

山葡萄 *PAL* 基因原核表达载体的构建及表达蛋白纯化

陈 蒙, 袁赫海, 张 宇, 刘海峰*

(延边大学农学院, 延吉 133002)

摘 要: 山葡萄苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 是苯丙烷途径的关键酶, 在果皮着色中能够调控花色苷合成途径。构建 *PAL* 基因原核表达重组质粒 pET28a-*PAL*, 并对重组蛋白表达条件进行优化, 以山葡萄 DNA 扩增 *PAL* 并连接到 pMD18-T, 筛选得到阳性克隆后连接到 pET28a 原核表达载体上, 重组质粒转化至 *E. coli* BL21 后经不同浓度的 IPTG、不同诱导温度、不同诱导时间处理, 通过 DPS 设计正交试验优化重组蛋白的表达条件, 并将重组蛋白纯化。结果显示, 正交试验不同处理下的蛋白表达差异显著 ($P < 0.05$), 诱导因素的影响程度从强到弱分别为 IPTG 浓度、温度和时间。IPTG 诱导浓度对其影响最显著 ($P = 0.015 < 0.05$), 且 IPTG 浓度为 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 诱导温度为 22°C , 诱导时间为 5 h 时, 诱导重组蛋白 PAL 的效果最佳。成功构建其原核表达载体并使其在大肠杆菌中得到高效表达, 为探究 PAL 蛋白的表达提供参考。

关键词: 山葡萄; *PAL* 基因; 正交设计; 原核表达

中图分类号: S663.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2019)05-0888-06

Construction of prokaryotic expression vector of *Vitis amurensis PAL* gene and purification of the expressed protein

CHEN Meng, YUAN Hehai, ZHANG Yu, LIU Haifeng

(College of Agriculture, Yanbian University, Yanji 133002)

Abstract: *Vitis amurensis* phenylalanine aminolysis enzyme (PAL) is a key enzyme in the phenylpropanoid pathway, which regulates the anthocyanin synthesis pathway in pericarp coloring. The prokaryotic expression recombinant plasmid pET28a-*PAL* was constructed, and the expression conditions of the recombinant protein were optimized. The *PAL* in the grape was amplified and ligated into pMD18-T. The positive clone was screened and ligated into the prokaryotic expression vector of pET28a. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 and further induced by different concentrations of IPTG, different induction temperature and induction time. The expression conditions of the recombinant protein were optimized by design orthogonal test of DPS, and the recombinant protein was purified. The results showed that the expression of the protein was significantly different under different treatments in orthogonal test ($P < 0.05$), and the influences of induction factors on the protein expression from strong to weak were respectively IPTG concentration, temperature and time. The induced IPTG concentration had the most significant effect ($P = 0.015 < 0.05$), and under the conditions of IPTG of $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, the induction temperature of 22°C , and the induction time of 5 h, the induced recombinant protein of PAL was the best. In conclusion, the prokaryotic expression vector was successfully constructed and highly expressed in *E. coli*, which would provide some references for exploring the expression of PAL protein.

Key words: *Vitis amurensis*; *PAL*; orthogonal design; prokaryotic expression

山葡萄 (*Vitis amurensis*) 为葡萄科葡萄属, 藤长且矮小, 果粒呈球型, 皮厚味酸, 低糖微涩, 叶互生且有缺口, 生育周期短, 营养价值高且口感品

质佳, 可作为酿酒葡萄, 是重要的经济作物^[1]。其为野生果树, 多产自我国东北、俄罗斯远东及朝鲜半岛等地区, 具有较强的抗性特征, 如: 抗虫害、

收稿日期: 2019-01-21

基金项目: 国家自然科学基金 (31260067) 和延边大学大学生创新创业训练资助项目共同资助。

共同第一作者简介: 陈 蒙, 硕士研究生。E-mail: 1055284082@qq.com; 袁赫海, 本科生。E-mail: 1920528920@qq.com

