

忽地笑 α -葡萄糖苷酶 2 编码基因的分子克隆与原核表达

李宜奎, 李洁, 程丽, 钱彬彬, 汪仁* (江苏省中国科学院植物研究所, 江苏南京 210014)

摘要 [目的]克隆忽地笑 [*Lycoris aurea* (L' Hér.) Herb.] α -葡萄糖苷酶 2 编码基因。[方法]基于忽地笑的转录组数据库,分析功能注释为 α -葡萄糖苷酶 2 的基因片段,通过设计特异性定量 PCR 扩增引物分析其在各组织中的表达丰度,利用 RACE (rapid-amplification of cDNA ends) 技术从高丰度组织中克隆获得忽地笑 α -葡萄糖苷酶 2 编码基因。[结果]忽地笑 α -葡萄糖苷酶 2 编码基因 *LauAgl2* cDNA 全长 3 185 bp, 开放阅读框为 2 961 bp, 编码含有 986 个氨基酸残基的 *LauAgl2* 蛋白质。*LauAgl2* 蛋白质氨基酸序列具有 α -葡萄糖苷酶 II 特征性的保守结构域和天冬氨酸残基组成的活性中心, 还具有一些蛋白质糖基化的潜在位点 (N-X-S/T 共有序列)。*LauAgl2* 蛋白质与油棕、陆地棉等其他植物的 α -葡萄糖苷酶 2 的氨基酸序列一致性为 73.0% 以上。利用 pET 表达系统,可以在大肠杆菌中实现 *LauAgl2* 蛋白质的诱导表达。[结论]成功从忽地笑花萼和花瓣中克隆到 α -葡萄糖苷酶 2 编码基因 *LauAgl2* 并在大肠杆菌中对 *LauAgl2* 进行了异源表达,为 *LauAgl2* 蛋白质的功能鉴定及其在忽地笑种子萌发与生长发育中的作用研究奠定了基础。

关键词 忽地笑; α -葡萄糖苷酶 2; 分子克隆; 原核表达

中图分类号 S 188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)36-0078-05

Molecular Cloning and Heterogenous Expression of α -Glucosidase 2 from *Lycoris aurea*

LI Yi-kui, LI Jie, CHENG Li et al (Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014)

Abstract [Objective] The gene encoding α -glucosidase 2 was to be cloned from *Lycoris aurea* (L' Hér.) Herb. [Method] Based on the transcriptomic data of *L. aurea*, the abundance of contigs annotated as α -glucosidase 2 was analyzed in different tissues by qRT-PCR, and then the α -glucosidase 2 encoding gene was cloned with the cDNA from the tissue with high gene abundance as the template via RACE technology. [Results] The full-length cDNA of *LauAgl2* is 3 185 bp with a 2 961 bp open reading frame, encoding a deduced polypeptide of 986 amino acids. *LauAgl2* protein contains the active center with aspartate and the conserved domains of α -glucosidase II, and some N-X-S/T motifs for possible glycosylation. The amino acid sequence of *LauAgl2* protein shares more than 73.0% identity with α -glucosidase 2 from *Elaeis guineensis* Jacq., *Gossypium hirsutum* Linn. and other plants. *LauAgl2* protein was successfully expressed in *Escherichia coli* on the pET expression system. [Conclusion] The *LauAgl2* gene encoding α -glucosidase 2 was cloned from the scape and the petal of *L. aurea*. In this study, molecular cloning and prokaryotic expression of *LauAgl2* protein were investigated to facilitate further research in functional characterization and identifying the role in the seed germination, growth and development of *L. aurea*.

Key words *Lycoris aurea*; α -Glucosidase 2; Molecular cloning; Prokaryotic expression

α -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.20) 在植物种子萌发过程中具有重要的生理作用。 α -葡萄糖苷酶参与植物种子萌发过程中淀粉的水解,产生为胚芽生长提供能量的物质^[1]。在这过程中, α -葡萄糖苷酶作用于淀粉水解产生的麦芽糖及麦芽寡糖,生成游离的葡萄糖^[2-3]。植物 α -葡萄糖苷酶活性的降低会影响种子萌发过程中淀粉代谢,导致麦芽糖积累,阻止种子萌发^[4]。拟南芥 α -葡萄糖苷酶的缺失影响了细胞内纤维素合成酶机器中的部分 N-糖蛋白的功能性糖基化修饰,使得细胞壁中主要结构组分——纤维素严重下降,从而导致早期胚胎径向膨胀,影响拟南芥早期胚胎的形态发生^[5]。因此,克隆 α -葡萄糖苷酶编码基因并进行深入研究对阐明其在植物种子萌发过程中的生理作用及其调控机制具有重要意义。

