

鸭梨多酚氧化酶基因反义表达载体的构建 及农杆菌介导的遗传转化

李桂琴^{1,2}, 齐 靖¹, 高志华², 许冬倩², 李会宣², 张玉星¹

(¹河北农业大学园艺学院, 保定 071001; ²河北经贸大学生物科学与工程学院, 石家庄 050061)

摘要:根据鸭梨多酚氧化酶基因序列设计引物, PCR 扩增该基因 3' 端 450bp 的片段, 并将该片段反向插入真核表达载体 pBI121 的 CaMV 35S 启动子和 NOS 终止子之间, 首次构建了鸭梨 *PPO* 基因的反义表达载体; 其后, 在农杆菌 EHA105 的介导下, 成功实现了 *PPO* 反义基因对鸭梨组培苗的遗传转化。经 Northern 杂交和酶活检测证实, 转基因鸭梨植株体内的多酚氧化酶基因转录和翻译水平均得到明显抑制, 从而为耐褐化梨新品种的培育奠定了基础。

关键词:鸭梨; 多酚氧化酶; 反义表达载体; 遗传转化

Construction and Transformation for Antisense Expression Vector of Polyphenol Oxidase Gene in Yali Pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.)

LI Gui-qin^{1,2}, QI Jing¹, GAO Zhi-hua², XU Dong-qian², LI Hui-xuan², ZHANG Yu-xing¹

(¹Horticulture College, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001; ²College of Biology Science and Engineering, Hebei University of Economic and Business, Shijiazhuang 050061)

Abstract: In this paper, a cDNA fragment of 450 bp which located on the 3' terminal of polyphenol oxidase (*PPO*) gene was amplified from Yali pear by using RT-PCR method, then the antisense expression vector was constructed by inserting the fragment of Yali pear *PPO* gene between the CaMV promoter and NOS terminator of the expression vector pBI121 in reverse orientation. After that, with agrobacterium-mediated method, the *PPO* antisense gene was transformed into Yali plants. Northern blot analysis and Enzyme activity assay showed that the *PPO* activities in the transgenic Yali plants were significantly decreased compared with the non-transformed Yali plants. This will lay a good foundation for breeding new varieties of pears which resistant to browning in the future.

Key words: Yali pear; Polyphenol oxidase; Antisense expression vector; Genetic transformation

鸭梨 (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) 原产我国, 是我国主栽梨品种之一, 也是我国出口创汇的重要果品。在果品生产后期, 鸭梨果实的褐变给果品的运输、贮藏和销售带来诸多不便并造成一定的经济损失, 因此有必要对其进行遗传改良。前人研究证实, 多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, *PPO*) 基因的大量表达是促使果实褐变的主要原因之一, 抑制果实组织中多酚氧化酶的表达将会起到降低褐变、延长保鲜期的作用^[1-3]。近年来, 利用反义技术降低植物中多酚氧化酶水平已在马铃薯上取得了一定的进

展^[4-7]。本研究借助反义 RNA 技术构建 *PPO* 基因的反义表达载体, 并在农杆菌介导下实现了对鸭梨组培苗的转化, 从而为日后培育耐褐化梨新品种奠定了基础, 为其他果树耐褐化新品种的培育提供了优质种质资源, 也为反义 RNA 技术在鸭梨遗传改良研究中的进一步应用提供了参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 试材为鸭梨, 定植于河北省农林

收稿日期: 2009-06-02 修回日期: 2010-02-03

基金项目: 河北省科技攻关计划项目 (042401116D-2)

作者简介: 李桂琴, 教授, 博士, 主要从事植物分子生物学方面研究。E-mail: liguiqin@heuet.edu.cn

通讯作者: 张玉星, 教授, 博导, 主要从事果树种质资源与育种研究。E-mail: jonsonzhxy@yahoo.com.cn

科学院果树研究所梨园。取成熟鸭梨果实用于克隆鸭梨 *PPO* 基因的 RNA 提取。利用本实验室已成功建立的鸭梨叶片不定芽再生体系诱导成的鸭梨叶片愈伤组织作为遗传转化受体材料。