* 通信作者: 刘海峰, 博士, 副教授。E-mail: Liufeng_1989@163.com

抗霉病及耐低温等^[2-3]。山葡萄富含丰富的氨基酸和维生素,除此之外还含有黄酮类等高效生物活性物质,营养十分丰富^[4-5]。以山葡萄酿造的葡萄酒因其鲜艳的色彩受国内人士称赞^[6]。山葡萄果皮颜色的深浅,主要取决于花色苷的多少。

花色苷(Anthocyanin)广泛存在自然界,是一类水溶性天然色素^[7-8],花色苷是酰基糖苷及花青素的糖苷衍生物^[7-9]。源自植物的花色苷可应用于天然着色剂,具抗炎、抗肿瘤等生理功能。花色苷使植物呈现出诱人的色泽,但其不稳定,易受物理化学以及花色苷自身结构等多因素影响^[10]。

山葡萄花色苷的生物合成是一个十分复杂的过程,分为两种途径,一种是苯丙烷类代谢途径,另一种是类黄酮途径^[11-12]。苯丙氨酸解氨酶(PAL)是苯丙烷途径的关键酶,催化苯丙烷类代谢第一步反应,在植物果实着色、次生代谢以及发育过程中起重要作用。苯丙氨酸解氨酶在白色葡萄中几乎不表达,而在有色葡萄中表达较强^[10-14]。PAL 基因家族成员在植物体各个组织和各个发育期的表达也有所差别^[14]。PAL 参与花色苷、植物保护素、酚类代谢等物质的合成。周爱琴等^[15]发现,在果实中,随着花青素的含量增多,PAL 酶的活性也随之增强。然而,崔艳涛等^[16]研究发现,李果果皮中的 PAL 酶的活性变化规律与花色苷的含量变化并不同步,这表明 PAL 酶不仅为催化花色苷的合成提供了前体,它还还为其他物质的合成提供了前体,只有当合成花青苷的前体物质有所缺乏时,PAL 酶才是花色苷合成的重要物质。赵则海等^[17]发现 PAL 酶活性与黄酮的含量呈正相关。1961 年, Kosuge 首次在植物中发现 PAL^[18],近些年来,对苯丙氨酸解氨酶研究越来越多,因为次级代谢产物的合成过程可以通过调节其活性来控制^[19]。本试验在蛋白水平对 PAL 进行研究,以期了解 PAL 基因在山葡萄体内的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 材料

山葡萄 (*Vitis amurensis*) 采自延边大学山葡萄资源圃。于成熟期采摘,取果皮置于液氮中, -80℃ 冷冻保存。

大肠杆菌 *Escherichia coli*、BL21、pET28a 原核表达质粒来自延边大学实验室; pMD18-T、His60 Ni Superflow Resin、*Ex Taq* 聚合酶来自 TaKaRa 公司;限制性内切酶、胶回收试剂盒来自 Promega 公司;质粒小提试剂盒购于天根生物公司; SDS-PAGE 电

泳凝胶试剂盒、T4 连接酶来自上海生工生物公司;其他试剂为国产分析纯。

1.2 重组质粒 pET28a-PAL 的构建

1.2.1 DNA 样品提取、检测 山葡萄叶片 DNA 依据本实验室改良 CTAB 法^[20]提取,测定质量和浓度,合格的 DNA 保存用于后续试验。

1.2.2 原核表达载体的构建 根据前期克隆出的山葡萄 PAL 基因的 ORF 序列 (GenBank 登录号是: MH045991)^[14],设计含有 *Xho* I 和 *Sma* I 酶切位点的特异性引物为:

PAL-F2: 5'-ACCCGGGATGCTCGTGAGGATCAACACCCT-3' (含 *Sma* I 酶切位点), PAL-R2: 5'-CGCTCGAGCTAGCAGATTGGGAGAGGAGCAAC-3' (含 *Xho* I 酶切位点)。以山葡萄 PAL 全长 DNA 为模版,扩增带有酶切位点的引物 ORF 序列。PCR 扩增程序如下: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 32 个循环, 72℃ 终加延伸 5 min。胶回收目的基因,连接、转化后将阳性克隆邮到上海生工生物工程公司测序。

