IFS 转基因大豆的鉴定及高异黄酮植株的筛选

祁延萍,刘雅婧,许乐义,王凌妍,朴哲主,崔光赫,闫 帆,王庆钰

(吉林大学 植物科学学院,吉林 长春 130062)

摘 要:大豆异黄酮是一种广泛应用的保健性活性物质,近年来已成为衡量大豆品质的重要指标之一。异黄酮合酶是大豆异黄酮合成途径中的关键酶基因之一,其在植物中的表达效率直接影响异黄酮含量。为进一步验证该基因的功能并获得高异黄酮稳定遗传转基因植株,本试验基于已有的 *IFS* 转基因材料开展研究。将其扩繁至 T_2 代,考种分析植株农艺性状,发现转基因植株的性状指标未发生明显变化,PCR 鉴定 *IFS* 转基因后代的结果显示:在 125 株转基因植株中,60 株为阳性,占比 48%,说明 *IFS* 在后代中可稳定遗传。选取 *IFS* 转基因吉林 35、Willimas 82 品种 T_2 代的 41 株,利用改良后的三波长法测定籽粒中大豆异黄酮的含量,结果显示:*IFS* 转基因植株的平均异黄酮含量为 1.2 $mg \cdot g^{-1}$;其中15 株的异黄酮含量高于非转基因植株,占比达到 36.6%,说明从转入 *IFS* 基因转基因大豆能够筛选出高异黄酮植株。本研究获得了稳定遗传的高异黄酮植株,为大豆遗传育种提供优异的种质资源;改良后的三波长法较原有方法更为精准、快速。

关键词:大豆;*IFS*;异黄酮含量;三波长法

中图分类号:S565.1 **文献标识码**:A **DOI**:10.11861/j.issn.1000-9841.2017.06.0857

Identification of *IFS* Transgenic Soybean and Selection of Plant with High Isoflavones

QI Yan-ping, LIU Ya-jing, XU Le-yi, WANG Ling-yan, PIAO Zhe-zhu, CUI Guang-he, YAN- Fan, WANG Qing-yu

(College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: As a healthy active substances, soybean isoflavones have obvious effects in the prevention of cancer, osteoporosis, cardiovascular disease and women's climacteric syndrome. *IFS* is one of the key enzymes in the pathway of isoflavone biosynthesis and it had a positive effect on the content of isoflavones in soybean seeds, but we still haven't get stable and efficient transforms. Therefore, it is very important to improve the content of soybean isoflavones by studying isoflavone synthase pathway. In this study, after propagating *IFS* transgenic plants to T_2 generation, physiological indexes in transgenic plants had no obviously changes by agronomic traits analyzing. After identifying *IFS* transgenic soybeans by RT-PCR analysis, there were 60 *IFS* transgenic soybeans in 125 plants, accounting for 48%. This result indicated that *IFS* was stablily inherited in offspring. We used the modified three wavelength method to measure the isoflavone content and results showed that the average isoflavone content was 1.2 $mg \cdot g^{-1}$ in *IFS* transgenic plants. Among the 41 *IFS* positive plants, isoflavone content of 15 individual plants were higher than that of the non-genetically modified plants, which accounted for 36.6%. The *IFS* had a certain effect on the improvement of isoflavone content and it is possible to select plants with high isoflavones in *IFS* transgenic soybeans. This study clarified the effect of *IFS* on the content of isoflavones in transgenic soybean and obtained transgenic soybean containing much soybean isoflavones and provided an excellent germplasm resource for soybean breeding at the meantime. In additionally, the improved three wavelength method was more accurate and faster.

