

大豆 *PAL2-3* 基因的克隆及转化研究

梁 冬¹,徐 红¹,秦海成¹,范 革¹,王 珣²,张大勇¹

(1. 东北农业大学 农学院,黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院 生物技术研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要:大豆异黄酮是苯丙氨酸代谢途径中合成的一类次级代谢产物,在苯丙氨酸代谢途径中,苯丙氨酸解氨酶(PAL)是关键酶和限速酶。本课题组前期研究发现 *PAL* 基因的相对表达量与大豆异黄酮含量具有明显的协同增减趋势,并且在 *PAL* 基因家族成员时空表达模式分析中发现,*PAL2-3*(XM_003542493)是 *PAL* 基因家族中相对表达量较高的主要表达成员之一。本试验首先通过克隆大豆中 *PAL2-3* 基因;然后构建 pCambia3301-*GmPAL2-3* 植物过表达载体,将构建好的 pCambia3301-*GmPAL2-3* 表达载体重组质粒转化到根癌农杆菌 EHA105 中;采用农杆菌介导的大豆子叶节转化体系获得转化植株,并对 T₁ 代转化植株进行 PPT 检测,外源标记基因 *Bar* 检测以及荧光定量 PCR 检测,对转基因阳性植株进行大豆籽粒异黄酮含量的测定。结果表明 T₁ 代转基因植株中 *PAL2-3* 基因的表达量是对照的 5.11 ~ 11.24 倍,总异黄酮含量最高的(2 587.63 μg·g⁻¹)是对照(1 616.90 μg·g⁻¹)的 1.6 倍。因此在大豆中过量表达 *PAL2-3* 基因可以提高大豆籽粒中异黄酮含量。

关键词:大豆;*PAL2-3* 基因;重组载体;转基因;大豆异黄酮

中图分类号:S565. 1 **文献标识码:**A **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2017. 04. 0508

Cloning and Transformation of the *PAL2-3* Gene in Soybean (*Glycine max* L.)

LIANG Dong¹, XU Hong¹, QIN Hai-cheng¹, FAN Ge¹, WANG Xun², ZHANG Da-yong¹

(1. Agronomy College of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Biotechnology Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: Soybean isoflavones are a class of secondary metabolites synthesized in the phenylalanine metabolic pathway. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) is a key enzyme and rate-limiting enzyme in the phenylalanine metabolic pathway. In the preliminary study, we found that the relative expression of *PAL* gene and soybean isoflavone content had a significant synergistic trend, and it was found that *PAL2-3* (XM_003542493) was one of the major expression members with high relative expression in *PAL* gene family. In this study, we firstly cloned the *PAL2-3* gene in soybean, then constructed the pCambia3301-*GmPAL2-3* plant overexpression vector and transformed it into *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. The transgenic plants were obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system, and the T₁ transgenic plants were determined by PPT, exogenous marker gene *Bar* and quantitative PCR. The determination of isoflavones in soybean seeds was carried out on the identified transgenic plants. The results showed that the expression level of *PAL2-3* gene in T₁ transgenic plants was 5.11 ~ 11.24 times of the control, and the highest of total isoflavones (2 587.63 μg·g⁻¹) was 1.6 times of the control (1 616.90 μg·g⁻¹). Therefore, overexpression of *PAL2-3* gene in soybean could increase the content of isoflavones in soybean seeds.

Keywords: Soybean; *PAL2-3* gene; Recombinant vector; Transgenic; Soybean isoflavone

1961 年,Koukol 和 Conn^[1] 首次在植物中发现了苯丙氨酸解氨酶(PAL),它是连接初级代谢和苯丙烷类代谢、催化苯丙烷类次级代谢的第一步反应的酶,是苯丙烷类代谢的关键酶和限速酶^[2]。苯丙烷代谢途径产生的多种次生代谢物是植物中重要的活性成分,在医药、保健和食品工业等领域的研究具有良好的应用前景^[4]。近年来,关于苯丙氨酸代谢途径关键酶的研究越来越多,因为通过调节这些酶的表达活性可有效调节与之相应的次级代谢产物的生物合成,根据人类的意愿培育出生产生活所需的植物新品种,例如低木质素含量的造纸原料树种、高异黄酮含量的大豆品种等^[3]。

