



孟衡玲, 张 薇, 卢丙越, 等. 铁皮石斛可溶性酸性转化酶基因克隆与表达分析[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(2): 81-85.

# 铁皮石斛可溶性酸性转化酶基因克隆与表达分析

孟衡玲, 张 薇, 卢丙越, 苏一兰, 薛春丽

(云南省高校农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室/红河学院 生命科学与技术学院, 云南 蒙自 661100)

**摘要:**【目的】克隆铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 可溶性酸性转化酶基因 *SAI*, 分析该基因生物学信息及时空表达特异性。【方法】基于同源序列克隆铁皮石斛 *SAI* 基因 cDNA 全长, 采用生物信息学方法进行序列分析, 并采用 qRT-PCR 进行组织特异性表达分析。【结果】铁皮石斛 *SAI* 基因全长为 1 595 bp, cDNA 编码区 1 368 bp, Genbank 登录号为 KU598852。该基因编码 455 个氨基酸, 蛋白相对分子质量为 50 700。NCBI BLASTx 分析表明, 该基因氨基酸序列与柑橘 *Citrus unshiu* 酸性转化酶基因、甜橙 *C. sinensis* 酸性  $\beta$ -呋喃果糖苷酶基因序列相似性最高, 达 77%, 与其他植物酸性转化酶基因的相似性均高于 68%。聚类分析表明, 铁皮石斛 *SAI* 基因与玉米 *Zea mays* 液泡转化酶基因、甘蔗 *Saccharum officinarum* *SAI* 基因亲缘关系最近。该基因编码的蛋白质属于非跨膜结构的亲水性热稳定蛋白, 定位于液泡中。*SAI* 基因在 2 年生铁皮石斛的茎中表达量最高, 3 年生的叶中表达量最低。【结论】成功克隆铁皮石斛液泡酸性转化酶基因, 该基因在铁皮石斛不同组织不同生育时期的表达量差异较大。

**关键词:** 铁皮石斛; 酸性转化酶; 基因克隆; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S828

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2017)02-0081-05

## Cloning and expression analysis of soluble acid invertase gene from *Dendrobium officinale*

MENG Hengling, ZHANG Wei, LU Bingyue, SU Yilan, XUE Chunli  
(Key Laboratory of High Quality Crops Cultivation and Safety Control/College of Life Science and Technology, Honghe University, Mengzi 661100, China)

**Abstract:** 【Objective】 To clone soluble acid invertase (*SAI*) gene in *Dendrobium officinale*, and perform bioinformatics and spatio-temporal expression analysis. 【Method】 The full length cDNA of *SAI* gene in *D. officinale* was cloned based on homologous sequences, the sequences were analyzed using bioinformatics tools, and the tissue-specific expressions were analyzed using qRT-PCR. 【Result】 The full length *SAI* gene in *D. officinale* is 1 595 bp, the full length cDNA is 1 368 bp, and the Genbank accession number is KU598852. The *SAI* gene encodes 455 amino acids, and the protein molecular mass is 50 700. NCBI BLASTx results show that the *D. officinale* acid invertase gene has 77% similarity with *Citrus unshiu* acid invertase gene and *C. sinensis* acid beta-fructofuranosidase gene, and has above 68% similarity with acid invertase genes from other plants. Cluster analysis shows that *D. officinale* acid invertase gene has the closest genetic relationship with *Zea mays* vacuolar invertase gene and sugarcane (*Saccharum officinarum*) *SAI* gene. The encoded protein of *D. officinale* *SAI* gene is positioned in vacuole, and is a hydrophilic, non-transmembrane and heat-stable protein. RT-PCR results showed that the expression level of *SAI* gene was the highest in 2-year-old *D. officinale* stems, and the lowest in 3-year-old *D. officinale* leaves. 【Conclusion】 The cloned gene is identified as the *D. officinale* vacuolar *SAI* gene. Its expression has

收稿日期: 2016-05-05 优先出版时间: 2017-01-10

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20170110.1424.044.html>

作者简介: 孟衡玲 (1981—), 女, 讲师, 博士, E-mail: menghengl@163.com

基金项目: 云南省科技厅应用基础研究项目 (2012FB174); 红河学院博硕项目 (14bs09); 红河学院学术带头人后备人才项目 (2015HB0303)

great differences among different tissues and at different developmental stages.

