBSSI 和 MeSSV 基因编码的蛋白序列与测序品种 AM560 相比, 分别发生了 4 个和 2 个氨基酸替换; MeGBSSI 蛋白对酵母细胞无毒性, 且无自激活活性; 该蛋白与可溶性淀粉合成酶 MeSSV 在酵母中发生互作; LCA 试验结果显示 MeGBSSI 与 MeSSV 共表达后化学信号显著增强; BiFC 试验进一步证明二者在植物细胞中能够形成复合体, 且互作信号定位于叶绿体。本研究结果为揭示木薯淀粉合成相关酶之间的协同调控机制提供新的视角。

关键词: 木薯; MeGBSSI; MeSSV; 酵母双杂交

中图分类号: S641.2 文献标志码: A

Protein Interaction Verification of Cassava MeGBSSI and MeSSV

ZHENG Junwen^{1,2}, LU Xiaohua², LI Yuheng^{1,2}, NONG Baochang^{1,2}, GE Yujian^{1,2}, WANG Yajie²,
YAO Yuan², GENG Mengting^{1*}

1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University / National Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Institute of Tropical Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Tropical Crop Biology and Genetic Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Sanya, Hainan 572000, China

Abstract: Granule-bound starch synthase I (MeGBSSI) is the key enzyme for amylose synthesis in cassava, primarily responsible for catalyzing the formation of amylose through α -1,4-glucosidic linkages on the surface of starch granules. However, how MeGBSSI cooperates with other starch-synthetic enzymes to orchestrate starch biosynthesis remains unclear. In the previous stage of this research group, through yeast two-hybrid technology, it was hypothesized that the soluble starch synthase MeSSV was a potential binding protein of MeGBSSI. In this study, the MeGBSSI and MeSSV genes were cloned using the main cultivated variety of cassava, Huanshan 8 (SC8), as the material. Yeast two-hybrid vectors pGBKT7-MeGBSSI and pGADT7-MeSSV were constructed. Through yeast two-hybrid point-to-point experiments, the interaction relationship between MeGBSSI and MeSSV was preliminarily verified. The luciferase complementation (LCA) and double-molecule fluorescence complementation (BiFC) techniques were used to further clarify the direct protein interaction between the two. The results showed that the protein sequences encoded by the MeGBSSI and

收稿日期 2025-11-18; 接受日期 2025-12-28

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 325RC816); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630052025020); 国家自然科学基金项目 (No. 32460519)。

作者简介 郑钧文 (1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 作物分子育种。*通信作者 (Corresponding author): 耿梦婷 (GENG Mengting), E-mail: mengtinggeng8908@163.com。

MeSSV genes, compared with the sequenced variety AM560, respectively, had 4 and 2 amino acid substitutions; the MeGBSSI protein was non-toxic to yeast cells and had no self-activation activity; this protein interacted with the soluble starch synthase MeSSV in yeast; the LCA experiment showed that the chemical signals significantly enhanced after co-expression of MeGBSSI and MeSSV; the BiFC experiment further proved that the two could form a complex in plant cells, and the interaction signal was located in the chloroplast. The findings would provide new insight into the synergistic regulation among cassava starch-synthetic enzymes.

Keywords: cassava; MeGBSSI; MeSSV; yeast two-hybrid system

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2026.03.003

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 为大戟科木薯属植物, 与马铃薯、甘薯并列为全球三大薯类, 同时是位居产量第六的粮食作物。由于木薯具有较强的适应性, 耐贫瘠土壤和耐干旱^[1], 且其生长过程中对田间管理要求较低、产量高。块根中含有丰富的淀粉, 因此被誉为“淀粉之王”^[2]。因此在热带和亚热带地区得到了广泛种植。木薯块根中的淀粉不仅是人类膳食中的重要能量来源, 还是食品、医药及工业加工中的关键原料^[3]。淀粉主要由直链淀粉 (amylose) 和支链淀粉 (amylopectin) 组成, 二者的比例对其理化性质及应用价值具有直接影响^[4]。其中, 糯性淀粉由于直链淀粉含量显著降低, 表现出独特的黏性和透明度, 因而在食品加工和生物材料领域展现出广泛的应用潜力^[5]。

颗粒结合淀粉合成酶 (granule-bound starch synthase, GBSS) 是直链淀粉合成的关键酶, 尤其在种子、胚和块根等贮藏器官中的表达, 直接调控直链淀粉的积累^[6]。在水稻、玉米等禾本科作物中, GBSSI 的缺失或功能缺陷通常导致直链淀粉含量显著下降, 形成典型的糯性淀粉, 这一现象在多种作物中已有充分验证^[7]。在木薯中, 通过 RNA 干扰或 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 MeGBSSI 基因, 发现直链淀粉显著减少, 伴随淀粉颗粒结构和理化性质改变, 从而成功获得了糯性木薯品系^[8-9]。此外, 对木薯自然种质资源中的 GBSSI 基因遗传变异研究表明, 其启动子区和编码区的单核苷酸多态性 (SNPs) 及插入缺失 (InDels) 等遗传标记, 可能与不同品种之间的淀粉品质差异密切相关^[10]。因此, MeGBSSI 蛋白不仅是木薯淀粉品质改良的核心靶点, 也是研究木薯淀粉分子合成机制的关键切入点。可溶性淀粉合成酶 (soluble starch synthase V) MeSSV 基因编码的蛋白包含 608 个氨基酸, 该蛋白具有 2 个保守的结构域: Glycos_transf_1 (PF00534; GT_1) 和 Glyco_transf_5 (PF08323; GT_5), 其中