目前已经从大豆^[5]、豌豆^[6]、水稻和小麦^[7]等多种植物中分离纯化得到 *PAL*。有研究表明 *PAL* 在植物组织中的表达具有组织特异性,同时也受到发育的调控,同一个 *PAL* 基因家族中不同 *PAL* 基因家族成员的表达模式也不尽相同^[8]。在大多数植物中,*PAL* 的表达量在根部和成熟的花中最高,而茎中的表达水平中等,在成熟叶片中几乎不表达。菜豆的 3 个 *PAL* 基因 *PAL1*、*PAL2* 和 *PAL3* 都在根部大量表达;而在芽中 *PAL1* 和 *PAL2* 有表达;叶中则仅 *PAL1* 有表达;在花瓣中 *PAL2* 大量表达,*PAL1* 表达量很少,*PAL3* 基本不表达^[9]。在大豆中,*PAL* 在根部和成熟的花中表达量最高,在茎中的表达水平中

收稿日期:2017-03-20
基金项目:国家自然科学基金(31101168);黑龙江省科技厅国际科技合作项目(WC05B10)。
第一作者简介:梁冬(1991-),男,硕士,主要从事作物遗传育种研究。E-mail:dongnongld@163.com。
通讯作者:张大勇(1976-),男,教授,硕士,主要从事作物遗传育种研究。E-mail:dongnongzhangdy@163.com。

等,成熟的叶片中几乎不表达^[8]。王静^[10]研究发现不同大豆品种的 *PAL2* 酶基因的相对表达量与不同品种成熟籽粒中异黄酮含量具有协同增减的趋势。侯鹏等^[11-12]从 *PAL* 基因家族成员着手,分析了各基因在不同生育时期不同部位的表达情况,结果表明在大豆根部 *PAL2-1* (NM_001250027)、*PAL2-3* (XM_003542493) 基因各个时期内表达量较稳定,在生殖生长后期大豆籽粒中 *PAL2-1* 和 *PAL2-3* 基因相对表达量先后达到最高值。因此推测 *PAL2-3* 基因的表达量影响着大豆籽粒中异黄酮含量,而关于这方面的研究尚未见报道。

为了验证这一推测本研究克隆了大豆 *PAL2-3* 基因,将 *PAL2-3* 基因连接到过表达载体 pCambia3301 上,利用农杆菌介导的大豆子叶节转化体系将 pCambia3301-*GmPAL2-3* 转化到大豆中,对获得的 *T*₁ 代转基因植株进行表达量分析及功能验证,来揭示过表达 *PAL2-3* 基因对异黄酮含量的影响,为进一步阐明该基因的功能奠定理论基础,为 *PAL2-3* 基因应用于提高大豆异黄酮含量提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆 (*Glycine max* L.) 受体材料品种为东农 50,由东北农业大学大豆研究所提供;试验用大肠杆菌菌株 DH5 α 、植物表达载体 pCambia3301、根癌农杆菌 EHA105 均由大豆生物学教育部重点实验室保存;限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Pml* I、*Taq* 酶、克隆载体 pGM-T Vector、T4-DNA 连接酶购自天根生化科技(北京)有限公司;PCR 引物合成和 DNA 测序均由哈尔滨博仕生物技术有限公司完成;其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取与基因克隆 取大豆品种东农 50 的 R7 期籽粒,迅速加入液氮研磨至粉末,提取总 RNA,具体提取步骤按照试剂盒说明书进行。用 2% 琼脂糖凝胶电泳检验提取的 RNA 质量。取 1 μ L RNA,加入到 20 μ L 反应体系中反转录合成第一链 cDNA,合成方法参照试剂盒说明书。根据 *PAL2-3* 基因的 CDS 全长序列,利用 Premier 5.0 设计 1 对特异引物, F: 5'-GAAGATCTCTCCTCGATTTTACCGCA-3' (下划线为 *Bgl* II 酶切位点), R: 5'-AACA-GAAGAAAACAAACTAACAAA-3'。采用 RT-PCR 的方法扩增基因,扩增体系含 10 \times PCR Buffer 2 μ L、dNTP Mixture 0.3 μ L、引物上下游 (10 μ mol \cdot L⁻¹) 各 0.5 μ L、*Taq* 酶 0.3 μ L、模板 cDNA 1 μ L、ddH₂O 补至 20 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增产物胶回收纯化后连接到 pGM-T 克隆载体上,

