

醮核荔枝胚胎发育相关蛋白质的分离及初步鉴定

李 蕾^{1,2}, 彭存智², 李明芳², 王向社², 郑学勤^{2*}

(1. 海南师范大学生物系, 海口 571158; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口 571101)

摘要:通过二维聚丙烯酰胺凝胶电泳以及计算机辅助的图像分析技术, 对荔枝开花后 40 d 的正常与败育胚蛋白质图谱进行初步分析。结果表明, 100 个蛋白质点在表达丰度上有明显差异; 选择仅在正常发育胚胎胶上表达的蛋白点 15 个和仅在败育胚胎胶上表达的蛋白点 50 个, 进行基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MASS)分析, 鉴定出 9 个与胚发育相关的蛋白, 这些蛋白可能参与了胚发育的调节和控制。

关键词: 荔枝; 胚发育; 蛋白质图谱; 质谱

中图分类号: Q946.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2008)06-0537-08

Isolation and Identification of Proteins Related with Embryo Development in Seedless Litchi

LI Lei^{1,2}, PENG Cun-zhi², LI Ming-fang², WANG Xiang-she², ZHENG Xue-qing^{2*}

(1. Department of Biology, Hainan Normal University, Haikou 571158, China; 2. Institute of Tropical Biotechnology and Bioscience, Chinese Academy of Tropical Agriculture Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: The global protein patterns in normal and aborted embryo of litchi at 40 days after flowering (DAA) were compared by using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) and computer image analysis. The results showed that the quantities of 100 protein spots in normal embryo were significantly different from aborted embryo. There were 15 and 50 spots appeared on the gel of normal embryo and aborted embryo, respectively. Then they were selected for MALDI-TOF-MASS analysis. Nine proteins related with embryo development were identified, which might involve in regulating and controlling the embryo abortion.

Key words: Litchi; Embryo development; Proteomics mapping; MALDI-TOF-MASS

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 为无患子科 (Sapindaceae) 荔枝属植物, 是我国特有的一种经济果树。醮核荔枝是我国热带生物资源中的一种特有果树, 它果实大, 果色鲜艳, 品质上乘, 在国内外市场极具竞争力, 但果实的醮核率不稳定, 严重影响了其商业价值。有关荔枝胚胎败育机制的研究虽然已有报道^[1-8], 但尚不够深入。

前文^[9]通过二维聚丙烯酰胺凝胶电泳(2-DE)以及计算机辅助的图像分析技术, 已对荔枝开花后 20 d 的正常与败育胚蛋白质图谱进行了初步分析。结果表明, 部分蛋白质在两种胚上的表达丰度不同; 发生了蛋白质缺失、增加以及位置改变等变化。

这些差异蛋白可能参与了胚发育的调节和控制。

本文采用 2-DE 技术对花后 40 d 正常发育胚胎和败育胚胎的蛋白质组图谱进行比较, 并采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术 (MALDI-TOF-MASS) 对部分蛋白进行分析鉴定, 为荔枝胚胎败育机制研究提供有价值的信息。

1 材料和方法

1.1 材料

醮核荔枝“陆侨” (*Litchi chinensis* ‘Luqiao’) 取自海南陆侨醮核荔枝基地, 选取 4~5 a 生正常挂果果树, 于盛花期选择开花量较大、花穗健壮的单株

收稿日期: 2007-12-29 接受日期: 2008-04-21

基金项目: 863 计划项目(2004AA001380); 海南省自然科学基金项目(80419); 海南省教育厅高校科学研究项目(HJKJ200740); 海南师范大学植物学重点扶持学科项目资助

* 通讯作者 Corresponding author

挂牌,记录雌花开放期。于花后 40 d 取幼果,冰上剥离正常发育及败育胚,于 -20°C 低温保存备用。

1.2 蛋白质提取及测定

提取液按张以顺等^[10]方法配制,分别称取 0.5 g 正常发育及败育胚,液氮下充分研磨,加入 3~4 倍体积的提取液及 10% (材料鲜重)的 PVP40,常温下再充分研磨,12 000 \times g, 4°C 下离心 15 min,取上清液。残渣用 3~4 倍体积的提取液重提一次(不加 PVP40),合并上清液,用 10 倍体积无水乙醇, -20°C 下沉淀 3~4 h,12 000 \times g, 4°C 下离心 15 min,沉淀用适量提取缓冲液溶解或直接置于 -20°C 冰箱备用。

