

· 热带作物 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20250028



主持人: 张洪亮, 徐 冉

Open Access

木薯 MeKIN10 与 MeRAV1/2 蛋白互作结构域鉴定

何娇妍[#], 陈 奥, 闫 语^{*}

(海南大学 热带农林学院/海南省耐盐作物生物技术重点实验室/南繁学院(三亚南繁研究院),
海南 三亚 572025 中国)

摘 要: 木薯(*Manihot esculenta*)是重要的粮食和能源作物,而干旱、高温等环境因素引起的氧化胁迫严重影响了木薯的产量和品质。已有研究表明,木薯能量感应激酶 MeKIN10 通过介导 MeRAV1/2 的蛋白磷酸化提高木薯的氧化胁迫抗性。蛋白互作是激酶介导蛋白磷酸化的关键,然而,MeKIN10 与 MeRAV1/2 的蛋白互作区域尚不明确。本研究通过蛋白结构域分析、AlphaFold3 互作预测及酵母双杂交实验,筛选了 MeKIN10 与 MeRAV1/2 的蛋白互作区域。结果显示,MeKIN10 的激酶结构域 STKc-AMPK-alpha 与 MeRAV1/2 均互作,而 UBA-SnRK1-plant 及 AMPKA-C 结构域只与 MeRAV2 互作。以上结果表明,MeKIN10 的激酶结构域 STKc-AMPK-alpha 是其与 MeRAV1/2 蛋白互作的关键结构域,进一步说明了 MeKIN10 与 MeRAV1/2 的蛋白互作是其介导 MeRAV1/2 磷酸化的关键。

关键词: 木薯; KIN10; RAV; 蛋白结构域; 蛋白互作

中图分类号: S533 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-7054(2025)05-0663-10

何娇妍, 陈奥, 闫语. 木薯 MeKIN10 与 MeRAV1/2 蛋白互作结构域鉴定 [J]. 热带生物学报, 2025, 16(5): 663-672. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20250028

植物在生长发育过程中经常遭遇干旱、高盐和极端温度等环境胁迫,这些胁迫会导致细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的过量积累^[1]。虽然 ROS 是一种重要的信号分子,能够激活抗逆基因的表达并帮助植物适应逆境,但其过量积累会引发细胞膜脂质过氧化、DNA 损伤和蛋白质失活等一系列氧化应激反应^[2]。为应对氧化应激,植物进化出复杂的抗氧化调控网络,其中,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)和过氧化物酶(catalase, CAT)等关键酶通过清除 ROS 维持细胞稳态^[3]。

在抗氧化调控网络中,信号传递和基因表达的精确调控需要激酶和转录因子的协同作用。蔗糖非发酵-1 相关蛋白激酶 1(sucrose non-fermenting-1-related protein kinase 1, SnRK1)是

调控植物代谢平衡和胁迫响应的核心分子^[4]。SnRK1 由催化亚基 α 、调节亚基 β 和 γ 组成,其中 α 亚基在 SnRK1 介导磷酸化过程中发挥了重要作用,其在植物中由 *KIN10(SnRK1.1)* 和 *KIN11(SnRK1.2)* 编码,不仅可以感知细胞的能量状态,还能通过代谢重编程调节细胞的代谢模式以适应不同的环境胁迫^[5]。例如, *AtKIN10* 通过调节脱落酸(abscisic acid, ABA)响应元件 MYC2 转录因子的活性参与到 ABA 介导的盐胁迫和缺氧胁迫反应中^[6]。为了将激酶调控的信号传递至抗氧化基因组水平,转录因子在这一过程中发挥了桥梁作用。RAV (related to ABI3/VP1)家族转录因子属于 AP2/ERF 家族,不仅广泛参与植物生长发育的调控,还在胁迫响应中起到关键作用^[7]。在辣椒中, *CaRAV1* 参与调节植物对盐胁迫和干旱胁迫的抗性^[8]。在水稻中, *OsRAV2* 积极响应盐胁迫的诱导^[9]。

收稿日期: 2025-02-08

修回日期: 2025-02-28

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目(32260452); 海南省自然科学基金项目(323RC410); 海南省研究生创新科研课题资助项目(Qhys2023-257)

[#]第一作者: 何娇妍(1996—), 女, 海南大学热带农林学院 2022 级硕士研究生。E-mail: 1508536880@qq.com

^{*}通信作者: 闫语(1992—), 女, 副教授, 博士生导师。研究方向: 热带作物分子生物学。E-mail: 996007@hainanu.edu.cn

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 是大戟科植物, 与甘薯、马铃薯并称为世界 3 大薯类作物。其贮藏根富含淀粉, 不仅可用作生物能源和工业原料, 还是热带和亚热带地区的重要粮食与能源作物^[10]。然而, 热带和亚热带种植区域往往伴随干旱、高温等非生物胁迫, 持续的环境压力会引发氧化应激, 导致木薯产量的显著下降^[11]。已有研究表明, 木薯中 MeKIN10 在氧化胁迫下通过直接磷酸化转录因子 MeRAV1 和 MeRAV2, 增强 MeRAV1/2 对抗氧化酶基因 *MeCAT6* 和 *MeCAT7* 的转录激活能力, 显著提高抗氧化酶的表达水平, 从而清除过量的 ROS, 有效缓解氧化胁迫对细胞的损害^[12]。

尽管已有研究证实 MeKIN10 通过与 MeRAV1/2 互作调控其功能, 但 MeKIN10 和 MeRAV1/2 的蛋白互作区域尚不清楚。因此, 本研究通过对 MeKIN10 蛋白结构域分析、AlphaFold3 互作预测及酵母双杂交实验, 系统鉴定 MeKIN10 与 MeRAV1/2 的互作结构域, 为深入解析木薯抗氧化调控网络提供新见解, 并为培育抗氧化胁迫耐受性木薯新品种提供理论依据。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料 植物材料: 本研究材料选用种植于海南大学海甸校区热带农业试验基地的木薯品种 ‘SC124’ (South China 124)。

