

研究报告

Research Report

甘蔗 *KNOX* 基因(*Sckn1*)的电子克隆及生物信息学分析

李旭娟 刘洪博 林秀琴 吴转娣 徐超华 刘新龙*

云南省农业科学院甘蔗研究所 / 云南省甘蔗遗传改良重点实验室, 开远, 661699

* 通讯作者, lxlgood868@163.com

摘要 *KNOX* 基因对植物顶端分生组织的形成和维持有至关重要的作用。本文选择功能已知的水稻 *KNOX* 基因(*OSHI*, *Oskn1*)为参考序列, 采用电子克隆技术克隆到甘蔗中与 *OSHI* 同源的一个 *KNOX* 基因 *Sckn1*, 并通过生物信息学分析预测该基因的结构、功能。结果表明: 该基因包含一个 1 071 bp 的开放阅读框, 编码 356 个氨基酸, 分子量为 39.36 kD, 理论等电点为 6.47。该基因很可能定位于细胞核, 起转录调控作用, 序列比对发现该基因编码蛋白与高粱、玉米、小米草等 *KN1* 蛋白高度相似。以上分析结果为进一步研究 *Sckn1* 基因的功能奠定了坚实的基础。

关键词 甘蔗, *KNOX* 基因, 电子克隆, 生物信息学分析

In Silico Cloning and Bioinformatics Analysis of *KNOX* Gene in Sugarcane (*Sckn1*)

Li Xujuan Liu Hongbo Lin Xiuqin Wu Zhuandi Xu Chaohua Liu Xinlong*

Yunnan Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement/Sugarcane Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kaiyuan, 661699

* Corresponding author, lxlgood868@163.com

DOI: 10.13417/j.gab.034.000136

Abstract *KNOX* plays an important role in the formation and maintenance of plant apical meristem. We chose rice *KNOX* gene (*OSHI*, *Oskn1*) as the reference sequence to clone the *KNOX* gene that is homologous with *OSHI* from sugarcane (named *Sckn1*) based on in silico cloning approach, then, the structure and function of *Sckn1* was analyzed and predicted by bioinformatics. The results showed that *Sckn1* contains a 1 071 bp open reading frame encoding 356 amino acids with the molecular weight 39.36 kD and theoretical isoelectric point 6.47. This gene is likely to be located in the nucleus, playing a role of transcriptional regulation. Sequence alignment revealed that *ScKN1* and *KN1* from sorghum, zea mays, setaria italica should be of great similar. These analyses lay a solid foundation for further research of *Sckn1*.

Keywords Sugarcane, *KNOX* gene, *In silico* cloning, Bioinformatics analysis

甘蔗是一种重要的糖料作物和能源植物, 其有效部位主要是其地上部分。研究表明, 有花植物地上部分器官形成依赖于其顶端分生组织(shoot apical meristem, SAM), 而顶端分生组织的形成和维护又受 *KNOX* 转录因子调控(Tsuda et al., 2014)。研究者已获得水稻同源异型盒基因 *OSHI*, 并证实该基因对水稻顶端分生组织的形成和维护具有重要作用。*OSHI* 属于 *KNOX* 家族 I 类, 与 *Oskn1* 是同一基因, 参与水稻茎端分生组织形成的调节和维持(Tsuda et al., 2011)。然而, 甘蔗中是否也存在该类基因, 其功

能又如何还不为所知, 鉴于此, 我们以水稻 *OSHI* 为探针来探索甘蔗中相关基因。

电子克隆(*in silico* cloning)技术是基于生物学数据库中的蛋白质、核酸序列和和表达序列标签(expressed sequence tags, ESTs)等信息, 利用生物信息学工具和计算机技术快速获得功能基因的方法(苏亚春等, 2011)。其中基于 EST 的电子克隆技术是近几年发展起来的一种新的基因快速克隆方法, 该方法是利用相近物种的核酸或蛋白为探针, 在数据库中搜索感兴趣基因的 ESTs, 再利用生物信息学技术组装

基金项目: 本研究由国家自然科学基金(31360359)资助

延伸 ESTs 序列,最终获得基因的部分乃至全长 cDNA 序列并进一步利用 RT-PCR 的方法进行克隆分析、验证(胡铄和萧浪涛,2007)。该技术具有效率高、成本低、针对性强等优点(孟超敏等,2014)。本研究以水稻 *OSH1* 基因序列为种子序列,在 NCBI 中 Blast 搜索甘蔗中与种子序列相似性较高的 ESTs,然后利用 Vector NTI、DNAMAN 等软件进行拼接,获得 EST 重叠群(contig),再以此 contig 为种子序列,重复上面步骤,直到没有可供延长的 EST 序列为止。然后将拼接得到的序列在 NCBI 比对,初步确定正确后,利用在线工具 ORF Finder 搜寻其正确的开放阅读框(open reading frame, ORF),即获得甘蔗中 *OSH1* 的同源基因的 cDNA 序列,取名 *ScKn1* (NCBI GenBank: KM880186),再借助相关生物信息学知识及软件分析预测该基因编码蛋白的理化性质、结构、功能等,以期为后续 *ScKn1* 的功能研究奠定基础。