**Key words:** *Dendrobium officinale*; soluble acid invertase; gene cloning; real-time quantitative PCR

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 为中国九大仙草之一,具有抗肿瘤、抗衰老、增强人体免疫力的作用<sup>[1]</sup>。其主要活性成分为石斛多糖,其水解为单糖后,葡萄糖所占的比例最高<sup>[2]</sup>。转化酶(Invertase, IVR, E. C. 3. 2. 1. 26)又称为蔗糖酶或 $\beta$ -D-呋喃果糖苷酶,在植物体中催化蔗糖降解为果糖和葡萄糖,是蔗糖代谢的关键酶之一,包括酸性转化酶(Acid invertase, AI)和中性转化酶(Neutral invertase, NI),高活性的AI与植物幼嫩组织的快速生长、贮藏器官的迅速膨大有关<sup>[3-4]</sup>,且与蔗糖积累呈显著的负相关关系<sup>[5]</sup>。前期研究表明,铁皮石斛酸性转化酶的活性与蔗糖积累呈负相关关系,但与还原糖及可溶性多糖呈显著正相关关系,说明酸性转化酶对多糖的积累有重要的贡献作用,可能是由于AI催化蔗糖降解形成葡萄糖和果糖,为多糖的合成提供碳源<sup>[6]</sup>。Wei等<sup>[7]</sup>也认为霍山石斛 *D. huoshanense* 多糖含量与细胞内还原糖的浓度有关;王博<sup>[8]</sup>认为霍山石斛类原球茎中还原糖和可溶性多糖含量与蔗糖转化酶及蔗糖合成酶活性相关。对多糖的研究主要集中于含量测定、化学成分分析及药理作用,关于多糖的代谢途径尚不清楚,本研究克隆了铁皮石斛可溶性酸性转化酶(Soluble acid invertase, SAI)基因SAI,并进行实时定量表达分析,为进一步研究该基因表达调控和功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

铁皮石斛由云南红河州巨峰石斛种植有限公司提供,以1年生幼嫩叶片为材料进行SAI基因克隆。以1年生、2年生和3年生的根、茎、叶为材料分析铁皮石斛不同年龄和不同组织中SAI基因的表达。

大肠埃希菌 DH5 $\alpha$ , Marker DL2000 Plus 购于北京全式金生物公司, pMD19-T (D102A) 载体、5' RACE 试剂盒(编号 D315)、3' RACE 试剂盒(编号 D314)购于 TaKaRa 公司,总 RNA 提取试剂盒、DNA 消化试剂盒、反转录酶 SuperScript<sup>®</sup> III First-Strand Synthesis SuperMix 及 qPCR 反应试剂 PowerUp<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix 购于美国 Life Technologies 公司。PCR 反应试剂浓度为 TaKaRa LA Taq<sup>®</sup> 5 U $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>、4种 dNTP 各 2.5 mmol $\cdot$  L<sup>-1</sup>、常规引物 10  $\mu$ mol $\cdot$  L<sup>-1</sup>、RT-PCR 引物 20  $\mu$ mol $\cdot$  L<sup>-1</sup>。PCR

产物用 12 g $\cdot$  L<sup>-1</sup> 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.2 铁皮石斛 SAI 基因克隆

用 RNA 提取试剂盒提取铁皮石斛总 RNA, RNA 纯度采用 Merinton SMA4000 超微量分光光度计(北京普莱恒通科技有限公司)测定。用 DNA 消化试剂盒及反转录试剂盒进行消化及反转录。根据 Genbank 中 SAI 基因的保守区域,设计铁皮石斛 SAI 基因的特异性扩增引物 SAIF1 (5'-GGCACGGGTATGTGGGAGTG-3') 和 SAIR1 (5'-GGTCATAAAAATGTCTTTGATGC-3'),以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系(50  $\mu$ L)为:cDNA 2  $\mu$ L, TaKaRa LA Taq<sup>®</sup> 0.5  $\mu$ L, 10 $\times$  LA PCR Buffer II(含 Mg<sup>2+</sup>) 5  $\mu$ L, dNTP 8  $\mu$ L, SAIF1 和 SAIR1 各 2  $\mu$ L, 灭菌水:30.5  $\mu$ L。反应程序为 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 51 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。将扩增获得片段克隆到 pMD19-T 载体上,送上海生工测序。