Glyco_transf_5 是淀粉合成酶的催化结构域, 负责使用 ADP-葡萄糖作为葡萄糖供体, 在淀粉合成过程中发挥关键作用^[11]。

近年来, 大量研究表明植物淀粉合成相关酶并非独立发挥作用, 而是通过多酶复合体的形式协同调控淀粉的合成与积累^[12]。在水稻、小麦和玉米中, GBSSI 与可溶性淀粉合成酶 (SS)、淀粉分支酶 (SBE) 及淀粉去分支酶 (DBE) 等蛋白均存在直接或间接的互作关系, 这些互作不仅影响酶的定位和活性, 还可能决定直链与支链淀粉的比例平衡^[13]。例如, 在小麦和玉米中, GBSSI 与多种 SS 或 SBE 的互作也与直链淀粉的合成效率相关^[14-15]。在水稻中, GBSSI 与 PTST1 蛋白的互作对于 GBSSI 正确定位于淀粉颗粒表面具有关键作用。与此同时, 越来越多的伴侣蛋白和调控因子对 GBSSI 的功能至关重要。例如, 水稻 OsGBP (GBSS-binding protein) 通过其 CBM48 结构域与 GBSSI/II 结合, 促进其锚定到淀粉颗粒, 从而保障直链淀粉合成^[16]; OsMYBR1 结合 GBSSI 启动子, 正向调控 GBSSI 的表达, 提高水稻胚乳中直链淀粉的含量^[17]; 此外, FLO2 虽不直接结合淀粉, 但通过调控 GBSSI 及其他淀粉合成酶的表达, 间接影响其功能^[18]。因此, GBSSI 的活性依赖于酶-酶互作、伴侣蛋白辅助及上游调控因子的多层次协同作用, 这一互作网络共同决定淀粉的合成特性与籽粒品质。

尽管在水稻、小麦和玉米等禾本科作物中, GBSSI 的互作网络已得到较多研究, 但在木薯中相关研究仍十分有限, 目前缺乏系统性的互作图谱和分子机制解析, 限制了对其在淀粉形成调控网络的深入认识。本课题组前期通过酵母双杂交技术筛选获得了木薯 MeGBSSI 的候选互作蛋白 MeSSV。本研究在此基础上, 进一步验证 MeGBSSI 与 MeSSV 之间的互作关系, 为揭示木薯淀粉合成的分子机制提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 华南 8 号 (SC8) 木薯, 采自国家木薯种质资源圃。本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 种子由本实验室保存, 用于双分子荧光互补试验 (bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 和萤火虫荧光素酶互补试验 (luciferase complementation assay, LCA)。

1.1.2 主要试剂 植物总 RNA 提取试剂盒购自聚合美生物科技有限公司; 反转录试剂盒购自莫纳生物科技有限公司; LA Taq[®] 高保真酶购自 TaKaRa 公司; 质粒 DNA 提取试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒购自 OMEGA 生物试剂公司; X- α -Gal 酵母显色底物和 D-虫荧光素钾盐购自北京索莱

宝科技有限公司; 限制性核酸内切酶 (*EcoR* I、*Sal* I、*Bam*H I) 购自赛默飞公司; 酵母缺陷培养基购自北京酷来搏科技有限公司; 2X Rapid Tap Master Mix 酶购自 Vazyme 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) 合成和测序服务由北京擎科生物技术有限公司提供。

1.1.3 载体和菌株 pGBKT7、pGADT7、pGBKT7-*Lam*、pGBKT7-p53、pGADT7-*T*、pNC-BiFC-Ecc、pNC-BiFC-Enc、pCAMBIA1300-cLuc 和 pCAMBIA1300-nLuc 均由本实验室保存; AH109 酵母感受态、大肠杆菌感受态 DH5 α 、根癌农杆菌感受态 GV3101(pSoup-p19) 购自上海维地生物技术有限公司。

表 1 引物信息
Tab. 1 Primer information

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Purpose
MeGBSSI	F:ATGGCAACTGTAATAGCTGCACA R:TCAAGGCGTGGGAACGTTCT	基因克隆
MeSSV	F:ATGCTGATCATGGAGAGTGC R:TCAGGATCTCACCTGATCG	
pGBKT7-MeGBSSI	F:TGGCCATGGAGGCCGAATTCATGGCAACTGTAATAGCTGCACA R:TGCGGCCGCTGCAGGTCGACTCAAGGCGTGGGAACGTTCT	载体构建
pGADT7-MeSSV	F:CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGCTGATCATGGAGAGTGC R:AGCTCGAGCTCGATGGATCCTCAGGATCTCACCTGATCG	
BiFC-MeGBSSI	F:AGTGGTCTCTGTCCAGTCCTATGGCAACTGTAATAGCTGCACA R:GGTCTCAGCAGACCACAAGTAGGCGTGGGAACGTTCTCCTTAG	
BiFC-MeSSV	F:AGTGGTCTCTGTCCAGTCCTATGCTGATCATGGAGAGTGC R:GGTCTCAGCAGACCACAAGTGGATCTCACCTGATCGAGT	
1300-cLuc-MeGBSSI	F:CGGGGCGGTACCCGGGATCCATGGCAACTGTAATAGCTGCACA R:CGAAAGCTCTGCAGGTCGACAGGCGTGGGAACGTTCTCCT	
1300-nLuc-MeSSV	F:GAGCTCGGTACCCGGGATCCATGCTGATCATGGAGAGTGC R:GCGTACGAGATCTGGTCGACGGATCTCACCTGATCGAGT	
pGBKT7 检测	F:GTGCGACATCATCATCGGAAG R:TAAGAGTCACTTTAAATTTGTATAC	载体检测
pGADT7 检测	F:AATACCACTACAATGGATGATG R:GAGATGGTGCACGATGCACAGT	
ProF	GCATTCTACTTCTATTGCAGC	
CR	GTCGCCGATGGGGGTGTTCT	
PEGFP-N3	GTCGCCGTCCAGCTCGACCAG	
1300-cLuc 检测	F:TTACCGGAAAACTCGACGCA R:TAGGATTCTGGTGTGTGCGC	
1300-nLuc 检测	F:CACTATCCTTCGCAAGACCCT R:TGTCCACCTCGATATGTGCAT	