菌种: 大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 、AH109 酵母菌株。

载体与质粒: 本实验室保存的酵母双杂交载体 *pGBKT7*、*pGADT7* 与质粒 *pGBKT7-p53*、*pGBKT7-lam*。

试剂耗材: β -巯基还原剂、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)、氯化锂 (LiCl)、Hifair® AdvanceFast 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒 (翌圣), Phusion™ 高保真 DNA 聚合酶、通用 DNA 纯化回收试剂盒 (TIANGEN)、质粒小提试剂盒 (TIANGEN)、同源重组连接酶 (诺唯赞)、限制性核酸内切酶 (赛默飞) 等。引物合成和测序由北京擎科生物科技股份有限公司 (Beijing Tsingke Biotech Co., Ltd.) 完成。

1.2 实验方法

1.2.1 *MeKIN10*、*MeRAV1/2* 基因的克隆 称取 2 ~ 3 g 新鲜木薯叶片, 在液氮中充分研磨成粉末后, 按照参考文献中的方法提取总 RNA^[13]。使用反转录试剂盒将提取的 RNA 逆转录为 cDNA。依据 Phytozome 数据库中 *MeKIN10* 和 *MeRAV1/2* 基因的编码序列, 设计扩增引物 (表 1)。以反转录后的 cDNA 为模板, 采用 PCR 技术扩增目的条带, 反应体系见表 2。将扩增后的产物进行琼脂糖凝胶电泳, 根据 DNA Marker 回收与预期大小一致的目的条带。随后, 分别将 *MeRAV1/2* 片段与

表 1 实验所用引物序列
Tab. 1 Primers and their sequences

引物名称 Primer	序列 (5'-3') Sequences
<i>pGBKT7-MeRAV1-F</i>	ATCTCAGAGGAGGACCTGCATATGATGGACGGAAGCTGCATAGAT
<i>pGBKT7-MeRAV1-R</i>	CTGCAGGTCGACGGATCCCCGGGCAAAGCTCCAATTATCCTCTG
<i>pGBKT7-MeRAV2-F</i>	ATCTCAGAGGAGGACCTGCATATGATGGACGGAAGCTGCACGGAT
<i>pGBKT7-MeRAV2-R</i>	CTGCAGGTCGACGGATCCCCGGGCAAAGCACCGATTATCCTCTG
<i>pGADT7-MeKIN10-F</i>	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGATGGGTCAACTCACCG
<i>pGADT7-MeKIN10-R</i>	AGCTCGAGCTCGACTAAAGGACTCGGAGTTGTG
<i>pGADT7-MeKIN10a-F</i>	CCATGGAGGCCAGTGAATTCACCAAATTACAACTTGGA
<i>pGADT7-MeKIN10a-R</i>	AGCTCGAGCTCGATGGATCCAAACCACGGGTGCTGACGGAT
<i>pGADT7-MeKIN10b-F</i>	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATTGATGAAGAAATTCTCCAA
<i>pGADT7-MeKIN10b-R</i>	AGCTCGAGCTCGATGGATCCATTGTCCAATAACAAATAGTA
<i>pGADT7-MeKIN10c-F</i>	CCATGGAGGCCAGTGAATTCAGGAAATGGGCTCTTGACTT
<i>pGADT7-MeKIN10c-R</i>	AGCTCGAGCTCGATGGATCCGAGTTGTGCAAGAAACGCTGC

表 2 PCR 反应体系及条件
Tab. 2 PCR reaction system and conditions

组分 Components	体积/ μL Volume/ μL	反应条件 Reaction conditions		
		循环数 Cycle	温度/ $^{\circ}\text{C}$ Temperature/ $^{\circ}\text{C}$	时间 Time
cDNA	2	1	95	3 min
正向引物 Forward primer	2		95	30 s
反向引物 Reverse primer	2	34	55	30 s
5 $\times$ FastPfu Buffer	20		72	1 min/kb
dNTPs(2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$)	8	1	72	8 min
FastPfu DNA Polymerase	2	1	16	终止反应 Terminate reaction
ddH ₂ O	64			

pGBKT7 载体, *MeKIN10* 片段与 *pGADT7* 载体进行同源重组连接。反应完成后, 将产物转至 DH5 α 感受态细胞中, 并涂布于含有相应抗生素的 LB 固体培养基上。将培养基置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 ~ 16 h 后, 挑选单克隆进行菌落 PCR 验证并测序。测序结果与参考序列比对后将阳性克隆置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜扩大培养, 次日使用试剂盒提取质粒, 并进行双酶切验证。验证无误后, 将质粒与菌液置于 -40 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 诱饵载体 *pGBKT7-MeRAV1/2* 毒性与自激活检验 将诱饵载体 *pGBKT7-MeRAV1*、*pGBKT7-MeRAV2* 和 *pGBKT7* 空载体分别转化至自制的 AH109 酵母感受态中, 转化后的酵母菌液均匀地涂在 SD/-Trp 固体培养基上, 倒置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱, 待培养 2 ~ 3 d, 酵母菌落生长后, 进行 PCR 扩增并通过凝胶电泳验证阳性克隆。挑取阳性克隆后, 将菌液用超纯水稀释, 设定梯度为 10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³, 并分别吸取 10 μL 菌液点至 SD/-Trp 固体培养基上, 倒置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 2 ~ 3 d 后, 观察酵母菌株的生长状况, 以检测 MeRAV1 和 MeRAV2 蛋白是否对酵母生长有影响。

将诱饵载体 *pGBKT7-MeRAV1* 和 *pGADT7* 空载体、*pGBKT7-MeRAV2* 和 *pGADT7* 空载体共转入自制的 AH109 酵母感受态中, 转化后的酵母菌液均匀的涂在 SD/-Leu/-Trp 固体培养基上, 同时将实验室保存的阳性对照(*pGBKT7-P53+pGADT7-T*)和阴性对照(*pGBKT7-lam+pGADT7*)培养至 SD/-Leu/-Trp 固体培养基上, 待 2 ~ 3 d 酵母菌落生长

后, PCR 扩增并进行凝胶电泳验证, 挑取阳性克隆后, 用超纯水将菌液稀释, 设置梯度为 10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³, 每个梯度吸取 10 μL 菌液点至 SD/-Leu/-Trp 和 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 固体培养基上, 倒置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱, 2 ~ 3 d 后, 观察酵母菌株的生长状况。检测标准: SD/-Leu/-Trp 固体培养基上有实验组酵母菌落生长, SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 固体培养基上无实验组酵母菌落生长, 则可证明 MeRAV1 和 MeRAV2 蛋白无自激活活性。若 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 固体培养基上有酵母菌落生长, 则认定 MeRAV1 和 MeRAV2 蛋白存在自激活活性。

