

网络出版时间:2015-05-11 15:02

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2015.06.007

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150511.1502.007.html>

玉米 AGPase-bt2 与 GPN1 蛋白互作的 双分子荧光互补技术研究

崔喜艳^{1,2}, 赵吉元¹, 胡广宇¹, 窦瑶³, 刘相国², 韩四平²

(1 吉林农业大学 生命科学学院, 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;

3 吉林大学 生命科学学院, 吉林 长春 130012)

[摘要] **【目的】**解析玉米淀粉合成限速酶 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶(AGPase-bt2)与糖酵解关键酶甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GPN1)在植物体内是否存在相互作用。**【方法】**首先克隆获得 *AGPase-bt2* 和 *GPN1* 基因,然后采用双分子荧光互补技术(BiFC),构建 326-CYCHA-AGPase-bt2 和 326-CYNEE-GPN1 双分子荧光表达载体,转化农杆菌 EHA105,并用 2 种载体共同瞬时侵染烟草叶肉细胞,48 h 后在激光共聚焦显微镜下观察 AGPase-bt2 与 GPN1 的相互作用。**【结果】***AGPase-bt2* 基因长 1 428 bp,*GPN1* 基因长 1 497 bp。双酶切鉴定结果表明,326-CYCHA-AGPase-bt2、326-CYNEE-GPN1 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;携带有共转化基因的烟草叶肉细胞在激光共聚焦显微镜下观察到明显的黄色荧光现象,且黄色荧光与叶绿体自发的红色荧光位置重合。**【结论】**AGPase-bt2 与 GPN1 在植物细胞中真实地存在蛋白互作。

[关键词] AGPase-bt2;GPN1;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(2015)06-0099-06

Interaction between AGPase-bt2 and GPN1 in maize using bimolecular fluorescence complementation

CUI Xi-yan^{1,2}, ZHAO Ji-yuan¹, HU Guang-yu¹, DOU Yao³,
LIU Xiang-guo², HAN Si-ping²

(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;

3 School of Life Sciences, Jilin University, Changchun, Jilin 130012, China)

Abstract: **【Objective】**This study aimed to clarify the interaction between starch synthesis rate-limiting enzyme ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase-bt2) and glycolytic key enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPN1) in maize. **【Method】***AGPase-bt2* and *GPN1* gene was cloned first. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) was used to construct the bimolecular fluorescence expression vectors 326-CYCHA-AGPase-bt2 and 326-CYNEE-GPN1 and they were transformed into *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. Then two vectors were used to dip tobacco mesophyll cells momentarily and the interaction between AGPase-bt2 and GPN1 was observed by using confocal laser scanning microscope after 48 hours. **【Result】***AGPase-bt2* gene length is 1 428 bp, and *GPN1* gene length is 1 497 bp. The 326-CYCHA-AGPase-bt2 and 326-CYNEE-GPN1 vectors were constructed correctly by double enzyme diges-

[收稿日期] 2014-09-29

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31170731,31200611);吉林省科技发展计划项目(20130206012NY,20130102066JC)

[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] 韩四平(1970—),男,吉林长春人,副研究员,硕士,主要从事分子标记辅助育种研究。E-mail: 13246294@qq.com

tion and expressed successfully by PCR. The tobacco mesophyll cells carrying co-transformed gene can be observed as yellow fluorescence phenomenon by laser confocal microscopy, and the yellow fluorescence coincided with spontaneous red fluorescence of chloroplasts. 【Conclusion】 The interaction between AGPase-bt2 and GPN1 in plant cells was confirmed.

Key words: AGPase-bt2; GPN1; bimolecular fluorescence complementation; protein interaction

