作物学报 ACTA AGRONOMICA SINICA 2023, 49(10): 2643–2653 http://zwxb.chinacrops.org/
ISSN 0496-3490; CN 11-1809/S; CODEN TSHPA9 E-mail: zwxb301@caas.cn

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2023.34009

马铃薯淀粉酶 StBAM9 互作蛋白的鉴定及其互作机制分析

杜 鹃[1] 彭晓君[1,2] 侯 娟[1,3] 刘腾飞[1,4] 刘 增[1] 宋波涛[1,*]

[1] 果蔬园艺作物种质创新与利用全国重点实验室 / 农业农村部马铃薯生物学与生物技术重点实验室 / 华中农业大学, 湖北武汉 430070; [2] 阿克陶县巴仁乡人民政府, 新疆克孜勒苏柯尔克孜自治州 845555; [3] 河南农业大学园艺学院, 河南郑州 450002; [4] 山东农业大学食品科学与工程学院, 山东泰安 271018

摘 要: 本实验室前期研究表明 β-淀粉酶 9 (StBAM9)在马铃薯抗低温糖化中具有重要作用, 但其并无 β-淀粉酶活性。为了研究 StBAM9 在马铃薯抗低温糖化中的功能机制, 我们构建了低温贮藏后块茎 cDNA 酵母双杂交文库, 并以 StBAM9 蛋白为诱饵, 对其进行了互作蛋白的筛选和分析, 结果显示分别以全长 StBAM9 和截去转运肽的 StBAM9 为诱饵筛选到的候选互作蛋白中有 12 个是共有的。酵母双杂交结果显示有 4 个蛋白(StDUF842、StTPR01660、StTPR22129 和 StTPR45174)与 StBAM9 互作。进一步通过谷胱甘肽-S-转移酶融合蛋白沉降技术验证表明, 其中的 2 个蛋白 StTPR01660 和 StTPR4517 与 StBAM9 互作。双分子荧光互补结果显示只有 StTPR01660 与 StBAM9 互作于淀粉粒上, 而 StTPR01660 自身定位于细胞质。因此, 我们推测 StBAM9 可能通过从细胞质中招募 StTPR01660 到淀粉粒上发挥淀粉降解的功能。

关键词: 马铃薯; 低温糖化; 淀粉降解; β-淀粉酶; 蛋白互作

Identification of potato amylase StBAM9 interacting protein and analysis of the interaction mechanism

DU Juan[1], PENG Xiao-Jun[1,2], HOU Juan[1,3], LIU Teng-Fei[1,4], LIU Zeng[1], and SONG Bo-Tao[1,*]

[1] National Key Laboratory for Germplasm Innovation and Utilization of Horticultural Crops / Key Laboratory of Potato Biology and Biotechnology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China; [2] People's Government of Baren Township, Aktau County, Kizilsu Kirgiz Autonomous Prefecture 845555, Xinjiang, China; [3] College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China; [4] College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China

Abstract: Previous research conducted in our laboratory has demonstrated the crucial role of StBAM9 (β-Amylase 9) in the resistance of potatoes to cold-induced sweetening (CIS), although StBAM9 lacks β-Amylase activity. To investigate the mechanism, we generated a yeast two-hybrid library of tuber cDNA following low-temperature storage and screened for potential interacting proteins with StBAM9 as bait. The results revealed that 12 of the identified interacting proteins were common among both full-length and truncated transport peptide StBAM9 bait screens. Among them, four proteins (StDUF842, StTPR01660, StTPR22129, and StTPR45174) had significant interactions with StBAM9 in yeast two-hybrid assay. Subsequently, two of these proteins, StTPR01660 and StTPR4517, were identified as the interactors with StBAM9 through Glutathione-S-transferase (GST) pull-down experiments. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays demonstrated that only StTPR01660 was co-localized with StBAM9 on starch granules, while StTPR01660 itself was observed in the cytoplasm. In conclusion, StBAM9 may recruit StTPR01660 from the cytoplasm to starch granules, potentially enabling starch degradation.

Keywords: potato; cold-induced sweetening (CIS); starch degradation; β-amylase; protein interaction

本研究由贵州省科技支撑计划(农业领域重点项目)生物育种先导性项目(黔科合支撑[2022]重点 030-3)和国家自然科学基金项目(31671749)资助。

This study was supported by the Guizhou Science and Technology Support Plan (the Key Project in Agricultural Field) Biological Breeding Pilot Project (Qiankehe Support [2022] Key 030-3) and the National Natural Science Foundation of China (31671749).

* 通信作者(Corresponding author): 宋波涛, E-mail: songbotao@mail.hzau.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: juandu@mail.hzau.edu.cn

Received (收稿日期): 2023-01-13; Accepted (接受日期): 2023-04-17; Published online (网络出版日期): 2023-04-26.

URL: https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20230425.1711.002.html

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

在马铃薯加工产业中, 为延长加工周期和减少块茎失水皱缩、病害传播、发芽等造成的损失, 通常会将薯块放在低温条件下贮藏(低于 10℃)。但低温影响了块茎内碳水化合物的代谢平衡, 最终导致还原糖的加速累积, 也就是“低温糖化”现象。在高温油炸加工过程中, 马铃薯块茎内的还原糖与游离的氨基酸发生非酶促的褐化反应(maillard reaction), 生成略带苦味的褐色物质, 严重影响了油炸加工产品的色泽品质, 同时还会生成有毒物质-丙烯酰胺, 它具有潜在的神经毒性、遗传毒性和致癌性, 严重威胁到人的身体健康[1-2]。低温糖化是阻碍马铃薯油炸加工产业发展的主要原因, 选育抗低温糖化的加工型品种尤其重要。目前对马铃薯抗低温糖化机制了解尚不全面, 为加速马铃薯抗低温糖化品种选育进程, 进一步解析低温糖化抗性形成的分子机制显得尤其重要。

一般来说, 植物中淀粉的降解主要是通过 β-淀粉酶来完成的[3-6]。近些年来, 模式植物拟南芥中关于 β-淀粉酶研究取得较多进展。拟南芥中编码 9 个 β-淀粉酶[7]。研究表明, 不同的 β-淀粉酶同工型在结构和功能上存在一定差异。Fulton 等[4]研究表明, BAM4 (BMY6)定位在叶绿体, 当在大肠杆菌中表达重组蛋白时, BAM1、BAM2 和 BAM3 可检测到 β-淀粉酶活性, 但 BAM4 检测不到 β-淀粉酶活性。令人惊讶的是, BAM4 虽然检测不到 β-淀粉酶活性, 但 *bam4* 突变体存在淀粉积累的表型, 在这 2 种情况下, 将 *bam4* 突变导入 *bam3* 或 *bam1 bam3* 背景下进一步提高了淀粉水平, 这些数据表明 BAM4 具有促进或调节淀粉分解的作用, 并且独立于 BAM1 和 BAM3。

