

网络出版时间:2014-06-21 18:03

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.07.034

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.07.034.html

玉米质体型 AGPase 小亚基和糖酵解关键酶 PPDK1 互作关系的研究

崔喜艳^{1,2}, 王 阔¹, 张继晓¹, 鹿 丹¹, 范 贝¹, 尹悦佳², 刘相国²

(1 吉林农业大学 生命科学院, 吉林 长春 130118; 2 吉林省农业科学院 农业生物技术研究所, 吉林 长春 130124)

[摘 要] **【目的】**利用双分子荧光互补(BiFC)技术,在烟草叶肉细胞中分析玉米 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶质体型小亚基(AGPase-bt2)与丙酮酸磷酸双激酶(PPDK1)之间的相互作用。**【方法】**构建 326-CYCHA-AGPase-bt2 和 326-CYNEE-PPDK1 双分子荧光表达载体,转化农杆菌 EHA105,瞬时浸染烟草叶肉细胞,激光共聚焦显微镜下观察 AGPase-bt2 和 PPDK1 的相互作用。**【结果】**双酶切试验表明,326-CYCHA-AGPase-bt2、326-CYNEE-PPDK1 载体构建正确;PCR 结果证实,植物表达载体成功转化到农杆菌 EHA105 中;浸染烟草叶片后,AGPase-bt2 和 PPDK1 在叶肉细胞中高效表达,出现 BiFC 荧光信号。**【结论】**AGPase-bt2 和 PPDK1 在植物细胞内存在真实互作关系。

[关键词] AGPase-bt2;PPDK1;双分子荧光互补技术;蛋白质互作

[中图分类号] Q753

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2014)07-0047-06

The interactions between maize plastidial small subunit of AGPase and glycolytic key enzyme PPDK1

CUI Xi-yan^{1,2}, WANG Kuo¹, ZHANG Ji-xiao¹, LU Dan¹,
FAN Bei¹, YIN Yue-jia², LIU Xiang-guo²

(1 School of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China;

2 Institute of Agricultural Biotechnology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130124, China)

Abstract: **【Objective】**The interactions between plastidial small subunit of ADP glucose pyrophosphorylase (AGPase-bt2) and phosphate dikinase (PPDK1) of maize were investigated by bimolecular fluorescence complementation (BiFC) in tobacco mesophyll cell. **【Method】**First, the expression vectors of 326-CYCHA-AGPase-bt2 and 326-CYNEE-PPDK1 were constructed and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. Then, it was used to dip tobacco mesophyll cell momentarily. At last, the interactions between AGPase-bt2 and PPDK1 were observed using confocal laser scanning microscope. **【Result】**326-CYCHA-AGPase-bt2 and 326-CYNEE-PPDK1 vectors were constructed correctly and expressed successfully. AGPase-bt2 and PPDK1 were highly expressed after dipping tobacco leaves and BiFC signals appeared. **【Conclusion】**The interactions between AGPase-bt2 and PPDK1 in leaf cells were proved.

Key words: ADP glucose pyrophosphorylase; phosphate dikinase; bimolecular fluorescence complementation; protein interaction

[收稿日期] 2014-03-29

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31170731, 31200611); 吉林省科技厅重点科技攻关项目(20130206012NY); 上海市科学技术委员会项目(10DZ2271800)

[作者简介] 崔喜艳(1971—), 女(达斡尔族), 吉林长春人, 副教授, 博士, 主要从事生物化学与分子生物学研究。
E-mail: cuixiyan2005@163.com

[通信作者] 刘相国(1983—), 男, 吉林长春人, 助研, 博士, 主要从事植物功能基因组学研究。E-mail: lxgyyj@foxmail.com

淀粉是玉米籽粒贮藏的主要物质,其合成是一个复杂的代谢过程,腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(AGPase)是玉米淀粉生物合成途径的关键酶,主要功能是催化葡萄糖使其为淀粉合成提供底物 AD-PG^[1]。根据在细胞中的位置,AGPase 分为胞质型和质体型 2 种^[2]。每种 AGPase 均是由 2 个大亚基(AGPase-bt1)和 2 个小亚基(AGPase-bt2)组成的异源四聚体蛋白,其中,AGPase-bt1 主要起调节功能,而 AGPase-bt2 主要起催化作用^[3-5]。Cossegal 等^[6]发现,玉米质体型 AGPase-bt2 突变体植株授粉 30 d 后,籽粒较大,淀粉粒数较少。分析表明,AGPase-bt2 的突变在一定程度上改变了相关基因的表达,并通过影响淀粉合成,决定胚乳中淀粉的含量。Trevanion 等^[7]研究发现,丙酮酸磷酸双激酶(PPDK)是 C4 途径的专一性酶,它催化固定 CO₂ 最初受体 PEP 的再生,PPDK 控制的反应是 C4 途径并参与糖酵解反应的一个关键限速酶。玉米 *ppdk* 基因包括 2 个成员(*ppdk1* 和 *ppdk2*),二者在根、叶片和种子中均表达^[8-9]。在叶片中 *ppdk1* 基因主要参与光合作用,在种子中调控淀粉的生物合成代谢^[10]。

