

大豆乙酰羟酸异构还原酶基因 *GmAHRI* 的克隆与分析

高静瑶¹, 姜 威¹, 刘春燕², 蒋洪蔚², 胡国华^{2,3}, 陈庆山^{1,3}

(1. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农垦科研育种中心, 黑龙江 哈尔滨 150090; 3. 国家大豆工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 基于电子克隆获得的大豆 *GmAHRI* 基因 cDNA 序列编码区设计特异引物, 以高异亮氨酸大豆品种“和龙早熟豆”总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 获得了约 1 764 bp 的 cDNA 片段, T/A 克隆后进行序列测定。测序结果显示: *GmAHRI* 基因家族有 2 个成员, 分别命名为 *GmAHRI1* (FJ594399.1) 和 *GmAHRI2* (JN034043)。 *GmAHRI1* 和 *GmAHRI2* 的编码区长度均为 1 764 bp, 编码 587 个氨基酸, 由 10 个外显子和 9 个内含子构成, 分别定位于 Gm12 和 Gm13 染色体上。2 个基因在氨基酸水平上的相似性达到了 96.71%, 所编码的蛋白质在二级结构上有所差异, 三级结构相同。

关键词: 大豆; *GmAHRI* 基因; 序列分析

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2011)05-0727-04

Molecular Cloning and Analysis of *GmAHRI* Gene in Soybean

GAO Jing-yao¹, JIANG Wei¹, LIU Chun-yan², JIANG Hong-wei², HU Guo-hua^{2,3}, CHEN Qing-shan^{1,3}

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. Crop Research and Breeding Center of Land-Reclamation, Harbin 150090; 3. National Research Center of Soybean Engineering and Technology, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: In this research, the *GmAHRI* gene was cloned from *Glycine max* and analyzed its sequences. A cDNA product about 1764 bp was amplified from the total RNA of soybean leaves by reverse transcription PCR (RT-PCR) with specific primers designed with the full-length sequence of *GmAHRI* gene. Sequence analysis showed that the *GmAHRI* gene family had two members, named *GmAHRI1* (FJ594399.1) and *GmAHRI2* (JN034043), respectively. The full length of *GmAHRI1* and *GmAHRI2* were 1764 bp, encoding 587 amino acids, constructed by 10 exons and 9 introns, and located on chromosome Gm12 and Gm13, respectively. The similarity of two genes reached to 96.71% in amino acid level, there were obvious difference in secondary structure, but they had same tertiary structure.

Key words: Soybean; *GmAHRI* gene; Sequence analysis

大豆乙酰羟酸异构还原酶 (Acetohydroxy acid isomeroreductase) 基因 *GmAHRI* 是苏氨酸代谢途径关键酶基因之一, 控制产生异亮氨酸、缬氨酸和亮氨酸, 同时也是丙酮酸代谢途径的关键酶基因之一。苏氨酸代谢途径是植物氨基酸合成的重要途径, 该途径生成的氨基酸都是重要的必需氨基酸。苏氨酸代谢途径产生的二氨基庚二酸盐是细菌细胞壁生物合成的主要成分, S-腺蛋氨酸是许多生物的甲基基团提供者^[1]。 *AHRI* 基因在叶绿体基质中被发现, 并且已从拟南芥中分离出来^[2,4]。 *AHRI* 基因是支链氨基酸膜蛋白的重要组成部分, 是生物合成途径中支链酮酸的中间体, 同时是细胞衰老脂肪酸的重要指标, 对植物衰老机制的研究具有重要的意义^[5-6]。 *AHRI* 在农用化学品上应用广泛, 由于它在动物体内不存在, 使得它成为特殊除草剂和杀真菌剂的潜在靶目标^[7]。

课题组前期工作中, 于妍等^[8]利用 EST 数据已经电子克隆了大豆乙酰羟酸异构还原酶基因, 并对该酶基因进行了电子定位^[9]。该试验克隆大豆全长 *GmAHRI* 基因, 对这一双拷贝基因进行了系统的分析, 分析 *GmAHRI1* 和 *GmAHRI2* 基因在一级、二级、三级结构及在大豆基因组中分布的差异, 为研究大豆乙酰羟酸异构还原酶生物学功能及其在植物基因工程、生物技术及生物化学上的应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 植物材料 高异亮氨酸含量大豆品种“和龙早熟豆”, 其异亮氨酸含量为 0.13 mg · g⁻¹。