转化到大肠杆菌 DH5 α 和转化重组质粒进行 PCR 检测,酶切鉴定,送测序分析。

1.2.2 植物 pCambia3301-*GmPAL2-3* 表达载体构建 将鉴定出的 pGM-T/*PAL2-3* 重组质粒和 pCambia3301 植物表达载体分别用 *Bgl* II 和 *Pml* I 进行双酶切,胶回收 *PAL2-3* 片段和 pCambia3301 载体片段, T₄-DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 过夜连接后转入到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,选取单克隆提取质粒,并进行 *Gm PAL2-3* 特异引物 PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳及双酶切检测转化重组质粒。

将构建好的过表达 pCambia3301-*GmPAL2-3* 重组载体利用冻融法导入到根癌农杆菌 EHA105 中,制成含有 pCambia3301-*GmPAL2-3* 的农杆菌菌液, -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.3 农杆菌介导的大豆遗传转化 采用农杆菌介导的方法,将制备好的含有 pCambia3301-*GmPAL2-3* 的农杆菌菌液侵染大豆品种东农 50 的子叶节,具体转化方法和培养基的配制参见姬月梅等^[13]的试验方法。

1.2.4 T₀ 代转基因大豆植株的 PCR 检测 待 T₀ 代转化植株长得比较健壮后,采用改良后的 CTAB 大量法^[14],提取转化植株和对照植株叶片的基因组 DNA。根据外源标记基因 *bar* 设计引物, barF: 5'-ATATCCGAGCGCCTCGTGCAT-3', barR: 5'-GGTCT-GCACCATCGTCAACCACT-3' 对基因组 DNA 进行 PCR 检测。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 反应体系同 1.2.1 节。

1.2.5 T₁ 代转基因大豆植株的 PPT 检测 将 T₀ 代检测出的转基因阳性再生植株收种子后种植于花盆中,同时再种植 1 株对照植株,待第一个三出复叶叶片完全展开后,用棉签涂抹 125 mg \cdot L⁻¹ 的 PPT 溶液于大豆叶片上,3 d 后拍照观察大豆叶片的变化。

1.2.6 T₁ 代转基因大豆植株的 PCR 检测 提取对 PPT 有抗性的 T₁ 代大豆植株和对照植株叶片的基因组 DNA^[14],对外源标记基因 *Bar* 进行 PCR 扩增,方法参照 1.2.4 节。

1.2.7 T₁ 代转基因大豆植株的 Real-time PCR 检测 提取 3 株 PCR 鉴定出的阳性 T₁ 代植株和 1 株对照植株的总 RNA,并进行反转录合成第一链 cDNA,利用 *PAL2-3* 定量引物 (F: 5'-CAATACTTG-GCGAACCCG-3'; R: 5'-TGGCAAAGTGCAATGAGG-3') 和内参基因 *TU45* 引物进行荧光定量 PCR,反应体系为 20 μ L: cDNA 1 μ L, 2.5 \times realMasterMix/20 \times SYBR solution 10 μ L; 引物 1.5 μ L; ddH₂O 7.5 μ L。反应步骤为三步反应法: 95 $^{\circ}$ C 15 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 60 ~ 95 $^{\circ}$ C 绘制溶解曲线,应用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法,分析基因相对表达量。

1.2.8 测定 T_1 代转基因植株大豆籽粒异黄酮含量
选取基因相对表达量较高的 T_1 代植株成熟豆粒进行异黄酮含量测定,具体参照张晓波等^[15]测定方法,用高效液相色谱仪系统测定^[16]。3 次重复试验,计算结果取平均值。

1.3 数据分析

数据用 DPS 7.5 和 Excel 2007 进行处理。

2 结果与分析

2.1 PAL2-3 基因的克隆及载体构建

2.1.1 总 RNA 的提取与 PAL2-3 基因的克隆 以提取的总 RNA 反转录合成 cDNA 第一链为模板进行 PAL2-3 基因的克隆,扩增条带的电泳结果(图 1)显示在2 100 bp 左右有一条特异性条带,胶回收后测序,与目的片段一致,大小为2 151 bp。