研究表明,淀粉合成过程中,各种酶并不是单独发挥作用,淀粉合成关键酶之间形成多酶复合物,酶与酶之间存在复杂的相互作用关系^[11-12]。Hennen-Bierwagen 等^[13-14]利用免疫共沉淀结合质谱技术,发现并验证了玉米胚乳造粉质体中存在多酶复合物;蔗糖合成酶 SUS-SH1 及淀粉磷酸化酶 SP、SS II a、SBE II a、SBE II b、PPDK、AGPase 大小亚基等出现在 SS III 免疫共沉淀结果中,以复合物的形式存在。以上结果多为体外研究,具体到两两蛋白之间互作研究,以及在植物体内是否存在真实互作研究报道较少。Lin 等^[15]用同位素¹³C 标记和 Müller-Röber^[16]等研究表明,马铃薯 AGPase 主要定位于叶绿体和淀粉体上,与淀粉合成密切相关。近年来研究发现,糖酵解途径的关键酶 PPDK1 也参与淀粉合成代谢中,亚细胞定位于叶绿体中^[17]。因此研究 AGPase-bt2 和 PPDK1 在植物体内的相互作用,可为明确糖酵解途径和淀粉合成等关系的研究提供依据。

根据吉林省农业科学院农业生物技术研究实验室前期利用酵母双杂交技术验证的 AGPase-bt2 和 PPDK1 在酵母细胞中存在互作关系的试验结果,本试验以 AGPase-bt2 和 PPDK1 为研究对象,采用双分子荧光互补(BiFC)技术判断两目标蛋白

在细胞中的相互作用,为进一步研究植物体内蛋白间真实互作关系提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株及质粒:大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 α 、农杆菌菌株 EHA105、prk2130 质粒、pGADT7-AGPase-bt2 质粒、pGBKT7-PPDK1 质粒,均由吉林省农业科学院保存;酿酒酵母菌株 AH109 购于 Clontech 公司。

荧光互补表达载体:阳性质粒(326-CYCHA-CDKD、326-CYNEE-CYCH)、阴性对照即空载体(326-CYCHA、326-CYNEE),均由中国科学院植保所馈赠,吉林省农业科学院保存。

植物材料:大叶烟草种子,由吉林省农业科学院保存。

主要试剂:Prime STAR、核酸限制性内切酶、T4 DNA 连接酶,均购于 TAKALA 公司;凝胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒,均购于维特洁公司;酵母提取物、蛋白胨、琼脂粉等购自长春德尔塔公司;MgCl₂、乙酰丁香酮(AS)、2-吗啉乙磺酸(MES)、琼脂糖、水饱和酚、氯仿、异戊醇等试剂,均购自上海生工有限公司。3-氨基-1,2,4-三唑(3-AT)、5-溴-4-氯-3-吡啶- α -D-吡喃半乳糖苷(X- α -Gal)、二甲基亚砜(DMSO)和鲑精 DNA 购于 Sigma 公司;Yeast nitrogen base(YNB)和氨基酸补充溶液等购于 Clontech 公司;酵母质粒提取试剂盒购于 TIANGEN 公司;MatchmakerTM Library Construction & Screening Kits 购于 Clontech 公司。

1.2 方法

1.2.1 AGPase-bt2 和 *ppdk1* 基因的克隆及回收 分别以 pGADT7-ADPase-bt2 和 pGBKT7-PPDK1 质粒为模板,采用带 *Xho* I / *Bam* H I 酶切位点的引物进行 PCR。

AGPase-bt2 的 CDS 序列上下游引物分别是: F1 5' CCGCTCGAGATGGACATGGCTTTGGCG 3'; R1 5' CGGGATCCTTATAACTGTTCCAC-TAGGGAGTAAAGC 3'。

ppdk1 的 CDS 序列上下游引物分别是: F2 5' CCGCTCGAGATGGCGGCATCGGTTTCC 3'; R2 5' CGGGATCCTGACAAGCACCTGAGCTG-CAGCTA 3'。CTCGAG 为 *Xho* I 的酶切位点,GGATCC 为 *Bam* H I 的酶切位点。

PCR 扩增条件:98 ℃ 5 min 预变性;98 ℃ 30

s,62 ℃ 45 s,72 ℃ 150 s,30 个循环;72 ℃ 10 min 后延伸。用 1%琼脂糖凝胶分别对 *AGPase-bt2* 和 *ppdk1* PCR 产物进行电泳,分别用凝胶回收试剂盒回收目的条带。