1 结果与分析

1.1 甘蔗 *KNOX* 基因相关 EST 序列 Vector NTI 11.5 Advance 的拼接

通过水稻 *OSH1* 基因(NCBI GenBank: AK107637) 序列在 NCBI 中 Blast 搜索到甘蔗中相似性较高的 25 条序列(NCBI GenBank: CA234507.1, CA275017.1, CA147421.1, CA229919.1, CA184947.1, CA072428.1, CA205078.1, CA148829.1, CF571207.1, CA235280.1, CA242709.1, CA160039.1, CA220958.1, CA200242.1, CA184991.1, CA253948.1, CA212204.1, CA110552.1, CA229847.1, CA242304.1, CA261229.1, CA227414.1, BQ537310.1, CA199909.1, CA225630.1),利用 Vector 软件将这些序列拼接,得到 1 591 bp 的 contig。Blast 比对初步认为该电子克隆序列就是甘蔗的 *KNOX* 基因(*ScKn1*)。

1.2 ROC22 生长点总 RNA 的提取及 *ScKn1* 基因扩增

按照试剂盒方法提取 ROC22 生长点总 RNA 后取 3 μ L 经 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测可见 3 条完

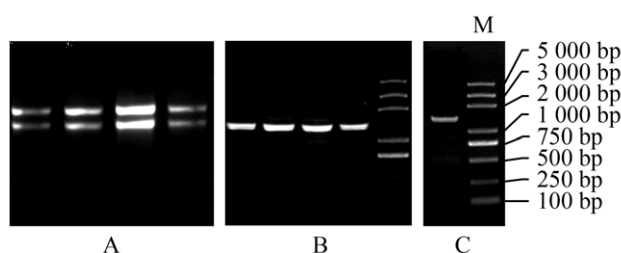


图 1 甘蔗生长点总 RNA 及 *ScKn1* PCR 扩增

注: A: 甘蔗生长点总 RNA; B: *ScKn1* 反转录 PCR 产物; C: *ScKn1* PCR 产物胶回收检测

Figure 1 AGE results of total RNA from sugarcane stem apex and *ScKn1* PCR product

Note: A: Total RNA of sugarcane stem apex; B: RT-PCR production of *ScKn1*; C: Detection of *ScKn1* gel extraction

整的条带(图 1 A),经 Bio Drop Lite PC 超微量可见紫外分光光度计检测 RNA OD_{260/280} 在 2.0 左右,说明提取 RNA 质量较好,符合实验要求。将提取的 RNA 反转录成 cDNA,以此为模板进行 PCR 得到 *ScKn1*, PCR 产物电泳并进行胶回收(图 1 B; 图 1C)。

1.3 ScKN1 生物信息学分析

1.3.1 ScKN1 的氨基酸理化性质分析

利用 ExPASy 服务器中的 ProtParam 和 Compute pI/Wm 程序,预测 ScKN1 的理化性质(章文贤等,2013),结果表 1 和图 2。由表 1 可知,该蛋白的不稳定系数为 51.45,大于 40,说明该蛋白不稳定;平均疏水性为 -0.562,参考付海辉等(2010)报道初步推测 ScKN1 是亲水性氨基酸。由图 2 可知 ScKN1 氨基酸组成中含量较多的是 Leu 和 Ser,推测它们可能与 ScKN1 空间结构的维持有关。采用 Kyte & Doolittle 标度计算,得到 ScKN1 的亲/疏水信号图(图 3)。图 3 中峰值分布在 -0.5 以下的比分布在 0.5 以上的多,再次表明该蛋白为亲水性蛋白。

1.3.2 ScKN1 蛋白亚细胞定位预测

基因编码的蛋白质需要处于细胞中特定的亚细胞位置上才能行使其功能,因而蛋白的分布与其功

表 1 ScKN1 一级结构预测

Table 1 Predicting primary structure of ScKN1

氨基酸数目	分子量(kD)	(pI)	负电荷残基数(Asp+Glu)	正电荷残基数(Arg+Lys)	不稳定系数(II)	AI	平均疏水性
No. of amino acid residues	Molecular weight (kD)		No. of negative charged amino acid (Asp+Glu)	No. of positive charged amino acids (Arg+Lys)	Instability index (II)		Average of hydrophobicity
356.0	39.36	6.47	41.00	36.00	51.45	75.70	-0.562