本实验室在马铃薯的基因组中发现了 7 个 β-淀粉酶同源类似物(StBAM1, 3, 4, 5, 7, 8, 9), 且只有 *StBAM1* 和 *StBAM9* 在块茎中有较高的表达并受低温诱导[8], 推测其可能在低温糖化中发挥一定的功能。Hou 等[6]研究表明, 干涉 *StBAM9* 的转基因株系块茎要比干涉 *StBAM1* 的转基因株系块茎中的还原糖含量更低, 且炸片色泽更浅, 猜测 StBAM9 可能在马铃薯的低温糖化过程中发挥更重要的作用。然而无论是原核表达还是真核表达 StBAM9 融合蛋白, 都检测不到 β-淀粉酶活性[9]。此外, 前期研究发现 StBAM9 定位于淀粉粒上[6]。因此, 我们推测无 β-淀粉酶活性的 StBAM9 蛋白可能因为其与淀粉粒结合能力较强, 先结合到淀粉粒上, 然后招募其他的淀粉酶类, 从而形成蛋白复合体或多聚体来行使淀粉降解功能, 但还需要进一步证实。本研究通过对 StBAM9 的互作蛋白进行筛选鉴定, 分析了无 β-淀粉酶活性的 StBAM9 在马铃薯低温糖化中的分子机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用植物材料包括马铃薯抗低温糖化材料 10908-06、CW2-1 和低温糖化敏感材料鄂马铃薯 3 号(E3)、本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)。马铃薯材料种植于华中农业大学国家蔬菜改良中心华中分中心南湖基地温室大棚, 2017 年 9 月至 2017 年 12 月, 自然光周期。本氏烟草种植于华中农业大学黄土坡基地生长室, 光周期为 16 h 光照, 8 h 黑暗, 温度 22℃。

1.2 引物

本研究利用 SnapGene 2.3.2 设计常用引物, 利用 NCBI Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)设计 qRT-PCR 引物, 上海生工生物股份有限公司合成。所用引物序列见附表 1。

1.3 互作蛋白的筛选

根据酵母文库构建试剂盒(CloneMiner II cDNA Library Construction Kit)说明书构建 cDNA 酵母双杂交文库。StBAM9 互作蛋白的筛选参照 Clonetech 酵母文库筛选说明书进行。通过功能互补和显色反应筛选到阳性菌落, 挑选 5 d 之内呈现蓝色的菌体进行培养, 然后提取其质粒(DP112, TIANGEN), 用 5′-T7 和 3′-AD 通用引物进行 PCR 扩增检测, 挑选单一条带, 送铂尚公司测序, 对载体中插入的文库基因进行分析, 确定与饵蛋白互作的潜在靶蛋白。

1.4 酵母双杂交互作验证(Yeast Two-Hybrid, Y2H)

方法参照 Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid (Y2H) System (Clonth, TaKaRa)用户手册。根据目的基因序列设计引物(附表 1), 将饵蛋白与靶蛋白的序列按照 ClonExpress One Step Cloning Kit (C112, Vazyme)的一步重组法分别构建到 pGBKT7 和 pGADT7 载体上。然后将构建好的饵蛋白与靶蛋白的载体共转入酵母菌株 AH109 的感受态细胞中, 置于 30℃培养 3 d。挑 5 个单菌落, 用 50 μL 无菌水稀释, 然后分别点 6 μL 于 SD/-Trp-Leu 和 SD/-Trp-Leu-His-Ade 平板(含有 40 mg L^{-1} 的 X-α-gal)上。

1.5　本氏烟草中的亚细胞定位

将构建好的连接有 GFP 或 RFP 的融合蛋白载体质粒转化农杆菌 GV3101。农杆菌注射本氏烟草叶片的方法参照之前的报道[10]。先用 YEB 液体培养基置于 28℃摇床培养, 以 230 转 min^{-1} 转速培养 12~16 h。在 20℃ 2655×*g* 条件下离心 8 min, 收集菌体后用 MMA 培养基重悬。调节菌体终浓度 OD_{600} 至 0.1, 利用不带针头的注射器从本氏烟草叶背面进行缓慢注射直至菌液浸入整个叶片。先暗培养 8~12 h, 然后置于上述黄土坡基地生长室中培养, 48 h 后利用 Olympus FV10 激光共聚焦系统分别于 560~615 nm 和 505~530 nm 波长下观察 RFP 和 GFP 的荧光情况。

1.6　谷胱甘肽-S-转移酶融合蛋白沉降技术(GST pull down)

以已构建好的 GST (Glutathione-S-transferase)-StBAM9 融合蛋白[10]作为诱饵蛋白, 同时通过上述一步重组法分别将 StBAM9 候选互作蛋白构建到带有 His 标签的 pET32a 表达载体上作为捕获蛋白, 并转化大肠杆菌表达菌株 Rosetta。将其接种到 5 mL LB 液体培养基(含有相应抗生素)中, 置于 37℃摇床, 以 230 转 min^{-1} 转速培养过夜。将初培养的菌液加入到 500 mL LB 液体培养基(含有相应抗生素)中, 置于 37℃摇床, 以 230 转 min^{-1} 转速培养 5 h 左右, 直到 OD_{600}>0.5。加入终浓度为 0.4 mmol L^{-1} 的 IPTG (isopropyl-α-D-thiogalactopyranoside, Sigma), 于 16℃ 230 转 min^{-1} 诱导 12~16 h。将诱导好的菌体在室温 1699×*g* 的条件下离心, 收集菌体。用 20 mL 的 lysis buffer 重悬菌体, 再利用高压细胞破碎仪(JNBio)将菌体细胞破碎 2 次。在 4℃ 15,294×*g* 条件下离心, 收集上清液。然后根据 GST 标签蛋白纯化说明书(Profinity IMAC and Bio-Scale Mini Profinity GST, Bio-RAD)和 His 标签蛋白纯化说明书(Ni Sepharose High performance, GE Healthcare)分别对诱饵蛋白和捕获蛋白进行纯化。纯化完成后将其按一定比例混合, 取 100 μL 混合蛋白作为 Input, 其余蛋白在 4℃孵育 2 h 后, 加入 20 μL GST 填料继续孵育 2 h。离心后弃上清, 使用 1 mL 洗脱液洗脱, 重复 8~10 次。洗脱完成后, 使用 50 μL 2× SDS loading buffer 变性填料作为 Pull down 样品, 将 Input 和 Pull down 样品用于 Western blot 作后续分析。

1.7　双分子荧光互补试验(Bimolecular fluorescence complementation, BiFC)

按照 ClonExpress One Step Cloning Kit (C112, Vazyme)的一步重组法将 StBAM9 的 CDS 序列构建在 pCL112 的 N 端, 候选互作蛋白的 CDS 序列构建在 pCL113 的 N 端, 然后将其转入农杆菌 GV3101。然后按照 1.5 所述的农杆菌介导的烟草瞬时表达方法进行注射, 2.5 d 后于 524~564 nm 波长下观察 YFP 蛋白的荧光情况。