1.2 方法

1.2.1 *MeGBSSI* 基因的克隆及诱饵载体构建 以 SC8 木薯品种组培苗作为材料, 提取总 RNA, 反转录获得 cDNA。利用 phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) 数据库查找 *MeGBSSI* (Manes.02G001000) 序列, 根据序列设计扩增引物 (表 1), 克隆 *MeGBSSI* 基因。PCR 反应体系 (50 μ L) 为: LA Taq 0.5 μ L, 10 $\times$ LA PCR Buffer 5 μ L, dNTP Mixture 8 μ L, 上下游引物各 1 μ L, 模板 1 μ L, 加 ddH₂O 补至 50 μ L。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min 15 s; 72 $^{\circ}$ C 最终延伸 5 min。PCR 产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测目的条带。将片段与载体 pGBKT7 (*Eco*R I 和 *Sal* I) 纯化, 使用同源重组试剂盒连接并转化 DH5 α 大肠杆菌感受态, 选取阳性菌株送至北京擎科生物技术有限公司进行 Sanger 测序。

1.2.2 *MeSSV* 基因的克隆及猎物载体构建 利用 phytozome 网站查找 *MeSSV* 序列并设计其扩增引物 (表 1)。使用 TaKaRa 公司 LA Taq[®] 高保真酶, 从 SC8 木薯中 PCR 扩增 *MeSSV* 的编码区片段。将纯化后的目的片段和 pGADT7 (*Eco*R I 和 *Bam*H I) 连接。挑取阳性单克隆进行鉴定, 并送至北京擎科生物技术有限公司进行 Sanger 测序。

1.2.3 毒性检测和自激活检测 将 pGBKT7-*MeGBSSI* 与 pGBKT7 空载 (对照) 分别转染到 AH109 酵母感受态细胞中, 梯度稀释, 点板于 SD/-Trp 培养基, 检测诱饵蛋白毒性。将 pGBKT7-*MeGBSSI* 诱饵载体与 pGADT7 空载 (对照) 共转染 AH109 酵母感受态细胞, 点板于 SD/-Trp-Leu、SD/-Trp-Leu-His-Ade 和 SD/-Trp-Leu-His-Ade+X- α -Gal 培养基, 检测诱饵蛋白自激活活性。自激活检测阳性对照是 pGBKT7-p53+pGADT7-T, 阴性对照是 pGBKT7-*Lam*+pGADT7-T, 实验组合是 pGBKT7-*MeGBSSI*+pGADT7。培养条件: 在 28 $^{\circ}$ C 倒置培养 2~3 d, 观察酵母菌落的生长情况。

1.2.4 酵母双杂交的点对点验证 将诱饵载体 pGBKT7-*MeGBSSI* 和 pGADT7-*MeSSV* 猎物载体共转化 AH109 酵母感受态细胞。点板在 SD/-Trp-Leu、SD/-Trp-Leu-His-Ade 和 SD/-Trp-Leu-His-Ade+X- α -Gal 培养基上, 28 $^{\circ}$ C 倒置培养 2~3 d, 观察酵母菌落的生长情况。点对点验证的阳性对照是 pGBKT7-p53+pGADT7-T, 阴性对照是 pGBKT7-*Lam*+pGADT7-T, 实验组合是 pGBKT7-

MeGBSSI+pGADT7-*MeSSV*。

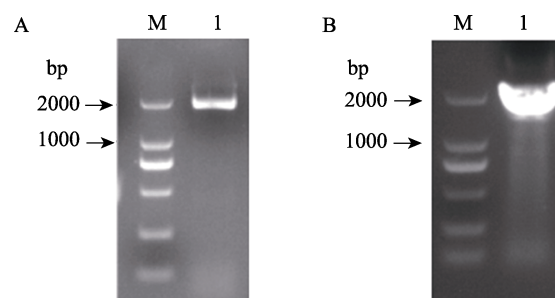
1.2.5 双分子荧光互补验证 (BiFC) 采用 BiFC 技术验证 *MeGBSSI* 和 *MeSSV* 的互作关系, 利用 Nimble Cloning 技术将 *MeGBSSI* 和 *MeSSV* 的片段分别与 pNC-BiFC-Ecc 和 pNC-BiFC-Enc 载体连接, 形成融合表达载体。将载体转入 GV3101 (pSoup-p19) 农杆菌, 混合注射烟草叶片, 培养 48 h 后, 使用激光共聚焦显微镜观察荧光信号。

1.2.6 萤火虫荧光素酶互补 (LCA) 验证 采用 LCA 技术进一步研究 *MeGBSSI* 和 *MeSSV* 的互作关系。通过同源重组技术, 分别将 *MeGBSSI* 和 *MeSSV* 的片段与 pCAMBIA1300-cLuc 和 pCAMBIA1300-nLuc 载体连接。选用 GV3101 (pSoup-p19) 感受态细胞, 将测序正确的重组载体转入农杆菌中, 经混合处理后注射烟草叶片, 培养 48 h 后, 在烟草叶片注射的区域喷 150 μ g/mL D-虫荧光素钾盐溶液, 使用植物活体成像仪观察叶片发光情况。

2 结果与分析

2.1 *MeGBSSI* 基因的克隆及 pGBKT7-*MeGBSSI* 载体构建

以 SC8 木薯 cDNA 为模板扩增 *MeGBSSI* 的编码区, 目的条带符合预期的编码区 (1827 bp) 长度 (图 1A)。将 *MeGBSSI* 基因片段与线性化 pGBKT7 空载纯化, 使用同源重组试剂盒进行连接, 挑取单克隆进行菌液 PCR 鉴定 (图 1B), 将阳性菌株进行 Sanger 测序。结果显示, phytozome 数据库中的木薯品种 AM560 的 *MeGBSSI* 序列与 SC8 木薯品种有 8 个碱基的差异: 第 26 个碱基



A: *MeGBSSI* 基因克隆; B: pGBKT7-*MeGBSSI* 大肠菌液 PCR; M: DL2000 DNA marker。

A: Cloning of the *MeGBSSI* gene; B: PCR of pGBKT7-*MeGBSSI* in *Escherichia coli* lysate; M: DL2000 DNA marker.

