生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):77-87

燕麦盐碱响应基因*AsGolS2*的克隆及互作蛋白的筛选

孙金梁 李星岩 张碧茹 米俊珍* 刘景辉*
（内蒙古农业大学农学院 内蒙古高校燕麦工程研究中心，呼和浩特 010018）

摘 要：【目的】探究燕麦（*Avena Sativa* L.）*AsGolS2*在盐碱胁迫响应中的功能，为阐明其介导的分子调控机制提供依据。【方法】从6个燕麦品种中克隆*AsGolS2*，并进行序列多态性分析。选取代表性品种定莜2号，克隆*AsGolS2*的全长cDNA序列，并进行生物信息学分析，利用RT-qPCR技术分析其叶片在不同浓度盐碱胁迫下*AsGolS2*的表达变化。以盐碱胁迫处理的定莜2号叶片为材料，构建均一化酵母双杂交cDNA文库，并利用该文库筛选AsGolS2的互作蛋白。【结果】多个品种燕麦的序列比对表明，*AsGolS2*的遗传变异主要存在于非翻译区（UTRs）。该基因CDS全长984 bp，由3个外显子构成，编码327个氨基酸，其编码蛋白具有GT8家族保守结构域，无跨膜结构。二级结构预测结果显示，该蛋白由33.03%的α-螺旋、10.70%的延伸链和56.27%的无规则卷曲构成。系统发育分析发现，燕麦AsGolS2与小麦TaGolS2蛋白的亲缘关系最近。RT-qPCR分析结果表明，*AsGolS2*在叶片中的表达受盐碱胁迫显著诱导，且在不同浓度胁迫下均呈先上升后下降的趋势。通过酵母双杂交筛选获得45个AsGolS2互作候选蛋白，其中，参与代谢过程的蛋白占比最高。【结论】成功克隆了燕麦*AsGolS2*，其在叶片中的表达受盐碱胁迫诱导。筛选出45个AsGolS2互作候选蛋白，其功能涉及代谢、信号转导及蛋白质稳态等多个生物学过程。

关键词：燕麦；*AsGOLS2*；盐碱胁迫；生物信息学；互作蛋白
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1333

Cloning of the Saline-alkali Response Gene *AsGolS2* and Screening of Interacting Proteins in Oat

SUN Jin-liang LI Xing-yan ZHANG Bi-ru MI Jun-zhen* LIU Jing-hui*
（*College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Inner Mongolia Oat Engineering Research Center in Higher Education Institutions, Hohhot* 010018）

Abstract: 【Objective】 To investigate the function of the oat (*Avena sativa* L.) *AsGolS2* in response to saline-alkali stress, thereby providing a basis for elucidating the molecular regulatory mechanisms it mediates. 【Method】 The *AsGolS2* gene was cloned from six oat varieties and subjected to sequence polymorphism analysis. The representative variety 'Dingyou 2' was selected for full-length cDNA cloning of *AsGolS2*, followed by bioinformatics analysis. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was employed to examine the expression variations in the leaves under varying concentrations of saline-alkali stress. Additionally, the leaves of 'Dingyou 2' subjected to saline-alkali stress were used to construct a normalized yeast two-hybrid (Y2H) cDNA library, which was subsequently utilized to screen for interacting proteins of AsGolS2. 【Result】 Sequence alignment of multiple oat varieties indicates that genetic variation in the *AsGolS2* gene primarily resides within the untranslated regions (UTRs). The coding sequence (CDS) of *AsGolS2* is 984 bp in length, comprising three exons and encoding 327 amino acids. The resulting protein possesses a conserved domain characteristic of the GT8 family and lacks transmembrane structures. Predicted results of secondary structure indicate that the encoded protein comprises 33.03% α-helices, 10.70% extended chains, and 56.27% disordered coils. Phylogenetic analysis reveals that oat AsGolS2 shares the closest relationship with the wheat TaGolS2 protein. RT-qPCR analysis demonstrates that the expression of the *AsGolS2* in leaves is significantly induced by saline-alkali stress, exhibiting an initial increase followed by a subsequent

收稿日期：2025-12-07
基金项目：燕麦全产业链科技创新团队项目（BR22-12-05），国家燕麦荞麦产业技术体系项目（CARS-07），燕麦联合攻关项目（YZ2023009），内蒙古自治区燕麦工程实验室能力建设项目（BR221023，BR251025）
*通信作者：米俊珍 imaumjz@aliyun.com，刘景辉 cauljh@163.com

decrease across different stress concentrations. Y2H screening identified 45 candidate interacting proteins for AsGolS2, among which proteins involved in metabolic processes constitute the largest proportion.【Conclusion】The *AsGolS2* gene of oat is successfully cloned, with its expression in leaves induced by saline-alkali stress. The 45 candidate proteins interacting with AsGolS2 are identified. Their functions span multiple biological processes, including metabolism, signal transduction, and protein homeostasis.

Keywords: *Avena sativa* L.; *AsGolS2*; saline-alkali stress; bioinformatics; interacting protein

燕麦（*Avena sativa* L.）是禾本科燕麦属粮饲兼用作物，在全球范围广泛种植[1]，其营养价值丰富，尤其以膳食纤维含量高而备受关注[2]。燕麦对盐碱、贫瘠等土壤逆境具有较强的耐受性，能有效提升盐碱化土地利用率[3-4]，具备改良土壤理化性质的生物潜力，常被用于中低产田的生态修复与可持续利用。因此，深入研究燕麦抗逆性的分子机制，揭示其适应盐碱胁迫的遗传与生理基础，对耐盐碱燕麦新品种的选育及土壤改良实践具有重要的理论指导价值。

