

# 绿竹 *BoGPIAP* 基因克隆与异位表达研究

董丽莉, 孙化雨, 赵韩生, 娄永峰, 王丽丽, 高志民\*

(国际竹藤中心, 竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京 100102)

**摘要:**糖基化磷脂酰肌醇锚定蛋白(GPIAP)因其结构和功能的多样性,决定了它在各种生物学过程中都发挥着重要作用。采用同源克隆的方法从绿竹(*Bambusa oldhamii*)中获得一个GPIAP同源基因,命名为*BoGPIAP*,cDNA全长1 772 bp,其中包括1 356 bp的开放阅读框,编码一个451 aa的蛋白。蛋白结构分析表明,该蛋白包含1个典型的GPIAP家族保守区域(47-211)和1个CCVS结构域,在N-端和C-端分别具有1个跨膜信号肽和1个GPI锚定信号肽,属于GPIAP家族。构建*BoGPIAP*与GFP融合的表达载体,在洋葱表皮细胞中瞬时表达,结果显示*BoGPIAP*:GFP融合蛋白定位于细胞膜上,证明*BoGPIAP*基因编码的蛋白为膜蛋白。分别构建*BoGPIAP*的正义、反义表达载体并转化烟草(*Nicotiana tabacum*)。PCR检测结果表明,*BoGPIAP*已转入烟草。与野生型相比,转反义基因植株细弱,纤维细胞壁明显变薄;而转正义基因植株粗壮,纤维细胞壁明显变厚。表明*BoGPIAP*可能对竹子纤维细胞壁的发育具有调控作用。

**关键词:**绿竹;糖基化磷脂酰肌醇锚定蛋白基因;亚细胞定位;异位表达;纤维细胞

中图分类号:S795.5

文献标识码:A

## Isolation and Ectopic Expression of *BoGPIAP* from *Bambusa oldhamii*

DONG Li-li, SUN Hua-yu, ZHAO Han-sheng, LOU Yong-feng, WANG Li-li, GAO Zhi-min

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

**Abstract:** Glycosylphosphatidylinositol-anchored protein (GPIAP) plays an important role in many biological processes because of its diversity of structure and function. A GPIAP gene was isolated from *Bambusa oldhamii* using homologous cloning method, and designed as *BoGPIAP*. The full-length cDNA of *BoGPIAP* was 1772 bp including an open reading frame of 1 356 bp. The predicted protein encoded by *BoGPIAP* was 451 amino acids with a transmembrane structure at the N-end and a signal of GPI-anchor at the C-end, and also containing a typical conserved domain (47-211) and a CCVS motif, which indicated that it was a membrane protein belonging to GPIAP family. The plant expression vector with *BoGPIAP*:GFP was constructed and transformed into onion epidermal cells. The results of fluorescent microscope showed that the fused proteins were mainly located on the cytoplasmic membrane, which revealed that the protein encoded by *BoGPIAP* was a membrane protein. The expression vectors of sense and antisense *BoGPIAP* were constructed into the multiple cloning sites of pBI121 respectively, and transformed into tobacco mediated with agrobacterium. The transgenic plants of *BoGPIAP* were confirmed by PCR method. The phenotypes showed the antisense transgenic plants were thin, while the sense transgenic ones were stout comparing with the wild type. The average thickness of fibrous cell wall in the antisense transgenic plants was thinner, while that of the sense transgenic ones was significantly thicker than that of wild type, indicating that the *BoG*

收稿日期:2014-07-31

基金项目:国家科技支撑计划专题“分子辅助育种技术集成与示范”(2012BAD23B0504)、“竹藤优异种质创制创新与种苗培育标准化示范”(2015BAD04B01)。

作者简介:董丽莉(1988—),女,硕士研究生,主要从事竹藤花卉分子育种研究。E-mail:lxhs0108@163.com

\* 通讯作者:高志民(1971—),男,河北唐山人,研究员,博士生导师。E-mail:gaozhimin@icbr.ac.cn

PIAP may play a regulatory role in the wall development of fibrous cell in bamboo.