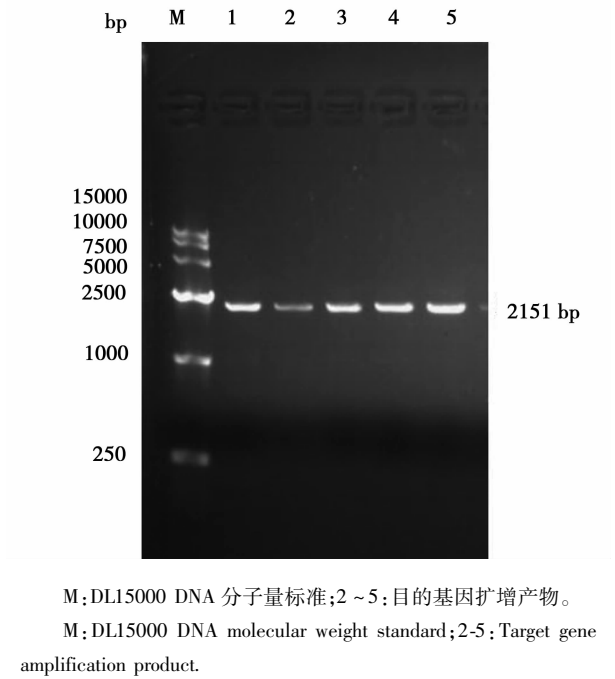


图 1 PAL2-3 基因序列扩增产物

Fig. 1 PAL2-3 gene sequence amplification products

2.1.2 pCAMBIA3301-GmPAL2-3 重组载体共整合
将 *GmPAL2-3* 基因连接到 pCAMBIA3301 载体上,连接产物双酶切检测结果如图 2,酶切后为2 151 bp 和9 290 bp 两条片段,分别与目的片段和酶切载体

片段大小一致,未酶切连接产物大小约为11 441 bp,说明 *GmPAL2-3* 已成功连到 pCAMBIA3301 载体上。图 3 为 pCAMBIA3301-*GmPAL2-3* 重组质粒结构图。

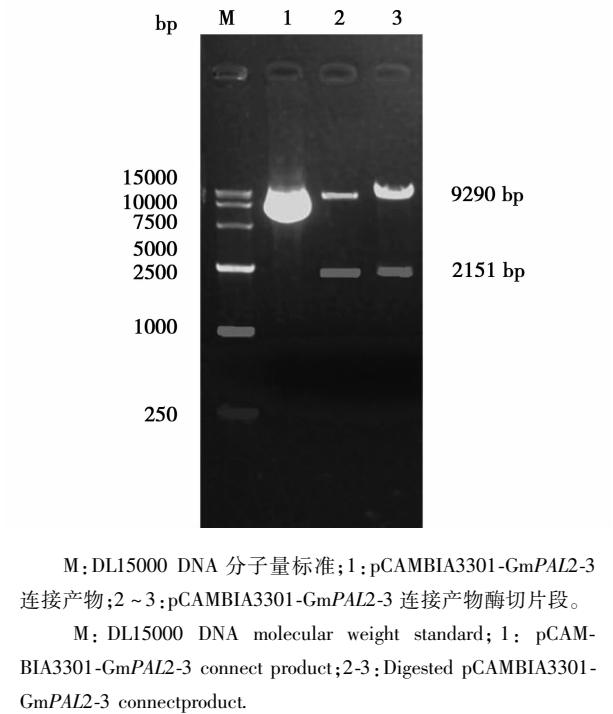


图 2 pCAMBIA3301-*GmPAL2-3* 连接产物双酶切检测

Fig. 2 Double enzyme digestion of pCAMBIA3301-*GmPAL2-3* connect product

将表达载体质粒 pCAMBIA3301-*GmPAL2-3* 转入根癌农杆菌 EHA105 感受态细胞中,以转化菌的单克隆质粒 DNA 为模板进行 PAL2-3 特异引物 PCR 检测,转化菌液质粒 DNA 能特异的扩增出约2 151 bp 大小的片段,说明重组质粒 pCAMBIA3301-*GmPAL2-3* 已成功转入根癌农杆菌 EHA105 中。

2.2 PAL2-3 基因的转化

2.2.1 子叶节法进行大豆遗传转化 采用根癌农杆菌介导法,将制备好的含有 pCAMBIA3301-*GmPAL2-3* 的根癌农杆菌感染大豆品种东农 50 的子叶,进行大豆遗传转化,过程包括暗培养、恢复、筛选、伸长、生根(图 4)。

