

绿竹*BoCOBL*基因的分子特征及其表达分析

高志民*, 陈颖, 胡陶, 赵韩生

(国际竹藤中心, 国家林业局竹藤科学与技术重点实验室, 北京 100102)

摘要: 为探讨 COBRA 相像蛋白(COBL)在竹子细胞发育过程中的作用, 采用 RT-PCR 和 RACE 技术, 从绿竹(*Bambusa oldhamii*)叶片中克隆到 1 个 *COBL* 同源基因 *BoCOBL* (GenBank 登录号: EU247930), cDNA 全长为 1743 bp。序列分析表明, *BoCOBL* 编码含 451 个氨基酸的 COBL 蛋白, 其 N 端具有 1 个明显的跨膜螺旋结构, C 端具有 1 个糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白信号序列, 属于糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白家族, 为典型的膜蛋白。通过构建 *BoCOBL::GFP* 融合表达载体, 并转化到烟草 (*Nicotiana tabacum*) 悬浮细胞中, 表达分析表明 *BoCOBL::GFP* 融合蛋白定位于细胞膜上, 而对照 GFP 的分布无特异性, 证明 *BoCOBL* 基因编码的蛋白为膜蛋白。组织特异性表达分析表明, *BoCOBL* 基因的表达模式为组成型, 在根、茎、叶片和叶鞘中均有表达, 但在茎中的表达丰度略低。这为深入研究 *BoCOBL* 基因在竹子中的功能奠定了基础。

关键词: 绿竹; COBRA 相像蛋白基因; 分子特征; 亚细胞定位; 组织特异性表达

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2013.06.010

Molecular Characteristics and Expression Analysis of *BoCOBL* Gene from Green Bamboo (*Bambusa oldhamii*)

GAO Zhi-min*, CHEN Ying, HU Tao, ZHAO Han-sheng

(International Center for Bamboo and Rattan, State Forestry Administration Key Laboratory on the Science and Technology of Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China)

Abstract: In order to understand the function of COBL similar protein in bamboo, *BoCOBL*, a *COBL* homologous gene, was cloned from *Bambusa oldhamii* by RT-PCR and RACE methods. The full-length cDNA of *BoCOBL* was 1743 bp (GenBank accession No.: EU247930). Sequence analysis showed that *BoCOBL* encoded 451 amino acids with a transmembrane helical structure at the N-terminal and a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein signal sequence at the C-terminal, which indicated that it was a membrane protein, belonging to glycosylphosphatidyl inositol-anchored protein family. The expression vector of *BoCOBL::GFP* was constructed and transformed into suspension cells of tobacco. The *BoCOBL::GFP* proteins were mainly located on the cytoplasmic membrane, while the control of GFP proteins was non-specific in the transformed cells. So, it was confirmed that the protein encoded by *BoCOBL* was a membrane protein. The analysis of tissue specific expression indicated that the expression of *BoCOBL* was constitutive, with similar level in root, leaf and sheath, while slightly low in stem. These results would be helpful for further study on the function of *BoCOBL* in bamboo.

Key words: *Bambusa oldhamii*; COBRA like protein (COBL) gene; Molecular characteristics; Subcellular localization; Tissue specific expression

收稿日期: 2013-04-01

接受日期: 2013-05-16

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD23B05)资助

作者简介: 高志民, 男, 博士, 研究员, 主要从事生物技术与功能基因组学研究。

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: gaozhimin@icbr.ac.cn

植物通过细胞定向分化与伸展,最后形成由细胞壁所包被的完美形态,这对细胞功能是至关重要的,其形态的变化对于生物与非生物信号的应答也起着重要作用^[1]。因此,研究细胞壁的生物合成及细胞伸展对揭示植物的生长发育规律具有重要价值。长期以来,竹类植物速生的特性一直受到研究者的关注。研究表明竹子速生过程中形态的变化与细胞的分裂、伸展密切相关^[2],同时与内源激素的平衡调节^[3]、功能蛋白的表达量有关^[4]。另外,从分子水平也有一些探讨性的研究报道,涉及了木质素生物合成^[5]、细胞色素 P450^[6]以及蔗糖的代谢^[7]与运输^[8]等,证明基因表达对竹子细胞壁的生物合作具有一定的调控作用,对解释竹子的快速发育机制起到了一定的支持作用。