忽地笑 [*Lycoris aurea* (L' Hér.) Herb.] 是石蒜科石蒜属多年生草本球根药用植物,富含加兰他敏、石蒜碱等石蒜科植物所特有的一类生物碱^[6]。加兰他敏是唯一在临床上得到应用的石蒜科生物碱,作为一种长效的、选择性的、可逆的、竞争性的乙酰胆碱酯酶抑制剂^[7],其在临床上用于治疗老年痴呆症^[8]。忽地笑不仅通过鳞茎进行无性繁殖,而且可

以通过种子进行有性生殖,是加兰他敏工业生产的良好原料^[9]。基于忽地笑的转录组数据库^[10],笔者从中筛选出 α -葡萄糖苷酶候选基因片段,利用 RACE 方法克隆到了忽地笑 α -葡萄糖苷酶 2 编码基因,并对其进行了生物信息学分析和原核表达分析等研究,为理解 α -葡萄糖苷酶 2 在忽地笑种子的萌发、生长与发育过程中的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料 该研究所用忽地笑植株采自江苏省中国科学院植物研究所药用植物种质资源圃(库)。大肠杆菌 TOP10 和 BL21 (DE3) 分别用于基因克隆和原核表达,为笔者所在实验室保存;原核表达载体 pET28a 购自 Novagen 公司; pMD19-T、T₄ DNA ligase、PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 反转录试剂盒和限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司; SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司; *Taq* DNA 聚合酶、高保真 Phanta[®] Super-Fidelity DNA 聚合酶、一步法克隆试剂盒 One-Step Cloning Kit、染料法荧光定量 PCR 试剂盒 AceQ[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix 和 Trizol 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; AxyPrepTM DNA Gel Extraction kit 和 AxyPrepTM Plasmid Miniprep kit 购自 AXYGEN 公司。引物合成和测序服务由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。

1.2 RNA 的提取 称取忽地笑组织约 0.1 g,于液氮中充分研磨,具体参照钱彬彬等^[11]的方法提取 RNA 以及检测 RNA 的纯度与完整性。

基金项目 国家自然科学基金项目(31572151);江苏省自然科学基金项目(BK20160599);江苏省植物资源研究与利用重点实验室基金项目(JSPKLB201505)。

作者简介 李宜奎(1983—),男,山东日照人,助理研究员,博士,从事分子生物学与合成生物学研究。*通讯作者,研究员,博士,从事天然产物生物合成与代谢调控研究。

收稿日期 2018-08-09;修回日期 2018-08-28

1.3 组织中基因丰度分析 称取花期忽地笑的根、花柱、花萼、花苞、子房、花瓣和雄蕊及盛叶期忽地笑的叶片,液氮速冻后提取忽地笑不同组织的 RNA,然后利用反转录酶获得忽地笑不同组织的 cDNA;利用忽地笑内参基因 *TIP41*^[12] 和 α -葡萄糖苷酶候选基因 *CL6740* 的特异性引物(表 1),以各组

织 cDNA 为模板,进行实时定量 PCR。PCR 程序为 95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 15 s,56 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 20 s,共 40 个循环。每个样品均进行 3 次重复试验。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算忽地笑不同组织中 α -葡萄糖苷酶候选基因的丰度。

表 1 忽地笑 α -葡萄糖苷酶 2 编码基因克隆及表达分析所采用的引物序列

Table 1 Primers used for gene cloning and expression analysis of *Lycoris aurea* α -glucosidase 2

