

DOI:10.11686/cyxb2017317

<http://cyxb.lzu.edu.cn>

汪王,田忠平,苏小霞,等.细叶百合 *LpAGD14* 基因的克隆与表达分析.草业学报,2018,27(2):117—123.

Wang W, Tian Z P, Su X X, et al. Cloning and expression analysis of *LpAGD14* from *Lilium pumilum*. Acta Prataculturae Sinica, 2018, 27(2): 117—123.

细叶百合 *LpAGD14* 基因的克隆与表达分析

汪王,田忠平,苏小霞,杨柳慧,周蕴薇*

(东北林业大学园林学院,黑龙江 哈尔滨 150000)

摘要:从细叶百合 cDNA 文库中克隆得到 *ArfGAP* 基因,该基因 ORF 序列编码 640 个氨基酸,具有一个典型的 C₄型 ArfGAP 保守结构域。蛋白相对分子量约为 69.43 kDa,理论等电点为 8.95,为亲水性蛋白,没有跨膜结构。氨基酸序列与油棕的 GTPase 同源性达到 59%,与芭蕉、海枣、石刁柏、凤梨的同源性都在 50% 以上,命名为 *LpAGD14*。qRT-PCR 分析 *LpAGD14* 表达量呈不断升高的趋势,其中休眠完全解除时基因表达量显著高于其他时期。亚细胞定位显示该基因定位在细胞膜上。超微结构观察发现随低温贮藏时间的延长高尔基体囊泡层数逐渐增多。这些结果表明 *LpAGD14* 可能通过影响囊泡运输参与细叶百合鳞茎休眠解除进程。该研究为深入了解该基因功能奠定了基础。

关键词:细叶百合;ArfGAP;克隆;表达

Cloning and expression analysis of *LpAGD14* from *Lilium pumilum*

WANG Wang, TIAN Zhong-ping, SU Xiao-xia, YANG Liu-hui, ZHOU Yun-wei*

College of Landscape Architecture, Northeast Forestry University, Harbin 150000, China

Abstract: A gene encoding an ArfGAP protein was cloned from the cDNA library of *Lilium pumilum*. Its ORF sequence encoded a 640-amino acid polypeptide with a typical C4 ArfGAP conserved domain. The relative molecular mass of the putative ArfGAP protein was 69.43 kDa, the theoretical isoelectric point was 8.95, and it was predicted to be a hydrophilic protein with no transmembrane structure. At the amino acid sequence level, the *L. pumilum* ArfGAP showed 59% homology to ArfGAP-domain proteins (AGDs) in *Elaeis guineensis*, and more than 50% homology to AGDs in *Musa acuminata* subsp., *Phoenix dactylifera*, and *Ananas comosus*. Therefore, the gene was named *LpAGD14*. Transcript analysis by qRT-PCR showed that the transcript levels of *LpAGD14* increased to reach the highest value after dormancy release. Subcellular localization assays showed that *LpAGD14* localized to the cell membrane. Ultrastructural observations showed that the layers of the Golgi body increased with prolonged cold storage. These results indicated that *LpAGD14* is involved in the dormancy release of *L. pumilum* and plays a role in vesicle transport. This study lays the foundation for further research on the function and regulation of this gene and its product.

Key words: *Lilium pumilum*; ArfGAP; cloning; expression

GTP 酶激活蛋白(GAPs)是一类调节蛋白质,是 ADP 核糖基化因子(ADP-ribosylation factor, Arf)基因功能的关键调节剂,能够与小 G 蛋白 α 亚基结合,激活 GTP 酶活性,促使 GTP 水解成 GDP,转变为非活化状

收稿日期:2017-07-24;改回日期:2017-10-18

基金项目:国家自然科学基金项目(31470698)资助。

作者简介:汪王(1993-),女,安徽安庆人,硕士。E-mail:1192763410@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail:dlzhyw@126.com