**Key words:** *Bambusa oldhamii*; glycosylphosphatidylinositol-anchored protein gene; subcellular localization; ectopic expression; fibrous cell

竹类植物是重要的森林资源,在全球森林资源锐减的情况下,竹类植物以其速生且材质优良的特点而倍受关注,我国每年竹材替代了全国将近 1/5 的木材使用量。随着竹产业的迅速发展,竹资源出现了质量相对单一,不能满足竹产业规模化、多元化利用需求的问题。细胞壁组分、结构是影响竹材材性的重要因素,研究竹细胞壁的生物合成对于培育符合生产实际需要的竹材新品种具有重要的现实意义。目前,关于竹类植物细胞壁生物合成相关的基因已有一些报道,如木质素生物合成相关基因 *COMT*<sup>[1]</sup>、*C4H*<sup>[2]</sup>、*BoPAL2*<sup>[3]</sup>、细胞色素 P450<sup>[4]</sup>、*PePAL*<sup>[5]</sup>、*BoPAL1*<sup>[6]</sup>、*BoPAL2*<sup>[7]</sup>、纤维素合成酶基因 *PpCesA1*<sup>[8]</sup>、蔗糖合成酶基因<sup>[9]</sup>与蔗糖运输基因 *BoSUT2*<sup>[10]</sup>等,但尚有许多与竹类植物细胞发育相关的基因资源有待挖掘。

糖基化磷脂酰肌醇锚定蛋白(glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, GPIAP)广泛存在于真核生物的细胞质膜上,一类非常重要的膜蛋白,它通过糖基磷脂酰肌醇插入于内质网膜和质膜来实现对细胞壁生物合成的调控<sup>[11]</sup>。拟南芥的 GPIAP 同源蛋白 AtCOB 通过和其它相关蛋白共同参与纤维素微纤丝取向与合成来调控细胞壁的生物合成<sup>[12]</sup>,玉米 Bk2 的功能是作用于木质素和纤维素之间的相互调节以保持器官的灵活性而不是直接参与纤维素生物合成<sup>[13]</sup>,水稻的 *SEMI-ROLLED LEAF1* 基因编码的蛋白是通过控制泡状细胞的形成来调节叶片卷曲度<sup>[14]</sup>,水稻的 BC1 蛋白功能缺失,都会使其细胞壁厚度和纤维素含量下降,提高木质素含量,导致茎秆、叶片变脆的表型,导致其机械强度下降<sup>[15]</sup>。因此,GPIAP 对于植物细胞壁的生物合成及细胞伸展有着重要的调节作用。绿竹(*Bambusa oldhamii*)是重要的笋用竹种,竹竿可作建筑用材或劈篾编制用具,也可作为造纸原料,其基础研究一直倍受关注,涉及竹笋生长发育<sup>[16-17]</sup>、细胞壁生物合成<sup>[18]</sup>及花发育<sup>[19-20]</sup>等相关基因的表达及功能初步研究。本研究以绿竹为材料,从分离 GPIAP 同源蛋白基因入手,通过其在烟草中的异位表达,来揭示其对细胞生长发育的调控作用,为实现竹子的定向培育提供基因资源和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

绿竹(*Bambusa oldhamii*)为盆栽扦插苗,培养条件为 25℃,光照 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,光周期:光/暗 = 16 h/8 h。

### 1.2 基因全长 cDNA 克隆与分析

采用 Trizol 法提取绿竹幼嫩叶片的总 RNA<sup>[21]</sup>,参照 Promega 反转录试剂盒操作说明合成 cDNA,按照 Clontech 的 SMART<sup>TM</sup> RACE 试剂盒合成 3' cDNA 和 5' cDNA。

根据 Bk2(DQ139874)的保守区序列设计引物, GPIAP-F1:5'-AACTACCAGATGTAC CGGC-3'和 GPIAP-R1:5'-GTTGTAGAACTTGAGCCCGTAG-3'。反应体系 20  $\mu\text{L}$ :2  $\times$  Buffer 10  $\mu\text{L}$ ,dNTP(各 2.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)3.2  $\mu\text{L}$ , F1(10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )2  $\mu\text{L}$ , R1(10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )2  $\mu\text{L}$ ,cDNA(0.04  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )1  $\mu\text{L}$ ,Mili-Q 水 1.6  $\mu\text{L}$ ,Taq 酶(5 U  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ )0.2  $\mu\text{L}$ 。反应条件:94℃ 1 min,68℃ 1 min,72℃ 1 min,共 35 个循环。电泳回收 PCR 产物并连接到 pGEM-T easy 载体上,转化大肠杆菌(*Esherichia coli*)菌株 DH5 $\alpha$  感受态细胞,经筛选、检测后,将阳性克隆测序(上海生工生物工程技术服务有限公司)。根据获得的序列,在保守区设计 RACE 引物。5'-RACE 引物:5-1:5'-AGGTAGACG-GTGGAG GGGACGATGCTG-3',5-2:5'-TGACGGTCT-TGTTG GTGGTGCCAGCG-3'。3'-RACE 引物:3-1:5'-TGA ACTACACCCAGTGGACGCTCGTCG-3',3-2:5'-ACGGGCTCAAGTTCTACAACGACCTGCTC-3'。分别以 5'cDNA 和 3'cDNA 为模板,用引物 5-1 和 3-1 与分别与 UPM(试剂盒提供)配对,按试剂盒操作说明进行第一轮 PCR 扩增(Program I)。反应结束后分别以降 PCR 的产物为模板,分别用 5-2 和 3-2 与 NUP(试剂盒提供)配对进行巢式 PCR 扩增(Program II),回收 PCR 产物,连接到 pGEM-T Easy 载体后测序。