在提取的蛋白质中加入 100 μl 裂解液(裂解液配制:尿素 7 mol/L, 硫脲 2 mol/L, 3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙铵]-丙磺酸(CHAPS) 4%, 二硫苏糖醇(DTT) 60 mmol/L, 两性电解质 2%), 4°C 下溶解过夜,12 000 \times g, 4°C 离心 15 min,以除去样品中不溶物或杂质部分。取上清液依 Bradford^[11]方法测定其蛋白质含量。

1.3 2-DE

IEF 使用 ImmobilineTM pH3-10 线性 IPG 预制凝胶条(购自 Amersham Pharmacia Biotech Inc.),在 IPGphor 电泳仪(Amersham Pharmacia Biotech Inc.)上完成。样品蛋白含量为每胶条 400 μg ,水化为 30 V, 12 h; 以 100 V, 1 h; 500 V, 1 h; 1 000 V, 0.5 h; 8 000 V, 7.5 h 电泳至 60 000 V h 时结束。

平衡 配制平衡液(50 mmol/L Tris, 尿素 6 mol/L, 30% 甘油, 2% SDS, 痕量溴酚蓝) 40 ml, 临用前加入 DTT,使其终浓度为 1%,将等电聚焦后的 IPG 胶条放入,于摇床上振荡 15 min。再将 IPG 胶条放入临用前加进 2.5% 碘乙酰胺的平衡液中,于摇床上振荡 15 min。

SDS-PAGE 在 Multiphor II 电泳仪上进行,配制 200 mm \times 200 mm \times 1 mm, 12.5% 均匀胶。将平衡后的 IPG 胶条移至凝胶的上方,用 0.5% 的琼脂糖封闭。电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸-SDS,在 14~15 $^{\circ}\text{C}$ 时,以每一胶条 15 mA 恒流电泳,直至溴酚蓝前沿抵玻璃板下缘为止。

1.4 染色

电泳后凝胶用考马斯亮兰染色,将电泳结束后取出的 SDS-PAGE 凝胶浸没在染色缓冲液(0.05%

考马斯亮蓝 R-250, 50% 甲醇, 10% 冰乙酸)中,于室温在脱色摇床上震荡染色 2~3 h。回收染色缓冲液,用 ddH₂O 略微冲洗,马上加入适量的脱色缓冲液(30% 乙醇, 10% 冰乙酸),于室温在脱色摇床上震荡脱色直至背景清晰。期间更换脱色缓冲液 2~3 次。

1.5 图象分析

使用 Labscan 控制 ImageScanner 扫描图像,图象扫描仪经强度校正(intensity calibration)后,透射扫描 2-DE 凝胶(光学分辨率 300 dpi, 象素深度 8 bits),所得图谱借助图象分析软件 ImageMaster 2D Elite 进行详细分析、比较蛋白质斑点差异。图象分析软件自动将不同图谱中的相同蛋白质点匹配,不能匹配的蛋白质斑点视为差异点。蛋白质分子的等电点和分子质量根据 IPG 胶条 pH 标示范围和低分子质量蛋白标准测算;蛋白质的相对含量以其占总蛋白质的百分数表示。

1.6 蛋白质消化与鉴定

蛋白质消化 将蛋白质点由胶上切下,水洗 3 次,每次 15 min,用 0.2 ml 50% ACN (acetonitrile, 乙腈), 25 mmol/L NH₄HCO₃ 脱色,每次 15 min,直至蓝色消失。再加入 50 μl 100% ACN 至胶呈白色块状。 -20°C 保存。

蛋白质的基质辅助激光解吸附电离飞行时间质谱分析(MALDI-TOP-MASS) 晾干的胶块(-20°C 保存)中加入 7 μl 胰酶液, 4°C 下吸涨 30~45 min, 吸掉多余的胰酶液,补入 4 μl 25 mmol/L NH₄HCO₃。37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 8 h 以上或过夜。 4°C 保存。

取样品 1 μl 与 0.6 μl 饱和基质液混合,点样于不锈钢点样板上,待样品结晶后在美国应用生物系统公司 Voyager-DETM STR-MALDI-TOF 生物质谱工作站进行分析。

质谱数据的数据库搜索 获得的混合物肽片段数据通过 <http://www.matrixscience.com> 搜索,搜索参数如下:物种为其它植物,输入参考等电点和肽片段质量(由图象分析得到),等电点误差为 ± 1 , 蛋白质质量误差为 $\pm 20\%$, 使用单一同位素质量,最大允许的肽质量误差为 $\pm 0.001\%$, 肽片段以正离子形式存在,半胱氨酸为脲基半胱氨酸,使用胰蛋白酶酶解。最少匹配肽片段为 4, 甲硫氨酸以氧化态存在。