1.1.2 质粒及菌株 pGEM-T Vector 购自 Promega 公司;农杆菌 EHA105 由河北师范大学分子遗传实验室朱正歌老师馈赠;pBI121 菌株和 *E. coli* DH5 α 感受态细胞由本实验室保存。

1.1.3 酶及试剂 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、反转录酶 M-MLV、DNA Marker 购自 Promega 公司;Oligo(dT)₁₅、*Taq* 酶、dNTP、DNA 片段回收试剂盒和基因组提取试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;质粒小量制备试剂盒为北京赛百盛公司产品;地高辛高效标记和检测试剂盒 I 为罗氏公司产品;MOPS、去离子甲酰胺、20 \times SSC、正电尼龙膜、马来酸购自上海生工;其他常规试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成 鸭梨总 RNA 提取和纯化参照改良 CTAB 法^[8]进行,以 1% 琼脂糖电泳检测 RNA 的完整性。纯化后的 RNA 在反转录酶 M-MLV 的作用下,以 Oligo(dT)₁₅ 为引物,按照反转录酶 M-MLV 使用说明书进行反转录,合成 cDNA 第一链。

1.2.2 *PPO* 基因片段的扩增 根据已发表的鸭梨 *PPO* 基因 CDS 序列(EU048225)^[9],利用 Oligo6.0 软件设计 1 对 PCR 扩增引物,A1(5'-AAGCTGG-GAGTTGCTCAGCAACTGT-3')与 A2(5'-TTAA-GAAGCAAACCTCAATCTTGATACCACC-3')。引物由上海生工合成。以 2 μ l 鸭梨反转录产物为模板,另加 10 \times PCR buffer 5 μ l,dNTP(10mmol/L)1 μ l,上、下游引物(20 μ mol/L)各 1 μ l,*Taq* 酶(5U/ μ l)1 μ l,ddH₂O 补足 50 μ l。PCR 循环参数为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min;94 $^{\circ}$ C 变性 30s,62 $^{\circ}$ C 退火 45s,72 $^{\circ}$ C 延长 1min,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

1.2.3 *PPO* 基因反义片段的克隆与测序 PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳中分离,回收目的片段,与 pGEM-T Vector 连接,借助热激法转化到 *E. coli* DH 5 α 感受态细胞,经蓝白斑筛选,质粒提取,酶切鉴定片段大小无误后送交上海生工测序。

1.2.4 反义 *PPO* 基因表达载体的构建 对经测序鉴定后鸭梨 *PPO* 基因片段反向插入在 pGEM-T Vector 多克隆位点的重组质粒以及真核表达载体 pBI121 进行 *Xba*I/*Sac*I 双酶切,用 1% 琼脂糖凝胶电

泳分离后,分别回收反义基因片段和切除 *Gus* 基因的 pBI121 线性载体并连接,转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,挑取卡那霉素(Kan)抗性单克隆,进一步扩繁。提取质粒后以 *Xba*I/*Sac*I 双酶切鉴定反义片段是否成功插入表达载体。将经鉴定的重组质粒用电击法转化农杆菌 EHA105 细胞,然后在含有链霉素(50mg/L)、卡那霉素(50mg/L)、利福平(50mg/L)的 YEB 平板上筛选阳性克隆,扩繁后提取质粒并进行酶切鉴定。