1.2.2 双分子荧光互补表达载体的构建及鉴定 *AGPase-bt2*、*ppdk1* PCR 产物凝胶回收后与 326-CYCHA、326-CYNEE 表达载体同时进行 *Xho* I / *Bam* H I 双酶切,试验方法及过程参考文献[18]。

1.2.3 双分子荧光互补表达载体转化农杆菌 EHA105 接种受体农杆菌 EHA105 于 YEP 液体培养基中,28 ℃ 振荡培养,同时接种含有 *prk2130* 质粒的大肠杆菌于 LB 液体培养基中,37 ℃ 振荡培养。挑选测序成功的 326-CYCHA-*AGPase-bt2* 和 326-CYNEE-PPDK1 大肠杆菌阳性菌落于 LB 液体培养基中,37 ℃ 振荡培养。待 3 种菌液生长到 OD₆₀₀ 均为 0.5 左右时,等体积混匀,涂布在不含任何抗生素的 YEP 固体培养基上,170 r/min、28 ℃ 过夜培养。将长出的单菌落培养于含抗性的 YEP 液体培养基中,28 ℃ 过夜培养,提取质粒并 PCR 验证阳性克隆。设置 326-CYCHA-CDKD、326-CYNEE-CYCH 为阳性对照,空载体 326-CYCHA、326-CYNEE 为阴性对照,同时将阳性质粒与阴性质粒同步转化农杆菌 EHA105。

1.2.4 重组质粒瞬时转化烟草叶肉细胞 吸取含有重组质粒的农杆菌 5 mL,170 r/min、28 ℃ 过夜

培养,3 000 g 离心 5 min,除去上清,将收集的菌体用稀释液(pH 5.6,10 mmol/L MES,10 mmol/L MgCl₂,150 μmol/L AS)溶解后稀释至 OD₆₀₀ 为 1.0 左右,使含有 *AGPase-bt2* 和 *ppdk1* 重组质粒的农杆菌菌液浓度一致。以含有阳性质粒和阴性质粒同浓度的菌液为对照。用 1 mL 无针头的注射器注射烟草叶片,为保持叶片水分,用保鲜膜将叶片包上,培养 48 h。

1.2.5 激光共聚焦镜检观察 取注射农杆菌后的烟草叶片,放置在载玻片,盖上盖玻片后,将载玻片倒置于激光共聚焦显微镜下,在波长 515 nm、100×物镜下观察烟草表皮细胞荧光蛋白表达情况,并拍照保存。

2 结果与分析

2.1 *AGPase-bt2* 和 *ppdk1* 基因的克隆

分别以含有目的基因的质粒 pGADT7-*AGPase-bt2* 和 pGBKT7-PPDK1 为模板,以上、下游分别带 *Xho* I / *Bam* H I 酶切位点的 F1/R1、F2/R2 为引物进行 PCR 扩增,PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测,分别扩增出与预期结果一致的条带:*AGPase-bt2* 为 1 428 bp,*ppdk1* 为 2 841 bp(图 1),获得目的基因 *AGPase-bt2* 和 *ppdk1* 的 CDS 序列,分别用凝胶回收试剂盒回收目的条带。

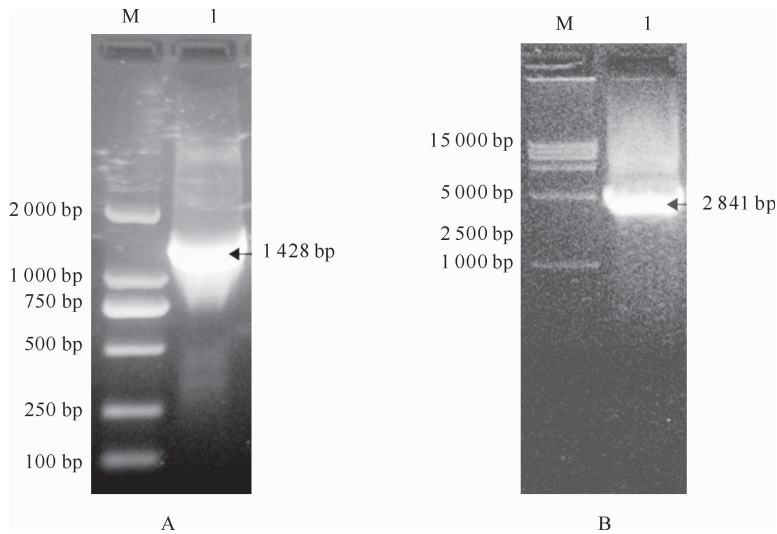


图 1 *AGPase-bt2* 和 *ppdk1* 基因 PCR 电泳结果

A:M. DNA 2 000 bp Marker;1. *AGPase-bt2* PCR product;