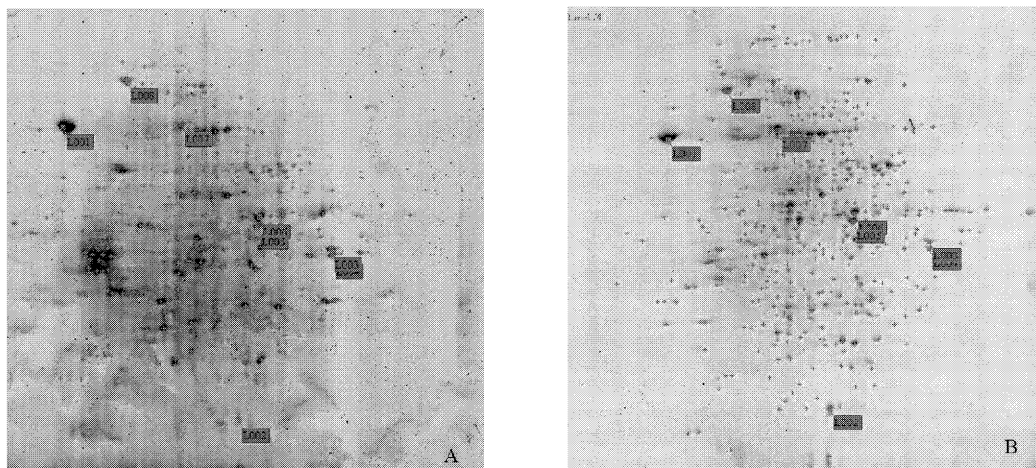


图1 花后40 d 胚蛋白质组图谱匹配与非匹配蛋白点

Fig 1 Matched protein spots and non-matched protein spots in embryos of 40 DAA Litchi

A. 正常胚 Normal embryo; B. 败育胚 Aborted embryo; 绿色和红色点分别为匹配和非匹配的蛋白质点
Green and red spots are represent matched protein spots and non-matched protein spots, respectively.

2 结果和分析

2.1 2-DE 图谱特征分析

荔枝花后40 d 正常发育胚胎与败育胚胎双向电泳各重复3次,重复性较好。其2-DE图谱见图1。根据Carsetin坐标系统,从左到右等电点增加,从下往上分子量增加。从图1可见,花后40 d 蛋白质斑点相对集中于中部偏左(pI 5~7),表示中性、偏酸性蛋白较多,碱性蛋白偏少。蛋白质分子主要集中于25~90 kD之间。采用图像分析软件ImageMaster 2D Platinum分析表明,花后40 d 正常胚胎蛋白质斑点数为388,败育胚胎蛋白质斑点数为482。以L001、L002、L003、L004、L005、L006、L007、L008八个蛋白点作为地界标,对两块胶进行蛋白质匹配,图中绿色标记点为匹配上的蛋白质点,红色标记点为非匹配蛋白质。结果表明,有160个蛋白质为共同蛋白,其余为差异蛋白。

统计分析表明,160个共同蛋白质中的60个蛋白点相对光密度(%OD)值在两块胶中差异较小,相关系数为0.912(图2),分别有54个(图3A)和46个(图3B)蛋白点在败育胚胎图谱中含量减少和增加。在图3的两柱状图中,垂直线对应于蛋白点值,中间水平线代表了选定的集中趋势,上下水平线条描绘出用[中心值±离差]定义的范围边界。表明胚胎发育过程中,败育引起较大的蛋白质表达差异。

2.2 MALDI-TOF-MASS 鉴定

在正常发育胚胎胶上,选择在败育胚胎胶上消失的蛋白点15个(图4a)(有关差异表达蛋白确定见前文^[9]),在败育胚胎胶上,选择在正常发育胚胎胶上没有出现的差异蛋白点50个(图4b),进行MALDI-TOF-MASS分析,获得的混合物肽片段数据,部分肽质量指纹图谱见图5。

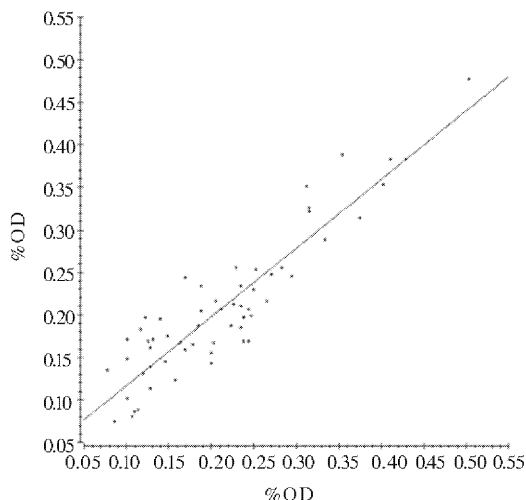


图2 两块胶中相对光密度(%OD)变化较小的蛋白质相关图

Fig 2 Correlation of proteins with low change between normal and aborted embryo

X: 败育胚凝胶的蛋白质点 Protein spots from the gel of aborted embryo;
Y: 正常胚凝胶的蛋白质点 Protein spots from the gel of normal embryo