注: pI 等电点; AI: 脂肪系数

Note: pI: Isoelectric point; AI: Aliphatic vindex

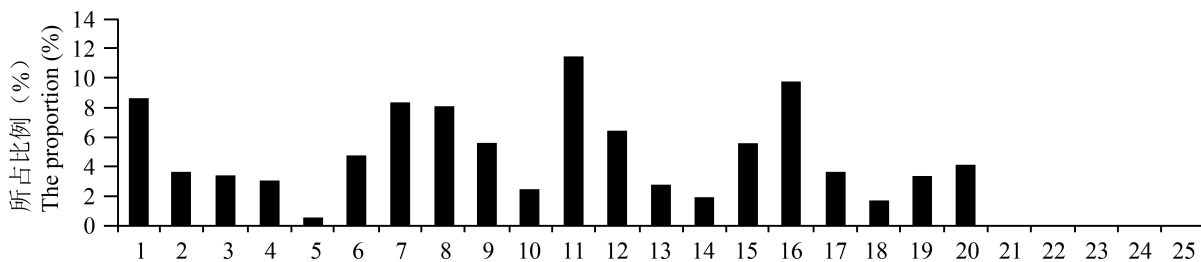


图2 ScKN1 的氨基酸组成及含量预测

注: 1: Ala (A) 31; 2: Arg (R) 13; 3: Asn (N) 12; 4: Asp (D) 11; 5: Cys (C) 2; 6: Gln (Q) 17; 7: Glu (E) 30; 8: Gly (G) 29; 9: His (H) 20; 10: He (I) 9; 11: Leu (L) 41; 12: Lys (K) 23; 13: Met (M) 10; 14: Phe (F) 7; 15: Pro (P) 20; 16: Ser (S) 35; 17: Thr (T) 13; 18: Trp (W) 6; 19: Tyr (Y) 12; 20: Val (V) 15; 21: Pyl (O) 0; 22: Sec (U) 0; 23: (B) 0; 24: (Z) 0; 25: (X) 0

Figure 2 Predicted the amino acid composition and content of ScKN1

Note: 1: Ala (A) 31; 2: Arg (R) 13; 3: Asn (N) 12; 4: Asp (D) 11; 5: Cys (C) 2; 6: Gln (Q) 17; 7: Glu (E) 30; 8: Gly (G) 29; 9: His (H) 20; 10: He (I) 9; 11: Leu (L) 41; 12: Lys (K) 23; 13: Met (M) 10; 14: Phe (F) 7; 15: Pro (P) 20; 16: Ser (S) 35; 17: Thr (T) 13; 18: Trp (W) 6; 19: Tyr (Y) 12; 20: Val (V) 15; 21: Pyl (O) 0; 22: Sec (U) 0; 23: (B) 0; 24: (Z) 0; 25: (X) 0

能紧密相关, 蛋白的亚细胞定位也在一定程度上反映了其对应基因的功能。研究采用 PSPORT 程序预测 ScKN1 的可能分布位置, 从表 2 来看, 该蛋白分布在细胞核中的可能性最大。

1.3.3 ScKN1 的二级结构预测

蛋白质的活性和功能与其结构密切相关, 因此, 研究蛋白空间结构对其功能探讨有重要指导作用, 本文参考原晓龙等(2013)的方法, 利用 SOPMA 预测 ScKN1 的二级结构。由表 3 可知, ScKN1 由 α 螺旋、延伸链和无规则卷曲构成, 其中无规则卷曲和 α 螺旋的比例较高, 分别为 43.82% 和 41.29%。图 4 也更直观地表明该蛋白的二级结构组成中包含无规则卷曲、 α 螺旋和延伸链, 其中前两者所占比例多。

1.3.4 ScKN1 的功能预测

基因功能分类是基因注释过程中的重要环节之一。为了加强对 *Sckn1* 的认识, 增加对该基因功能了解, 本研究对该基因进行了功能预测, 功能分类结果(表 4)表明, *Sckn1* 主要起转录调控作用, 推测其可能

表 2 基于 PSPORT 预测 ScKN1 的亚细胞定位

Table 2 Subcellular location of ScKN1 based on PSPORT

亚细胞定位	可能性
Subcellular localization	Possibility
细胞核	0.700
Nucleus	
线粒体基质	0.100
Mitochondrial matrix	
微体(过氧化物酶体)	0.368
Microbody (peroxysome)	

是转录因子。

1.3.5 ScKN1 的蛋白质结构域与亲缘进化关系分析

以 ScKN1 为探针, 在 NCBI 中进行 Blast 比对, 结果显示 ScKN1 包含一个转录调控 DNA 结合域 Homeodomain (HD), KNOX1 区域和 KNOX2 区域, 此外还有一个核定位区域 ELK (图 5), 这些区域对植物的形态建成起重要作用, 水稻 *OSH1* 突变体 *osh1* 中缺失 HD 区域(Tsuda et al., 2011), ELK 是核定位区域, KNOX2 和 HD 对诱导转基因作物异常表型起重要作用, KNOX1 和 ELK 可抑制转基因作物中靶基因的表达(Nagasaki et al., 2011)。下载与该探针蛋白相似性较高的蛋白序列通过 DNAMAN 进行序列比对(图 6), 发现它们在保守结构域上氨基酸相似度很高, 非保守结构域上存在一定变化。利用软件 MEGA6.06 构建 ScKN1 与高粱假定蛋白(GenBank:

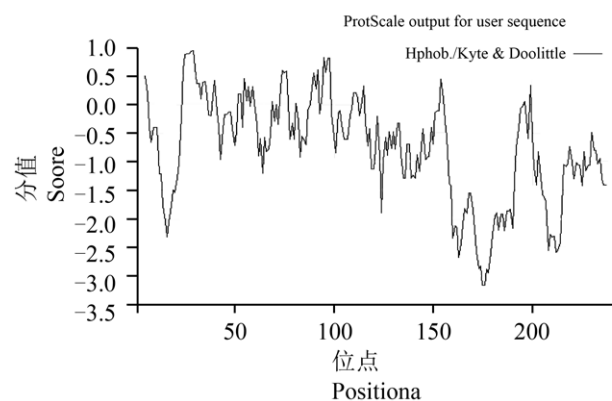


图 3 ScKN1 氨基酸序列的疏 / 亲水性预测

Figure 3 Predicted hydrophobicity/hydrophobicity of the deduced amino acid sequence of ScKN1

表 3 ScKN1 的二级结构预测

Table 3 Predicted secondary structure of ScKN1

二级结构元件	数目	百分比(%)
Secondary structure elements	Number	The percentage (%)
α 螺旋	147	41.29
Alpha helix		
延伸链	53	14.89
Extended strand		
无规则卷曲	156	43.82
Random coil		

XP_002463952.1)、高粱 KN1 (ABC71525.1)、玉米 KN1 (NP_001266662.1)、玉米 KN1 同源蛋白(NP_001105436.1)、小米草 KN1 (ABC71528.1)、小米草 KN1 同源蛋白 (XP_004981913.1)、小盼草 KN1 (ABC71529.1)、粟米 KN1 (ABC71526.1)其它几种植物 KN1 氨基酸序列进化树(图 7),可知 ScKN1 与小米草同源异型结构域蛋白亲缘关系最近。

综上所述,虽然 *ScKn1* 的具体功能还有待进一步验证,但本文的分析预测结果为后续实验奠定了基础。

2 讨论

OSH1 基因属于 *KNOX* (knotted1-like homeobox) 家族,该家族基因编码同源异型结构域(homeodomain, HD)转录因子。研究发现,HD 转录因子作用于赤霉素(GA)氧化酶基因(Bolduc and Hake, 2009)、GA 生物合成酶基因(Sakamoto et al., 2001)和细胞分裂素(CK)生物合成酶等基因(Sakamoto et al., 2006),进而调控这两类激素水平,从而影响植物 SAM 细胞分化。

电子克隆(in silico cloning)是基因克隆的新策略,也是一项伴随着基因组计划和 EST 计划发展起来的快速克隆基因的方法(Gill and Sansseau, 2000)。随着

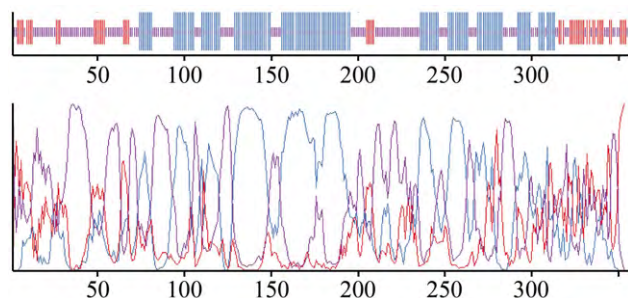


图 4 ScKN1 二级结构预测

注: 蓝色为 α-螺旋; 红色为延伸链; 玫红色为无规则卷曲

Figure 4 Secondary structure prediction of ScKN1

Note: The blue is alpha helix; red is extended strand; the rose red is random coil

表 4 ScKN1 的主要功能预测

Table 4 The main function prediction of ScKN1

功能分类	概率	功能分类	概率
Functional category	Probability	Functional category	Probability
转录调控	0.339	调控功能	0.320
Transcription regulation		Regulatory functions	
复制和转录	0.373	转录	0.133
Replication and transcription		Transcription	
翻译	0.078	信号转导	0.077
Translation		Signal transducer	