态^[1-2]。失活状态的 Arf 会结合到高尔基体上转变成活化态的 ArfGTP,与 ArfGAP 结合作用于 KDEL-跨膜受体,同时 ArfGAP 可以促使 ArfGTP 水解失活^[3-4]。与 ArlGTP(类 ArfGTPase)不同,ArfGAPs 不但能激活霍乱毒素还可以回复 Arf。有研究表明 ArfGAP 基因主要定位在高尔基体上,参与蛋白质在高尔基体和内质网间的转运,对蛋白的分类筛选起到促进作用,失活状态的 ARF1 的内源 GTP 酶会抑制高尔基体产生 α -淀粉酶和液泡蛋白的共表达^[5]。ArfGAPs 作为一种外壳蛋白参与囊泡的形成,是囊泡转运途径的重要组成部分^[6]。酵母细胞中 GCS1 和 GLO3(ArfGAP)缺失突变体破坏内质网和高尔基体间的囊泡运输,导致膜结构积累,进一步证实 ArfGAP 在囊泡运输中的重要作用^[7]。同时研究发现,在动物细胞中,ArfGAPs 参与物质跨膜运输过程^[8];此外,ArfGAPs 在激素信号转导、细胞分裂以及器官分裂等生物过程同样发挥重要作用^[9-10]。

关于 Arf 参与植物休眠解除进程仅在马铃薯(*Solanum tuberosum*)中有过报道^[11]。ArfGAP 同属于 Arf 家族成员,且是高尔基体囊泡的重要组成部分,通过介导物质转运 ArfGAP 是否也能参与植物休眠调控研究尚属空白。细叶百合(*Lilium pumilum*)地下鳞茎具有休眠特性,未解除休眠的鳞茎开花质量差甚至出现盲花现象。本研究从细叶百合鳞茎 cDNA 文库中克隆得到 *LpAGD14* 基因,分子生物手段和组织形态观察相结合,对阐明 *LpAGD14* 功能和作用机制具有重要意义,同时对采用基因工程解除植物休眠提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 细叶百合鳞茎取自东北林业大学园林学院苗圃。试验于 2014 年 10 月中旬选出完好无损伤的周径在 4~6 cm 的鳞茎,用水清洗干净,再用 50% 多菌灵可湿性粉剂 1000 倍液浸泡 30 min 后,清水漂洗干净,晾干。最后用消毒的蛭石(湿度以手握成团、放手散开为度)混合拌匀,装入塑料盆中,用保鲜膜封上(膜上打小孔以透气),置于 4 ℃ 冰箱中冷藏处理。低温处理阶段,以处理第 0、30、60、90 天样品分别标记为 S₁、S₂、S₃、S₄ 时期,提取 RNA,并合成 cDNA 文库。

1.1.2 主要试剂和药品 胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自于天根生化科技(北京)有限公司;荧光定量反转录试剂盒和高保真酶 KOD-Plus-Neo 购自 TOYOBO,克隆基因反转录试剂盒购自 Takara,T 载体 PMD18-T 购自全式金公司,内切酶 Kpn I 和 Spe I 购自 NEB。

1.2 试验方法

1.2.1 细叶百合总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成 采用改良的 CTAB 法提取细叶百合鳞茎总 RNA^[12],采用 PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(Takara)反转录 cDNA,具体做法是 Oligo dT Primer (1 μ L)+dNTP (1 μ L)+RNA (1 μ L),补水至 10 μ L,65 ℃ 保温 5 min,迅速冷却,上述体系加 5×PrimeScrip II Buffer (4 μ L)+RNase Inhibitor (0.5 μ L)+PrimeScrip II Rtase (1 μ L),补水至 20 μ L,经 42 ℃ 45 min;95 ℃ 5 min 后迅速冷却,即得到 cDNA 模板。

