

王沙沙, 何宁, 汪庆昌, 等. 小麦 γ -醇溶蛋白基因 *Tagli- γ -11* 的克隆及其互作蛋白质分析[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(5): 833-839.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.05.001

小麦 γ -醇溶蛋白基因 *Tagli- γ -11* 的克隆及其互作蛋白质分析

王沙沙¹, 何宁¹, 汪庆昌¹, 黄超¹, 宋晓², 晁岳恩¹

(1.河南省农业科学院小麦研究所/河南省小麦生物学重点实验室, 河南 郑州 450002; 2.河南省农业科学院植物营养与资源环境研究所, 河南 郑州 450002)

摘要: 为进一步解析 γ -醇溶蛋白基因在小麦面粉品质中的调控机制, 本研究从郑麦 158 (低蛋白质含量、高面团强度) 中克隆了小麦 γ -醇溶蛋白基因 *Tagli- γ -11*。生物信息学分析结果表明, 该基因具有 γ -醇溶蛋白的典型结构特征, 含有 8 个保守的半胱氨酸残基, 并在该蛋白质的重复区 II 内第 133~141 aa 位置发现 1 个乳糜泻 (CD) 表位 (PQQSFPQQQ)。利用酵母双杂交技术筛选郑麦 158 的 cDNA 文库, 共筛选了 8 个可能与 *Tagli- γ -11* 互作的蛋白质, 它们分别是半胱氨酸蛋白酶、果糖二磷酸醛缩酶、富含半胱氨酸和跨膜结构域蛋白 1、(1,3:1,4)- β -D-葡聚糖酶、生长素响应因子 ARF17-like、细胞数目调控因子 CNR8-like、泛素结构域蛋白 DSK2b 和转录因子 PIF1-like。3 个代表性候选蛋白质 [富含半胱氨酸和跨膜结构域蛋白 1、果糖二磷酸醛缩酶、(1,3:1,4)- β -D-葡聚糖酶] 的回转验证结果表明, 它们与 *Tagli- γ -11* 均存在互作关系, 推测 *Tagli- γ -11* 与这些蛋白质相互作用, 主要参与了小麦籽粒中贮藏蛋白 (如醇溶蛋白) 和淀粉的合成与降解, 以及生殖生长过程。

关键词: 小麦; *Tagli- γ -11* 基因; 酵母双杂交; 回转验证

中图分类号: S512.1; Q756 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)05-0833-07

Cloning of γ -gliadin gene *Tagli- γ -11* and interactive proteins analysis in wheat

WANG Shasha¹, HE Ning¹, WANG Qingchang¹, HUANG Chao¹, SONG Xiao², CHAO Yue'en¹

(1. Institute of Wheat Research, Henan Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory for Wheat Biology of Henan Province, Zhengzhou 450002, China; 2. Institute of Plant Nutrient and Environmental Resources, Henan Academy of Agricultural Science, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To further analyze the regulation mechanism of γ -gliadin gene in flour quality of wheat, the *Tagli- γ -11* gene was successfully cloned from Zhengmai 158 (low protein content and high dough strength). Bioinformatic analysis revealed that this gene possessed the typical structural characteristics of γ -gliadin, containing eight conserved cysteine residues. A celiac disease (CD) epitope (PQQSFPQQQ) was identified within repeat domain II of the *Tagli- γ -11* protein,

收稿日期: 2024-11-08

基金项目: 河南省科技攻关项目 (232102110220); 河南省农业科学院科技攻关项目; 河南省农业科学院自主创新项目 (2024ZC001)

作者简介: 王沙沙 (1981-), 女, 河南焦作人, 博士, 助理研究员, 研究方向为小麦分子育种。(E-mail) 515605313@qq.com。何宁为共同第一作者。

通讯作者: 晁岳恩, (E-mail) nkychaoyuen@163.com

located at amino acid positions 133–141. Using the yeast two-hybrid (Y2H) system, the cDNA library of Zhengmai 158 was screened, yielding eight candidate proteins potentially interacting with *Tagli- γ -11*. These included cysteine protease, fructose-bisphosphate aldolase, cysteine-rich and transmembrane domain-containing protein 1, (1,3:1,4)- β -D-glucanase, auxin response factor 17-like (ARF17-like), cell number regulator 8-like (CNR8-like), ubiquitin-associated domain-containing protein

DSK2b, transcription factor PIF1-like. The rotation validation assays performed on cysteine-rich and transmembrane domain-containing protein 1, fructose-bisphosphate aldolase, and (1,3:1,4)- β -D-glucanase confirmed physical interaction with Tagli- γ -11. Based on these results, it was hypothesized that Tagli- γ -11 interacted with these proteins and participated in the synthesis and degradation of storage proteins (such as gliadin) and starch within wheat grains, as well as in reproductive growth processes.