基因高通量测序技术的迅速发展,数据库中表达序列标签(expressed sequence tags, EST)序列数量与日俱增,利用基于 EST 的电子克隆获取目标基因的技术应用愈加广泛,目前已运用该方法成功从多种作物中获得了许多新基因,如武安泉等(2013)克隆了小麦 *Cyp450* 基因,徐婉莉等(2014)克隆了辣椒 *actin* 基因,郝爱平和王婷婷(2014)克隆了高粱 *SAMDC* 基因,方静平等(2012)克隆了甘蔗 β-1,3-葡聚糖酶基因以及巩元勇等(2013)克隆的陆地棉 *GhNIP5.J* 基因等。生物信息学也是一项新兴技术,广泛用于基因功能研究中新基因序列及其所编码的蛋白质结构和功能的详细预测和分析,对新基因序列的分析有很大的指导作用。相信随着基因组序列信息的丰富和生物信息学技术的发展,基因电子克隆技术也将更加精准、高效且备受青睐。

本研究利用基于 EST 的电子克隆技术从甘蔗中克隆了一个新基因 *ScKn1*,生物信息学分析表明该基因包含一个 1 071 bp 的开放阅读框,编码 356 个氨基酸,其蛋白定位于细胞核,可能作为转录因子参与转录调控作用,蛋白二级结构主要由 α 螺旋和无规则卷曲和延伸链构成。序列分析发现该蛋白与高粱、玉米和小米草等植物 KN1 蛋白高度保守,这些为 *ScKn1* 的功能研究奠定了良好的基础。