图 1 木薯 *MeGBSSI* 基因克隆及诱饵载体构建

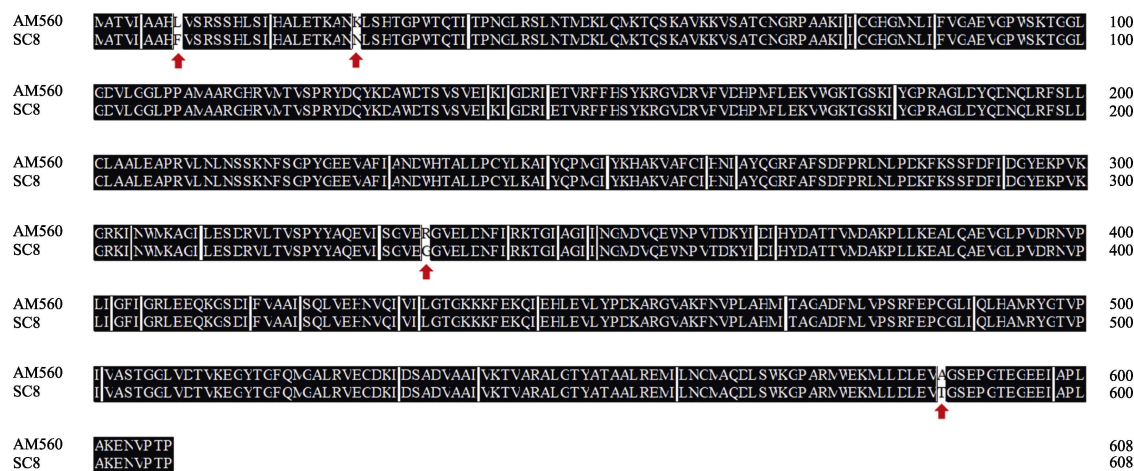
Fig. 1 Cloning of *MeGBSSI* gene from cassava and construction of bait vector

A→C, 第 80 个碱基 G→T, 第 179 个碱基 A→T, 第 999 个碱基 A→G, 第 1196 个碱基 T→C, 第 1269 个碱基 T→C, 第 1241 个碱基 A→C, 第 1755 个碱基 G→A。氨基酸序列比对结果显示, 有 4 个氨基酸发生替换: 第 9 个氨基酸 L→F, 第 27 个氨基酸 K→N, 第 334 个氨基酸 R→G, 第 586 个氨基酸 A→T (图 2)。

2.2 MeSSV 基因的克隆及 pGADT7-MeSSV 载体构建

以 SC8 木薯 cDNA 为模板扩增 MeSSV (Manes.02G082800) 的编码区, 目的条带符合预

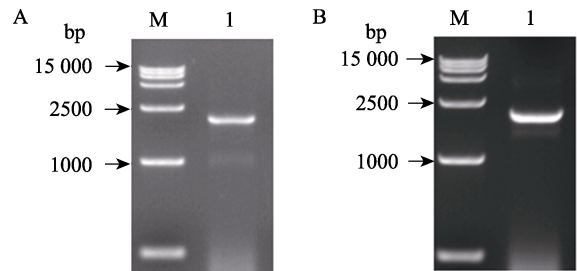
期的编码区 (1827 bp) 长度 (图 3A)。将 MeSSV 基因片段与线性化 pGADT7 空载纯化, 使用同源重组试剂盒进行连接, 挑取单克隆进行菌液 PCR 鉴定 (图 3B), 将阳性菌株进行 Sanger 测序。结果显示, phytozome 数据库上的 AM560 品种 MeSSV 序列与 SC8 的 MeSSV 序列有 4 个碱基的差异: 第 60 个碱基 A→G, 第 130 个碱基 A→C, 第 441 个碱基 G→T, 第 1596 个碱基 T→G。氨基酸序列比对结果显示, 有 2 个氨基酸发生替换: 第 44 个氨基酸 M→L, 第 147 个氨基酸 M→I (图 4)。



箭头表示氨基酸发生替换位置。
The arrows indicate the positions where amino acid substitutions occur.

图 2 MeGBSSI 氨基酸序列对比

Fig. 2 Comparison of MeGBSSI amino acid sequence



A: MeSSV 基因克隆; B: pGADT7-MeSSV 大肠菌液 PCR; M: DL15000 DNA marker。

A: Cloning of the MeSSV gene; B: PCR of pGADT7-MeSSV in Escherichia coli lysate; M: DL15000 DNA marker.

图 3 候选互作蛋白基因克隆及猎物载体构建

Fig. 3 Cloning of candidate interacting protein genes and construction of prey vectors

2.3 MeGBSSI 蛋白的毒性检测与自激活检测

由图 5 可知, 诱饵蛋白 pGBKT7-MeGBSSI 和 pGBKT7 空载蛋白的酵母生长状态大致相同, 表

明诱饵载体已转入 AH109 酵母细胞且对其无毒性。由图 6 可知, pGADT7 空载与 pGBKT7-MeGBSSI 诱饵载体共转酵母菌与阴性对照在 SD/-Trp-Leu 培养基上正常生长, 在 SD/-Trp-Leu-His-Adel、SD/-Trp-Leu-His-Ade+X-α-Gal 培养基上均不能生长, 表明诱饵蛋白无自激活活性。

2.4 酵母双杂交点对点验证

将 pGBKT7-MeGBSSI 诱饵载体与 pGADT7-MeSSV 猎物载体在 AH109 酵母共表达, 发生互作时, 会激活报告基因的表达。由图 7 可知, pGBKT7-MeGBSSI+pGADT7-MeSSV 在 SD/-Trp-Leu、SD/-Trp-Leu-His-Ade 培养基中正常生长, 且在 SD/-Trp-Leu-His-Ade+X-α-Gal 培养基上变蓝, 与阳性对照 pGBKT7-p53+pGBADT7-T 的生长状况大致相同。结果表明 MeGBSSI 与 MeSSV 蛋白在酵母中发生互作。