1.2.5 鸭梨的遗传转化 将预培养 2d 的鸭梨叶片愈伤组织作为遗传转化的起始材料,置于 OD₆₀₀ 为 0.4 农杆菌菌液中浸渍 5min,用滤纸吸去多余的菌液,接种于诱导选择培养基(MS + S_{30g/L} + 6-BA_{5.0mg/ml} + IAA_{0.3mg/ml} + Agar_{6.0g/L}(pH 5.8) + Kan_{5mg/L})避光共培养 2d,再加入 400 μ g/ml 的羧苄青霉素抑菌。然后将抗性芽转入芽再生选择培养基(MS + S_{30g/L} + 6-BA_{1.0mg/ml} + NAA_{0.5mg/ml} + Agar_{6.0g/L}(pH5.8) + Kan_{5mg/L} + Carb_{400mg/L})培养,待不定芽长度为 4~6cm 时,切取带有顶芽或腋芽片段 1.5~2cm,接种于生根培养基(1/2MS + IBA_{0.5mg/L} + S_{30g/L} + Agar_{6.0g/L}(pH 5.8) + Kan_{20mg/L} + Carb_{400mg/L})上培养,观察不定根的再生情况。

1.2.6 转基因鸭梨的检测 PCR 检测 根据 Genbank 上公布的 *NPT II* 基因序列设计 1 对特异性引物,N1(5'-CGTCTGTCGAGAAGTTTC-3')和 N2(5'-TACTTCTACACAGCCATC-3'),按大连宝生物工程有限公司基因组提取试剂盒提供的方法提取卡那霉素抗性转基因鸭梨 DNA,进行 PCR 扩增。取 10 μ l PCR 产物,加入 6 \times Loading Buffer 2 μ l,充分混匀后在 1% 琼脂糖凝胶、5V/cm 电压下,电泳 20min 后显影、照相。

Northern 杂交检测 根据鸭梨 *PPO* 基因 CDS 序列(EU048225)^[9]合成探针进行 Northern 杂交鉴定。Northern 探针的合成、RNA 变性电泳、RNA 转膜、预杂交和杂交、洗膜和检测杂交信号参照地高辛标记试剂盒进行。

PPO 活性的生理检测 在 5ml 用 0.2mol/L pH7.4 的柠檬酸-磷酸缓冲液配制的 0.2% 的邻苯二酚底物液中加入 0.5ml 叶片粗酶提取液,迅速混匀后,在 415nm 处准确测定酶促反应 1min 时 OD 值,每隔 10s 读数 1 次,重复 3 次,取平均值。按 25 $^{\circ}$ C 条件下反应体系每分钟增加 0.001OD 值为一个相对酶活性单位计算 PPO 活性(1U = 0.001OD 值/min \cdot ml)。

2 结果与分析

2.1 鸭梨 PPO 基因反义片段的克隆

根据已有的鸭梨 PPO 基因 cDNA 序列 (EU048225),在下游 1333 ~ 1782bp 处设计 1 对引物 A1 和 A2,以鸭梨果实 cDNA 为模板,PCR 扩增构建反义表达载体所用的 PPO 基因片段。电泳结果显示 (图 1),该片段长度为 450bp,与预期结果相一致。进一步将此片段回收后与 pGEM-T Vector 连接,并转化 *E. coli* DH 5 α 感受态细胞,经蓝白斑筛选、质粒酶切鉴定 (图 2) 无误后送交上海生工测序。测序结果显示该片段与登录号为 EU048225 序列相符,没有移码或突变发生,可用于构建反义表达载体,遂将此片段命名为 *AsPPO*。

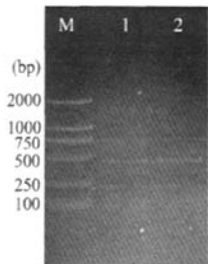


图 1 鸭梨 PPO 基因片段电泳结果
Fig.1 Agarose gel electrophoresis result of PPO fragment in Yali pear
1,2:PCR 扩增产物 PCR produces;M:Marker

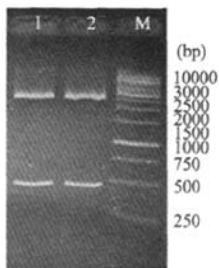


图 2 基因片段重组质粒经 *Sac* I 和 *Xba* I 双酶切产物电泳结果
Fig.2 Electrophoresis pattern of recombinant plasmid double-digested by *Sac* I and *Xba* I
1,2:重组质粒酶切结果 Recombinant plasmid double-digested by *Sac* I and *Xba* I;M:Marker