2　结果与分析

2.1　低温贮藏后的马铃薯块茎 cDNA 构建酵母双杂交文库

为了更好地解析 StBAM9 在马铃薯低温糖化淀粉降解过程中的作用机制, 将马铃薯抗低温糖化材料 10908-06、CW2-1 和低温糖化敏感材料 E3 块茎在 4℃低温贮藏 5 d 后进行总 RNA 提取和 mRNA 分离纯化, 然后将其反转录成 cDNA, 用 Actin 引物检测后重组到 pDONR222 载体上, 获得初级文库。进一步将初级文库质粒重组到 pGADT7-DEST, 转化至 DH10B, 获得次级文库, 重组率为 100%且插入片段多态性丰富(图 1-A)。进一步将次级文库质粒转化

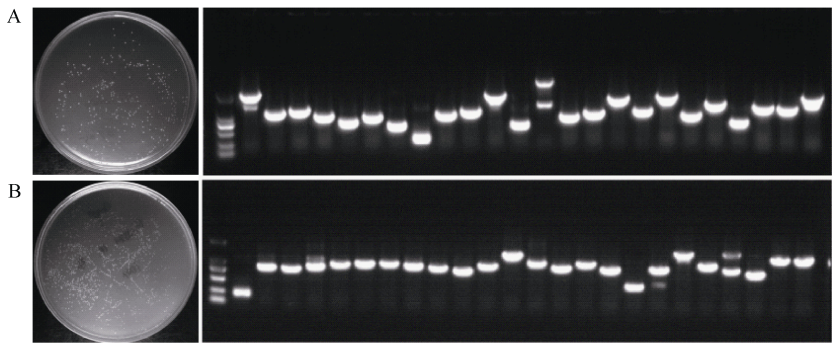


图 1　酵母 cDNA 文库滴度检测及其插入片段分析

Fig. 1　Titer and inserted fragment detection of yeast cDNA Library

A: 次级 cDNA 文库滴度及插入片段菌落 PCR 检测; B: 表达 cDNA 文库滴度及插入片段菌落 PCR 检测。

A: titer and inserted fragment detection of the entry cDNA library by colony PCR; B: titer and inserted fragment detection of the expression cDNA library by colony PCR.

Y187 酵母菌株，进行文库滴度检测，滴度为 3×107 cells mL^{-1}，而且插入片段多态性丰富(图 1-B)，为后期互作蛋白分离提供了良好的酵母文库基础。

2.2 酵母双杂交筛选出 12 个 StBAM9 的候选互作蛋白

根据前期研究结果，StBAM9 含有叶绿体转运肽且定位于淀粉粒[6]。由于本研究构建的酵母文库属于核体系酵母文库，为了使 StBAM9 能适用于 Y2H 系统，分别构建含有 CDS 全长和截去转运肽的 StBAM9 的酵母表达载体 pGBKT7-StBAM9、pGBKT7-StBAM9-P，并以它们为诱饵进行酵母双杂交文库的筛选，分离潜在的互作蛋白。对通过 X-α-gal 筛选得到的阳性转化子进一步培养并抽提质粒，然后用 pGADT7 载体的通用引物 5′-T7 和 3′-AD 进行 PCR 扩增。对扩增出单一片段的 PCR 产物进行测序，并将测序结果在 Spud DB 数据库(http://potato.plantbiology.msu.edu/index.shtml)上进行比对，获得潜在互作蛋白的相关信息。以 StBAM9 为饵蛋白筛到 29 个潜在互作蛋白，而以 StBAM9-P 为饵蛋白筛到 75 个潜在互作蛋白(表 1)，其中有 12 个蛋白完全一致，总共筛到 92 个不同的潜在互作蛋白。

将以上筛到的 StBAM9 和 StBAM9-P 的潜在互作蛋白进行 GO 分析(Gene Ontology, https://www.blast2go.com/)，分别得到 22 个和 64 个 GO 注释结果。进一步利用 Web Gene Ontology Annotation Plot

表 1 StBAM9 和 StBAM9-P 的酵母文库筛选结果
Table 1 Yeast library screening results by using StBAM9 or StBAM9-P as a bait

饵蛋白 Bait protein	测序转化子数 Number of sequencing transformers	潜在互作蛋白个数 Number of potential interaction proteins	相同潜在互作蛋白个数 Number of proteins with the same potential interaction
StBAM9	68	29	12
StBAM9-P	118	75	

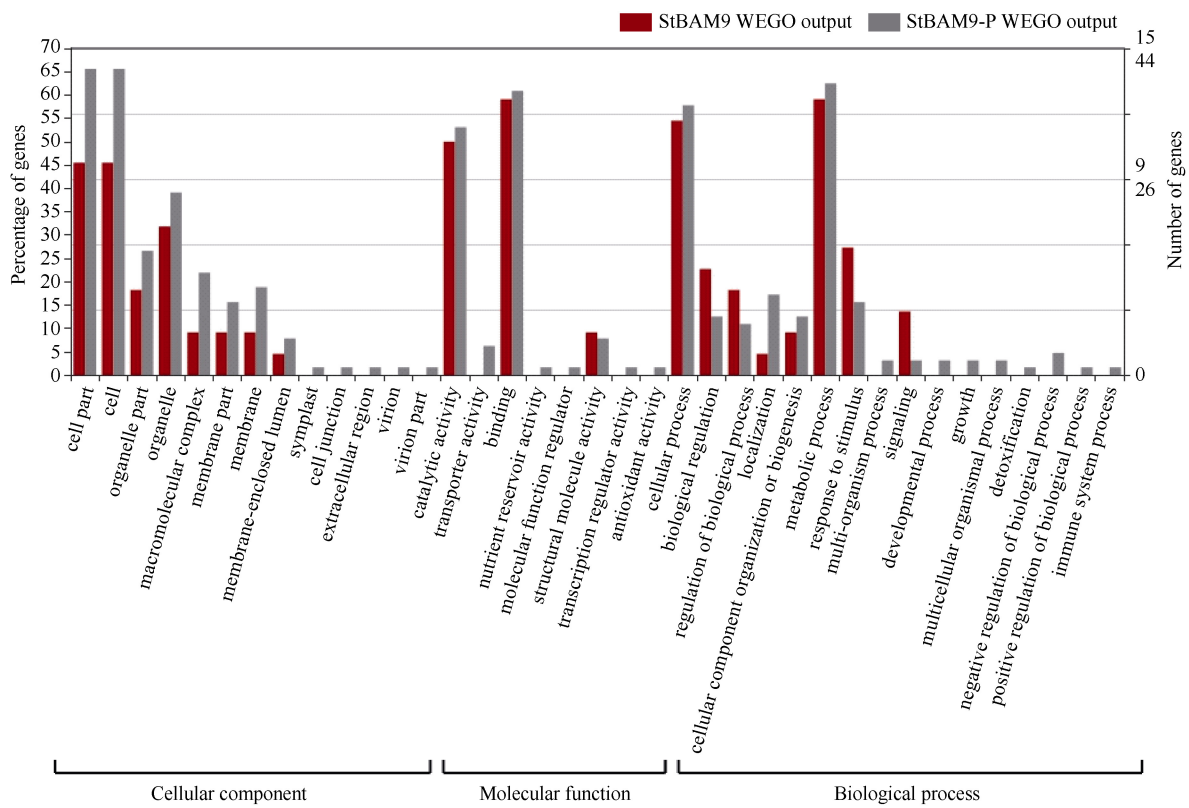


图 2 StBAM9 和 StBAM9-P 潜在互作蛋白的 WEGO 分析
Fig. 2 WEGO analysis of potential interacting proteins of StBAM9 or StBAM9-P
红色和灰色柱子分别表示 StBAM9 和 StBAM9-P 的分析结果。
Red and gray columns show the analysis of StBAM9 and StBAM9-P, respectively.

