

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.03.016

齐靖,李桂琴,董祯,等. 鸭梨 PPO 与 GFP 融合基因的烟草转化及亚细胞定位观察[J]. 广西植物,2014,34(3): 369-374

Qi J, Li GQ, Dong Z, et al. Transformation of tobacco plants by Yali PPO-GFP fusion gene and observation of subcellular localization[J]. *Guihaia*, 2014, 34(3): 369-374

鸭梨 PPO 与 GFP 融合基因的烟草转化及亚细胞定位观察

齐靖^{1*}, 李桂琴¹, 董祯², 周薇¹

(1. 河北经贸大学 生物科学与工程学院, 石家庄 050061; 2. 河北女子职业技术学院, 石家庄 050091)

摘要: 将鸭梨 PPO 基因与绿色荧光蛋白 GFP 基因相融合共同进行遗传转化的方式, 对鸭梨多酚氧化酶开展细胞定位研究。通过克隆该酶基因除终止密码子 TAA 外长度为 1 779 bp 的 CDS 序列, 与绿色荧光蛋白基因重组构建了荧光表达载体 pBI121-PPO-GFP, 借助农杆菌转化烟草, 转基因烟草叶片细胞经激光扫描共聚焦显微镜观察, 绿色荧光蛋白荧光与叶绿体自发荧光相重合。结果表明鸭梨多酚氧化酶为叶绿体蛋白质。

关键词: 鸭梨; 多酚氧化酶; 绿色荧光蛋白; 基因融合; 遗传转化; 亚细胞定位

中图分类号: Q942.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2014)03-0369-06

Transformation of tobacco plants by Yali PPO-GFP fusion gene and observation of subcellular localization

QI Jing^{1*}, LI Gui-Qin¹, DONG Zhen², ZHOU Wei¹

(1. College of Biology Science and Engineering, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang 050061, China; 2. Hebei Women's Vocational College, Shijiazhuang 050091, China)

Abstract: To explore the subcellular localization of Polyphenol oxidase (PPO) from *Pyrus bretschneideri*, the 1 779 bp cDNA of PPO gene was cloned and fused with GFP in frame to construct a binary vector pBI121-PPO-GFP. Then, the binary vector was transformed into *Nicotiana tabacum* by the tumefaciens-mediated method. Using confocal laser scanning microscopy, green fluorescent signals were localized in chloroplasts of the transformed *Nicotiana tabacum* cell. This results suggested that the Polyphenol oxidase from *Pyrus bretschneideri* was a chloroplast protein.

Key words: Yali; polyphenol oxidase; GFP; gene fusion; genetic transformation; subcellular localization

果蔬产品褐变现象发生的主要原因是氧化还原酶介导的酶促反应, 在这个反应中由于多酚类物质被氧化成了深褐色的醌类物质从而引起了褐变的发生。多酚氧化酶(Polyphenol Oxidase, PPO)是催化这个氧化还原反应的主要酶类, 任何导致该酶含量下降或活性降低的因素均可以起到抑制褐变的作用, 果蔬生产上常用的抑制褐变方法也正是基于这

一点来延缓果蔬褐变的。由于多酚氧化酶在褐变反应中具有重要的地位, 长期以来有关多酚氧化酶的研究吸引了众多科学家的目光。深化对该酶的研究也将有助于从根本上解决果蔬产品褐变问题。

多酚氧化酶是一种质体酶, 由细胞核基因编码, 在细胞质中合成后转运到其它细胞区域。细胞化学和细胞免疫化学分析表明, 多酚氧化酶主要存在于

收稿日期: 2013-10-10 修回日期: 2013-12-22

基金项目: 河北省科技计划项目(11220103D-9); 河北省高等学校科学技术研究指导项目(Z2012065); 河北省高等学校科学研究计划重点项目(ZH2011126)。

作者简介: 齐靖(1981-), 男, 河北石家庄人, 博士, 讲师, 主要从事植物生理与分子生物学方面研究, (Email)qijing@heuet.edu.cn。