Key words: *Triticum aestivum* L.; Tagli- γ -11 gene; yeast two-hybrid system; rotation validation

醇溶蛋白约占小麦籽粒总贮藏蛋白的 40%, 是赋予面团独特黏弹性的关键组分^[1]。其中, γ -醇溶蛋白约占醇溶蛋白总量的 30%, 其在面粉的最终使用用途方面发挥了重要作用^[2]。因此, 开展小麦 γ -醇溶蛋白基因的研究, 探讨与其相关的分子调控机制, 可为小麦品质的遗传改良提供重要依据。

目前, 许多学者对小麦 γ -醇溶蛋白基因的功能及其调控机制进行了较为深入的研究^[2-4]。Zhou 等^[3]发现, 小麦 *TaGli- γ -2.1* 基因启动子区域甲基化抑制其表达, 导致小麦种子的醇溶蛋白总量和 γ -醇溶蛋白积累量显著减少, 谷蛋白指数和面团稳定时间增加。面筋蛋白积累关键基因 *LGPI* 编码区第 56 位核苷酸发生 C 到 T 突变, 导致第 19 位氨基酸由丙氨酸 (Ala) 突变为缬氨酸 (Val), 该突变可导致 γ -醇溶蛋白信号肽不能正常切割而滞留在内质网内, 从而引起内质网结构发生改变, 形成类自噬体样结构, 最终导致种子贮藏蛋白传递到细胞外, 进而降低谷蛋白和淀粉生物合成水平, 并触发内质网胁迫反应和细胞死亡相关途径^[4]。敲除 *Gli- γ 1-1D* 基因和 *Gli- γ 2-1B* 基因可导致小麦高分子量谷蛋白亚基 (HMW-GSs) 含量上升, 谷蛋白 (Glu) 含量与醇溶蛋白 (Gli) 含量的比值显著提高, 十二烷基硫酸钠 (SDS) 沉降值、面筋指数也显著提高^[2]。由此可见, γ -醇溶蛋白基因可负调控与面团强度相关的小麦品质。

乳糜泻 (CD) 是由于摄入小麦、黑麦、燕麦等含麸质蛋白质类食物而引发的一种慢性、多器官自身免疫性疾病^[5], 它在全球发病率约为 1%^[6]。有研究表明, α -醇溶蛋白、 β -醇溶蛋白和 γ -醇溶蛋白含有大量的 CD 免疫显性表位, 是导致乳糜泻的主要原因^[7]。目前, 小麦中已发现 31 个醇溶蛋白的 CD 表位^[7]。许多学者则通过降低 CD 表位, 来改善面团品质, 并将这种方法应用于优质麦育种的遗传改良当中^[4, 8-10]。也有学者通过敲除或者沉默醇溶蛋白的方法来降低 CD 表位, 并获得对乳糜泻患者

毒性很低甚至无毒的小麦品系^[4, 9-10], 并且乳糜泻患者在食用了这些小麦品系制作的面包后也未引起免疫原性反应^[11]。因此, 开发无醇溶蛋白或低醇溶蛋白的小麦品种, 有望满足乳糜泻患者等特殊人群的特定饮食需求。然而, 目前这类小麦品种仍然较少。

晁岳恩等^[12]通过对郑麦 158 (高面团强度)、郑麦 369 (低面团强度) 不同发育时期的籽粒进行转录组测序分析发现, 在郑麦 158 与郑麦 369 之间, 包括 γ -醇溶蛋白 11 基因 (TraesCS1D02G001100) 在内的 24 个贮藏蛋白基因存在显著差异表达, 推测这些基因可能对小麦面粉品质或者面团强度有重要影响。为了深入研究这些基因在小麦面团强度中的调控机制, 本研究拟克隆 γ -醇溶蛋白 11 基因 (TraesCS1D02G0011000), 并将其命名为 *Tagli- γ -11*, 对其进行生物信息学分析及互作蛋白质的筛选, 以期为进一步解析 γ -醇溶蛋白 11 基因功能、小麦品质相关调控机制以及低醇溶蛋白小麦品种的选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

