

小麦燕麦类似蛋白 TaALP-7D 自激活活性检测及其互作蛋白分析

何宁¹, 王沙沙¹, 黄超¹, 汪庆昌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:为解析燕麦类似蛋白(avenin-like proteins, ALPs)在小麦品质中的调控机制,从小麦品种郑麦158中克隆了小麦燕麦类似蛋白基因*TaALP-7D*,并对其进行了表达分析及其互作蛋白质筛选,确定与其互作的关键候选蛋白。结果表明,在小麦不同组织中,*TaALP-7D*基因在籽粒不同发育时期的相对表达量均最高,推测*TaALP-7D*基因可能参与小麦种子发育过程中面团强度相关基因的调控。利用酵母双杂交技术共筛选了6个可能与*TaALP-7D*互作的蛋白,分别是半胱氨酸水解酶1(XM_044496235.1)、F-box蛋白SKP2A-like(XM_044518121.1)、非特异性脂转移蛋白LTP1-like(XM_044488525.1)和1,3-β-葡聚糖苷酶(XM_044596055.1)以及与植物激素响应有关的乙烯响应转录因子TaERF1-like(XM_044549609.1)和茉莉酸诱导的氧化酶JOX2-like(XM_044519612.1)。经回转变证,5个代表性候选蛋白(半胱氨酸水解酶1、F-box蛋白SKP2A-like、非特异性脂转移蛋白LTP1-like、1,3-β-葡聚糖苷酶和乙烯响应转录因子TaERF1-like)与*TaALP-7D*均存在互作关系,推测*TaALP-7D*可能通过与这些蛋白互作,参与了小麦籽粒中贮藏蛋白(如醇溶蛋白)的降解、淀粉的合成以及其他与激素响应有关的过程。

关键词:小麦;燕麦类似蛋白;*TaALP-7D*基因;表达分析;酵母双杂交;回转变证

中图分类号:S512.1;S330

文献标识码:A

文章编号:1009-1041(2025)12-1599-07

Detection of Self-Activation Activity and Analysis of Interacting Proteins of Avenin-Like Protein TaALP-7D in Bread Wheat

HE Ning¹, WANG Shasha¹, HUANG Chao¹, WANG Qingchang¹, SONG Xiao², CHAO Yuen¹

(1. Wheat Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences/Henan Province Key Laboratory of Wheat

Biology, Zhengzhou, Henan 450002, China; 2. Institute of Plant Nutrient and Environmental Resources,

Henan Academy of Agricultural Science, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: In order to further analyze the regulation mechanism of avenin-like proteins in flour quality of wheat, the *TaALP-7D* gene was successfully cloned from Zhengmai 158 (strong dough strength). Relative expression patterns of different tissues showed that the *TaALP-7D* gene was highly expressed at different developmental stages of the kernels. It was suggested that *TaALP-7D* gene may be involved in the regulation of genes related to dough strength during wheat seed development. Six possible candidate interactive proteins of *TaALP-7D* were screened from Zhengmai 158 cDNA library by the yeast two-hybrid system: cysteine hydrolase 1 (XM_044496235.1), F-box protein SKP2A-like (XM_044518121.1), non specific lipid transfer protein LTP1-like (XM_044488525.1), and 1,3-β-glucosidase (XM_044596055.1), and also the ethylene response transcription factor TaERF1-like (XM_044549609.1) and jasmonic acid-induced oxidase JOX2-like (XM_044519612.1) related to plant hor-

收稿日期:2024-12-27 修回日期:2025-01-19

基金项目:河南省重大科技专项(241100110300);河南省中央引进地方科技发展资金项目(Z20241471126);河南省农科院自主创新项目(2025ZC03)

第一作者 E-mail:hening0371@126.com(何宁);shasha0391@126.com(王沙沙,共同第一作者)

通讯作者 E-mail:nkychaoyuen@163.com(晁岳恩)

mone response. The rotation validation assays of the five representative candidate proteins (cysteine hydrolase 1, F-box protein SKP2A like, non-specific lipid transfer protein LTP1-like, 1,3- β -glucosidase, and ethylene response transcription factor TaERF1-like) indicated that all of them interacted with TaALP-7D. Therefore, it is speculated that TaALP-7D probably interacts with these candidate proteins and be mainly involved in the degradation of storage proteins (such as gliadins), synthesis of starch in wheat kernels, as well as other processes of plant hormone response

Keywords: *Triticum aestivum* L.; Avenin-like proteins; *TaALP-7D* gene; Expression analysis; Yeast two-hybrid system; Rotation validation