利用 blast(<http://www.ncbi.nih.gov/blast>)进行序列比对分析,利用在线软件 ProtScale 预测蛋白的疏水性/亲水性<sup>[22]</sup>,Motif Scan 预测功能域<sup>[23]</sup>,SOPMA 预测蛋白二级结构<sup>[24]</sup>,TMPRED 预测跨膜

序列<sup>[25]</sup>,SignalP-4.0 预测信号肽<sup>[26]</sup>。

### 1.3 基因表达载体的构建

根据目的基因序列的酶切位点特征,以及植物表达载体 pPZP、pBI121 的多克隆位点,分别设计添加 *Xba* I 和 *Bam*H I 酶切位点的正义引物,GPIAP-F2:5'-AATCTAGAATGGAGCTCC GCCGCAACTCC-3' (5'端添加 *Xba* I 酶切位点)和 GPIAP-R2:5'-GGATCCTGGCACCAGGAGCAGCACCAG-3' (5'端添加 *Bam*H I 酶切位点),以及反义引物 GPIAP-F3:5'-GGATCCATGGAGCTCCGCCGCAACTCC-3' (5'端添加 *Bam*H I 酶切位点)和 GPIAP-R3:5'-AATCTA-GATGGCACCAGGAGCAGCACCAG-3' (5'端添加 *Xba* I 酶切位点)。采用 Takara 公司的高保真酶 Pyrobest 进行扩 PCR 扩增。产物经测序正确后采用双酶切 (*Xba* I / *Bam*H I) 直接将目的基因的编码区 (不含终止密码子) 连接到 pPZP、pBI121 的多克隆位点,分别形成了由 CaMV35S 启动的目的基因与 *GFP* 融合的植物表达载体,以及目的基因的正义、反义表达载体。

### 1.4 基因瞬时表达显微观察

将目的基因与 *GFP* 基因融合的植物表达载体质粒按照制备成金粉子弹,采用基因枪系统 PDS-1000/He (美国伯乐公司),轰击 (1 100 p. s. i) 洋葱 (*Allium cepa*) 表皮。样品 25℃ 培养过夜后,利用激光共聚焦扫描显微镜 (Axiovert S100, Zeiss, Germany) 激发光 488 nm 对转基因洋葱表皮细胞进行观察,采集图像<sup>[27]</sup>。

### 1.5 反义基因转化与检测

将目的基因的正义、反义表达载体转入农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*),经菌落 PCR 鉴定正确后,选取单克隆培养,采用叶盘法转化烟草,同时以转空载 pBI121 为对照。经过预培养、浸染、共培养、选择培养 (Kan 50 mg · L<sup>-1</sup>)、生根培养和移栽后,获得转基因再生植株<sup>[28]</sup>。分别提取转基因烟草和野生烟草植株的基因组 DNA,利用引物 GPIAP-F4:5'-ATGGAGCTCC GCCGCAACTCC-3' 和 GPIAP-R4:5'-TGGCACCAGGAGCAGCACCAG-3' 进行检测。

### 1.6 转基因植株纤维细胞表型观察

分别取株高 30 cm 的转基因烟草和野生烟草植株茎秆,取其中间部位 (约 2 cm),将样品按轴向劈成片,投入装有离析液 (30% 过氧化氢:冰醋酸 = 1:1) 的试管中,盖好试管塞后将试管放入烘箱中,控制温度在 60℃,保持 36 h。待样品发白后,取出样品,