植物在响应逆境胁迫时，会激活一系列复杂的生理生化适应机制[5]，其中，渗透调节物质的积累是关键的策略之一[6]。棉子糖系列寡糖（raffinose family oligosaccharides, RFOs）作为一类重要的渗透保护剂和活性氧清除剂，在此过程中发挥着重要作用[7-9]。该家族包含棉子糖、水苏糖、毛蕊花糖等多种寡糖，其中，棉子糖是RFOs生物合成的核心前体与典型代表，其合成通路是理解整个家族代谢调控的关键。棉子糖生物合成的第一步是合成肌醇半乳糖苷，即在肌醇半乳糖苷合成酶（galactinol synthase, GolS）催化下，UDP-半乳糖（UDP-Gal）的半乳糖基被转移至肌醇上，生成肌醇半乳糖苷[10]。GolS是棉子糖合成代谢途径的限速酶，被认为是植物抗逆响应中的重要调节因子，通过介导RFOs积累在植物发育、抗逆及代谢调控中发挥关键作用。为应对复杂的胁迫环境，植物中*GolS*通常以多等位基因的形式存在，不同等位基因在表达上呈现高度的胁迫特异性与功能多样性，共同构成胁迫响应网络，从而介导植物对不同逆境胁迫的特异性耐受。拟南芥*AtGolS1*、*AtGolS2*[11]和马铃薯*StGolS4*[12]在干旱或盐胁迫下诱导表达；拟南芥*AtGolS3*[11]、小麦*TaGolS1*、*TaGolS2*[13]和黄瓜*CsGolS1*[14]响应低温胁迫而上调表达，其中，黄瓜*CsGolS1*通过促进RFOs积累增强韧皮部运输。此外，转基因研究也为*GolS*的功能提供直接证据。例如，过表达黄瓜*CsGolS4*[15]、马铃薯*ScGolS1*[16]均能提升植株耐寒性；过表达拟南芥*AtGolS1*可增强砷胁迫耐受性[17]；过表达小麦*TaGolS3*通过增强抗氧化防御提高锌耐受性[18]。除在非生物胁迫响应中的核心作用，*GolS*还参与植株的生长发育调控。例如，番茄*SlGolS2*、*SlGolS4*参与果实成熟、株高等发育过程的调控[19-20]。*GolS*的表达受多种转录因子调控，这些转录因子通过结合其启动子区的顺式作用元件以激活转录。例如，矮牵牛*PhZFP1*直接结合*PhGolS1-1*启动子[21]、拟南芥*AtHsfA3*结合*AtGolS1*和*AtGolS2*的启动子[22]，激活其转录，从而提高RFOs含量；水稻DOF转录因子*OsRPBF*通过调控*OsGolS*表达以影响种子活力[23]。GolS的功能实现同样依赖于复杂的蛋白互作网络，该网络的特异性及其调控模式对于阐明其生理功能至关重要[24]。例如，在胁迫响应通路中，小麦TaUSP_3B-1与TaGolS发生特异性互作，二者共同调控内质网应激下的活性氧（reactive oxygen species, ROS）稳态，从而增强细胞胁迫耐受性[25]。综上，*GolS*基因家族通过成员功能的胁迫特异性分化以及表达上的复杂转录与翻译后调控，在植物整合信号、合成渗透保护物质以应对多种非生物胁迫的过程中扮演着核心枢纽角色。

前期研究表明，过表达*AsGolS2*显著增强拟南芥对盐碱胁迫的耐受性，且AsGolS2-GFP融合蛋白在拟南芥原生质体中同时定位于细胞核与细胞质[26]。然而，燕麦*AsGolS2*尚未得到系统解析，在盐碱胁迫下的表达调控机制亦不明确。

本研究首先对燕麦*AsGolS2*进行克隆与生物信息学分析，并验证其在盐碱胁迫下的表达变化，利用酵母双杂交技术筛选与AsGolS2蛋白互作的候选蛋白，为深入阐明*AsGolS2*在燕麦盐碱胁迫响应中的分子调控机制提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

供试燕麦品种加燕2号、定莜2号、晋燕17号、

白燕2号、白燕5号和草莜1号，均由内蒙古农业大学燕麦产业研究中心保存与提供。选取均匀饱满的种子，经1% NaClO溶液表面消毒10 min，用超纯水冲洗3–5次，置于铺有两层滤纸的培养皿中。培养条件设定为：温度25 ℃，相对湿度70%，于人工气候箱中培养。本研究所用引物序列详见附表1。

1.2　*方法*

1.2.1　燕麦*AsGolS2*的克隆　以前期盐碱胁迫后的燕麦叶片转录组数据Unigene序列Pepsico1_Contig6168.path1为参考[26]，用Primer Premier 5.0软件设计*AsGolS2*特异性引物，基于燕麦基因组数据库（PepsiCo OT3098 Hexaploid Oat v2 pseudomolecules）验证引物序列，使用BLASTN比对，将显著性阈值设定为E值≤$1e^{-1}$，确保引物3′端不存在连续3个或以上碱基与非靶位点完全匹配。分别以耐盐碱品种白燕2号、定莜2号、加燕2号和盐碱敏感品种白燕5号、草莜1号、晋燕17号生长7 d的幼苗叶片为材料[27]，采用CTAB法提取燕麦基因组DNA。以gDNA为模板，进行PCR扩增，检测、回收，与pEASY T1载体连接，并转化*Trans*1-T1感受态细胞。筛选阳性克隆后进行Sanger测序，以验证插入序列的正确性。

1.2.2　燕麦*AsGolS2*基因cDNA的克隆及生物信息学分析　以定莜2号幼苗叶片为材料，提取总RNA，并反转录成cDNA，进行扩增。具体步骤参考1.2.1。利用在线工具对*AsGolS2*进行生物信息学分析（附表2）。

1.2.3　盐碱胁迫处理下燕麦*AsGolS2*的表达分析　以筛选获得的耐盐碱燕麦品种定莜2号为试验材料。选取均匀饱满的种子，经1% NaClO溶液表面消毒10 min，用超纯水冲洗3–5次，置于铺有两层滤纸的培养皿中，于25 ℃、70%相对湿度的人工气候箱中催芽。待种子萌发后，转移至装有1/2 Hoagland营养液的黑色水培盒中，在光照16 h/黑暗8 h、温度25 ℃/18 ℃的条件下培养至二叶一心期。使用75（Y1）和150（Y2）mmol/L（NaCl∶Na_2SO_4∶$NaHCO_3$∶Na_2CO_3的摩尔比=1∶9∶9∶1）的混合盐碱溶液进行胁迫处理，分别于处理0、6、12、24、72和120 h后采集幼苗叶片样品，液氮速冻后-80 ℃保存。提取不同胁迫时间的燕麦叶片RNA，并反转录为cDNA，用*AsGolS2*的qPCR特异性引物进行RT-qPCR分析，以*AsGAPDH*为内参。具体参考Premix Prp Taq HS Qpcr Kit（ROX Plus）试剂盒说明书，每个样品设置3次生物学重复。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算*AsGolS2*的相对表达水平。

1.2.4　酵母双杂交cDNA文库的构建与质量鉴定　从胁迫72 h的各组燕麦幼苗叶片中分别提取总RNA，并纯化，用1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性，用分光光度计检测其浓度和纯度。进一步将其反转录成单链cDNA，以其为模板通过长片段PCR扩增获得dscDNA。对均一化后的cDNA进行纯化处理，并使用Clontech CHROMA SPIN™+TE-1000 Columns试剂盒进行小片段去除，与pGADT7载体连接，转化至感受态细胞，得到初级cDNA文库。取10 μL初级文库培养液稀释10 000倍，计算初级文库库容。随机挑选24个克隆进行菌落PCR检测文库质量。

