

粗毛革孔菌及其高产漆酶突变株的比较分析

韩振亚, 徐晓立, 张爱萍, 谢君

(农业部能源植物资源与利用重点实验室, 华南农业大学新能源与新材料研究所, 广东广州 510642)

摘要: 漆酶是一种广泛分布的多酚氧化酶, 在食品、能源和环保等领域具有重要的应用价值。本实验室所筛的高产漆酶粗毛革孔菌经诱变后, 生长形态变化大, 突变株漆酶活力可达 303 U/mL, 是野生菌的 3 倍多。本文比较分析了原始菌株和突变菌株的生理生化差异, 并通过 RAPD 比较分析了它们的差异基因。用 140 条随机引物扩增获得 20 条稳定的特异条带, 并对其中的 3 条进行回收、克隆, 测序结果与 BLASTX、NCBI 数据库的比对表明引物 S381 扩增出的 809 bp 的特异条带对应于云芝的假想蛋白, 引物 S225 扩增出的 654 bp 的特异条带对应于 30 S 核糖体蛋白 S4, 引物 S193 扩增的 1027 bp 的特异条带对应于糖苷水解酶。该试验为探讨粗毛革孔菌突变株高产漆酶的分子机制, 以及通过定向突变构建高产漆酶工程菌提供理论依据。

关键词: 粗毛革孔菌; 变异体; 形态学; 酶活; 生物信息学分析

文章编号: 1673-9078(2014)7-81-86

Comparison of *Coriopsis gallica* and High Laccases Production Mutant

HAN Zhen-ya, XU Xiao-li, ZHANG Ai-ping, XIE Jun

(Key Laboratory of Energy Plant Resources and Utilization, Ministry of Agriculture, Institute of New Energy and New Materials, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Laccase is a kind of polyphenol oxidase, and it has important application values in food, energy, environment industries and other fields. A mutant strain from wild *Coriopsis gallica* was selected, and its morphological characteristics were very different from the wild strain. The production of laccase by the mutant was up to 303 U/mL, which was three times higher than that by the wild strain. In this article, the physiological and biochemical differences between the wild and mutant, and their genetic differences with RAPD were compared and analyzed. Twenty stable specific bands were amplified with 140 random primers, and three of them were recovered and cloned. Then comparison analysis of their sequencing results with BLASTX, NCBI database showed that the 809 bp band from primer S381 was corresponding to a hypothetical protein of *Trametes versicolor*. The 654 bp band from primer S225 was corresponding to 30 S ribosomal protein S4 of *Oribacterium* sp, and the 1027 bp band from primer S193 was corresponding to glycoside hydrolase of *Dichomitus squalens*. This test would provide a theoretical basis for investigating molecular mechanism of the mutant yielding high laccase, and building high yield laccase engineering stain by directed mutation.

Key words: *Coriopsis gallica*; mutant; morphology; enzyme activity; bioinformatics analysis

漆酶 (laccase, EC 1.10.3.2) 是含铜的多酚氧化酶 (polyphenol oxidases, PPO), 能通过 O₂ 作为电子传递介质氧化多种酚类化合物, 生成苯醌和水^[1]。因漆酶对底物的专一性要求不高, 能氧化大范围的化合物, 近年来, 漆酶除在纸浆生物漂白、环境污染治理^[2]、生物除污和饲料加工及堆肥等方面有广泛的应用外, 还应用于食品工业, 如饮料加工、食药菌生产、食品分子交联等; 有机合成; 生物及免疫检测, 如基

收稿日期: 2014-02-14

基金项目: 广东省科技计划重点项目(2011B090400437); “十二五” 国家科技支撑计划(2011BAD22B01)

作者简介: 韩振亚 (1989-), 男, 硕士研究生

通讯作者: 谢君 (1965-), 男, 教授、博士生导师, 主要从事能源植物及其生化转化研究

于漆酶的生物传感器等领域。由于漆酶的广泛应用, 国际上对其研究越来越受到广泛关注。

白腐真菌 (*white-rot fungi*) 是一类产漆酶的真菌。白腐菌所分泌的木质素降解酶主要有 3 种, 即木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶, 在白腐菌木质素降解酶系统中, 漆酶与过氧化物酶相比具有更大的实际应用价值。粗毛革孔菌 (*Coriopsis gallica*) 是一种能够高效表达胞外漆酶的白腐真菌^[3]。对于粗毛革孔菌的研究主要集中在对其提取物的抗菌研究^[4]和产漆酶性质的研究^[5], 对于粗毛革孔菌产漆酶机理研究不多。

本实验室自主筛选出一株漆酶活力较高的野生型粗毛革孔菌 (*Coriopsis gallica*) CK, 在此基础上经过紫外和亚硝基胍联合诱变得到突变型粗毛革孔菌 T9, 采用 ABTS 法检测发酵培养条件下漆酶的活性,

结果表明突变型粗毛革孔菌漆酶活性达到 303 U/mL, 是野生菌的 3 倍多, 该菌具有潜在工业化应用前景, 也是研究白腐真菌高产漆酶分子调控机制的良好材料。

目前由于细菌漆酶的广泛应用使得人们对它的关注度越来越高, 但对其研究还远远不够。本研究对野生粗毛革孔菌和诱变粗毛革孔菌进行生理生化分析以及随机引物扩增。从生理、DNA 水平上研究原始株与突变株的基因组水平的差异, 在分子水平上探讨引起突变株漆酶活性提高的因素, 为进一步了解粗毛革孔菌突变株高产漆酶的分子机制、深入了解漆酶代谢特征以及构建高产漆酶工程菌奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验菌株: 本实验所用的菌株是野生型的粗毛革孔菌(为本研究室自主筛选), 以及粗毛革孔菌突变体 T906 (*Corioloropsis gallica* T906)。其中 T906 (T9) 保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏号为 CCTCCM 2011317。