Keywords: Soybean; *IFS*; Isoflavone content; Three wavelength method

大豆异黄酮是从大豆中提取的一种生物活性物质,主要分布于大豆的种皮、胚轴和子叶中[1],被称为天然植物雌激素[2],在预防心血管疾病、预防骨质疏松、抗肿瘤和抗癌等方面具有重要的作用[3],还能有效改善更年期妇女综合征[4],近几年已成为衡量大豆品质的重要指标之一。异黄酮的合成源自黄烷酮合成途径中的中间代谢产物,而异黄酮合酶(isoflavone synthase, IFS)在黄烷酮代谢途径转入异黄酮代谢途径中起了关键作用[5-6],它是该转换过程中的第一步反应酶,迄今已在各种植物中发现了近百种由 IFS 酶催化而来的异黄酮化合物,主要有染料木素、大豆苷元和黄豆黄素以及它们的糖苷衍生化合物。如今随着生活水平的不断提高,人们越来越重视健康,大豆异黄酮也被广泛

收稿日期:2017-04-27

基金项目:吉林大学大学生创新创业训练计划(2015821253);农业部转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08004003-004)。

第一作者简介:祁延萍(1995 -),女,学士,主要从事大豆分子育种研究。E-mail:qiyp@mails.jlu.edu.cn。

通讯作者:王庆钰(1963 -),女,博士,教授,主要从事基因工程在育种上的应用与植物杂种优势的理论及其应用研究。E-mail:qywang@jlu.edu.cn。

作为保健类活性物质。以往大豆异黄酮的研究与开发主要以加工提取为主,产品多为药物中间体,供特殊人群保健需要,很少从提高大豆中异黄酮含量的生物学角度入手,从食物源头来提高异黄酮含量,进而预防疾病发生。随着分子生物学研究的发展,近年来,已经有很多通过转化单个酶基因来提高异黄酮含量的报道,但转基因大豆异黄酮表达的高效性和稳定性还有待进一步研究。

本试验基于研究室前期已获得的 *IFS* 转基因材料,研究了 T_2 代转基因植株的农艺性状表现、转 *IFS* 基因的遗传,用优化的三波长法测定阳性转基因植株中异黄酮的含量,以期获得高异黄酮含量且稳定遗传 *IFS* 转基因大豆。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆品种为吉林 35 和 Willimas 82 的 *IFS* 转基因材料。吉林 35 是吉林省农业科学院大豆研究所育成的高脂肪型中熟大豆新品种,生育期 126 d,适宜在≥10℃有效积温 2 700 ~ 2 900℃以上地区种植。质粒 pCB35SR1R2GFP-*IFS*2,含 *Bar* 基因。以上材料均由吉林大学植物科学学院植物种质资源与利用研究室提供。

主要试剂:三波长测定异黄酮含量所需的染料木苷(美国 sigma 公司),*Taq* 酶和 PCR 所需试剂(TAKARA 公司),国产分析纯无水乙醇(北京化工厂)。

1.2 方法

1.2.1 *转基因植株大田扩繁* T_2 代种植:共 3 个株系,编号为 S1(吉林 35)、S2(吉林 35)、S3(Willimas 82)。于 2016 年 5 月 9 日在吉林大学试验田进行单粒点播,株距 20 cm,行间距 20 cm。其中 S1、S2 和 S3 株系分别播种 40,35 和 50 粒,共计 125 粒种子。

1.2.2 *IFS 转基因大豆鉴定* 利用 Primer Premier 5 设计引物,用于鉴定阳性转基因植株的引物根据 *Bar* 基因序列设计,上游引物序列为:5′- AAACCCACGTCATGCCAGCTC-3′;下游引物序列为:5′-CGACAAGCACGGTCAACTTC-3′,扩增片段长度为 417 bp。其次用 CTAB 法提取 T_2 代 *IFS* 转基因大豆的总 DNA,然后通过 PCR 来鉴定 T_2 代 *IFS* 转基因大豆,PCR 反应体系为:10 × buffer (Mg^{2+}) 2.5 μL,dNTP 2 μL,正义引物 1 μL,反义引物 1 μL,DNA 模板 1 μL,DNA 聚合酶 0.3 μL,加 ddH_2O 至总体积 25 μL。PCR 条件:94℃预变性 10 min;94℃变性 50 s,60℃退火 50 s,72℃延伸 30 s,共 30 个循环;72℃延伸 10 min,4℃保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳 EB 染色后,在凝胶成像仪下观察条带。