1.2.3 生物信息学分析方法 使用 NCBI 的 CD-search 工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)默认参数对 MeKIN10 进行功能结构域分析。使用 AlphaFold 3(<https://alphafoldserver.com>)预测蛋白互作, 并用 PyMOL3.1(Schrödinger, 美国)进行蛋白互作结构可视化和互作位点分析。

1.2.4 酵母双杂交点对点验证 分别将诱饵载体 *pGBKT7-MeRAV1* 和 *pGBKT7-MeRAV2* 与 4 个猎物载体共转入自制的 AH109 酵母感受态中, 转化后的酵母菌液均匀涂在 SD/-Leu/-Trp 固体培养基上, 待 2 ~ 3 d 酵母生长出阳性克隆后, 挑取酵母菌落 PCR 扩增后进行凝胶电泳验证, 将阳性克隆、阳性对照与阴性对照分别挑至超纯水中, 分别稀释梯度为 10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³, 每个梯度吸取 10 μL 菌液点至 SD/-Leu/-Trp 和 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 固体培养基上, 倒置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱进行

酵母双杂交点对点验证, 2 ~ 3 d 后观察酵母菌株的生长状况。

2 结果与分析

2.1 MeKIN10 和 MeRAV1/2 蛋白结构域分析

本研究使用 NCBI 的 CD-search 在线工具分析了 MeKIN10 和 MeRAV1/2 蛋白的结构域。分析结果显示, MeKIN10 包含 3 个主要的功能性结构域。STKc-AMPK-alpha 结构域是主要的激酶结构域, 在调控细胞能量代谢和维持能量平衡中发挥

关键作用; UBA-SnRK1-plant 结构域与泛素化相关; AMPKA-C 结构域在 SnRK1 的激酶活性调控机制中起关键作用。

MeRAV1 具有两个结构域, 分别为 AP2 和 B3 结构域。AP2 和 B3 结构域为植物转录因子中常见的 DNA 结合域, 涉及植物发育调控及对环境变化的响应。MeRAV2 包含 3 个结构域: KLF6-7-N-like superfamily 结构域(具有类似锌指的功能, 参与基因表达调控), 以及 AP2 和 B3 结构域(图 1)。

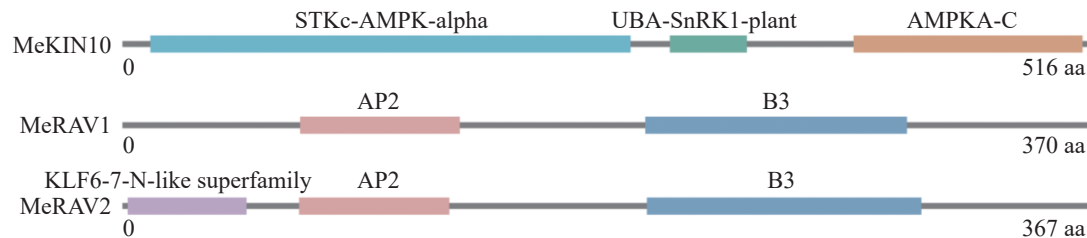
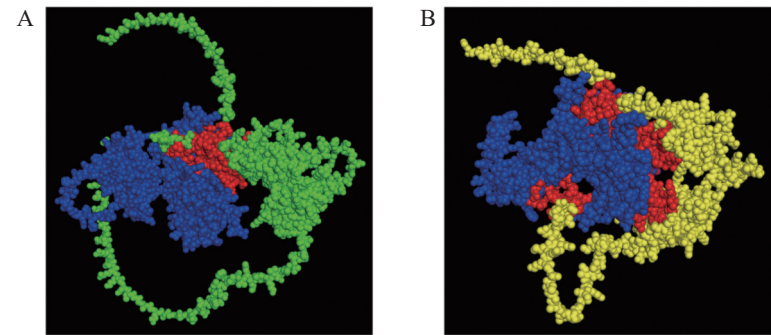


图 1 MeKIN10 和 MeRAV1/2 蛋白结构域分析
Fig. 1 Protein domain analysis of MeKIN10 and MeRAV1/2

2.2 MeKIN10 与 MeRAV1/2 蛋白互作预测分析

为研究 MeKIN10 与 MeRAV1/2 蛋白的相互作用位点, 使用 AlphaFold 3 模拟其三维结构及蛋白

互作。预测结果表明, MeKIN10 的 STKc-AMPK-alpha 结构域与 MeRAV1 发生相互作用, 而其 3 个结构域均与 MeRAV2 发生互作(图 2、图 3)。

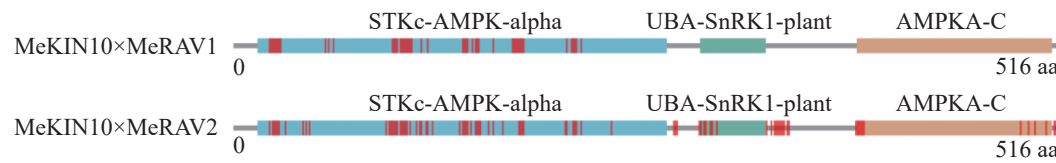


A.MeKIN10 和 MeRAV1 蛋白互作预测; B.MeKIN10 和 MeRAV2 蛋白互作预测。图中蓝色代表 MeKIN10 蛋白, 绿色表示 MeRAV1 蛋白, 黄色表示 MeRAV2 蛋白, 红色代表 2 个蛋白之间的互作结构。

A.Protein interaction prediction of MeKIN10 and MeRAV1;B.Protein interaction prediction of MeKIN10 and MeRAV2.Blue is used to denote the MeKIN10 protein, green is employed to indicate the MeRAV1 protein, yellow signifies the MeRAV2 protein, and red represents the interaction structure between the two proteins.