1.1.2 主要分子试剂 工程菌 *Escherichia coli* DH5α 宿主菌购自北京全式金生物技术有限公司。

收稿日期: 2011-07-07

基金项目: 转基因专项资助项目 (2009ZX08009-013B); 公益性行业 (农业) 科研专项资助项目 (200903003)。

第一作者简介: 高静瑶 (1986-), 女, 在读硕士, 研究方向为大豆遗传育种。E-mail: yaojinggao007@126.com。

通讯作者: 陈庆山 (1973-), 男, 教授, 博士, 研究方向为大豆生物技术。E-mail: qshchen@126.com。

T/A 克隆载体 pGWC-T 为实验室保存。ExTaq DNA 聚合酶购于 TaKaRa。引物及测序均有上海生工完成。总 RNA 抽提所用的 Trizol 及 M-MLV 逆转录酶购于 Invitrogen 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 根据已电子克隆的大豆 *GmAHRI* 基因全长 cDNA 序列^[8], 利用 Primer Premier 5.0 软件, 在 *GmAHRI* 基因全长 cDNA ORF 区域的 5' 和 3' 末端分别设计上下游引物。

Forward: 5'-ATGGCGGCTGCTATGACGT-3'

Reverse: 5'-CTAATTGCTAGACTGACGCAACTC-3'

1.2.2 大豆叶片总 RNA 提取 将大豆种子在水中浸泡过夜, 吸胀后种在花盆中, 放在光照培养箱培养。待大豆长出三出复叶后取幼嫩的叶片用于分析。采用 Trizol 法提取大豆叶片的总 RNA。具体方法为: 取大豆幼嫩叶片 50 ~ 100 mg 于液氮中研磨后加入 1 mL Trizol, 15 ~ 30℃ 温浴 5 min; 然后加入 200 μ L 氯仿, 剧烈震荡 15 s, 15 ~ 30℃ 温浴 2 ~ 3 min, 12 000 $r \cdot \min^{-1}$, 4℃ 离心 15 min; 将上清移至无菌且无 RNase 的 1.5 mL 离心管中, 加入等体积异丙醇混匀, 15 ~ 30℃ 放置 10 min; 12 000 $r \cdot \min^{-1}$, 4℃ 离心 15 min; 弃上清, 加入 1 mL 75% 乙醇轻轻涡旋, 7 500 $r \cdot \min^{-1}$, 4℃ 离心 5 min; 稍干后用无 RNase 的 50 μ L 无菌水溶解沉淀; -80℃ 保存。

1.2.3 cDNA 合成 在无 RNase 的 0.5 mL Eppendorf 管中加入 1 μ L Oligo(dT) (0.5 μ g)、3 μ L 总 RNA (4 ~ 5 μ g)、9.5 μ L DEPC-H₂O, 混匀后在 65℃ 保温 10 min, 0℃ 保温 5 min; 稍离心一下, 在混合物中依次加入: 1 μ L 10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP、4 μ L 5 \times M-MLV Buffer、0.5 μ L RNasin 混匀, 37℃ 保温 2 min; 再次加入 200 U \cdot μ L⁻¹ M-MLV 1 μ L; 37℃ 保温 60 min, 70℃ 保温 10 min; 反应得到第一链的 cDNA, -20℃ 保存备用。

1.2.4 大豆 *GmAHRI* 基因的克隆及测序 以第一链 cDNA 产物为模板, *GmAHRI* F/*GmAHRI* R 为引物对, 用 ExTaq DNA 聚合酶对 *GmAHRI* 基因全长 cDNA ORF 区序列进行 PCR 扩增。反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 110 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。在 1.2% (W/V) 的琼脂糖凝胶上电泳检测 PCR 产物, 回收目的片段并连接到 pGWC-T 载体上, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。随机筛选白色单菌落, 利用 M13-47/*GmAHRI* R 为引物对, 用 ExTaq DNA 聚合酶在同上的反应条件下对阳性克隆测序。重组质粒命名为 pGWC-*GmAHRI*。