AM560	MLI NESALVGKFCPCCFHSRKGLRKRKGNATHLFSSEFN LLSSSTHPSVQAGALKRESSACFVTKELVWPSPDDEI PFWKRDFFSVLASSEVPTD	100
SC8	MLI NESALVGKFCPCCFHSRKGLRKRKGNATHLFSSEFN LLSSSTHPSVQAGALKRESSACFVTKELVWPSPDDEI PFWKRDFFSVLASSEVPTD	100
AM560	I VKESNLLHI VHVTAEVAPI AKVGCLGCVVTGLARACLLRGHTVDI LPFFYECI QKQCI SDLALI TVYNSYHDCNVI PTNAHRGVVSGI PVI F EPSNEF	200
SC8	I VKESNLLHI VHVTAEVAPI AKVGCLGCVVTGLARACLLRGHTVDI LPFFYECI QKQCI SDLALI TVYNSYHDCNVI PTNAHRGVVSGI PVI F EPSNEF	200
AM560	FKGCHVYCGSYNEL EAYLFFSRACLEWQVSGI CPDI FVHEWCTGALPLLFVEMCYLSLKKPRVI LTI ENMEHYGECRQECLSKCGLDCSVYATI DKA	300
SC8	FKGCHVYCGSYNEL EAYLFFSRACLEWQVSGI CPDI FVHEWCTGALPLLFVEMCYLSLKKPRVI LTI ENMEHYGECRQECLSKCGLDCSVYATI DKA	300
AM560	LDRTI GENPERLSLLKGGI VYSNAVVTVSPTYLKETLCSRVLASTLI AHRDKYFGI LNGI DTAMVNPATDVFLPAKFSCQNI EGKKLCKHYVQRGLGLA	400
SC8	LDRTI GENPERLSLLKGGI VYSNAVVTVSPTYLKETLCSRVLASTLI AHRDKYFGI LNGI DTAMVNPATDVFLPAKFSCQNI EGKKLCKHYVQRGLGLA	400
AM560	SEGI SCNNVPTMLKVPLVCI SRLVPQKGLHL THAI KYI EELGGCM VLGKASCSRFEGEFKHLAELFNHGPSI RI LLAYSEELSHMLYAADNVLV	500
SC8	SEGI SCNNVPTMLKVPLVCI SRLVPQKGLHL THAI KYI EELGGCM VLGKASCSRFEGEFKHLAELFNHGPSI RI LLAYSEELSHMLYAADNVLV	500
AM560	PSI YEP CGLSQLI GARYGAI PVVRKTGGLAETVFDMDQSNCEI ANGFI FEGVDEGSLNVALDRAFAYYREKPDENVSTVQKVI E CNSVKNKTAGEYIKI	600
SC8	PSI YEP CGLSQLI GARYGAI PVVRKTGGLAETVFDMDQSNCEI ANGFI FEGVDEGSLNVALDRAFAYYREKPDENVSTVQKVI E CNSVKNKTAGEYIKI	600
AM560	YCSI RVRS	608
SC8	YCSI RVRS	608

箭头表示氨基酸发生替换位置。
The arrows indicate the positions where amino acid substitutions occur.

图 4 MeSSV 氨基酸序列比对

Fig. 4 Comparison of MeSSV amino acid sequence

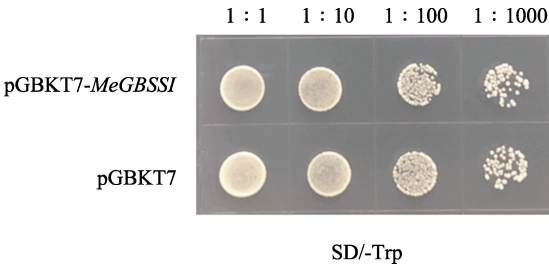


图 5 MeGBSSI 蛋白的毒性检测
Fig. 5 Toxicity test of MeGBSSI protein

2.5 双分子荧光互补验证 MeGBSSI 和 MeSSV 蛋白互作

本研究构建了 MeGBSSI-cEYFP 和 MeSSV-nEYFP 载体, 利用双分子荧光互补技术, 进一步验证 MeGBSSI 蛋白和 MeSSV 蛋白在植物体内的互作关系。由图 8 可知, MeGBSSI-cEYFP+MeSSV-nEYFP 实验组合中存在黄色荧光信号, 对照组合 (MeGBSSI-cEYFP+nEYFP, MeSSV-

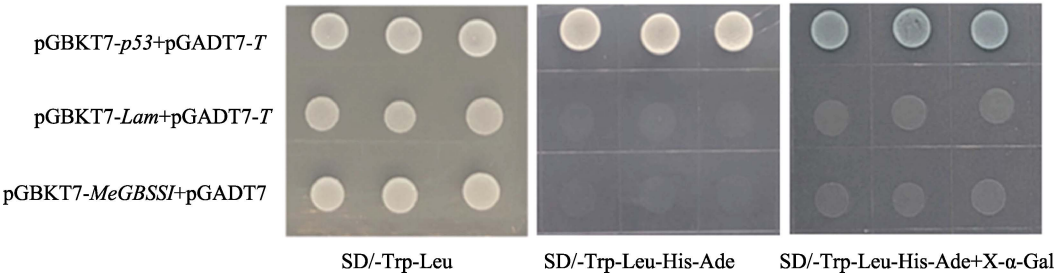


图 6 MeGBSSI 蛋白的自激活检测
Fig. 6 Detection of self-activation of MeGBSSI protein

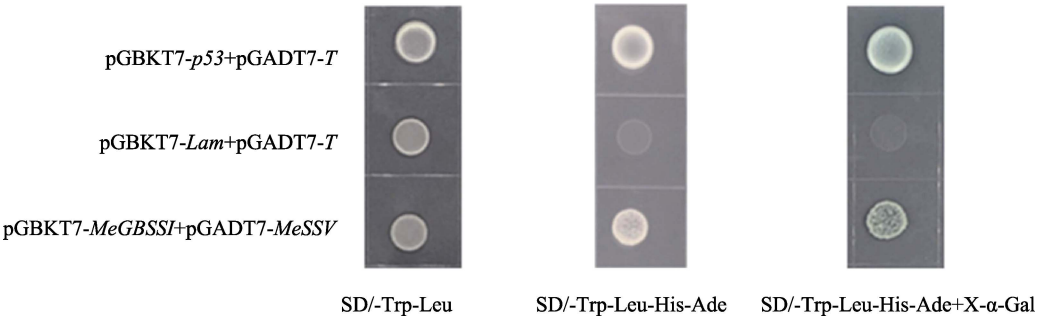


图 7 酵母双杂交点对点验证
Fig. 7 Yeast two-hybrid point-to-point validation

nEYFP+cEYFP, cEYFP+nEYFP) 中无荧光信号。结果表明 MeGBSSI 蛋白和 MeSSV 蛋白在植物体内存在互作关系, 且互作信号定位于叶绿体。