图 2 MeKIN10 和 MeRAV1/2 蛋白的三维结构和互作预测

Fig. 2 Three-dimensional structure and interaction prediction of MeKIN10 and MeRAV1/2 proteins



图中红色代表 MeKIN10 和 MeRAV1/2 蛋白的互作残基位点。

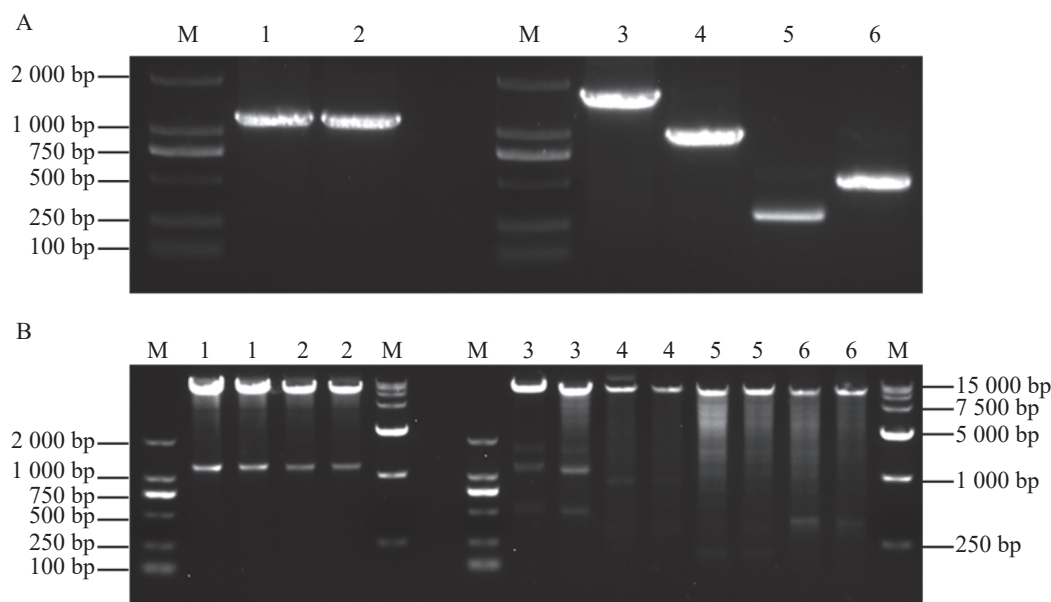
Red represents the interacting residue sites between the MeKIN10 and MeRAV1/2 proteins.

图 3 MeKIN10 与 MeRAV1/2 蛋白的互作位点分析

Fig. 3 Analysis of the interaction sites between MeKIN10 and MeRAV1/2 proteins

2.3 MeKIN10 猎物载体和 MeRAV1/2 诱饵载体的构建 为探究 MeKIN10 与 MeRAV1/2 蛋白互作中的主要区域, 基于 MeKIN10 蛋白的 3 个结构域, 笔者将其分为 3 个基因片段, 并分别构建到 pGADT7 载体中。得到的猎物载体分别命名为 pGADT7-MeKIN10a(STKc-AMPK- α 结构域 47 ~ 813 bp)、pGADT7-MeKIN10b(UBA-SnRK1-plant 结构域 877 ~ 999 bp) 及 pGADT7-MeKIN10c(AMPK α -C 结构域 1 168 ~ 1 536 bp), 将 MeRAV1 和 MeRAV2 的编码区构建到 pGBKT7 载体上, 得到的诱饵载体命名为 pGBKT7-MeRAV1 和 pGBKT7-MeRAV2。目的片段扩增结果通过琼脂糖凝胶电泳检测确认, 在目标区域出现预期条带, 其中 MeRAV1(1 110 bp)、MeRAV2(1 101 bp)、MeKIN10(1 548 bp)、MeKIN10a(767 bp)、MeKIN10b(122 bp) 和 MeKIN10c(368 bp)(图 4-A)。使用 DNA 产物

纯化回收试剂盒回收目的片段, 后将回收的 MeKIN10、MeKIN10a、MeKIN10b 和 MeKIN10c 片段用 *EcoR* I *Bam* H I 双酶切好的 pGADT7 线性化载体进行同源重组连接; MeRAV1/2 片段与用 *Nde* I 和 *Sma* I 双酶切好的载体 pGBKT7 线性化载体进行同源重组连接。将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞中, 放置于 37 °C 下培养 12 ~ 16 h 后, 挑选单克隆进行菌落 PCR 验证并测序。对测序结果正确的菌液, 在 37 °C 过夜扩增培养后提取质粒, 最后进行双酶切验证, MeKIN10 在 1 066 bp 位置有与 *EcoR* I 相同的碱基序列, 因此酶切过程中将 MeKIN10 切成了 3 段, 分别是 1 548、1 066、482 bp, 符合预期结果, 其他均切出一条符合基因片段大小的片段(图 4-B)。验证无误后, 选取质粒与一致菌液置于 -40 °C 保存备用。



A. 目的基因片段扩增; B. 酶切验证。图中 1 为 MeRAV1, 2 为 MeRAV2, 3 为 MeKIN10, 4 为 MeKIN10a, 5 为 MeKIN10b, 6 为 MeKIN10c。

A. Target gene fragment amplification; B. Enzyme digestion verification. In the figure, 1 represents MeRAV1, 2 represents MeRAV2, 3 represents MeKIN10, 4 represents MeKIN10a, 5 represents MeKIN10b, and 6 represents MeKIN10c.