3 材料与方法

3.1 材料

3.1.1 植物材料

本实验所用材料保存于国家甘蔗种质资源圃,

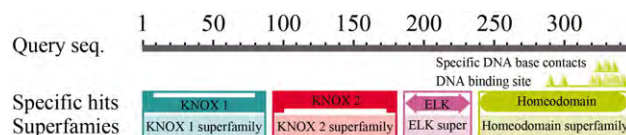


图 5 ScKN1 保守结构域预测

Figure 5 Conserved domain prediction of ScKN1

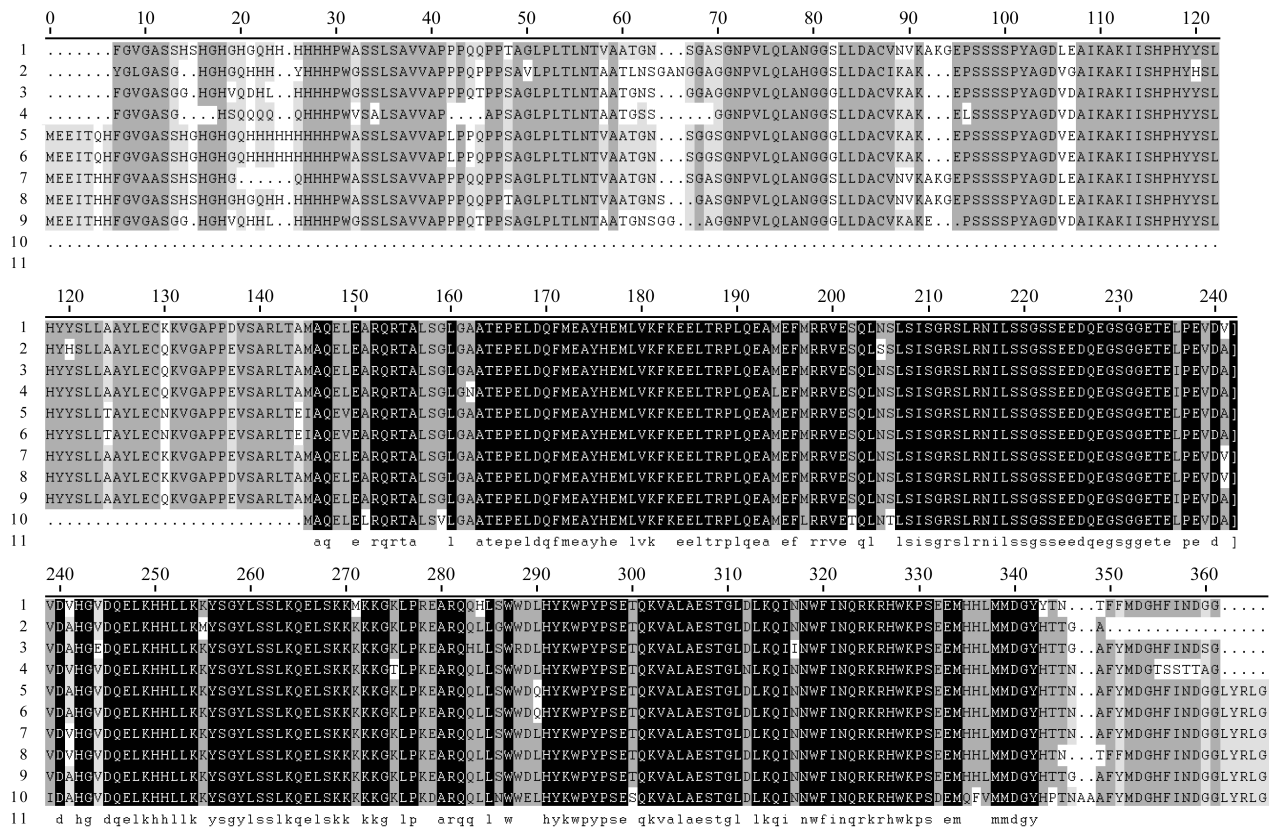


图 6 ScKN1 与几种植物 KN1 蛋白同源性比对

注: 1: ABC71525.1.fasta; 2: ABC71526.1; 3: ABC71528.1.fasta; 4: ABC71529.1.fasta; 5: NP_001105436.1.fasta; 6: NP_001266662.1.fasta; 7: ScKN1_Pr.txt; 8: XP_002463952.1.fasta; 9: XP_004981913.1; 10: OSH1_conserved_domain.txt; 11: Consensus

Figure 6 Homology analysis of ScKN1 and KN1 from other plant species

Note: 1: ABC71525.1.fasta; 2: ABC71526.1; 3: ABC71528.1.fasta; 4: ABC71529.1.fasta; 5: NP_001105436.1.fasta; 6: NP_001266662.1.fasta; 7: ScKN1_Pr.txt; 8: XP_002463952.1.fasta; 9: XP_004981913.1; 10: OSH1_conserved_domain.txt; 11: Consensus

选取甘蔗当家品种 ROC22 的新鲜幼嫩分蘖芽, 剥开其生长点剪碎后液氮速冻并用于后续 RNA 提取。

3.1.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒 Trans Zol™ Plant、反转录试剂盒 Trans Script One-step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix、Trans Taq DNA Polymerase High Fidelity (HiFi)、DNA Marker、克隆载体 PEASY-T5 Zero Cloning Kit 等购于北京金全生物技术有限公司。

3.1.3 生物信息学软件及网上资源

文中所用生物信息学软件及网上资源归纳如表 5 所示。

3.2 方法

3.2.1 ROC22 生长点总 RNA 的提取及反转录

将液氮速冻准备好的植物材料于液氮中迅速研磨成粉末并按 Trans Zol™ Plant 试剂盒方法提取 RNA, 用 1.2% 的琼脂糖凝胶和 Bio Drop Lite PC 超

微量可见紫外分光光度计检测 RNA 质量和浓度, 然后根据 TransScript One-step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒操作要求反转录成 cDNA 后于 -20℃ 保存备用。

3.2.2 ScKn1 的电子克隆

以水稻 *OSH1* (NCBI GenBank AK107637, D16507) 为基础, 在 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) blast 甘蔗的相关 EST 序列, 用 DNAMAN 软件对搜索到的 EST 序列进行拼接, NCBI 在线分析初步确定所拼接序列就是甘蔗的 *KNOX* 基因序列。利用 NCBI 中 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/p-projects/gorf/orf.cgi>) 搜索 *ScKn1* 的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 得到 *ScKn1* 的 cDNA 全长的电子克隆序列。

3.2.3 RT-PCR 扩增 ScKn1

以电子克隆序列为模板, 利用软件 Primer Premier 5.0 设计引物如下, 以保存的 ROC22 生长点

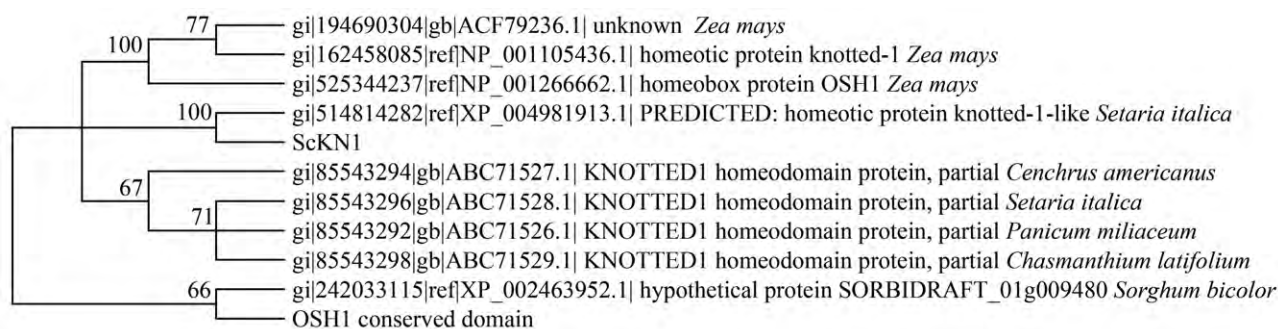


图 7 ScKn1 与其它几种植物 KN1 氨基酸序列进化树

Figure 7 Phylogenetic tree of the amino acids sequences of ScKn1 and KN1 from other plant species