B:M. DNA 15 000 bp Marker;1. *ppdk1* PCR product

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis results for PCR products of *AGPase-bt2* and *ppdk1* genes

2.2 BiFC 表达载体的构建及验证

AGPase-bt2、*ppdk1* PCR 产物凝胶回收后与

326-CYCHA、326-CYNEE 表达载体同时进行 *Xho* I / *Bam* H I 双酶切,将酶切后的目的片段和表

达载体经 T4 DNA 连接酶 16 ℃ 过夜连接,并转化大肠杆菌感受态 DH5 α 。挑取单菌落摇菌后提取重组质粒 326-CYCHA-AGPase-bt2、326-CYNEE-PPDK1,进行 *Xho* I /*Bam*H I 酶切验证,结果表明插

入片段大小与测序结果一致(图 2)。阳性菌落进一步测序进行验证,证明目的基因 *AGPase-bt2*、*ppdk1* 插入开放阅读框正确,成功构建重组质粒。

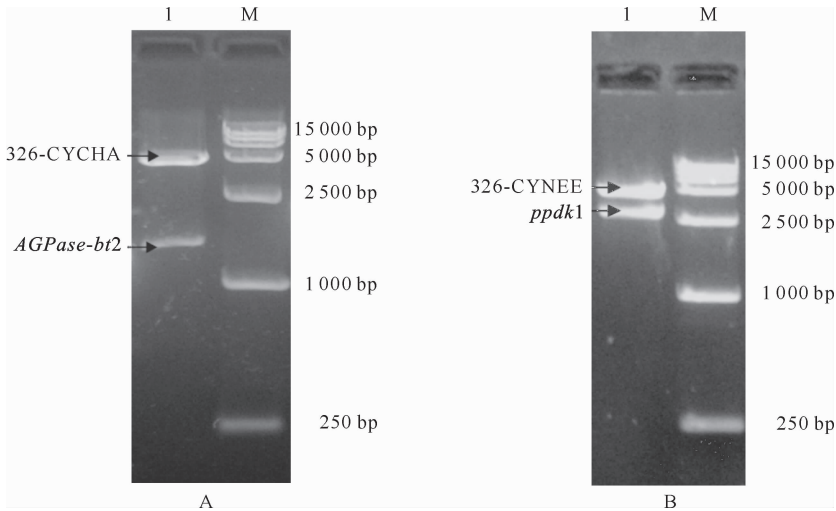


图 2 重组质粒 326-CYCHA-AGPase-bt2(A)和 326-CYNEE-PPDK1(B)的酶切结果

A:1. 326-CYCHA-AGPase-bt2 酶切结果(*Xho* I /*Bam*H I); M. DNA 15 000 bp Marker;
B:1. 326-CYNEE-PPDK1 酶切结果(*Xho* I /*Bam*H I);M. DNA 15 000 bp Marker

Fig. 2 Enzyme digestion of recombinant plasmids 326-CYCHA-AGPase-bt2 (A) and 326-CYNEE-PPDK1 (B)

A:1. Enzyme digestion of 326-CYCHA-AGPase-bt2 vector (*Xho* I /*Bam*H I);M. DNA 15 000 bp Marker;
B:1. Enzyme digestion of 326-CYNEE-PPDK1 vector (*Xho* I /*Bam*H I);M. DNA 15 000 bp Marker

2. 3 BiFC 检测 AGPase-bt2 和 PPDK1 的蛋白互作

将构建好的载体 pGADT7-AGPase-bt2 与 pG-BKT7-PPDK1 共转化入酵母报告菌株 AH109 中,同时分别以载体 pGBKT7-Lam 和 pGADT7-RecT 为阴性对照,pGBKT7-53 和 pGADT7-RecT 为阳性

对照。将转化后菌液涂布于四缺培养基(缺乏 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp)筛选平板上,长出菌落后挑至 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal 验证平板上。激活下游报告基因,导致菌斑区域变为蓝色,酵母双杂交试验结果(图 3)证实 AGPase-bt2 与 PPDK1 间发生相互作用。