1.2.2 *LpAGD14* 基因的克隆和序列分析 根据已获得的该基因最大开放阅读框(ORF)序列设计特异性上下游引物 *LpAGD14-F*: ATGGCGAACATGGATGAAGGA 和 *LpAGD14-R*: AGCAAACCCC TTTGGGAAGA。进行 PCR 扩增,转化大肠杆菌,随机挑取阳性克隆,以 M13R 为测序引物进行测序。将获得的序列采用 Clustalx 1.83 软件与已知的 ORF 序列进行比对,NCBI 在线软件 BlastX 进行同源比对。利用 MEGA 5.0 构建系统进化树;在线分析工具 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 Pfam (Protein family: <http://pfam.sanger.ac.uk/>) 用于蛋白质保守结构域的分析;用 Expasy (www.expasy.org) 预测氨基酸相关理化性质。利用 TM-HMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 对蛋白质的跨膜结构域进行预测,利用 SOPMA 对蛋白质二级结构进行预测。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 分析基因表达模式 以 *lilyActin*^[13](GenBank 登录号:JX826390)基因作为内参基因,ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO,Japan)反转录低温贮藏 4 个时期总 RNA (500 ng),所得 cDNA 稀释 5 倍作为荧光定量模板。荧光染料采用 SYBR Green (TOYOBO,Japan),在 Roche LightCycler96 上进行如下反应:预变性(95 ℃ for 30 s);3 步法(95 ℃ for 5 s;60 ℃ for 15 s;72 ℃ for 30 s;45 cycles);溶解(95

℃ for 10 s; 65 ℃ for 60 s; 97 ℃ for 1 s); 冷却(37 ℃ for 30 s), 每组 3 个重复, 以 S₁ 时期表达量为对照, *LpAGD14* 的相对表达量计算参考 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ^[14]。

1.2.4 亚细胞定位分析基因表达位点 对测序正确的 *LpAGD14* 质粒稀释 100 倍作为模板, 设计添加酶切位点 Kpn I (NEB) 和 Spe I (NEB) 的特异性引物: *LpAGD14-F*: 5'-GGTAC V CATGGCGAATCGGATGAAG-3' 和 *LpAGD14-R*: 5'-A V CTAGTCCCAAAGGGTTCTCC-3' 进行 PCR 扩增反应, 对加上酶切位点的质粒与带有 GFP 绿色荧光蛋白报告基因的 pBI121-MCS-GFP 载体分别经 Kpn I + Spe I 双酶切, 酶切体系为: PMD18-T-*LpAGD14* / pBI121-MCS-GFP (8 μL) + Kpn I (1 μL) + Spe I (1 μL) + CutSmart Buffer (2 μL) + ddH₂O (8 μL), 37 ℃ 酶切 20 min, 1% 琼脂糖凝胶电泳回收后 T₄ 连接过夜, 构建 pBI121-*LpAGD14*-GFP 植物表达载体, 经鉴定后, 以 pBI121-MCS-GFP 为对照, 参考刘锴栋等^[15] 的基因枪法转化洋葱 (*Allium cepa*) 表皮细胞, 经过 24 h 的暗培养, 共聚焦显微镜观察基因瞬时表达。

1.2.5 透射电子显微镜观察高尔基体超微结构 取冷藏处理 4 个时期的细叶百合鳞茎, 通过固定、冲洗、脱水、渗透、包埋、切片、染色等步骤, 电镜样品的制备具体参考刘芳等^[16] 的方法, H-7650 透射电子显微镜下观察不同时期高尔基体形态变化。

2 结果与分析

2.1 细叶百合基因 *LpAGD14* 的克隆及序列特征分析

采用改良 CTAB 法提取 RNA, 所得 RNA 28S 条带亮度大约为 18S 两倍, D_{260}/D_{280} 介于 1.8~2.0 间, RNA 效果较好, 可用于后续实验。以提取总 RNA 反转录合成的第一链 cDNA 为模板, 获得目的基因扩增片段, 获得的拼接结果与已知 ORF 序列比对, 完全吻合。生物信息学分析表明, 该编码区大小为 1923 bp, 预测编码一个含有 640 个氨基酸的蛋白。具有 ArfGAP 保守结构域(图 1), 该结构域位于氨基酸序列的第 12~130 位, 由 119 个氨基酸组成, 属于 Arf 基因家族, 是一种 GTPase。