用纯净水洗 6~7 次,期间每隔 2 h 换一次水,直至样品没有酸味。用玻璃棒轻轻将纤维捣成单根的纤维,用吸管吸取适量的纤维置于载玻片上,气干,每个样品设置 3 个重复<sup>[29]</sup>。使用三目显微镜测量 (型号:LEICA DM LB2),将气干的载玻片放在显微镜下,每个样品分别记录 30 根纤维细胞的长度、细胞壁厚度,进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因 cDNA 全长获得

利用引物 GPIAP-F1 和 GPIAP-R1 以绿竹叶片的 cDNA 为模板进行 PCR,产物克隆到 pGEM-T Easy 载体上,经测序获得一个 939 bp 的插入片段,与 NCBI 公共数据库进行比对分析发现该片段为糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白 (GPIAP) 基因保守区的部分序列。应用 RACE 引物进行扩增,3'-RACE 和 5'-RACE 产物测序分别得到 3'端序列 574 bp 和 5'端序列 683 bp。经过序列拼接,得到一个全长为 1 772 bp 的 cDNA。序列分析表明,该序列包括一个完整的开放阅读框 1 356 bp,5'非翻译区 117 bp,3'非翻译区 269 bp 和 30 bp 的 polyA 尾巴。将该基因命名为 BoGPIAP (GenBank 注册号:KM267642)。

### 2.2 基因编码蛋白质性质与结构预测分析

蛋白的结构决定其性质和功能。序列分析表明,BoGPIAP 编码一个 451 aa 的蛋白,预测分子量和等电点 pI 分别为 49.379 kDa 和 8.649。蛋白亲水性/疏水性分析结果显示,该蛋白总体呈现亲水性。BoGPIAP 包含 1 个典型的 GPIAP 家族保守区域 COBL (47-211) 和 1 个 CCVS 结构域。二级结构预测显示,BoGPIAP 含有  $\alpha$  螺旋、延伸链、 $\beta$  折叠和无规则卷曲四种结构,其中无规则卷曲最长,覆盖了 50.11% 的氨基酸残基 (226 aa),其次为延伸链覆盖了 113 aa (25.06%), $\alpha$  螺旋结构和  $\beta$  折叠分别覆盖了 84 aa (18.63%) 和 53 aa (6.21%)。跨膜结构分析表明,BoGPIAP 从 N-端开始具有 3 个跨膜螺旋结构 (8-24 aa, 168-191 aa, 434-451 aa)。信号肽预测显示,在 N-端有 1 个导向内质网的信号肽 (1-23 aa) (切割位置:AVA ↓ YD)<sup>[26]</sup>;C-端具有 GPI-anchor 信号特征序列,包括一个非结构化的连接区域 (409-423:DECKMPPPDTPYLP)、一个 GPI 锚定位点  $\omega$  位点 (424:S)、一个中等极性间隔区 (425-432:SAPVAPLR) 和一个疏水性氨基酸组成的尾巴 (433-451:STIAAGAASALLLVLLLVP)<sup>[30-31]</sup>。BoGPIAP

符合 GPI 锚定蛋白的特征<sup>[32]</sup>。因此,推测 *BoGPIAP* 基因编码了一个 GPI 锚定蛋白质,位于细胞膜上。

### 2.3 同源性比较与系统进化树分析

蛋白序列的同源性是蛋白之间保守性及其进化关系的判断重要依据。Blast 结果表明,在 NCBI 数据库中与 *BoGPIAP* 一致性为 67% 以上的序列就有

100 条,表明该蛋白是相对保守的,其中与绿竹的糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白 *BoCOBL* (ACA04978) 一致性达 98.4%,主要区别在于 C-端相差 11 aa(图 1)。与模式植物水稻 *COBRA* (NP\_001050366)、拟南芥 *COBRA-like protein 4* (NP\_197067) 的一致性分别为 89.8% 和 71.9%。