1.2.5　PGBKT7-AsGolS2诱饵载体构建及自激活检测　在*AsGolS2*编码区序列两端分别引入*Eco*R I和*Sal* I酶切位点。经双酶切后，将目的片段与pGBKT7载体连接，构建重组载体，转化，筛选阳性克隆，测序，获得正确的诱饵载体pGBKT7-AsGolS2。将pGBKT7-AsGolS2质粒转化Y2HGold酵母感受态细胞，并涂布于SD-T固体培养基，验证其转化能力。将阴性对照pGBKT7-laminC+pGADT7-largeT、阳性对照pGBKT7-p53+pGADT7-largeT、pGBKT7-AsGols2+pGADT7共转至酵母感受态细胞，将转化产物点在缺陷型固体培养基上进行自激活检测。进一步将其点于添加不同浓度3-AT的SD-TLH固体培养基上，观察自主生长情况。

1.2.6　AsGolS2的互作蛋白筛选及回转验证　采用Clontech酵母双杂交系统，将pGBKT7-AsGols2诱饵质粒与pGADT7载体构建的燕麦cDNA文库质粒共转至AH109酵母感受态细胞，并涂布于含0.25 mmol/L 3-AT的SD-TLH的固体培养基上，以pGBKT7-p53+pGADT7-largeT为阳性对照，对筛选平板上长出的克隆进行划线纯化，观察其生长情况。使用特异性引物，通过菌落PCR扩增酵母阳性克隆中捕获的文库质粒插入片段。PCR产物经纯化后测序，所获序列通过与燕麦基因组数据库（PepsiCo OT3098 Hexaploid Oat v2 pseudomolecules）BLAST比对分析，鉴定潜在的互作蛋白编码基因。为确认互作关系，对

所有经序列分析后的候选阳性克隆进行回转验证。

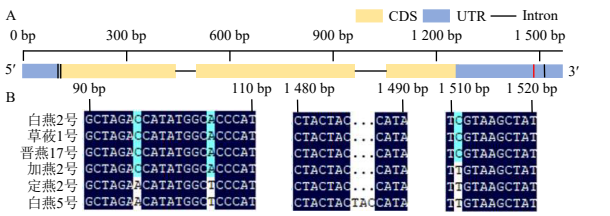
2 结果

2.1 *AsGolS2* 的克隆与分析

通过对6个燕麦品种的叶片gDNA进行扩增，结果显示，所有品种均可扩增出一条约2 000 bp的清晰条带（附图1-A），与预期扩增长度2 394 bp相符。进一步以定莜2号叶片cDNA为模板，使用特异性引物*AsGolS2-F2/R2*进行PCR扩增，获得一条约1 000 bp条带（附图1-B）。经测序，证实其CDS全长为984 bp，与前期转录组数据获得的序列一致。

2.2 *AsGolS2* 的序列多态性分析

为探究*AsGolS2*序列与燕麦盐碱胁迫耐受性之间的遗传变异关系，选取在前期表型鉴定中具有明确对比表型的6个燕麦品种。通过对其进行序列分析，共鉴定出4个变异位点，包括3个单核苷酸变异（SNP）和1个插入缺失（InDel）。其中，仅1个SNP位于编码区，在第1外显子的第6个碱基，密码子为GCA/GCT，对应丙氨酸，未改变氨基酸序列，为同义突变。其余2个变异均位于非翻译区（UTR），分别位于5′-UTR和3′-UTR。此外，白燕5号在3′-UTR第1486位碱基后插入3个碱基（图1-A、B）。



A：多态性位点示意图；黑色竖线代表单核苷酸突变位点，红色竖线代表插入缺失位点；B：A图中所示变异位点的具体列表

A: Schematic diagram of polymorphic sites. Black vertical lines indicate the mutation sites of single nucleotide; red vertical lines indicate insertion-deletion sites. B: Detailed list of the specific variation sites shown in Fig. A

图1 *AsGolS2*的序列多态性分析

Fig. 1 Sequence polymorphism analysis of *AsGolS2*

2.3 *AsGolS2* 的生物信息学分析

通过对燕麦*AsGolS2*上游2 000 bp的启动子区进行分析，结果显示（表1），该启动子区域含有1个脱落酸响应元件、4个光响应元件和2个低温响应元件等。基因结构分析发现，燕麦*AsGolS2*包含5′-UTR、3个外显子、2个内含子和3′-UTR（附图2-A）。理化性质分析表明，该基因编码327个氨基酸，其编码蛋白由20种氨基酸组成，其中，丙氨酸的占比最高（10.7%），分子量为37.04 kD，理论等电点为5.33，脂肪指数为85.9，总平均亲水性值为-0.119，为亲水性蛋白（附图2-E），不稳定系数II为35.95，属于稳定蛋白。二级结构预测显示，该蛋白由33.03%的α-螺旋、10.70%的延伸链和56.27%的无规则卷曲构成（附图2-B）。该蛋白包含一个糖基转移酶（GT8）结构域（附图2-C），无跨膜结构（附图2-D）和信号肽（附图2-G）。磷酸化位点预测发现共有18个潜在位点，其中，丝氨酸2个，苏氨酸6个，酪氨酸10个（附图2-F）。

表1 *AsGolS2*启动子区主要顺式作用元件

Table 1 Major *cis*-acting elements in the *AsGolS2* promoter region

作用元件 Functional element	序列 Sequence	数量 Number	功能 Function
ABRE	CACGTG	1	参与脱落酸响应的顺式作用元件
AAGAA-motif	GAAAGAA	1	功能尚未明确表征
AE-box	AGAAACTT	1	光响应模块的组成部分
ARE	AAACCA	1	对厌氧诱导至关重要的顺式调控元件
CAAT-box	CCAAT	7	启动子和增强子区域中常见的顺式作用元件
G-Box	CACGTG	1	参与光响应的顺式调控元件
LTR	CCGAAA	2	参与低温响应的顺式作用元件
MBS	CAACTG	1	参与干旱诱导的MYB结合位点
MYB	CAACAG	1	MYB转录因子的结合位点
MYC	CATGTG	3	MYC转录因子的结合位点
STRE	AGGGG	2	干旱、盐碱等胁迫响应元件
TCT-motif	TCTTAC	2	光响应元件的一部分
W box	TTGACC	5	WRKY转录因子的结合位点

2.4 AsGolS2蛋白的系统进化分析

为探究燕麦AsGolS2蛋白的进化关系，从NCBI数据库中检索并筛选出8种植物的GolS2蛋白序列，包括短柄草（*Brachypodium distachyon*）、拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）、小麦（*Triticum aestivum*）、大