引物 Primer	序列(5'—3') Sequence (5'—3')	用途 Application
<i>LauAgl2</i> -5RACE-PR1	CGTGA AAAATCCGCTTCCTGTGCC	5'-RACE
<i>LauAgl2</i> -5RACE-PR2	CTTTTAATCCAGGGTCAAGCATCC	5'-RACE
<i>LauAgl2</i> -3RACE-PF1	CGAGCAATATACAGTTGTTGAGAGG	3'-RACE
<i>LauAgl2</i> -3RACE-PF2	AACAGAAGGATCATGGAAGAGGC	3'-RACE
<i>LauAgl2</i> -ORF-PF	CGGCTACGAAAATGGTGGAGAA	克隆开放阅读框
<i>LauAgl2</i> -ORF-PR	GATAGGCAACAAGATCACATAATGGAC	克隆开放阅读框
pET28a- <i>LauAgl2</i> -PF	<u>CCTGCTGCCCGCCGCGCAGCCATATGTTGGAGAATTCGAGGAGTAGCAGTG</u>	原核表达
pET28a- <i>LauAgl2</i> -PR	<u>ACTGGTGTGGTGGTGGTCTCGAGTTATGAAAGATGTTCCACTTCATATTC</u>	原核表达
RT- <i>LauAgl2</i> -PF	GGTAAACCGTTTCTACTTGAATCAGG	实时定量
RT- <i>LauAgl2</i> -PR	GATAGGCAACAAGATCACATAATGGAC	实时定量
<i>LauTIP41</i> -PF	GCAACCATCCAAAGTTTAACTGCT	实时定量
<i>LauTIP41</i> -PR	AATGTGCAAGCAGGGCTACTAA	实时定量

注:带下划线的序列为与线性化质粒的同源臂,用于基因组装

Note:The underlined sequences were the homologous arms to the linear vector for gene assembly via one step cloning

1.4 全长 cDNA 的克隆 基于忽地笑的转录组数据库^[10],选择功能注释为 α -葡萄糖苷酶 2 的基因片段,设计该片段的克隆引物以及 5'端和 3'端的 RACE (rapid-amplification of cDNA ends)引物(表 1)。RACE 扩增程序为 95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 45 s,56 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 120 s,共 30 个循环;72 °C 充分延伸 10 min。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测并用胶回收试剂盒回收;回收片段连接 pMD19-T 载体,并转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞;菌落 PCR 验证后,挑取阳性克隆子测序。

根据片段间的重叠区域拼接基因序列,获得全长 cDNA 序列;利用在线软件 ORFfinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 预测开放阅读框(open reading frame, ORF),根据 ORF 序列设计引物 *LauAgl2*-ORF-PF 和 *LauAgl2*-ORF-PR(表 1)扩增 *LauAgl2* 的编码区。目标 PCR 扩增产物通过切胶回收,连接克隆载体 pMD19-T,转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞;经菌落 PCR 验证后,挑取阳性克隆子测序,保存测序正确的重组菌株并提取质粒,获得重组质粒 pMD-*LauAgl2*。

1.5 生物信息学分析 利用在线程序 BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对分析氨基酸序列;利用 BioEdit 软件^[13]和 ClustalW 程序分别进行氨基酸序列的联立与比对分析;利用 PROSITE (<http://prosite.expasy.org>) 数据库对 *LauAgl* 蛋白进行功能结构预测;利用 Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>) 分析氨基酸序列的信号肽及糖基化位点^[14]。

1.6 *LauAgl2* 的原核表达及 SDS-PAGE 电泳检测 质粒 pET28a 利用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 进行双酶切;利用引物对 pET28a-*LauAgl2*-PF 和 pET28a-*LauAgl2*-PR(表 1)扩增获得 *LauAgl2* 的编码序列(*LauAgl2*);利用 One Step Cloning Kit 将 *LauAgl2* 组装到 pET28a 质粒的 *Nde* I 与 *Xho* I 位点之