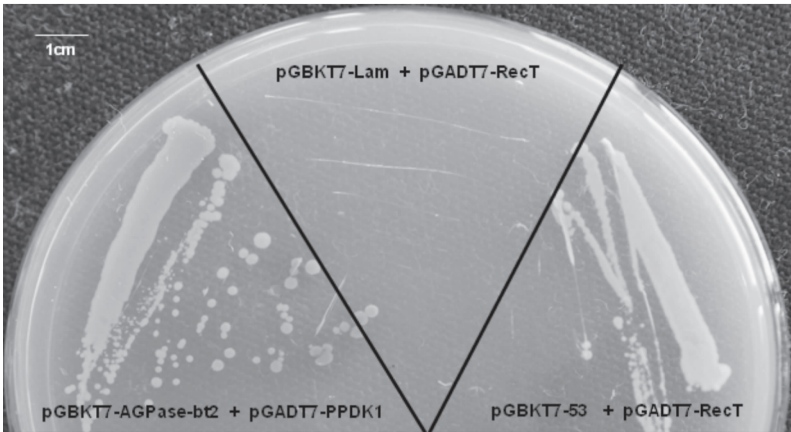


图 3 酵母双杂交验证 AGPase-bt2 和 PPDK1 蛋白质相互作用

Fig. 3 Interactions between proteins of AGPase-bt2 and PPDK1 by yeast two-hybrid system

将构建好的 326-CYCHA-AGPase-bt2 和 326-CYNEE-PPDK1 重组载体,共同瞬时转化烟草叶肉细胞 48 h 后,515 nm 黄光激发光、100 $\times$ 物镜下激

光共聚焦显微镜下观察荧光(黄色)信号的产生情况,结果(图 4)显示,在激光共聚焦显微镜下阴性对照无荧光信号,而瞬时转化 326-CYCHA-AGPase-

bt2 和 326-CYNEE-PPDK1 的烟草叶肉细胞检测到较为明显的黄色荧光信号,结果与阳性对照组一致。说明 AGPase-bt2 和 PPKD1 之间在植物体内也存在蛋白互作。

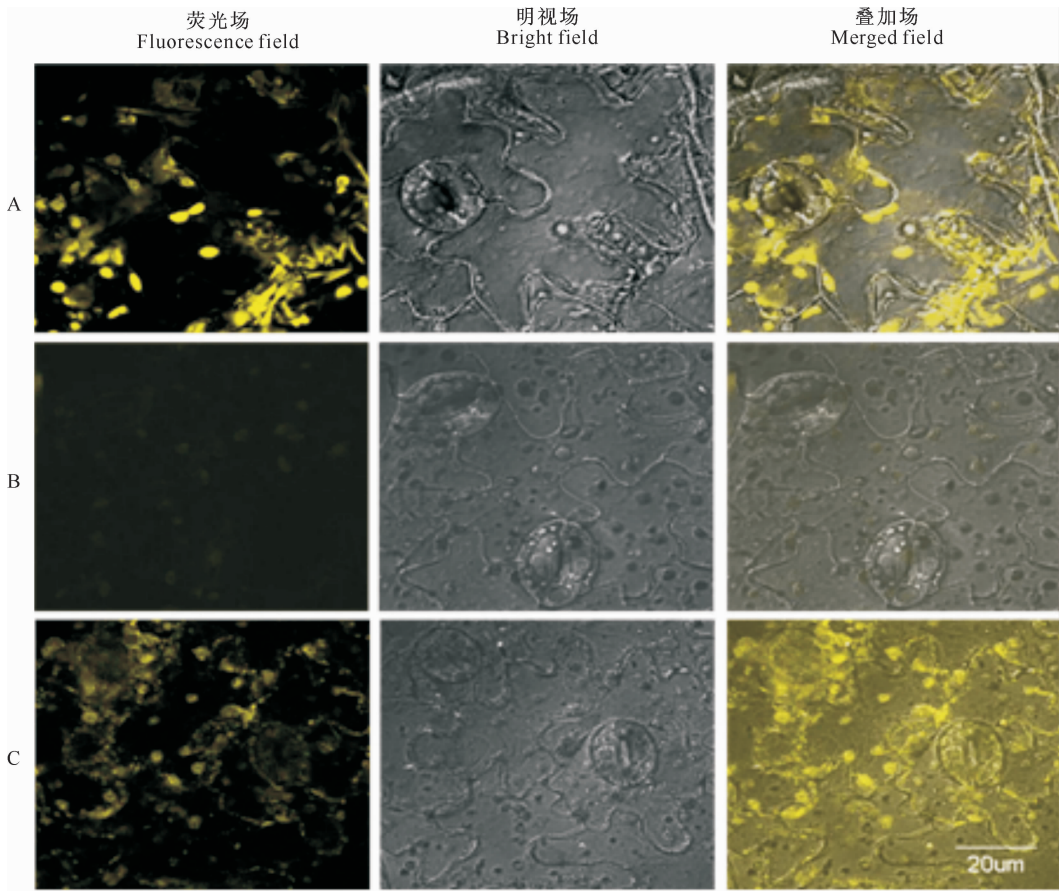


图 4 转化烟草叶肉细胞的荧光共聚焦镜检结果

A. 转化 326-CYCHA-CDKD 和 326-CYNEE-CYCH(阳性对照)的烟草叶肉细胞;

B. 转化 326-CYCHA 和 326-CYNEE(阴性对照)的烟草叶肉细胞;

C. 转化 326-CYCHA-AGPase-bt2 和 326-CYNEE-PPDK1 的烟草叶肉细胞

Fig. 4 Bimolecular fluorescence complementation(BiFC) analysis of interactions between AGPase-bt2 and PPKD1 in tobacco mesophyll cells