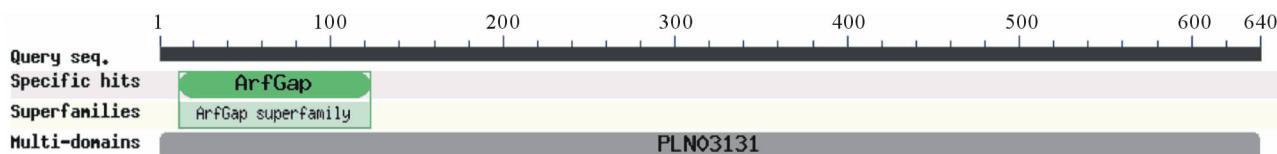


图 1 *LpAGD14* 的保守结构域预测

Fig. 1 The conserved domain prediction of *LpAGD14*

2.2 *LpAGD14* 基因氨基酸理化性质与结构预测分析

对基因编码的氨基酸序列的组成成分和理化性质分析结果表明, 该蛋白的分子量约为 69.43 kDa, 理论等电点为 8.95, 氨基酸的亲水指数为 -0.733(正值: 疏水; 负值: 亲水), 说明该蛋白为亲水性蛋白。跨膜结构域进行预测显示该蛋白的氨基酸肽链位于膜外, 推测其可能不存在跨膜结构域, 属于非跨膜类蛋白。*LpAGD14* 基因编码的蛋白质二级结构含有丰富的无规则卷曲和 α-螺旋, 其次为延伸链和 β-卷角。

2.3 *LpAGD14* 基因氨基酸同源性分析

氨基酸同源性比对结果显示该氨基酸序列与油棕 (*Elaeis guineensis*)、芭蕉 (*Musa acuminata* subsp *Malaccensis*)、海枣 (*Phoenix dactylifera*)、凤梨 (*Ananas comosus*) 等多种植物的 GTP 激活蛋白 AGD14 具有较高的同源性, 都含典型的 C₄ 型锌指结构, 有 4 个固定的半胱氨酸 (cysteine), 即 CX2CX16CX2C 结构域, 分析其与不同物种的 GTP 激活蛋白 AGD14 进化关系(图 2), 其中与油棕 (XP_010934816) GTP 激活蛋白 AGD14 同源性达到 59%, 与其他植物的同源性均在 40% 以上, 因此, 将该细叶百合 GTP 酶激活蛋白命名为 *LpAGD14*(登录号: KY434115)。