玉米(*Zea mays*)是重要的粮食作物和工业生产原料,淀粉是玉米籽粒中的主要贮藏物质^[1]。大量研究表明,在玉米淀粉代谢过程中,多种淀粉代谢相关的酶形成多酶复合物,通过相互作用的形式参与调节淀粉的代谢过程,这种复合物的形成及蛋白的相互作用涉及到与糖代谢相关的所有代谢途径,同时促进了糖异生、糖酵解和淀粉合成等多种不同代谢途径在空间位置关系上的拉近,预示着几种代谢途径存在着共同的代谢底物^[2-3]。淀粉的代谢是一个复杂的生物过程,在玉米胚乳中,蔗糖在蔗糖合成酶作用下先被分解为果糖和 UDP-葡萄糖,进而在磷酸变位酶和 UDPG 焦磷酸化酶作用下形成 1-磷酸葡萄糖(G-1-P)^[4]; G-1-P 在 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶的作用下形成淀粉合成所需的重要前体物质 ADP-葡萄糖,然后再转移到造粉体中进一步生成淀粉^[5]。ADP-葡萄糖焦磷酸化酶((ADP-Glucose pyrophosphorylase, AGPase)分为胞质型和质体型 2 种,每种 AGPase 均由 2 个大亚基(AGPase-bt1)和 2 个小亚基(AGPase-bt2)组成,是淀粉生物合成的限速酶之一,在为淀粉合成提供前体物质 ADP-葡萄糖的反应中,AGPase-bt2 主要起催化作用^[6]。

直链和支链淀粉在合成的同时也不断地降解,糖酵解就是其中一个重要的降解途径^[7-8]。Jörg 等^[9]、Kirby 等^[10]研究表明,糖酵解途径过程不仅存在于细胞溶质中,其关键中间代谢物在质体中也存在,并且中间代谢物在细胞溶质和质体之间存在一定的物质交流。糖酵解途径中通过一系列特异性酶的催化将葡萄糖分解成丙酮酸,同时伴有少量 ATP 生成^[11]。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GPN1)是糖酵解过程的关键酶,其主要生物学功能是催化甘油醛-3-磷酸氧化磷酸化,生成 1,3-二磷酸甘油酸^[12]。GPN1 酶活性大小直接影响葡萄糖分解为丙酮酸的程度,以及生成 ATP 的速度。从物质代谢和能量代谢的角度来说,淀粉的合成和糖酵解是相反却又密不可分的两种代谢。因此,研究糖酵解途径和淀粉代谢中各自关键酶是否也参与形成多酶复合物,以及是否互作具有重要意义。

双分子荧光互补(Bimolecular fluorescence

complementation, BiFC)分析技术是 Hu 等^[13]最先报道的一种在活细胞中判断目标蛋白相互作用和定位的直观、快速的新技术。该技术将荧光蛋白分割成两个没有荧光活性的分子片段,并将待检测的两个目标蛋白分别与它们连接。若这两个目标蛋白之间存在相互作用,则无荧光活性的这两个荧光分子片段就会因相互靠近而形成有活性的荧光基团,因此在荧光显微镜下会检测到荧光,反之则检测不到荧光。前期,吉林省农业科学院农业生物技术研究实验室已利用酵母双杂交技术,对 AGPase-bt2 与 GPN1 的互作关系在酵母体内进行了验证(结果未发表),但酵母双杂交的假阳性几率较高^[13],且不能说明在植物体内两种蛋白同样会存在相互作用。而 BiFC 技术可以高度模拟植物自然形态下细胞的生理形态^[14-15],利用这种技术已成功验证玉米 SSI 与 PDK1^[16]之间的蛋白互作,在此研究基础上,本试验以质体型 AGPase-bt2 和糖酵解关键酶 GPN1 为材料,在烟草活细胞中力求真实还原 AGPase-bt2 和 GPN1 在植物体内的蛋白互作关系,以期为进一步解析玉米淀粉生物合成和糖酵解途径的关系提供研究方法和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物材料:大叶烟草种子由吉林农业大学生物化学与分子生物学研究室保存提供。

质粒及菌种:pGBKT7-AGPase-bt2 质粒、pGADT7-GPN1 质粒(分别含有从玉米中克隆的 AGPase-bt2 和 GPN1 编码框的目的基因),均由吉林省农业科学院农业生物技术研究实验室保存提供;荧光互补表达载体,阴性质粒 326-CYNEE、326-CYCHA,阳性质粒 326-CYNEE-CYCH、326-CYCHA-CDKD(CYCH 为细胞周期素 H(cyclin H),CDKD 为细胞周期依赖激酶 D 型(cyclin-dependent kinases D),二者存在蛋白互作关系^[17])均由中国科学院植保所馈赠;大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 α 、农杆菌菌株 EHA105 由吉林省农业科学院农业生物技术研究实验室保存提供。