### 1.3 铁皮石斛 SAI 基因 3'端克隆

根据“1.2”获得的 SAI 基因部分序列,设计 2 条上游特异引物 SAIF2 (5'-AATGAGAACAAGTGGGTG-3') 和 SAIF3 (5'-GCATCAAAGACATTTTATGACC-3')。采用 3'-RACE 试剂盒进行巢式 PCR 扩增,以引物 SAIF2 及试剂盒中的 Outer Primer 进行第 1 轮 PCR 扩增,反应体系(50  $\mu$ L)为:反转录反应液 1  $\mu$ L, 1 $\times$  cDNA Dilution Buffer II 8  $\mu$ L, SAIF2 引物 1  $\mu$ L, 3' RACE Outer Primer 1  $\mu$ L, TaKaRa LA Taq<sup>®</sup> 0.25  $\mu$ L, 10 $\times$  LA PCR Buffer II(含 Mg<sup>2+</sup>) 5  $\mu$ L, 灭菌水 33.75  $\mu$ L。反应程序为:94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 20 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。以第 1 次 PCR 产物为模板,以 SAIF3 及 Inner Primer 为引物进行第 2 轮 PCR 扩增,反应体系(50  $\mu$ L)为:Outer PCR 产物 1  $\mu$ L, dNTP 8  $\mu$ L, SAIF3 引物 1  $\mu$ L, 3' RACE Inner Primer 1  $\mu$ L, TaKaRa LA Taq<sup>®</sup> 0.25  $\mu$ L, 10 $\times$  LA PCR Buffer II(含 Mg<sup>2+</sup>) 5  $\mu$ L, 灭菌水 33.75  $\mu$ L。反应程序为:94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 51 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。将扩增获得片段克隆到 pMD19-T 载体上,送上海生工测序。

### 1.4 铁皮石斛 SAI 基因 5'端克隆

用 5'-RACE 试剂盒克隆 SAI 基因的 5'端序列,根据“1.2”获得的 SAI 基因部分序列设计 2 条特异性下游引物 SAIR2 (5'-ATCAACGCTTACAGGAAA-3') 和 SAIR3 (5'-CACCCACTTGTCTCATT-3')。以

引物 SAIR2 及 Outer Primer 进行第 1 轮 PCR 反应,反应体系(50  $\mu\text{L}$ )为:反转录反应液 2  $\mu\text{L}$ ,1  $\times$  cDNA Dilution Buffer II 8  $\mu\text{L}$ ,SAIR2 引物 1  $\mu\text{L}$ ,5'RACE Outer Primer 1  $\mu\text{L}$ ,TaKaRa LA Taq<sup>®</sup> 0.25  $\mu\text{L}$ ,10  $\times$  LA PCR Buffer II(含  $\text{Mg}^{2+}$ ) 5  $\mu\text{L}$ ,灭菌水 32.75  $\mu\text{L}$ 。反应程序为:94  $^{\circ}\text{C}$  3 min,94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,52  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  2 min,30 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。以第 1 次 PCR 产物为模板进行第 2 轮 PCR 反应,反应体系同“1.3”中第 2 轮 PCR 的反应体系(引物替换为 SAIR3 和 5'RACE Inner Primer)。反应程序为:94  $^{\circ}\text{C}$  3 min,94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  2 min,30 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。将扩增获得片段克隆到 pMD19-T 载体上,送上海生工测序。用 DNAMAN 软件进行序列拼接。

### 1.5 铁皮石斛 SAI 基因的全长扩增

根据拼接序列设计特异引物 SAIF4(5'-GCAT-GCTCTACACCGTTCACCAA-3')和 SAIR4(5'-GCT-TATGAGAATTGGTATGCGTG-3')扩增铁皮石斛 ORF 全长。反应体系参照“1.2”。反应程序为:94  $^{\circ}\text{C}$  5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,53  $^{\circ}\text{C}$  45 s,72  $^{\circ}\text{C}$  2 min,35 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。将扩增获得片段克隆到 pMD19-T 载体上,送上海生工测序。

### 1.6 铁皮石斛 SAI 基因的生物信息学分析

采用 Computer pI/Mw Tool 在线软件进行蛋白分析,使用 ExPASyProtParamTool 预测蛋白质的理化性质,利用 TMHMM 的 Transmembrane Prediction Server 预测跨膜结构域,使用 Swiss-model 进行二级结构预测和结构域分析。