(WEGO, http://wego.genomics.org.cn/)对该结果进行分析, 第 3 级结果显示 StBAM9 的潜在互作蛋白主要定位在细胞中, 绝大多数蛋白具有催化活性和结合作用, 并且主要富集在细胞学过程、代谢过程以及生物学调控等生物学途径上, StBAM9-P 的潜在互作蛋白的分析结果与 StBAM9 类似(图 2)。

基于以上结果, 本研究根据转化子互作强弱、参与的代谢途径及可能涉及的分子功能等方面筛选了 12 个作为候选互作蛋白, 包括 1 个未知功能结构域蛋白 StDUF842, 3 个含有四三肽重复(TPR)结构域的蛋白 StTPR01660、StTPR22129 和 StTPR45174, 2 个 HSP20 家族的小热休克蛋白 StSHSP12249 和 StSHSP78006, 1 个甘油醛-3-磷酸脱氢酶 StGAPDH, 1 个金属离子结合蛋白 StAFTP4, 3 个信号转导相关的蛋白激酶 StSTPK61170、StSTPK63153 和 StSTPK69936, 还有 1 个蛋白磷酸酶 StPP2C (表 2)。它们的编码区序列(CDS)长度在 396 bp 和 1515 bp 之间。

表 2　StBAM9 的 12 个候选互作蛋白的基本信息
Table 2　Basic information of 12 candidate interacting proteins of StBAM9

序号 Serial number	基因名称 Gene name	PGSC 编号 PGSC number	注释 Annotation	CDS (bp)
1	*StDUF842*	PGSC0003DMT400042117	含 DUF842 结构域的蛋白质 DUF842 domain containing protein	450
2	*StTPR01660*	PGSC0003DMT400001660	含四肽重复结构域的蛋白 Tetratricopeptide repeat domain-containing protein	951
3	*StTPR22129*	PGSC0003DMT400022129	含四肽重复结构域的蛋白 Tetratricopeptide repeat domain-containing protein	1083
4	*StTPR45174*	PGSC0003DMT400045174	含四肽重复结构域的蛋白 Tetratricopeptide repeat domain-containing protein	909
5	*StSHSP12249*	PGSC0003DMT400012249	线粒体小分子热休克蛋白 Mitochondrial small heat shock protein	636
6	*StSHSP78006*	PGSC0003DMT400078006	17.6 kD I 类热休克蛋白 17.6 kD class I heat shock protein	465
7	*StGAPDH*	PGSC0003DMT400044944	胞质甘油醛-3-磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	1017
8	*StAFTP4*	PGSC0003DMT400044590	金属离子结合蛋白 Metal ion binding protein	396
9	*StSTPK61170*	PGSC0003DMT400061170	渗透应激激活蛋白激酶 Osmotic stress-activated protein kinase	1083
10	*StSTPK63153*	PGSC0003DMT400063153	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Ser/Thr protein kinase	1515
11	*StSTPK69936*	PGSC0003DMT400069936	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 NEK8Serine/threonine-protein kinase Nek8	1425
12	*StPP2C*	PGSC0003DMT400067098	蛋白磷酸酶 2CProtein phosphatase 2C	1128

2.3　酵母双杂交结果显示 StBAM9 与 4 个候选蛋白互作

根据上述 12 个候选互作蛋白的 CDS 序列, 分别设计相应的首尾引物(附表 1), 以马铃薯 E3 的叶片 cDNA 为模版扩增目的基因。将扩增片段按照 1.4 中一步重组法构建到 pGADT7 载体上, 并将其分别与 pGBKT7-StBAM9 和 pGBKT7-StBAM9-P 共转酵母菌株 AH109, 涂于 SD-Trp/-Leu、SD-Trp/-Leu/His/Ade (X-α-gal)氨基酸缺陷培养基上。结果显示有 4 个蛋白分别与 StBAM9 和 StBAM9-P 互作显蓝, 分别是 StDUF842、StTPR01660、StTPR22129 和 StTPR45174 (图 3)。

2.4　GST 融合蛋白沉降结果显示 StBAM9 分别与 StTPR01660 和 StTPR45174 发生互作

进一步通过 GST pull down 技术验证上述筛选到的 4 个候选互作蛋白是否与 StBAM9 互作。将 StDUF842、StTPR01660、StTPR22129 和 StTPR45174 分别构建到带有 His 标签的 pET32a 表达载体上, 得到 His-StDUF842、His-StTPR01660、His-StTPR45174 和 His-StTPR22129 的融合蛋白作为捕获蛋白。然后将之前已构建好的 GST-StBAM9 作为诱饵蛋白分别与这 4 个 His 融合蛋白进行体外互作验证。当 GST-StBAM9

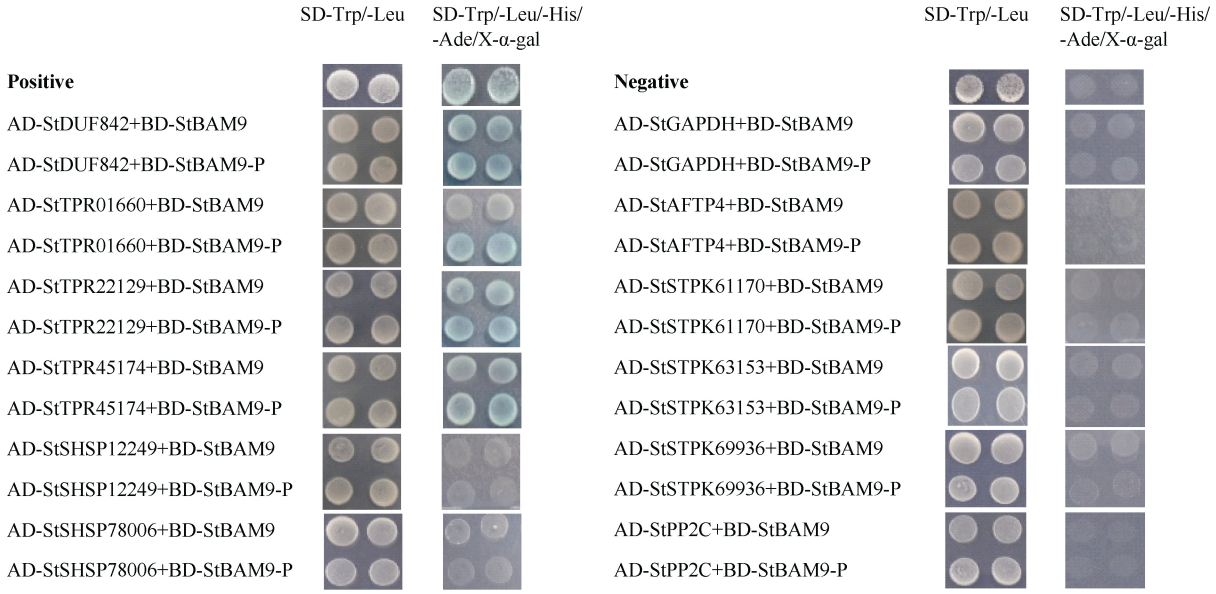


图 3 **StBAM9 和 12 个候选互作蛋白的酵母双杂交互作验证结果**

Fig. 3 Interaction validation of StBAM9 and 12 candidate interaction proteins by yeast two hybrid