测序结果正确后,将含有 *Xho* I 和 *Sma* I 酶切位点的山葡萄 PAL 的 ORF 和用 *Xho* I 和 *Sma* I 同时双酶切 pET28a 原核表达载体,对目的基因、原核表达载体大片段进行回收,16℃ 下用 T4 DNA 连接酶连接过夜,体系为: 酶切 PCR 产物 1.0 μL, 10×T4 Ligase 3.0 μL, 酶切 pET28a 3.5 μL, T4 连接酶 1.0 μL, ddH₂O 11.5 μL。将连接产物转化到感受态细胞,涂布于固体 LB 培养基 (含 100 mg·L⁻¹ 氨苄) 37℃ 过夜培养,挑取单克隆 PCR 并进行双酶切鉴定。对验证后的菌液扩大培养并用质粒小提试剂盒提取,保存备用。

1.3 诱导重组蛋白 pET28a-PAL 的单因素筛选

将影响重组蛋白表达的诱导三因素,分别进行单因素试验和正交试验^[21]。重组蛋白表达纯化方法参照文献^[22]。SDS-PAGE 检测: 取诱导前样品、诱导菌液各 1 mL, 12 000 r·min⁻¹, 离心 1 min, 悬浮菌体,加入 200 μL PBS 缓冲液重悬,利用反复冻融方法进行细胞裂解; 4℃, 12 000 r·min⁻¹, 离心 20 min, 分别在沉淀、上清样品中加入 120 μL 5×上样缓冲液, 100℃ 水浴 8 min。10% SDS-PAGE 电泳检测,在样品的上清中存在目的蛋白。

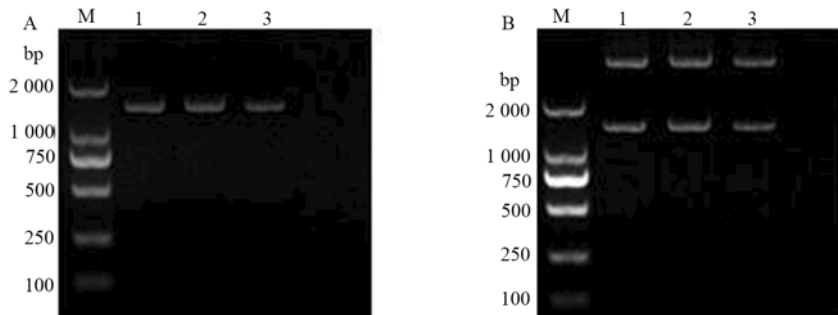
IPTG 浓度对重组蛋白表达影响: 分别将培养液中 IPTG 浓度稀释到 0.1、0.2、0.4、0.6 和 0.8 mmol·L⁻¹, 200 r·min⁻¹ 常温振荡培养 5 h, 利用反复冻融方法进行细胞裂解, SDS-PAGE 电泳检测,以不添加 IPTG 组作为对照 (CK)。

培养时间对重组蛋白表达的影响: IPTG 浓度为 $0.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $200 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 常温振荡培养, 分别培养 3、5、7、9 和 11 h, 收集菌体反复冻融法裂解细胞进行 SDS-PAGE 电泳检测。

培养温度对重组蛋白表达的影响: IPTG 浓度为 $0.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $200 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 5 h, 培养温度分别为 15、18、21、24 和 27°C , 收集菌体, 反复冻融法裂解细胞, 进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.4 正交试验 $L_9(3^4)$ 对重组蛋白诱导及纯化

依据单因素试验结果设计正交试验^[22], IPTG 浓度: 0.2、0.4 及 $0.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 诱导时间: 3、5 和 7 h; 诱导温度: 22、24 及 26°C , 进行蛋白诱导表达、纯化, 用 10% SDS-PAGE 电泳检测样品蛋白并纯化目的蛋白, 观察结果。