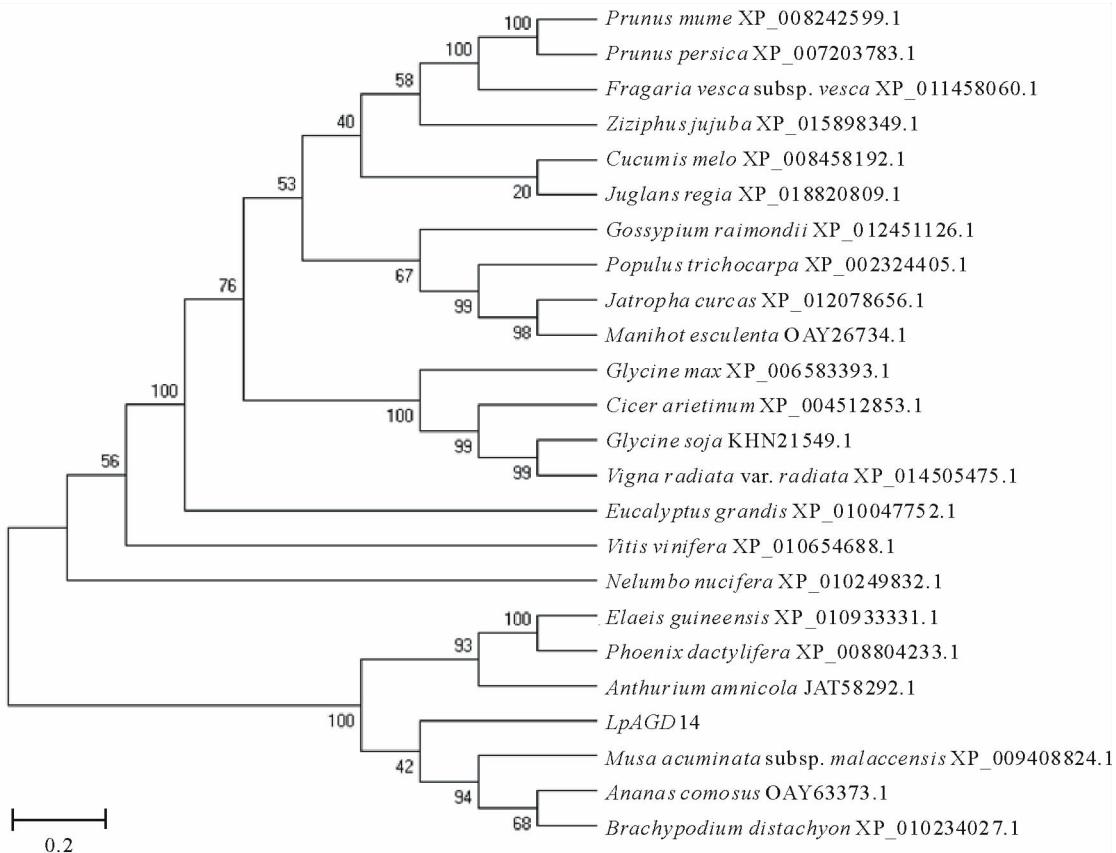


图 2 细叶百合及其他植物 AGD14 基因的氨基酸序列系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of AGD14 of lily and other plants

2.4 *LpAGD14* 基因表达模式分析

以百合肌动蛋白基因 *lilyActin*^[13] 为内参基因,采用 qRT-PCR 法对细叶百合鳞茎低温贮藏 0 d(S₁)、30 d(S₂)、60 d(S₃)、90 d(S₄) 鳞茎的 *LpAGD14* 基因相对表达量进行分析(图 3),结果表明, *LpAGD14* 基因相对表达量在 S₂ 时期较前一时期增长 3 倍, 在 S₃ 时期较前一时期增长 2 倍, 在 S₄ 时期较前一时期增长 6 倍, 差异表达显著。

2.5 *LpAGD14* 基因亚细胞定位分析

共聚集显微镜观察发现,空载体质粒打入洋葱表皮后,绿色荧光分布于整个细胞中(图 4A),而重组融合载体 pBI121-*LpAGD14*-GFP 质粒打入洋葱表皮后,在细胞核和细胞膜中均有较为明显的绿色荧光,并且能同时检测到多个洋葱表皮细胞中出现绿色荧光(图 4B),说明 pBI121-*LpAGD14*-GFP 融合亚细胞表达载体定位在细胞膜上。

2.6 透射电子显微镜观察高尔基体超微结构

高尔基体结构在低温贮藏不同时期具有较为明显的变化(图 5)。在 S₁ 时期, 高尔基体数量较少, 分泌囊泡数量不多, 基本分布为 1~3 层, 到 S₂ 时期, 可见高尔基体上分布 3~5 层扁平囊泡, 随低温贮藏时间的延长, 在 S₃

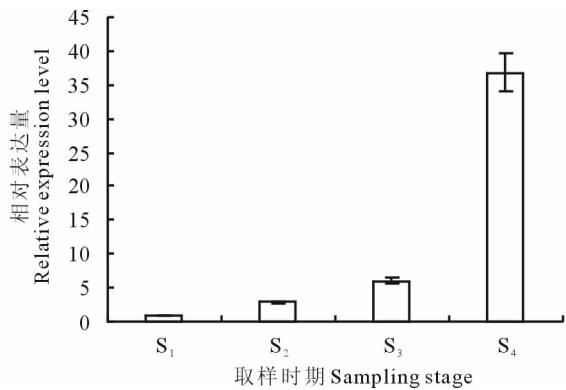


图 3 *LpAGD14* 基因在细叶百合鳞茎

不同休眠时期的相对表达

Fig. 3 The relative expression of *LpAGD14* gene in different dormancy stages of *Lilium pumilum*