1.2.3 *转基因植株农艺性状调查* 2016 年 9 月分别统计各扩繁后代株高、分枝数、单株荚数、绒毛颜色等农艺性状。挂写标签,单株收获,悬挂于种子挂藏室。收获后对晾干的植株进行单株考种。单株脱粒过程中完成对种皮颜色、种脐颜色、粒数的统计,然后用天平称量粒重,并计算百粒重。此后,通过近红外谷物综合分析仪测定 T_2 代植株的蛋白质和脂肪含量。

1.2.4 *三波长法测定异黄酮含量* 基于本实验室前期研究者张艳等[7]三波长测定异黄酮的基础,综合鞠兴荣等[8]、王哲等[9]、赵健如[10]的理论方法,将超声波法提取异黄酮改良为水浴锅加热法提取,并且保持料液比为 1:20,测定异黄酮含量。

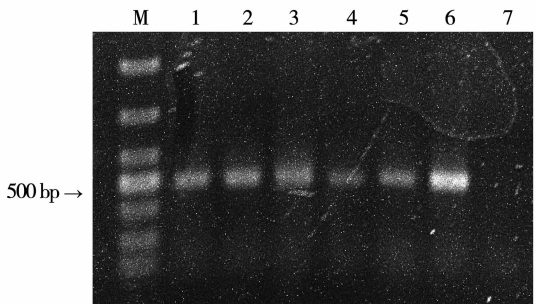
1.3 数据分析

采用 Excel 2013 进行数据统计。

2 结果与分析

2.1 T_2 代转基因阳性植株的鉴定

T_2 代种植 125 株转 *IFS* 基因植株,108 株成熟并收获,经 PCR 鉴定阳性植株有 60 株(表 1,图 1)。其中 S1 株系种植 40 株,最终收获 33 株,其中阳性植株 20 株;S2 株系种植 35 株,最终收获 28 株,阳性植株 14 株;S3 株系种植 50 株,收获 47 株,有 26 株呈阳性。



M:DNA 分子量标准;1 ~ 5:部分阳性 *IFS* 转基因植株样品;6:阳性对照(质粒);7:阴性对照(H_2O)。

M: DNA marker; 1-5: Some positive samples of *IFS* transgenic plants; 6: Positive control (plasmid); 7: Negative control (H_2O).

图 1 *IFS* PCR 产物电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis patterns of *IFS* PCR product

2.2 T_2 代转基因植株农艺性状分析

由表 2 可知,转 *IFS* 基因植株中的蛋白质含量、脂肪含量、分枝数、荚数、绒毛色、种皮、种脐、粒数和百粒重与非转基因植株无显著性差异,株高与非转基因植株间存在显著差异($P < 0.05$)。表明 *IFS* 不影响大豆的其它性状指标。

表 1　各株系转基因植株鉴定结果

Table 1　The identify result of different *IFS* transgenic strains

株系 Line	种植株数 Number of tested plants	收获株数 Number of gained plants	阳性株数 Number of positive plants
S1	40	33	20
S2	35	28	14
S3	50	47	26
总计 Total	125	108	60

此外,由表 2 可知,*IFS* 转基因植株各株系同非转基因大豆在蛋白质、脂肪、株高、分支、荚数、绒毛色、种皮、种脐、粒数和百粒重方面基本无差异,仅株高和非转基因植株存在显著性差异。其中,S1 株系的百粒重和非转基因植株有显著性差异,而且株高比较中,S1 株系最矮。此外,S2 株系的荚数和粒数与非转基因植株存在 0.05 水平显著差异,而百粒重无差异,今后应对其遗传稳定性做进一步的研究。综上,绝大多数 *IFS* 转基因植株较非转基因植株各农艺性状无显著性变化,*IFS* 转入大豆对绝大多数大豆品种的性状指标不造成影响。