A. Transformation 326-CYCHA-CDKD and 326-CYNEE-CYCH (positive control) in tobacco mesophyll cells;

B. Transformation 326-CYCHA and 326-CYNEE (negative control) in tobacco mesophyll cells;

C. Transformation 326-CYCHA-AGPase-bt2 and 326-CYNEE-PPDK1 in tobacco mesophyll cells

3 讨 论

蛋白质是生命活动的物质基础,基因的表达与调控、物质的代谢与调节等,都离不开蛋白质之间的相互作用^[19]。研究蛋白质互作的方法较多,有免疫共沉淀技术、酵母双杂交技术,但是这些方法都不能够在活细胞条件下对细胞内蛋白质间相互作用进行动态研究^[20]。

BiFC 技术是近年来发展起来的用于体内或体外快速检测目标蛋白在细胞中定位和相互作用的一项新技术,该技术主要是将荧光蛋白在合适的位点切开形成 2 个不发荧光的片段,这 2 个片段借助融

合于其上的目的蛋白间的相互作用,彼此再次靠近,重新形成具有活性的荧光蛋白^[21]。该技术不但可以检测蛋白间的相互作用,而且为在活细胞内观察蛋白质相互作用提供了更多便利^[22]。Grinberg 等^[23]利用该技术证明,转录因子 Max 家族蛋白在活细胞中能与 Myc 和 Mad 家族的所有成员结合。Boruc 等^[24]利用酵母双杂交和 BiFC 技术相结合,验证了拟南芥细胞周期蛋白依赖性激酶与之调节关联蛋白间的互作。崔喜艳等^[18]也成功利用 BiFC 技术验证,玉米中可溶性淀粉合成酶 SSI 与质体型糖酵解合成途径关键催化酶 PPKD1 的蛋白互作关系。

本试验成功构建 326-CYCHA-AGPase-bt2、

326-CYNEE-PPDK1 2 个 BiFC 载体,采用瞬时转化的方法注射烟草叶肉细胞,并设置阳性和阴性对照,结果显示与阳性对照一致,转化 326-CYCHA-AG-Pase-bt2 和 326-CYNEE-PPDK1 的烟草叶肉细胞检测到较为明显的黄色荧光信号,能够在植物细胞内发生真实的相互作用,该试验结果与酵母双杂交试验结果相同。