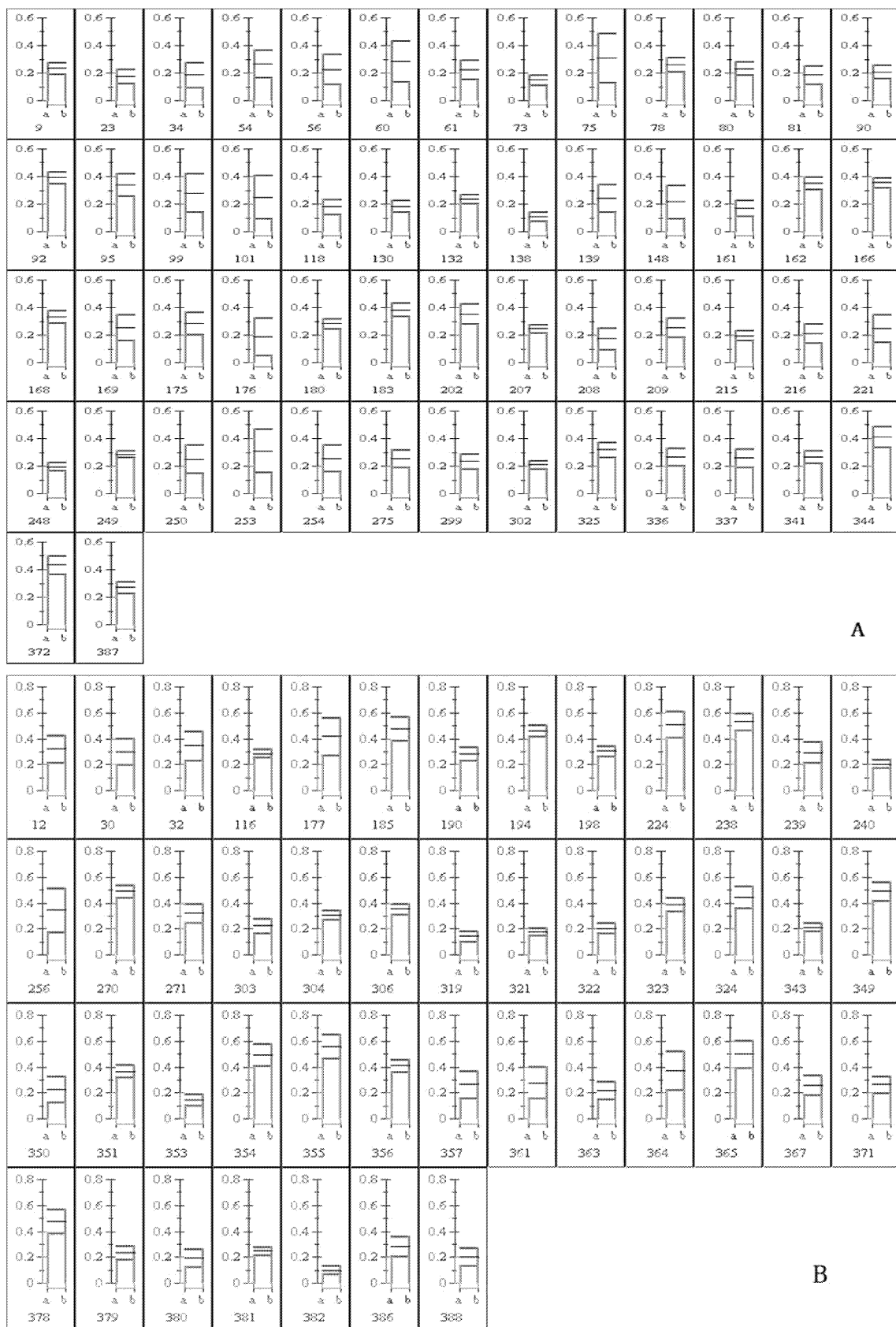


图 3 败育胚胎中表达量变化的蛋白质点

Fig 3 Protein spots with change in expression quantity in aborted embryo

A. 减弱 Decrease; B. 增加 Increase

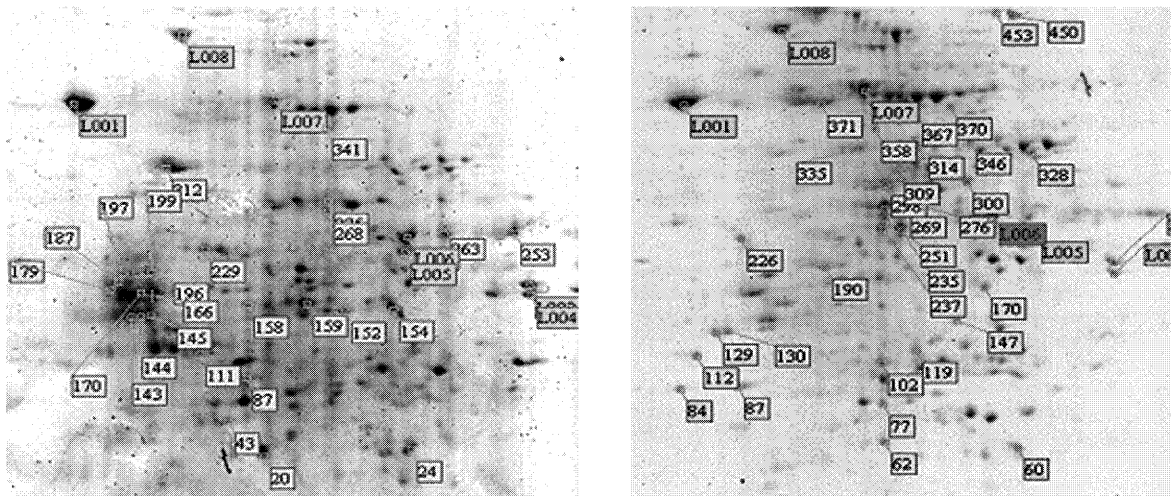


图 4 差异蛋白点的 MALDI-TOF-MASS 分析

Fig. 4 MALDI-TOF-MASS analysis of protein spots

左(Left): 正常胚 Normal embryo; 右(Right): 败育胚 Aborted embryo; L001 ~ L008: 地界标 Landmark

表 1 鉴定出的蛋白质

Table 1 Identified proteins

蛋白点 Protein spot	总肽段数 Number of total peptide	匹配的肽段数 Number of matched peptide	覆盖率 Coverage	匹配概率 Score	登录号 Accession	蛋白质 Protein	分子量 Mr (kDa)	等电点 pI
1-154	13	4	17	66	Q9NSG0-06-00-00	Rho-GTPase-activating protein 8 (PP610)	34454	9.33
1-170	14	6	12	86	EFG_BACSU	Elongation factor G (EF-G) (Vegetative protein 19)	76365	4.82
2-102	10	4	21	69	Q8YDA5	Acetylglutamate kinase N-acetyl-L-glutamate 5-phosphotransferase	31592	5.43
2-235	11	5	21	68	O22263	Probable protein disulfide-isomerase A6 precursor	39472	5.80
2-245	13	6	21	75	P07273	Transcription elongation factor S-II(DNA strand transfer protein alpha)	34822	9.01
2-276	12	4	9 19	70	P23321	Oxygen-evolving enhancer protein 1-1, chloroplast precursor 33 kDa subunit of oxygen evolving system of photosystem II	35121	5.55
2-335	18	7	27	103	P53492	Actin 7 (Actin 2)	41937	5.31
2-385	23	7	19	98	P29685	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	60335	5.95
2-450	14	5	13	69	Q05526	Pectate disaccharide-lyase	64261	6.26