本研究共获得 216 株过表达 PAL2-3 基因植株。

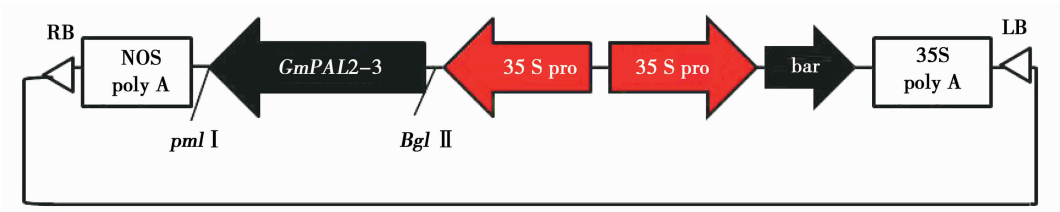
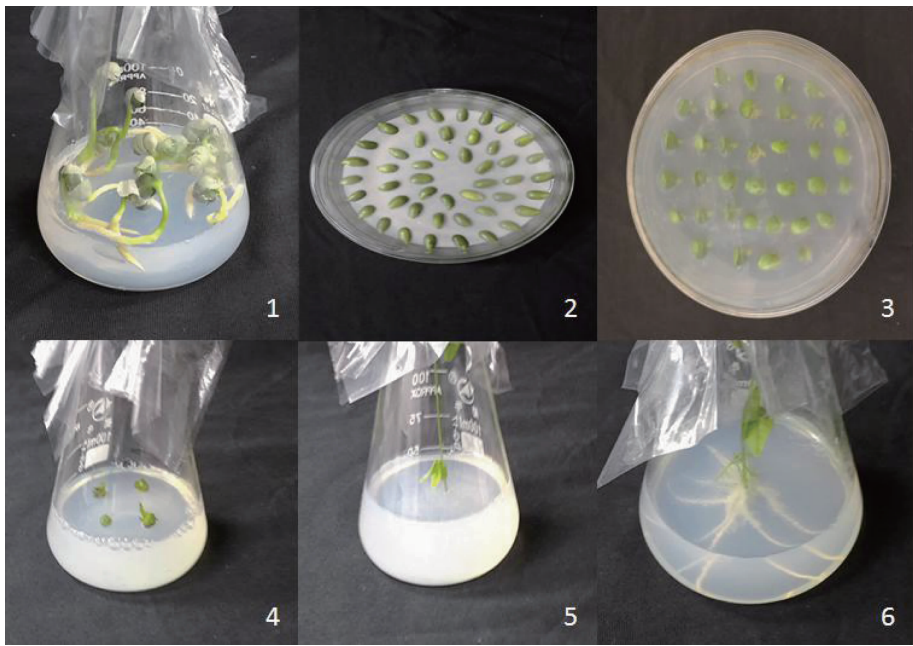


图 3 pCAMBIA3301-*GmPAL2-3* 重组质粒结构图

Fig. 3 Structure of recombinant plasmid pCAMBIA3301-*GmPAL2-3*



1: 无菌苗;2: 共培养;3: 恢复培养;4: 筛选培养;5: 伸长培养;6: 生根培养。
1: Sterile seedlings;2: Co-culture;3: Resume culture;4: Screening culture;5: Elongation culture;
6: Rooting culture.

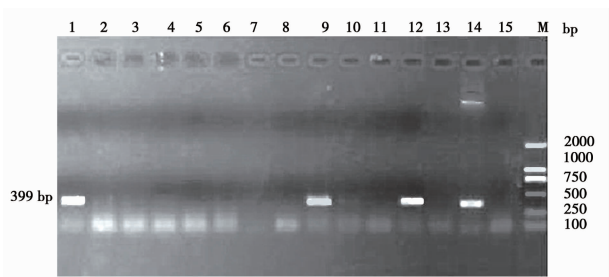
图 4 大豆遗传转化过程
Fig. 4 The process of soybean transformation

2.2.2 T_0 代转基因大豆植株的 PCR 检测 提取 T_0 代转基因大豆植株叶片的基因组 DNA,以基因组 DNA 为模板,外源标记基因 *Bar* 引物进行 PCR 扩增,将 PCR 扩增产物电泳检测结果如图 5 所示。在同一批次检测的 12 个植株中,有 3 株植株的基因组 DNA 扩增出的目的条带(编号 1、9、12)与阳性对照扩增出的目的条带大小相符(编号 14),均为 399 bp 左右,而阴性对照和 DNase Free 水均未扩增出条带。在不同转化批次的所有 T_0 代再生植株中,共检测出 20 株阳性转化植株。

2.2.3 T_1 代转基因大豆植株的 PPT 检测 PPT 涂抹后 3d,涂抹部位叶片变化如图 6 所示。转基因植株叶片轻微变黄,对 PPT 有抗性;对照植株叶片涂抹部位全部变黄,并且叶片变皱,对 PPT 无抗性,本试验共筛选出抗 PPT 的过表达转基因植株 25 株。