表 2　*IFS* 转基因植株各株系与非转基因植株间农艺性状的比较

Table 2　Difference in physiological indexes of different *IFS* transgenic soybean strains and non-genetically modified soybean

农艺性状 Economical character	*IFS* 转基因植株 *IFS* transgenic plants				非转基因植株 Non-genetically modified plants
	S1	S2	S3	总计 Total	
绒毛色 Fuzz color	灰 Gray	灰 Gray	灰 Gray	灰 Gray	灰 Gray
种皮 Sporniderm	黄 Yellow	黄 Yellow	黄 Yellow	黄 Yellow	黄 Yellow
种脐 Umbilicus	黄 Yellow	黄 Yellow	黄 Yellow	黄 Yellow	黄 Yellow
蛋白质含量 Protein content	42.44 abc	42.84 ab	42.90 a	42.73 a	43.05 a
脂肪含量 Fat content	22.27 a	22.11 a	22.26 a	22.21 a	22.32 a
株高 Shoot height	54.30 d	97.87 ab	96.00 ab	82.73 a	69.21 c
分枝 Branch number	0 a	2.40 a	0.40 a	0.93 ab	0.36 a
荚数 Pod number	51.33 b	125.33 a	46.00 b	74.22 ab	48.14 b
粒数 Seed number	130.33 b	231.73 a	102.00 b	154.69 ab	96.36 b
百粒重 100-seed weight	14.74 c	21.34 a	19.15 ab	18.41 a	20.30 ab

不同小写字母代表差异显著($P<0.05$)。下同。

Different lowercase indicate significant difference ($P<0.05$). The same below.

2.3　转基因植株异黄酮含量分析

经鉴定转 *IFS* 阳性植株共计 60 株,从中挑选 41 株进行异黄酮含量的测定,对吉林 35 和 Williamas 82 转 *IFS* 株系与非转基因植株间单株异黄酮含量进行分析比较。结果显示:S1 和 S2 株系间平均异黄酮含量无显著性差异($P>0.05$),S1、S2 与其受体品种吉林 35 间无显著差异($P>0.05$);S3 株系与其受体品种 Williamas 82 间平均异黄酮含量无显著性差异($P>0.05$)(表 3)。

表 3　各品(株)系间异黄酮含量比较

Table 3　Comparison of isoflavone content in different varieties(lines)

品(株)系 Varieties (strains)	异黄酮含量 Isoflavone content /(mg·g^{-1})	异黄酮含量增幅 The increase of isoflavone content/%
S1	1.22 b	-22.57
S2	1.27 b	-19.33
S3	1.03 c	7.74
吉林 35 Jilin 35	1.57 ab	-
Willimas 82	0.95 c	-

鉴于以上结果,统计分析了吉林 35 和 Williamas 82 各转基因株系 T_2 各单株异黄酮含量,10 株 S1 株系样本中有 2 株异黄酮含量高于非转基因植株,分别高 5.6% 和 13.7%;12 株 S2 株系转基因植株中有 3 株异黄酮含量高于非转基因植株,分别高 22.3%、14.8% 和 69.1%;19 株 S3 株系转基因植株中有 10 株异黄酮含量高于非转基因植株,分别高 36.8%、15.8%、51.3%、46.6%、19.1%、30.8%、39.7%、51.3%、35.3%、10.9%(表 4)。由此得出,虽然吉林 35 和 Williamas 82 的转基因植株异黄酮含量平均值与非转基因间无显著性差异,但在转基因植株后代中仍能选出高异黄酮植株。综上,3 个株系 41 株转基因植株中高异黄酮植株达到 15 株,占比 36.6%,说明转入 *IFS* 能够筛选出高异黄酮植株。同时 S1 株系中高异黄酮植株占 20%;而 S2 株系中高异黄酮植株占 25%;S3 株系中高异黄酮植株占 52.7%,说明不同株系所获得高异黄酮植株的量是不同的,为了获得高异黄酮植株,需要增加转基因植株的数量。