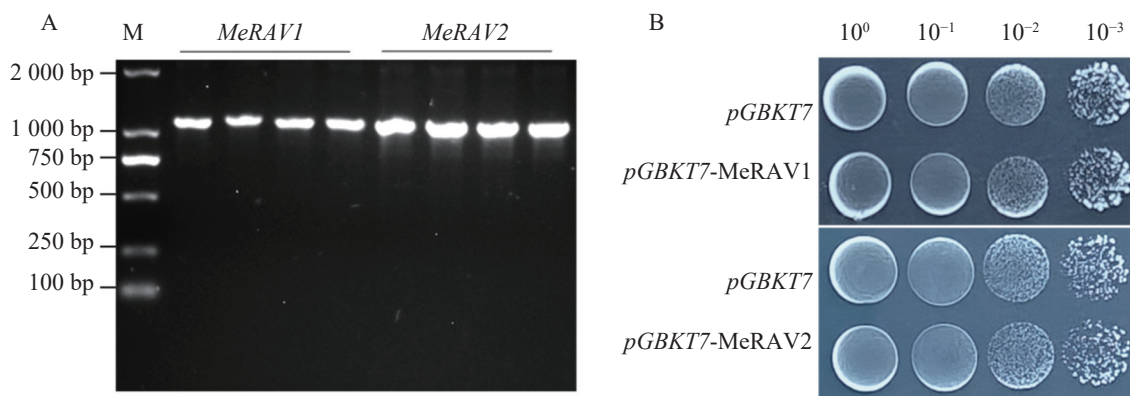
图 4 目的基因载体构建

Fig. 4 Construction of recombinant vector containing the target gene

2.4 MeRAV1/2 毒性和自激活检测 为检测诱饵蛋白是否具有毒性, 将载体 pGBKT7-MeRAV1/2 和空载体 pGBKT7 分别转化至 AH109 酵母感受态中, 通过菌落 PCR 筛选阳性克隆(图 5-A)。将阳性克隆培养至 OD₆₀₀=0.8 后, 用超纯水稀释至 10、10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 的梯度, 每个梯度取 10 μ L 菌液点滴至 SD/-Trp 平板。结果显示, 携带诱饵载体 pGBKT7-

MeRAV1/2 的酵母菌株与携带空载体 pGBKT7 的酵母菌株在生长趋势上保持一致(图 5-B)。表明 pGBKT7-MeRAV1/2 诱饵蛋白对酵母细胞生长无显著影响, 也未表现出毒害作用, 表明该诱饵蛋白适合用于后续实验。

为检测诱饵蛋白是否具备转录激活活性, 将 pGBKT7-MeRAV1/2 与空载体 pGADT7 共转化至



A.酵母菌落 PCR; B.诱饵蛋白毒性检测。

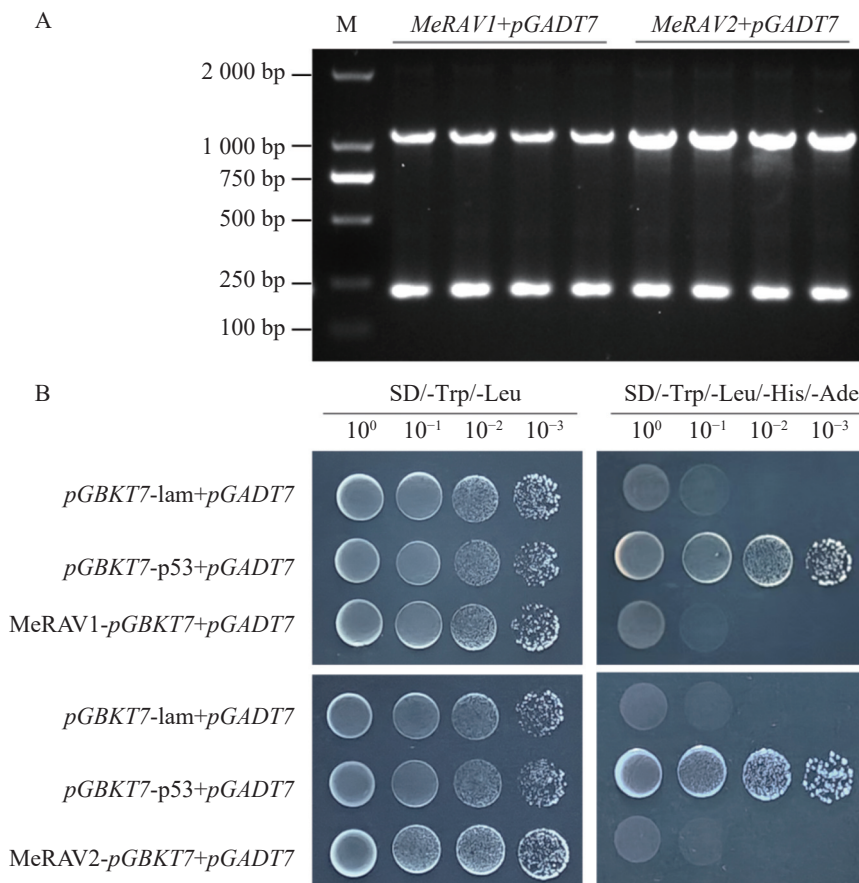
A.Yeast colony PCR; B.Toxicity test of the bait proteins.

图 5 诱饵蛋白 MeRAV1/2 的毒性检测

Fig. 5 Toxicity test of the bait proteins MeRAV1/2

AH109 酵母感受态细胞中, 并涂布在二缺培养基 SD/-Trp/-Leu 平板上, 对正常生长出的酵母菌株进行 PCR 检测, 结果显示均为阳性(图 6-A), 证明质粒转化成功。将阳性克隆点滴在四缺培养基 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板上, 结果显示, 仅阳性对照

(*pGBKT7*-p53+*pGADT7*)酵母菌株正常生长, 阴性对照(*pGBKT7*-lam+*pGADT7*)及实验组(*pGBKT7*-MeRAV1/2+*pGADT7*)酵母菌株均未正常生长(图 6-B)。这些结果表明, MeRAV1/2 诱饵蛋白不具备自激活活性, 适用于后续蛋白互作实验。