RNA 反转录 cDNA 为模板, 利用引物 *ScKn1*-43-F: 5'-AGCCTTTTCCCTGCTGTGC-3'; *ScKn1*-1348-R: 5'-GCCCTGCCTTCAGTAGTTC-3' 进行 PCR 扩增, 反应程序为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 45 s, 56°C 退火 45 s, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环; 72°C 最后延伸 10 min, 反应结束后, 用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测并胶回收纯化, 克隆测序分析。50 μL 反应体系如表 6 所示。

3.2.4 ScKn1 的生物信息学分析

(1) ScKn1 氨基酸的理化性质分析, 利用 ExPASy 服务器中的 ProtScale 和 ProtParam 软件预测 ScKn1 的理化性质。

(2) ScKn1 的亚细胞定位: 利用在线软件 PSORT (<http://psort.hgc.jp/form.html>) 预测 ScKn1 在细胞中的存在部位。

(3) 利用 SOP-MA 分析预测 ScKn1 的二级结构。

(4) 通过 ProtFun 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/>) 预测 ScKn1 的功能。

表 5 生物信息学软件及网上资源

Table 5 Bioinformatics software and online resources

软件及在线工具	网址
Software and tools online	Web site
Vector NTI 11.5	
Primer Premier 5.0	
DNAMAN	
MEGA 6.06	
NCBI	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
ORF Finder	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html
ExPASy	http://www.expasy.org/resources
PSORT	http://psort.hgc.jp/form.html
SOPMA	http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_audat.pl?page=npsa_gor4.html
ProtFun	http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/

vices/ ProtFun/) 预测 ScKn1 的功能。

作者贡献

刘新龙负责相关实验设计及论文进行修改; 李旭娟主要负责实验具体实施、数据结果分析以及论文的撰写; 刘洪博、林秀琴和吴转娣协助实验取材以及 RNA 提取; 徐超华负责文献资料的收集与整理工作。

致谢

本研究由国家自然科学基金(31360359)项目资助; 感谢国家甘蔗种质资源圃提供实验材料。

参考文献

Bolduc N., and Hake S., 2009, The maize transcription factor

表 6 PCR 反应体系

Table 6 The PCR reaction system

成分	体积(μL)
Composition	Volume (μL)
灭菌去离子水	26
Sterilization deionized water	
10 倍全式金高保真酶缓冲液 II	5
10×Trans Taq HiFi Buffer II	
2.5 mmol/L 的 dNTP 混合物	4
2.5 mmol/L dNTPs mixture	
正向引物	2
<i>ScKn1</i> -43-F	
反向引物	2
<i>ScKn1</i> -1348-R	
模板	5
Template	
10 倍 GC 强化剂	5
10×GC Enhancer	
全式金高保真 DNA 聚合酶	1
Trans Taq HiFi DNA Polymerase	