研究表明,植物通过细胞壁-质膜-细胞骨架的连续体参与细胞发育的调节,其中由 *COBL* 基因编码的糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白(GPIAP)作为质膜上的一种膜蛋白,通过糖基磷脂酰肌醇插入于内质网膜和质膜对细胞壁的生物合成及其对各种环境刺激的反应发挥着重要的调控作用^[9]。对 *COBL* 基因家族成员的研究已有较多报道,包含了其表达模式、对细胞伸展及细胞壁的发育调控等,如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 *COBRA* 通过参与纤维素微纤丝的方向来控制细胞的发育方向^[10];水稻(*Oryza sativa*)的 *SEMI-ROLLED LEAF1* 基因通过调节泡状细胞的形成来控制叶片卷曲^[11];玉米(*Zea mays*)的 *BK2* 基因在发育初期(5 叶期之前)呈高表达,成熟期降低,植株表现为脆性,易折断^[12]。然而,关于竹类植物 *COBL* 基因的相关研究尚未见报道。本研究以绿竹(*Bambusa oldhamii*)为材料,分离 *COBL* 基因家族的同源基因,在对其编码蛋白结构分析的基础上,进行了基因的亚细胞定位研究和组织特异性表达分析,为从分子生物学角度来揭示竹子速生机制提供科学参考。

1 材料和方法

1.1 材料

绿竹(*Bambusa oldhamii*)扦插苗取自浙江温州,在本研究组的培养室进行培养,培养温度为 25℃,光/暗交替培养时间为 16 h/8 h,光照强度为 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。

1.2 基因克隆

采用 Trizol 法^[13](Invitrogen 公司生产)提取绿竹顶端第 3 片叶的叶片、叶鞘以及其包裹的幼茎、须根的 RNA,按照反转录试剂盒(Promega 公司生产)的说明书合成 cDNA。根据 SMARTTM RACE 试剂盒(Clontech 公司生产)的说明书合成 3' cDNA 和 5' cDNA。

玉米 *Bk2* 基因通过调控木质素与纤维素间的相互作用来维持器官的韧性。为研究其同源基因在竹子中的作用,根据 *Bk2* (DQ139874)的保守区序列设计引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成,正向引物 F1: 5'-GACGATGAGCAACTAC-CAGATG-3' 和反向引物 R1: 5'-GTCGTTGTAGAA-CTTGAGCCCG-3'。PCR 反应体系共 20 μL : 包含 cDNA (0.04 $\mu\text{g L}^{-1}$) 1 μL , F1 (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) 1 μL , R1 (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) 1 μL , dNTP (各 2.5 mmol L^{-1}) 3.2 μL , 2 \times Buffer 10 μL , *Taq* DNA 聚合酶 (5 U μL^{-1}) 0.2 μL , Mili-Q 水 3.6 μL 。反应条件: 94℃ 1 min, 55℃ ~ 65℃ 1 min, 72℃ 1 min 10 s, 共 35 个循环。PCR 产物经电泳分析后,用上海申能博彩生物科技有限公司的 DNA 试剂盒回收后,连接到 Promega 的 pGEM-T Easy 载体上,转化大肠杆菌(*Esherichia coli*)菌株 DH5 感受态细胞。经蓝白斑筛选,阳性克隆送北京三博远志科技有限公司进行测序。