小麦 (*Triticum aestivum* L.) 作为一种重要的食物来源, 是加工成面包、蛋糕、饼干、面条等食品的主要原材料^[1]。小麦的加工性能很大程度上取决于小麦面团的流变学特性, 并与小麦贮藏蛋白的组分关系密切^[2-3]。近年来, 燕麦类似蛋白 (avenin-like proteins, ALPs) 作为一种新型的贮藏蛋白在麦类作物 (大麦、小麦、黑麦) 的品质研究中备受关注^[4-6]。该蛋白为 30 kDa 以下的低分子量 (low molecular weight, LMW) 醇溶蛋白, 属于一个新的醇溶蛋白家族^[7]。ALPs 可分为 a 型和 b 型^[8]: a 型含有 14 个半胱氨酸残基, 可以形成 7 个链内二硫键, 是典型的单体 LMW 醇溶蛋白; b 型 ALPs 包含 18 或 19 个半胱氨酸残基, 可形成 8 个分子内二硫键^[6]。

目前, 许多学者对于 ALPs 的研究主要集中在 b 型 ALPs 的功能分析、分子标记开发等方面^[1,9-12]。ALPs 基因属于一个多基因家族, 具有种子胚乳特异性, 与麦谷蛋白基因和醇溶蛋白基因在小麦种子发育过程中具有相似的表达模式^[9]。在小麦面粉中掺入 b 型 ALPs 会对面团强度产生正向作用^[10]。通过过表达 b 型 ALPs, SDSS (十二烷基硫酸钠沉降) 体积显著增加, 面团的弹性、混合耐受性和抗延伸性均提高, 小麦的加工品质进一步改善, 推测可能是 b 型 ALP 蛋白通过链间二硫键整合到谷蛋白聚合物中所致^[1]。采用定点诱变技术产生突变 b 型 ALPs, 在其蛋白 C 端的一个 Tyr 密码子被 Cys 密码子取代后, 面团特性可显著提高^[11]。Song 等^[12]克隆了 b 型 ALP 基因 (GenBank 登录号 JN622144) 上游一个 1 644 bp 的启动子序列, 该序列中与 RY 基序重叠的 esp 样元件可能在启动子的调节功能中发挥了关键作用。

随着 b 型 ALPs 基因遗传变异研究的不断深入, 其新的等位基因不断被发现, 其与小麦品质的关系也被揭示^[13-15]。Chen 等^[6]从普通小麦中克

隆 *TaALP-4A*、*TaALP-7A* 和 *TaALP-7D* 基因, 同时通过对 102 份小麦材料分析, 发现 *TaALP-7A1* 和 *TaALP-7A2* 两个等位基因与小麦的加工品质显著相关。Cao 等^[13]从 108 株节节麦中发掘了 13 个 b 类等位基因 (*TaALPb7D-A-M*), 共检测到与这些基因相关的 15 个核苷酸发生变化, 这些变化可导致 11 个氨基酸发生变异。Zhang 等^[14]从普通小麦中鉴定出 15 个 *TaALP* 基因, 并将其分为 a 型、b 型和 c 型, 对应的基因长度分别为 520、850 和 470 bp, 每 1 种类型可再分为 x 和 y 两种类型; 在此基础上, 进一步在野生二粒小麦的 *TdALP-bx-7AS*、*TdALP-ax-7AS*、*TdALP-ay-7AS* 和 *TdALP-ax-4AL* 基因上分别发现 25、13、7 和 4 个等位变异位点, 这些等位变异可用于面包小麦的品质育种。目前, 对 ALPs 功能的研究已做得较深入, 但对 ALPs 调控机制的分析还未见报道。

本课题组前期通过对黄海麦区 40 个小麦品种灌浆中期的籽粒进行 RNA-seq 分析, 鉴定出 14 个 ALP 基因和 24 个 ALP 等位变异, 其中 13 个 ALP 基因对面筋强度有重要作用^[15]。为进一步探究调控这些 ALP 基因的分子机制, 本研究从小麦品种郑麦 158 中克隆了小麦燕麦类蛋白基因 *TaALP-7D* (*TraesCS7D02G032100*), 并对其进行表达分析, 确定与其互作的关键候选蛋白, 以期作为优质小麦品种选育和品质调控提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料及试验试剂

选取小麦品种郑麦 158 三叶期的根、茎、叶, 孕穗期的穗, 以及花后 7、14、21、28、35 和 42 d 的籽粒作为供试材料, 取样液氮速冻后, 置于 -80°C 冻存。