1.3 生物信息学分析

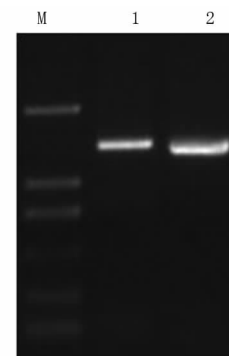
利用 DNAMAN 5.0 的 Multiple Sequence Alignment 功能对基因及其同源序列进行联配分析, 并构建系统发育树。利用 <http://www.phytozome.com>

对基因进行结构分析与定位分析。通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 的 Protein Conservation Domain 程序对目的基因编码的氨基酸序列进行保守结构域分析。用 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 对蛋白质的二级结构进行分析。利用 Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>) 的三级结构预测功能对蛋白质进行三级结构预测。

2 结果与分析

2.1 大豆 *GmAHRI* 基因的克隆

以叶片总 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 通过 RT-PCR 扩增, 得到 1 条特异性 cDNA 条带, 与预期大小相一致。重组质粒 pGWC-*GmAHRI* 用 *GmAHRI* F/*GmAHRI* R 引物扩增, 得到的片段长度与于妍等^[8]利用 EST 数据电子克隆的 *GmAHRI* 预测的片段长度 1 764 bp 一致 (图 1)。各通过 10 次测序, 测序结果经 DNAMAN 5.0 软件验证, 确定基因序列, 全长均为 1 764 bp, 编码 587 个通读的蛋白质氨基酸序列和 1 个终止密码子序列, 分别命名为 *GmAHRI1* (FJ594399.1) 和 *GmAHRI2* (JN034043)。



M: 2 000 bp Marker; 1: pGWC-*GmAHRI1*;
2: pGWC-*GmAHRI2*

图 1 重组质粒 pGWC-*GmAHRI* 的 PCR 产物鉴定

Fig. 1 Identification of PCR product of the recombinant plasmids pGWC-*GmAHRI*

2.2 *GmAHRI1* 和 *GmAHRI2* 基因比较分析

2.2.1 *GmAHRI1* 和 *GmAHRI2* 基因序列的联配分析 利用 DNAMAN 5.0 的 Multiple Sequence Alignment 功能对 *GmAHRI1* 和 *GmAHRI2* 基因进行联配分析, 2 个基因在氨基酸水平上的相似性达到了 96.71%。*GmAHRI1* 与 *GmAHRI2* 基因相比, 在 54 个位点有 1 个碱基的错配, 4 个位点有 2 个碱基的错配。说明 2 个基因不完全相同, 但又同属一个基因家族。其功能有待于进一步区分与验证。

2.2.2 *GmAHRI1* 和 *GmAHRI2* 基因编码产物的二

级及三级结构比较 用 SOPMA 对 *GmAHR1* 和 *GmAHR2* 编码蛋白质产物的二级结构进行了分析,结果表明,*GmAHR1* 的二级结构中 47.87% 为 α 螺旋结构(Helices),12.95% 为 β 折叠结构(Extended strand),9.54% 为 β 转角结构(Beta turn),29.64% 为不规则卷曲结构(Random coil)。*GmAHR2* 的二级结构中 42.08% 为 α 螺旋结构,15.33% 为 β 折叠结构,8.18% 为 β 转角结构,34.41% 为不规则卷曲结构。*GmAHR1* 和 *GmAHR2* 编码蛋白质产物的二级结构有差异。

利用 Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>) 的三级结构预测功能对 *GmAHR1* 和 *GmAHR2* 编码的蛋白质产物进行三级结构预测,并利用 Rasmol 软件对三级结构图形化分析,从分析结果可知,2 个拷贝氢键均为 378 个, α 螺旋结构为 32 个, β 折叠结构为 13 个,转角为 47 个。虽然 *GmAHR1* 基因和 *GmAHR2* 基因的二级结构有差