* 通讯作者

正常细胞的光合组织(如类囊体的囊泡)和非光合组织的质体(如马铃薯块茎细胞的造粉体)中(鞠志国等,1998; Vaughn *et al.*, 1984; Sherman *et al.*, 1991)。缺乏质体的组织没有多酚氧化酶,但含有质体的植物组织不一定都有该酶存在,其原因至今尚不明确(王曼玲等,2005)。虽然多酚氧化酶被广泛认为存在于植物细胞质体中,但针对不同植物来源的多酚氧化酶,其具体存在的质体种类也表现出明显的不同(Hunt *et al.*, 1993; Thygesen *et al.*, 1995; Chevalier *et al.*, 1999)。目前,关于鸭梨多酚氧化酶在细胞中的定位尚属研究空白,虽然在前期研究中我们通过克隆鸭梨 PPO 基因,根据生物信息学分析结果推断该酶定位于细胞类囊体中(李桂琴,2009),但这尚缺乏有力的实验结果支持。因此,作为基因功能研究的一部分,在本研究中我们拟通过将鸭梨 PPO 基因与绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)基因相融合共同进行遗传转化的方式对鸭梨多酚氧化酶的亚细胞定位进行实验验证,从而为进一步深入研究编码该蛋白的基因功能奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 鸭梨(*Pyrus bretschneideri* 'Yali' pear),栽植于河北省农林科学院石家庄果树研究所,常规管理。三生烟(*Nicotiana tabacum* Samsum),由本实验室种植,培养条件为 22 °C, 16 h 光照/8 h 黑暗,光通量密度 110 L · m⁻² · s⁻¹,湿度约为 30%。

1.1.2 主要试剂 大肠杆菌菌株 DH5 α 、克隆载体 pUCm-T Vector、UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒为上海生工公司产品;Oligo(dT)15、RTase M-MLV、Taq 酶、dNTP、限制性内切酶、T4 连接酶以及 DNA Marker 均购自 TAKARA 公司;农杆菌菌株 EHA105、含有 GFP 基因的双元表达载体 GFP-pBI121 均由本实验室提供;其它常规化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 荧光表达载体的构建 以成熟鸭梨果实为试材,参照改良 CTAB 法(董祯,2007)提取总 RNA,反转录为 cDNA。根据已获得的鸭梨 PPO 基因 cDNA 全长序列(李桂琴,2009)的 CDS 区设计一对引物(上游引物:5'-TGACGTCTCTTTCACCTCCG-

GTAGTCA-3', 下游引物:5'-AGAAGCAAACCTCAATCTTGATAC-3'),以鸭梨果实 cDNA 为模板扩增除终止密码子 TAA 外的完整氨基酸编码序列,扩增体系为 50 μ L,其中包含鸭梨 DNA 50 ng、10 \times PCR Buffer 5 μ L、rTaq(TAKARA)0.5 μ L、上下游引物各 30 ng, dNTP 终浓度为 0.25 mmol · L⁻¹。PCR 反应在德国 Biometra 公司生产的 T Gradient PCR 仪中进行,扩增程序为 94 °C 变性 30 s, 70 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环。

PCR 扩增结束后,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离后回收,与 pUCm-T Vector 连接后转化 *E. coli* DH 5 α 感受态细胞,送交上海生工测序。根据测序结果挑选目标片断正向插入在 pUCm-T Vector 多克隆位点的重组质粒以及荧光表达载体 GFP-pBI121 共同进行 Xba I/Sac I 双酶切。酶切反应结束后,分别电泳回收 PPO 基因片断和 GFP-pBI121 线性载体,并将两片段连接构建 PPO-GFP 荧光表达载体。PPO-GFP 荧光表达载体经测序验证后,借助冻融法(王关林和方宏均,2002)转化农杆菌菌株 EHA105 用于烟草转化。