### 1.7 铁皮石斛 SAI 基因的 qRT-PCR 分析

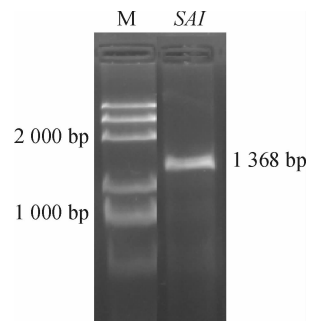
根据已经获得的铁皮石斛 SAI 基因序列,设计 RT-PCR 扩增引物 SAIF5(5'-GCTGGGCTTGACACATCGG-3')和 SAIR5(5'-CCACTTGTTCATTAG-CATCATAACC-3'),目的片段 123 bp。根据金钗石斛 *D. nobile* 内参基因 GAPDH(GQ250049.1)设计内参引物 GAPDHF(5'-GTGCCAAGAAGTTATCATCT-CTG-3')和 GAPDHR(5'-CTCATGCTCATTAAACAC-CAACAAC-3'),目的片段 74 bp。使用 ABI7500 荧光定量 PCR 仪进行实时定量分析,每个样本重复 3 次,反应体系(20  $\mu\text{L}$ )为:cDNA 5  $\mu\text{L}$ ,PowerUp<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix 10  $\mu\text{L}$ ,正向引物 0.2  $\mu\text{L}$ ,反向引物 0.2  $\mu\text{L}$ ,50  $\times$  ROX 0.04  $\mu\text{L}$ ,灭菌水 4.56  $\mu\text{L}$ 。反应程序为:95  $^{\circ}\text{C}$  2 min;95  $^{\circ}\text{C}$  10 s,60  $^{\circ}\text{C}$  34 s,72  $^{\circ}\text{C}$  30 s,45 个循环;循环结束后从 60  $^{\circ}\text{C}$  升高到 98  $^{\circ}\text{C}$  获取溶解曲线。采用 SPSS17.0 软件 LSD 多重比较进行显著差异分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 铁皮石斛 SAI 基因全长扩增与同源性分析

经 SMA4000 超微量分光光度计测定,各样本总 RNA 纯度高、完整性好。以铁皮石斛 cDNA 为模板,SAIF1 及 SAIR1 为引物,PCR 扩增获得 1 条清晰、特异性好的条带,将扩增产物纯化后连接到 pMD19-T 载体上,筛选阳性质粒、测序。将测序结果进行 BLASTx 比对,结果显示其与柑橘 *Citrus unshiu* 酸性转化酶基因序列、甜橙 *C. sinensis* 酸性  $\beta$ -呋喃果糖苷酶基因序列相似性最高,达 77%,与其他植物酸性转化酶基因序列相似性均高于 68%。

根据已获得的片段设计特异引物,采用 RACE 试剂盒进行 3'端和 5'端扩增,3'端扩增获得 930 bp 左右的片段,5'端获得 450 bp 左右的片段,测序后进行 NCBI BLASTx 比对。DNAMAN 软件拼接后获得 1 595 bp 的序列,利用 ORF finder 查找完整的开放阅读框,其 ORF 包含 1 368 个碱基,编码 455 个氨基酸,5'端非编码区有 111 bp,3'端非编码区有 116 bp。根据 ORF 设计引物(SAIF4/SAIR4)扩增编码区,获得了 1 条特异性较好的条带,大小为 1 368 bp(图 1)。



M: Marker DL2000 Plus.

图 1 铁皮石斛 SAI 基因全长扩增

Fig. 1 Amplification of full length of SAI gene of *Dendrobium officinale*

### 2.2 铁皮石斛 SAI 基因的生物信息学分析

采用在线软件 Computer pI/MW Tool 对 SAI 基因进行蛋白分析,该序列相对分子质量为 50 7000,理论等电点 5.32。使用在线软件 ExPASyProtParamTool 分析 SAI 基因的氨基酸组成,该序列编码的氨基酸中丙氨酸所占的比例最大,占 8.1%。其不稳定系数为 37.8,无信号肽,基因编码的蛋白是非跨膜结构的亲水性热稳定蛋白,完全在细胞内起作用,定位于液泡中。BLASTx 预测该蛋白功能结构域,发现该蛋白含有多个功能结构域和保守结构,其中包括糖基转化酶家族 32 的保守结构域(图 2)。