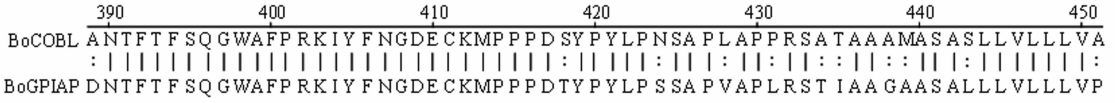
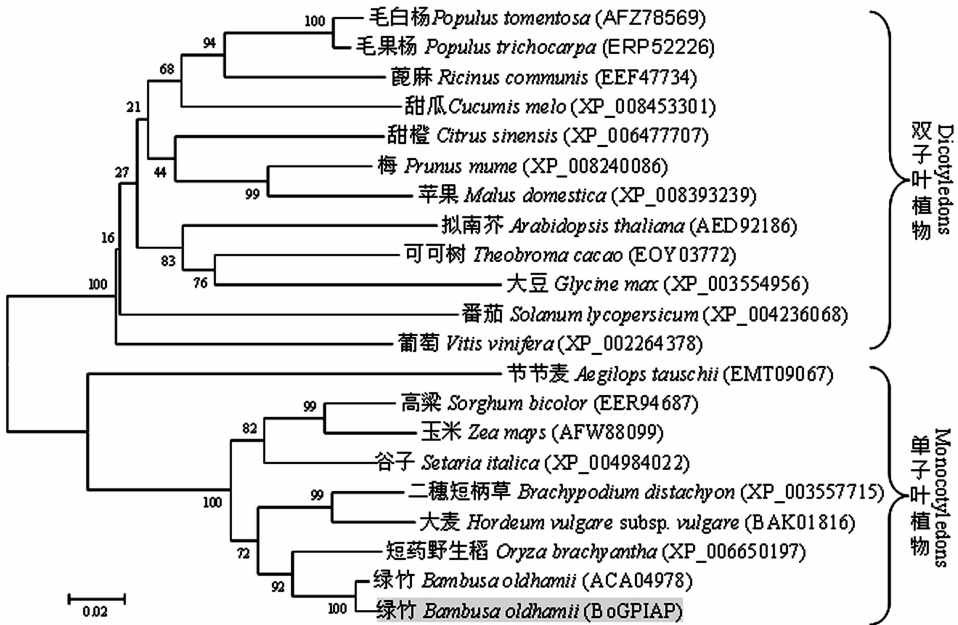


图 1 *BoGPIAP* 与 *BoCOBL* 蛋白序列 C-端差异比较

基于不同物种 GPIAP 同源蛋白序列构建系统进化树,结果表明来自单子叶植物和双子叶植物的 GPIAP 同源蛋白分别聚集成两个大的分支。在单子叶植物分支中,绿竹与短药野生稻聚集在一起,与大

麦和二穗短柄草组成的分支靠近,其次是谷子、玉米、高粱等单子叶植物,而与同是单子叶植物的节节麦的距离较远(图 2)。



每个分支上的数字表示 1000 次重复搜索的靴带值。

图 2 基于 GPIAP 同源蛋白序列的系统进化树分析

### 2.4 基因表达载体构建与检测

分别用引物 GPIAP-F2 和 GPIAP-R2、GPIAP-F3 和 GPIAP-R3 扩增,PCR 产物经连接到 pGEM-T Easy 载体后测序结果显示,插入片段均为 1 367 bp,其中 GPIAP-F2 和 GPIAP-R2 扩增序列依次包含了 *Xba* I 酶切位点(TCTAGA)、*BoGPIAP* 基因编码区(不包括终止密码子)和 *Bam*H I 酶切位点(GGATCC),而 GPIAP-F3 和 GPIAP-R3 扩增序列依次包含了 *Xba* I

酶切位点、*BoGPIAP* 基因反向编码区(不包括终止密码子)和 *Bam*H I 酶切位点,与预期完全吻合。用 *Xba* I/*Bam*H I 双酶分别消化含有目的片段的 pGEM-T easy 质粒以及 pPZP 和 pBI121 表达载体质粒,回收目的片段,分别将正义 *BoGPIAP* 连接到 pPZP 和 pBI121 载体的 *Xba* I 和 *Bam*H I 酶切位点之间,将反义 *BoGPIAP* 连接到 pBI121 载体的 *Xba* I 和 *Bam*H I 酶切位点之间,转化大肠杆菌感受态细