1.2.2 农杆菌 LBA4404 介导的 PPO-GFP 荧光表达载体转化烟草 选取培养 1~2 个月的三生烟植株,取其生长正常细嫩叶片,剪去边缘及主脉,再剪成小块(大小为 0.5 cm \times 0.5 cm)作为转化的起始外植体材料。

参照叶盘法(Horsch *et al.*, 1985)对烟草进行侵染转化。首先在无菌条件下,用接种针挑取保存的农杆菌工程菌株 EHA105 菌液,于含 Kan、Rif 和 Str 各 50 mg · mL⁻¹ 的 YEB 平板上划线培养,28 °C 倒置暗培养直到长出单菌落。在转化平板上挑取单菌落接种于 1 mL 含同样抗生素的 YEB 液体培养基中,220 r · min⁻¹, 28 °C 振荡培养过夜。在 50 mL 含同样抗生素的 YEB 液体培养基中加入 1 mL 上述培养物,220 r · min⁻¹, 28 °C 振荡培养 14 h 左右,到菌液 OD₆₀₀ 到 0.6 左右;室温下 5 000 r · min⁻¹ 离心 15 min,弃上清液,菌体用 MS 液体培养基悬浮,稀释 10 倍后备用。其后将剪切好的烟草叶盘置于菌悬液中轻微振荡 5 min 后,转入共培养培养基(MS+1 mg/L 6-BA)26 °C 黑暗共培养 3 d;再转入筛选培养基(MS+1 mg/L 6-BA+500 mg/L Cef+30 mg/L Kan)进行筛选和分化,每两周继代培养 1 次,3~4 周后陆续从叶片边缘分化出幼芽,待抗性芽长到 1 cm 以上时切下,插入生根培养基(1/2 MS

+500 mg/L Cef+30 mg/L Kan) 进行生根。待抗性芽长有 5~8 条主根后, 将无菌小苗开盖在 25 °C 左右条件下培养锻炼 2 d, 然后移栽入土壤中, 置于温室中按常规管理。

1.2.3 转基因烟草的 PCR 检测 根据 Genbank 上发表的 GFP 基因序列设计一对引物, 上游引物为 5'-GTTGAATTAGATGGTGATAAT-3'; 下游引物为 5'-ATAACCTTCGGGCATGGCACTC-3'。参照 CTAB 法(王关林和方宏均, 2002) 抽提转基因烟草 DNA, 并以此为模板进行扩增, 扩增体系同 1.2.1, 扩增程序为 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 35 个循环。PCR 扩增结束后, 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳中分离, 紫外灯下检测、照相。

1.2.4 转基因烟草的激光扫描共聚焦显微镜观察 采集经 PCR 鉴定的转基因烟草叶片制作显微切片, 用激光扫描共聚焦显微镜 (LSM5 Pascal, Zeiss) 观察叶肉细胞中 GFP 的表达。采用 40 倍油镜进行观察, 激发光波长为 488 nm, 带通 BP 为 505~530 nm, 长通 LP 为 560 nm。

2 结果与分析

2.1 荧光表达载体的构建

根据已知鸭梨多酚氧化酶基因全长序列(李桂琴, 2009) 设计一对引物, 以鸭梨果实 mRNA 为模板, RT-PCR 扩增除终止密码子 TAA 外的完整氨基酸编码序列, 扩增结果如图 1:A 所示。将目标片段回收后与 pUCm-T Vector 连接后转化 *E. coli* DH 5 α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选、质粒酶切鉴定(图 1:B) 无误后送交上海生工测序。测序结果显示, 该序列长度为 1 779 bp, 与已知的鸭梨多酚氧化酶基因在序列组成上无差异, 没有碱基突变的发生, 可用于构建植物表达载体。

所扩增得到的鸭梨多酚氧化酶基因片段在克隆到载体 pUCm-T Vector 时存在正、反两种插入方式, 选择经测序验证片段反向插入 pUCm-T Vector 的重组质粒, 进行 Xba I/Sac I 双酶切, 电泳回收目标片断, 与用同样酶切的含有 GFP 基因的 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 *E. coli* DH 5 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 Xba I/Sac I 双酶切鉴定证实多酚氧化酶基因片段