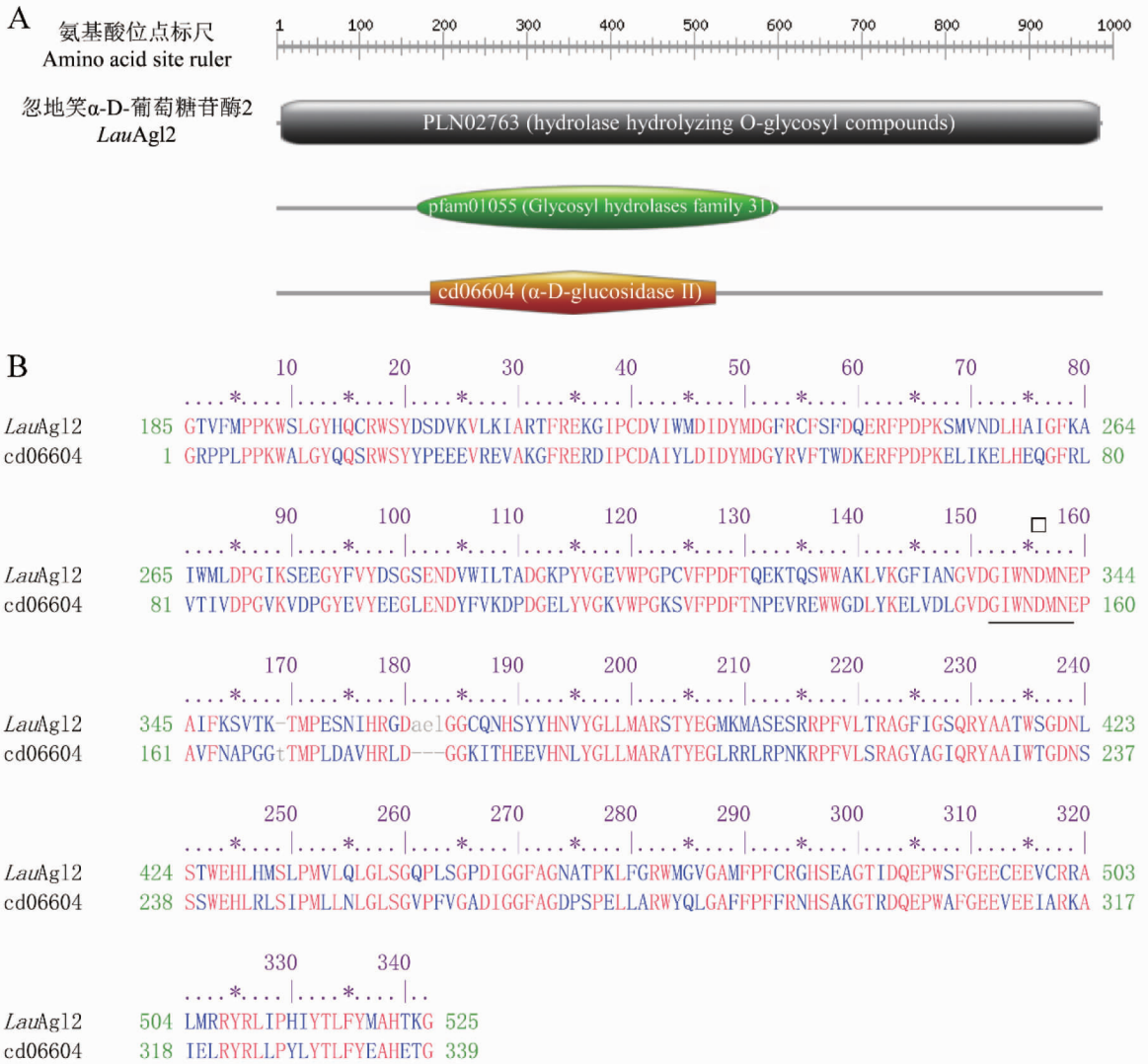
间,获得 pET28a-*LauAgl2*,经测序正确后提取质粒并连回空载体 pET28a 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中,挑取阳性克隆子进行原核表达分析。

将构建的重组菌株接种于 3 mL LB 液体培养基中,过夜培养,然后按 1%的接种量将菌液转接入 50 mL LB 液体培养基中,于 37 °C、200 r/min 培养至 A_{600} 达 0.6~0.8,吸取菌液 1 mL,并加入终浓度 0.1 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)进行诱导表达 24 h;菌液于 12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 200 μ L 无菌水重悬菌体,加入 50 μ L 5 \times SDS 上样缓冲液,沸水浴 10 min,室温下 12 000 r/min 离心 10 min;取 20 μ L 上清液进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分析。

2 结果与分析

2.1 α -葡萄糖苷酶 2 候选基因在忽地笑不同组织中的丰度 基于忽地笑的转录组数据库^[10],根据注释为 α -葡萄糖苷酶 2 的基因片段 *CL6740* 序列设计特异性定量 PCR 扩增引物,以忽地笑 *TIP41* 基因为内参基因^[12],采用实时定量 PCR 的方法分析 α -葡萄糖苷酶候选基因在忽地笑不同组织中的丰度(图 1)。*CL6740* 基因片段在忽地笑的鳞茎、根、叶、花柱、花萼、花苞、子房、花瓣和雄蕊中均有表达,且在花萼和花瓣中的丰度较高,在雄蕊中的丰度次之,其余组织中的丰度相对较低。这说明 *CL6740* 基因片段在忽地笑中的表达具有一定的组织特异性。