2.2.4 T_1 代转基因大豆植株的 PCR 检测 将 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 7 所示,从提取的总 DNA 中扩增出的目的条带(编号 4、8、10、11、12、13)与阳性对照扩增出的目的条带(编号 1)大小相符,大约为 399 bp,而阴性对照和 DNase Free 水均未扩增出条带。所以可以确定扩增出目的条带的为转基因植株,并且说明 *PAL2-3* 基因已整合到基因组 DNA 中。

2.2.5 T_1 代转基因大豆植株的 Real-time PCR 检测 实时荧光定量 PCR 检测转基因植株中 *PAL2-3* 基因的相对表达量结果如图 8 所示,3 株过表达植株的 *PAL2-3* 表达量与对照相比达到差异极显著水平,并且是对照表达量的 5.11 ~ 11.24 倍。



M:DL2000 DNA 分子量标准;1~12: T_0 代过表达转基因大豆不同植株 PCR 扩增产物;13: 阴性对照;14: 阳性对照;15: DNase Free 水。
M: DL2000 DNA molecular weight standard;1-12: T_0 generation of transgenic soybean plants PCR products;13: Negative control;14: Positive control;15: DNase Free water.

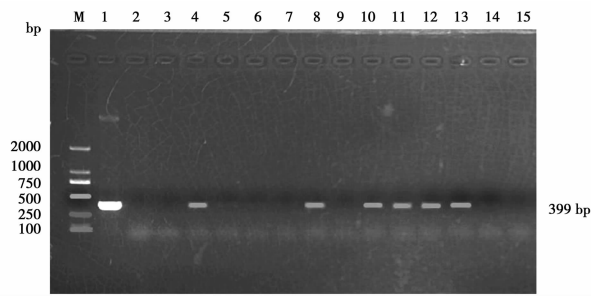
图 5 T_0 代转基因大豆植株 PCR 扩增的部分结果
Fig. 5 The partial results of PCR amplification of T_0 transgenic soybean plants



1、2:转基因植株;3:对照植株。
1, 2: Transgenic plant;3: CK.

图6 T₁代转基因大豆植株的PPT检测

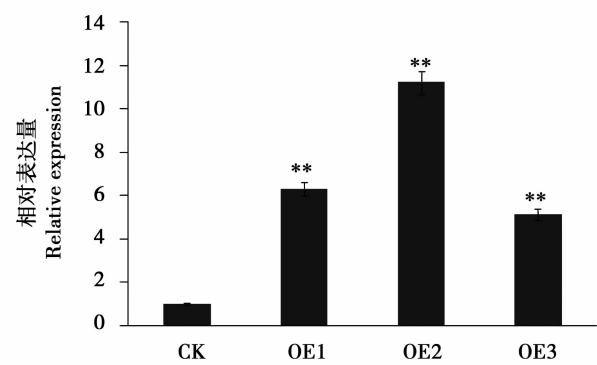
Fig. 6 PPT detection of T₁ transgenic soybean plants



M:DL2000 DNA 分子量标准;1:阳性对照;2:阴性对照;3: DNase Free 水;4~15:T₁代过表达转基因大豆不同植株 PCR 扩增产物。
M: DL2000 DNA molecular weight standard;1: Positive control;2: Negative control;3: DNase free water;4-15: T₁ Generation of transgenic soybean plants PCR products.

图7 T₁代转基因大豆 PCR 检测

Fig. 7 T₁ transgenic soybean by PCR detection



CK:非转基因大豆植株;OE1、OE2、OE3:过表达 *PAL2-3* 基因植株。
CK: Non-transgenic soybean plants;OE1, OE2, OE3: Overexpressing *PAL2-3* gene plants.