根据获得的保守区序列,分别设计 RACE 引物。5' RACE 的引物有 5-1 (5'-ACGGTCTTGTG-GTGGTGCCAGCGAG-3')和 5-2 (5'-GAGGTAGACGGTGGAGGGGACGATGGT-3')。3' RACE 的引物有 3-1 (5'-CCGCATGAACTACACCCAGTGGACG-CTC-3')和 3-2 (5'-TACGGGCTCAAGTTCTACAA-CGACCTGC-3')。分别以 3' cDNA 和 5' cDNA 为模板,用引物 5-1 和 3-1 与 UPM 配对使用进行降落 PCR 扩增,反应的条件为: 94℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 70℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 3 min, 25 个循环。分别以降落 PCR 的产物为模板,用 5-2 和 3-2 与 NUP 配对进行巢式 PCR 扩增,反应的条件为: 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 3 min, 共 25 个循环。回收 PCR 产物,连接到 pGEM-T Easy 载体后测序。

1.3 基因序列及其编码蛋白结构域分析

利用 DNASTAR 软件对获得的序列进行初步分析、比对与拼接,并预测基本理化性质。利用 <http://>

www.ncbi.nih.gov/blast 和 http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan 在线软件对基因及其编码蛋白结构域进行分析。利用在线网址 http://www.eh.embnet.org/cgi-bin/TMPRED 和 http://genome.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0 进行跨膜序列预测和信号肽预测。

1.4 基因表达载体的构建

根据植物表达载体 pPZP 的多克隆位点和目的基因序列的酶切位点特征,设计添加酶切位点的引物,正向引物 F2: 5'-AATCTAGAATGGAGCTCCG-CCGCAACTC-3' (5'端添加 *Xba* I 酶切位点),反向引物 R2: 5'-GGATCCGGATCCCTATTCTGCTCTCCAAATATGAG-3' (5'端添加 *Bam*H I 酶切位点),采用 Pyrobest polymerase (Takara 公司生产)进行扩 PCR 扩增。扩增产物连接到 pGEM-T Easy 载体上,经测序正确后采用双酶切(*Xba* I/*Bam*H I)直接将 *BoCOBL* 的编码区(不含终止密码子)连接到 pPZP 的多克隆位点,构建包含 *BoCOBL* 基因与 *GFP* 融合的植物表达载体。

1.5 烟草悬浮细胞转化与亚细胞定位

将 *BoCOBL::GFP* 融合表达载体转入农杆菌,经菌落 PCR 鉴定正确后,选取单克隆培养,按照 Chen 等^[14]的方法转化烟草悬浮细胞 BY-2,同时以转化 pPZP 载体的烟草悬浮细胞作为对照。利用激光共聚焦扫描显微镜(德国 Leica Sp2)对转基因烟草悬浮细胞进行观察,采集图像。

1.6 基因的组织特异性表达检测

以绿竹叶片、叶鞘、幼茎和根的 cDNA 为模板,先用绿竹 *Actin* 基因作内参^[15],调整 cDNA 用量和循环数,使内标基因的表达丰度一致。再利用 RT-PCR 法确定 *BoCOBL* 基因在不同组织中的表达量。PCR 反应条件为:94 °C 5 min; 然后 94 °C 1 min, 61 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 28 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。

2 结果和分析

2.1 基因全长克隆

以绿竹叶片的 cDNA 为模板,通过梯度 PCR,筛选出引物 F1 / R1 适宜的扩增退火温度为 61.3 °C,继续扩增并将获得的片段克隆到 pGEM-T Easy 载

体上进行测序,结果表明,插入片段长度为 950 bp。进一步 Blast 分析表明,该片段为糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白(COBL)基因保守区的部分序列。应用 RACE 引物,通过 3' RACE 和 5' RACE 扩增,扩增产物经测序分别获得了 3' 端序列(582 bp)和 5' 端序列(594 bp)。将保守区序列与 RACE 产物序列进行拼接,获得了一条全长为 1743 bp 的 cDNA。序列分析表明,该序列包含 1 个完整的开放阅读框(1356 bp)、5' 非翻译区(UTR, Untranslated region)有 73 bp、3' UTR 有 290 bp 和 24 bp 的 polyA 尾。将该基因命名为 *BoCOBL*,并送 GenBank 注册,登录号为 EU247930。