2.2 鸭梨反义 PPO 基因表达载体的构建

AsPPO 在克隆到载体 pGEM-T Vector 时存在正、反两种插入方式,选择经测序验证 *AsPPO* 反向插入 pGEM-T Vector 的重组质粒,进行 *Sac* I/*Xba* I

双酶切,电泳回收 *AsPPO* 片段,与用同样酶切的 pBI121 线性载体进行定向连接,连接反应完成后将连接产物转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,挑取卡那霉素 (Kan) 抗性单克隆,进一步扩繁。提取质粒后,经 *Sac* I/*Xba* I 双酶切鉴定证实反义片段已成功插入表达载体 (图 3)。构建的反义表达载体图谱如图 4 所示。

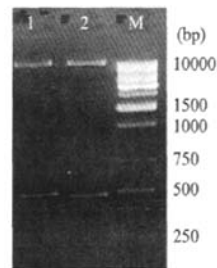


图 3 反义表达载体 pBI121-*AsPPO* 酶切鉴定结果
Fig.3 Identification of pBI121-*AsPPO* by restriction enzyme digestion
1,2:反义表达载体酶切结果 Antisense expression vector double-digested by *Sac* I and *Xba* I;M:Marker

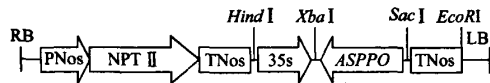


图 4 反义表达载体 pBI121-*AsPPO* 图谱
Fig.4 Diagram of antisense express vector of pBI121-*AsPPO*

将经酶切鉴定证实构建成功的鸭梨 PPO 基因反义表达载体借助电极法转化农杆菌 EHA105 细胞,在 Kan/Rif/Str 抗生素平板挑取抗性单菌落,进一步扩繁后回收质粒,以 A1 和 A2 为引物进行 PCR 鉴定。扩增产物电泳结果同图 1,再次证实鸭梨 PPO 基因反义表达载体构建成功并已导入农杆菌 EHA105,该工程菌株可直接用于下一步的遗传转化研究。

2.3 卡那霉素抗性鸭梨无菌苗的获得

叶片经农杆菌菌液侵染后,在愈伤组织诱导选择培养基 (MS + S_{30g/L} + 6-BA_{5.0mg/ml} + IAA_{0.3mg/ml} + Agar_{6.0g/L} (pH5.8) + Kan_{5mg/L}) 上对愈伤组织进行诱导和再生。经过大约 20d 左右的诱导后,共有 94 个外植体产生了愈伤组织,占外植体总数的 5.4%;其后将愈伤组织转接到诱导芽的再生培养基 (MS + S_{30g/L} + 6-BA_{1.0mg/ml} + NAA_{0.5mg/ml} + Agar_{6.0g/L} (pH5.8) + Kan_{5mg/L} + Carb_{400mg/L}) 中培养 2 ~ 4 周,共有 23 个外植体的愈伤组织长出不定芽,占外植体总数的

1.33%;在培养基中加入卡那霉素对不定芽进行两代筛选,发现19个外植体的不定芽死亡,仅有4个外植体的不定芽表现出卡那霉素抗性,占外植体总数的0.23%。

2.4 反义转基因鸭梨的检测

提取4株对Kan表现抗性的鸭梨植株总DNA,根据Genbank上公布的*NPT II*基因序列设计1对特异性引物,对鸭梨转基因植株进行PCR鉴定。图5为鸭梨转基因植株的PCR鉴定结果。以未转基因鸭梨植株DNA为模板的阴性对照(泳道1)没有扩增产物,而以反义表达载体质粒为模板的阳性对照(泳道2)和1株转基因植株(泳道5)均能扩增出800bp的目标片段,与设计长度相符,初步证实这1株鸭梨植株中反义*PPO*基因已经成功实现转化。