麦（*Hordeum vulgare*）、水稻（*Oryza sativa*）、玉米（*Zea mays*）、高粱（*Sorghum bicolor*）和大豆（*Glycine max*）。利用MAGA 11软件构建系统进化树，结果显示，燕麦AsGOLS2蛋白与小麦、短柄草的GolS2蛋白聚集在同一进化分支，其中，与小麦TaGolS2蛋白的亲缘关系最近（图2）。

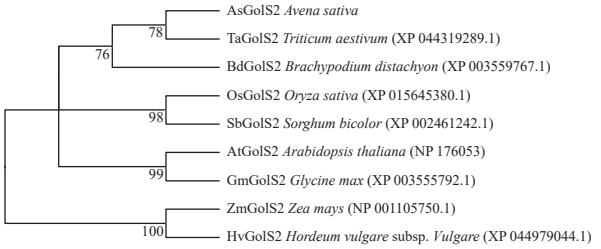
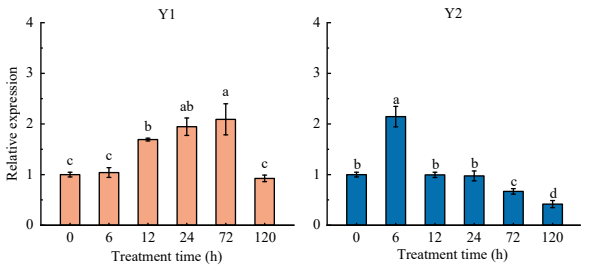


图2　AsGolS2与8种植物蛋白的系统进化树分析

Fig. 2　Phylogenetic tree analysis of AsGolS2 and eight plant proteins

2.5　盐碱胁迫处理后*AsGolS2*的表达水平分析

在不同浓度盐碱胁迫下，*AsGolS2*的表达均呈现先上升后下降的变化规律，但2种处理浓度间的时序特征存在差异。具体而言，Y1胁迫下，*AsGolS2*的表达缓慢持续上升，至72 h达到峰值，随后回落，在120 h恢复至初始水平（与0 h无显著差异）。相比之下，Y2胁迫则引起*AsGolS2*的快速强烈响应，在6 h表达量达到最高，随后迅速下降，至72 h时已显著低于0 h对照水平，并于120 h降至最低（图3）。



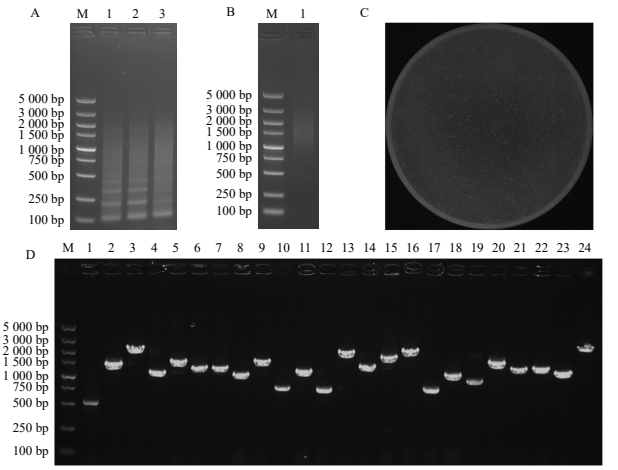
Y1：75 mmol/L. Y2：150 mmol/L. Different lowercase letters mean significant difference at the 0.05 level. The same below

图3　盐碱胁迫下*AsGolS2*基因的表达水平

Fig. 3　Expressions of *AsGolS2* gene in saline-alkali stress

2.6　酵母双杂交互作蛋白的筛选

2.6.1　燕麦酵母双杂交文库的构建　为构建酵母双杂交cDNA文库，以盐碱胁迫72 h的定荾2号叶片为材料提取总RNA，逆转录合成第一链cDNA，进而通过DNA聚合酶合成dscDNA。经琼脂糖凝胶电泳检测，dscDNA呈弥散条带，表明合成质量良好（图4-A）。随后对dscDNA进行均一化与纯化处理，以去除小于500 bp的小片段。电泳检测显示，处理后的dscDNA仍呈弥散条带，且小片段背景已基本消除，说明均一化与纯化成功（图4-B）。将纯化后的dscDNA片段与pGADT7载体连接，转化大肠杆菌。文库库容量测定为1.076×10^8 CFU/mL，总克隆数为2.152×10^8 CFU（图4-C）。随机挑选24个克隆进行菌落PCR鉴定，结果显示，所有克隆均有插入，片段平均长度大于1 000 bp（图4-D）。以上结果表明，所构建的cDNA文库库容量充足、插入片段完整，质量符合后续文库筛选实验要求。



A：dscDNA电泳图；M：Marker DL5 000，1：CK，2：Y1，3：Y2；B：均一化及去除小片段后电泳图；C：文库库容量鉴定；D：文库质量鉴定

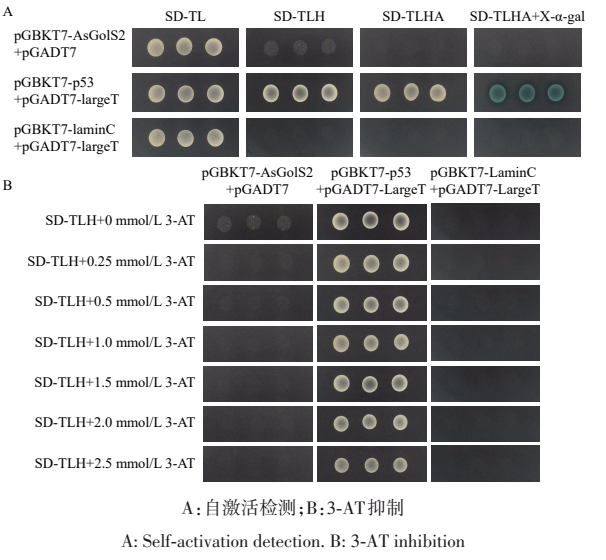
A: Electrophoresis of dscDNA. M: Marker DL5 000. 1: Control (CK); 2: Y1; 3: Y2. B: Electrophoresis after normalization and removal of short fragments. C: Determination of library titer. D: Assessment of library quality

图4　cDNA文库的构建及质量鉴定

Fig. 4　Construction and quality assessment of the cDNA library

2.6.2　诱饵载体pGBKT7-AsGolS2的构建及自激活检测　构建诱饵载体pGBKT7-AsGolS2，经测序证实目的基因序列正确，可进行后续自激活实验。阳性对照组pGBKT7-p53+pGADT7-largeT能在SD-TL、SD-TLH、SD-TLHA、SD-TLHA+X-α-gal平板上生长，并