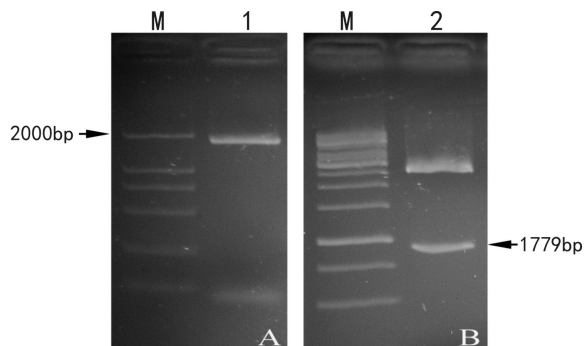


图 1 PCR 扩增鸭梨多酚氧化酶基因序列及其克隆载体的酶切鉴定 A. 鸭梨多酚氧化酶基因 cDNA 序列 PCR 扩增产物 M. 分子量标准 (2 000、1 000、750、500、250、100 bp), 1. PCR 扩增产物; B. 阳性克隆的 EcoR I/BamH I 酶切鉴定 M. marker, 2. 阳性克隆的 EcoR I/Xba I 酶切鉴定结果。

Fig. 1 PCR amplification of PPO and identification of cloning vector by endonuclease digest A. PCR amplification products of PPO M. 1 kb DNA marker (2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp), 1. Product of PCR amplification; B. Product cut by EcoR I/BamH I. M. DNA marker, 2. Product by endonuclease digest.

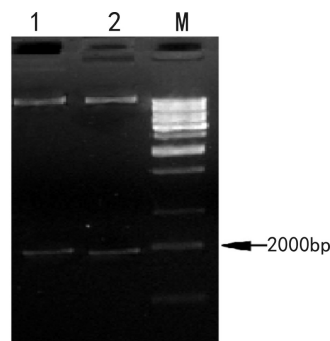


图 2 pBI121-PPO-GFP 表达载体的酶切鉴定 1, 2. 重组质粒酶切结果; M. 1kb DNA Ladder。

Fig. 2 Identification of pBI121-PPO-GFP by restriction enzyme digestion 1, 2. Recombinant plasmid double digested by Sac I and Xba I; M. 1kb DNA Ladder.

已成功插入表达载体(图 2), 测序结果显示目标片段正向排列于 35 S 启动子和 GFP 基因之间, 可由 35 S 启动子完成 PPO-GFP 融合基因的转录。构建好的荧光表达载体图谱如图 3 所示。

2.2 转基因植株的获得

将构建好的 pBI121-PPO-GFP 质粒以及仅含有 GFP 基因的 pBI121 质粒 (pBI121-GFP) 分别借助电击法转化农杆菌 EHA105 细胞, 参照叶盘法(李桂琴, 2009) 分别对烟草进行遗传转化。分别将与两种农杆菌工程菌株共培养 3 d 后的烟草叶片接种于筛选培养基上进行诱导培养, 每 2 周继代 1 次,

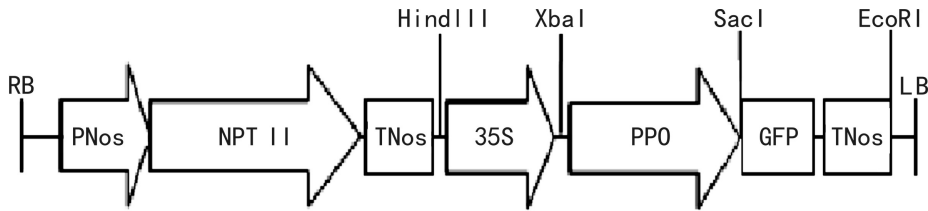


图 3 植物表达载体 pBI121-PPO-GFP 图谱

Fig. 3 Diagram of antisense express vector of pBI121-PPO-GFP

6 周后选取长势良好的芽接种到含卡那霉素的生根培养基上继续培养,3 周左右分化出根,选择根系较发达的移栽到营养钵中,最终得到 77 株转 pBI121-PPO-GFP 烟草以及 69 株转 pBI121-GFP 烟草,两种转化植株均表型正常。