胞,提取质粒并酶切验证,结果与预期相符(图略),即获得了由 CaMV 35S 启动子启动的 *BoCOBL::*

*GFP* 融合植物表达载体,以及 *BoGPIAP* 的正义、反义植物表达载体(图 3)。

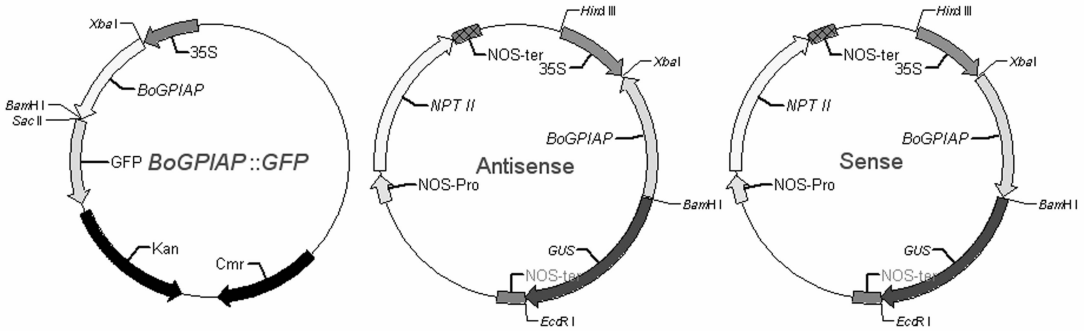
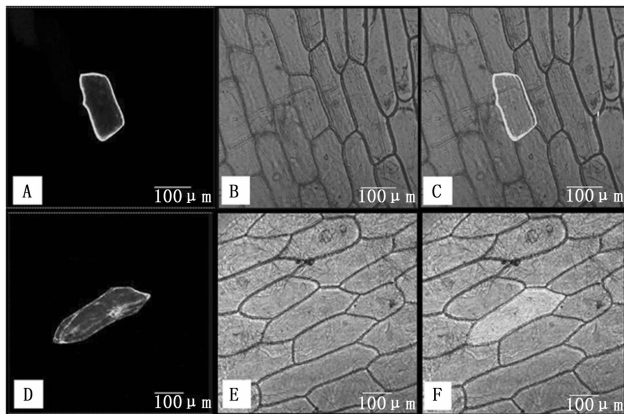


图 3 *BoGPIAP* 的植物表达载体

### 2.5 瞬时表达分析

分别用 *BoGPIAP::GFP* 融合表达载体和 pPZP 表达载体转化洋葱表皮细胞,经培养后显微镜观察表明,在 488 nm 激发光下观察,转化 *BoCOBL::GFP* 的洋葱表皮细胞绿色荧光信号主要是分布在细胞膜上(图 4 A, B, C),而只转化 pPZP 表达载体的洋葱表皮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 D, E, F)。由此证明,*BoCOBL::GFP* 融合蛋白位于洋葱表皮细胞中的细胞膜上,初步证明 *BoGPIAP* 基因编码的蛋白为膜蛋白,亚细胞定位于细胞膜上。



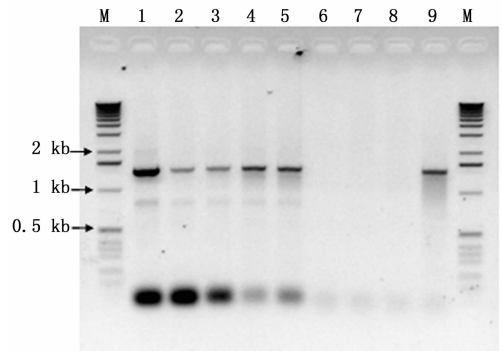
A, B, C: 表达 *BoCOBL::GFP* 融合蛋白的细胞; D, E, F: 表达 GFP 融合蛋白的细胞; A, D: 暗场; B, F: 明场; C, F: 合并模式。

图 4 *BoGPIAP::GFP* 和 GFP 在洋葱表皮细胞中的亚细胞定位

### 2.6 转基因植株检测与表型分析

通过对转基因植株的 PCR 检测,扩增产物电泳结果表明,共获得 5 个转基因阳性植株,其中正义植株 3 株,反义植株 2 株,转目的基因植株和质粒对照均具有特异的目的条带,而水对照、未转基因的烟草植株、转空载 pBI121 植株没有目的条带,表明获得

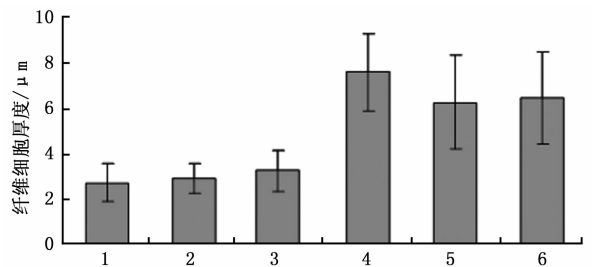
了 *BoGPIAP* 转基因植株(图 5)。



1, 2: 反义植株; 3, 4, 5: 正义植株; 6: 野生型; 7: 转控载体对照; 8: 水对照; 9: 质粒对照  
M: DNA 分子量标记。

图 5 转基因烟草 PCR 检测

表型分析发现,与野生型相比,转反义基因植株细弱,而转正义基因植株粗壮。纤维细胞壁观察表明,转反义基因植株、转正义基因植株与野生型烟草的纤维细胞长度虽有差异,但差别不明显;而纤维细胞厚度变化明显,转反义基因植株的纤维细胞厚度略低于野生型,而转正义基因植株纤维细胞壁明显变厚,比野生型增厚约 1 倍左右(图 6)。