2.2 *BoCOBL*理化性质与结构域预测

蛋白氨基酸序列理化性质预测结果表明,*BoCOBL* 序列编码的蛋白包含 451 个氨基酸,其分子量约为 49.3 kDa,等电点 pI 约为 8.7。利用在线软件对 *BoCOBL* 编码蛋白的结构域进行分析,结果表明 *BoCOBL* 蛋白包含 1 个典型的保守区域(47 ~ 211),编码植物络合素合酶相像蛋白;1 个 CCVS 结构域;还包含 2 个依赖于 cAMP 和 cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点(4 ~ 7, 194 ~ 197)、7 个 N-糖基化位点(32 ~ 35、157 ~ 160、165 ~ 168、229 ~ 232、321 ~ 324、336 ~ 339 和 355 ~ 358)、5 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(34 ~ 36、156 ~ 158、159 ~ 161、265 ~ 267 和 275 ~ 277)、12 个 N-肉豆蔻酰化位点(84 ~ 89、99 ~ 104、116 ~ 121、130 ~ 135、136 ~ 141、151 ~ 156、172 ~ 177、241 ~ 246、249 ~ 254、255 ~ 260、358 ~ 363 和 377 ~ 382)、1 个甘氨酸富集区(241 ~ 263)。进一步 BLASTP 分析结果表明,*BoCOBL* 属于糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白(GPI-anchored proteins, GPIAP)家族成员。

2.3 跨膜序列及信号肽预测

跨膜结构分析表明,*BoCOBL* 的 N-端具有 1 个明显的跨膜螺旋结构(7 ~ 24 氨基酸)(图 1),与预测信号肽(1 ~ 24 氨基酸)中的切割位置相符(多数位于第 23 和 24 个氨基酸之间:AVA ↓ YD)(图 2)。在 *BoCOBL* 氨基酸序列的 C-端具有 1 个 GPI-anchor 信号序列,切割位点为 C-28(图 1),C-端最后是由 16 个氨基酸组成的疏水性尾巴,即 *BoCOBL* 具有 N-和 C-双向信号序列,进一步证实 *BoCOBL* 符合 GPI 锚定蛋白的特征^[16]。因此,预测 *BoCOBL* 位于

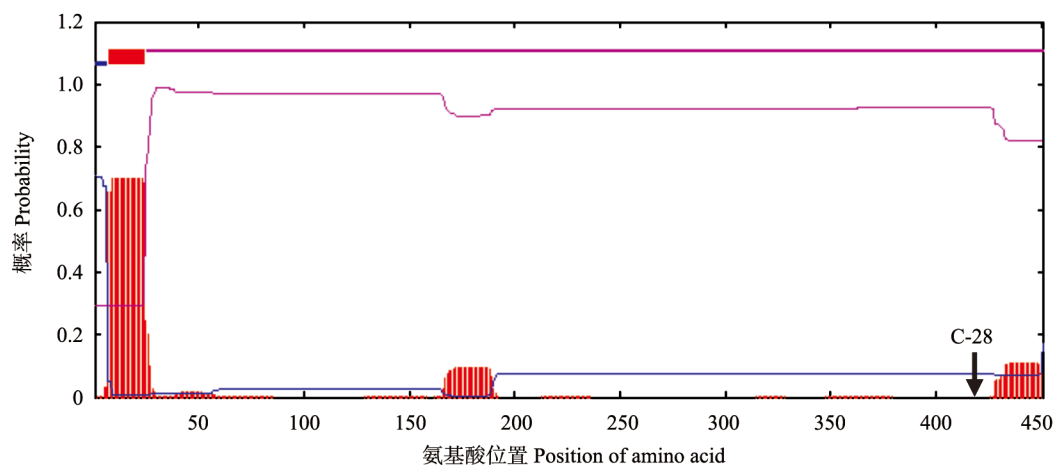


图 1 跨膜结构分析。红色:跨膜;蓝色:膜内;粉色:膜外。

Fig. 1 Analysis of transmembrane structure. Red: Transmembrane; Blue: Inside of membrane; Pink: Outside of membrane.