2.2 忽地笑 α -葡萄糖苷酶 2 编码基因的克隆 以忽地笑花萼和花瓣组织的 cDNA 为模板,利用 PCR 技术扩增获得了 *CL6740* 片段及其 5'端和 3'端,通过拼接测序结果,得到 1 条长度为 3 185 bp 的全长 cDNA 序列,包含一个 2 961 bp 的开放阅读框,编码一个包含 986 个氨基酸残基的蛋白质(图 2)。进一步通过 BLASTp 分析发现,编码的蛋白质属于糖苷水解酶 31 家族,含有 α -葡萄糖苷酶 II 特征性的保守结构域(图 3A),而且具有 α -葡萄糖苷酶的保守基序(图 3B),所以将该



注:方形所示氨基酸为预测的活性位点;下划线所示氨基酸序列为 α -葡萄糖苷酶II的保守基序

Note: The square and the underline indicated conserved activity site and motif of α -glucosidase II respectively

图3 忽地笑 *LauAgl2* 编码的氨基酸序列的结构域(A)与功能分析(B)

Fig.3 Conserved domain (A) and functional analysis (B) of the amino acid sequence encoded by *LauAgl2* gene from *Lycoris aurea*

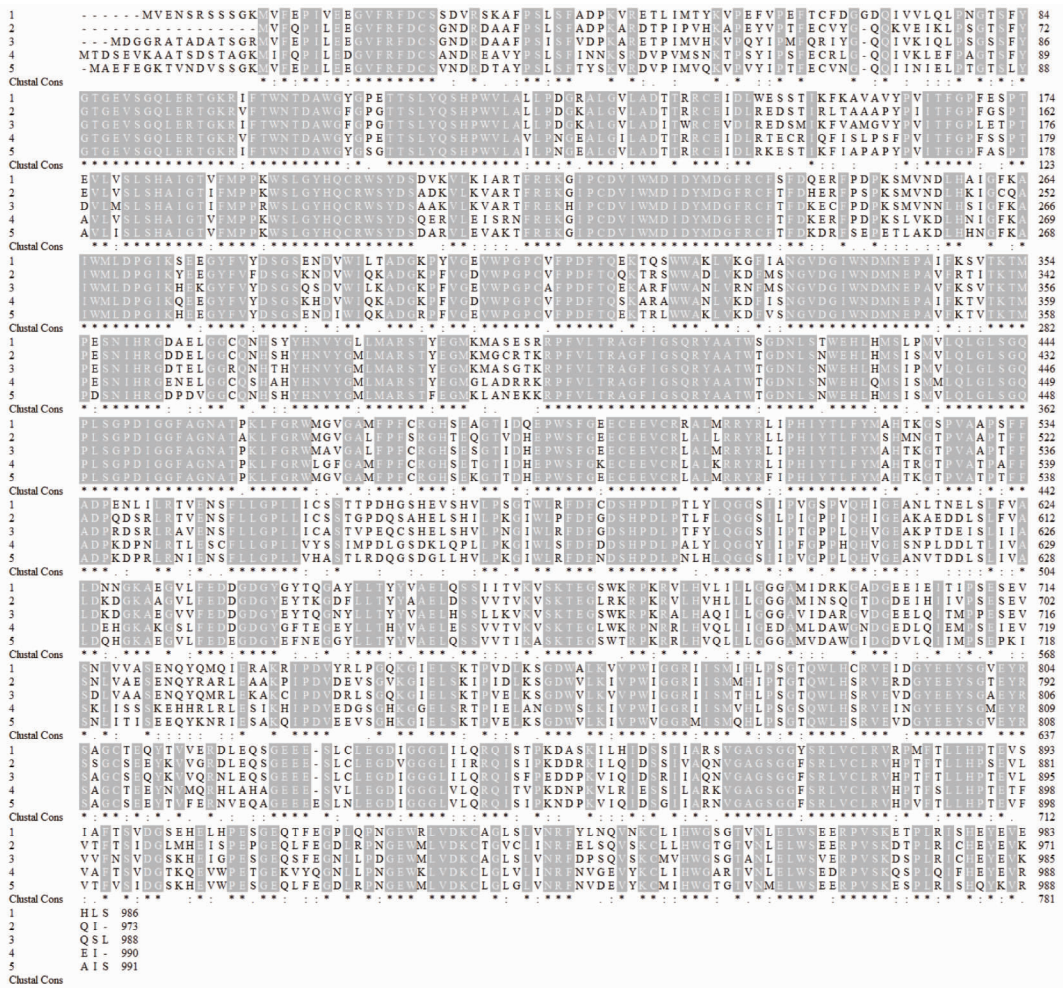
2.5 *LauAgl2* 的原核表达分析 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,通过将 *LauAgl2* 的编码序列组装到 pET28a 表达系统,并在 N-端融合组氨酸标签序列,利用异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 进行诱导蛋白的表达,并对诱导细胞进行 SDS-PAGE 电泳检测,结果表明,经 IPTG 诱导后,在含重组质粒 pET28a-*LauAgl2* 的细胞中检测到 1 条相对分子质量约为 110 kDa 的蛋白质条带(图 5),与预测的 6his*LauAgl2* 蛋白质的理论相对分子质量基本一致,这说明目标蛋白质 6his*LauAgl2* 在大肠杆菌中成功表达。而且,随着 IPTG 诱导时间的延长,6his*LauAgl2* 蛋白质的表达量显著增加。