基因克隆所需主要试剂: TRIzol (TIANGEN, DP424) 和反转录试剂盒 (TIANGEN,

KR103); 酵母双杂交技术所需试剂: 各种营养缺陷型培养基 (TaKaRa) (SD/-Trp/-Leu 二缺板、SD/-Trp/-Leu/-His 三缺板和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 四缺板) 和酵母菌株 Y2H Gold (TaKaRa); 阳性对照 pGBKT7-P53^[16]、阴性对照 pGBKT7-Lam^[16]、载体 (pGBKT7 和 pGADT7) 等均购自 Clontech 公司; 郑麦 158 酵母双杂交 cDNA 文库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。

1.2 小麦 TaALP-7D 基因克隆

利用天根生化科技(北京)有限公司生产的 TR-Izol 试剂和反转录试剂盒进行郑麦 158 总 RNA 的提取, 并将其反转录获得 cDNA。根据 TaALP-7D (*TraesCS7D02G032100*) 基因的 cDNA 序列^[14] 设计特异性引物 (F₁: 5'-ATGAAGACCAITGTTGATCCTCG-3'; R₁: 5'-TTAGCAGGTACCACCAACACA-3') 用于 PCR 扩增反应。PCR 产物连接至 pMD18-T 克隆载体, 菌落 PCR 鉴定阳性克隆后送到生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.3 小麦 TaALP-7D 基因的表达模式分析

根据已获得的 TaALP-7D 的 cDNA 序列, 设计特异性引物 (F₂: 5'-GCCATGCCGTCTGCG-GT-3'; R₂: 5'-AAGCACCATCCTTCTTATCT-CAATG-3')。随后提取郑麦 158 不同组织材料的总 RNA, 将其反转录成 cDNA 后进行实时荧光扩增反应。qRT-PCR 扩增体系和扩增程序参考王沙沙等^[17] 方法, 小麦 β -actin 为内参基因, 其特异性引物为 (F₃: 5'-TGCTATCCTTCGTTTGGAC-CTT-3'; R₃: 5'-AGCGGTTGTTGTGAGGGAGT-3'), 每个样品为 3 次生物学重复。试验结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法对原始数据进行处理、分析, 确定 TaALP-7D 基因在各组织中的相对表达情况。

1.4 pGBKT7-TaALP-7D 载体构建、自激活检测

根据小麦 TaALP-7D 基因 cDNA 序列, 设计携带 NdeI 和 BamHI 两个限制性酶切位点的特异性引物 (F₄: 5'-CATATGATGAAGACCATG-TTGATCC-3'; R₄: 5'-GGATCCTTAGCAGGTACCAC-CAAC-3')。以小麦 TaALP-7D-pMD18-T 质粒 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增, 获得带有酶切位点的目的片段。然后将目的片段通过酶切、连接等方法连接至 pGBKT7 载体上, 获得重组载体, 菌落 PCR 鉴定阳性克隆后, 再测序验证其准确性。

将 pGBKT7-TaALP-7D 转化至 Y2H Gold 酵母菌株, 并将酵母菌依次涂布于二缺板、三缺板以及含 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, 设置阴性对照和阳性对照。以此验证 pGBKT7-TaALP-7D 的自激活活性。

1.5 TaALP-7D 互作蛋白分析及回转验证

参照宋晓等^[18] 方法将已构建好的郑麦 158 酵母双杂交文库质粒和诱饵 pGBKT7-TaALP-7D 重组质粒共转化 Y2H Gold 酵母感受态细胞内, 并将转化后的酵母菌液依次涂布于含 AbA 抗性的三缺板和四缺板上, 筛选阳性克隆。设置阳性对照和阴性对照, 3 次重复。利用 AD-F/AD-R (DF: 5'-CGGCTAGTAAAATTGATGATGGTAATAATTCA-3'; AD' R: 5'-CACAGTTGAAGTGAAGTTCGCG-3') 特异性引物对候选蛋白进行 PCR 鉴定后, 送到生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序、分析。

将构建好的 pGBKT7-TaALP-7D 质粒与 pGADT7-候选互作蛋白质粒利用上述同样的方法进行酵母转化和酵母菌的筛选, 观察菌落生长情况, 如长出蓝色菌落, 则说明 TaALP-7D 与候选蛋白之间存在互作关系, 否则说明不存在互作关系。