异,但是三级结构相同,说明其基因的功能相似,属于同一基因的 2 个不同拷贝。

2.3 *GmAHR1* 基因和 *GmAHR2* 基因的结构分析与定位

为了确定 *GmAHR1* 和 *GmAHR2* 基因的结构及在基因组中的位置,将 2 个基因序列与美国最新释放出来的基因组数据进行了比对分析,其中基因的匹配区段是指 *GmAHR1* 基因在基因组数据中分段匹配的结果,也就是外显子区段;基因组匹配区段是指在基因组数据中 *GmAHR1* 匹配区段所对应的位置。由表 1 和表 2 可以看出,*GmAHR1* 和 *GmAHR2* 基因均由 10 个外显子和 9 个内含子组成,分别定位在 Gm12 和 Gm13 染色体上。通过 2 个表的联合分析可以看出,在外显子方面 2 个基因片段长度相同。在内含子方面 2 个基因差异很大,长度均不相同。进一步说明 2 个基因编码区相似性很高,但又有明显差别,属于一个基因家族的 2 个成员。

表 1 大豆 *GmAHR1* 的结构分析与定位
Table 1 Structure and mapping analysis of *GmAHR1*

片段长度	内含子长度	基因匹配区段	基因组匹配区段	E 值范围	平均匹配率	基因组序号
Length/bp	Length of intron/bp	Gene matching section	Genome matching section	E-value	Average matching rate/%	Genome No.
285	-	1-285	36959354-36959638	$5.6e^{-104}$	87.4	Gm12
93	110	286-378	36959749-36959841	$5.3e^{-44}$	100	Gm12
66	163	379-444	36960005-36960070	$2.4e^{-26}$	100	Gm12
141	121	445-585	36960192-36960332	$4.6e^{-67}$	100	Gm12
228	737	586-813	36961070-36961297	$2.2e^{-115}$	100	Gm12
118	104	814-931	36961402-36961519	$4.1e^{-55}$	100	Gm12
140	75	932-1071	36961595-36961734	$1.6e^{-66}$	100	Gm12
168	139	1072-1239	36961874-36962041	$1.0e^{-88}$	100	Gm12
156	77	1240-1395	36962119-36962274	$1.4e^{-73}$	100	Gm12
369	195	1396-1764	36962470-36962835	0	99.2	Gm12

表 2 大豆 *GmAHR2* 的结构分析与定位
Table 2 Structure and mapping analysis of *GmAHR2*

片段长度	内含子长度	基因匹配区段	基因组匹配区段	E 值范围	平均匹配率	基因组序号
Length/bp	Length of intron/bp	Gene matching section	Genome matching section	E-value	Average matching rate/%	Genome No.
285	-	1-285	37976549-37976265	$1.3e^{-143}$	100	Gm13
93	85	286-378	37976181-37976089	$5.3e^{-41}$	100	Gm13
66	210	379-444	37975880-37975815	$6.9e^{-27}$	100	Gm13
141	135	445-585	37975681-37975541	$4.6e^{-67}$	100	Gm13
228	750	586-813	37974792-37974564	$7.8e^{-115}$	100	Gm13
118	105	814-931	37974460-37974343	$4.1e^{-55}$	100	Gm13
140	77	932-1071	37974267-37974128	$1.6e^{-66}$	100	Gm13
168	132	1072-1239	37973997-37973830	$1.0e^{-81}$	100	Gm13
156	78	1240-1395	37973753-37973598	$1.2e^{-74}$	100	Gm13
369	146	1396-1764	37973453-37973088	0	98.9	Gm13

2.4 *GmAHR1* 基因与其它同源基因的比对分析

为了获得大豆 *GmAHR1* 基因与其它同源基因的关系,用 DNAMAN 5.0 对 2 个 *GmAHR1* 基因编码产

物进行了系统发育分析(图 2)。由系统发育分析可以看出,*GmAHR1* 和 *GmAHR2* 的相似性最高。与其它物种的同源基因相比,与豌豆(*Pisum_sativum*)

的相似性最高,然后依次为衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、新隐生球菌(*Cryptococcus neoformans*)、裂殖酵母 972H(*Schizosaccharomyces pombe_972h*)基因,而与裂殖酵母 972H(*Shizosaccharomyces pombe_972h*)的相似度最低。