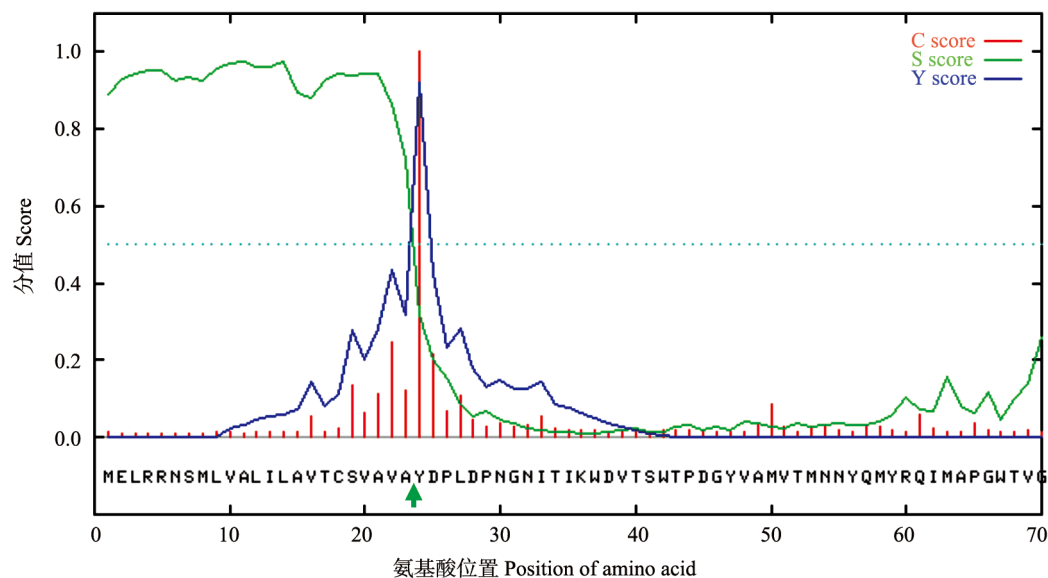


图 2 信号肽预测。绿色箭头示切割位置。

Fig. 2 Prediction of signal peptide. Green arrow show cutting position.

细胞膜上。

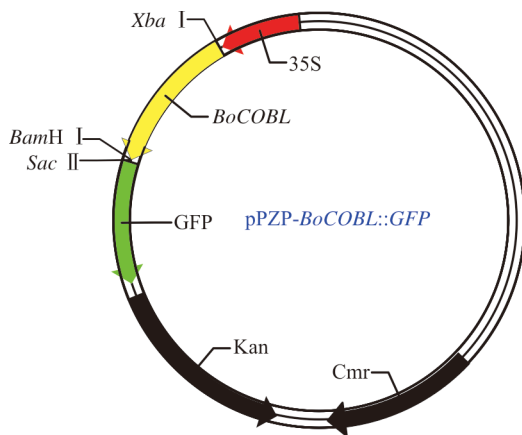
2.4 基因表达载体构建与检测

为验证 *BoCOBL* 编码蛋白的亚细胞定位,构建了 *BoCOBL::GFP* 融合表达载体。用引物 F2 和 R2 的 PCR 扩增产物测序结果表明:插入片段为 1367 bp, 包含了 *BoCOBL* 基因编码区(1353 bp)、添加的 *Xba* I 酶切位点(TCTAGA) 6 bp、*Bam*H I 酶切位点(GGATCC) 6 bp 以及保护碱基(AA) 2 bp, 与预期目的片段的完全符合。分别用 *Xba* I/*Bam*H I 双酶消化含有目的片段的 pGEM-T Easy 质粒和 pPZP 表达载体质粒,回收目的片段,应用 T₄ DNA