2.3 转基因植株的 PCR 检测

对经过卡那霉素筛选出的烟草植株,各随机挑选 10 株提取其 DNA,并以此为模板应用根据 GFP 基因设计的引物进行 PCR 扩增。电泳结果显示,在转 PPO-GFP 基因的烟草植株中 PCR 检测结果全部呈阳性,而在转 GFP 基因的烟草植株中仅有 8 株扩增出了目标片段,2 株呈现假阳性(图 4 显示了部分电泳结果)。

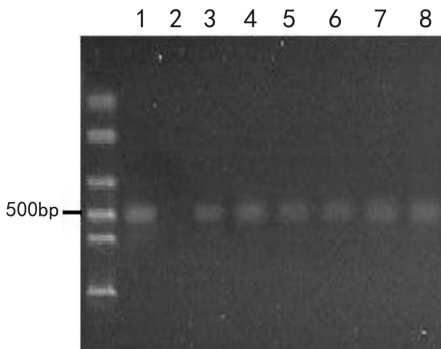


图 4 烟草转基因植株 PCR 鉴定结果 1. pBI121-PPO-GFP 质粒,阳性对照; 2. 水,阴性对照; 3-8. 烟草转基因植株。

Fig. 4 PCR analysis of transgenic tobacco plants 1. positive control; 2. negative control; 3-8. transgenic tobacco plants.

2.4 报告基因 GFP 的表达

对 PCR 检测阳性的烟草植株用激光共聚焦显微镜观察其叶片中 GFP 的表达情况,结果显示在 488 nm 的激发光下,野生型烟草仅在大于 560 nm 处出现叶绿素自发荧光(红色),在 GFP 发射光波段 505~530 nm 没有任何信号(图 5:A-C)。pBI121-GFP 转基因植株在 505~530 nm 波段,GFP 荧光(绿色)在细胞质中呈弥散状分布(图 5:D-F)。而在

pBI121-PPO-GFP 转基因植株中,GFP 荧光信号与叶绿素自发荧光信号共定位于叶绿体中(图 5:G-I)。该结果表明本研究获得的鸭梨多酚氧化酶基因所编码蛋白的成熟肽位于叶绿体中,故该蛋白质为核基因编码的叶绿体蛋白质。

3 讨论与结论

蛋白质在细胞器中的定位对于明确其功能和参与的代谢途径有着非常重要的作用。多酚氧化酶在细胞内的定位情况较为复杂,在其它植物的叶绿体(Kim *et al.*, 2001)、线粒体(Haruta *et al.*, 1999)、过氧化物体和微体(Pan *et al.*, 2005)中均发现有该酶的存在。Sommer *et al.*(1994)和 Smeekens *et al.*(1986)认为多酚氧化酶主要位于植物细胞的类囊体内,而汪敏等(1994)则发现凤眼莲中的多酚氧化酶主要存在于线粒体中,鞠志国(1989)也发现在莱阳在梨的亚细胞颗粒中以线粒体的多酚氧化酶活性最高。这些研究报道给我们透露出明显的信息,即不同植物来源的多酚氧化酶似乎都有其独特的细胞定位方式,也使得我们很难基于前人研究来推定鸭梨鸭梨多酚氧化酶所定位的细胞器。尽管如此,在前期研究中,我们还是基于他人研究结果围绕鸭梨多酚氧化酶基因做了大量的生物信息学分析工作(李桂琴, 2009),结果显示鸭梨多酚氧化酶与大多数定位于叶绿体的植物多酚氧化酶结构特征相符,故在之前的研究中我们推测鸭梨多酚氧化酶很可能定位于叶绿体中。也正是基于这样的推论,在本研究中我们未对其它细胞器做免疫荧光处理,仅借助叶绿体自发荧光即实现了鸭梨多酚氧化酶的细胞定位分析。可见,在缺乏研究背景的情况下对拟细胞定位的蛋白做详细生物信息学分析是非常必要的,这将有效的节省科研工作者的工作量。