酶及生物试剂:PCR 所用扩增酶、限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、质粒提取试剂盒和凝胶回收试剂盒均购于 TAKARA 公司;氯化镁、乙酰丁香、2-吗啉乙磺酸、水饱和酚、氯仿和异戊醇等均购自沈阳联星公司;酵母提取物、蛋白胨购自 OXIXD 公司,琼脂粉购自 BD 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 玉米 *AGPase-bt2* 和 *GPN1* 基因的 PCR 扩增 分别以 pGBKT7-*AGPase-bt2* 和 pGADT7-*GPN1* 质粒为模板,采用带酶切位点的引物进行 PCR 扩增。上游引物 5'端添加 *Xho* I 酶切位点 CTCGAG,下游引物 5'端添加 *Bam*H I 酶切位点 GGATCC。引物由北京生工有限公司合成。

AGPase-bt2 基因 PCR 上游引物 F1: 5'-CCGCTCGAGATGGCGGCATCGGTTTCC-3', 下游引物 R1: 5'-CG GGATCC TGACAAGCACCT GAGCTGCAGCTA-3';

GPN1 基因 PCR 上游引物 F2: 5'-CCGCTCGAGATGGCGCTGGCGGGGAC-3', 下游引物 R2: 5'-CG GGATCC TGCCCATGGTG TAGGATGGTGACG-3'。

PCR 扩增条件为: 98 ℃ 5 min;98 ℃ 30 s,66 ℃ 45 s,72 ℃ 160 s,35 个循环;72 ℃ 10 min。对 PCR 产物采用 1%琼脂糖凝胶进行电泳检测,观察记录结果。

1.2.2 双分子荧光互补表达载体的构建及鉴定 *AGPase-bt2* 基因和 *GPN1* 基因的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,凝胶回收试剂盒回收后进行(*Xho* I /*Bam*H I)双酶切,分别与同样用 *Xho* I /*Bam*H I 双酶切的 326-CYCHA 载体、326-CYNEE 载体 16 ℃过夜连接,构建表达载体,转化大肠杆菌 DH5 α 。

挑取单菌落在 LB 液体培养基中过夜培养,提取质粒,将质粒进行 PCR 和双酶切鉴定,鉴定成功的阳性克隆送北京生工有限公司测序。

1.2.3 *AGPase-bt2* 和 *GPN1* 分子相互结合的 BiFC 分析 将测序正确的重组质粒 326-CYCHA-*AGPase-bt2* 和 326-CYNEE-*GPN1* 分别转化农杆菌 EHA105, 28 ℃过夜摇菌,提质粒后 PCR 验证阳性克隆,同时以转化阳性和阴性质粒为对照。将 2 种阳性克隆及 2 种对照分别转化农杆菌,YEP 液体培养基 28 ℃摇菌过夜培养,3 000 *g* 离心 5 min,弃上清,将收集的菌体分别用稀释液(pH 5.6,10 mmol/L MES,10 mmol/L MgCl₂,150 μ mol/L AS)溶解后稀释至 OD₆₀₀ 为 1.0 左右,使含有待测重组质粒的菌液浓度达到一致后等体积混合,同时稀释阳性和阴性质粒菌液至 OD₆₀₀ 为 1.0 作为对照。用灭菌针头在烟草叶片下表面扎 2~4 个小孔;用 1 mL 的无针头注射器将 2 种重组质粒、2 种阳性质粒和 2 种阴性质粒的混合溶液分别平稳注入烟草下表皮扎孔处;将烟草叶片用保鲜膜包住。在 28 ℃温室中培养 48 h 后,取出烟草叶片,用刀片和镊子撕取叶片下表皮注射农杆菌的部分;将标本置于载玻片上,表面滴 1 滴体积分数 15%的甘油,覆上盖玻片,使用激光共聚焦显微镜(515 nm 黄光激发光、100 $\times$ 物镜)观察烟草表皮细胞荧光的蛋白表达情况,并拍照保存试验结果。

2 结果与分析

2.1 *AGPase-bt2* 和 *GPN1* 基因的 PCR 扩增

分别以含有目的基因的质粒 pGBKT7-*AGPase-bt2*、pGADT7-*GPN1* 为模板,以 F1/R1、F2/R2 为引物进行 PCR 扩增,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,结果(图 1)与预期大小一致。