3 讨论

该研究在分析忽地笑转录组数据库的基础上,通过考察忽地笑不同组织中 α -葡萄糖苷酶 2 候选基因片段 CL6740 的丰度,进一步利用 RACE 方法从忽地笑花萼和花瓣中克隆得到一个 α -葡萄糖苷酶 2 编码基因 *LauAgl2*。*LauAgl2* 基因 cDNA 全长 3 185 bp,存在一个 2 961 bp 长度的开放阅读框,

编码 1 个含有 986 个氨基酸残基的蛋白质 *LauAgl2*。*LauAgl2* 蛋白质属于糖苷水解酶 31 家族 (GH31),其氨基酸序列的 N-端不具有分泌信号肽序列。*LauAgl2* 蛋白质与其他植物来源的 α -葡萄糖苷酶 2 氨基酸序列具有较高的一致性,且具有相似的保守结构域和相同的活性位点,说明该蛋白在进化上是高度保守的。

α -葡萄糖苷酶不仅能够催化麦芽糖等物质末端非还原性的 α -1,4 连接的葡萄糖苷键的水解,释放 D-葡萄糖,还能够将从低聚糖类底物非还原末端释放的葡萄糖残基转移到另一糖类、酯类或蛋白质类底物上,形成 α -1,6 葡萄糖苷键,产生非发酵性的低聚异麦芽糖或糖苷、糖酯、糖肽等物质^[15-17],在低聚异麦芽糖及一些非天然的 α -葡萄糖苷等生产领域具有重要的应用。该研究克隆到忽地笑 α -葡萄糖苷酶 2 编码基因 *LauAgl2* 为其功能基础研究及应用研究奠定了良好的基础。

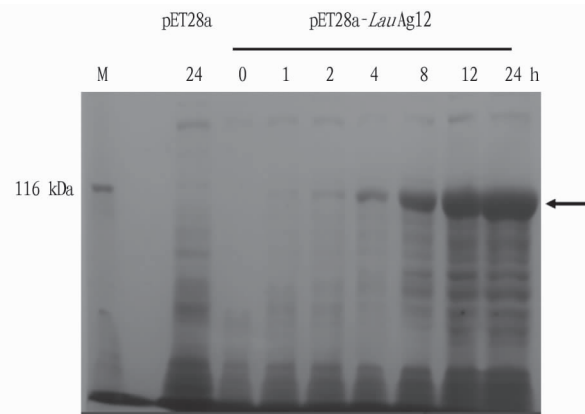


注:1.忽地笑 (*LauAgl2*); 2.凤梨 (*OAY72905*); 3.油棕 (*XP_010920077*); 4.陆地棉 (*XP_016693550*); 5.博落回 (*OVA18455*)

Note: 1. *Lycoris aurea* (L' Hér.) herb. (*LauAgl2*); 2. *Ananas comosus* (Linn.) Merr. (*OAY72905*); 3. *Elaeis guineensis* Jacq. (*XP_010920077*); 4. *Gossypium hirsutum* Linn. (*XP_016693550*); 5. *Macleaya cordata* (Willd.) R.Br. (*OVA18455*)

图4 *LauAgl2* 与其他植物 α -葡萄糖苷酶 2 的氨基酸序列多重比对

Fig.4 Multiple alignment of amino acid sequence between *LauAgl2* and α -glucosidase 2 from other species



注: M. 蛋白质分子量标准品; 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 分别为异丙基硫代半乳糖苷诱导时间; 箭头所示为目标蛋白质

Note: M. protein molecular weight marker; 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h indicate the induction time by isopropyl thiogalactoside; the arrow indicates the target protein