在SD-TLHA+X-α-gal平板上显蓝色，阴性对照组pGBKT7-laminC+pGADT7-largeT在SD-TL平板上生长，在SD-TLH、SD-TLHA、SD-TLHA+X-α-gal平板上不生长，说明2组对照试验均成功（图5-A）。诱饵表达载体pGBKT7-AsGols2+pGADT7在SD-TL平板上生长，说明pGBKT7-AsGols2质粒成功转入酵母菌株中，在SD-TLHA、SD-TLHA+X-α-gal平板上不生长，在SD-TLH平板上有微弱生长，表明pGBKT7-AsGols2有微弱的自激活活性。将pGBKT7-AsGolS2+pGADT7、阳性对照pGBKT7-p53+pGADT7-LargeT、阴性对照pGBKT7-LaminC+pGADT7-LargeT在不同浓度3-AT的SD-TLH缺陷平板中培养，当3-AT浓度为0.25 mmol/L时为AsGolS2自激活最佳抑制浓度（图5-B）。



A：自激活检测；B：3-AT抑制

A: Self-activation detection. B: 3-AT inhibition

图5 诱饵载体自激活验证及3-AT浓度选择

Fig. 5 Verification of bait vector auto-activation and selection of 3-AT concentration

2.6.3 酵母双杂交筛库及回转验证 为筛选与燕麦AsGolS2蛋白互作的候选蛋白，以pGBKT7-AsGolS2诱饵质粒的AH109酵母菌株为受体，制备感受态细胞后转入燕麦cDNA文库质粒，涂布于SD-TLH+0.25 mmol/L 3-AT筛选平板进行初步筛选，共获得96个候选阳性克隆（图6-A）。提取阳性克隆质粒并测序，将所得序列与燕麦基因组数据库（PepsiCo OT3098 Hexaploid Oat v2 pseudomolecules）进行BLAST比对，去除冗余序列后最终鉴定出45个非重复候选互作蛋白。通过一对一回转验证，结果均为阳性（图6-B）。功能注释表明，这些候选互作蛋白广泛参与代谢、信号转导、蛋白质稳态等多种生物学过程（表2）。KEGG通路富集分析显示，候选互作蛋白显著富集于次生代谢物的生物合成、碳代谢、氨基酸生物合成、糖酵解及卡尔文循环等通路（图7）。

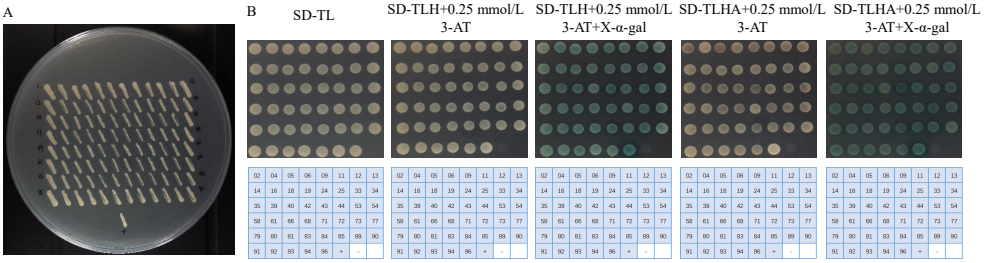


图6 酵母双杂交（A）及回转验证（B）结果

Fig. 6 Yeast two-hybrid (A) and reciprocal verification (B) results

3 讨论

*GolS*基因家族在植物响应干旱、盐碱等多种非生物胁迫中扮演着关键角色[28]。为深入探究其在燕麦耐盐碱中的功能，本研究从燕麦中成功克隆*AsGolS2*，其CDS长度为984 bp，由3个外显子构成。序列分析表明，*AsGolS2*具有参与胁迫响应的分子基础，其遗传变异主要富集于非编码UTR区，尽管这些变异在耐盐碱与盐碱敏感品种之间未呈现绝对区分的分布模式，但UTR区在基因表达调控中的关键作用已被广泛认知[29]。顺式作用元件分析表明，启动子区域中含有丰富的激素、光及环境响应元件，并存在抗逆转录因子的结合位点，为其响应复杂环

表2　AsGolS2候选互作蛋白

Table 2　Candidate interacting proteins of AsGolS2

序号 No.	基因标识符 Gene ID	蛋白名称 Protein name	分子功能 Molecular function
4	AVESA.00001b.r3.7Ag0000572	6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 6-phosphogluconate dehydrogenase	NADP结合；磷酸葡萄糖酸脱氢酶(脱羧)活性
5	AVESA.00001b.r3.1Dg0003031	糖转运蛋白MST4 Sugar transport protein MST4	跨膜转运蛋白活性
9	AVESA.00001b.r3.4Ag0001257	30S核糖体蛋白S13 30S ribosomal protein S13	核糖体结构组成；RNA结合；核酸结合
11	AVESA.00001b.r3.2Cg0002211	S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶原酶 S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme	腺苷甲硫氨酸脱羧酶活性
13	AVESA.00001b.r3.7Cg0001500	丝氨酸羧肽酶样18 Serine carboxypeptidase-like 18	丝氨酸型羧肽酶活性
14	AVESA.00001b.r3.2Dg0003272	未表征的氧化还原酶At1g06690 Uncharacterized oxidoreductase At1g06690	氧化还原酶活性
19	AVESA.00001b.r3.6Cg0000485	蛋白质高叶绿素荧光表型173 Protein HIGH CHLOROPHYLL FLUORESCENCE PHENOTYPE 173	RNA结合；光系统II组装
24	AVESA.00001b.r3.5Dg0001084	喹啉酸合成酶 Quinolinate synthase	[4Fe-4S]簇结合；喹啉酸合成酶A活性
25	AVESA.00001b.r3.5Cg0003292	伴侣蛋白dnaJ GFA2 Chaperone protein dnaJ GFA2	ATP结合；热休克蛋白结合；未折叠蛋白结合
34	AVESA.00001b.r3.3Cg0001710	SUN结构域包含蛋白2 SUN domain-containing protein 2	蛋白质-膜锚定活性
35	AVESA.00001b.r3.6Cg0002056	外膜蛋白80 Outer envelope protein 80	叶绿体组织
39	AVESA.00001b.r3.6Ag0001123	磷酸核酮糖激酶 Phosphoribulokinase	ATP结合；激酶活性；磷酸核酮糖激酶活性
40	AVESA.00001b.r3.1Ag0001739	转录因子VOZ1 Transcription factor VOZ1	序列特异性DNA结合；锌离子结合
42	AVESA.00001b.r3.7Cg0000571	过氧化物酶体(S)-2-羟基酸氧化酶GLO1 Peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase GLO1	氧化还原酶活性；FMN结合
43	AVESA.00001b.r3.5Dg0000088	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶OSK4 Serine/threonine protein kinase OSK4	ATP结合；蛋白激酶活性
44	AVESA.00001b.r3.7Dg0001328	木葡聚糖内转糖基化酶/水解酶蛋白8 Xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase protein 8	水解酶活性；木葡聚糖；木糖基转移酶活性
54	AVESA.00001b.r3.7Dg0002332	可能的α-甘露糖苷酶At5g13980 Probable alpha-mannosidase At5g13980	催化活性；α-甘露糖苷酶活性；碳水化合物结合
61	AVESA.00001b.r3.3Ag0001245	S-腺苷甲硫氨酸合成酶1 S-adenosylmethionine synthase 1	ATP结合；甲硫氨酸腺苷转移酶活性
66	AVESA.00001b.r3.7Ag0001375	C末端加工肽酶3 Carboxyl-terminal-processing peptidase 3	蛋白质结合；丝氨酸型肽酶活性
68	AVESA.00001b.r3.7Cg0002489	晚胚轴富集蛋白 Protein LATE ELONGATED HYPOCOTYL	转录顺式调控区域结合
71	AVESA.00001b.r3.1Dg0002098	蛋白酶Do样1 Protease Do-like 1	丝氨酸型内肽酶活性；蛋白质结合
72	AVESA.00001b.r3.2Dg0003778	12S种子贮藏球蛋白1 12S seed storage globulin 1	营养储存物活性