提取 RNA 所用试剂 TRIzol 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 反转录试剂盒、SD/-Trp/-Leu (二缺板)、SD/-Trp/-Leu/-His (三缺板)、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade (四缺板) 等营养缺陷型培养基均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 酵母双杂交所用载体 (pGBKT7 和 pGADT7)、酵母菌株 Y2H Gold、郑麦 158 酵母双杂交 cDNA 文库、阳性对照 pGBKT7-p53^[13]、阴性对照 pGBKT7-Lam^[13] 等均由河南省农业科学院小麦研究所小麦营养与品质研究室保存。

选取普通小麦郑麦 158 (高面团强度) 扬花后第 7 d、14 d、21 d、28 d、35 d 和 42 d 等不同发育时期的种子, 液氮速冻后, 置于 -80 °C 条件下冻存。

1.2 总 RNA 的提取、反转录及 *Tagli- γ -11* 基因的 cDNA 合成

利用 TRIzol 提取郑麦 158 种子不同发育时期的

总 RNA。按照反转录试剂盒说明书将总 RNA 反转录获得 cDNA, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。设计特异性引物 (F1: 5'-ATGAAGACCTTACTCATCCTAACA-3'; R1: 5'-TTATTGGCCACCAATGCCG-3') 用于 PCR 扩增反应。参照王沙沙等^[14]的方法配制 PCR 反应体系,并设置 PCR 扩增程序。将反应体系放置于 PCR 扩增仪(购自江苏万科科教仪器有限公司)中进行 PCR 扩增反应。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测、回收、连接至 pMD18-T 克隆载体,并测序。选择测序正确的阳性单克隆进行摇菌、提取质粒, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

1.3 *Tagli- γ -11* 蛋白结构和 CD 表位分析

利用 Pfam 数据库分析 *Tagli- γ -11* 蛋白的信号肽以及结构域,利用 CD 表位数据库(<http://www.isscd.org/EpitopeNomenclature>)分析 *Tagli- γ -11* 蛋白的 CD 表位情况。

1.4 诱饵载体的构建、酵母转化及自激活检测

根据小麦 *Tagli- γ -11* 基因 cDNA 序列及 pGBKT7 载体序列,利用 Primer premier 3.0 在线软件设计携带 *Nde* I 和 *Bam* H I 这 2 个限制性酶切位点的特异性引物 (F2: 5'-CATATGATGAAGACCTTACTCATCC-3'; R2: 5'-GGATCCTTATTGGCCACCAAT-3')。以小麦 *Tagli- γ -11*-pMD18-T 质粒 DNA 为模板,利用已设计的特异性引物进行 PCR 扩增。采用 *Nde* I 和 *Bam* H I 双酶切处理,将目的基因 *Tagli- γ -11* 克隆至 pGBKT7 载体骨架,经 T4 DNA 连接酶连接构建诱饵表达载体 pGBKT7-*Tagli- γ -11*。利用 PEG/LiAC 介导酵母转化法,将 pGBKT7-*Tagli- γ -11* 转化至 Y2H Gold 酵母菌株中,同时设置阴性对照 (pGBKT7-Lam+pGADT7-T) 和阳性对照 (pGBKT7-p53+pGADT7-T)。

将 pGBKT7-*Tagli- γ -11*+pGADT7、pGBKT7-p53+pGADT7-T (阳性对照) 和 pGBKT7-Lam+pGADT7-T (阴性对照) 分别转入 Y2H Gold 酵母菌株中,然后依次涂布于二缺板、三缺板以及含金担子素 A (AbA) 抗性的四缺板上,观察酵母菌在这 3 种营养缺陷型平板上的生长情况,以此判断载体是否转化成功,验证 pGBKT7-*Tagli- γ -11* 是否具有自激活活性。