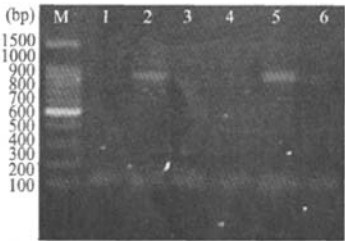


图5 鸭梨转基因植株 PCR 鉴定结果

Fig.5 PCR analysis of transgenic Yali plant

1:阳性对照;2:阴性对照;3~6:鸭梨转基因植株

1: Positive control; 2: Negative control; 3~6: Transgenic Yali plants; M: Marker

应用 Northern 杂交检测转基因鸭梨的内源*PPO*基因转录情况,分别提取了非转基因鸭梨植株叶片及经PCR鉴定为阳性的转基因鸭梨植株叶片的总RNA,转膜后进行以*PPO*基因CDS全长为探针的Northern杂交分析。结果显示(图6),在相同含量(20μg)的总RNA中,转基因鸭梨植株的*PPO*转录水平明显较对照低,再次证实*PPO*基因反义片段已成功转化目标植株并有效地抑制了目标植株内源*PPO*基因的表达。

为进一步检测反义*PPO*基因对转基因鸭梨内源*PPO*活性抑制效果,分别测定了非转基因鸭梨植株和转基因鸭梨植株的多酚氧化酶活性。从图7可以看出,转基因鸭梨植株体内多酚氧化酶活性明显低于相同反应时间下非转基因鸭梨植株体内多酚氧化酶的活性。

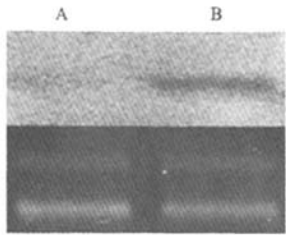


图6 *PPO* 基因在普通鸭梨与转反义*PPO* 基因鸭梨组织中的表达情况

Fig.6 Expression analysis of *PPO* gene in normal yali tissue and the tissue with anti-*PPO* gene

A:转入反义*PPO*基因的鸭梨组织;B:普通鸭梨组织。上边的条带是Northern杂交的结果,每泳道约含有20μg总RNA;底层条带为等量总RNA在EB染色下的结果

A:The tissue with anti-*PPO* gene;B:The normal tissue. The upper panel is the result of Northern blotting, about 20μg total RNA was loaded in each line, and the bottom panel was the equal amounts of total RNA loading were identified with ethidium bromide staining

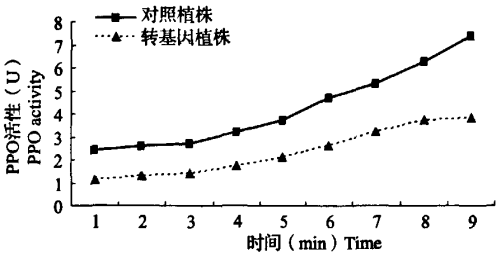


图7 对照植株与转基因植株在9min 内的酶活性测定结果

Fig.7 The result of enzyme activity in the control and transgenic plants

3 讨论

本研究首次构建了鸭梨*PPO*基因反义表达载体,并在农杆菌EHA105介导下对鸭梨叶片进行了遗传转化,经PCR和Northern blot分子检测及*PPO*活性生理检测,成功获得了转基因鸭梨植株,为研究鸭梨*PPO*基因在鸭梨树体内的表达调控及其在梨果品质改良上的应用提供了参考。由于鸭梨树系多年生木本植物,与马铃薯相比,建立再生体系难度大,遗传转化效率比较低。本试验从大批受体材料中仅检测到4个转基因植株,卡那霉素抗性苗的获得率也仅为0.23%。因此,还需要改进鸭梨转基因技术以提高遗传转化效率。此外,虽然经Northern杂交鉴定和*PPO*活性生理检测,转基因鸭梨叶片*PPO*活性有所下降,但其果实中*PPO*活性如何,还