通过在 <http://www.matrixscience.com> 上搜索,在正常发育胚胎和败育胚胎中分别鉴定出 2 个和 7

个蛋白质(表 1)。

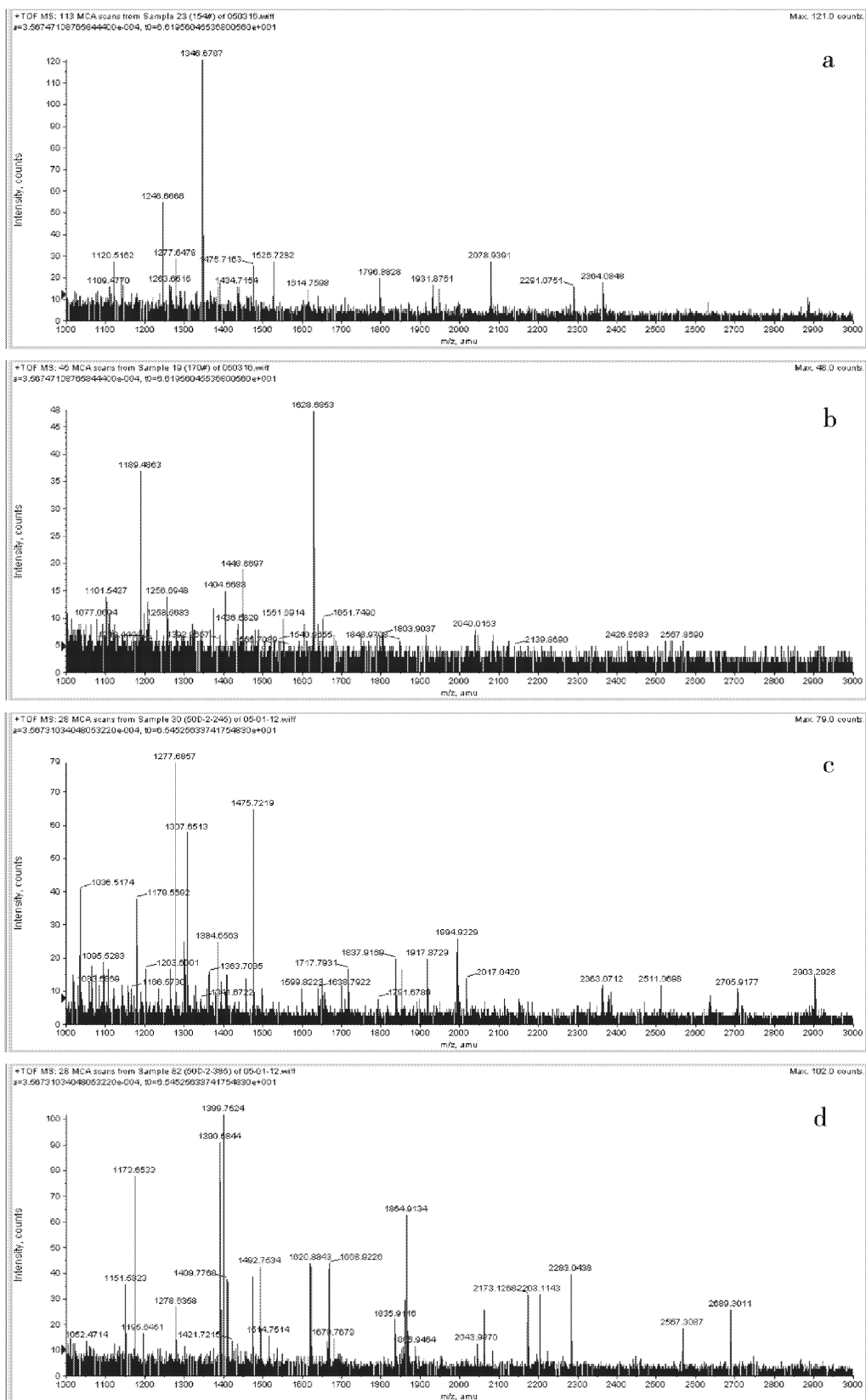


图 5 蛋白点肽质量指纹图谱

Fig 5 MASS spectrum of protein spots

a. 正常胚胶中 154#蛋白点 No. 154 protein spot on the normal embryo; b. 正常胚胶中 170#蛋白点 No. 170 protein spot on the normal embryo; c. 败育胚胶中 245#蛋白点 No. 245 protein spot on the aborted embryo; d. 败育胚胶中 385#蛋白点 No. 385 protein spot on the aborted embryo.

3 讨论

3.1 影响鉴定结果的关键因素

在选择70余个蛋白质中,得到了大部分蛋白质的肽质量指纹图,有些蛋白质点没有获得其肽质量指纹图,可能是由于部分肽质量指纹图的肽片段峰信号不强、或是由于蛋白质含量太少、在实验操作过程中角蛋白污染及丢失等原因造成。还有一些虽得到较好的肽质量指纹图,但搜索数据库时没有得到匹配的结果,可能是数据库不全,所研究的蛋白质在数据库中不存在,即可能是未知蛋白质。

质谱法测定肽序列,最擅长的是确证已知序列和分析已知序列中的翻译后修饰。对基因组信息不完整物种的分析尚有一定难度,这也是造成蛋白鉴定成功率低的原因,可用TOF/TOF串联质谱进行进一步的分析与鉴定。