图8 T₁代转基因大豆植株中 *PAL2-3* 基因的相对表达量
Fig. 8 Relative expression of *PAL2-3* gene in T₁ transgenic soybean

2.3 *PAL2-3* 基因对大豆籽粒异黄酮含量的影响

3株 *PAL2-3* 基因相对表达最高的 T₁ 代转基因植株的大豆籽粒中大豆黄素、黄豆黄素、染料木黄素含量分别为 472. 23,186. 99,953. 26 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,分别是对照大豆籽粒中异黄酮含量的 1. 2,1. 5,1. 9 倍,有极显著性差异,并且过表达植株中总异黄酮含量(2 587. 63 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)是对照植株(1 616. 90 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)的 1. 6 倍(图9)。3株阳性植株中 *PAL2-3* 表达量越高,染料木素的含量也相应的越高,大豆黄素和黄豆黄素的含量则相对较稳定,并且 *PAL2-3* 表达量越高的植株中总异黄酮含量也越高。因此,在大豆中过量表达 *PAL2-3* 基因可以提高大豆籽粒中异黄酮含量。

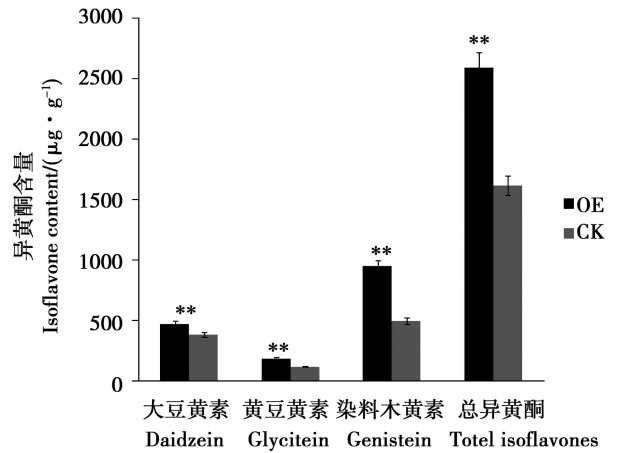


图9 T₁代转基因大豆籽粒中异黄酮含量
Fig. 9 Isoflavone content in T₁ transgenic soybean seed

3 结论与讨论

苯丙氨酸代谢途径是植物最重要的次生代谢途径之一,其下游产物包括异黄酮、植保素、木质素等多种次生代谢产物。在苯丙氨酸代谢途径中苯丙氨酸解氨酶(PAL)是起始酶和关键酶^[1],其活性

影响着整个途径的活跃程度。异黄酮代谢途径是苯丙氨酸代谢途径的一个分支,也就是说异黄酮的合成也受苯丙氨酸解氨酶活性的调控。为了探究异黄酮的合成与苯丙氨酸解氨酶表达量的关系,本课题组前期研究发现不同大豆品种间 *PAL2* 的相对表达量与大豆籽粒异黄酮含量存在一定的协同关系,其活性的高低影响着大豆籽粒异黄酮的积累^[10],之后本课题又在 *PAL* 家族基因 8 个成员时空表达的研究中发现 *PAL2-3* 基因在各部位相对表达量高于其它同家族基因,并且 *PAL2-3* 基因在生殖生长后期出现表达峰值^[11]。也就是说在大豆籽粒成熟过程中 *PAL2-3* 基因表达量达到最大,那么也可以反映出 *PAL2-3* 基因表达量和大豆成熟籽粒中异黄酮含量的积累更为密切。因此本试验为了验证 *PAL2-3* 基因对大豆籽粒中异黄酮含量的影响,克隆了大豆 *PAL2-3* 基因,并且通过农杆菌介导大豆子叶节遗传转化的方式,在大豆中过量表达 *PAL2-3* 基因,研究发现在过量表达 *PAL2-3* 基因的 *T₁* 代植株中,*PAL2-3* 基因的相对表达量是对照植株的 5.11 ~ 11.24 倍,之后又对 *PAL2-3* 基因相对表达量高的植株进行大豆籽粒异黄酮含量的测定,测定结果表明 *PAL2-3* 基因表达量越高的转基因植株,其总异黄酮含量也越高,是对照植株大豆籽粒中异黄酮含量的 1.6 倍,说明 *PAL2-3* 基因过量表达后可以提高大豆籽粒中异黄酮含量的积累,同时也验证了本课题组前期的发现,*PAL* 基因的相对表达量与大豆异黄酮含量具有明显的协同趋势,但对 1 个基因功能的研究还不够全面,*PAL2-3* 基因沉默表达后对大豆籽粒中异黄酮含量的影响还不清楚,以及 *PAL2-3* 基因是如何来调控大豆籽粒中异黄酮含量积累的机制也尚不清楚,有待于后续试验的进一步研究。

参考文献

[1] Koukol J, Conn E E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1961, 236(10): 2692-2698.

[2] Jiang C J, Yu Y B. Advances of studies on phenylalanine ammonia-lyase[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2001, 28(4): 425-430.