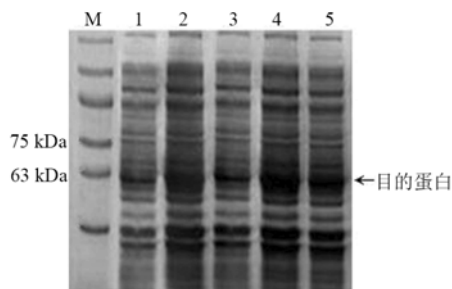


M: DL 2000 Marker; A: *PAL* 基因双酶切; B: 重组质粒双酶切鉴定; 泳道 1、2 和 3 为重复检测

M: DL 2000 Marker; A: *PAL* gene double digestion; B: double enzyme digestion identification of recombinant plasmid; Lanes 1, 2 and 3 mean repeated detections

图 1 目的基因与重组质粒的检测与鉴定

Figure 1 Detection and identification of target gene and recombinant plasmid



泳道 1—5 代表诱导温度分别为 15、18、21、24 和 27°C

Lanes 1-5 represent the induced protein at temperature of 15, 18, 21, 24 and 27°C , respectively

图 2 不同温度诱导表达产物的 SDS-PAGE 检测

Figure 2 SDS-PAGE detection of the expression products induced by different temperature

2.2 原核表达条件的优化及重组蛋白的纯化

目的蛋白的表达量影响后续蛋白纯化, 故本试验设计单因素正交试验对原核蛋白的诱导表达条件进行优化。将已验证的重组质粒 pET28a-*PAL* 转化到 *E.coli* BL21 (DE3), 根据不同的诱导温度、IPTG

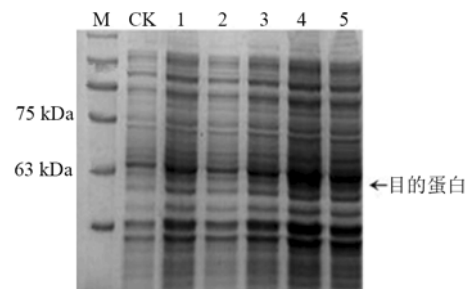
1.5 数据处理

通过 ExPASy 预测等电点和分子量; 使用 SPSS 17.0 对正交试验结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 原核表达载体的构建与鉴定

以 *PAL* 的 DNA 全长为模版, PCR 扩增含有酶切位点的 ORF 序列, 与预期特异性条带相符, 将目的片段回收并用 *Xho* I 和 *Sma* I 双酶切 (图 1-A), 测序鉴定正确后, 用于表达载体的构建。将 pET28a 原核表达载体进行双酶切, 用 T4 DNA 连接酶连接原核表达载体大片段和目的基因酶切片后, 获得 pET28a-*PAL* 重组质粒原核表达载体, 鉴定结果与预期一致, 并进行双酶切鉴定 (图 1-B), 且测序正确。表明原核表达载体已构建成功。



CK (不添加 IPTG); 泳道 1—5 表示诱导的 IPTG 浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.6 和 $0.8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

CK (without addition of IPTG); Lanes 1-5 represent the induced protein at the IPTG concentration of 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 and $0.8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively

图 3 SDS-PAGE 检测不同 IPTG 浓度诱导表达产物

Figure 3 SDS-PAGE detection of the expression products induced by different IPTG concentrations

浓度、诱导时间进行优化。结果显示: 温度在 15~ 27°C 时, 目的蛋白的表达量随温度的升高表现为先增加后降低, 当温度高于 24°C 时, 表达量最高 (图

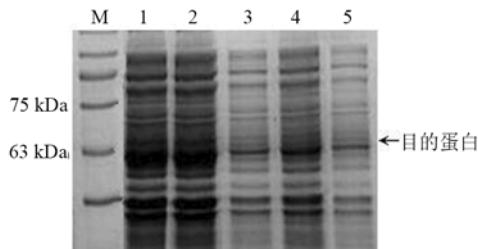
2); 目的蛋白表达量随着 IPTG 浓度的升高逐渐增加, 当浓度为 $0.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 表达量最高 (图 3), 而 IPTG 单因素对蛋白的诱导表达纯化后显示其大小约为 61 kDa (图 4); 诱导时间在 3~5 h 时, 目的蛋白表达量呈上升趋势, 但时间大于 5 h 后表达量下降 (图 5)。