分别与 His-StDUF842 和 His-StTPR22129 一起过谷胱甘肽亲和层析柱时，用 His 抗体检测不到 His-StDUF842 或 His-StTPR22129，同时胶图中未检测到其目标大小的融合蛋白，说明 StBAM9 可能不与 StDUF842 或 StTPR22129 互作。当 GST-StBAM9 与 His-StTPR01660 一起过谷胱甘肽亲和层析柱时，用 His 抗体也检测不到 His-StTPR01660 融合蛋白，但是胶图中有一条较弱的该融合蛋白目标大小的条带(48 kD；红色箭头所示)，且阴性对照中检测不到这个蛋白(图 4)，说明 StBAM9 有可能与 StTPR01660 互作。当 GST-StBAM9 与 His-StTPR45174 一起过谷胱甘肽亲和层析柱时，用 His 抗体可以检测到 His-StTPR45174 (46.8 kD；红色箭头所示)，同时胶图中有一条该融合蛋白目标大小的条带(46.8 kD；红色箭头所示)，阴性对照中检测不到这个蛋白(图 4)，说明 StTPR45174 与 StBAM9 互作。

2.5 双分子荧光互补试验结果显示 StBAM9 与 StTPR01660 互作于淀粉粒

本研究通过双分子荧光互补(BiFC)技术对 StBAM9 分别与 StTPR01660 和 StTPR4517 的互作进行了验证。将携带 StBAM9 与 StTPR01660 或 StTPR4517 的农杆菌分别与携带淀粉粒定位的标记蛋白颗粒结合淀粉合酶(Granule-bound starch synthase，GBSS)的 RFP 融合蛋白 GBSS-RFP 的农杆菌共注射本氏烟草叶片，2.5 d 后结果显示只有 StTPR01660 与 StBAM9 互作信号与 GBSS-RFP 的红色荧光共定位，说明 StTPR01660 与 StBAM9 互作于淀粉粒上(图 5)。由于 StBAM9 自身也定位于淀粉粒，为了明确 StTPR01660 自身在植物体内的亚细胞定位，本研究将其利用 gateway 方法构建到 GFP 表达载体上并转入农杆菌 GV3101。将其注射本氏烟草叶片 48 h 后，利用共聚焦显微镜观察 GFP 和 RFP 荧光情况，发现 StTPR01660 自身定位于细胞质(图 6)，说明 StBAM9 改变了 StTPR01660 的亚细胞定位，使其从细胞质转移到淀粉粒。

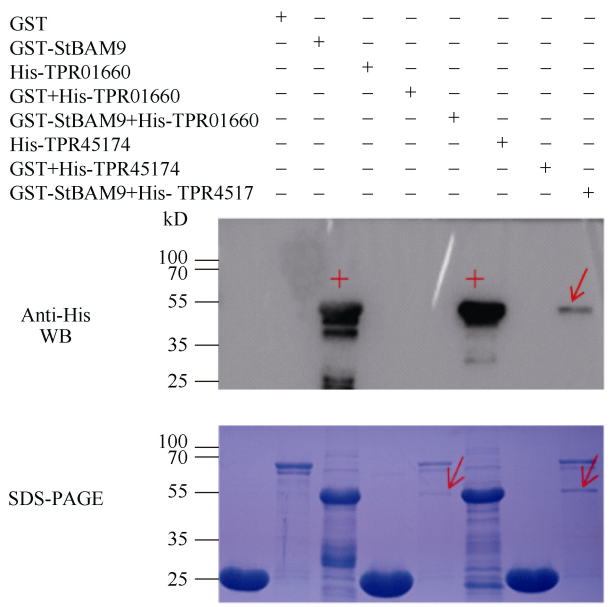


图 4 **StBAM9 分别与 StTPR01660 和 StTPR45174 的体外互作验证结果**

Fig. 4 *In vitro* interaction validation of StBAM9 with StTPR01660 and StTPR45174

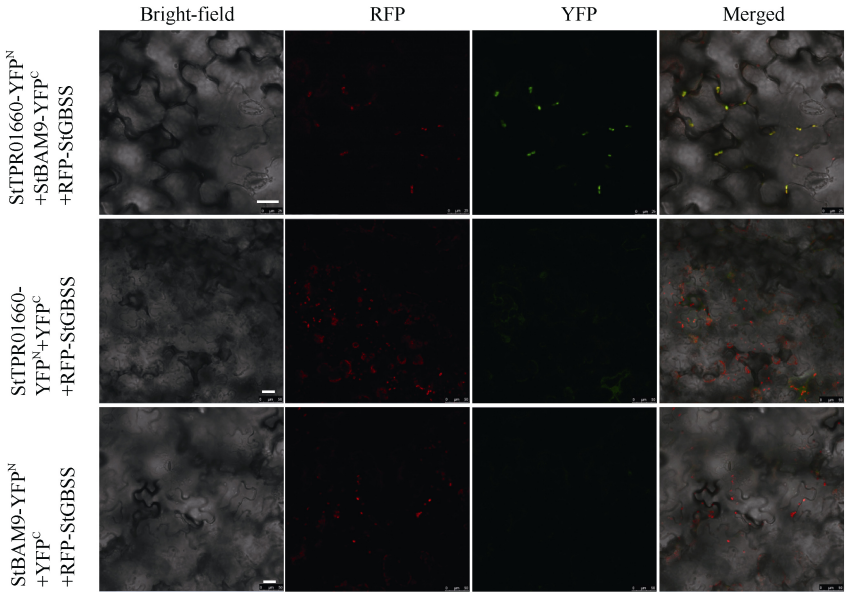


图 5　StBAM9 与 StTPR01660 互作于淀粉粒
Fig. 5　StBAM9 interacts with StTPR01660 on starch granules
标尺: 25 μm。Bar: 25 μm.