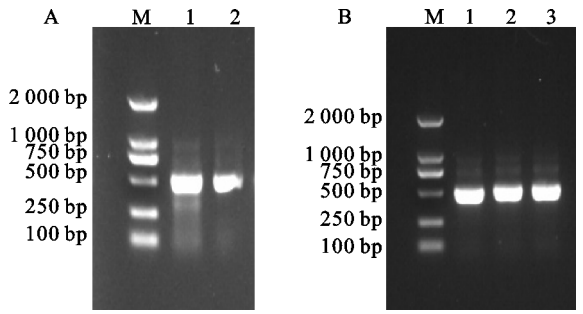
2 结果与分析

2.1 小麦 TaALP-7D 基因克隆、cDNA 序列的获得

根据小麦 TaALP-7D 基因序列, 以郑麦 158 的 cDNA 为模板, 利用 F₁/R₁ 引物 PCR 扩增目的片段后, 连接至 pMD18-T 克隆载体, 菌落 PCR 筛选阳性克隆并测序, 最终获得长度为 522 bp 的小麦 TaALP-7D 基因的 cDNA 序列 (图 1A), 利用 pGBKT7 载体进一步验证此结果 (图 1B)。

2.2 小麦 TaALP-7D 基因的表达模式

对郑麦 158 不同组织材料的 cDNA 样品进行 qRT-PCR 检测发现, TaALP-7D 基因在郑麦 158 花后 7、14、21、28 和 35 d 籽粒中的表达水平显著高于根、茎、叶及穗中的表达水平 (图 2), 说明该基因主要在小麦籽粒发育过程中高表达。郑麦 158 为面团强度较高的小麦品种^[19], 因此推测 TaALP-7D 基因可能参与小麦籽粒发育过程中面团品质相关基因的调控。

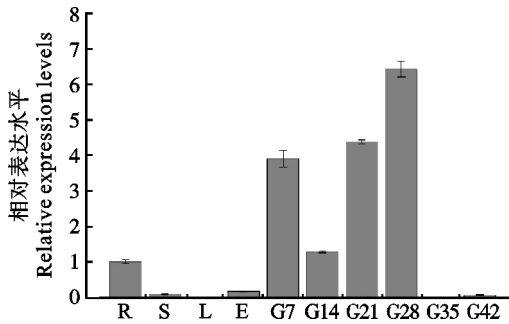


A: *TaALP-7D*-pMD18-T 菌落 PCR 产物的电泳检测; B: pGBKT7-*TaALP-7D* 菌落 PCR 电泳检测; M: Maker.

A: Electrophoresis detection of PCR products of *TaALP-7D*-pMD18-T; B: Electrophoresis analysis of PCR products of pGBKT7-*TaALP-7D*; M: Maker.

图 1 菌落 PCR 产物的电泳检测

Fig. 1 Electrophoresis detection of PCR products from colony



R: 根; S: 茎; L: 叶; E: 穗; G7~G42: 花后 7~42 d 的籽粒。

R: Root; S: Stem; L: Leaf; E: Ear; G7-G42: Grains from 7 days to 42 days after anthesis.

图 2 郑麦 158 不同组织材料中 *TaALP-7D* 基因的表达模式

Fig. 2 Relative expression levels of *TaALP-7D* gene in different tissues of Zhengmai 158

2.3 pGBKT7-*TaALP-7D* 诱饵表达载体的构建及自激活检测

将小麦 *TaALP-7D* 基因的 cDNA 序列连接到载体 pGBKT7 上, 经菌落 PCR 检测(图 1B)以及测序, 成功构建 pGBKT7-*TaALP-7D* 诱饵载体。将 pGBKT7-*TaALP-7D* 重组载体、阳性对照和阴性对照分别与 pGADT7 转化 Y2H Gold 酵母感受态细胞。结果显示, 3 种质粒转化酵母菌在二缺板上均能长出菌落, 说明这 3 种质粒已成功转入到酵母菌株中(图 3)。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-*TaALP-7D* 重组载体的酵母菌和阴性对照在三缺板和四缺板上不能长出菌落, 说明 *TaALP-7D* 编码的蛋白不具有自激活活性。

2.4 *TaALP-7D* 互作蛋白的筛选、鉴定

将郑麦 158 文库质粒和 pGBKT7-*TaALP-7D* 诱饵质粒混合转化 Y2H Gold 酵母菌株, 并依次涂布于三缺板和含 AbA 抗性的四缺板上, 经 2 次筛选, 共获得 96 个蓝色单克隆菌落(图 4)。

将单克隆菌落提取质粒测序后并进行 BLAST 比对分析, 最终确定 6 个与 *TaALP-7D* 互作的候选蛋白质, 包括与醇溶蛋白降解有关的半胱氨酸水解酶 1(XM_044496235.1)、与植物花器官发育有关的 F-box 蛋白 SKP2A-like(XM_044518121.1)、富含半胱氨酸的小分子碱性脂质