2.6 萤火虫荧光素酶互补验证 MeGBSSI 和 MeSSV 蛋白互作

本研究构建了 1300-cLuc-MeGBSSI 和 1300-nLuc-MeSSV 载体, 采用萤火虫荧光素酶互补技术, 进一步验证 MeGBSSI 和 MeSSV 蛋白互作的关系。将重组载体 1300-cLuc-MeGBSSI、1300-nLuc-MeSSV 与空载 1300-cLuc、1300-nLuc 分别转化农杆菌, 使用植物活体成像仪观察。在

1300-cLuc-MeGBSSI+1300-nLuc-MeSSV 实验组合中观察到明显的化学发光信号。在对照组 (1300-cLuc-MeGBSSI+1300-nLuc, 1300-nLuc-MeSSV+1300-cLuc, 1300-cLuc+1300-nLuc) 中未观察到化学发光信号 (图 9), 进一步验证 MeGBSSI 蛋白和 MeSSV 蛋白存在互作关系。

3 讨论

淀粉的合成是一个高度协调的生物过程, 受到多种淀粉合成酶的精细调控^[19]。其中, 颗粒结合型淀粉合成酶 GBSSI 是直链淀粉合成的关键限

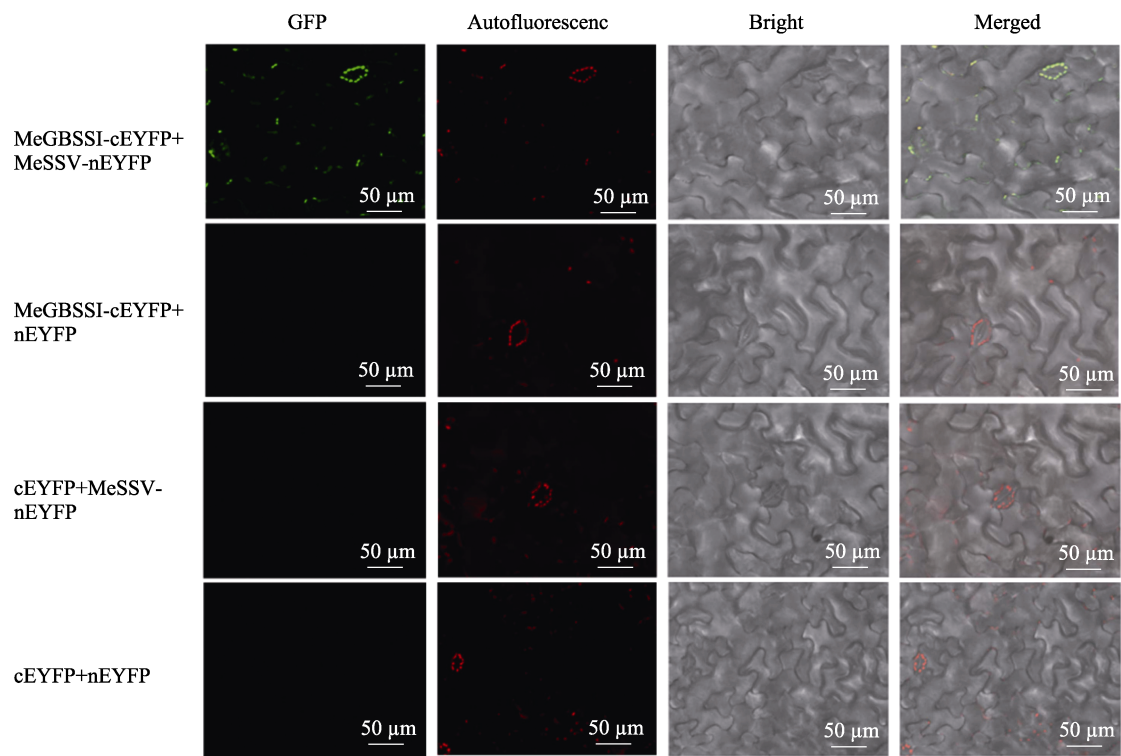


图 8 BiFC 验证 MeGBSSI 和 MeSSV 蛋白互作

Fig. 8 BiFC verification of interaction between MeGBSSI and MeSSV proteins

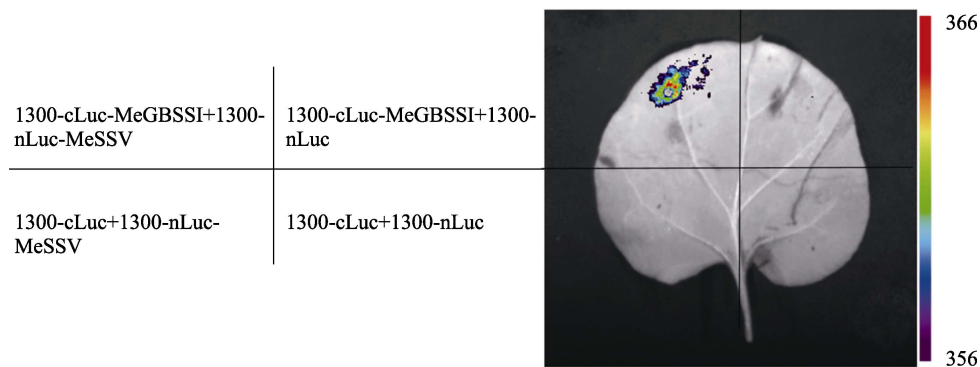


图 9 LCA 验证 MeGBSSI 和 MeSSV 蛋白互作

Fig. 9 LCA verification of interaction between MeGBSSI and MeSSV proteins

速酶。在苦荞麦胚乳中, *GBSSI* 基因的表达模式与直链淀粉含量呈显著正相关, 其在灌浆初期的表达量较高, 与直链淀粉积累的相关系数达到极显著水平^[20]。在水稻中, *Wx* 基因编码的 *GBSSI* 催化直链淀粉的合成, 不同的 *Wx* 等位基因通过影响 *GBSSI* 的活性及其结构域特性, 从而调控直链淀粉含量差异, 进而决定稻米的蒸煮特性与食味品质^[21]。此外, *OsLESV* 和 *OsESV1* 蛋白可与 *GBSSI*、*GBSSII* 等关键酶形成复合体, 促进这些酶从叶绿体基质正确定位至淀粉颗粒表面, 进而提高叶片瞬时淀粉与胚乳储藏淀粉的合成效率, 对稻米品质与产量具有重要影响^[22]。在谷物胚乳中, 淀粉合成不仅依赖于多种关键酶 (如 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶 *AGPase*、淀粉合成酶 *SS*、淀粉分支酶 *SBE* 等), 还需要一些非酶蛋白 (如 *PTST*) 的协同作用^[23]。这些组分往往通过形成异源或同源多聚体, 实现对淀粉合成不同阶段的精确调控。水稻的研究表明, *SSI*、*SSIIa* 与 *BEIIb* 等酶相互作用形成复合体, 依次负责支链淀粉短侧链的生成与延长^[24]。玉米的研究发现, 淀粉合成酶复合体的组装与功能活性受到蛋白质磷酸化的精密调控, 表明淀粉合成酶协同作用的动态调节机制^[25]。因此, 可以推测 *MeGBSSI* 与 *MeSSV* 通过互作是木薯淀粉酶复合体的重要部分, 共同影响淀粉的合成。

在木薯中已有研究表明, *MeGBSSI* 可与 *MeSSI*、*MeISAI* 形成蛋白互作网络, 且 *MeGBSSI* 还能够发生自互作^[26]。本研究进一步通过酵母双杂交、LCA 和 BiFC 技术验证了 *MeSSV* 与 *MeGBSSI* 之间存在稳定的蛋白互作关系。这些结果表明, 木薯直链淀粉合成过程中多种淀粉合成相关酶可组装成多酶复合体 (multi-enzyme complex), 协同参与淀粉链的延伸与颗粒结构的构建, 从而为木薯直链淀粉高效合成提供分子基础。此外, 本研究发现我国主栽品种 SC8 与 AM560 (参考基因组品种) 的 *MeSSV* 与 *MeGBSSI* 基因中均存在多个 SNP 变异位点, 推测这些遗传变异可能导致蛋白结构差异, 进而影响酶间互作强度与淀粉合成效率。AIEMNAKA 等^[27]报道在自然突变型糯性木薯中, *MeGBSSI* 序列突变使 *GBSSI* 活性完全丧失, 导致直链淀粉合成受阻; 而 POOTAKHAM 等^[28]在 *MeSSV* 中鉴定的 Met147→Ile 突变则可能影响淀粉颗粒结构与糊化特性。未来可进一步研究 *MeGBSSI*-*MeSSV* 复合体的结构特征与调控机

制, 深入探索不同遗传变异对酶复合体稳定性及功能的影响, 为木薯淀粉品质改良提供新的分子依据。

参考文献