表2续表 Table 2 continued

序号 No.	基因标识符 Gene ID	蛋白名称 Protein name	分子功能 Molecular function
80	AVESA.00001b.r3.6Ag0000732	甲硫氨酸氨肽酶1D Methionine aminopeptidase 1D	起始甲硫氨酰氨肽酶活性;金属离子结合;金属氨肽酶活性
84	AVESA.00001b.r3.5Cg0000202	肽基-脯氨酰顺反异构酶FKBP16-3 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP16-3	肽基-脯氨酰顺反异构酶活性
85	AVESA.00001b.r3.6Cg0002058	富马酰乙酰乙酰酶 Fumarylacetoacetase	催化活性;延胡索酰乙酰乙酸酶活性
89	AVESA.00001b.r3.6Ag0001269	伴侣蛋白dnaJ A6 Chaperone protein dnaJ A6	蛋白折叠;热休克蛋白结合;未折叠蛋白结合;Hsp70蛋白结合
90	AVESA.00001b.r3.5Dg0002096	硫醇蛋白酶aleurain Thiol protease aleurain	半胱氨酸型内肽酶活性
93	AVESA.00001b.r3.5Dg0002008	聚泛素8 Polyubiquitin 8	蛋白质结合
94	AVESA.00001b.r3.2Dg0002768	肽基-脯氨酰顺反异构酶FKBP20-2 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP20-2	肽基-脯氨酰顺反异构酶活性
96	AVESA.00001b.r3.5Ag0002377	染色质重塑蛋白EBS Chromatin remodeling protein EBS	染色质结合
6, 79, 91	AVESA.00001b.r3.1Dg0002877, AVESA.00001b.r3.4Cg0003529, AVESA.00001b.r3.4Cg0003528	烯醇化酶 Enolase	镁离子结合;磷酸丙酮酸水合酶活性
12, 16	AVESA.00001b.r3.6Ag0000268, AVESA.00001b.r3.2Dg0001159	脂氧合酶2.3 Lipoxygenase 2.3	金属离子结合;氧化还原酶活性
53, 77, 81, 92	AVESA.00001b.r3.6Dg0001185, AVESA.00001b.r3.6Ag0001496, AVESA.00001b.r3.7Dg0001656, AVESA.00001b.r3.6Cg0003509	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NAD结合;NADP结合;氧化还原酶活性
58, 83	AVESA.00001b.r3.6Ag0002227, AVESA.00001b.r3.2Cg0000580	类囊体形成蛋白1 Protein THYLAKOID FORMATION1	光系统II组装
2, 18, 33, 73	AVESA.00001b.r3.2Cg0001041, AVESA.00001b.r3.2Dg0001209, AVESA.00001b.r3.1Cg0001552, AVESA.00001b.r3.Ung0000271	未知蛋白 Unknown protein	

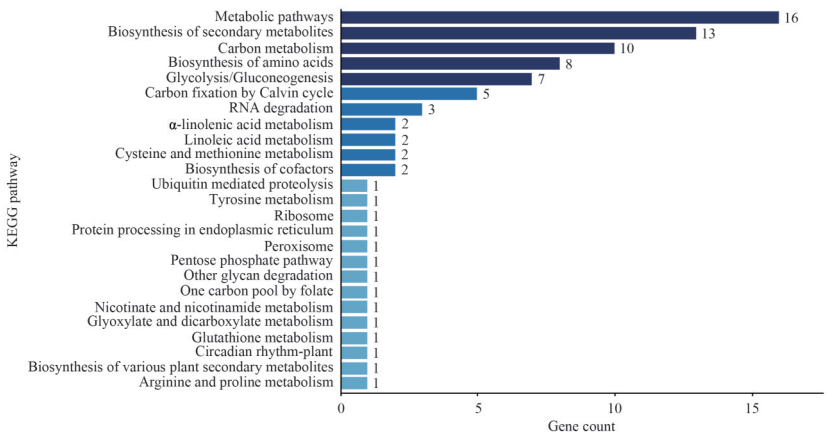


图7 AsGolS2互作蛋白KEGG通路分析

Fig. 7 KEGG pathway analysis of AsGolS2 interacting proteins

境信号提供直接的转录调控基础。系统进化分析显示，AsGolS2与小麦TaGolS2蛋白亲缘关系最近，拟南芥中的同源蛋白AtGolS2参与多种环境胁迫响应[11]，表明AsGolS2蛋白也可能在非生物胁迫中发挥重要功能。这些生物信息学特征，结合该基因在盐碱胁迫下叶片中的显著表达变化，共同揭示*AsGolS2*是燕麦响应盐碱胁迫的一个关键候选基因。