1.5 *Tagli- γ -11* 互作蛋白质的筛选及反转验证

为了筛选 *Tagli- γ -11* 互作蛋白质,首先将已构建好的郑麦 158 酵母双杂交文库质粒和诱饵载体

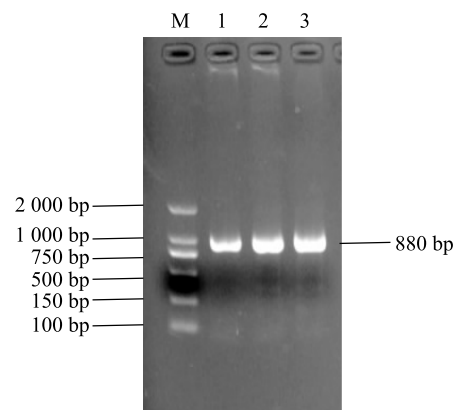
pGBKT7-*Tagli- γ -11* 质粒共转化到 Y2H Gold 酵母感受态细胞中,具体操作步骤参照宋晓等^[15]的方法。随后将转化后的酵母菌液涂布于三缺板上, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 3~5 d。待菌落长至直径为 2 mm 时,挑取蓝色菌落到含 AbA 抗性的四缺板上继续生长, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 3~5 d,再次筛选阳性克隆。设置阳性对照和阴性对照,做 3 次重复。利用特异性引物对 AD-F/AD-R (AD-F: 5'-CGGCTAGTAAAATGATGATGGTAATAATTCA-3'; AD-R: 5'-CACAGTTGAAGTGAACCTGCCG-3') 对候选蛋白质进行 PCR 鉴定、测序及分析。

为了进一步验证 pGBKT7-*Tagli- γ -11* 与候选蛋白质之间的互作关系,将构建好的 pGBKT7-*Tagli- γ -11* 质粒与 pGADT7-候选互作蛋白质质粒转至 Y2H Gold 酵母感受态细胞中,再依次涂布于二缺板、三缺板以及含 AbA 抗性的四缺板上,培养 3~5 d。如果长出蓝色菌落则说明 pGBKT7-*Tagli- γ -11* 与候选蛋白质之间存在互作关系,反之,则说明 pGBKT7-*Tagli- γ -11* 与候选蛋白质之间不存在互作关系。

2 结果与分析

2.1 小麦 *Tagli- γ -11* 基因克隆、cDNA 序列的检测

根据已报道的小麦 *Tagli- γ -11* 基因序列,以郑麦 158 的 cDNA 为模板,经 PCR 扩增、回收、连接 pMD18-T 克隆载体、测序,最终获得长度为 880 bp 的小麦 *Tagli- γ -11* 基因的 cDNA 序列(图 1)。



M: DL2000 DNA Marker; 1~3: *Tagli- γ -11*-pMD18-T 菌液 PCR 片段。

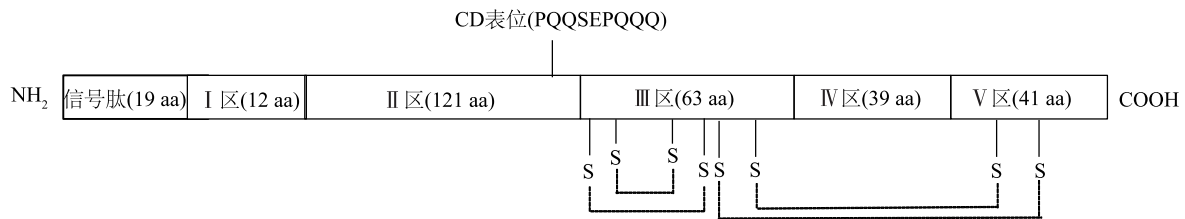
图 1 *Tagli- γ -11*-pMD18-T 菌液 PCR 产物的电泳检测

Fig.1 Electrophoretic detection of PCR products from *Tagli- γ -11*-pMD18-T bacterial solution

2.2 Tagli- γ -11 蛋白结构及 CD 表位分析

利用 Pfam 数据库分析 Tagli- γ -11 蛋白的信号肽以及结构域,发现该蛋白质包括 19 个氨基酸残基的信号肽。通过生物信息学分析发现,该蛋白质具有典型的 γ -醇溶蛋白结构,主要包括由信号肽(由 19 个氨基酸残基组成)、N 端非重复 I 区(由 12 个氨基酸组成)、包括若干 PQQPYPPQQFPF 重复单元的重复 II 区(由 121 个氨基酸组成)、包含 6 个保守

半胱氨酸残基的非重复 III 区(由 63 个氨基酸组成)、多聚谷氨酰胺 IV 区(由 39 个氨基酸组成)以及包含 2 个保守半胱氨酸残基的 C 末端非重复 V 区(由 41 个氨基酸组成)。利用 CD 表位数据库(<http://www.isscd.org/EpitopeNomenclature>)分析 Tagli- γ -11 蛋白的 CD 表位情况,结果发现在该蛋白质的重复 II 区即第 133~141 aa 位置有 1 个 CD 表位(PQQSEFQQQ)(图 2)。