- [1] OTEKUNRIN A O. Cassava (*Manihot esculenta* Crantz): a global scientific footprint—production, trade, and bibliometric insights[J]. *Discover Agriculture*, 2024, 2(1): 94.
- [2] MUBANGA S C, SEYOUM T W, GEREMEW B, ADEGBEMIRO B A. Progress in research and applications of cassava flour and starch: a review[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, 56(6): 2799-2813.
- [3] COELHO E, BALLESTEROS F L, DOMINGUES L, VILANOVA M, TEIXEIRA A J. Production of a distilled spirit using cassava flour as raw material: chemical characterization and sensory profile[J]. *Molecules*, 2020, 25(14): 3228.
- [4] WANG Y, OU X, MAQTARI A A Q, HE H J, OTHMAN N. Evaluation of amylose content: structural and functional properties, analytical techniques, and future prospects[J]. *Food Chemistry: X*, 2024, 24: 101830.
- [5] CHEN Z G, ZHONG H X, CHEN M, GONG F Y, LI J. The fine structure of starch: a review[J]. *Npj Science of Food*, 2025, 9(1): 50.
- [6] HUANG K Y, LU F F, CHEN P F, JIAO G A, LIN H Y, ZHANG J, ZHAO S L, CAO R J, SHAO G N, SHENG Z H, HU S K, TANG S Q, HU P S, WEI X J. A large-scale gene regulatory network for rice endosperm starch biosynthesis and its application in genetic improvement of rice quality[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2025, 23(7): 2583-2594.
- [7] HUNT H V, MOOTS H M, GRAYBOSCH R A, JONES H, PARKER M, ROMANOVA O, JONES M K, HOWE C J, TRAFFORD K. Waxy phenotype evolution in the allotetraploid cereal broomcorn millet: mutations at the *GBSSI* locus in their functional and phylogenetic context[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(1): 109-122.
- [8] BULL E S, SEUNG D, CHANEZ C, MEHTA D, KUON J E, TRUERNIT E, HOCHMUTH A, ZURKIRCHEN I, ZEE-MAN S C, GRUISSEM W, VANDERSCHUREN H. Accelerated ex situ breeding of *GBSS*- and *PTST1*-edited cassava for modified starch[J]. *Science Advances*, 2018, 4(9): 6086.
- [9] RAEMAKERS K, SCHREUDER M, SUURS L, FURRER-VERHORST H, VINCKEN J P, VETTEN N, JACOBSEN E, VISSER R G F. Improved cassava starch by antisense inhibition of granule-bound starch synthase I[J]. *Molecular Breeding*, 2005, 16(2): 163-172.
- [10] VASCONCELOS L M, BRITO A C, CARMO C D, OLIVEIRA E J. Polymorphism of starch pathway genes in cas-