在利用 GFP 报告基因对蛋白质进行叶绿体定

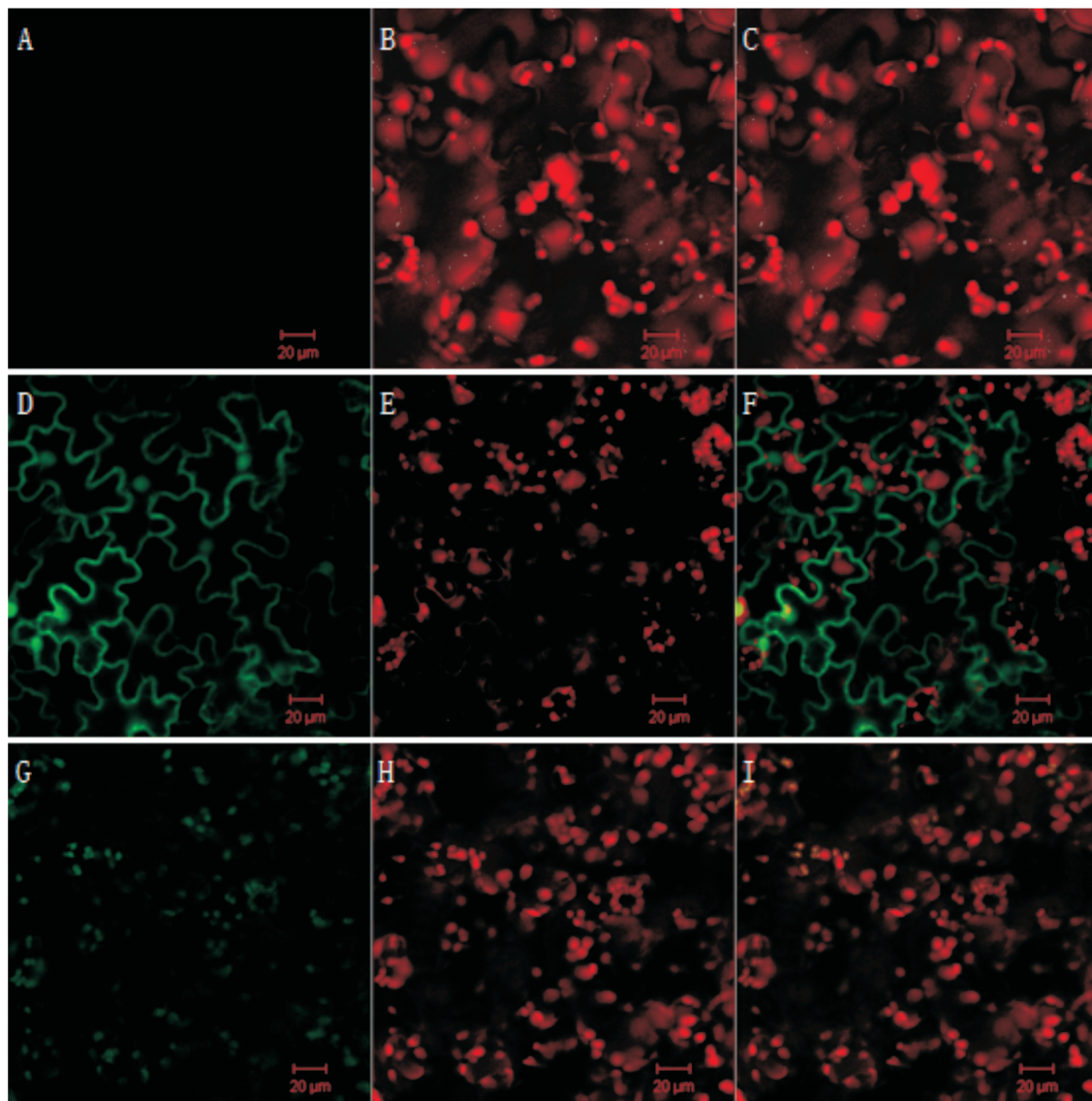


图 5 转基因烟草叶肉细胞中 GFP 荧光的观察 A-C. 野生型烟草植株 GFP 荧光观察; D-F. 转基因 pBI121-GFP 植株 GFP 荧光观察; G-I. 转基因 pBI121-PPO-GFP 植株 GFP 荧光观察。A, D, G. GFP 绿色荧光; B, E, H. 叶绿体自发荧光; C, F, I. 叠加后的结果; A-I. 标尺为 20 μm 。

Fig. 5 Fluorescence detection in the transgenic tobacco cells A-C. Wild type tobacco fluorescent detection; D-F. Transgenic plant pBI121-GFP fluorescent detection; G-I. Transgenic plants pBI121-PPO-GFP fluorescent detection; A, D, G. GFP fluorescence; B, E, H. Chlorophyll autofluorescence; C, F, I. Overlapping; A-I. Scale bars are 10 μm .