通过酵母双杂交技术筛选出45个燕麦AsGolS2相互作用的候选蛋白。KEGG通路注释分析表明，候选蛋白主要涉及多个代谢通路。其中，碳代谢是候选蛋白注释最集中的通路之一，其作为植物能量供给与渗透调节的核心环节，在胁迫适应中的关键作用已得到广泛研究[30]。上述结果表明，AsGolS2并非独立行使功能，而是通过以碳代谢为核心的多层次互作网络，协调燕麦的盐碱胁迫应答。该互作网络首先调控碳代谢与氧化还原稳态，一方面，甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH）可以与磷酸核酮糖激酶（phosphoribulokinase, PRK）互作[31]，同时，二者可在脚手架蛋白CP12的介导下形成三元复合物，其组装与解离受光照条件动态调节[32]，从而调控卡尔文循环的碳流分配。此外，GAPDH在氧化应激下可发生翻译后修饰，转而参与细胞信号调控[33]。另一方面，6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（6-phosphogluconate dehydrogenase, 6PGD）是磷酸戊糖途径（pentose phosphate pathway, PPP）关键酶，可生成NADPH，为ROS的清除系统提供还原力[34]，研究表明，PGD2的磷酸化使其在细胞质中形成二聚体，暴露C末端过氧化物酶体靶向信号，从而引导其进入过氧化物酶体[35]。而（S）-2-羟基酸氧化酶（GLO1）在过氧化物酶体中参与ROS的生成[36]，二者可能通过互作网络在氧化还原稳态上形成功能关联。这不仅调控碳流，还通过整合氧化还原元件来维持细胞内氧化还原稳态，从而间接保障碳代谢的高效、稳定运行。该互作网络进一步通过关键代谢物整合胁迫信号，例如，S-腺苷甲硫氨酸合成酶（S-adenosylmethionine synthase, SAMS）催化生成的S-腺苷甲硫氨酸（S-adenosylmethionine synthase, SAM）是乙烯和多胺合成的共同前体，而这两种物质在植物胁迫响应中扮演核心角色[37]。研究表明，黄瓜CsSAMS1可与CsCDPK6互作，整合上游的钙信号与下游的多胺和乙烯代谢平衡，从而增强耐盐性[38]。该互作网络的功能稳定性还依赖于其内在的稳态维持机制，例如，DnaJ家族伴侣蛋白可通过调节Hsp70 ATP酶活性参与蛋白质折叠、组装及降解[39]；FKBP家族成员也广泛参与蛋白质折叠、植物胁迫响应等过程[40]。这些蛋白质稳态调控机制共同保障碳通量分配、胁迫信号整合等核心网络功能在逆境条件下得以可靠执行。综上，AsGolS2可能作为一个代谢调控枢纽，通过协调碳流分配、优化能量与还原力供应，并整合胁迫信号与蛋白质稳态，从而为适应盐碱胁迫提供核心的代谢基础。后续仍需通过双分子荧光互补（bimolecular fluorescence complementation, BiFC）、免疫共沉淀（co-immunoprecipitation, Co-IP）等试验进行验证，并结合遗传学与分子生物学手段，系统阐明AsGolS2及其互作网络在燕麦耐盐碱中的生物学功能与调控机制。

4　结论

从燕麦中成功克隆了*AsGolS2*，在不同品种间表现出丰富的调控区多态性，其编码蛋白不含跨膜结构。在叶片中，*AsGolS2*的表达受盐碱胁迫显著诱导。筛选到45个与AsGolS2互作的候选蛋白，涉及代谢、信号转导及蛋白质稳态等多个生物学过程，推测AsGolS2可能通过参与蛋白互作网络，协同调控多种生物学过程以增强燕麦的胁迫耐受性。

文章所有附图附表请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260420092505_NewsFile_11.pdf）。

参考文献

[1] Li PF, Mo F, Li DF, et al. Exploring agronomic strategies to improve oat productivity and control weeds: leaf type, row spacing, and planting density [J]. Can J Plant Sci, 2018, 98(5): 1084-1093.

[2] Ma X, Pan J, Ju ZL, et al. Functional characterization of *AsGRAS24* in *Avena sativa* reveals its role in enhancing salt tolerance via antioxidant and hormonal regulation in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. BMC Plant Biol, 2025, 25: 1102.

[3] Zhu GL, Liu J, Wu H, et al. The optimum mixed cropping ratio of oat and alfalfa enhanced plant growth, forage yield, and forage quality in saline soil [J]. Plants, 2024, 13(21): 3103.

[4] Han LP, Eneji AE, Steinberger Y, et al. Comparative biomass

production of six oat varieties in a saline soil ecology [J]. Commun Soil Sci Plant Anal, 2014, 45(19): 2552-2564.

[5] 王伟伟, 赵振杰, 王志, 等. 盐胁迫下与小麦生理响应相关的耐盐基因研究进展 [J]. 生物技术通报, 2025, 41(5): 14-22.
Wang WW, Zhao ZJ, Wang Z, et al. Research progress in salt-tolerant genes related to physiological response of wheat to salt stress [J]. Biotechnol Bull, 2025, 41(5): 14-22.

[6] 张海燕, 汪宝卿, 冯向阳, 等. 不同时期干旱胁迫对甘薯生长和渗透调节能力的影响 [J]. 作物学报, 2020, 46(11): 1760-1770.
Zhang HY, Wang BQ, Feng XY, et al. Effects of drought treatments at different growth stages on growth and the activity of osmotic adjustment in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] [J]. Acta Agron Sin, 2020, 46(11): 1760-1770.

[7] ElSayed AI, Rafudeen MS, Golldack D. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress [J]. Plant Biol J, 2014, 16(1): 1-8.

[8] Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage [J]. Plant Physiol, 2008, 147(3): 1251-1263.

[9] Sengupta S, Mukherjee S, Basak P, et al. Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants [J]. Front Plant Sci, 2015, 6: 656.

[10] dos Santos TB, Vieira LGE. Involvement of the galactinol synthase gene in abiotic and biotic stress responses: a review on current knowledge [J]. Plant Gene, 2020, 24: 100258.

[11] Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, et al. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 2002, 29(4): 417-426.

[12] Jing QK, Chen AR, Lv ZY, et al. Systematic analysis of galactinol synthase and raffinose synthase gene families in potato and their expression patterns in development and abiotic stress responses [J]. Genes, 2023, 14(7): 1344.

[13] Shimosaka E, Ozawa K. Overexpression of cold-inducible wheat galactinol synthase confers tolerance to chilling stress in transgenic rice [J]. Breed Sci, 2015, 65(5): 363-371.

[14] Dai HB, Zhu ZH, Wang ZG, et al. *Galactinol synthase 1* improves cucumber performance under cold stress by enhancing assimilate translocation [J]. Hortic Res, 2022, 9: uhab063.

[15] Ma S, Lv JG, Li X, et al. Galactinol synthase gene 4 (*CsGolS4*) increases cold and drought tolerance in *Cucumis sativus* L. by inducing RFO accumulation and ROS scavenging [J]. Environ Exp Bot, 2021, 185: 104406.