[3] 董艳珍. 植物苯丙氨酸解氨酶基因的研究进展[J]. 生物技术通报, 2006(S1): 31-33. (Dong Y Z. Research advances on plant phenylalanine ammonia-lyase gene[J]. Biotechnology Bulletin, 2006(S1): 31-33.)

[4] 李莉, 赵越, 马君兰. 苯丙氨酸代谢途径关键酶: PAL、C4H、4CL 研究新进展[J]. 生物信息学, 2007, 5(4): 187-189. (Li L, Zhao Y, Ma J L. Recent progress on key enzymes: PAL, C4H, 4CL of phenylalanine metabolism pathway[J]. China Journal of

Bioinformatics, 2007, 5(4): 187-189.)

[5] Havir E A. Phenylalanine ammonia-lyase: purification and characterization from soybean cell suspension cultures[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1981, 211(2): 556-563.

[6] Munn C B, Drysdale R B. Kievitone production and phenylalanine ammonia-lyase activity in cowpea[J]. Phytochemistry, 1975, 14(5): 1303-1307.

[7] 欧阳光察, 应初衍, 沃绍根, 等. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究—VI. 水稻、小麦 PAL 的纯化及基本特性[J]. 植物生理学报, 1985, 11(2): 204-214. (Ouyang G C, Ying C Y, Wo S G, et al. Studies on plant phenylalanine ammonia-lyase(PAL)—VI purification and some properties of PAL from etiolated seedlings of rice (*ORYZA SATIVA*) and wheat (*TRITICUM AESTIVUM*) [J]. Plant Physiology Communications, 1985, 11(2): 204-214.)

[8] 张必弦, 李炜, 来永才, 等. 大豆苯丙氨酸解氨酶及其基因的研究进展[J]. 大豆科学, 2008, 27(6): 1058-1061. (Zhang B X, Li W, Lai Y C, et al. Advances of studies on soybean phenylalanine ammonia-lyase and its gene[J]. Soybean Science, 2008, 27(6): 1058-1061.)

[9] Cramer C L, Edwards K, Dron M, et al. Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure[J]. Plant Molecular Biology, 1989, 12(4): 367-383.

[10] 王静. 异黄酮合成代谢途径中关键酶基因表达及底物差异研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015. (Wang J. The difference of expression of key enzyme genes and the metabolic substrates in isoflavones biosynthetic pathway [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2015.)

[11] 侯鹏, 梁冬, 张卫国, 等. 苯丙氨酸解氨酶基因家族在大豆中的时空表达研究[J]. 作物杂志, 2016(2): 57-62. (Hou P, Liang D, Zhang W G, et al. Study on temporospatial expression of PAL gene family in soybean[J]. Crops, 2016(2): 57-62.)

[12] 侯鹏. 大豆 PAL 基因家族时空表达及 PAL2-1 基因对异黄酮含量调控的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016. (Hou P. Studies on the temporospatial expression of soybean PAL gene family and PAL2-1 gene regulation of content isoflavones [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2016.)

[13] 姬月梅, 陈受宜, 李英慧, 等. 农杆菌介导大豆子叶节遗传转化体系的优化研究[J]. 大豆科学, 2008, 27(1): 26-32. (Ji Y M, Chen S Y, Li Y H, et al. Optimization of genetic transformation system from soybean cotyledon mediated by *Agrobacterium* [J]. Soybean Science, 2008, 27(1): 26-32.)

[14] 李荣华, 夏岩石, 刘顺枝, 等. 改进的 CTAB 提取植物 DNA 方法[J]. 实验室研究与探索, 2009, 28(9): 14-16. (Li R H, Xia Y S, Liu S Z, et al. CTAB-improved method of DNA extraction in plant[J]. Research and Exploration in Laboratory, 2009, 28(9): 14-16.)

[15] 张晓波, 吴岩, 林红. 高效液相色谱测定水解大豆中异黄酮方法研究[J]. 粮食与油脂, 2006(4): 19-21. (Zhang X B, Wu Y, Lin H. Study on method of hydrolyze isoflavone in soybean by HPLC[J]. Cereals & Oils, 2006(4): 19-21.)

[16] 徐颖. 高效液相色谱法检测大豆异黄酮含量[J]. 粮油食品科技, 2006(6): 33-35. (Xu Y. Determination of the soybean isoflavone content by HPLC[J]. Science and Technology of Cereals, oils and Foods, 2006(6): 33-35.)