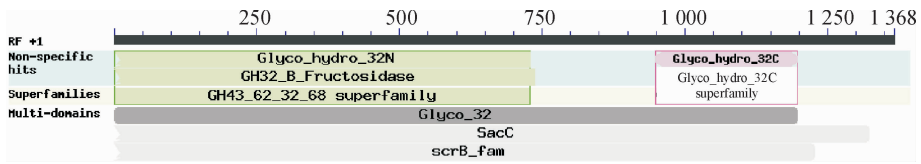


图2 铁皮石斛 SAI 基因保守结构域

Fig. 2 Conservative structure domains of SAI gene of *Dendrobium officinale*

采用 MEGA5 软件 UPGMA 法对 Genbank 中部分植物的酸性转化酶基因氨基酸序列进行聚类分析, 从图 3 可以看出, 铁皮石斛 SAI 基因氨基酸序列与玉

米 *Zea mays* 液泡转化酶基因、甘蔗 *Saccharum officinarum* SAI 基因的亲缘关系最近, 三者聚为一类。

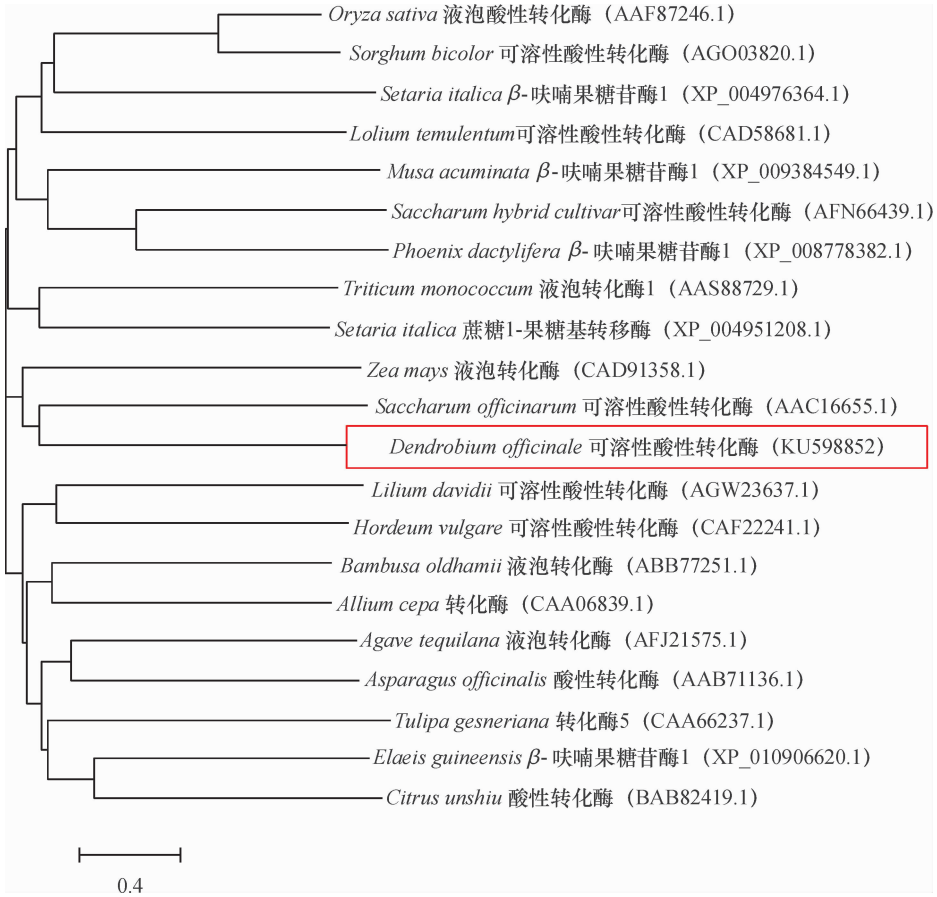
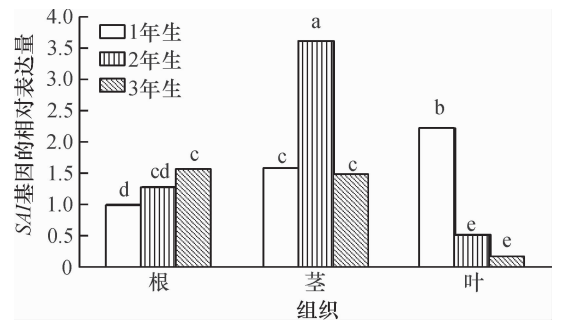