时期高尔基体结构更为复杂,囊泡层数继续增多,可以观察到 6~7 层囊泡,并在 S₄ 时期进一步增长到 8~10 层,此时期正与鳞茎休眠解除相对应。

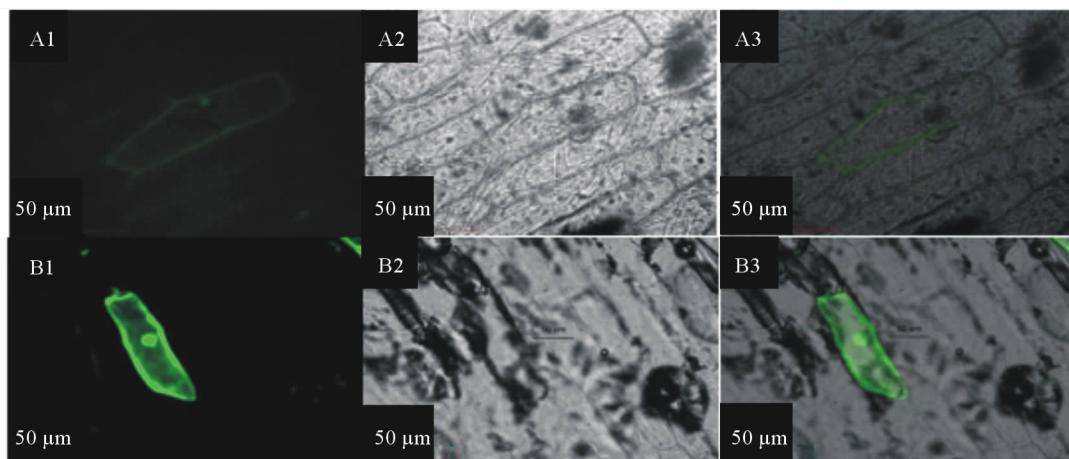


图 4 *LpAGD14* 基因在洋葱表皮细胞中的瞬时表达

Fig. 4 Transient expression of *LpAGD14* gene in onion

A1, A2, A3: 瞬时表达 pBI121-MCS-GPF 的洋葱表皮细胞作为对照, 分别为荧光、白光和重叠视野。B1, B2, B3: 瞬时表达 pBI121-*LpAGD14*-GFP 的洋葱表皮细胞, 分别为荧光、白光和重叠视野。A1, A2, A3: Transiently expressed pBI121-MCS-GPF in onion epidermal cells, fluorescent, bright and vision. B1, B2, B3: Transiently expressed pBI121-*LpAGD14*-GFP in onion epidermal cells, fluorescent, bright and vision.

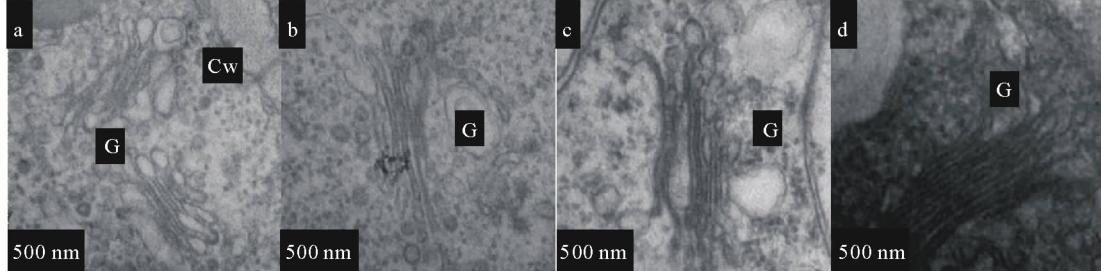


图 5 低温贮藏时期细叶百合鳞茎高尔基体超微结构的观察

Fig. 5 Golgi bodies ultrastructure observation of *Lilium pumilum* during cold storage

a, b, c 和 d 分别代表低温贮藏 0、30、60、90 d 高尔基体超微结构。Cw: 细胞壁; G: 高尔基体。a, b, c and d represent Golgi bodies ultrastructure during cold storage of 0, 30, 60 and 90 days, respectively. Cw: Cell wall; G: Golgi body.