AGPase-bt2 作为淀粉合成中的关键酶之一,催化 1-磷酸葡萄糖与 ATP 形成 ADPG 和焦磷酸,主要为淀粉合成提供前体物质 ADPG。PPDK1 在种子中参与淀粉的合成,是糖酵解途径中的关键酶。PPDK1 能够催化丙酮酸生成 PEP 和焦磷酸^[25]。AGPase-bt2 和 PPDK1 之间蛋白的互作,使得 ADPG 合成时产生的焦磷酸更快地转移到 PPDK1 催化的反应上,同时加快丙酮酸生成速度^[26],从而促进丙氨酸族氨基酸的合成,使得氨基酸合成和淀粉合成途径紧密相连。AGPase-bt2 和 PPDK1 在空间上的接近有效地提高了局部酶促反应中底物和酶的浓度,在维持淀粉代谢稳定性的同时,极大地加速了整个淀粉代谢过程。本研究为进一步解析复杂的淀粉代谢和糖酵解途径的关系,以及碳代谢流由淀粉生成转化到氨基酸合成提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] 沈丙权,郑贝贝,彭慧芳,等.玉米 AGPase 胞质型小亚基 ZmSSUI 基因的克隆及在籽粒发育过程中的表达 [J]. 西北农业学报,2010,19(7):61-65.
Shen B Q, Zheng B B, Peng H F, et al. Cloning of a cytosolic small subunit of AGPase and its transcripts in the developing kernels of maize (*Zea mays*) [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2010, 19(7): 61-65. (in Chinese)
- [2] 康国章,刘超,沈丙权,等.小麦 AGPase 4 个亚基的克隆及其组织特异性表达 [J]. 西北农业学报,2009,18(1):60-64.
Kang G Z, Liu C, Shen B Q, et al. Cloning of four subunit genes for wheat AGPase and their transcript levels in different organs [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2009, 18(1): 60-64. (in Chinese)
- [3] Hannah L C, Shaw J R, Giroux M J, et al. Maize genes encoding the small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase [J]. Plant Physiol, 2001, 127(1): 173-183.
- [4] Fu Y B, Ballieora M A, Leykam J F, et al. Mechanism of reductive activation of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase [J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(39): 25045-25052.
- [5] Anisworh C, Tarvis M, Clark J. Isolation and analysis of cDNA clone encoding the small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase from wheat [J]. Plant Molecular Biology, 1993, 23(1): 23-33.
- [6] Cossegal M, Chambrier P, Mbello S, et al. Transcriptional and metabolic adjustments in ADP-glucose pyrophosphorylase-deficient bt2 maize kernels [J]. Plant Physiol, 2008, 146(4): 1553-1570.
- [7] Trevanion S J, Furbank R T, Ashton A R. NADP-malate dehydrogenase in the C4 plant *Flaveria bidentis* (Cosense suppression of activity in mesophyll and bundle-sheath cells and consequences for photosynthesis) [J]. Plant Physiol, 1997, 113(4): 1153-1165.
- [8] 张桂芳,王金明,赵明,等.植物丙酮酸磷酸双激酶的分子生物学和基因工程研究进展 [J]. 生物技术通报,2009,8(8):18-21.
Zhang G F, Wang J M, Zhao M, et al. Progress of PPDK in the area of molecular biology and gene engineering [J]. Biotechnology Bulletin, 2009, 8(8): 18-21. (in Chinese)
- [9] Matsuoka M. The gene for pyruvate, orthophosphate dikinase in C4 plants; Structure, regulation and evolution [J]. Plant and Cell Physiology, 1995, 36(6): 937-943.
- [10] Kang H G, Park S, Matsuoka M, et al. White-core endosperm floury endosperm-4 in rice is generated by knockout mutations in the C4-type pyruvate orthophosphate dikinase gene (OsPPDKB) [J]. The Plant Journal, 2005, 42(6): 901-911.
- [11] Tetlow I J, Wait R, Lu Z, et al. Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein-protein interactions [J]. Plant Cell, 2004, 16(3): 694-708.
- [12] Tetlow I J, Beisel K G, Cameron S, et al. Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes [J]. Plant Physiol, 2008, 146(4): 1878-1891.
- [13] Hennen-Bierwagen T A, Liu F S, Marsh R S, et al. Starch biosynthetic enzymes from developing maize endosperm associate in multisubunit complexes [J]. Plant Physiol, 2008, 146(4): 1892-1908.
- [14] Hennen-Bierwagen T A, Lin Q H, Grimaud F, et al. Proteins from multiple metabolic pathways associate with starch biosynthetic enzymes in high molecular weight complexes: A model for regulation of carbon allocation in maize amyloplasts [J]. Plant Physiol, 2009, 149(3): 1541-1559.
- [15] Lin T P, Caspar T, Sommeville C R, et al. A starch deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* with low ADP-glucose pyrophosphorylase activity lacks one of the two subunits of the enzyme [J]. Plant Physiol, 1988, 88(4): 1175-1181.
- [16] Müller-Röber B T, Koßmann J, Hannah L C, et al. One of two different ADP-glucose pyrophosphorylase genes from potato responds strongly to elevated levels of sucrose [J]. Molecular and General Genetics MGG, 1990, 224(1): 136-146.
- [17] 王重,张跃强,樊哲儒,等.玉米高光效基因 ppdk 的克隆及其生物信息学分析 [J]. 新疆农业科学,2010,47(12):2354-2360.
Wang Z, Zhang Y Q, Fan Z R, et al. Cloning and bioinformatics analysis of high photosynthetic gene ppdk in *Zea mays* [J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2010, 47(12): 2354-2360. (in Chinese)