1, 2: 反义植株; 3: 野生型; 4, 5, 6: 正义植株。

图 6 转烟草纤维细胞厚度分析

### 3 讨论

GPIAP 是一类基于膜结合方式而定义的蛋白,因此各类蛋白之间并无序列的保守性<sup>[33]</sup>,在植物中各类 GPIAP 是具有多基因成员的家族,同家族蛋白成员之间的保守性较高。如 COBRA 同源蛋白在拟南芥、水稻、玉米中分别有 12 个、11 个和 9 个<sup>[34]</sup>,它们都包含 1 个典型的保守区域 COBL 和 1 个 CCVS 结构域。本研究从绿竹中获得的 *BoGPIAP* 基因编码的蛋白与其它植物中的 COBRA 蛋白有着较高的一致性,尤其是与其近缘种的一致性更高,如与水稻同源蛋白的一致性最高达 89.8%。与同是来自绿竹的 *BoCOBL* 的差异仅为 1.6%,集中在于 C-端疏水区域(图 1),这可能意味着在插入内质网膜脂中时它们的稳定性存在差异,而与其成熟蛋白影响不大,但 *BoGPIAP* 与 *BoCOBL* 是否存在功能上的差异,尚需进一步验证。

研究表明,植物 GPIAP 在细胞扩张、细胞表面连接、维持细胞壁结构和次生细胞壁的生物合成中均发挥着重要作用<sup>[11, 35-36]</sup>。对水稻突变体 *bcl* 的研究表明,其茎秆、叶片、叶鞘变脆,机械强度下降的表型是因为 *BCI* 基因突变引起的<sup>[15]</sup>。通过对 *BoGPIAP* 在洋葱表皮细胞中瞬时表达研究表明,该基因表达的蛋白定位于细胞膜上,与预测的结果一致。在烟草中过量表达 *BoGPIAP* 基因,转基因植株生长健壮,纤维细胞壁有明显增厚,而转反义的 *BoGPIAP* 基因植株长势较弱,纤维细胞壁厚度小于野生型,表明该基因的功能与维管束纤维细胞壁的发育有关,其原因可能是正义过量表达 *BoGPIAP* 产生的膜蛋白,促进了细胞膜和细胞壁之间的物质交换,引起次生细胞壁增厚,而反义表达则起抑制作用,影响了细胞壁的次生长,但 *BoGPIAP* 基因的功能尚需要通过在绿竹中进行验证。同时,*BoGPIAP* 基因的同家族成员对竹子细胞壁发育的调控如何,对竹材理化性质产生怎样的影响,都需要深入开展研究,才能通过基因工程来实现人为对竹子目标材性的有效调控,培育出符合生产实际需要的新品种。

#### 参考文献:

[1] 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.

[2] 金顺玉,卢孟柱,高健. 毛竹木质素合成相关基因 *CAH* 的克隆及组织表达分析[J]. 林业科学研究,2010, 23(3): 319-325.

[3] Hsieh L S, Yeh C S, Pan H C, et al. Cloning and expression of a phenylalanine ammonia-lyase gene (*BoPAL2*) from *Bambusa oldhamii* in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*[J]. Protein Expr Purif, 2010, 71(2): 224-30.

[4] 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.

[5] Gao Z M, Wang X C, Peng Z H, et al. Characterization and primary functional analysis of phenylalanine ammonia-lyase gene from *Phyllostachys edulis*[J]. Plant Cell Rep, 2012, 31(7):1345-1356.

[6] Hsieh L S, Hsieh Y L, Yeh C S, et al. Molecular characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (*BoPAL1*) from *Bambusa oldhamii*[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(1): 283-290.

[7] Hsieh L S, Yeh C S, Pan H C, et al. Cloning and expression of a phenylalanine ammonia-lyase gene (*BoPAL2*) from *Bambusa oldhamii* in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*[J]. Protein Expr Purif, 2010, 71(2):224-30.