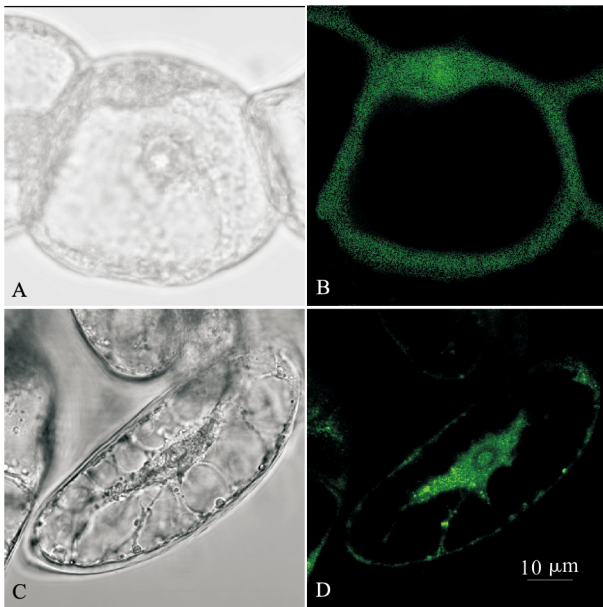
连接酶将 *BoCOBL* 基因编码区插入到 pPZP 载体的 *Xba* I 和 *Bam*H I 酶切位点之间,连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5,提取阳性克隆质粒,酶切验证与预期相符,即获得了由 35S 启动子启动,包含 *BoCOBL::GFP* 融合的植物表达载体(图 3)。

2.5 亚细胞定位观察

分别用 *BoCOBL::GFP* 融合表达载体和 pPZP 表达载体转化烟草悬浮细胞 BY-2,经培养后在显微镜下进行观察。结果表明,在 488 nm 激发光下,转化 *BoCOBL::GFP* 的烟草悬浮细胞绿色荧光信号主要是分布在细胞膜上(图 4: A, B),而只转化 pPZP

图3 *BoCOBL::GFP* 融合植物表达载体Fig. 3 Plant expression vector of *BoCOBL::GFP*

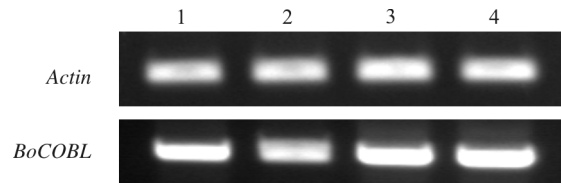
表达载体的烟草悬浮细胞绿色荧光信号分布无特异性,主要分布于细胞核和胞质溶胶中(图4: C,D)。由此证明, *BoCOBL::GFP* 融合蛋白位于烟草悬浮细胞中的细胞膜上,间接证明 *BoCOBL* 基因编码的蛋白为膜蛋白,亚细胞定位于细胞膜上。

图4 *BoCOBL::GFP* 在烟草悬浮细胞中的表达。A,B: *BoCOBL::GFP* 定位在细胞膜上; C,D: GFP 定位无特异性。Fig. 4 Expression of *BoCOBL::GFP* in tobacco cells. A,B: *BoCOBL::GFP* located on cellular membrane; C,D: GFP appeared non-specific.

2.6 基因的组织表达分析

为了解 *BoCOBL* 基因在不同组织中的表达情况,分别以绿竹根、茎、叶片和叶鞘的 cDNA 为模板,采用 RT-PCR 的方法进行半定量检测。扩增产

物的电泳结果表明, *BoCOBL* 基因在根、茎、叶片和叶鞘等 4 个组织中都有表达,证明该基因的表达模式为组成型,其中在根、叶片和叶鞘中的表达丰度相似,但在茎中的表达丰度略低(图 5)。

图5 *BoCOBL* 在不同组织中的表达。1: 根; 2: 茎; 3: 叶片; 4: 叶鞘。Fig. 5 Expression of *BoCOBL* in different tissues. 1: Root; 2: Stem; 3: Leaf; 4: Sheath.