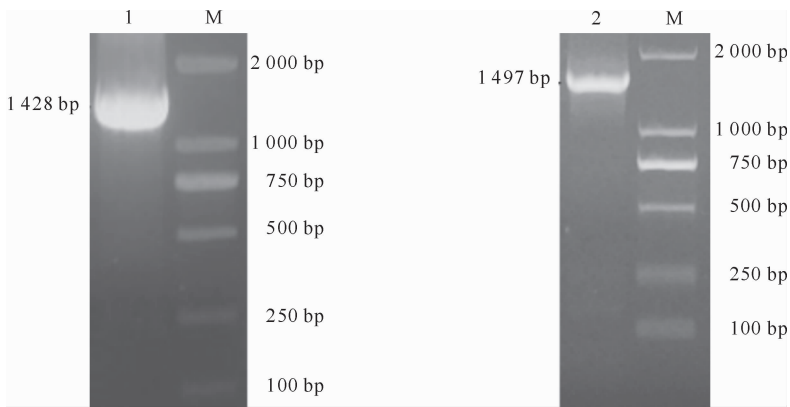


图 1 *AGPase-bt2* 基因和 *GPN1* 基因的 PCR 扩增
M. DL2000 DNA Marker;1. *AGPase-bt2*;2. *GPN1*

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of *AGPase-bt2* and *GPN1* PCR products

由图 1 可见, *AGPase-bt2* 基因大小为 1 428 bp, *GPN1* 基因大小为 1 497 bp。用凝胶回收试剂盒回收目的基因片段。分别获得上游带 *Xho* I 酶切位点、下游带 *Bam*H I 酶切位点的 *AGPase-bt2* 基因 PCR 产物和 *GPN1* 基因 PCR 产物。

2.2 双分子荧光互补表达载体的构建及鉴定

AGPase-bt2 基因和 *GPN1* 基因的 PCR 扩增片段分别经 *Xho* I / *Bam*H I 双酶切后, 分别与同样经 *Xho* I / *Bam*H I 双酶切的荧光载体 326-CYCHA

和 326-CYNEE 进行连接, 转化大肠杆菌后挑选阳性克隆, 提取质粒, 经双酶切鉴定发现, *AGPase-bt2* 基因条带大小为 1 400 bp 左右, *GPN1* 基因条带大小为 1 500 bp 左右, 与 PCR 产物大小相符(图 2)。将鉴定的阳性克隆菌株送至北京生工有限公司测序, 发现所得序列与 GenBank 报道的玉米 *AGPase-bt2* 基因和 *GPN1* 基因序列一致, 相似度为 100%, 证明成功构建了玉米 326-CYCHA-*AGPase-bt2*、326-CYNEE-*GPN1* 重组质粒。

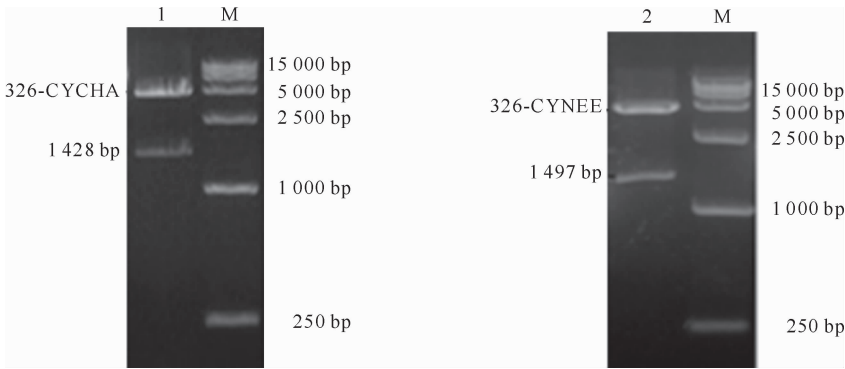


图 2 重组质粒 326-CYCHA-*AGPase-bt2* 和 326-CYNEE-*GPN1* 的双酶切结果

1. 重组质粒 326-CYCHA-*AGPase-bt2* 的限制性酶切结果(*Xho* I / *Bam*H I);M. DL15000 DNA Marker;
2. 重组质粒 326-CYNEE-*GPN1* 的限制性酶切结果(*Xho* I / *Bam*H I)

Fig. 2 Recombinant plasmid 326-CYCHA-*AGPase-bt2* and 326-CYNEE-*GPN1* by double enzyme digestion