- KNOTTED1 directly regulates the gibberellin catabolism gene *ga2ox1*, *The Plant Cell*, 21(6): 1647-1658
- Fu H.H., Xin P.Y., Xu Y.L., Liu Y., Wei Y.J., Dong J., Cao Y.L., and Zhou J., 2011, Bioinformatics analysis of *UFGT* gene from several economic plants, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 30(1): 92-102 (付海辉, 辛培尧, 许玉兰, 刘岩, 韦援教, 董娇, 曹有龙, 周军, 2011, 几种经济植物 *UFGT* 基因的生物信息学分析, *基因组学与应用生物学*, 30(1): 92-102)
- Fang J.P., Su Y.C., You Q., Que Y.X., Xu L.P., and Chen R.K., 2012, In silico cloning and bioinformatic analysis of β -1,3-glucanase gene (*ScBG*) from sugarcane (*Saccharum* spp.), *Shengwu Xinxixue (Chinese Journal of Bioinformatics)*, 10(3): 199-207 (方静平, 苏亚春, 游倩, 阙友雄, 许莉萍, 陈如凯, 2012, 甘蔗 β -1,3-葡聚糖酶基因的电子克隆与分析, *生物信息学*, 10(3): 199-207)
- Gill R.W., and Sanseau P., 2000, Rapid in silico cloning of genes using expressed sequence tags (ESTs), *Biotechnology Annual Review*, 5: 25-44
- Gong Y.Y., Guo S.Q., Shu H.M., He L.C., and Ni W.C., 2013, In silico cloning and bioinformatics analysis of aquaporin gene *GhNIP5.1* from upland cotton (*Gossypium hirsutum*), *Jiangsu Nongye Xuebao (Jiangsu Journal of Agricultural Sciences)*, 29(3): 682-684 (巩元勇, 郭书巧, 束红梅, 何林地, 倪万潮, 2013, 陆地棉 *GhNIP5.1* 基因的电子克隆及生物信息学分析, *江苏农业学报*, 29(3): 682-684)
- Hao A.P., and Wang T.T., 2014, In silico cloning and bioinformatic analysis of *SAMDC* gene in sorghum, *Xinan Nongye Xuebao (Southwest China Journal of Agricultural Sciences)*, 27(2): 507-511 (郝爱平, 王婷婷, 2014, 高粱 *SAMDC* 基因的电子克隆与生物信息学分析, *西南农业学报*, 27(2): 507-511)
- Hu H., and Xiao L.T., 2007, Application of bioinformatics in full-length cDNA sequence in silicon cloning of novel genes, *Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin)*, 4: 93-96 (胡铄, 萧浪涛, 2007, 生物信息学在新基因全长 cDNA 电子克隆中的应用, *生物技术通报*, 4: 93-96)
- Meng C.M., Ji J.H., Li X.L., and Shang J., 2014, Electronic clone and bioinformatics analysis of CPP transcription factor genes from wheat, *Shengwu Jishu (Biotechnology)*, 24(4): 39-42 (孟超敏, 姬俊华, 李雪林, 尚家, 2014, 小麦 CPP 转录因子基因的电子克隆及生物信息学分析, *生物技术*, 24(4): 39-42)
- Nagasaki H., Sakamoto T., Sato Y., and Matsuoka M., 2001, Functional analysis of the conserved domains of a rice KNOX homeodomain protein, OSH15, *The Plant Cell*, 13(9): 2085-2098
- Sakamoto T., Kamiya N., Ueguchi-Tanaka M., Iwahori S., and Matsuoka M., 2001, KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem, *Genes & Development*, 15(5): 581-590
- Sakamoto T., Sakakibara H., Kojima M., Yamamoto Y., Nagasaki H., Inukai Y., Sato, Y., and Matsuoka M., 2006, Ectopic expression of KNOTTED1-like homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis genes in rice, *Plant Physiology*, 142(1): 54-62
- Su Y.C., Li G.Y., Que Y.X., Guo J.L., Xu J.S., and Xu L.P., 2011, In silico cloning and characterization of chitinase gene from sugarcane using bioinformatics tools, *Shengwu Xinxixue (China Journal of Bioinformatics)*, 9(4): 322-330 (苏亚春, 李国印, 阙友雄, 郭晋隆, 徐景升, 许莉萍, 2011, 甘蔗几丁质酶基因的电子克隆与生物信息学分析, *生物信息学*, 9(4): 322-330)
- Tsuda K., Ito Y., Sato Y., and Kurata N., 2011, Positive autoregulation of a *KNOX* gene is essential for shoot apical meristem maintenance in rice, *The Plant Cell*, 23(12): 4368-4381
- Tsuda K., Kurata N., Ohyanagi H., and Hake S., 2014, Genome-wide study of KNOX regulatory network reveals brassinosteroid catabolic genes important for shoot meristem function in rice, *The Plant Cell*, 26(9): 3488-3500
- Wu A.Q., Wang J.S., Zhang Y.X., and Yin G.H., 2013, Analysis of electronic clone and bioinformatics on the cytochrome *P450* gene in wheat (*Triticum aestivum* L.), *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 29(18): 38-44 (武安泉, 王俊生, 张玉玺, 殷贵鸿, 2013, 小麦 *Cyp450* 基因的电子克隆与生物信息学分析, *中国农学通报*, 29(18): 38-44)
- Xu W.L., Pei X.L., Jing Z.G., and Xiong Z.L., 2014, Analysis of electronic clone and bioinformatics on the *actin* gene in pepper (*Capsicum annum* L.), *Jiangsu Nongye Kexue (Jiangsu Agricultural Sciences)*, 42(5): 46-48 (徐婉莉, 裴徐梨, 荆赞革, 熊自立, 2014, 辣椒 *actin* 基因电子克隆与生物信息学分析, *江苏农业科学*, 42(5): 46-48)
- Yuan X.L., Zhou J., Xin P.Y., Dong J., Meng F.X., and Fu H.H., 2013, Bioinformatics analysis of *CHI* genes in eight plant species, *Xinan Linye Daxue Xuebao (Journal of Southwest Forestry University)*, 33(2): 88-95 (原晓龙, 周军, 辛培尧, 董娇, 孟富宣, 付海辉, 2013, 8 种植物 *CHI* 基因的生物信息学分析, *西南林业大学学报*, 33(2): 88-95)
- Zhang W.X., Jiang Y.M., He W.X., Guo W.Y., Huang X.J., and Zheng S.Y., 2013, In silico cloning and expression analysis of *14-3-3* gene in *Ganoderma lucidum*, *Huabei Nongxuebao (Acta Agriculturae Boreali-Sinica)*, 28(5): 15-22 (章文贤, 蒋咏梅, 贺望兴, 郭文燕, 黄晓菊, 郑素云, 2013, 灵芝 *14-3-3* 蛋白基因的电子克隆与表达分析, *华北农学报*, 28(5): 15-22)