有待其开花结果之后进行研究。

利用反义 RNA 技术抑制植物体内 *PPO* 基因的表达,从而控制酶促褐变,成为多酚氧化酶活性控制的有效手段。Bechem 等^[7]通过农杆菌介导,分别将 *PPO* cDNA 片段和 cDNA 全长加上合适的启动子,反向插入到马铃薯的染色体上,成功获得了抗褐变马铃薯新品系。王清等^[4-6]从马铃薯试管苗叶片中提取总 DNA,对多酚氧化酶基因进行克隆并构建了相应的反义基因植物表达载体,并借助农杆菌对现有优良加工型马铃薯品种进行遗传转化,获得了转化植株,使块茎和抗性愈伤组织 *PPO* 活性均比对照明显降低。本研究结果显示,转基因鸭梨叶片 *PPO* 活性也明显低于对照。可见,对于反义技术而言,构建到反义表达载体上的反义片段关系到整个试验的成败。有文献表明,覆盖整个 cDNA 的反义 RNA、与部分 mRNA 互补的反义 RNA 对基因的表达能起到良好的抑制作用^[4]。鸭梨 *PPO* 基因 cDNA 序列就多达 1782 个核苷酸,如此长的片段用于构建反义表达载体会带来操作的诸多不便;同时,通过序列比对还发现鸭梨 *PPO* C 端 150 个氨基酸范围内存在 1 个富含组氨酸的铜结合区 (CuC),即 *PPO* 活性位点。除鸭梨外,存在 CuC 的物种还有富士苹果^[10]、美洲商陆^[11]、马铃薯^[12]、番茄^[13]、蚕豆^[14]等。因此,选择编码该 *PPO* C 末端具高保守度 150 个氨基酸序列的基因片段构建反义基因表达载体,可以达到既能特异性抑制鸭梨内源 *PPO* 基因表达又能为日后开展其他植物抑制内源 *PPO* 基因表达遗传转化研究提供工程菌株的作用。

参考文献

[1] 鞠志国,朱广廉. 水果贮藏期间的组织褐变问题[J]. 植物生理学通讯,1988(4): 46-48

[2] 张学杰,屈冬玉,金黎平. 马铃薯酶褐变机理及其控制途径[J]. 中国马铃薯,2000,14(3): 158-160

[3] 王清,王蒂. 加工型马铃薯品种多酚氧化酶活性的变化规律[J]. 植物遗传资源学报,2003,4(1): 21-26

[4] 王清,王蒂,黄俊生,等. 马铃薯多酚氧化酶基因克隆及反义表达载体构建[J]. 西北植物学报,2003,23(10): 1745-1749

[5] 王清,黄惠英,陈亚兰,等. 转基因纯合四倍体马铃薯多酚氧化酶活性及同工酶谱的变异[J]. 作物学报,2005,31(9): 1162-1166

[6] 王清,黄惠英,马文芳,等. 反义 *PPO* 基因对马铃薯块茎褐化的影响[J]. 作物学报,2007,33(11): 1822-1827

[7] Bachem C W B, Speckmann G J, Van der Linde P C G, et al. Antisense expression of polyphenol oxidase genes inhibits enzymatic browning in potato tubers[J]. Nature Biotechnology, 1994, 12: 1101-1105

[8] 董祯. 梨果实 ACC 氧化酶基因克隆的研究[D]. 河北保定: 河北农业大学, 2007

[9] 李桂琴,李会宜,许冬倩,等. 鸭梨多酚氧化酶基因 CDS 区的克隆及表达[J]. 果树学报,2008,25(4): 577-580

[10] Kim J Y, Seo Y S, Kim J E, et al. Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the Fuji apple[J]. Plant Science, 2001, 161: 1145-1152