表 4 各转基因株系单株异黄酮含量比较

Table 4 Comparison of isoflavone content of each transgenic plant

株系 Line	单株编号 Individual number	异黄酮含量 Isoflavone content /(mg·g^{-1})	异黄酮含量增幅 The increase of isoflavone content/%	株系 Line	单株编号 Individual number	异黄酮含量 Isoflavone content /(mg·g^{-1})	异黄酮含量增幅 The increase of isoflavone content/%
S1	14.10	1.18	-25.5	S3	18.16	1.30	36.8
	14.11	1.17	-26.1		18.17	1.10	15.8
	14.12	0.96	-39.0		18.19	1.44	51.3
	14.16	0.63	-60.2		18.20	0.75	-21.8
	14.18	1.67	5.6		18.21	0.83	-13.4
	14.19	0.96	-39.2		18.25	1.40	46.6
	14.20	1.49	-5.8		18.30	1.14	19.1
	14.60	0.86	-45.3		18.30	1.25	30.8
	14.70	1.79	13.7		18.33	0.39	-58.6
	14.80	1.52	-3.9		18.34	1.33	39.7
S2	15.11	1.93	22.3		18.35	0.51	-46.4
	15.10	1.81	14.8		18.39	1.44	51.3
	15.10	1.54	-2.4		18.40	1.29	35.3
	15.20	0.81	-48.8		18.40	0.89	-6.8
	15.22	1.27	-19.5		18.41	0.84	-12.1
	15.24	1.00	-37.0		18.43	0.76	-19.8
	15.26	1.01	-35.8		18.46	0.92	-3.7
	15.30	1.03	-34.7		18.48	1.06	10.9
	15.40	0.75	-52.4		18.50	0.88	-7.9
	15.50	0.82	-47.9				
	15.60	0.64	-59.7				
	15.90	2.67	69.1				

为了进一步研究各 *IFS* 转基因株系间异黄酮含量的异同,从吉林 35、Williamas 82 的转基因植株中挑选高异黄酮含量高于平均值的植株,比较其异黄酮含量平均增幅。S1、S2 和 S3 株系高异黄酮含量株系的异黄酮含量增幅分别为 9.7%、35.4% 和 33.7%,S2 和 S3 株系虽转基因受体的品种不同,但其高异黄酮含量株系的转基因植株异黄酮提高量无显著性差异($P>0.05$);而 S1 株系高异黄酮含量植株的提高量较 S2、S3 存在显著性差异($P<0.05$),说明不同转基因株系获得高异黄酮植株比率和绝对值是有差异的。综上所述,为了获得稳定遗传的高异黄酮植株,要增大转基因量,从大量转基因株系中筛选到高异黄酮转基因植株,为大豆高异黄酮育种提供优异的种质资源。

3 讨 论

3.1 高异黄酮含量转基因植株的筛选鉴定

研究发现,*IFS* 是进入异黄酮合成途径的第一个酶[11],故提高 *IFS* 在大豆中的表达对异黄酮含量的提高有着重要意义[12],本研究将 *IFS* 转基因材料 T_2 代种植于转基因释放基地,后期鉴定转基因阳性植株,并与非转基因植株异黄酮含量进行差异分析,以筛选高异黄酮植株。结果发现,41 株阳性样本植株中,高异黄酮植株占 36.6%,说明转入 *IFS* 后可获得高异黄酮植株;而 3 个株系随着种植株数的增加,获得的高异黄酮植株数量也在增加,说明为获得更多高异黄酮植株,应增加基因的遗传转化数量。其中非转基因吉林 35 籽粒中大豆异黄酮含量为 1.57 mg·g^{-1},S1 株系高异黄酮植株的大豆异黄酮含量是非转基因吉林 35 的 1.1 倍,S2 株系高异黄酮植株的大豆异黄酮含量是非转基因吉林 35 的 1.4 倍;而非转基因 Williamas 82 籽粒中大豆异黄酮含量为 0.95 mg·g^{-1},S3 株系高异黄酮植株的大豆异黄酮含量是非转基因 Williamas 82 的 1.3 倍。而赵健如[10]的研究中发现:非转基因吉林 47 籽粒中异黄酮总量是 3.886 mg·g^{-1}。其中 T_1 代经 HPLC 法测定异黄酮含量发现 IFS-1 株系的大豆异黄酮总量几乎是非转基因吉林 47 的 3 倍。IFS-2 株