CK (不添加 IPTG); 泳道 1-5 表示诱导的 IPTG 浓度分别为 0.1 、 0.2 、 0.4 、 0.6 和 $0.8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

CK (without addition of IPTG); Lanes 1-5 represent the purified protein at IPTG concentration of 0.1 , 0.2 , 0.4 , 0.6 and $0.8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively

图 4 SDS-PAGE 检测不同 IPTG 浓度诱导表达产物纯化
Figure 4 Purification SDS-PAGE detection of the expression products induced by different IPTG concentrations



泳道 1-5 表示诱导时间分别为 3、5、7、9 和 11 h

Lanes 1-5 represent the induced protein with induction time of 3, 5, 7, 9 and 11 h, respectively

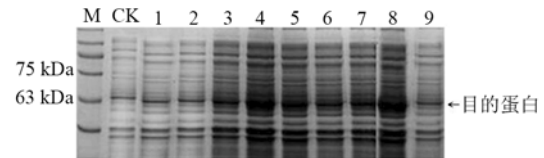
图 5 不同时间诱导表达产物的 SDS-PAGE 检测

Figure 5 Detection of the expression products at different time by SDS-PAGE

2.3 目的蛋白正交试验的优化及纯化

设计正交试验针对诱导温度、IPTG 浓度、诱导

时间进行优化, 并用 His60 Ni 将诱导后的蛋白纯化, SDS-PAGE 电泳检测, 用 Gel Pro Analysis 进行蛋白浓度预测 (图 6、图 7 及表 1), SPSS 17.0 处理数据分析结果显示, IPTG 浓度为 $0.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 诱导温度为 22°C , 时间为 5 h 时, 诱导重组蛋白 PAL 的效果最佳, 模型具显著性差异 ($R^2=0.993$, 调整 $R^2=0.971$, $P\leq 0.05$) (见表 2 和图 8)。正交试验不同处理下蛋白的表达差异显著 ($P<0.05$), 诱导因素的影响程度为 IPTG 浓度>温度>时间。诱导浓度对其影响最显著 ($P=0.015<0.05$)。



CK, 不添加 IPTG; 泳道 1-9 表示正交设计诱导结果
CK, without addition of IPTG; 1-9 represent the induced protein under the conditions of orthogonal test design as in table 1.

图 6 正交试验对 PAL 蛋白诱导结果

Figure 6 Orthogonal test for PAL protein induction results



CK, 不添加 IPTG; 泳道 1—9 表示正交设计条件诱导后的纯化结果

CK, without addition of IPTG; 1-9 represent the purified protein induced under the conditions of orthogonal test design as in table 1.

图 7 目的 PAL 蛋白的纯化结果

Figure 7 Purification result of the target PAL protein

表 1 正交试验设计及结果

Table 1 Orthogonal test design and results

序号 No.	温度/ $^\circ\text{C}$ Temperature	IPTG 浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Concentration	时间/h Time	蛋白质量/ng Protein content
1	22	0.2	3	10.877
2	24	0.2	5	11.083
3	26	0.2	7	13.533
4	24	0.4	3	15.603
5	26	0.4	5	13.904
6	22	0.4	7	12.919
7	26	0.6	3	12.878
8	22	0.6	5	18.008
9	24	0.6	7	12.755

3 讨论与结论

葡萄中, PAL 的活性同花青素的含量呈正相关, 该基因可能在植物代谢网络中能够影响到黄酮类

代谢途径的流速和方向来影响葡萄的果实颜色产生变化。山葡萄 *PAL* 基因鲜少有报道, 本实验研究的 *PAL* 理化性质与其他植物 *PAL* 具有相似的特点。苯丙氨酸解氨酶在有颜色的葡萄品种表达很强, 在

白色葡萄中表达很少或者不表达。外源基因是否能成功地在大肠杆菌中得到正确表达,受到诸多因素影响^[23]。不同植物体所含 PAL 类基因的蛋白质以不同形式存在^[22-27]。通过设计正交试验和单因素试验分析影响山葡萄 PAL 基因的原核表达的主次因素,即诱导温度、诱导剂 IPTG 浓度和诱导时间对表达