从 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上下载豌豆、拟南芥、衣藻、新隐生球菌、裂殖酵母 972H 物种的 *AHRI* 基因序列,利用 DNAMAN 软件进行了多序列联配。从联配结果(结果未显示)可知,虽然 *AHRI* 基因来自多个不同物种,但基因存在着较高的保守性,联配的一致性达到了 31.93%。

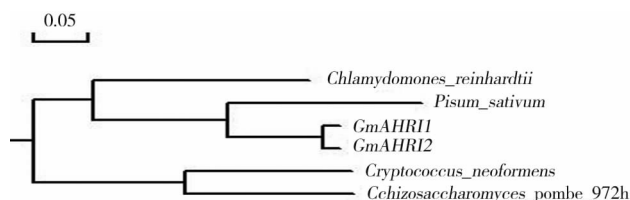


图2 大豆 *GmAHRI1* 和 *GmAHRI2*

基因编码产物的系统发育分析

Fig.2 Dendrogram of deduced amino acid sequence of *GmAHRI1* and *GmAHRI2* gene in soybean

3 讨论

经 RT-PCR 克隆了大豆的 *GmAHRI*s 基因,经序列分析验证,结果与实验室之前电子克隆序列并非完全一致,而且发现该基因有 2 个拷贝。大豆乙酰羟酸异构还原酶基因 *GmAHRI* 与豌豆的 *AHRI* 基因序列一致性最高,但还是在很多的位置出现碱基错配。因为种质资源不同,基因型存在差异,但关键的保守结构域都完全保留。该研究所用材料是种质资源中异亮氨酸含量较高的和龙早熟豆,因此对和龙早熟豆中的 *GmAHRI* 基因克隆有更大的研究价值。

该研究确定 *GmAHRI* 基因家族至少含有 2 个基因, *GmAHRI1* 和 *GmAHRI2*,从而证明了大豆是四倍体。在最近的很多研究中均发现大豆的多数基因在基因组中均有 2 个或 2 个以上的拷贝^[10],如大豆耐盐基因^[11],脂肪酸合成基因^[12],抗逆基因^[13]等,甚至部分基因还会出现 2 个以上的基因,只是结构比较完整的有 2 个,其它的多为基因片段,可能为假基因。大豆功能基因拷贝数多使得大豆基因功能研究更加复杂,需要对每个基因进行较为细致的研究才有可能获得准确的结论。

从大豆品种和龙早熟豆中所研究克隆的 2 个 *GmAHRI* 基因在氨基酸水平上的相似性达到了

96.71%,并且它们的三级结构相同,但它们二级结构有差异,并且分别定位于 Gm12 与 Gm13 染色体,进一步说明 2 个基因为同一基因的 2 个拷贝,功能相似。大豆基因组的测序表明这 2 个染色体存在大片段的重复^[14],这为 *GmAHRI* 基因的 2 个家族成员的存在提供了合理解释。但 2 个家族成员的具体功能及其差异还需要进一步的研究。该研究首次获得了大豆 *GmAHRI1* 与 *GmAHRI2* 基因并对其进行了生物信息学分析,为大豆乙酰羟酸异构还原酶基因在植物基因工程、生物技术及生物化学上的应用奠定了基础。