[11] Joy R W, Sugiyama M, Fukuda H, et al. Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of *Physalacca americana*[J]. Plant Physiol, 1995, 107(4): 1083-1089

[12] Hunt M D, Eannetta N T, Yu H, et al. cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase[J]. Plant Mol Biol, 1993, 21(1): 59-68

[13] Newman S M, Eannetta N T, Yu H, et al. Organisation of the tomato polyphenol oxidase gene family[J]. Plant Mol Biol, 1993, 21(6): 1035-1051

[14] Cary J W, Lax A R, Flurkey W H. Cloning and characterization of cDNAs coding for *Vicia faba* polyphenol oxidase[J]. Plant Mol Biol, 1992, 20(2): 245-253

2011 年部分生物、农林类学术期刊联合征订表 (一)

刊物名称	邮发代号	刊期	年价(元)	期刊网址	编辑部 E-mail
癌变·畸·突变	80-285	双月刊	60	www.egh.net.cn	cemscm@stu.edu.cn
动物学研究	64-20	双月刊	150	www.zoores.ac.cn	zoores@mail.kiz.ac.cn
动物学杂志	2-422	双月刊	360	http://dwzzz.ioz.ac.cn	journal@ioz.ac.cn
分子植物育种	84-23	双月刊	240	www.molplantbreed.org	mpb@hibio.org
国际遗传学杂志	14-55	双月刊	90	www.cma.org.cn	genetics@ems.hrbmu.edu.cn
激光生物学报	42-194	双月刊	150	www.jgswxb.net	jgswxb@hunnu.edu.cn
菌物学报	2-499	双月刊	480	http://journals.im.ac.cn/jwxtcn	jwxt@im.ac.cn
昆虫知识	2-151	双月刊	360	www.ent-bull.com.cn	entom@ioz.ac.cn
林业科学	82-6	月刊	300	www.linyekexue.net	linyxx@forestry.ac.cn
农业生物技术学报	2-367	双月刊	240	www.jabitech.org.cn/	nsjxb@cau.edu.cn
人类学学报	2-384	季刊	100	www.ivpp.ac.cn	acta@ivpp.ac.cn
生命科学	4-628	月刊	480	www.lifescience.net.cn	cbis@sibs.ac.cn
生命科学研究	42-172	双月刊	108	http://smky.chinajournal.net.cn	life@hunnu.edu.cn

鸭梨多酚氧化酶基因反义表达载体的构建及农杆菌介导的遗传转化

作者：[李桂琴](#), [齐靖](#), [高志华](#), [许冬倩](#), [李会宣](#), [张玉星](#), [LI Gui-qin](#), [QI Jing](#), [GAO Zhi-hua](#), [XU Dong-qian](#), [LI Hui-xuan](#), [ZHANG Yu-xing](#)

作者单位：[李桂琴, LI Gui-qin \(河北农业大学园艺学院, 保定071001; 河北经贸大学生物科学与工程学院, 石家庄050061\)](#), [齐靖, 张玉星, QI Jing, ZHANG Yu-xing \(河北农业大学园艺学院, 保定, 071001\)](#), [高志华, 许冬倩, 李会宣, GAO Zhi-hua, XU Dong-qian, LI Hui-xuan \(河北经贸大学生物科学与工程学院, 石家庄, 050061\)](#)

刊名：[植物遗传资源学报](#) [\[ISTIC\]\[PKU\]](#)

英文刊名：[JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES](#)

年, 卷(期): 2010, 11 (5)

参考文献(14条)