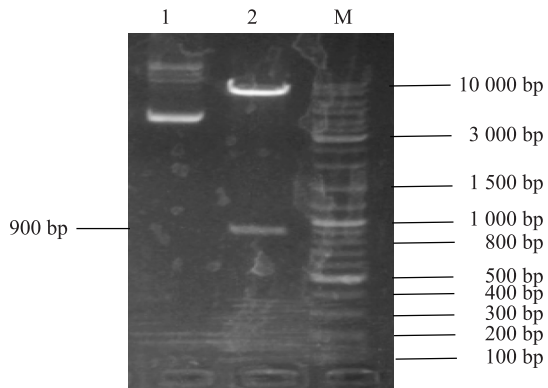
S 表示二硫键。

图 2 小麦 Tagli- γ -11 蛋白结构

Fig.2 Tagli- γ -11 protein structure in wheat

2.3 pGBKT7-Tagli- γ -11 诱饵表达载体的构建及自激活检测

将小麦 Tagli- γ -11 基因的 cDNA 序列连接到载体 pGBKT7 上,经 *Nde* I 和 *Bam* H I 双酶切检测(图 3)以及测序,pGBKT7-Tagli- γ -11 诱饵载体构建成功。



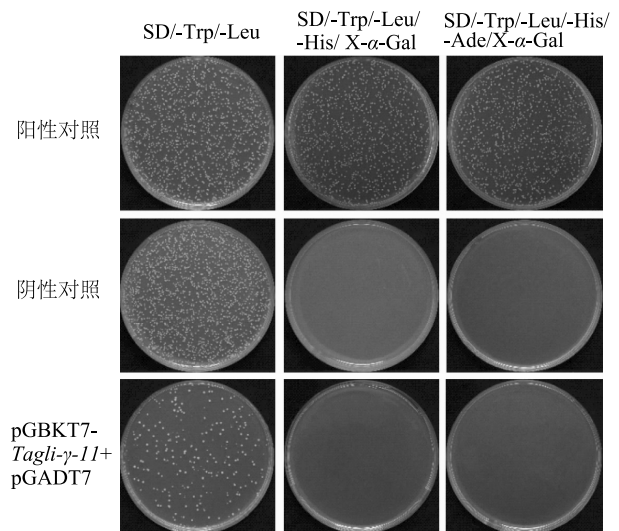
M: DL10000; 1: pGBKT7-Tagli- γ -11 诱饵载体; 2: 被限制性内切酶 *Nde* I 和 *Bam* H I 消化后的片段。

图 3 pGBKT7-Tagli- γ -11 的 *Nde* I 和 *Bam* H I 酶切鉴定

Fig.3 Restriction digestion verification of pGBKT7-Tagli- γ -11 with *Nde* I and *Bam* H I

分别将阳性对照(pGBKT7-p53+pGADT7-T)、阴性对照(pGBKT7-Lam+pGADT7-T)以及 pGBKT7-Tagli- γ -11+pGADT7 转化 Y2H Gold 酵母感受态细胞。结果(图 4)显示,3 种质粒转化酵母菌在二缺板上均能长出菌落。阳性对照在三缺板和含 AbA

抗性的四缺板上均能够长出菌落,含 pGBKT7-Tagli- γ -11 重组载体的酵母菌和阴性对照在三缺板和含 AbA 抗性的四缺板上不能长出菌落。上述结果说明这 3 种质粒已成功转入到酵母菌株中,Tagli- γ -11 编码的蛋白质不具有自激活活性。



SD/-Trp/-Leu; 二缺板; SD/-Trp/-Leu/-His; 三缺板; SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade; 四缺板。X- α -Gal; 酵母半乳糖苷酶的显色底物。

图 4 pGBKT7-Tagli- γ -11 诱饵载体转化酵母自激活检测

Fig.4 Self-activation detection of yeast transformed with the pGBKT7-Tagli- γ -11 bait vector