图5 *LauAgl2* 在大肠杆菌中的表达

Fig.5 Expression of *LauAgl2* in *Escherichia coli*

参考文献

- [1] TAGAMI T, YAMASHITA K, OKUYAMA M, et al. Molecular basis for the recognition of long-chain substrates by plant α -glucosidases [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288 (26): 19296-19303.
- [2] STANLEY D, REJZEK M, NAESTED H, et al. The role of α -glucosidase in germinating barley grains [J]. *Plant Physiol*, 2011, 155 (2): 932-943.
- [3] SUN Z T, HENSON C A. A quantitative assessment of the importance of barley seed α -amylase, β -amylase, debranching enzyme, and α -glucosidase in starch degradation [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1991, 284 (2): 298-305.
- [4] KONISHI Y, OKAMOTO A, TAKAHASHI J, et al. Effects of Bay m 1099, an α -glucosidase inhibitor, on starch metabolism in germinating wheat seeds [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, 58 (1): 135-139.
- [5] GILLMOR C S, POINDEXTER P, LORIEAU J, et al. α -glucosidase I is required for cellulose biosynthesis and morphogenesis in *Arabidopsis* [J]. *J Cell Biol*, 2002, 156 (6): 1003-1013.
- [6] GUO Y, PIGNI N B, ZHENG Y H, et al. Analysis of bioactive Amaryllidaceae alkaloid profiles in *Lycoris* species by GC-MS [J]. *Nat Prod Commun*, 2014, 9 (8): 1081-1086.
- [7] NOVIKOVA I Y, TULAGANOV A A. Physicochemical methods for the analysis of galanthamine (Review) [J]. *Pharmaceutical chemistry journal*, 2002, 36 (11): 623-627.
- [8] 马广恩. 加兰他敏治疗老年性痴呆症的研究概况 [J]. *药学进展*, 1998, 22 (3): 153-156.

(下转第 89 页)

共培养时间过短,农杆菌尚未附着,T-DNA 还没有充分切割、转移和整合;时间过长,植物细胞易受毒害,后续培养时难以除菌,农杆菌容易过度生长。根据试验确定在该系统中最佳的共培养时间为 4 d,超过时间,外植体大量的褐化死亡,农杆菌过度生长。在很多研究中,为了防止共培养时农杆菌过度生长,在共培养培养基上放置不同层数的滤纸,而该研究中未使用滤纸,在 4 d 时农杆菌没有过度生长,这样就降低了试验操作难度。

有研究表明共培养时的温度对遗传转化效率存在影响^[11]。而该试验由于条件限制,未能完成对共培养温度的试验,有待于进一步证明共培养温度对雪柑遗传转化的影响。

3.4 生长调节剂在转化中的作用 Cervera 等^[12]发现在共培养和预培养时使用 0.2~1.0 mg/L 2,4-D 可以促进愈伤组织形成,进而提高转化率和再生率。Ghorbel 等^[13]和 Domínguez 等^[14]也报导了 2,4-D 的加入对不定芽的再生关系不大,推测其可导致植物细胞形成感受态,促进其接收外源 DNA,从而提高了转化效率。Yu 等^[4]用不同浓度的 2,4-D 对外植体进行预处理并在共培养培养基中加入相应浓度的 2,4-D,雪柑转化率由不进行 2,4-D 处理的 8% 提高到了 12%,其 *GUS* 阳性比例相应提高了 33.6%;枳的转化率由 40% 提高到 80%,*GUS* 阳性比例提高了 26.0%,2,4-D 浓度过高则会导致愈伤组织大量形成,过夜处理则导致转化效率降低。这说明 2,4-D 的加入活化了植物组织细胞,促进了 T-DNA 的转移,从而提高了转化效率。该研究是在已知 2,4-D 能够提高转化率的前提下,用一定浓度的 2,4-D 对雪柑外植体进行预培养,并在共培养时加入相应浓度的 2,4-D,来优化雪柑转化中所选 2,4-D 的浓度。从抗性不定芽的长势来看,1 mg/L 2,4-D 的处理使抗性不定芽筛选后期长势较好。但预培养时间过长则抗性芽的比例下降,这与 Yu 等^[4]的结论一致。