- sava[J]. Genetics and Molecular Research, 2016, 15(4): 1-12.
- [11] YANG Z F, WANG Y F, XU S H, XU C W, YAN C J. Molecular evolution and functional divergence of soluble starch synthase genes in cassava (*Manihot esculenta* Crantz)[J]. Evolutionary Bioinformatics, 2013, 9: 239-249.
- [12] TETLOW I, EMES M. Starch biosynthesis in the developing endosperms of grasses and cereals[J]. Agronomy, 2017, 7(4): 81.
- [13] SAITHONG T, RONGSIRIKUL O, KALAPANULAK S, CHIEWCHANKASET P, SIRIWAT W, NETRPHAN S, SUKSANGPANOMRUNG M, MEECHAI A, CHEEVADHANARAK S. Starch biosynthesis in cassava: a genome-based pathway reconstruction and its exploitation in data integration[J]. BMC Systems Biology, 2013, 7(1): 75.
- [14] WANG Z B, LI W H, QI J C, SHI P C, YIN Y A. Starch accumulation, activities of key enzyme and gene expression in starch synthesis of wheat endosperm with different starch contents[J]. Journal of Food Science and Technology, 2014, 51(3): 419-429.
- [15] ZHANG J J, HU F Y, HUANG B Y. Relationship between activities of key enzymes involved in starch synthesis and accumulation in maize inbred lines during grain filling[J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2008, 55(2): 249-255.
- [16] ZHANG L, LI N, ZHANG J, ZHAO L L, QIU J J, WEI C X. The CBM48 domain-containing protein FLO6 regulates starch synthesis by interacting with SSIVb and GBSS in rice[J]. Plant Molecular Biology, 2022, 108(2): 343-361.
- [17] HUANG K Y, CHEN L, JIAO G A, RUAN Z Y, LI X W, TANG S Q, HU P S, WEI X J. OsMYBR1, a 1R-MYB family transcription factor regulates starch biosynthesis in rice endosperm[J]. Life, 2025, 15(6): 962.
- [18] KAO-CHIH S, KUSANO H, KOIZUMI K, YAMAKAWA H, HAKATA M, IMAMURA T, FUKUDA M, NAITO N, TSURUMAKI Y, YANESHIMA M, TSUGE T, MATSUMOTO K, KUDOH M, ITOH E, KIKUCHI S, KISHIMOTO N, YAZAKI J, ANDO T, YANO M, AOYAMA T, SASAKI T, SATOH H, SHIMADA H. A novel factor floury endosperm2 is involved in regulation of rice grain size and starch quality[J]. The Plant Cell, 2010, 22(10): 3280-3294.
- [19] YU G W, GAOYANG Y Z, LIU L, SHOAIB N, DENG Y W, ZHANG N, LI Y P, HUANG Y B. The structure, function, and regulation of starch synthesis enzymes SSIII with emphasis on maize[J]. Agronomy, 2022, 12(6): 1359.
- [20] 黎媛, 张贤聪, 王涛, 王安虎, 王迅. 苦荞胚乳 GBSSI 基因表达模式及胚乳淀粉含量分析[J]. 分子植物育种, 2018, 16(11): 3509-3517.
- LI Y, ZHANG X C, WANG T, WANG A H, WANG X. Analysis of expression pattern of GBSSI gene and starch content in endosperm of *Fagopyrum tataricum*[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(11): 3509-3517. (in Chinese)
- [21] LIN L S, LI Z, NING M Y, ZOU Z H, ZHANG L, LIU Q Q, WEI C X. A mutant allele of the Wx gene encoding granule-bound starch synthase I results in extremely low amylose content in rice[J]. Plant Physiology, 2024, 196(4): 2296-2299.
- [22] DONG N N, JIAO G A, CAO R J, LI S F, ZHAO S L, DUAN Y Q, MA L Y, LI X W, LU F F, WANG H, WANG S W, SHAO G N, SHENG Z H, HU S K, TANG S Q, WEI X J, HU P S. OsLESV and OsESV1 promote transitory and storage starch biosynthesis to determine rice grain quality and yield[J]. Plant Communications, 2024, 5(7): 100893.
- [23] HUANG L C, TAN H Y, ZHANG C Q, LI Q F, LIU Q Q. Starch biosynthesis in cereal endosperms: an updated review over the last decade[J]. Plant Communications, 2021, 2(5): 100237.
- [24] CROFTS N, IIZUKA Y, ABE N, MIURA S, KIKUCHI K, MATSUSHIMA R, FUJITA N. Rice mutants lacking starch synthase I or branching enzyme IIb activity altered starch biosynthetic protein complexes[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 1817.
- [25] SAHAR M, USHA M, TETLOW I J, LIU F, EMES M J. Protein phosphorylation regulates maize endosperm starch synthase IIa activity and protein-protein interactions[J]. The Plant Journal, 2020, 105(4): 1098-1112.
- [26] HE S T, HAO X M, WANG S S, ZHOU W Z, MA Q X, LU X L, CHEN L N, ZHANG P. Starch synthase II plays a crucial role in starch biosynthesis and the formation of multienzyme complexes in cassava storage roots[J]. Journal of Experimental Botany, 2022, 73(8): 2540-2557.
- [27] AIEMNAKA P, WONGKAEW A, CHANTHAWORN J, NAGASHIMA S K, BOONMA S, AUTHAPUN J, JENWEERAWAT S, KONGSILA P, KITTIPADAKUL P, NAKASATHIEN S, SREEWONGCHAI T, WANNARAT W, VICHUKIT V, BECERRA LÓPEZ-LAVALLE L A, CEBALLOS H, ROJANARIDPICHE C, PHUMICHA C. Molecular characterization of a spontaneous waxy starch mutation in cassava[J]. Crop Science, 2012, 52(5): 2121-2130.
- [28] POOTAKHAM W, SHEARMAN J R, RUANG-AREERATE P, JOMCHAI N, SATHITKOWIT P, UKOSKIT K, TRAGOONRUNG S, VANAVICHIT A, TANGPHATSORNURANG S. Single nucleotide polymorphism in the gene encoding granule-bound starch synthase I (GBSS I) as a diagnostic marker for rice grain quality[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2015, 128(1): 183-197.