效率的影响。正交试验和单因素试验能够直观、高效的观察结果,为山葡萄 PAL 重组蛋白制备以及纯化体系对的建立提供了依据。山葡萄 PAL 基因成功表达,进一步证实了克隆所获得的目的基因的准确性。

表 2 正交试验主体间效应检验
Table 2 Inter-subject effect test of orthogonal experiment

源 Source	型平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F value	P 值 P value
校正模型 Correction model	38.629	6	6.438	45.755	0.022
截距 Intercept	1 641.870	1	1 641.870	11 668.525	0.000
温度 Temperature	11.359	2	5.679	40.363	0.024
IPTG 浓度 IPTG concentration	18.094	2	9.047	64.297	0.015
时间 Time	9.175	2	4.588	32.604	0.030
误差 Error	0.281	2	0.141		
总计 Total	1 680.780	9	9		
校正的总计 Corrected total	39.910	8	8		

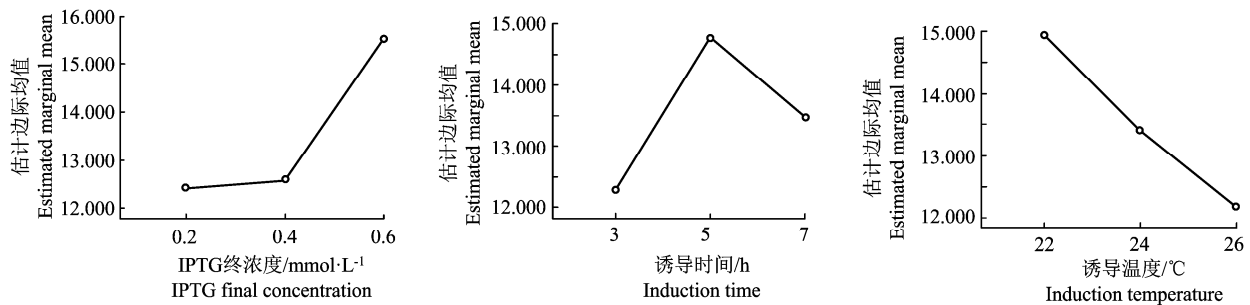


图 8 正交试验各因素效应曲线
Figure 7 Effect curves of factors in orthogonal experiment

通过对 PAL 蛋白原核表达的分析, IPTG 浓度为 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 诱导温度为 22°C , 诱导时间为 5 h 时, 诱导重组蛋白 PAL 的效果最佳, 诱导因素的影响程度为 IPTG 浓度>温度>时间, 试验结果对探究 PAL 蛋白的大量表达提供一定参考, 为后续 PAL 蛋白的功能验证建立了基础。

参考文献:

- [1] 朱丹, 尹鹏飞, 候丽霞, 等. 11 个酿酒葡萄品种在胶东半岛地区的引种表现[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2018, 35(4): 271-277.
- [2] 许培磊, 杨义明, 秦红艳, 等. 不同品种山葡萄接种霜霉病菌后叶片的超微结构与抗氧化酶活性变化[J]. 北方园艺, 2018(17): 45-54.
- [3] MA Y Y, ZHANG Y L, SHAO H, et al. Differential physio-biochemical responses to cold stress of cold-tolerant and non-tolerant grapes (*Vitis L.*) from China[J]. J Agron Crop Sci, 2010, 196(3): 212-219.
- [4] 韩诚武, 高鹏飞, 丁玉萍, 等. 山葡萄酒苹果酸—乳酸发酵工艺优化[J]. 食品与机械, 2018, 34(7): 200-203.
- [5] 黄金焕. 山葡萄优质高产栽培技术[J]. 江西农业, 2018(12): 2.
- [6] 徐华容, 李丽琪, 刘阳, 等. AB-8 大孔树脂纯化紫色马铃薯花色苷的工艺研究[J]. 中国药学杂志, 2017, 52(24): 2141-2145.
- [7] 徐龙, 葛林梅, 郜海燕, 等. 黑莓花色苷提取纯化及抗氧化研究进展[J]. 浙江农业科学, 2014, 55(4): 550-554.
- [8] 邹波, 曾丹, 吴继军, 等. 不同品种紫肉甘薯抗氧化能力及花色苷成分分析[J]. 食品科学, 2018, 39(2): 38-44.
- [9] 楼乐燕, 岳阳, 尹培, 等. 单宁酸和绿原酸对杨梅花色苷的辅色研究[J]. 食品与发酵工业, 2018(12): 1-11.
- [10] 朱敏倩, 张文霞, 王磊, 等. 辅色剂对木棉花色苷辅色效果及其稳定性的影响[J]. 食品工业, 2018, 39(10): 180-184.
- [11] JOSTON S A, ROBERTO M, TERESA M, et al. Effect of high carbon dioxide concentration on PAL activity and phenolic contents in ripening cherimoya fruit[J]. Postharvest Bio Tec, 2001, 23(1): 33-39.
- [12] FUKUDA H, KOMAMINE A. Establishment of an experimental system for the study of tracheary element dif-

- ferentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*[J]. *Plant Physiol*, 1980, 65(1): 57-60.
- [13] 陈蒙, 张雪, 张宇, 等. 山葡萄苯丙氨酸解氨酶基因(*PAL*)的克隆与表达分析[J]. *华北农学报*, 2018, 33(6): 64-71.
- [14] 郑祖宇. E26 菌剂对葡萄悬浮细胞防卫反应基因 *pal* 和 *sts* 表达的影响[D]. 北京: 中国农业大学, 2003.
- [15] 周爱琴, 祝军, 生吉萍, 等. 苹果花青素形成与 *PAL* 活性及蛋白质含量的关系[J]. *中国农业大学学报*, 1997, 2(3): 97-99.
- [16] 崔艳涛, 孟庆瑞, 王文凤, 等. 安哥诺李果皮花青苷与内源激素、酶活性变化规律及其相关性[J]. *果树学报*, 2006, 23(5): 699-702.
- [17] 赵则海, 邱卓荣, 陈雄伟, 等. 攀援型和矮生型四棱豆苯丙氨酸解氨酶活性和黄酮含量的研究[J]. *生态环境学报*, 2011, 20(11): 1670-1674.
- [18] KOSUGE T, CONN E E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. V. Purification and properties of dihydrocoumarin hydrolase of *Melilotus alba*[J]. *J Biol Chem*, 1962, 237: 1653-1656.
- [19] 张雪. 山葡萄果皮转录组测序及 *PAL* 基因的克隆与表达分析[D]. 延吉: 延边大学, 2018.
- [20] 李晶, 李芳娜, 林雄杰, 等. 牛樟芝 *se* 原核表达载体构建及重组蛋白的表达、纯化[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(16): 50-53.
- [21] 林雄杰, 王琴秋, 陈少华, 等. 稻瘟病菌 Rab5 蛋白的表达及互作蛋白的初步筛选[J]. *热带作物学报*, 2011, 32(7): 1352-1355.
- [22] 陈蒙, 袁赫海, 杨铭慧, 等. 山葡萄类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶基因的表达分析[J]. *河南农业科学*, 2018, 47(11):95-98.
- [23] 宋婕. 丹参苯丙氨酸解氨酶基因 (*SmPAL1*) 的克隆及其功能初探[D]. 西安: 陕西师范大学, 2007.
- [24] 韩秀丽. 大麦水杨酸合成基因 *ICS* 和 *PAL* 的克隆与分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2013.
- [25] 李成磊, 冯争艳, 白悦辰, 等. 金荞麦苯丙氨酸解氨酶基因 *FdPAL* 的克隆及原核表达[J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(23): 3238-3243.
- [26] 郭庆勋, 阮文渊, 怀凤涛, 等. 辣椒素生物合成途径基因 *pal* 克隆及原核表达分析[J]. *东北农业大学学报*, 2010, 41(5): 66-71.
- [27] 王伟英, 李海明, 戴艺民, 等. 中国水仙类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶基因的原核表达[J]. *福建农业学报*, 2016, 31(8): 816-819.