[16] He FY, Xu JF, Jian YQ, et al. Overexpression of galactinol synthase 1 from *Solanum commersonii* (*ScGolS1*) confers freezing tolerance in transgenic potato [J]. Hortic Plant J, 2023, 9(3): 541-552.

[17] Ranjan A, Gautam S, Michael R, et al. Arsenic-induced galactinol synthase1 gene, *AtGolS1*, provides arsenic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Environ Exp Bot, 2023, 207: 105217.

[18] Wang YG, Liu HH, Wang SP, et al. Overexpression of a common wheat gene *GALACTINOL SYNTHASE3* enhances tolerance to zinc in *Arabidopsis* and rice through the modulation of reactive oxygen species production [J]. Plant Mol Biol Rep, 2016, 34(4): 794-806.

[19] Wang S, He PJ, Wang ZJ, et al. Galactinol synthase 4 influences plant height by affecting phenylpropanoid metabolism and the balance of soluble carbohydrates in tomato [J]. Plant Physiol Biochem, 2025, 220: 109484.

[20] Zhang HD, Zhang KP, Zhao XY, et al. Galactinol synthase 2 influences the metabolism of chlorophyll, carotenoids, and ethylene in tomato fruits [J]. J Exp Bot, 2024, 75(11): 3337-3350.

[21] Zhang HL, Sun Z, Feng S, et al. The C2H2-type zinc finger protein PhZFP1 regulates cold stress tolerance by modulating galactinol synthesis in *Petunia hybrida* [J]. J Exp Bot, 2022, 73(18): 6434-6448.

[22] Song C, Chung WS, Lim CO. Overexpression of heat shock factor gene *HsfA3* increases galactinol levels and oxidative stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. Mol Cells, 2016, 39(6): 477-483.

[23] Sonowal K, Gandass N, Kamble NU, et al. A seed-specific DNA-binding with One Finger transcription factor, RPBF, positively regulates galactinol synthase to maintain seed vigour in rice [J]. Plant Cell Physiol, 2024, 65(12): 2066-2079.

[24] Kapoor A, Mondal S, Chaudhary A, et al. A topological review on protein-protein interactions: the development and promises in the era of omics [J]. J Proteins Proteom, 2024, 15(3): 523-544.

[25] Singh A, Singhal C, Sharma AK, et al. An auxin regulated Universal stress protein (TaUSP3B-1) interacts with TaGolS and provides tolerance under drought stress and ER stress [J]. Physiol Plant, 2024, 176(3): e14390.

[26] 张碧茹. 燕麦耐盐碱种质资源鉴定及候选基因功能验证 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2024.
Zhang BR. Identification of saline-alkali tolerant oat germplasm resources and functional verification of candidate genes [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2024.

[27] Zhang BR, Mi JZ, Zhao BP, et al. Testing of saline-alkali tolerance in oat germplasm through integrated germination and field performance assessments [J]. Agronomy, 2025, 15(6): 1267.

[28] 贾雯淇, 熊玉婷, 李曼, 等. GolS在植物非生物胁迫中的研究进展 [J]. 分子植物育种, 2025, 23(24): 8215-8223.
Jia WQ, Xiong YT, Li M, et al. Advances in GolS study in abiotic stress in plants [J]. Mol Plant Breed, 2025, 23(24): 8215-8223.

[29] Hardy EC, Balcerowicz M. Untranslated yet indispensable−UTRs act as key regulators in the environmental control of gene expression [J]. J Exp Bot, 2024, 75(14): 4314-4331.

[30] Xu Y, Fu XY. Reprogramming of plant central metabolism in response to abiotic stresses: a metabolomics view [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(10): 5716.

[31] 何炜, 曲梦宇, 魏毅东, 等. 水稻磷酸核酮糖激酶基因胁迫诱导表达分析与互作蛋白筛选 [J]. 农业生物技术学报, 2023, 31(1): 1-14.
He W, Qu MY, Wei YD, et al. Expression analyses of phosphoribulokinase gene induced by stresses and its interacting protein screening in rice (*Oryza sativa*) [J]. J Agric Biotechnol, 2023, 31(1): 1-14.

[32] Yu AL, Xie Y, Pan XW, et al. Photosynthetic phosphoribulokinase structures: enzymatic mechanisms and the redox regulation of the Calvin-Benson-bassham cycle [J]. Plant Cell, 2020, 32(5): 1556-1573.

[33] Tossounian MA, Zhang B, Gout I. The writers, readers, and erasers in redox regulation of GAPDH [J]. Antioxidants, 2020, 9(12): 1288.

[34] 林世锋, 付强, 余婧, 等. 烟草胞质6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶基因的克隆及表达分析 [J]. 生物技术通报, 2015, 31(5): 113-119.
Lin SF, Fu Q, Yu J, et al. Cloning and expression analysis of cytosolic 6-phosphogluconate dehydrogenase gene in tobacco (*Nicotiana tabacum*) [J]. Biotechnol Bull, 2015, 31(5): 113-119.

[35] Doering LN, Gerling N, Linnenbrügger L, et al. Evidence for dual targeting control of *Arabidopsis* 6-phosphogluconate dehydrogenase isoforms by N-terminal phosphorylation [J]. J Exp Bot, 2024, 75(10): 2848-2866.

[36] Chern M, Bai W, Chen XW, et al. Reduced expression of glycolate oxidase leads to enhanced disease resistance in rice [J]. PeerJ, 2013, 1: e28.

[37] Yin MM, Huang Z, Aslam A, et al. Genome-wide identification of *SAMS* gene family in Cucurbitaceae and the role of ClSAMS1 in watermelon tolerance to abiotic stress [J]. Plant Physiol Biochem, 2024, 211: 108708.

[38] Zhu HY, He MW, Jahan M, et al. CsCDPK6, a CsSAMS1-interacting protein, affects polyamine/ethylene biosynthesis in cucumber and enhances salt tolerance by overexpression in tobacco [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(20): 11133.

[39] 段敏杰, 李怡斐, 杨小苗, 等. 辣椒锌指蛋白*DnaJ-Like*基因家族鉴定及对高温胁迫的表达响应 [J]. 生物技术通报, 2023, 39(1): 187-198.
Duan MJ, Li YF, Yang XM, et al. Identification of zinc finger protein *DnaJ-like* gene family in *Capsicum annuum* and its expression analysis responses to high temperature stress [J]. Biotechnol Bull, 2023, 39(1): 187-198.

[40] Nie FH, Wang MH, Liu LL, et al. Genome-wide identification and bioinformatics analysis of the FK506 binding protein family in rice [J]. Genes, 2024, 15(7): 902.

（责任编辑　李楠）