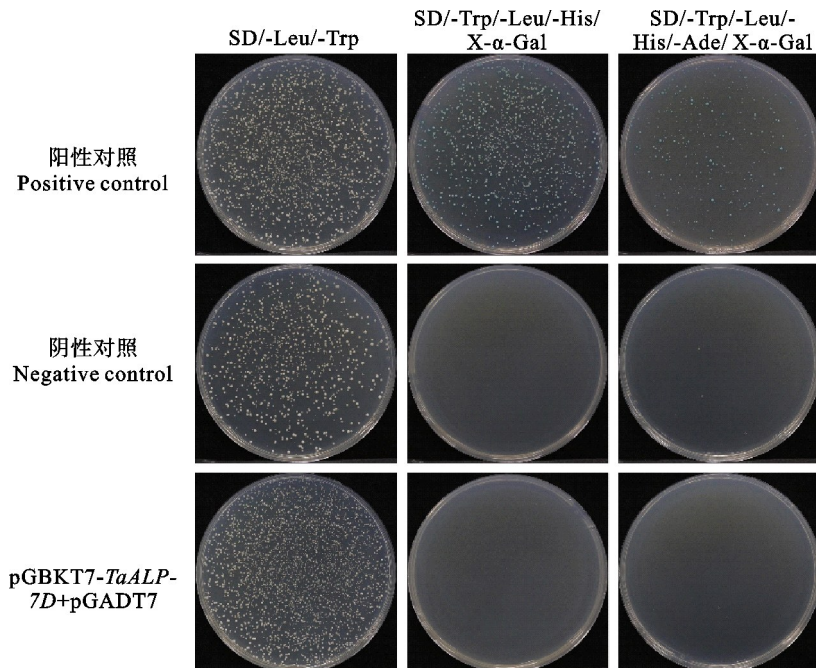
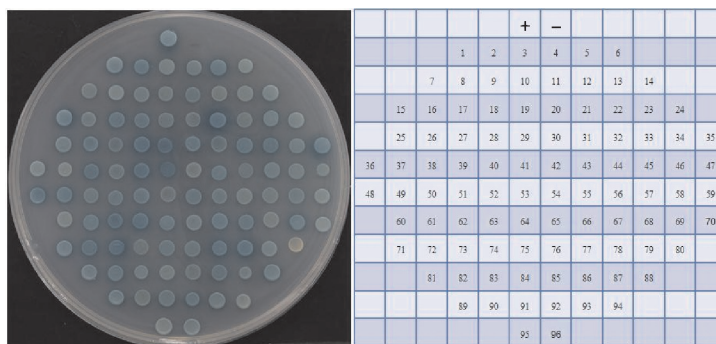


图 3 pGBKT7-*TaALP-7D* 诱饵载体转化酵母自激活检测

Fig. 3 Detection of self-activation of pGBKT7-*TaALP-7D* bait vector



—: 阴性对照; +: 阳性对照。
 —: Negative control; +: Positive control.

图 4 小麦 TaALP-7D 互作蛋白的四缺板筛选
 Fig. 4 Screening of interacting protein for TaALP-7D in wheat

结合蛋白、与植物种子发育有关的非特异性脂转移蛋白 LTP1-like (XM_044488525. 1) 和 1,3-β-葡聚糖苷酶(XM_044596055. 1) 以及与植物激素响应相关且参与小麦籽粒淀粉合成的乙烯响应转录因子 TaERF1-like(XM_044549609. 1) 和茉莉酸诱导的氧化酶 JOX2-like(XM_044519612. 1) (表 1)。推测这些蛋白质主要参与小麦籽粒中贮藏蛋白(如醇溶蛋白)降解、淀粉的合成以及其他与激素响应有关的过程。

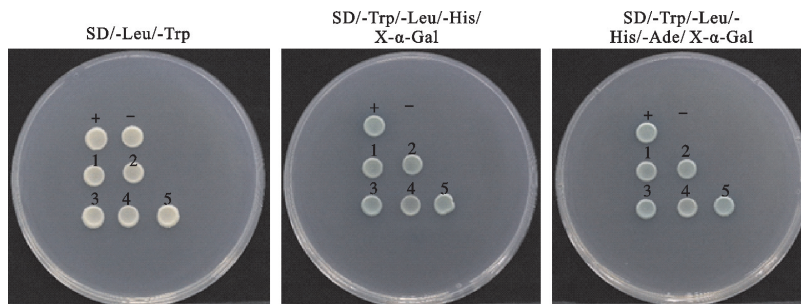
2.5 TaALP-7D 与候选互作蛋白质回转验证

将筛选的 5 个代表性阳性克隆质粒(XM_044496235. 1、XM_044518121. 1、XM_044488525. 1、XM_044596055. 1 和 XM_044549609. 1) 分别和诱饵载体 pGBKT7-TaALP-7D 转化酵母菌株,并依次涂布于二缺板、三缺板以及含 AbA 抗性的四缺板上培养。结果显示,这 5 个克隆均能长出蓝色克隆(图 5),推测这 5 个候选蛋白质均与 TaALP-7D 存在互作关系。