A.酵母菌落 PCR; B.自激活检测。

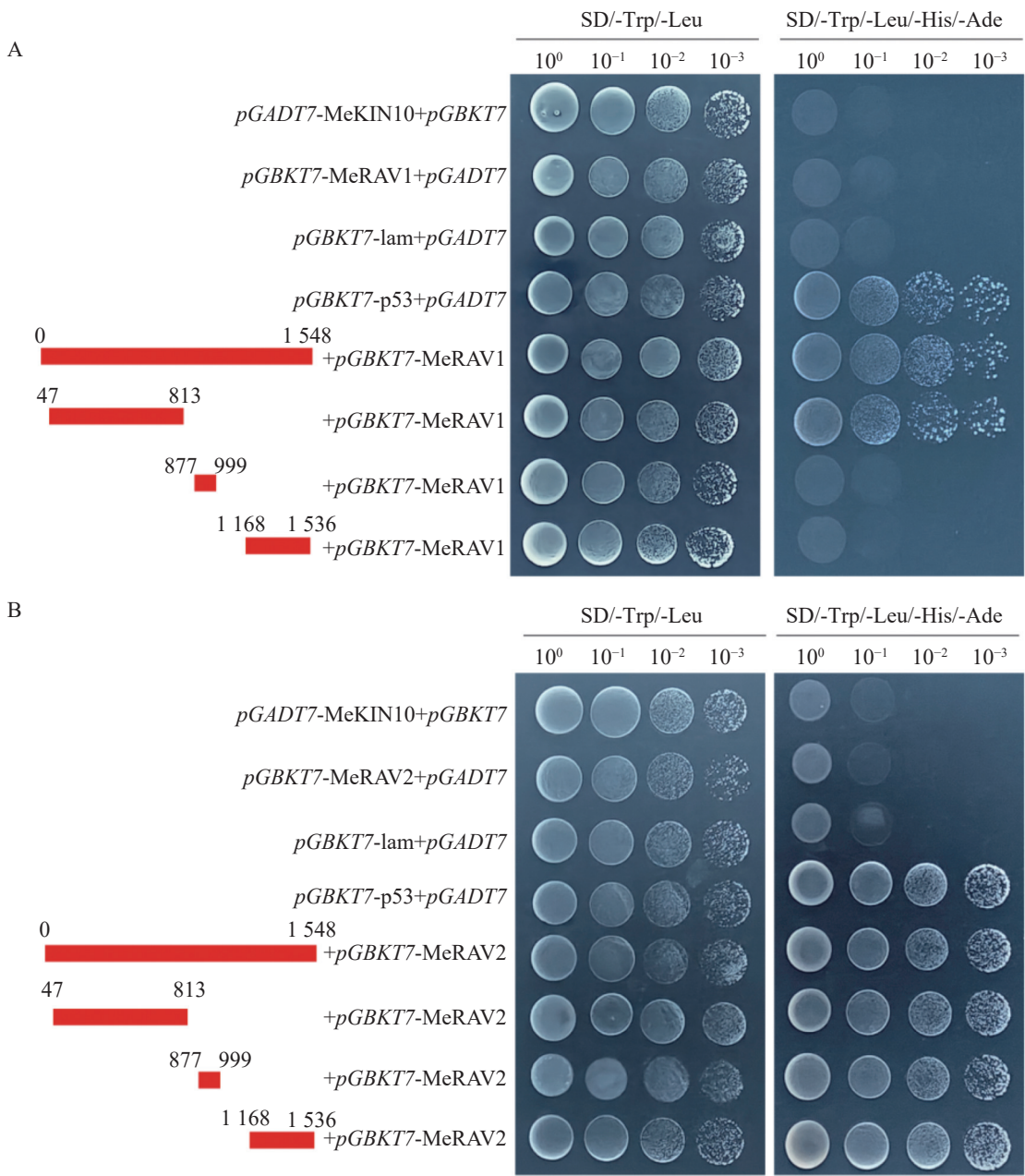
A.Yeast colony PCR; B.Self-activation detection.

图 6 诱饵蛋白 MeRAV1/2 的自激活检测

Fig. 6 Self-activation assay of bait protein MeRAV1/2

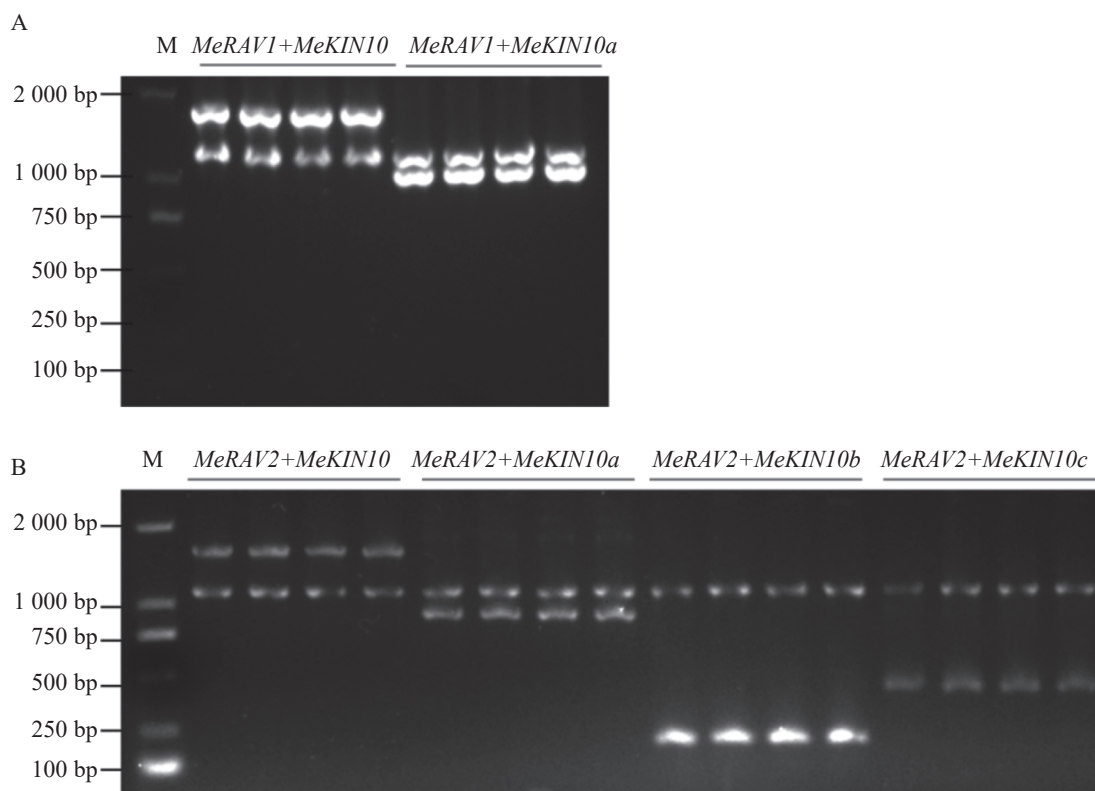
2.5 MeKIN10 和 MeRAV1/2 酵母双杂交点对点验证 将 *MeKIN10* 全长和其 3 个结构域的猎物载体与诱饵载体 *pGBKT7-MeRAV1/2* 分别共转化至 AH109 酵母感受态细胞, 在 SD/-Trp/-Leu 平板上, 所有酵母菌株均可正常生长。随后, 将阳性酵母克隆按不同梯度稀释并点滴在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板上, 结果显示, 除阳性对照和 MeKIN10 全长片段外, MeKIN10a 可以和 MeRAV1 互作,