系和 IFS-3 株系大豆异黄酮总量是非转基因吉林 47 的 2 倍多。IFS-4 株系、IFS-5-1 株系、IFS-5-2 株系和 IFS-6 株系大豆异黄酮总量均高于非转基因吉林 47。通过对以上 T_1 和 T_2 代异黄酮含量测定结果的比较,发现 T_2 代中 *IFS* 对异黄酮含量的积累仍有较大贡献,说明 *IFS* 可稳定高效遗传。综上,为获得更多高异黄酮含量且稳定遗传的植株,提高 *IFS* 在大豆籽粒中的表达,然后加大转基因的转化量是行之有效的途径。

3.2　转基因植株对农艺性状的影响

经后期 PCR 鉴定转基因阳性植株,并与非转基因植株进行表型差异分析,125 株转基因植株中阳性植株有 60 株,占 48%,说明 *IFS* 正在后代中可稳定遗传;而绝大多数 *IFS* 转基因植株各农艺性状较非转基因植株无显著性变化,说明转入 *IFS* 对大豆品种的绝大多数性状指标不造成影响。

3.3　三波长法测定异黄酮含量方法的改良效应

目前检测大豆异黄酮含量的方法大体可以分为 3 类,分别为色谱原理、紫外吸收特性和医学免疫检测法[10]。其中,紫外吸收特性有紫外分光光度法(UV)和三波长法(TL-UV),这两种方法主要用于总异黄酮的检测。紫外分光光度法特异性差,耗时也长,但回收率高,适于异黄酮趋势快速检测;而采用三波长法测定大豆异黄酮含量,能有效消除随浓度不同发生的本底漂移、油脂等干扰物质及吸收峰不对称给定量分析造成影响,适合多次快速提取,操作简便,特异性较高,具有良好的准确性和精密度[8],并且仪器价格低廉。本研究进一步优化了三波长法测定大豆异黄酮的方法。改良后的三波长法在进行异黄酮含量测定时,有如下两点优化效果:(1)张艳等[7]的超声波法提取异黄酮,一次只能提取十几个样,而采用水浴锅加热法提取时,可一次性提取近 100 个样品,且用时仅 2 h,基于大批量的试验样本,可明显缩短试验时间,适用于不具备超声波细胞粉粹机的研究室应用;(2)较鞠兴荣等[8]的方法优化了异黄酮提取的料液比,使之保持在 1∶20。如此,乙醇从原来的每个样本 60 mL 缩减到了 18 mL,用量只需原来的 1/3,大幅节约了成本,并提高了异黄酮提取效率。

4　结　论

本研究基于 *IFS* 转基因材料,经鉴定、测量、分析比较最终获得 15 株高异黄酮植株,说明 *IFS* 能够提高大豆籽粒中的异黄酮含量,但为了获得更多且更稳定的高异黄酮植株,仍需要进一步加大转基因的转化量。未来可以尝试加大多个异黄酮相关基因在同一株植株中的表达量,以此实现异黄酮含量的增高,同时可避免转化率不高带来的损失。

参考文献

[1] 李卫东, 周鹏. 异黄酮及其在非豆科植物中生成的研究进展[J]. 分子植物育种, 2005, 3(6): 888-894. (Li W D, Zhou P. Research progress of isoflavones and synthesized in Non-legumes[J]. Molecular Plant Breeding, 2005, 3(6): 888-894.)