[8] 杜亮亮,鲁专,金爱武. 雷竹纤维素合成酶基因 cDNA 克隆与表达分析[J]. 江西农业大学学报,2010, 32(3): 535-540.

[9] 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.

[10] 高志民,杨学文,彭镇华,等. 绿竹 *BoSUT2* 基因的克隆、分析与亚细胞定位研究[J]. 林业科学,2010, 46(2): 45-49.

[11] 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.

[12] Wasteneys G O, Fujita M. Establishing and maintaining axial growth: wall mechanical properties and the cytoskeleton [J]. J Plant Res, 2006, 119(1): 5-10.

[13] 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.

[14] 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.

[15] Li Y, Qian Q, Zhou Y, 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.

[16] Liao S C, Lin C S, Wang A Y, et al. Differential expression of genes encoding acid invertases in multiple shoots of bamboo in response to various phytohormones and environmental factors [J]. J Agric Food Chem. 2013, 61(18): 4396-405.

[17] Yeh S H, Lee B H, Liao S C, et al. Identification of genes differentially expressed during the growth of *Bambusa oldhamii* [J]. Plant Physiol Biochem. 2013, 63: 217-226.

[18] Chen C Y, Hsieh M H, Yang C C, et al. Analysis of the cellulose synthase genes associated with primary cell wall synthesis in *Bam-*

- busa oldhamii* [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71 (11 - 12): 1270 - 1279.
- [19] 朱龙飞,徐英武,林新春. 绿竹花发育相关基因 *BoAP3* 的克隆与分析[J]. *浙江农林大学学报*, 2013, 30(6): 839 - 842.
- [20] Lin X C, Huang L C, Fang W, *et al.* Understanding bamboo flowering based on large scale analysis of expressed sequence tags[J]. *Gen Mol Res*, 2010, 9(2): 1085 - 1093.
- [21] Gao Z M, Li X P, Li L B, *et al.* An effective method for total RNA isolation from bamboo[J]. *Chinese For Sci Tech*, 2006, 5(3): 52 - 54.
- [22] Kyte J, Doolittle R F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein [J]. *J Mol Biol*, 1982, 157, 105 - 132.
- [23] Sigrist C J, Cerutti L, de Castro E, *et al.* PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(Database issue): D161 - 6.
- [24] Geourjon C, Deléage G. SOPMA: Significant improvement in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments[J]. *Comput Appl Biosci*, 1995, 11(6), 681 - 684.
- [25] Hofmann K, Stoffel W. TMbase-A database of membrane spanning proteins segments[J]. *Biol Chem*, 1993, Hoppe-Seyler 374, 166.
- [26] Petersen T N, Brunak S, von Heijne G, *et al.* SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. *Nat Methods*, 2011, 8(10): 785 - 786.
- [27] Gao Z M, Zheng B, Wang W Y, *et al.* Cloning and functional characterization of a GNA-like lectin from Chinese Narcissus (*Narcissus tazetta* var. *Chinensis* Roem) [J]. *Physiol Plantarum*, 2011, 142(2): 193 - 204.
- [28] 徐刚标,卢孟柱,陆 燕. *ARF* 基因导入烟草的遗传转化研究 [J]. *中南林业科技大学学报*, 2007, 27(5): 6 - 12.
- [29] 曹双平. 植物单根纤维拉伸性能测试与评价 [D]. 中国林业科学研究院硕士论文, 2010.
- [30] Eisenhaber B, Bork P, Eisenhaber F. Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase [J]. *Protein Eng*, 1998, 11(12): 1155 - 1161.
- [31] Eisenhaber B, Bork P, Eisenhaber F. Prediction of potential GPI-modification sites in proprotein sequences [J]. *J Mol Biol*, 1999, 292 (3): 741 - 758.
- [32] Udenfriend S, Kodukula K. How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made [J]. *Annu Rev Biochem*, 1995, 64: 563 - 591.
- [33] 刘 兵. 水稻 GPI 锚定蛋白基因 *OsGPAI* 的生物学功能研究 [D]. 中山大学博士学位论文, 2009.
- [34] 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.
- [35] Sedbrook J C, Carroll K L, Hung K F, *et al.* The *Arabidopsis* *SKU5* gene encodes an extracellular glycosyl phosphatidylinositol-anchored glycoprotein involved in directional root growth [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(7): 1635 - 1648.
- [36] Shi H, Kim Y, Guo Y, *et al.* The *Arabidopsis* *SOS5* locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(1): 19 - 32.