1. [王清; 王蒂](#) 加工型马铃薯品种多酚氧化酶活性的变化规律[期刊论文]-[植物遗传资源学报](#) 2003 (01)
2. [张学杰; 屈冬玉; 金黎平](#) 马铃薯酶褐变机理及其控制途径 2000 (03)
3. [鞠志国; 朱广廉](#) 水果贮藏期间的组织褐变问题 1988 (04)
4. [Cary J W; Lax A R; Flurkey W H](#) Cloning and characterization of cDNAs coding for Vicia faba polyphenol oxidase[外文期刊] 1992 (02)
5. [Newman S M; Eannetta N T; Yu H](#) Organisation of the tomato polyphenol oxidase gene family[外文期刊] 1993 (06)
6. [Hunt M D; Eannetta N T; Yu H](#) cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase[外文期刊] 1993 (01)
7. [Joy R W; Sugiyama M; Fukuda H](#) Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of Phytolacca americana[外文期刊] 1995 (04)
8. [Kim J Y; Seo Y S; Kim J E](#) Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the Fuji apple 2001
9. [李桂琴; 李会宣; 许冬倩](#) 鸭梨多酚氧化酶基因CDS区的克隆及表达[期刊论文]-[果树学报](#) 2008 (04)
10. [董桢](#) 梨果实ACC氧化酶基因克隆的研究 2007
11. [Bachem C W B; Speckmann G J; Van der Linde P C G](#) Antisense expression of polyphenol oxidase genes inhibits enzymatic browning in potato tubers 1994
12. [王清; 黄惠英; 马文芳](#) 反义PPO基因对马铃薯块茎褐化的影响[期刊论文]-[作物学报](#) 2007 (11)
13. [王清; 黄惠英; 陈亚兰](#) 转基因纯合四倍体马铃薯多酚氧化酶活性及同工酶谱的变异[期刊论文]-[作物学报](#) 2005 (09)
14. [王清; 王蒂; 黄俊生](#) 马铃薯多酚氧化酶基因克隆及反义表达载体构建[期刊论文]-[西北植物学报](#) 2003 (10)

本文读者也读过(8条)

1. [李桂琴](#), [李会宣](#), [许冬倩](#), [刘坤](#), [张玉星](#), [LI Gui-qin](#), [LI Hui-xuan](#), [XU Dong-qian](#), [LIU Kun](#), [ZHANG Yu-xing](#) 鸭梨多酚氧化酶基因CDS区的克隆及表达[期刊论文]-[果树学报](#)2008, 25 (4)
2. [李桂琴](#), [李会宣](#), [刘坤](#), [许冬倩](#), [张玉星](#), [LI Gui-qin](#), [LI Hui-xuan](#), [LIU Kun](#), [XU Dong-qian](#), [ZHANG Yu-xing](#) 4种梨的多酚氧化酶基因克隆及其序列比较[期刊论文]-[华北农学报](#)2008, 23 (6)
3. [生物信息分析平台](#) [期刊论文]-[现代临床医学生物工程杂志](#)2002, 8 (2)
4. [杨岑](#), [余贤美](#), [贺春萍](#), [郑服从](#), [Yang Qin](#), [Yu Xianmei](#), [He Chunping](#), [Zheng Fucong](#) 洋葱伯克霍尔德氏菌CAS19嗜

铁素合成相关基因cepR的克隆及生物信息分析[期刊论文]-基因组学与应用生物学2010, 29(2)

5. 刘红梅, 卓丽环, 刘群录, 徐有明, LIU Hong-mei, ZHUO Li-huan, LIU Qun-lu, XU You-ming 利用正交设计优化百子莲农杆菌转化条件的初探[期刊论文]-上海交通大学学报（农业科学版） 2011, 29(1)
6. 杨兰, 张宝燕 不同的抗生素对农杆菌EHA105(codA)和农杆菌EHA105(betA)的抑制作用[期刊论文]-山东林业科技 2011, 41(2)
7. 雷昊 基于组件的生物信息分析系统框架的研究与实现[学位论文]2004
8. 刘晶, 李桂琴, 张翠茹, 韩清波, LIU Jing, LI Gui-qin, ZHANG Cui-ru, HAN Qing-bo 嗜冷菌对UHT奶品质影响的研究[期刊论文]-食品科学2007, 28(8)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201005022.aspx