表 1 通过酵母双杂交系统筛选出与 TaALP-7D 互作的蛋白质

Table 1 Screening of the interacting proteins of TaALP-7D by the yeast two-hybrid system

序号 Number	登录号 Accession number	注释 Annotation
1	XM_044496235. 1	半胱氨酸水解酶 1 Cysteine hydrolase 1
2	XM_044518121. 1	F-box 蛋白 SKP2A-like F-box protein SKP2A-like
3	XM_044488525. 1	非特异性脂转移蛋白 LTP1-like Non-specific lipid transfer protein LTP1-like
4	XM_044596055. 1	1,3-β-葡聚糖苷酶 1,3-β-glucanase
5	XM_044549609. 1	乙烯响应转录因子 TaERF1-like Ethylene response transcription factor TaERF1-like
6	XM_044519612. 1	茉莉酸诱导的氧化酶 JOX2-like Jasmonic acid-induced oxidase JOX2-like



—: 阴性对照; +: 阳性对照。1~5 分别表示 XM_044496235. 1、XM_044518121. 1、XM_044488525. 1、XM_044596055. 1 和 XM_044549609. 1。
 —: Negative control; +: Positive control, 1-5 represent XM_044496235. 1, XM_044518121. 1, XM_044488525. 1, XM_044596055. 1, and XM_044549609. 1, respectively.

图 5 小麦 TaALP-7D 蛋白与 5 个代表性候选互作蛋白回转验证
 Fig. 5 Rotation validation of TaALP-7D and five representative candidate proteins in wheat

3 讨论

近年来,ALPs 作为一种新型的、非典型谷蛋白在麦类作物(大麦、小麦、黑麦等)研究中备受关注^[4-6],许多学者主要对其蛋白结构、基因家族、功能等方面做了大量的研究,尤其是对于 b 型 ALPs 正调控小麦面团品质的功能方面研究得较为深入。例如,过表达 b 型 ALPs 可显著增加 SDSS 体积,提高面团的加工品质;定点诱变 b 型 ALPs 的一个密码子(Tyr 被 Cy 取代),可显著提高面团的综合特性。在此基础之上,许多学者进一步研究了 b 型 ALPs 基因的遗传变异情况,在小麦中发掘了 *TaALP-7A1*、*TaALP-7A2* 两个优良等位基因^[6],在节节麦中发掘了 13 个类 b 等位基因(*TaALPb7D-A-M*)^[13],在野生二粒小麦 *TdALP* 基因中也发现多个等位变异位点^[14],这些基因的发现可为分子标记辅助育种、提高小麦的面团品质提供重要的依据。但是,对于 ALPs 的调控机制方面的研究还未见报道。鉴于此,本研究通过克隆小麦 *TaALP-7D* 基因,并对其在不同组织的 qRT-PCR 分析及其互作蛋白的筛选,结果表明,该基因在郑麦 158 不同发育时期籽粒中的表达水平高于根、茎、叶及穗中的表达水平。郑麦 158 为面团强度较高的小麦品种^[19],因此推测 *TaALP-7D* 基因可能在小麦籽粒发育过程参与了面团强度相关基因的调控。此外,通过酵母双杂技术筛选,共获得半胱氨酸蛋白酶 1、非特异性脂转移蛋白 LTP1-like 和 1,3- β -葡聚糖苷酶、与植物生殖生长(尤其是花器官的生长发育)有关的 F-box 蛋白 SKP2A-like 以及与植物激素响应有关、参与小麦种子内淀粉合成的乙烯响应转录因子 TaERF1-like 和茉莉酸诱导的氧化酶 JOX2-like 等 6 个可能与 *TaALP-7D* 互作的蛋白。其中,半胱氨酸蛋白酶作为一种蛋白质降解酶在植物生长发育过程中发挥重要的作用,可参与植物种子贮藏蛋白-醇溶蛋白的降解等过程^[20-22],推测此互作蛋白可能与 *TaALP-7D* 相互作用参与小麦种子中醇溶蛋白的降解,进而提高了贮藏蛋白中麦谷蛋白的比重,最终提高了小麦的面团强度。非特异性脂转移蛋白 nsLTPs 作为植物中大量存在的一类富含半胱氨酸的小分子碱性脂质结合蛋白可参与植物(水稻、芝麻)的种子发育过程^[23-24]。例如,抑制表达水稻 *OsLTP36* 基因,可导致水稻种子的胚乳变白,降低脂肪酸含量,最终影响种子质量^[23];