3.2 所鉴定蛋白在胚发育过程中的功能研究及推测

Rho-GTPases是G蛋白的下游蛋白,转变胞外配基刺激成胞内信号,调节不同的细胞进程和细胞行为。已有研究报道,Rho蛋白是植物小GTP结合蛋白中唯一的信号分子,能调控肌动蛋白的重组和动态变化,从而控制极性生长^[12-16]。迄今已从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)及烟草(*Nicotiana tabacum*)等植物中克隆了Rho蛋白的编码基因。梁卫红^[17]等以Rho家族成员OsRacD为诱饵,采用酵母双杂体系,分离到两种与OsRacD互作的水稻RhoGDP解离抑制蛋白的基因OsRhoGDI1和OsRhoGDI2。它们在水稻根、地上部分和幼穗等组织中都有表达,但表达特征有所不同。OsRhoGDI2在不同组织的不同发育时期表达有明显的变化,在成体根和幼嫩的叶中几乎检测不到OsRhoGDI2的表达,但在OsRacD特异表达的幼穗中,OsRhoGDI2表达水平较高。推测在幼穗组织中,OsRhoGDI2是OsRacD主要的调控蛋白。

近年来,从高等植物中相继分离出一系列调控干旱、高盐、低温、激素、病原反应及发育等相关基因表达的转录因子。龙华^[18]关于延伸因子1 α -A在*Oryzias latipes*转基因胚胎中的表达研究表明,随着胚胎的发育,EF-1 α -A启动子活性逐渐减弱。

果胶裂解酶(Pectate disaccharide-lyase, PL)通过 β -消除的方式,即通过对 β -碳原子上的基因进行去除或转移,以形成双键的反应来催化聚半乳糖醛酸

$\alpha(1-4)$ 键的断裂。Dominguez-Puigjaner等^[19]通过差异筛选(differential screening)从香蕉(*Musa spp.*)果实cDNA文库中克隆出一种编码与果胶裂解酶同源的cDNA-Ban17。Northern分析表明,该克隆的mRNA最初是在跃变早期的果实中被发现,然后在跃变峰处达到最大值,接着在过熟时含量下降。首次报告了PL转录与果实成熟有关。张德有等^[20]用RT-PCR方法对香蕉不同组织和不同成熟度果实的果胶裂解酶基因的表达进行了研究,结果表明,该基因只在果实中表达,具有组织特异性,而且只在果实的特定发育阶段表达。

高等植物肌动蛋白(actin)在进化过程中保持高度的保守性和同源性,且具有组织和器官特异性。现已克隆出在花粉发育后期表达的基因并在转基因植物中得到表达。Mascarenhas^[21]用Northern杂交技术报道了玉米(*Zea mays*)和紫鸭跖草(*Tradescantia virginiana*)花粉肌动蛋白基因的表达受发育的控制。

姜沂春等^[22]利用差异显示技术报道已知的水稻ATP合成酶基因在水稻中的表达丰度受GA₃诱导,且在水稻整个生理效应反应的前期阶段,即植物对激素整体反应的准备阶段。可以推测ATP合成酶转录水平的提高对细胞内一系列基因表达及细胞生理反应起着重要的作用。GA₃通过诱导调节ATP合成酶mRNA丰度的生理学机制则有待于进一步研究。杨立新^[23]在2-细胞胚胎阶段特异性表达基因的研究中,分离到ATP合成酶亚单位6基因,该基因由线粒体DNA编码,与细胞内ATP的合成相关,说明小鼠(*Musculus*)2-细胞胚胎特异表达的ATP合成酶亚单位6基因可能与胚胎发育相关。

N-乙酰谷氨酸激酶(N-Acetylglutamate kinase, NAGK),是精氨酸合成途径的第二个酶,受到精氨酸的反馈抑制和反馈阻遏。精氨酸是腐胺、鲱精氨、精氨等多胺的合成前体,陈伟等^[7]曾报道了多胺种类及含量变化与荔枝胚胎胎育密切相关。

蛋白二硫键异构酶(protein disulfide-isomerase, PDI)也是鉴定出的蛋白质之一,它是一种折叠酶,主要存在于内质网管腔中,具有显著的非特异性多肽结合能力。它主要是催化蛋白质分子中硫基与二硫键的交换反应,并被普遍认为是催化细胞内蛋白质生物合成过程中天然二硫键形成的酶。