2.4 Tagli- γ -11 互作蛋白质的筛选、鉴定

将郑麦 158 文库质粒和 pGBKT7-Tagli- γ -11 诱

饵质粒混合转化至 Y2H Gold 酵母菌株中,依次涂布于三缺板和含 AbA 抗性的四缺板上,经过 2 次筛选,共获得 99 个蓝色单克隆菌落(图 5)。



-表示阴性对照;+表示阳性对照。

图 5 小麦 *Tagli- γ -11* 互作蛋白质的筛选

Fig.5 Screening for interacting proteins of wheat *Tagli- γ -11*

将单克隆菌落提取质粒、测序后进行 BLAST 比对分析,最终确定 8 个与 *Tagli- γ -11* 互作的候选蛋白质,包括半胱氨酸蛋白酶、果糖二磷酸醛缩酶、富含半胱氨酸和跨膜结构域蛋白 1 和 (1,3 : 1,4)- β -D-葡聚糖酶,还包括与植物生殖生长(尤其是花粉和籽粒生长发育)有关的生长素响应因子 ARF17-

like、细胞数目调控因子 CNR8-like 以及与植物逆境胁迫响应有关的泛素结构域蛋白 DSK2b 和转录因子 PIF1-like(表 1)。这些蛋白质主要涉及小麦籽粒中淀粉和贮藏蛋白(如醇溶蛋白)的合成与降解以及其他生殖生长等。

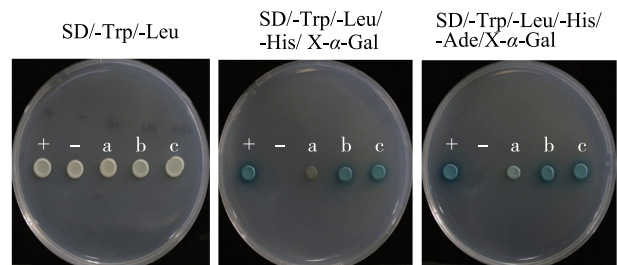
表 1 通过酵母双杂交系统筛选出与 *Tagli- γ -11* 互作的蛋白质

Table 1 Screening for proteins interacting with *Tagli- γ -11* using the yeast two-hybrid system

序号	登录号	注释
1	XM_044577944.1	半胱氨酸蛋白酶
2	XM_044518121.1	果糖二磷酸醛缩酶
3	XM_044546254.1	富含半胱氨酸和跨膜结构域蛋白 1
4	XM_044550279.1	(1,3 : 1,4)- β -D-葡聚糖酶
5	XM_044499954.1	细胞数目调控因子 CNR8-like
6	XM_044586904.1	生长素响应因子 ARF17-like
7	XM_044474147.1	泛素结构域蛋白 DSK2b
8	XM_044597895.1	转录因子 PIF1-like

2.5 *Tagli- γ -11* 与候选互作蛋白质的回转验证

将筛选的 3 个代表性阳性克隆质粒(登录号分别为: XM_044518121.1、XM_044546254.1、XM_044550279.1)分别与诱饵载体 pGBKT7-*Tagli- γ -11* 共转化酵母感受态细胞。将共转化后的酵母细胞分别涂布于二缺板、三缺板以及含 AbA 抗性的四缺板上培养。结果(图 6)显示,在四缺板上均长出蓝色菌落,推测这 3 个候选蛋白质均与 *Tagli- γ -11* 存在互作关系。



SD/-Trp/-Leu: 二缺板; SD/-Trp/-Leu/-His: 三缺板; SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade: 四缺板。X- α -Gal: 酵母半乳糖苷酶的显色底物。-表示阴性对照;+表示阳性对照。a: XM_044518121.1; b: XM_044546254.1; c: XM_044550279.1。

图 6 小麦 *Tagli- γ -11* 蛋白与 3 个代表性候选互作蛋白质的回转验证

Fig.6 Rotation validation of *Tagli- γ -11* and three representative candidate interacting proteins in wheat

3 讨论

γ -醇溶蛋白约占醇溶蛋白的 30%, 其对面粉的功能性质具有关键影响, 决定了面粉的最终用途^[2]。近年来, 由于醇溶蛋白基因结构复杂、拷贝数众多且存在大量假基因, 其对面团强度的作用机制研究仍不够深入。因此, 单个醇溶蛋白对面团强度的具体影响尚未明确, γ -醇溶蛋白基因的功能解析与调控机制研究也相对有限。