Song 等^[24]通过 *SiLTPs* 基因的表达分析以及加权基因共表达网络分析鉴定了 3 个芝麻种子高油含量的候选基因(*nsLTP1*、*SiLTP1.23* 和 *SiLTP1.28*),在拟南芥中过表达 *SiLTP1.23* 基因可显著增加种子中的油脂含量。本研究通过酵母双杂技术筛选到了 *TaALP-7D* 的互作蛋白 LTP1-like,推测 *TaALP-7D* 可能通过与 LTP1-like 互作参与小麦品质有关的发育过程。另有研究表明,乙烯响应转录因子 ERF 可通过基因启动子上的顺式作用元件参与耐旱、耐盐以及冷害等非生物胁迫的调控,也可参与小麦籽粒淀粉的合成。例如 2020 年,高天等利用 BSMV-VIGS(Barley stripe mosaic virus-virus induced gene-silencing)技术沉默 AP2/ERF 家族成员 *TaERFL1a* 基因,结果导致小麦的籽粒变小,使淀粉排列变得疏松和含量降低。由此推测 *TaERFL1a* 基因可能与 *TaALP-7D* 参与了小麦籽粒发育过程的淀粉合成过程^[25]。SKP2A 属于一种调控细胞周期的 F-box 蛋白,该蛋白在植物生长发育尤其是花器官发育等方面发挥了重要作用。研究发现,F-box 基因在花柱、花萼和雄蕊中显著表达^[26]。以上这些互作蛋白质主要涉及小麦种子中贮藏蛋白(如醇溶蛋白)的降解、淀粉的合成及其他激素胁迫等方面。因此,后期将需要更深入的研究来证实小麦 *TaALP-7D* 与这些候选蛋白之间的互作关系。

4 结论

本研究成功克隆了小麦燕麦类蛋白基因 *TaALP-7D*。小麦不同组织的 qRT-PCR 分析表明, *TaALP-7D* 基因主要在小麦种子不同发育时期高表达,推测 *TaALP-7D* 基因可能参与小麦种子发育过程面团强度相关基因的调控。通过酵母双杂技术筛选获得了 6 个与小麦籽粒中贮藏蛋白(如醇溶蛋白)的降解、淀粉的合成以及激素响应有关的候选蛋白,5 个代表性候选蛋白(半胱氨酸水解酶 1、F-box 蛋白 SKP2A-like、非特异性脂转移蛋白 LTP1-like、1,3- β -葡聚糖苷酶和乙烯响应转录因子 TaERF1-like)的回转验证再次证明了其与 *TaALP-7D* 均存在互作关系。

参考文献:

- [1] MA F Y, LI M, LI T T, et al. Overexpression of avenin-like b proteins in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) improves dough mixing properties by their incorporation into glutenin polymers [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e66758.