位的研究领域,多数研究报告所应用的方法是仅将目标蛋白的预测转运肽与 GFP 融合来实现细胞定位。在研究过程中我们虽然也发现了鸭梨多酚氧化酶基因所推导氨基酸序列 N-端 87~89 区域具备一个 Ala-X-Ala 的切割位点,且 1~89 氨基酸序列区域 N 端有大量的亲水性氨基酸残基,C 端氨基酸残基中半数以上为疏水残基,与已报道的大多数多酚氧化酶转运肽特征相符(Fraignier *et al.*, 1995)。但考虑到植物多酚氧化酶复杂的细胞定位方式,我们

还是保守的采用 RT-PCR 克隆基因 CDS 序列与 GFP 基因相融合的方式来实现鸭梨多酚氧化酶的细胞定位。虽然这种构建融合蛋白的方式可使定位结果更具说服力,但却未能证实研究所发现的引导肽序列。因而,进一步验证鸭梨多酚氧化酶转运肽序列,从而阐明经加工后的成熟鸭梨多酚氧化酶结构和组成特点也成为了我们今后深化多酚氧化酶研究的一个重点。

在本研究中,我们借助农杆菌介导法实现了荧

光表达载体向烟草的转化,并最终实现了鸭梨多酚氧化酶在烟草中的细胞定位。虽然从理论上说,将荧光表达载体转化鸭梨细胞中镜检更具说服力,但实际操作中我们发现与烟草相比,鸭梨细胞体积过小,我们很难对 GFP 发光源进行定位,因此只能选择模式植物烟草进行遗传转化。虽然在分子水平上这种验证方法是间接的,但考虑到利用 GFP 报告基因实现蛋白在模式植物中的细胞定位已经成为蛋白研究领域普遍使用的一种方法(Abdel-Ghany *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2006),且有着坚实的理论基础,所以我们相信多酚氧化酶在鸭梨中的细胞定位与本次实验结果相同,是位于在叶绿体中的。

参考文献:

- Abdel-Ghany SE, Müller-Moulé P, Niyogi KK, *et al.* 2005. Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts[J]. *Plant Cell*, **17**(4):1 233-1 251
- Chevalier T, de Rigal D, Mbéguié-A-Mbéguié D, *et al.* 1999. Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase[J]. *Plant Physiol*, **119**:1 261-1 269
- Dong Z(董祯). 2007. The study on the ACC oxidase genes clone of pear fruit(梨果实 ACC 氧化酶基因克隆的研究)[D]. Baoding(保定): Agricultural University of Hebei(河北农业大学)
- Fraignier MP, Marques L, Fleuriet A, *et al.* 1995. Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidase from different fruits of *Prunus*[J]. *J Agric & Food Chem*, **43**:2 375-2 380
- Gao H, Sage TL, Osteryoung KW. 2006. FZL, an FZO-like protein in plants, is a determinant of thylakoid and chloroplast morphology[J]. *Proceed Nat Acad Sci USA*, **103**(17):6 759-6 764
- Haruta M, Murata M, Kadokura H, *et al.* 1999. Immunological and molecular comparison of polyphenol oxidase in Rosaceae fruit trees[J]. *Phytochemistry*, **50**(6):1 021-1 025
- Horsch RB, Fry JE, Hoffman N. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants[J]. *Science*, **227**:1 229-1 231
- Hunt MD, Eannetta NT, Yu H, *et al.* 1993. cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase[J]. *Plant Mol Biol*, **21**:59-68
- Ju ZG(鞠志国), Song GL(朱广廉), Cao ZX(曹宗巽). 1998. The compartmentation of polyphenol oxidase and its substrates in relation with fruit browning of Laiyang Chili (*Pyrus bretschneideri* Rehd)(莱阳茺梨果实褐变与多酚氧化酶及酚类物质区域化分布的关系)[J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), **14**(4):351-356
- Ju ZG(鞠志国). 1989. Properties and distribution of polyphenol oxidase in cells of *Pyrus bretschneideri* (Laiyang Chili)(莱阳茺梨细胞中多酚氧化酶的分布及其性质)[J]. *Plant Physiol Comm* (植物生理学通讯), (3):33-35
- Kim JY, Seo YS, Kim JE, *et al.* 2001. Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the Fuji apple[J]. *Plant Sci*, **161**:1 145-1 152
- Li GQ(李桂琴). 2009. Study on cloning and anti-transformation for polyphenol oxidase gene in 'Yali' Pear(鸭梨多酚氧化酶基因克隆及其反义转化的研究)[D]. Baoding(保定): Agricultural University of Hebei(河北农业大学)
- Pan D, Chen G, Lü L, *et al.* Isolation of full length Nai (*Prunus salicina* Lindl.) leaf polyphenol oxidase [DB/OL]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=58047495>, 2005-07-28/2008-01-20
- Sherman TD, Vaughn KC, Duck SO. 1991. A limited survey of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase [J]. *Phytochemistry*, **30**:2 499-2 506
- Smeekens S, Bauerle C, Hageman J, *et al.* 1986. The role of the transit peptide in the routing of precursors toward different chloroplast compartments[J]. *Cell*, **46**:365-375
- Sommer A, Nèeman E, Steffens JC, *et al.* 1994. Import, targeting and processing of a plant polyphenol oxidase[J]. *Plant Physiol*, **105**:1 301-1 311
- Thygesen PW, Dry IB, Robinson SP. 1995. Polyphenol oxidase in potato. A multigene family that exhibits differential expression patterns[J]. *Plant Physiol*, **109**:525-531
- Vaughn KC, Duke SO. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants[J]. *Plant Physiol*, **60**:106-112
- Wang M(汪敏), Zheng SZ(郑师章). 1994. Physiological and biochemical properties of the polyphenol oxidase in *Eichhornia crassipes*(凤眼莲体内多酚氧化酶的生理生化特性)[J]. *J Fudan Univ: Nat Sci Edit*(复旦学报·自然科学版), **33**(2):167-164
- Wang GL(王关林), Fang HJ(方宏均). 2002. The Principle and Technology of Plant Gene Engineering(植物基因工程的原理与技术)[M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社)
- Wang ML(王曼玲), Hu ZL(胡中立), Zhou MQ(周明全), *et al.* 2005. Advances in research of polyphenol oxidase in plants(植物多酚氧化酶的研究进展)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), **22**(2):215-222