参考文献

- [1] Nichols C E, Haliwal B D, Lockyer M, et al. High-resolution structures reveal details of domain closure and "half-of-sites-reactivity" in *Escherichia coli* aspartate b-semialdehyde dehydrogenase [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 341: 797-806.
- [2] Dumas R, Joyard J, Douce R. Purification and characterization of acetohydroxy acid reductoisomerase from spinach chloroplasts [J]. *Biochemical Journal*, 1989, 262: 971-976.
- [3] Wessel P M, Biou V, Dorce R, et al. A loop deletion in the plant acetohydroxy acid isomerase reductase homodimer generates an active monomer with reduced stability and altered affinity [J]. *Biochemistry*, 1998, 37: 12753-12760.
- [4] Curien G, Dumas R, Douce R. Nucleotide sequence and characterization of a cDNA encoding the acetohydroxy acid isomerase reductase from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Molecular Biology*, 1993, 21: 717-722.
- [5] Nooden L D, Leopold A. The phenomenon of senescence and aging, in senescence and aging in plants [M]. San Diego: Academic Press, 1988.
- [6] Xu H S, Xu Y J, Gu X S, et al. Cloning and analysis of a cDNA encoding acetohydroxy acid isomerase reductase from G2 pea [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2001, 46: 1808-1812.
- [7] Dumas R, Biou V, Hagland F, et al. Enzymology, structure and dynamics of acetohydroxy acid isomerase reductase [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2001, 34: 399-408.
- [8] 于妍, 姜威, 唐敬仙, 等. 利用 EST 数据克隆大豆天冬氨酸代谢途径关键酶基因 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(4): 651-658. (Yu Y, Jang W, Tang J X, et al. Cloning of key enzyme genes on aspartic acid metabolic pathway in soybean based on EST data [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2009, 28(4): 651-658.)
- [9] 于妍, 姜威, 唐敬仙, 等. 大豆天冬氨酸代谢途径关键酶基因电子定位与结构分析 [J]. *大豆科学*, 2010, 29(1): 22-27. (Yu Y, Jang W, Tang J X, et al. Electronic mapping and structure analysis of key enzyme genes on aspartic acid metabolic pathway in soybean [J]. *Soybean Science*, 2010, 29(1): 22-27.)

(下转第 737 页)

一个量化的指标即文库的库容量来衡量,它是指构建出的原始突变基因文库中所包含的独立的重组子克隆数。该试验利用 CaCl_2 的化学方法进行转化,库容量达到 1.77×10^6 cfu,如采用电转法,建立高效的电转体系,转化率可望达到 $10^9 \sim 10^{10}$ [7],库容量会获得极大扩充,文库会更具代表性。

目前国内外研究较多的是与 SBP 同属 III 类过氧化物酶的辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP), 二者结构和功能相似,但 SBP 较 HRP 具有来源容易、耐热性能高、酸碱稳定性好等优点,更符合工业应用要求。然而,迄今为止对 SBP 的研究主要集中在分离纯化层面上 [8],有关基因修饰与改造的研究报道很少。该研究旨在利用易错 PCR 等蛋白质工程技术对大豆过氧化物酶基因进行随机突变,提高酶的活性,获得催化效率提高的突变株应用于生产。大豆过氧化物酶基因随机突变文库的构建为进行体外分子进化筛选及研究大豆过氧化物酶分子结构与功能关系奠定了基础。