- [2] DOBRASZCZYK B J, MORGENSTERN M P. Rheology and the breadmaking process [J]. *Journal of Cereal Science*, 2003, 38(3): 229.
- [3] 孙杨柳. 小麦及其近缘物种中类燕麦储藏蛋白 Avenin-like 基因的克隆综述[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(8): 40.
SUN Y L. Review of cloning of wheat and related species class oat storage protein avenin-like gene [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015, 43(8): 40.
- [4] ARAGONCILLO C, SANCHEZ-MONGE R, SALCEDO G. Two groups of low molecular weight hydrophobic proteins from barley endosperm [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1981, 32(6): 1279.
- [5] SALCEDO G, SANCHEZ-MONGE R, ARGAMENTERIA A, et al. Low molecular weight prolamins: Purification of a component from barley endosperm [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1982, 30(6): 1155.
- [6] CHEN X Y, CAO X Y, ZHANG Y J, et al. Genetic characterization of cysteine-rich type-b avenin-like protein coding genes in common wheat [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 30692.
- [7] CLARKE B C, PHONGKHAM T, GIANIBELLI M, et al. The characterization and mapping of a family of LMW-gliadin genes: Effects on dough properties and bread volume [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106(4): 629.
- [8] KAN Y C, WAN Y F, BEAUDOIN F, et al. Transcriptome analysis reveals differentially expressed storage protein transcripts in seeds of *Aegilops* and wheat [J]. *Journal of Cereal Science*, 2006, 44(1): 75.
- [9] CHEN P, WANG C D, LI K X, et al. Cloning, expression and characterization of novel avenin-like genes in wheat and related species [J]. *Journal of Cereal Science*, 2008, 48(3): 734.
- [10] CHEN P, LI R, ZHOU R, et al. Heterologous expression and dough mixing studies of a novel cysteine-rich avenin-like protein [J]. *Cereal Research Communications*, 2010, 38(3): 406.
- [11] WANG Y Q, LI M, GUAN Y B, et al. Effects of an additional cysteine residue of avenin-like b protein by site-directed mutagenesis on dough properties in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(31): 8559.
- [12] SONG F, CUI C J, CHEN L, et al. Isolation and characterization of an endosperm-specific promoter from wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 2012, 67(11-12): 611.
- [13] CAO D, WANG H X, ZHANG B, et al. Genetic diversity of avenin-like b genes in *Aegilops tauschii* Coss [J]. *Genetica*, 2018, 146(1): 45.
- [14] ZHANG Y J, HU X, ISLAM S, et al. New insights into the evolution of wheat avenin-like proteins in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(52): 13312.
- [15] 晁岳愚, 李文旭, 王沙沙, 等. 黄淮麦区小麦中类燕麦蛋白的分类、等位基因及质量评价[J]. 麦类作物学报, 2024, 44(10): 1238.
CHAO Y E, LI W X, WANG S S, et al. Classification, alleles and quality evaluation of avenin-like proteins in common wheat from the Huang-Huai wheat region [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2024, 44(10): 1238.
- [16] 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.
- [17] 王沙沙, 黄超, 汪庆昌, 等. 小麦籽粒大小相关基因 *TaGS2* 克隆及功能分析[J]. 作物学报, 2022, 48(8): 1926.
WANG S S, HUANG C, WANG Q C, et al. Cloning and functional identification of *TaGS2* gene related to kernel size in bread wheat [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2022, 48(8): 1926.
- [18] 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.
SONG X, HUANG S M, ZHANG K K, et al. Transcriptional activity detection of wheat nitrate transporter TaNRT1.1-1A and screening of interacting proteins [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2023, 43(10): 1227.
- [19] 晁岳愚, 李文旭, 王沙沙, 等. 不同面团强度小麦品种差异表达贮藏蛋白基因分析[J]. 河南农业科学, 2022, 51(10): 17.
CHAO Y E, LI W X, WANG S S, et al. Analysis of differentially expressed storage protein genes between wheat cultivars with different dough strength [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2022, 51(10): 17.
- [20] CERCÓS M, GÓMEZ-CADENAS A, HO T D. Hormonal regulation of a cysteine proteinase gene, *EPB-1*, in barley aleurone layers: *Cis*- and *trans* acting elements involved in the co-ordinated gene expression regulated by gibberellins and abscisic acid [J]. *The Plant Journal*, 1999, 19(2): 107.
- [21] RICHAU K H, KASCHANI F, VERDOES M, et al. Subclassification and biochemical analysis of plant papain-like cysteine proteases displays subfamily-specific characteristics [J]. *Plant Physiology*, 2012, 158(4): 1583.
- [22] DIAZ-MENDOZA M, DOMINGUEZ-FIGUEROA J D, VELASCO-ARROYO B, et al. HvPap-1 C1A protease and HvCPI-2 cystatin contribute to barley grain filling and germination [J]. *Plant Physiology*, 2016, 170(4): 2511.
- [23] WANG X, ZHOU W, LU Z H, et al. A lipid transfer protein, OsLTPL36, is essential for seed development and seed quality in rice [J]. *Plant Science*, 2015, 239: 200.
- [24] SONG S N, YOU J, SHI L S, et al. Genome-wide analysis of *nsLTP* gene family and identification of SiLTPs contributing to high oil accumulation in sesame (*Sesamum indicum* L.) [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(10): 5291.
- [25] 高天, 徐梦军, 李鸽子, 等. TaERFL1a 转录因子在小麦籽粒淀粉合成中的功能研究[J]. 麦类作物学报, 2020, 40(5): 526.
GAO T, XU M J, LI G Z, et al. Function of TaERFL1a transcription factor in grain starch synthesis in common wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2020, 40(5): 526.
- [26] CHAI L J, GE X X, BISWAS M K, et al. Molecular analysis and expression of a floral organ-relative F-box gene isolated from 'Zigui Shatian' pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) [J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(7): 4429.