- ules in wheat endosperm [J]. *Crop Research*, 2012, 26(4): 337-343. (in Chinese)
- [17] 侯 蕾, 韩小贤, 郑学玲, 等. 不同直链淀粉含量玉米淀粉研究进展 [J]. *粮食与油脂*, 2013(6): 11-14.
Hou L, Han X X, Zheng X L, et al. Research advance on corn starch with different content of amylose [J]. *Cereals & Oils*, 2013(6): 11-14. (in Chinese)
- [18] 黄 强, 王 婵, 罗发兴, 等. 玉米淀粉的热力学性质与消化性 [J]. *华南理工大学学报*, 2011, 39(9): 7-11.
Huang Q, Wang C, Luo F X, et al. The thermodynamic and digestive properties of corn starch [J]. *Journal of South China University of Technology*, 2011, 39(9): 7-11. (in Chinese)
- [19] 王中荣, 刘 雄. 不同直链淀粉含量的玉米淀粉理化性质及其应用研究 [J]. *粮食与油脂*, 2007(5): 15-19.
Wang Z R, Liu X. Studies on physical-chemical properties and application of cornstarch with different content of amylose [J]. *Cereals & Oils*, 2007(5): 15-19. (in Chinese)
- [20] 王中荣, 刘 雄. 高直链淀粉性质及应用研究 [J]. *粮食与油脂*, 2005(11): 10-13.
Wang Z R, Liu X. Study on properties and application of high amylose starch [J]. *Cereals & Oils*, 2005(11): 10-13. (in Chinese)
- [21] 黄祖强, 胡华宇, 童张法, 等. 机械活化法制备冷水可溶性玉米淀粉的工艺研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2005, 31(12): 1-3.
Huang Z Q, Hu H Y, Tong Z F, et al. Processive research on soluble corn starch in cold water of mechanical active method [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2005, 31(12): 1-3. (in Chinese)
- [22] 马 齐, 秦 涛, 田 萍, 等. 黄姜淀粉的理化性质分析 [J]. *食品研究与开发*, 2007, 28(5): 98-101.
Ma Q, Qin T, Tian P, et al. Analysis on some physiochemical property of dioscorea, zingiberensis wright starch [J]. *Food Research and Development*, 2007, 28(5): 98-101. (in Chinese)
- [23] 袁美兰. 淀粉结构和性质的研究概况 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2011, 32(1): 102-104.
Yuan M L. Research survey on structure and properties of starch [J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2011, 32(1): 102-104. (in Chinese)
- [24] Singh J, Singh N. Studies on the morphological, thermal and rheological properties of starch separated from some Indian potato cultivars [J]. *Food Chemistry*, 2011, 75(1): 67-77.

(上接第 52 页)

- [18] 崔喜艳, 张继晓, 窦 瑶, 等. 双分子荧光互补技术 (BiFC) 分析玉米 SSI 与 PPK1 之间的蛋白互作 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2013, 41(7): 49-53, 59.
Cui X Y, Zhang J X, Dou Y, et al. SSI and PPK1 interactions in bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay [J]. *Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed*, 2013, 41(7): 49-53, 59. (in Chinese)
- [19] 郭术俊, 赵保明, 唐 洁, 等. pBiFC-VN173-Olig2 和 pBiFC-VC155-Id4 真核表达质粒的构建及其在活细胞内的相互作用 [J]. *华中科技大学学报: 医学版*, 2011, 40(2): 137-141.
Guo S J, Zhao B M, Tang J, et al. Construction of pBiFC-VN173-Olig2 and pBiFC-VC155-Id4 eukaryotic expression vectors and their interaction in living cells [J]. *Acta Medicinæ Universitatis Scientiæ et Technologiæ Huazhong*, 2011, 40(2): 137-141. (in Chinese)
- [20] 严 晶, 霍克克. 双分子荧光互补技术及其在蛋白质相互作用研究中的应用 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2006, 33(6): 589-595.
Yan J, Huo K K. Biomolecular fluorescence complementation (BiFC) and its application in researching on protein-protein interactions [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2006, 33(6): 589-595. (in Chinese)
- [21] Hu C D, Chinenov Y, Kerppola T K. Visualization of interactions among bZip and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation [J]. *Molecular Cell*, 2002, 9(4): 789-798.
- [22] 樊晋宇, 崔宗强, 张先恩. 双分子荧光互补技术 [J]. *中国生物化学与分子生物学学报*, 2008, 24(8): 767-774.
Fan J Y, Cui Z Q, Zhang X E. Bimolecular fluorescence complementation technique [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 24(8): 767-774. (in Chinese)
- [23] Grinberg V A, Hu C D, Kerppola K T. Visualization of Myc/Max/Mad family dimers and the competition for dimerization in living cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(10): 4294-4308.
- [24] Boruc J, Van den Daele H, Hollunder J, et al. Functional modules in the *Arabidopsis* core cell cycle binary protein-protein interaction network [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(4): 1264-1280.
- [25] 王金明, 丁在松, 张桂芳, 等. 家稗丙酮酸磷酸双激酶 (PPDK) 基因的克隆及序列分析 [J]. *作物学报*, 2007, 33(6): 927-930.
Wang J M, Ding Z S, Zhang G F, et al. Cloning and sequence analysis of *pdk* gene in *Echinochloa crusgalli* var. *frumentacea* (Roxb.) W. F. Wight [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, 33(6): 927-930. (in Chinese)
- [26] 张建福, Swapan K Datta, 王国英, 等. 玉米高光效基因 PPDK 在籼稻 IR64 中的整合及其与光合作用相关的特性分析 [J]. *分子植物育种*, 2006, 4(6): 797-804.
Zhang J F, Swapan K D, Wang G Y, et al. Integration of C4-specific PPDK gene of maize to C3 rice IR64 and its photosynthesis characteristics analysis [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2006, 4(6): 797-804. (in Chinese)