3 讨论

有研究表明,抑制马铃薯(*Solanum tuberosum*)Arf 基因的表达会导致植物表型及碳水化合物含量发生变化^[17],而淀粉及可溶性糖和相关酶活性的变化,能够进一步影响百合鳞茎所处的休眠状态^[18~19],推测 Arf 基因可能间接参与休眠进程的调控。Liu 等^[11]从马铃薯中克隆得到 Arf 基因,荧光定量分析发现,Arf 基因表达量在马铃薯块茎休眠解除后期显著增长,Arf 基因积极参与马铃薯块茎休眠解除进程。*LpAGD14* 属于 Arf 家族下的 ArfGAP 亚家族成员,在低温解除细叶百合鳞茎休眠期间,其表达量显著增长,*LpAGD14* 基因的上调表达与鳞茎的休眠解除进程相对应。前人发现,ArfGAPs 参与构成细胞内吞系统^[20],作为一种主要定位在高尔基体上的外壳蛋白,参与囊泡的形成,是囊泡转运途径的重要组成部分^[5~6]。小 G 蛋白中 Arf GAP1, Arf GAP2 和 Arf GAP3 对囊泡的形成具有重要作用^[21~24],通过膜包裹、形成囊泡、与膜融合或断裂的囊泡转运过程,Arf-GAPs 能影响细胞间的物质交流,以此调控植物生物进程^[25]。此外,高尔基体囊泡被认为与内质网物理相连^[26],

两者构成细胞重要的内膜系统,参与物质转运。通过超微结构观察,在低温贮藏初期,高尔基体囊泡层数较少,仅可看到1~3层,而在低温贮藏后期,高尔基体囊泡层数显著增多,结构更为复杂,可看到8~10层囊泡层数,此时鳞茎已解除休眠状态,且*LpAGD14*基因的相对表达量增长到最大值。分子生物分析结合组织形态观察可以发现,低温贮藏期间,功能基因差异表达与囊泡层数变化存在内在联系,推测克隆得到的*LpAGD14*基因可能通过影响囊泡形成,从而影响物质转运过程,对百合鳞茎休眠与解除产生影响。

4 结论

在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和水稻(*Oryza sativa*)中,已确认几种具有ArfGAP活性的蛋白质,但大部分ArfGAP基因在植物中的具体功能研究报道较少,尤其是对植物休眠的研究上仅在马铃薯中有过报道^[11]。高尔基体小囊泡是物质转运的重要载体,对细叶百合*LpAGD14*基因的克隆与分析,及进一步研究其对细胞体内物质运输作用机制和对休眠的调控作用奠定了基础。

参考文献 References:

- [1] Gillingham A K, Munro S. The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2007, 23(23): 579—611.
- [2] Tanabe K, Torii T, Natsume W, et al. A novel GTPase-activating protein for ARF6 directly interacts with clathrin and regulates clathrin-dependent endocytosis. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(4): 1617—1628.
- [3] Lanoix J, Ouwendijk J, Lin C, et al. GTP hydrolysis by arf-1 mediates sorting and concentration of Golgi resident enzymes into functional COP I vesicles. *EMBO Journal*, 1999, 18(18): 4935—4948.
- [4] Moss J, Vaughan M. Molecules in the ARF orbit. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(34): 21431—20434.
- [5] Pimpl P, Hanton S L, Taylor J P, et al. The GTPase ARF1p controls the sequence-specific vacuolar sorting route to the lytic-vacuole. *Plant Cell*, 2003, 15: 1242—1256.
- [6] Moss J, Vaughan M. Structure and function of ARF proteins: activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(21): 12327—12330.
- [7] Poon P P, Cassel D, Huber I, et al. Expression, analysis, and properties of yeast ADP-ribosylation factor (ARF) GTPase activating proteins (GAPs) Gcs1 and Glo3. *Methods Enzymol*, 2001, 329: 317—324.
- [8] Yahara N, Sato K, Nakano A. The Arf1p GTPase-activating protein Glo3p executes its regulatory function through a conserved repeat motif at its C-terminus. *Journal of Cell Science*, 2006, 119(12): 2604—2612.
- [9] Zhuang X L, Jiang J F, Li J H, et al. Over-expression of OsAGAP, an ARF—GAP, interferes with auxin influx, vesicle trafficking and root development. *Plant Journal*, 2006, 48(4): 581—591.
- [10] Liljegren S J, Leslie M E, Darnielle L, et al. Regulation of membrane trafficking and organ separation by the nevershed ARF—GAP protein. *Development*, 2009, 136(11): 1909—1918.
- [11] Liu B L, Zhang N, Wen Y K, et al. Identification of differentially expressed genes in potato associated with tuber dormancy release. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(12): 11277—11287.
- [12] Du Y P, Li S, He H B, et al. Comparative of methods for RNA extraction from Lily bulb scales. *Molecular Plant Breeding*, 2010, 8(4): 832—836.
- 杜运鹏, 李双, 何恒斌, 等. 百合鳞片总RNA提取方法的比较. *分子植物育种*, 2010, 8(4): 832—836.
- [13] Feng D L, Lai Y, He S L. Cloning, characterization and expression of an ArfGAP gene from pepper (*Capsicum annuum* L.). *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(34): 184—189.
- 冯冬林, 赖燕, 何水林. 辣椒ArfGAP基因的克隆与表达分析. *中国农学通报*, 2012, 28(34): 184—189.
- [14] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402—408.
- [15] Liu K D, Li H L, Zhong S T, et al. Cloning, subcellular localization and expression analysis of AsAG from sugar apple (*Annona spumosa* L.). *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(1): 142—154.
- 刘锴栋, 黎海利, 钟舒婷, 等. 番荔枝花器官发育基因AsAG的克隆, 亚细胞定位及表达分析. *中国农业科学*, 2016, 49(1): 142—154.
- [16] Liu F, Wang J Y, Wang X L, et al. The apical bud cell ultra-structure changes of *Lilium pumilum* bulbs during breaking dormancy under refrigerated condition. *Acta Horticulturae Sinica*, 2013, 40(6): 1110—1118.
- 刘芳, 王家艳, 王晓丽, 等. 细叶百合鳞茎在低温解除休眠过程中茎尖细胞超微结构的变化. *园艺学报*, 2013, 40(6):