MeKIN10a、MeKIN10b 和 MeKIN10c 可 以 和 MeRAV2 互作(图 7-A, B)。并进一步对其酵母菌株进行 PCR 检测, 结果显示均为阳性(图 8-A, B), 且两条目的条带位置正确。以上结果表明 MeRAV1 仅与 MeKIN10 的第 1 个结构域 STKc-AMPK-alpha 存在互作关系, 而 MeRAV2 与 MeKIN10 的 3 个结构域均具有互作关系。



A.MeRAV1 与 MeKIN10 点对点验证; B.MeRAV2 与 MeKIN10 点对点验证。红色条形图代表不同结构域的 MeKIN10 猎物载体。
A.Verification of the interaction between MeRAV1 and MeKIN10; B.Verification of the interaction between MeRAV2 and MeKIN10. The MeKIN10 prey vectors corresponding to different domains are represented by the red bar graph.

图 7 MeRAV1/2 与 MeKIN10 的点对点验证互作
Fig. 7 Verification of the interaction between MeRAV1/2 and MeKIN10



A. *MeRAV1* 与 *MeKIN10* 酵母菌落 PCR 验证; B. *MeRAV2* 与 *MeKIN10* 酵母菌落 PCR 验证。

A. PCR verification of yeast colony containing *MeRAV1* and *MeKIN10*; B. PCR verification of yeast colony containing *MeRAV2* and *MeKIN10*.

图 8 *MeRAV1/2* 与 *MeKIN10* 的点对点阳性克隆 PCR 验证

Fig. 8 PCR verification of positive clones for *MeRAV1/2* and *MeKIN10*

3 讨论

植物在面对逆境胁迫时需要不断调整自身的代谢从而适应多变的环境条件, SnRK1 复合体是植物能量和环境胁迫信号的中心整合, 它可以通过调节合成代谢和分解代谢的平衡来维持细胞能量稳态^[14]。MeKIN10 是 SnRK1 蛋白激酶行使磷酸化功能的 1 个重要 α 亚基, 广泛参与了不同的逆境响应机制^[15]。番茄中的 SnRK1 α 1 可以介导的 RBOH1 磷酸化调控 ROS, 增强番茄对低氮的耐受性^[16]。木薯中的 MeKIN10 也有报道可以通过磷酸化 MeHB16 蛋白调控木质素合成, 提高木薯的细菌性枯萎病抗性^[17]。

本研究通过对 MeKIN10 与转录因子 MeRAV1/2 蛋白结构域分析表明, MeKIN10 含有 STKc-AMPK- α 、UBA-SnRK1-plant 及 AMPKA-C 3 个功能域, 属于典型的 SnRK1 α 蛋白。MeRAV1 包含 AP2 和 B3 DNA 结合域, 而 MeRAV2 额外具备 KLF6-7-N-like superfamily 结构域, 表明其在基因调控网络中可能具有更复杂的功能。为了检测

MeKIN10 蛋白与 MeRAV1/2 蛋白相互作用的结构域, 本研究构建了 MeKIN10 的全长序列与 3 个截断体 MeKIN10a/b/c, 以及 MeRAV1/2 的全长序列。可以根据这些截断体从而推测 STKc-AMPK- α 、UBA-SnRK1-plant 及 AMPKA-C 3 个功能域中哪些结构域与 MeRAV1/2 的蛋白互作。

KIN10 的激酶活性依赖于 N 端高度保守的激酶催化结构域, 其展现出经典的二级折叠结构, 含有一个激活环(T-loop), 其关键氨基酸残基为参与磷酸集团转移反应的一个保守赖氨酸(K), 突变形式的 AtKIN10K^{48M} 不具有激酶活性^[18-20]。在大麦中, SnRK1 的激酶结构域能够磷酸化 WRKY3, 从而正向调节其对白粉病的抗性^[21]。本研究的蛋白互作预测及酵母双杂交实验结果显示, MeKIN10 的 STKc-AMPK- α 催化结构域与 MeRAV1/2 均互作, 这说明其催化结构域可能是其介导磷酸化反应的关键。紧跟催化结构域之后, KIN10 含有泛素相关(UBA)结构域, 这是更广泛的 AMPK 相关激酶家族的共同特征^[22]。在拟南芥中, 已经有报道 KIN10 的 UBA 结构域与 E3 泛素连接酶复

合物 SKP1/ASK1 相互作用,但其确切功能仍有待探索^[23]。此外 KIN10 还具有 C 端调控结构域,参与调控 SnRK 其余亚基和上游磷酸酶的相互作用。在拟南芥中发现,ABI1 和 PP2CA 能够与 KIN10 的 AMPK-C 结构域相互作用,导致其去磷酸化和失活^[24]。本研究中发现,UBA-SnRK1-plant 及 AMPK-C 结构域只与 MeRAV2 互作。这表明 MeKIN10 通过其多个结构域与 MeRAV2 全面互作,可能在能量状态或环境条件下,赋予植物更灵活的氧化应激应答机制。然而,本研究采用的酵母双杂交系统存在异源表达的局限性,蛋白在酵母中的表达和折叠可能与植物细胞有所不同。因此,未来研究应结合植物本体的实验方法,如共免疫沉淀或双分子荧光互补,以进一步验证其互作区域。

综上所述,本研究鉴定了 MeKIN10 与 MeRAV1/2 蛋白互作的具体区域,进一步阐明了 MeKIN10 与 MeRAV1/2 的蛋白互作介导磷酸化的作用机制,并为深入探索植物应对能量需求变化及环境胁迫的分子机制提供了重要依据。

参考文献:

- [1] BAXTER A, MITTLER R, SUZUKI N. ROS as key players in plant stress signalling[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(5): 1229 – 1240.
- [2] PETROV V, HILLE J, MUELLER-ROEBER B, et al. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 69.
- [3] XIE X L, HE Z Q, CHEN N F, et al. The roles of environmental factors in regulation of oxidative stress in plant[J]. *BioMed Research International*, 2019, 2019(1): 9732325.
- [4] PEIXOTO B, BAENA-GONZÁLEZ E. Management of plant central metabolism by SnRK1 protein kinases[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2022, 73(20): 7068 – 7082.
- [5] BAENA-GONZÁLEZ E, ROLLAND F, THEVELEIN J M, et al. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling[J]. *Nature*, 2007, 448(7156): 938 – 942.
- [6] IM J H, CHO Y H, KIM G D, et al. Inverse modulation of the energy sensor Snf1-related protein kinase 1 on hypoxia adaptation and salt stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2014, 37(10): 2303 – 2312.
- [7] MATÍAS-HERNÁNDEZ L, AGUILAR-JARAMILLO A E, MARÍN-GONZÁLEZ E, et al. RAV genes: regulation of floral induction and beyond[J]. *Annals of Botany*, 2014, 114(7): 1459 – 1470.
- [8] SOHN K H, LEE S C, JUNG H W, et al. Expression and functional roles of the pepper pathogen-induced transcription factor RAV1 in bacterial disease resistance, and drought and salt stress tolerance[J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 61(6): 897 – 915.
- [9] DUAN Y B, LI J, QIN R Y, et al. Identification of a regulatory element responsible for salt induction of rice *OsRAV2* through ex situ and in situ promoter analysis[J]. *Plant Molecular Biology*, 2016, 90(1/2): 49 – 62.
- [10] 王鹏. RAV 转录因子在木薯抗细菌性枯萎病和氧化应激反应中的功能解析[D]. 海口: 海南大学, 2022. doi:10.27073/d.cnki.gshdu.2022.001142.
- [11] YAN Y, LIU W, WEI Y X, et al. MeCIPK23 interacts with whirly transcription factors to activate abscisic acid biosynthesis and regulate drought resistance in cassava[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(7): 1504 – 1506.
- [12] WANG P, YAN Y, BAI Y J, et al. Phosphorylation of RAV1/2 by KIN10 is essential for transcriptional activation of *CAT6/7*, which underlies oxidative stress response in cassava[J]. *Cell Reports*, 2024, 43(7): 114467.
- [13] 关玲, 赵密珍, 王庆莲, 等. 改良 CTAB 方法提取果树不同组织的 RNA[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(15): 19 – 22.
- [14] POLGE C, THOMAS M. SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control?[J]. *Trends in Plant Science*, 2007, 12(1): 20 – 28.
- [15] 王红蕾. 植物能量感受器 SnRK1 抑制硝态氮信号转导的机理研究[D]. 济南: 山东大学, 2022. doi:10.27272/d.cnki.gshdu.2022.006876.
- [16] ZHENG X L, YANG H F, ZOU J P, et al. SnRK1 α 1-mediated RBOH1 phosphorylation regulates reactive oxygen species to enhance tolerance to low nitrogen in tomato[J]. *The Plant Cell*, 2024, 37(1): koae321.
- [17] YAN Y, WANG P, HE J Y, et al. KIN10-mediated HB16 protein phosphorylation and self-association improve cassava disease resistance by transcriptional activation of lignin biosynthesis genes[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22(10): 2709 – 2723.
- [18] WURZINGER B, NUKARINEN E, NÄGELE T, et al. The SnRK1 kinase as central mediator of energy signalling between different organelles[J]. *Plant physiology*, 2018, 176(2): 1085 – 1094.
- [19] HANKS S K, HUNTER T. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification[J]. *The FASEB Journal*, 1995, 9(8): 576 – 596.
- [20] PEIXOTO B, MORAES T A, MENGIN V, et al. Impact of the SnRK1 protein kinase on sucrose homeostasis and the transcriptome during the diel cycle[J]. *Plant physiology*, 2021, 187(3): 1357 – 1373.

- [21] HAN X Y, ZHANG L, ZHAO L F, et al. SnRK1 phosphorylates and destabilizes WRKY3 to enhance barley immunity to powdery mildew[J]. *Plant Communications*, 2020, 1(4): 100083.
- [22] BRIGHT N J, THORNTON C, CARLING D. The regulation and function of mammalian AMPK-related kinases[J]. *Acta Physiologica*, 2009, 196(1): 15 – 26.
- [23] FARRÁS R, FERRANDO A, JÁSIK J, et al. SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase[J]. *The EMBO Journal*, 2001, 20(11): 2742 – 2756.
- [24] RODRIGUES A, ADAMO M, CROZET P, et al. ABI1 and PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-related protein kinase1 signaling in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(10): 3871 – 3884.

Identification of interaction domains between cassava *MeKIN10* and *MeRAV1/2* proteins

HE Jiaoyan[#], CHEN Ao, YAN Yu^{*}

(School of Tropical Agriculture and Forestry/Hainan Key Laboratory of Biotechnology for Salt Tolerant Crops/School of Breeding and Multiplication (Sanya Institute of Breeding and Multiplication), Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China)

Abstract: Cassava (*Manihot esculenta*), a crucial staple and bioenergy crop, faces significant yield and quality losses due to oxidative stress induced by environmental factors such as drought and high temperature. Previous studies have demonstrated that *MeKIN10*, a protein kinase associated with energy sensing in cassava, enhances oxidative stress tolerance by mediating the phosphorylation of *MeRAV1/2*. While protein-protein interaction is essential for kinase-mediated phosphorylation, the specific interaction regions between *MeKIN10* and *MeRAV1/2* remain elusive. In this context the interaction regions of *MeKIN10* and *MeRAV1/2* were identified through protein domain analysis, AlphaFold3 prediction and yeast two-hybrid experiment. The results demonstrate that the STKc-AMPK-alpha kinase domain of *MeKIN10* is the key domain in its interaction with *MeRAV1/2*, which further indicates that the protein interaction between *MeKIN10* and *MeRAV1/2* is the key in mediating the phosphorylation of *MeRAV1/2*.

Keywords: cassava; KIN10; RAV; protein domain; protein interaction

(责任编辑: 钟云芳)