1. Restriction endonuclease of recombinant plasmid 326-CYCHA-*AGPase-bt2* (*Xho* I / *Bam*H I);M. DL15000 DNA Marker;
2. Restriction endonuclease of recombinant plasmid 326-CYNEE-*GPN1* (*Xho* I / *Bam*H I)

2.3 *AGPase-bt2* 与 *GPN1* 互作的 BiFC 分析

将构建好的重组载体 326-CYCHA-*AGPase-bt2* 和 326-CYNEE-*GPN1* 共同瞬时侵染烟草叶肉细胞 48 h 后, 在激光共聚焦显微镜下观察荧光信号, 同时设置 326-CYCHA-CDKD、326-CYNEE-CYCH 为阳性对照, 空载体 326-CYNEE、326-CYCHA 作为阴性对照, 结果见图 3。图 3 中, (1) 是在自然光下观察到的细胞; (2) 是细胞叶绿体在激发后产生的红色荧光; (3) 为在激发光下观察到的黄色荧光蛋白发光; (4) 为叶绿体在激发后产生的自发红色荧光和激发光下蛋白互作产生的黄色荧光的叠加结果; (5) 为在完整细胞结构中观察到的 YFP 激发光下的蛋白互作位点。由图 3 可见, 阳性对照组(326-CYCHA-CDKD 和 326-CYNEE-CYCH)可检测到明显的黄色荧光信号; 阴性对照组(326-CYCHA 和 326-CYNEE)检测不到黄色荧光; 试验组(326-CYCHA-*AGPase-bt2* 和 326-CYNEE-*GPN1*)在 YFP 激发光下可以检测到较为明显的黄色荧光信号, 与阳性对照组结果一致, 表明 *AGPase-bt2* 和 *GPN1* 蛋白能够在植物细胞内相互结合。

3 讨 论

禾本科植物种子中贮存的主要物质是淀粉和蛋白质, 二者的含量直接影响籽粒的品质和产量^[18]。*AGPase-bt2* 是玉米胚乳淀粉代谢关键酶 *AGPase* 基因的一个突变体小亚基, 它的主要生物学作用是以 1-磷酸葡萄糖为原料, 在 ATP 的供能下生成焦磷酸以及 ADPG。*AGPase-bt2* 主要存在于玉米胚乳的造粉质体内^[19]。研究人员在 1995 年发现, *AGPase* 对玉米生长进程中的某些生理活性起着关键性作用^[20]。*AGPase-bt2* 主要催化 G-1-P 在 ATP 的参与下合成腺苷二磷酸葡萄糖 ADPG^[21]。*AGP* 酶催化淀粉合成的限速步骤, 在玉米胚乳的淀粉合成过程中起着至关重要的作用^[22]。*GPN1* 是一个管家基因, 可催化甘油醛-3-磷酸氧化磷酸化生成 1,3-二磷酸甘油酸^[23]。甘油醛 3-磷酸脱氢酶在糖酵解过程中起到关键作用, 参与叶片的光合作用, 同时种子中的甘油醛 3-磷酸脱氢酶参与淀粉的合成。*AGPase-bt2* 和 *GPN1* 蛋白的互作, 使得淀粉合成与糖酵解途径之间建立了某种联系, 在玉米淀粉积累