3 讨论

糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白(GPIAP)是一大类基于细胞膜定位方式而划分的蛋白质,与多种生长及发育机制相关。植物中的锚定蛋白主要参与细胞壁合成、细胞扩张、维持细胞壁结构、细胞表面连接等生理过程^[17]。本研究从绿竹中克隆了 *BoCOBL* 基因,其编码的蛋白为一种 GPIAP, BLASTP 比对结果表明,该蛋白与其它物种的 COBRA 相像蛋白具有较高的一致性,其中与水稻的 COBRA-like protein (BC1)相似性最高,为 86.0%。对 *BC1* 基因的功能研究证实,该基因在水稻茎秆、叶片、叶鞘中起机械支撑作用,如调节厚壁细胞和维管束细胞的细胞壁厚度和纤维素、半纤维素及木质素的含量,其功能和作用机理的揭示有助于建立植物机械强度的遗传调控网络^[9]。因此, *BoCOBL* 基因对于研究竹子细胞壁发育的分子机制,探讨纤维素的沉积和木质素的调控将具有重要意义。还有一些研究表明, *COBRA* 基因家族在植物中具有多基因成员,在拟南芥中有 12 个,水稻中有 11 个,玉米中有 9 个^[1]。本研究从绿竹中克隆了其中的一个成员 *BoCOBL*,其它成员还有待于进一步克隆分析,对其家族成员进行全面的了解。

作为膜蛋白, GPIAP 起到连接质膜和细胞壁的作用, GPI 将蛋白锚定在膜上,而蛋白质上的糖基化成分能够直接与细胞壁成分相互作用,将 GPIAP 中的蛋白成分释放出来,成为细胞壁的结构成分;GPI 能够将蛋白定位在某个特殊区域内行使特定的生物学功能;另外, GPI 的锚定增加了蛋白质在细胞膜上的运动性,有助于细胞膜蛋白间的相

互作用^[18]。本研究通过构建 *BoCOBL::GFP* 融合表达载体,并在烟草悬浮细胞中表达,证明 *BoCOBL* 编码的蛋白亚细胞定位于细胞膜上。同时 RT-PCR 检测结果表明, *BoCOBL* 的表达模式为组成型表达,这与拟南芥^[10]的 *COB*、水稻^[9]的 *BCI*、玉米^[12]的 *ZmBk2* 的表达模式一致,这意味着它可能在细胞的发育过程中发挥着重要的生物学功能,对绿竹的细胞生长发育具有重要的作用。因此,研究 *BoCOBL* 基因及其家族成员在细胞生长发育过程中的作用机制,验证其功能,将有助于从分子水平来揭示竹子的速生机制。