上述结果表明,鉴定所得的蛋白质多与果实或发育相关,它们在荔枝胚发育过程中的作用仍需进一步探讨。

参考文献

- [1] Lü L X(吕柳新), Chen R M(陈荣木), Chen J L(陈景录), et al. Observation of the embryo development stages of litchi [J]. Subtrop Plant Sci(亚热带植物科学), 1985(1): 1-5.(in Chinese)
- [2] Ye X L(叶秀遵), Wang F X(王伏雄), Qian N F(钱南芬). Embryological studies of *Litchi chinensis* [J]. Acta Bot Yunnan(云南植物学研究), 1992, 14(1): 59-65.(in Chinese)
- [3] Qiu Y P(邱燕平), Zhang Z W(张展薇), Qiu R X(丘荣熙). Study on embryo and endosperm development of *Litchi chinensis* Sonn. [J]. Chin Bull Bot(植物学通报), 1994, 11(3): 45-47.(in Chinese)
- [4] Chen W(陈伟), Lü L X(吕柳新). Changes in polyamine content in relation to embryo development in litchi ovules [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2000, 8(3): 229-234.(in Chinese)
- [5] Chen W(陈伟), Lü L X(吕柳新), Ye C L(叶陈亮). Relationship between embryo abortion and endogenous hormones in litchi ovules [J]. J Trop Crop(热带作物), 2000, 21(3): 34-38.(in Chinese)
- [6] Chen W(陈伟), Lü L X(吕柳新). Relationship between embryonic development and changes of endogenous hormones in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) ovules [J]. J Appl Environ Biol(应用与环境生物学报), 2000, 6(5): 419-422.(in Chinese)
- [7] Chen W, Lü L X. Relationship between litchi embryo abortion and phenolic inhibitors [J]. Acta Bot Sin, 2002, 44(2): 168-172.
- [8] Chen W(陈伟), Lü L X(吕柳新), Huang C M(黄春梅). Studies on 'Wuye' litchi specific proteins in the embryo development stages [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2001, 28(6): 504-508.(in Chinese)
- [9] Li L(李蕾), Peng C Z(彭存智), Li M F(李明芳), et al. Analysis on the proteomics mapping of seedless litchi in the embryo development stages [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2006, 14(4): 312-317.(in Chinese)
- [10] Zhang Y S(张以顺), Xiang X(向旭), Huang S Z(黄上志), et al. A method for extracting embryo proteins in *Litchi chinensis* Sonn. [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2003, 11(2): 174-176.(in Chinese)
- [11] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principles of protein dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [12] Lin Y, Yang Z. Inhibition of pollen tube elongation by microinjected anti-Rop1Ps antibodies suggests a crucial role for Rhotype GTPases in the control of tip growth [J]. Plant Cell, 1997, 9: 1647-1659.
- [13] Li H, Lin Y, Heath R M, et al. Control of pollen tube tip growth by a Rop GTPase-dependent pathway that leads to tip-localized calcium influx [J]. Plant Cell, 1999, 11: 1731-1742.
- [14] Kawasaki T, Henmi K, Ono E, et al. The small GTP-binding protein rac is a regulator of cell death in plants [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 10922-10926.
- [15] Delmer D P, Pear J R, Andrawis A, et al. Genes encoding small GTP-binding proteins analogous to mammalian rac are preferentially expressed in developing cotton fibers [J]. Mol Gen Genet, 1995, 248: 43-51.
- [16] Potikha T S, Collins C C, Johnson D I, et al. The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers [J]. Plant Physiol, 1999, 119: 849-858.
- [17] Liang W H(梁卫红), Tang Z R(唐朝荣), Wu N H(吴乃虎). Isolation and characterization of two GDP dissociation inhibitor genes from *Oryza sativa* L. [J]. Chin J Biochem Mol Biol(中国生物化学与分子生物学报), 2004, 20(6): 785-791.(in Chinese)
- [18] Long H(龙华). Expression of elongation factor-1 α -a and β -actin promoters in embryos of transgenic medaka (*Oryzias latipes*) [J]. J Mol Cell Biol(实验生物), 2003, 36(3): 238-242.(in Chinese).
- [19] Dominguez-Puigianer E, Immaculada L, Vendrell M, et al. A cDNA clone highly expressed in ripe banana fruit shows homology to pectate lyases [J]. Plant Physiol, 1997, 114: 1071-1076.
- [20] Zhang D Y(张德有), Xu B Y(徐碧玉), Jing Z Q(金志强). Cloning of pectate lyase gene of banana [J]. J Plant Physiol Mol Biol(植物生理与分子生物学报), 2003, 29(5): 401-404.(in Chinese)
- [21] Mascarnhas J P. Characterization of genes that are expressed in pollens [M]// Goldberg R B. The Molecular Basis of Plant Development. NewYork: Springer-Verlag, 1989: 99-105.
- [22] Lou Y C(娄沂春), Dong H T(董海涛), Li D B(李德葆). The mRNA expression level of rice chloroplast ATP synthase response to gibberellins [J]. Chin J Rice Sci(中国水稻科学), 2001, 15(1): 17-20.(in Chinese)
- [23] Yang L X(杨立新), Yu W D(郁卫东), Chen Q X(陈清轩). Analysis and identification of a stage-specific ATPase 6 gene expression in mouse 2-cell embryo [J]. Chin J Biochem Mol Biol(中国生物化学与分子生物学报), 2003, 19(2): 201-204.(in Chinese)