的过程中,糖酵解为淀粉积累提供了直接能量 ATP,同时可以有效地加速碳代谢流。

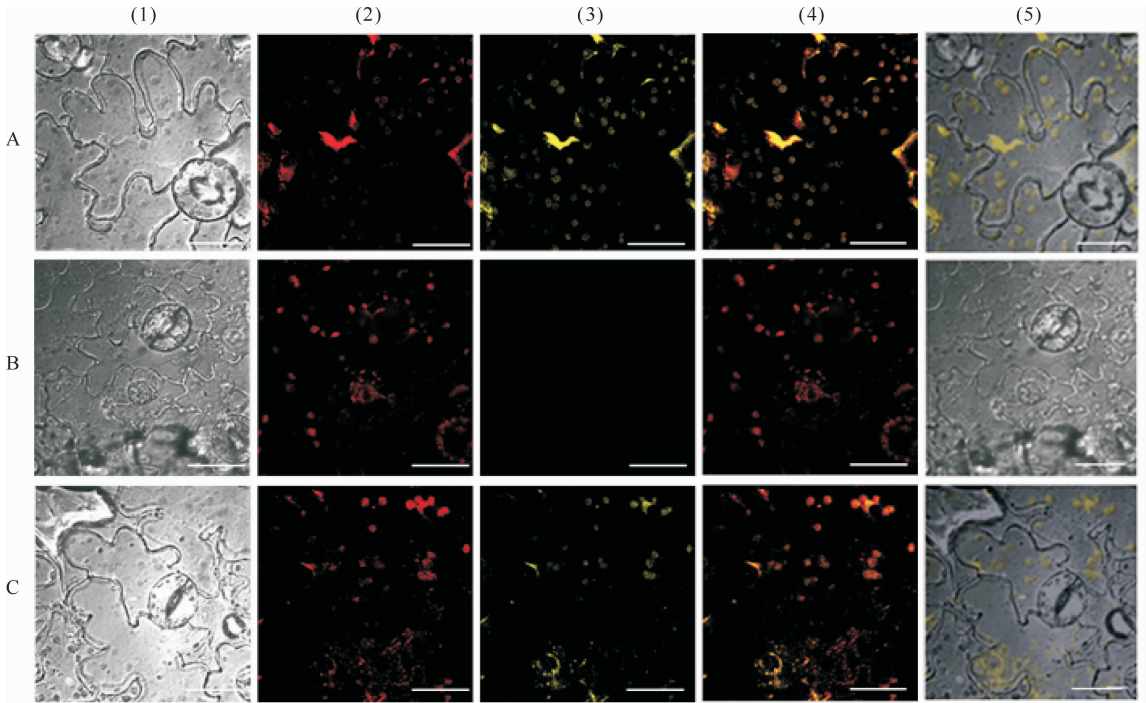


图 3 AGPase-bt2 与 GPN1 在烟草叶肉细胞中互作的 BiFC 检测结果

A. 阳性对照(326-CYCHA-CDKD 和 326-CYNEE-CYCH);(1). 明视场;(2). 叶绿体自发荧光;(3). 黄色荧光蛋白激发荧光;(4). (2)和(3)的叠加;(5). (1)和(3)的叠加;B. 阴性对照(326-CYCHA 和 326-CYNEE);(1). 明视场;(2). 叶绿体自发荧光;(3). 无荧光现象;(4). (2)和(3)的叠加;(5). (1)和(3)的叠加;C. 试验组(326-CYCHA-AGPase-bt2 和 326-CYNEE-GPN1);(1). 明视场;(2). 叶绿体自发荧光;(3). 有明显黄色荧光蛋白的激发荧光;(4). (2)和(3)的叠加;(5). (1)和(3)的叠加。Bar=20 μm

Fig. 3 Detection of the mesophyll cells in tobacco by fluorescence confocal microscopy

A. Positive control (326-CYCHA-CDKD and 326-CYNEE-CYCH); (1). Light field;(2). Chloroplast auto-fluorescence(CAF); (3). Yellow Fluorescent Protein(YFP) fluorescence excitation;(4). (2)and(3)merge field;(5). (1)and(3)merge field; B. Negative control (326-CYCHA and 326-CYNEE);(1). Light field;(2). CAF;(3). No fluorescence excitation; (4). (2) and (3)merge field;(5). (1) and (3)merge field;C. Experiment groups (326-CYCHA-AGPase-bt2 and 326-CYNEE-GPN1);(1). Light field;(2). CAF;(3). Apparent YFP fluorescence excitation; (4). (2)and(3)merge field;(5). (1)and(3)merge field. Bar=20 μm

本试验成功构建了荧光表达载体,并通过激光共聚焦显微镜观察到 326-CYCHA-AGPase-bt2 和 326-CYNEE-GPN1 的共转染组和阳性对照组均有明显的黄色荧光信号,而阴性对照组没有黄色荧光信号,表明 AGPase-bt2 和 GPN1 蛋白在植物体内存在相互作用,且黄色荧光信号与叶绿体自发的红色荧光信号位置重合,推测发生互作的亚细胞可能位于叶绿体内。AGPase-bt2 和 GPN1 蛋白互作的亚细胞定位有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] 张智猛,戴良香,胡昌浩,等. 玉米灌浆期水分差异供应对籽粒淀粉积累及其酶活性的影响 [J]. 植物生态学报,2005,29(4): 636-643.
Zhang Z M,Dai L X,Hu C H,et al. Effects of different water treatments on starch accumulation and related enzyme activity