从该试验结果可以看出,在筛选培养基中加入 BA、NAA、ZT 3 种不同浓度的生长调节剂,对抗性芽分化率没有

太明显的影响,但是对抗性大苗分化率影响较大。这也说明在筛选培养基中加入生长调节剂不能从根本上影响转化率的提高,而只是在芽的生长分化中起到了作用,加快了其形态建成,这也与以往外源激素在组织培养中的作用研究得到统一。在筛选培养基中不同浓度生长调节剂的组合促进了抗性大苗分化,这为后面转基因植株的筛选和培养提供了便利。

参考文献

- [1] PEÑA L, MARTÍN-TRILLO M, JUÁREZ J, et al. Constitutive expression of *Arabidopsis* *LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time[J]. *Nature biotech*, 2001, 19: 263-267.
- [2] 徐海峰. 以 *PMI* 基因为选择标记雪柑转基因体系的建立[D]. 福州: 福建农林大学, 2007.
- [3] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [4] YU C H, HUANG S, CHEN C X, et al. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of sweet orange and citrange[J]. *Plant cell tissue and organ culture*, 2002, 71: 147-155.
- [5] 黄涛, 李耿光, 张兰英, 等. 柑桔遗传转化技术的研究进展[J]. *广西植物*, 2004, 24(2): 134-138.
- [6] 杨莉, 徐昌杰, 陈昆松. *PMI*/甘露糖筛选体系在植物转基因中的应用[J]. *林业科学*, 2005, 41(3): 137-141.
- [7] JOERSBO M, DONALDSON I, KREIBERG J, et al. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet[J]. *Mol Breed*, 1998, 4(2): 111-117.
- [8] NEGROTTO D, JOLLEY M, BEER S, et al. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation[J]. *Plant Cell Rep*, 2000, 19(8): 798-803.
- [9] LUCCA P, YE X D, POTRYKUS I. Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent[J]. *Molecular breeding*, 2001, 7(1): 43-49.
- [10] KIM J Y, JUNG M, KIM H S, et al. A new selection system for pepper regeneration by mannose[J]. *Journal plant biotechnology*, 2002, 4(3): 129-134.
- [11] 胡繁荣, 夏英武. 辐照对高羊茅愈伤组织诱导及农杆菌介导转化的影响[J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2005, 23(2): 158-162.
- [12] CERVERA M, PINA J A, JUÁREZ J, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: Factors affecting transformation and regeneration[J]. *Plant cell reports*, 1998, 18: 271-278.
- [13] GHORBEL R, JUÁREZ J, NAVARRO L, et al. Green fluorescent protein as a screenable marker to increase the efficiency of generating transgenic woody fruit plants[J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 350-358.
- [14] DOMÍNGUEZ A, GUERRI J, CAMBRA M, et al. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus[J]. *Plant Cell Rep*, 2000, 19: 427-433.

(上接第 82 页)

- [9] 谷海燕, 谢孔平, 李世丽, 等. 石蒜属植物的无性繁殖研究[J]. *中国林副特产*, 2012(2): 32-35.
- [10] WANG R, XU S, JIANG Y M, et al. *De novo* sequence assembly and characterization of *Lycoris aurea* transcriptome using GS FLX titanium platform of 454 pyrosequencing[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): 1-10.
- [11] 钱彬彬, 李宜奎, 李洁, 等. 忽地笑 CYP98A 的分子克隆与表达分析[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(11): 3533-3541.
- [12] MA R, XU S, ZHAO Y, et al. Selection and validation of appropriate reference genes for quantitative real-time PCR analysis of gene expression in *Lycoris aurea*[J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 536.
- [13] HALL T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. *Nucleic Acids Symp*

Ser, 1999, 41(2): 95-98.

- [14] OMASITS U, AHRENS C H, MULLER S, et al. Protter: Interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(6): 884-886.
- [15] MALÁ Š, DVO ŘÁKOVÁ H, HRABAL R, et al. Towards regioselective synthesis of oligosaccharides by use of α -glucosidases with different substrate specificity[J]. *Carbohydr Res*, 1999, 322(3/4): 209-218.
- [16] OKUYAMA M, SABURI W, MORI H, et al. α -glucosidases and α -1,4-glucan lyases: Structures, functions, and physiological actions[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(14): 2727-2751.
- [17] SUGIMOTO M, FURUI S, SASAKI K, et al. Transglucosylation activities of multiple forms of α -glucosidase from spinach[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67(5): 1160-1163.

本刊提示 文稿题名下写清作者及其工作单位名称、邮政编码;第一页地脚注明第一作者简介,格式如下:“作者简介:姓名(出生年—),性别,籍贯,学历,职称或职务,研究方向”。