图3 植物酸性转化酶基因氨基酸序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of amino acid sequences of plant acid invertase genes

### 2.3 铁皮石斛 SAI 基因的表达分析

使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  分析方法<sup>[9]</sup>, 将 1 年生铁皮石斛根的 SAI 基因表达量设为对照, 即  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值定义为 1。从图 4 可以看出, SAI 基因在铁皮石斛不同发育阶段不同组织的表达量差异较大。在 2 年生茎中的表达量最高, 是 1 年生和 3 年生茎的表达量的 2.4 倍左右, 差异显著 ( $P < 0.05$ ), 但在 1 年生和 3 年生茎中基因表达量无显著差异。在根中, SAI 基因的表达量随生育年限的增加呈逐年增加的趋势, 但变化幅度较小, 1 年生与 3 年生间存在显著差异。在叶中, 1 年生的表达量最高, 显著高于 2 年生和 3 年生叶的表达量。



柱子上凡具有一个相同小写字母者, 表示差异不显著 ( $P > 0.05$ , LSD 法)。

图4 铁皮石斛 SAI 基因表达的时空特异性分析

Fig. 4 Spatio-temporal expression analysis of SAI gene in *Dendrobium officinale*

### 3 讨论与结论

酸性转化酶是催化蔗糖不可逆降解的关键酶之一,在植物的生长发育和形态建成过程中具有重要作用。酸性转化酶是由1个多基因家族编码的蛋白质<sup>[10-11]</sup>,分为细胞壁酸性转化酶亚家族和液泡酸性转化酶亚家族,在不同种植物或同一种植物的不同部位的多基因家族的不同成员间的相对分子质量不同,从50 000到80 000不等,为单体或二聚体。液泡酸性转化酶在多数植物中至少有2个同工酶,以可溶性蛋白积累于液泡的酸性区域。

本研究克隆了铁皮石斛 *SAI* 基因 cDNA 全长为 1 595 bp, ORF 编码区为 1 368 bp, 共编码 455 个氨基酸, 其蛋白相对分子质量为 50 700。与其他植物液泡酸性转化酶基因的氨基酸进行同源分析, 相似性最高为 77%, 最低也在 68% 以上。该基因编码的蛋白具有糖基转化酶家族 32 的保守结构域, 靠近 N-末端含有 1 个  $\beta$ -呋喃果糖苷酶的特征序列, 即五肽 ND-PNG/A 保守结构, 靠近 C-末端还有 1 个半胱氨酸 (Cys) 残基及其 MWECV/P 结构域, 这些均为酸性转化酶的催化和功能结构域<sup>[12]</sup>, 因此, 初步鉴定本研究克隆的基因为铁皮石斛液泡酸性转化酶基因。

在植物生长发育的不同阶段以及不同的器官组织中, 酸性转化酶基因的表达具有时间与空间上的差异<sup>[13-14]</sup>。本研究表明, *SAI* 基因在 1 年生铁皮石斛根、茎、叶中的表达量较高, 主要促进植物的生长发育和形态建成<sup>[15]</sup>。*SAI* 基因在 2 年生铁皮石斛茎中的表达量最高, 主要促进蔗糖分解成葡萄糖和果糖, 为多糖的积累提供基础, 这与诸燕等<sup>[16]</sup>观点一致, 认为 2 年生铁皮石斛可溶性多糖的积累最快, 进一步证实铁皮石斛酸性转化酶活性与可溶性多糖的积累有直接关系, 可溶性多糖的合成是以葡萄糖、果糖等单糖为起点的。

在甘蔗、胡萝卜等植物中均发现有 2 个可溶性酸性转化酶基因, 甘蔗中 AI 的 2 个同工酶相对分子质量分别为 61 100 和 74 400, 在胡萝卜中的相对分子质量分别为 61 000 和 49 000<sup>[17-18]</sup>。酸性转化酶基因反义转入马铃薯中, 使马铃薯中还原糖和淀粉含量降低<sup>[19]</sup>, 转入甜瓜中, 使葡萄糖、果糖含量降低, 蔗糖含量升高<sup>[20]</sup>。因此, 下一步需进行铁皮石斛 *SAI* 基因的遗传转化研究, 为铁皮石斛 *SAI* 基因功能研究以及分子育种和遗传改良奠定基础。