1110—1118.

- [17] Zuk M, Prescha A, Keüpaczynski J, et al. ADP ribosylation factor regulates metabolism and antioxidant capacity of transgenic potato tuber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51: 288—294.
- [18] Sun H M, Li T L, Li Y F. Starch metabolism and sprouting of bulb in *Lilium davidii* var. *unicolor* stored at different cold temperatures. *Acta Horticulturae Sinica*, 2004, 31(3): 337—342.
- 孙红梅, 李天来, 李云飞. 不同贮藏温度下兰州百合种球淀粉代谢与萌发关系初探. *园艺学报*, 2004, 31(3): 337—342.
- [19] Liu F, Li D D, Lian H, et al. Relationship between dormancy breaking and protective enzymes in refrigerated *Lilium pumilum* bulbs. *Acta Prataculturae Sinica*, 2015, 24(12): 180—187.
- 刘芳, 李丹丹, 廉华, 等. 细叶百合冷藏过程中鳞茎保护酶活性与休眠解除的关系. *草业学报*, 2015, 24(12): 180—187.
- [20] Chen P W, Jian X, Luo R, et al. Simple *in vitro* assay of Arf GAPs and preparation of Arf proteins as substrates. *Methods in Cell Biology*, 2015, 30: 69—80.
- [21] Kartberg F, Asp L, Dejgaard S Y, et al. ARFGAP2 and ARFGAP3 are essential for COPI coat assembly on the Golgi membrane of living cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(47): 36709—36720.
- [22] Oix J, Ouwendijk J, Stark A, et al. Sorting of Golgi resident proteins into different subpopulations of COPI vesicles: a role for ArfGAP1. *Journal of Cell Biology*, 2001, 155(7): 1199—1212.
- [23] Ismail S A, Vetter I R, Sot B, et al. The structure of an Arf-ArfGAP complex reveals a Ca^{2+} regulatory mechanism. *Cell*, 2010, 141(5): 812—821.
- [24] Spang A, Shiba Y, Randazzo P A. ArfGAPs: gatekeepers of vesicle generation. *FEBS Letters*, 2010, 584(12): 2646—2651.
- [25] Dodonova S O, Diestelkoetter-Bachert P, von Appen A, et al. A structure of the COPI coat and the role of coat proteins in membrane vesicle assembly. *Science*, 2015, 349(6244): 195—198.
- [26] Sparkes I A, Ketelaar T, De Ruijter N C A, et al. Grab a Golgi: laser trapping of Golgi bodies reveals *in vivo* interactions with the endoplasmic reticulum. *Traffic*, 2009, 10(5): 567—571.