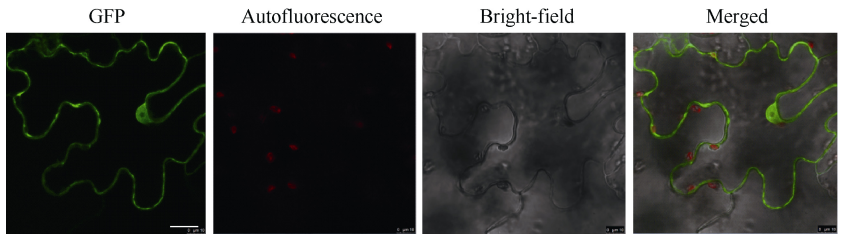


图 6　StTPR01660 定位于细胞质
Fig. 6　StTPR01660 is located in the cytoplasm
Autofluorescence, 叶绿体自发荧光; 标尺: 25 μm。Bar: 25 μm.

2.6　StTPR01660 与 StBAM9 互作需要完整的 TPR 结构域

根据前人报道, TPR 结构域可以介导蛋白之间的相互作用[12-13], 因此, 本研究进一步验证了 StTPR01660 和 StBAM9 互作是否通过 TPR domain 起作用。将 StTPR01660 的氨基酸序列分别在 UniProt (http://www.uniprot.org/)和 NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)网站上进行了 TPR 结构域区间的预测, 结果稍有不同。UniProt 预测结果显示 TPR 结构域位于 181~262 aa; 而 NCBI 预测为 181~277 aa。根据这 2 段的 cDNA 序列分别设计引物 StTPR01660-A1-180-F/R, StTPR01660-A181-317-F/R, StTPR01660-A181-277-F/R, StTPR01660-A181-262-F/R, StTPR01660-A263-317-F/R, StTPR01660-A278-317-F/R (附表 1), 以马铃薯 E3 的叶片 cDNA 为模版扩增目的片段, 并按照 1.4 中一步重组法分别将其构建到 pGADT7 载体上。然后将构建好的重组载体分别与 pGBKT7-StBAM9 进行酵母双杂互作验证。结果显示只有含有完整的 181~277 aa 序列的片段能与 StBAM9 互作显蓝(图 7), 说明 NCBI 上的预测比 UniProt 预测结果更精确。表明, 完整的 TPR 结构域是 StTPR01660 与 StBAM9 互作所必需的。

3　讨论

本实验室前期研究证明了一个无 β-淀粉酶活性 StBAM9 涉及块茎淀粉降解过程, 对低温糖化的调节具有重要作用[6]。为了进一步解析 StBAM9 参与块茎淀粉降解的机制, 本研究对其互作蛋白进行了筛选鉴定。以全长 StBAM9 和截去转运肽的 StBAM9 (StBAM9-P)为饵蛋白分别钓到 29 个和 75 个潜在互作蛋白(表 3), 其中只有 12 个蛋白相同。我们猜测因为 StBAM9 定位到淀粉粒[6], StBAM9-P 定位到细胞质和细胞核[11], 而我们构建的酵母文库为核体系, 更适合 StBAM9-P 筛选到潜在互作蛋白。本研究进一步通过酵母双杂交、GST 融合蛋白沉降和双分子荧光互补试验这 3 种方法鉴定到一个 StBAM9 的互

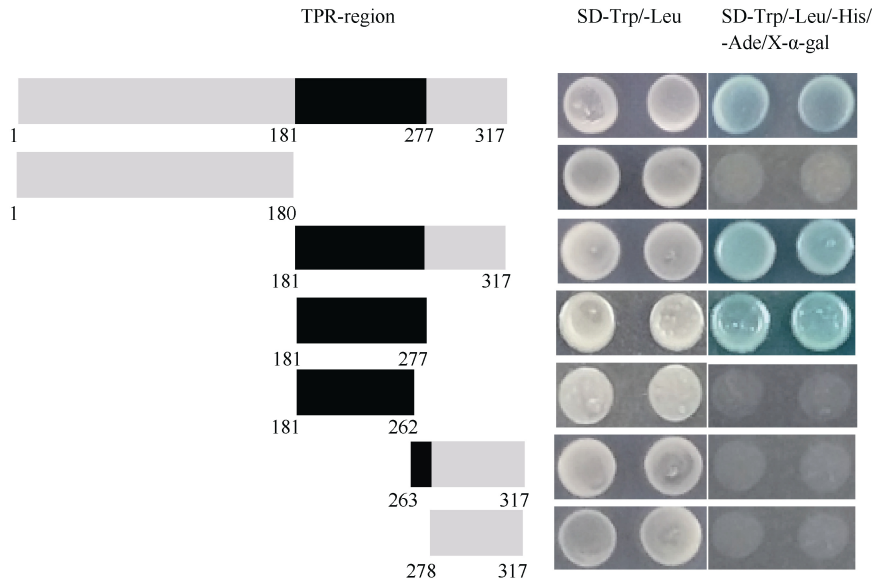


图 7 StTPR01660 的 TPR 结构域与 StBAM9 的酵母双杂互作验证结果
Fig. 7 Validation of yeast two hybrid interaction between the TPR domain of StTPR01660 and StBAM9

作蛋白 StTPR01660。虽然在 GST 融合蛋白沉降实验中, SDS-PAGE 胶图中检测到 His-StTPR01660 融合蛋白, 但用 His 抗体没有杂到, 猜测可能是 GST-StBAM9 拉下来的 His-StTPR01660 融合蛋白少, 所以条带很弱, 与单独纯化的 His-StTPR01660 相比差异大, 从而使得 Western Blot (WB)技术没有检测到。

目前 StTPR01660 功能未知, 仅能预测到含有四三肽重复(TPR)结构域。TPR 结构域存在于多种生物体以及蛋白中, 可以介导蛋白之间的相互作用, 并且经常参与多蛋白复合体的组装[12-13]。在水稻的研究中发现, 携带 TPR 结构的蛋白 FLOURY ENDOSPERM2 (FLO2)通过影响胚乳中贮藏物质的积累, 对水稻籽粒大小和淀粉品质起着关键的调节作用[14], 并且这种调节作用主要是通过调节淀粉合成相关基因的表达影响淀粉品质[15], 暗示 TPR 结构蛋白在植物淀粉代谢过程中发挥功能。在模式植物拟南芥的研究中发现淀粉合成酶 4 (Starch synthase 4, SS4)与含 TPR 结构域蛋白 At3g47080 在酵母中直接互作, 且 At3g47080 同样定位于叶绿体, 但该研究没有进一步探究 At3g47080 对 SS4 酶活的影响[16]。本研究同样发现与淀粉降解相关的无 β-淀粉酶活性 StBAM9 与 TPR 结构蛋白 StTPR01660 直接互作, 并且这种互作依赖于 TPR 结构域(图 7)。

此前, Hussain 等[17]研究发现异淀粉酶 Stisa1 和 Stisa2 形成一个多聚体共同作用, 在淀粉合成期间脱去可溶性葡聚糖, 其中 Stisa1 具有水解活性, Stisa2 无催化活性。本研究发现 StTPR01660 单独定位于细胞质(图 6), 然而其与 StBAM9 互作于淀粉粒, StBAM9 又无 β-淀粉酶活性。因此, 我们推测 StTPR01660 可能具有淀粉酶活性, 被 StBAM9 招募到淀粉粒后发挥淀粉水解的功能。此外, StTPR01660 也有可能从细胞质中和其他的互作蛋白一起被带到淀粉粒上发挥功能。下一步可以通过超量或干涉 StTPR01660, 然后测定薯块中淀粉、葡萄糖的含量等相关表型, 从而明确其是否参与马铃薯块茎淀粉的降解, StTPR01660 的潜在功能及其与 StBAM9 的互作机制有可能开启马铃薯低温糖化分子功能研究的新篇章。