#### 参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 1 部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 265.  
 [2] 黄民权, 黄步汉, 蔡体育, 等. 铁皮石斛多糖的提取、分离和分析[J]. 中草药, 1994, 25(3): 128-129.  
 [3] YAMADA K, KOJIMA T, BANTOG N, et al. Cloning of

two isoforms of soluble acid invertase of Japanese pear and their expression during fruit development [J]. J Plant Physiol, 2007, 164(6): 746-755.

- [4] TIAN H, KONG Q, FENG Y, et al. Cloning and characterization of a soluble acid invertase-encoding gene from muskmelon [J]. Mol Biol Rep, 2009, 36(3): 611-617.  
 [5] WANG A Q, HUANG W J, NIU J Q, et al. Effects of ethephon on key enzymes of sucrose metabolism in relation to sucrose accumulation in sugarcane [J]. Sugar Tech, 2013, 15(2): 177-186.  
 [6] 杨骏, 孟衡玲, 杨生超, 等. 铁皮石斛可溶性糖含量与蔗糖代谢酶活性的相关性研究 [J]. 西部林业科学, 2012, 41(2): 62-67.  
 [7] WEI M, JANG S T, LUO J P. Enhancement of growth and polysaccharide production in suspension cultures of protocorm-like bodies from *Dendrobium huoshanense* by the addition of putrescine [J]. Biotechnol Lett, 2007, 29(3): 495-499.  
 [8] 王博. 水杨酸调节霍山石斛类原球茎生长和多糖合成的研究 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2009.  
 [9] 张驰宇, 徐顺高, 黄新祥. 一种新颖简便的荧光实时 RT-PCR 相对定量方法的建立 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2005, 32(9): 883-888.  
 [10] HAOUAZINE-TAKVORIA N, TYMOWSKA-LALANNE Z, TAKVORIAN A, et al. Characterization of two members of the *Arabidopsis thaliana* gene family, *At $\beta$ fruct3* and *At $\beta$ fruct4*, coding for vacuolar invertases [J]. Gene, 1997, 197(1/2): 239-251.  
 [11] 刘慧英, 朱祝军. 转化酶在高等植物蔗糖代谢中的作用研究进展 [J]. 植物学通报, 2002, 19(6): 666-674.  
 [12] SCHROEVEN L, LAMMENS W, VAN LAERE A, et al. Transforming wheat vacuolar invertase into a high affinity sucrose: Sucrose 1-fructosyltransferase [J]. New Phytol, 2008, 180(4): 822-831.  
 [13] 欧庸彬. 马铃薯液泡酸性转化酶基因的表达调控机制研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.  
 [14] HEDLEY P E, MACHRAY G C, DAVIES H V. Potato (*Solanum tuberosum*) invertase-encoding cDNAs and their differential expression [J]. Gene, 1994, 145(2): 211-214.  
 [15] 潘秋红, 张大鹏. 植物酸性转化酶基因及其表达调控 [J]. 植物学通报, 2005, 22(2): 129-137.  
 [16] 诸燕, 斯金平, 郭宝林, 等. 人工栽培铁皮石斛多糖含量变异规律 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(4): 427-430.  
 [17] 郑月霞, 许玉林, 张积森, 等. 甘蔗可溶性酸性转化酶基因的克隆及序列分析 [J]. 热带作物学报, 2012, 33(11): 2007-2011.  
 [18] 牛俊奇, 王爱勤, 黄静丽, 等. 甘蔗可溶性酸性转化酶 (SoSAII) 基因的克隆及表达分析 [J]. 中国农业科学, 2013, 46(24): 5248-5260.  
 [19] 王清, 黄惠英, 张金文, 等. 反义酸性转化酶基因对低温贮藏马铃薯块茎还原糖和淀粉含量的影响 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31(5): 533-538.  
 [20] 樊继德. 甜瓜酸性转化酶基因表达特性分析及功能鉴定 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2007.

【责任编辑 庄 延】

<http://xuebao.scau.edu.cn>