已有研究结果表明, *Tagli- γ -11* 基因在小麦籽粒发育过程中显著表达, 可能对提高小麦的面团强度有重要作用^[12]。在此基础之上, 本研究首先克隆了小麦 *Tagli- γ -11* 基因, 并通过分析 *Tagli- γ -11* 蛋白的结构, 在该蛋白质的重复 II 区第 133~141 aa 位置发现 1 个 CD 表位(PQQSFPQQQ)。小麦中醇溶蛋白的 CD 表位是导致乳糜泻的重要原因。因此, 本研究后期可通过敲除或者沉默醇溶蛋白的方法降低 CD 表位, 改善面团品质, 并将其应用于优质麦育种的遗传改良当中, 从而获得对乳糜泻患者毒性很低甚至无毒的小麦品系, 进而生产无醇溶蛋白或低醇溶蛋白的小麦品种, 满足特殊人群(例如, 乳糜泻患者)的饮食需求。

另外, 通过酵母双杂技术筛选 *Tagli- γ -11* 的互作蛋白质, 共获得了 8 个可能与 *Tagli- γ -11* 互作的蛋白质, 它们分别是半胱氨酸蛋白酶、果糖二磷酸醛缩酶、富含半胱氨酸和跨膜结构域蛋白 1、(1,3:1,4)- β -D-葡聚糖酶、生长素响应因子 ARF17-like、细胞数目调控因子 CNR8-like、泛素结构域蛋白 DSK2b 和转录因子 PIF1-like。这些蛋白质主要参与小麦种子中淀粉和贮藏蛋白(特别是醇溶蛋白)的合成与降解, 并涉及生殖生长、逆境胁迫响应等过程。半胱氨酸蛋白酶是一类重要的蛋白酶, 参与植物种子贮藏蛋白降解等过程^[16]。基于其与 *Tagli- γ -11* 的互作关系, 我们推测该蛋白酶可能协同 *Tagli- γ -11* 参与小麦种子中醇溶蛋白的降解调控。半胱氨酸是 γ -醇溶蛋白的重要组成部分, 对维持其结构稳定性和功能至关重要^[2]。在小麦种子发育过程中, *Tagli- γ -11* 可能通过与富含半胱氨酸和跨膜结构域蛋白 1 相互作用, 促进醇溶蛋白的合成, 最终影响小麦的品质。果糖二磷酸醛缩酶通过糖酵解、磷酸戊糖途径以及碳同化等参与淀粉合成^[17-18], 推测该酶可能与 *Tagli- γ -11* 通过光合作用参与小麦种子中淀粉的合

成。(1,3:1,4)- β -D-葡聚糖酶是一种高温水解酶, 它可以降解淀粉生成麦芽糖和少量葡萄糖^[19], 推测此酶可能与 *Tagli- γ -11* 互作, 参与小麦种子中淀粉的降解过程。另外, 生长素响应因子 ARF17-like 通过影响花粉管的果胶壁修饰调控花粉管的生长^[20]; 细胞数目调控因子 CNR8-like 通过改变细胞数量影响植株生长, 改变器官大小^[21]; 泛素结构域蛋白 DSK2b 可负向调控水稻叶瘟和渗透胁迫抗性^[22]; 转录因子 PIF1-like 属于 bHLH(Basic helix-loop-helix) 转录因子家族的第 15 亚族, 在植物信号调控网络中发挥重要的作用^[23]。上述所有互作关系及其潜在功能关联, 均需后续试验验证。

综上, 本研究成功克隆了小麦 γ -醇溶蛋白基因 *Tagli- γ -11*, 并在 *Tagli- γ -11* 蛋白重复 II 区的第 133~141 aa 位置发现 1 个乳糜泻表位(PQQSFPQQQ)。利用酵母双杂交技术, 筛选获得了 8 个与小麦籽粒中贮藏蛋白和淀粉的合成与降解以及生殖生长过程相关的候选互作蛋白质。对 3 个代表性候选蛋白质[富含半胱氨酸和跨膜结构域蛋白 1、果糖二磷酸醛缩酶、(1,3:1,4)- β -D-葡聚糖水解酶]进行回转变证, 结果证实其均与 *Tagli- γ -11* 存在互作关系。

参考文献:

- [1] MA W J, YU Z T, SHE M Y, et al. Wheat gluten protein and its impacts on wheat processing quality[J]. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 2019, 6(3):279-287.
- [2] LIU D, YANG H M, ZHANG Z H, et al. An elite γ -gliadin allele improves end-use quality in wheat[J]. *The New Phytologist*, 2023, 239(1):87-101.
- [3] ZHOU Z F, LIU C C, QIN M M, et al. Promoter DNA hypermethylation of *TaGli-2.1* positively regulates gluten strength in bread wheat[J]. *Journal of Advanced Research*, 2022, 36:163-173.
- [4] CHEN Q, YANG C F, ZHANG Z H, et al. Unprocessed wheat γ -gliadin reduces gluten accumulation associated with the endoplasmic reticulum stress and elevated cell death[J]. *The New Phytologist*, 2022, 236(1):146-164.
- [5] LUDVIGSSON J F, LEFFLER D A, BAI J C, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms[J]. *Gut*, 2013, 62(1):43-52.
- [6] LUDVIGSSON J F, BAI J C, BIAGI F, et al. Diagnosis and management of adult coeliac disease: guidelines from the British Society of Gastroenterology[J]. *Gut*, 2014, 63(8):1210-1228.
- [7] SOLLID L M, QIAO S W, ANDERSON R P, et al. Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules[J]. *Immunogenetics*, 2012, 64(6):

- 455-460.
- [8] WANG D W, LI D, WANG J J, et al. Genome-wide analysis of complex wheat gliadins, the dominant carriers of celiac disease epitopes[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7:44609.
- [9] GIL-HUMANES J, PISTÓN F, TOLLEFSEN S, et al. Effective shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(39):17023-17028.
- [10] BARRO F, IEHISA J C M, GIMÉNEZ M J, et al. Targeting of prolamins by RNAi in bread wheat; effectiveness of seven silencing-fragment combinations for obtaining lines devoid of coeliac disease epitopes from highly immunogenic gliadins[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(3):986-996.
- [11] GUZMÁN-LÓPEZ M H, SÁNCHEZ-LEÓN S, MARÍN-SANZ M, et al. Oral consumption of bread from an RNAi wheat line with strongly silenced gliadins elicits no immunogenic response in a pilot study with celiac disease patients[J]. *Nutrients*, 2021, 13(12):4548.
- [12] 晁岳恩,王沙沙,杨 剑,等. 影响小麦面团强度的贮藏蛋白基因表达研究[J]. *麦类作物学报*, 2023, 43(7):857-864.
- [13] CHEN J, ZHOU J H, SANDERS C K, et al. A surface display yeast two-hybrid screening system for high-throughput protein interactome mapping[J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 390(1):29-37.
- [14] 王沙沙,黄绍敏,宋 晓,等. 小麦氮素利用效率基因 *TaARE1-A* 等位变异与产量相关性状之间的关系分析[J]. *河南农业科学*, 2023, 52(12):14-21.
- [15] 宋 晓,黄绍敏,张珂珂,等. 小麦硝酸盐转运蛋白 TaNRT1.1-1A 转录活性检测及互作蛋白筛选[J]. *麦类作物学报*, 2023, 43(10):1227-1233.
- [16] 莫黎杰,刘夏瞳,李 慧,等. 植物半胱氨酸蛋白酶在植物生长发育中的功能研究[J]. *生物技术通报*, 2021, 37(6):202-212.
- [17] UEMATSU K, SUZUKI N, IWAMAE T, et al. Increased fructose 1,6-bisphosphate aldolase in plastids enhances growth and photosynthesis of tobacco plants[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(8):3001-3009.
- [18] 苏在兴,李 强,唐 维,等. 甘薯果糖-1,6-二磷酸醛缩酶 5 基因 (*IBFBA5*) 的克隆与生物信息学分析[J]. *分子植物育种*, 2015, 13(11):2469-2476.
- [19] 王 敏,李 丹. 环葡聚糖水解酶的应用研究[J]. *黑龙江科技信息*, 2009(17):24.
- [20] 刘至洋. 拟南芥生长素响应因子 ARF17 调控花粉管的生长[D]. 上海:上海师范大学, 2016.
- [21] GUO M, RUPE M A, DIETER J A, et al. Cell number regulator 1 affects plant and organ size in maize; implications for crop yield enhancement and heterosis[J]. *The Plant Cell*, 2010, 22(4):1057-1073.
- [22] 丁杰荣,马雅美,潘发枝,等. 泛素受体蛋白 OsDSK2b 负向调控水稻叶瘟和渗透胁迫抗性[J]. *作物学报*, 2023, 49(6):1466-1479.
- [23] 荐红举,尚丽娜,金中辉,等. 马铃薯 PIF 家族成员鉴定及其对高温胁迫的响应分析[J]. *作物学报*, 2022, 48(1):86-98.

(责任编辑:王 妮)