4 结论

本研究鉴定到一个与淀粉降解相关但无 β-淀粉酶活性的蛋白 StBAM9 的互作蛋白 StTPR01660, 通过多种试验方法证实了它们之间的直接互作, 并且这种互作依赖于 TPR 结构域。虽然 StTPR01660 功能目前尚不清楚, 但其与淀粉降解相关蛋白 StBAM9 的互作关系暗示了其在植物淀粉代谢过程中的潜在功能。

References

[1] Shepherd L V T, Bradshaw J E, Dale M F B, McNicol J W, Pont S D A, Mottram D S, Davies H V. Variation in acrylamide producing potential in potato: segregation of the trait in a breeding population. *Food Chem*, 2010, 123: 568–573.

[2] Hogervorst J G, Schouten L J, Konings E J, Goldbohm R A, van den Brandt P A. A prospective study of dietary acrylamide intake and the risk of endometrial, ovarian, and breast cancer. *Cancer*

Epidem Biomar, 2007, 16: 2304–2313.

[3] Scheidig A, Frohlich A, Schulze S, Lloyd J R, Kossmann J. Downregulation of a chloroplast-targeted beta-amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves. *Plant J*, 2002, 30: 581–591.

[4] Fulton D C, Stettler M, Mettler T, Vaughan C K, Li J, Francisco P, Gil M, Reinhold H, Eicke S, Messerli G, Dorken G, Halliday K, Smith A M, Smith S M, Zeeman S C. Beta-AMYLASE4, a non-catalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active beta-amylases in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell*, 2008, 20: 1040–1058.

[5] Reinhold H, Soyk S, Simková K, Hostettler C, Marafino J, Mainiero S, Vaughan C K, Monroe J D, Zeeman S C. Beta-amylase-like proteins function as transcription factors in *Arabidopsis*, controlling shoot growth and development. *Plant Cell*, 2011, 23: 1391–1403.

[6] Hou J, Zhang H L, Liu J, Reid S, Liu T F, Xu S J, Tian Z D, Sonnewald U, Song B T, Xie C H. Amylases StAmy23, StBAM1 and StBAM9 regulate cold-induced sweetening of potato tubers in distinct ways. *J Exp Bot*, 2017, 68: 2317–2331.

[7] Smith S M, Fulton D C, Chia T, Thorneycroft D, Chapple A, Dunstan H, Hylton C, Zeeman S C, Smith A M. Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol*, 2004, 136: 2687–2699.

[8] Zhang H L, Hou J, Liu J, Xie C H, Song B T. Amylase analysis in potato starch degradation during cold storage and sprouting. *Potato Res*, 2014, 57: 47–58.

[9] Zhang H L, Liu J, Hou J, Yao Y, Lin Y, Ou Y B, Song B T, Xie C H. The potato amylase inhibitor gene *SbAI* regulates cold-induced sweetening in potato tubers by modulating amylase activity. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12: 984–993.

[10] Du J, Rietman H, Vleeshouwers V G. Agroinfiltration and PVX agroinfection in potato and *Nicotiana benthamiana*. *J Vis Exp*, 2014, 83: e50971.

[11] 侯娟. 马铃薯低温糖化相关淀粉酶基因的功能鉴定及机制解析. 华中农业大学博士学位论文, 湖北武汉, 2017.
Hou J. Function Characterization and Mechanism Dissection of the Amylase Genes Related to Cold-induced Sweetening in Potato. PhD Dissertation of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China, 2017 (in Chinese with English abstract).

[12] Amit K D, Patricia T W C, David B. The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J*, 1998, 17: 1192–1199.

[13] Blatch G L, Lässle M. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *BioEssays*, 1999, 21: 932–939.

[14] She K C, Kusano H, Koizumi K, Yamakawa H, Hakata M, Imamura T, Fukuda M, Naito N, Tsurumaki Y, Yaeshima 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. *Plant Cell*, 2010, 22: 3280–3294.

[15] Wu Y P, Pu C H, Lin H Y, Huang H Y, Huang Y C, Hong C Y, Chang M C, Lin Y R. Three novel alleles of *FLOURY ENDOSPERM2* (*FLO2*) confer dull grains with low amylose content in rice. *Plant Sci*, 2015, 233: 44–52.

[16] Gámez-Arjona F M, Raynaud S, Ragel P, Mérida Á. Starch synthase 4 is located in the thylakoid membrane and interacts with plastoglobule-associated proteins in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2014, 80: 305–316.

[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. *Plant Cell*, 2002, 15: 133–149.