参考文献

- [1] Brady S M, Song S, Dhugga K S, et al. Combining expression and comparative evolutionary analysis: The *COBRA* gene family [J]. *Plant Physiol*, 2007, 143(1): 172–187.
- [2] Xiong W Y, Ding Z F, Li Y F. Intercalary meristem and internodal elongation of bamboo plants [J]. *Sci Silv Sin*, 1980, 16(2): 81–89. 熊文愈, 丁祖福, 李又芬. 竹类植物的居间分生组织与节间生长: I 秆茎的居间分生组织与节间生长 [J]. *林业科学*, 1980, 16(2): 81–89.
- [3] Fang K, Yang G Y, Yang P Q, et al. Dynamic changes of endogenesis hormone in bamboo formation course (*Phyllostachys edulis*) [J]. *Acta Agri Univ Jiangxi*, 2011, 33(6): 1107–1111. 方楷, 杨光耀, 杨清培, 等. 毛竹成竹过程中内源激素动态变化 [J]. *江西农业大学学报*, 2011, 33(6): 1107–1111.
- [4] Cui K, He C, Zhang J, et al. Temporal and spatial profiling of internode elongation-associated protein expression in rapidly growing culms of bamboo [J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(4): 2492–2507.
- [5] Gao Z M, Wang X C, Peng Z H, et al. Characterization and primary functional analysis of phenylalanine ammonialyase gene from *Phyllostachys edulis* [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31(7): 1345–1356.
- [6] Yang X W, Peng Z H. Cloning and expression of a cytochrome P450 gene from moso bamboo [J]. *Acta Agri Univ Anhui*, 2010, 37(1): 116–121. 杨学文, 彭镇华. 一个毛竹细胞色素P450基因的克隆与表达研究 [J]. *安徽农业大学学报*, 2010, 37(1): 116–121.
- [7] Chiu W B, Lin C H, Chang C J, et al. Molecular characterization and expression of four cDNAs encoding sucrose synthase from green bamboo *Bambusa oldhamii* [J]. *New Phytol*, 2006, 170(1): 53–63.
- [8] Gao Z M, Yang X W, Peng Z H, et al. Molecular characterization and subcellular localization of *BoSUT2* from *Bambusa oldhamii* [J]. *Sci Silv Sin*, 2010, 46(2): 45–50. 高志民, 杨学文, 彭镇华, 等. 绿竹*BoSUT2*基因的分子特征与亚细胞定位研究 [J]. *林业科学*, 2010, 46(2): 45–50.
- [9] Li Y H, Qian Q, Zhou Y H, et al. *BRITTLE CULM1*, which encodes a COBRA-like protein, affects the mechanical properties of rice plants [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(9): 2020–2031.
- [10] Roudier F, Fernandez A G, Fujita M, et al. COBRA, an *Arabidopsis* extracellular glycosyl-phosphatidyl inositol-anchored protein, specifically controls highly anisotropic expansion through its involvement in cellulose microfibril orientation [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(6): 1749–1763.
- [11] Xiang J J, Zhang G H, Qian Q, et al. *SEMI-ROLLED LEAF1* encodes a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored protein and modulates rice leaf rolling by regulating the formation of bulliform cells [J]. *Plant Physiol*, 2012, 159(4): 1488–1500.
- [12] Sindhu A, Langewisch T, Olek A, et al. Maize *Brittle stalk₂* encodes a COBRA-like protein expressed in early organ development but required for tissue flexibility at maturity [J]. *Plant Physiol*, 2007, 145(4): 1444–1459.
- [13] Gao Z M, Li X P, Li L B, et al. An effective method for total RNA isolation from bamboo [J]. *Chin For Sci Techn*, 2006, 5(3): 52–54.
- [14] Chen Z L, Yu Y, Liu L, et al. Isolation, characterization and functional analysis of a cdc48 homologue from tobacco BY-2 cells [J]. *Prog Nat Sci*, 2007, 17(2): 156–162.
- [15] Li X P, Gao Z M, Peng Z H, et al. Cloning and characterization of *COMT* gene from *Bambusa oldhamii* [J]. *For Res*, 2007, 20(5): 722–725. 李雪平, 高志民, 彭镇华, 等. 绿竹咖啡酸-O-甲基转移酶基因 (*COMT*)的克隆及相关分析 [J]. *林业科学研究*, 2007, 20(5): 722–725.
- [16] Udenfriend S, Kodukula K. How glycosyl phosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made [J]. *Annu Rev Biochem*, 1995, 64(1): 563–591.
- [17] Liu B. Biological function research of a GPI anchored protein gene, *OsGAPI* in *Oryza sativa* [D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2009: 1–102. 刘兵. 水稻GPI锚定蛋白基因*OsGPAI*的生物学功能研究 [D]. 广州: 中山大学, 2009: 1–102.
- [18] Li Y H. Map-based cloning and functional analysis of the rice *Brittle Culm1* gene [D]. Beijing: Graduate School of Chinese Academy of Sciences, 2002: 1–15. 李云海. 水稻脆秆控制基因*BCI*的图位克隆与功能研究 [D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2002: 1–15.