参考文献

- [1] Nissim M, Feis A, Smulevich G. Characterization of soybean seed coat peroxidase: resonance raman evidence for a structure-based classification of plant peroxidases [J]. *Bio-spectroscopy*, 1998, 4 (6): 355-364.
 - [2] 季钟煜, 费锦鑫. 辣根过氧化物酶及其同工酶 [J]. *生命的化学*, 1992, 12 (3): 30-32. (Ji Z Y, Fei J X. Horseradish peroxidase and its isozyme [J]. *Chemistry of Life*, 1992, 12 (3): 30-32.)
 - [3] Chen H, Vierling R A. Molecular cloning and characterization of soybean peroxidase gene families [J]. *Plant Science*, 1999, 150 (2): 129-137.
 - [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning* [K]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 55-56.
 - [5] 顾春华, 廖世奇. 抗菌肽 DCD-1L 的随机突变及在毕赤酵母中的表达 [J]. *食品与药品*, 2010, 12 (1): 24-27. (Gu C H, Liao S Q. Random mutation of antibacterial peptide DCD-1L and expression in *Pichia pastoris* [J]. *Food and Drug*, 2010, 12 (1): 24-27.)
 - [6] 苏怡丹, 伍宁丰, 刘国安. 蛋白质定向进化技术的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2009 (11): 43-47. (Su Y D, Wu N F, Liu G A. Research on directed evolution of protein [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2009 (11): 43-47.)
 - [7] Dower W J, Miller J F. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation [J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16: 6127.
 - [8] 严群, 张建国, 徐芝勇. 大豆过氧化物酶研究进展 [J]. *中国粮油学报*, 2005, 20 (3): 51-53. (Yan Q, Zhang J G, Xu Z Y. The research progress of soybean peroxidase [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2005, 20 (3): 51-53.)
 - [9] 黄瑛, 蔡勇, 杨江科, 等. 基于易错 PCR 技术的短小芽孢杆菌 YZ02 脂肪酶基因 *BpL* 的定向进化 [J]. *生物工程学报*, 2008, 24 (3): 445-451. (Huang Y, Cai Y, Yang J K, et al. Directed evolution of lipase of *Bacillus pumilus* YZ02 by error-prone PCR [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 24 (3): 445-451.)
 - [10] 杨锦, 冯红, 万民远, 等. 短小芽孢杆菌碱性蛋白酶基因的随机突变 [J]. *应用与环境生物学报*, 2010, 16 (1): 96-99. (Yang J, Feng H, Wan M Y, et al. Random mutation of alkaline protease gene in *Bacillus pumilus* [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2010, 16 (1): 96-99.)
 - [11] 张少平, 崔堂兵, 陈亮, 等. 豆豉纤溶酶的定向进化 [J]. *华南理工大学学报 (自然科学版)*, 2010, 38 (9): 138-145. (Zhang S P, Cui T B, Chen L, et al. Directed evolution of Douchi fibrinolytic enzyme [J]. *Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition)*, 2010, 38 (9): 138-145.)
 - [12] Zha D, Eipper A, Reetz M. Assembly of designed oligonucleotides as an efficient method for gene recombination: a new tool in directed evolution [J]. *ChemBioChem*, 2003, 4 (1): 34-39.
 - [13] 张赛, 邢克克, 胡亚冬, 等. 基于易错 PCR 的黄曲霉素解毒酶体外分子定向进化 [J]. *生物工程学报*, 2011, 27 (7): 1100 - 1108. (Zhang S, Xing K K, Hu Y D, et al. Directed evolution of aflatoxin detoxifzyme in vitro by error-prone PCR [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2011, 27 (7): 1100 - 1108.)
 - [14] Tetsuko N, Toshiiji T, Makoto T, et al. An in vitro evaluation of a thermo stable pectate lyase by using error-prone PCR [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004, 27: 127-131.
 - [15] Li H M, Chen J, Li Y H. Enhanced activity of yqhD oxidoreductase in synthesis of 1,3-propanediol by error-prone PCR [J]. *Progress in Natural Science*, 2008, 18 (12): 1519-1524.
-
- (上接第 730 页)
- [10] 樊妙姬, 陈丽梅, 马庆生. 根瘤菌共生结瘤基因的分子遗传学研究进展 [J]. *遗传*, 1998, 20 (2): 43-48. (Fan M J, Chen L M, Ma Q S, et al. The advance in molecular genetic of rhizobium symbiotic nodulation genes [J]. *Hereditas*, 1998, 20 (2): 43-48.)
 - [11] 刘 昀, 李冉辉, 郑易之, 等. 大豆 PM2 蛋白及其结构域可提高烟草耐盐性 [J]. *深圳大学学报 (理工版)*, 2007, 24 (1): 95-101. (Liu J, Li R H, Zheng Y Y, et al. Soybean PM2 protein and its 22-mer region enhance salt tolerance of tobacco plants [J]. *Journal of Shenzhen University (Science & Engineering)*, 2007, 24 (1): 95-101.)
 - [12] Tang G Q, Novitzky W P, Carol G H, et al. Oleate desaturase enzymes of soybean: evidence of regulation through differential stability and phosphorylation [J]. *The Plant Journal*, 2005, 44 (3): 433-436.
 - [13] 王晓波, 蒋凌雪, 魏利, 等. 外源抗草甘膦 *EPSPs* 基因在大豆基因组中的整合与定位 [J]. *作物学报*, 2010, 36 (3): 365-375. (Wang X B, Jiang L X, Wei L, et al. Integration and insertion site of *EPSPs* gene on the soybean genome in genetically modified glyphosate-resistant soybean [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2010, 36 (3): 365-375.)
 - [14] Jeremy S, Steven B C, Jessica S, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean [J]. *Nature*, 2010, 463: 178-183.