附表 1 本研究所用的引物
Table S1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5′−3′)	用途 Use
5′-T7	TAATACGACTCACTATAGG	酵母文库构建 Yeast library construction
3′-AD	ACTGTGCATCGTGCACCATCTC	酵母文库构建 Yeast library construction
AD-StDUF842-F	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGACGCAATAGCAGCAGC	酵母双杂交 Y2H
AD-StDUF842-R	AGCTCGAGCTCGATGGATCCTCAATTGTTGAAGCCGAGAG	酵母双杂交 Y2H
AD-StTPR01660-F	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGTTATTGAGAAGCTCATC	酵母双杂交 Y2H
AD-StTPR01660-R	AGCTCGAGCTCGATGGATCCCTAAGAAGCAGCAGCCAAGG	酵母双杂交 Y2H
AD-StTPR22129-F	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGTTGCTAAGGAGTTCTTC	酵母双杂交 Y2H
AD-StTPR22129-R	AGCTCGAGCTCGATGGATCCTCAAACAGTTATAGAAGCCG	酵母双杂交 Y2H
AD-StTPR45174-F	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGAGAACTGTCCTTTTCCG	酵母双杂交 Y2H
AD-StTPR45174-R	AGCTCGAGCTCGATGGATCCCTAGTAAGCTGCAACCGTTG	酵母双杂交 Y2H
AD-StSTPK69936-F	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGAGGTAATAGAGAAGGA	酵母双杂交 Y2H
AD-StSTPK69936-R	AGCTCGAGCTCGATGGATCCTCAAGTTGGTGATTCAGCTA	酵母双杂交 Y2H
AD-StSTPK63153-F	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGAGTTCCAGAGGTGGTGG	酵母双杂交 Y2H
AD-StSTPK63153-R	AGCTCGAGCTCGATGGATCCTCATTGTGGTCCCTCTAGCT	酵母双杂交 Y2H
AD-StSTPK61170-F	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGAGAAATACGAGCTTGT	酵母双杂交 Y2H
AD-StSTPK61170-R	AGCTCGAGCTCGATGGATCCTTAGGTGAGACGAACTTCCC	酵母双杂交 Y2H
AD-StPP2C-F	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGAAGAAAGTAAAATGAT	酵母双杂交 Y2H
AD-StPP2C-R	AGCTCGAGCTCGATGGATCCTTAATCTTTCAAGGTATCCA	酵母双杂交 Y2H
AD-StGAPDH-F	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGCCAATGGCAAGATCAA	酵母双杂交 Y2H
AD-StGAPDH-R	AGCTCGAGCTCGATGGATCCTCAAGCCTTGGCCATATGGC	酵母双杂交 Y2H
AD-StSHSP12249-F	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGCAACTTCACTTGCTCT	酵母双杂交 Y2H
AD-StSHSP12249-R	AGCTCGAGCTCGATGGATCCTCACTCAATTTTAACATCAA	酵母双杂交 Y2H
AD-StSHSP78006-F	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGTCACTGATCCCAAGAAT	酵母双杂交 Y2H
AD-StSHSP78006-R	AGCTCGAGCTCGATGGATCCTTAACCAGAGATCTCAATGG	酵母双杂交 Y2H
AD-StAFTP4-F	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGAAGCAAAAGGTTGTTAT	酵母双杂交 Y2H
AD-StAFTP4-R	AGCTCGAGCTCGATGGATCCTCACATAATGGAGCAATTGG	酵母双杂交 Y2H
AD-StSSIV-F	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGAGATGAAGATCTCCAA	酵母双杂交 Y2H
AD-StSSIV-R	AGCTCGAGCTCGATGGATCCTCAACTACGACTTGCAGCTC	酵母双杂交 Y2H
AD-StGWD-F	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGAGTAATTCCTTAGGGAA	酵母双杂交 Y2H
AD-StGWD-R	AGCTCGAGCTCGATGGATCCTCACATCTGAGGTCTTGTCT	酵母双杂交 Y2H
StTPR01660-A1-180-F	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGTTATTGAGAAGCTCATC	酵母双杂交 Y2H
StTPR01660-A1-180-R	AGCTCGAGCTCGATGGATCCCTATTTCTGGTAATAGGCAT	酵母双杂交 Y2H
StTPR01660-A181-262-F	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGATCGAAGCCCACCCAGG	酵母双杂交 Y2H
StTPR01660-A181-262-R	AGCTCGAGCTCGATGGATCCCTACAGTACGTAGCAGTCAT	酵母双杂交 Y2H
StTPR01660-A263-317-F	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGGCTCTTATGCTCGATT	酵母双杂交 Y2H
StTPR01660-A263-317-R	AGCTCGAGCTCGATGGATCCCTAAGAAGCAGCAGCCAAGG	酵母双杂交 Y2H
StTPR01660-A181-277-F	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGATCGAAGCCCACCCAGG	酵母双杂交 Y2H
StTPR01660-A181-277-R	AGCTCGAGCTCGATGGATCCCTACTCATATTCTTCACCAG	酵母双杂交 Y2H
StTPR01660-A278-317-F	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGAATGAGGGTGAGGACGA	酵母双杂交 Y2H
StTPR01660-A278-317-R	AGCTCGAGCTCGATGGATCCCTAAGAAGCAGCAGCCAAGG	酵母双杂交 Y2H
StTPR01660-A181-317-F	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGATCGAAGCCCACCCAGG	酵母双杂交 Y2H
StTPR01660-A181-317-R	AGCTCGAGCTCGATGGATCCCTAAGAAGCAGCAGCCAAGG	酵母双杂交 Y2H

(续附表 1)

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5′−3′)	用途 Use
pET32a-StDUF842-F	CTGATATCGGATCCGAATTCATGGACGCAATAGCAGCAGC	原核表达 Prokaryotic expression
pET32a-StDUF842-R	TGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTCAATTGTTGAAGCCGAGAG	原核表达 Prokaryotic expression
pET32a-StTPR01660-F	CTGATATCGGATCCGAATTCATGTTATTGAGAAGCTCATC	原核表达 Prokaryotic expression
pET32a-StTPR01660-R	TGGTGGTGGTGGTGCTCGAGCTAAGAAGCAGCAGCCAAGG	原核表达 Prokaryotic expression
pET32a-StTPR22129-F	CTGATATCGGATCCGAATTCATGTTGCTAAGGAGTTCTTC	原核表达 Prokaryotic expression
pET32a-StTPR22129-R	TGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTCAAACAGTTATAGAAGCCG	原核表达 Prokaryotic expression
pET32a-StTPR45174-F	CTGATATCGGATCCGAATTCATGAGAACTGTCCTTTTCCG	原核表达 Prokaryotic expression
pET32a-StTPR45174-R	TGGTGGTGGTGGTGCTCGAGCTAGTAAGCTGCAACCGTTG	原核表达 Prokaryotic expression
pGEX6p-1-StDUF842-F	TCCAGGGGCCCCTGGGATCCATGGACGCAATAGCAGCAGC	原核表达 Prokaryotic expression
pGEX6p-1-StDUF842-R	ATGCGGCCGCTCGAGTCGACTCAATTGTTGAAGCCGAGAG	原核表达 Prokaryotic expression
StDUF842-YFP^N-F	TGTTGATACATATGGGATCCATGGACGCAATAGCAGCAGC	双分子荧光互补 BiFC
StDUF842-YFP^N-R	CCGAATTCACTAGTGTCGACATTGTTGAAGCCGAGAGAAG	双分子荧光互补 BiFC
StTPR22129-YFP^N-F	TGTTGATACATATGGGATCCATGTTGCTAAGGAGTTCTTC	双分子荧光互补 BiFC
StTPR22129-YFP^N-R	CCGAATTCACTAGTGTCGACAACAGTTATAGAAGCCGTGG	双分子荧光互补 BiFC
actin-F	CAGAAAGGACCTCTACGGTAACATT	cDNA 检测 cDNA detection
actin-R	TCTGTGGACGATGGACGGAC	cDNA 检测 cDNA detection
attB1+StDUF842-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAATGGACGCAATAGCAGCAGC	BP 反应 BP reaction
attB2+StDUF842-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAATTGTTGAAGCCGAGAG	BP 反应 BP reaction
attB1+StTPR01660-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAATGTTATTGAGAAGCTCATC	BP 反应 BP reaction
attB2+StTPR01660-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTAAGAAGCAGCAGCCAAGG	BP 反应 BP reaction
attB1+StTPR22129-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAATGTTGCTAAGGAGTTCTTC	BP 反应 BP reaction
attB2+StTPR22129-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAAACAGTTATAGAAGCCG	BP 反应 BP reaction
attB1+StTPR45174-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAATGAGAACTGTCCTTTTCCG	BP 反应 BP reaction
attB2+StTPR45174-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTAGTAAGCTGCAACCGTTG	BP 反应 BP reaction

下画线表示酶切位点。GAATTC: *Eco*R I; GGATCC: *Bam*H I; CTCGAG: *Xho* I; GTCGAC: *Sal* I。

The underline represents the digestion site. GAATTC: *Eco*R I; GGATCC: *Bam*H I; CTCGAG: *Xho* I; GTCGAC: *Sal* I.