[2] 高秀芝, 刘慧, 丁雪莲, 等. 大豆异黄酮的研究与应用进展[J]. 食品科学, 2004(11):386-391. (Gao X Z, Liu H, Ding X L, et al. Progress on the study and application of soybean isoflavones[J]. Food Science, 2004(11): 386-391.)

[3] 钱丹丹, 龚德顺, 焦丽, 等. 大豆异黄酮合成关键酶基因的克隆及表达分析[J]. 大豆科学, 2011, 30(5): 743-748. (Qian D D, Gong D S, Jiao L, et al. Cloning and expression analysis of key enzymes genes in biosynthesis of soybean isoflavones[J]. Soybean Science, 2011, 30(5): 743-748.)

[4] 陈宣钦, 张乐, 徐慧妮, 等. 大豆异黄酮生物合成关键酶及其代谢工程研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(7): 133-138. (Chen X Q, Zhang L, Xu H N, et al. Key enzymes in soybean isoflavones biosynthesis and its metabolic engineering[J]. China Biotechnology, 2012, 32(7): 133-138.)

[5] 郑晓宣, 徐荣艳, 陈家宽, 等. 植物的异黄酮合酶[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(4): 388-394. (Zheng X X, Xu R Y, Chen J K, et al. Isoflavone synthase in plant[J]. Plant Physiology Communications, 2010, 46(4): 388-394.)

[6] 练云, 李海朝, 王树峰, 等. 大豆异黄酮生物合成途径 *IFS*2 基因表达分析[J]. 华北农学报, 2013, 28(3): 25-29. (Lian Y, Li H C, Wang S F, et al. Expression analysis of *IFS*1 gene in isoflavone pathway in soybean[J]. Acta Agriculture Boreali-Sinica, 2013, 28(3): 25 -29.)

[7] 张艳, 李晓薇, 张海军, 等. 大豆异黄酮提取-测定优化体系的建立[J]. 大豆科学, 2011, 30(1): 141-146. (Zhang Y, Li X W, Zhang H J, et al. Establishment of an optimized system about extraction-determination of soybean isoflavone[J]. Soybean Science, 2011, 30(1): 141-146.)

[8] 鞠兴荣, 袁建, 汪海峰. 三波长紫外分光光度法测定大豆异黄酮含量的研究[J]. 食品科学, 2001, 22(5): 46-48. (Ju X R, Yuan J, Wang H F. Research of the determination of soybean isoflavone content by three-wavelengths UV spectrophotometry[J]. Food Science, 2001, 22(5): 46-48.)

[9] 王哲, 白志明, 田娟娟, 等. 紫外分光光度法测定大豆异黄酮含量[J]. 中国油脂, 2005, 30(1): 52-53. (Wang Z, Bai Z M, Tian J J, et al. Determination of soybean isoflavones content by ultraviolet spectrophotometric method[J]. China Oils and Fats, 2005, 30(1): 52-53.)

[10] 赵健如. 大豆子叶节遗传转化体系的优化及基因 *IFS*2 和 *CHI* Ⅱ的遗传转化[D]. 长春: 吉林大学, 2014: 28-30. (Zhao J R. Optimization of soybean cotyledonary-node genetic transformation system and gene *IFS*2, *CHI* Ⅱ genetic transformation[D]. Changchun: Jilin University, 2014: 28-30.)

[11] 马君兰, 李成, 魏颖, 等. 异黄酮的生物合成途径及其调控[J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(5): 692-696. (Ma J L, Li C, Wei Y, et al. The biosynthetic pathways and regulation of isoflavones[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2007, 38(5): 692-696.)

[12] Jung W, Yu O, Lau S C, et al. Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes[J]. Nature Biotech, 2000, 18: 208-212.