in grain of maize during grain-filling period [J]. Acta Phytoecologica Sinica,2005,29(4):636-643. (in Chinese)
[2] 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 Physiology,2008,146(4):1892-1908.
[3] 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 Physiology,2009,149(3):1541-1559.
[4] Fernie A R,Willmitzer L,Trethewey R N. Sucrose to starch; A transition in molecular plant physiology [J]. Trends Plant Sci,2002,7(1):35-41.
[5] Nelson O,Pan D. Starch synthesis in maize endosperms [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,1995,46:475-496.
[6] Harn C,Knight M,Ramakrishnan A,et al. Isolation and char-

- acterization of the zSSIa and zSSIb starch synthase cDNA clones from maize endosperm [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 37(4): 639-649.
- [7] Brian J K, Hans V W, Jacky L S, et al. The extent to which ATP demand controls the glycolytic flux depends strongly on the organism and conditions for growth [J]. *Molecular Biology Reports*, 2002, 29(1/2): 41-45.
- [8] Kossmann J, Abel W, Wringer F. Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a starch synthase from potato that is predominantly expressed in leaf tissue [J]. *Planta*, 1999, 208: 503-511.
- [9] Jörg S, John B O, Yair S-H. A flux model of glycolysis and the oxidative pentosephosphate pathway in developing *Brassica napus* embryos [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(32): 29442-29453.
- [10] Kirby N S, Katherine G, Ganesh K A, et al. The 14-3-3 isoforms chi and epsilon differentially bind client proteins from developing *Arabidopsis* seed [J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(9): 4076-4087.
- [11] 李庆章, 吴永尧. 生物化学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 144-152.
- Li Q Z, Wu Y Y. Biological chemistry [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2004: 144-152. (in Chinese)
- [12] Kleczkowski L A, Volland P, Luthi P, et al. Insensitivity of barley endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase to 3-phosphoglycerate and orthophosphate regulation [J]. *Plant Physiology*, 1993, 101(1): 179-186.
- [13] 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.
- [14] Birgit H, Ulrich K. Use of bimolecular fluorescence complementation to demonstrate transcription factor interaction in nuclei of living cells from the filamentous fungus *Acremonium chrysogenum* [J]. *Current Genetics*, 2005(2): 132-138.
- [15] Walter M, Chaban C, Schu K, et al. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation [J]. *The Plant Journal*, 2004, 40(3): 428-438.
- [16] 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 PDK1 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. Interactions between SSI and PDK1 of maize using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay [J]. *Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed*, 2013, 41(7): 49-53, 59. (in Chinese)
- [17] Akie S, Ryoko O, Katerina B, et al. Diverse phosphoregulatory mechanisms controlling cyclin-dependent kinase-activating kinases in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Journal*, 2006, 47(5): 701-710.
- [18] 周 琴, 姜 东, 戴廷波, 等. 不同基因型小麦籽粒蛋白质和淀粉积累与碳氮转运的关系 [J]. *南京农业大学学报*, 2002, 25(3): 1-4.
- Zhou Q, Jiang D, Dai T B, et al. Grain protein and starch accumulation and its relationship to remobilization of carbon and nitrogen in different wheat genotypes [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2002, 25(3): 1-4. (in Chinese)
- [19] Shannon J C, Pien F M, Cao H P, et al. Brittle-1, an adenylate translocator, facilitates transfer of extra plastidial synthesized adp-glucose into amyloplasts of maize endosperms [J]. *Plant Physiology*, 1998, 117(4): 1235-1252.
- [20] Causse M, Rocher J P, Henry A M, et al. Genetic dissection of the relationship between carbon metabolism and early growth in maize, with emphasis on key-enzyme loci [J]. *Molecular Breeding*, 1995, 1(3): 259-272.
- [21] Boruc J, Van den Daele H, Hollunder J, et al. Functional modules in the core cell cycle binary protein-protein interaction network [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(4): 1264-1280.
- [22] Nikolaos G, Hannah L C. Isolation of a heat-stable maize endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase variant [J]. *Plant Science*, 2008, 175(3): 247-254.
- [23] Zhong H, Simons J W. Direct comparison of GAPDH, β -Actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, 259(2): 523-526.