PDA 液体培养基 (1 L): 土豆 200.0 g, 蔗糖 20.0 g。

高产漆酶 TNI 发酵培养基 (1 L): 酸水解干酪素 15.0 g, 麦麸 25.0 g, 甘油 10.0 g, 磷酸氢二氨 3.0 g, KH_2PO_4 2.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.3 g, 琥珀酸丁二钠 1.18 g, VB_1 10 mg, 吐温-80 0.5 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 微量元素混合液 70 mL。

LB 液体培养基 (1 L): 酵母提取物 5.0 g, 胰蛋白胨 10.0 g, NaCl 10.0 g, 用氢氧化钠调节 pH 到 7.4。固体培养基, 每升加入 20 g 琼脂粉。

所有培养基在使用前均须在 121 °C 下灭菌 20 min。

1.2 试剂

胶回收试剂盒、*Tap* 酶、dNTP、真菌基因组提取试剂盒、80 条随机引物 S1037-S1116 均购自于上海生工生物有限公司。

本实验所用的大肠杆菌感受态细胞为 Trans1-T1, 载体选用 pEASY-T1 Cloning Kit, 购自于北京全式金生物技术有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株的活化及生长形态观察

将放置于 4 °C 下的 PDA 固体培养基中的 CK、T9

用打孔器打 0.7 cm 直径的菌塞, 各接种 3 片菌塞于 50 mL PDA 液体培养基, 31 °C, 180 r/min 培养 3 d。并各取菌塞接种于新鲜 PDA 固体培养基, 放置于 31 °C 培养, 观察生长形态。

1.3.2 透射电镜观察

取在 PDA 固体培养基上生长 3 d 的 CK、T9 菌体, 4% 戊二醛固定, 透射电镜待检。

1.3.3 发酵培养基 (TNI) 培养

取上述培养 3 d 的菌液加入灭菌的细玻璃珠和碎载玻片, 于 31 °C, 200 r/min 摇 1 h。再取打散的菌液各 4 mL 于 50 mL 的 TNI 培养基, 接种的菌液浓度为 8%。于 31 °C, 180 r/min 培养。

1.3.4 漆酶酶活测定

每隔 24 h 取 TNI 培养基中菌液, 以 ABTS 为底物检测酶活。

1.3.5 真菌总 DNA 的提取及检测

9 d 之后取上述菌液离心, 弃上清, 利用真菌基因组 DNA 快速提取试剂盒 (生工生物) 提取真菌总 DNA。用 1% 的琼脂糖检测 DNA 质量, 并利用核酸蛋白分析仪 (BECKMAN COUNTER DU730) 检测 DNA 浓度, 将提取的 DNA 置于 -20 °C 冰箱中保存。

1.3.6 RAPD-PCR 反应程序

PCR 反应体系为 25 μL , 其中 10 \times PCR 反应缓冲液 (不含 Mg^{2+}) 2.5 μL , dNTPs (10 mmol/L) 0.4 μL , MgCl_2 (25 mmol/L) 1.5 μL , 引物 (5 $\mu\text{mol/L}$) 1.2 μL , Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 0.4 μL , 模板 DNA (15 ng/ μL) 3 μL , ddH₂O 16 μL 。扩增反应在 PCR 仪 (Bio-RAD MyCycler™ Thermal Cycler) 上进行。扩增程序为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 35 s, 40 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 40 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。

1.3.7 电泳检测和数据分析

以 DM5000 DNA Marker (康为世纪) 为分子量对照, 取 9 μL PCR 产物加入 1 μL 6 \times loading buffer (Takara) 在 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳, 经 EB 染色后, Universal Hood II (BIO-RAD) 凝胶成像系统拍照。

1.3.8 切胶回收

选取扩增清晰的特异性条带, 用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (生工生物) 进行切胶回收, 回收之后在 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳, 经 EB 染色后, 检测回收纯度。

1.3.9 目的片段连接转化及挑选单克隆

本实验采用 pEASY-T1 Cloning Kit (北京全式金生物技术有限公司) 载体, 用于连接胶回收之后片段。

转化所用的大肠杆菌感受态为 Trans1-T1 (北京全式金生物技术有限公司)。转化之后涂布于 LB 固体培养基 37 °C 培养 1 d, 挑选单克隆进行菌落 PCR。菌落 PCR 体系采用 25 μ L 反应体系, 其中 10 \times PCR 反应缓冲液 (不含 Mg^{2+}) 2.5 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 0.4 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 1.5 μ L, 引物 (5 μ mol/L) 1.2 μ L, Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.4 μ L, 不足体系的用双蒸水进行补足 25 μ L。扩增反应在 PCR 仪 (Bio-RAD MyCyclerTM Thermal Cycler) 上进行。扩增程序为 94 °C 预变性 10 min, 94 °C 变性 30 s, 50 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。

1.3.10 测序以及生物信息分析

挑选的阳性单克隆, 在 LB 液体培养基中进行扩大培养, 培养条件为 37 °C, 200 r/min。培养 17 h 后送华大基因测序。获得测序结果后进行生物信息学分析。

1.3.11 荧光定量 PCR

提取粗毛革孔菌及其变异体 RNA, 并合成 cDNA 第一链。荧光定量 PCR 使用 TaKaRa 公司 SYBR Premix Ex Taq, 体系为: SYBR Premix Ex Taq II (2 \times) 12.5 μ L; 上游引物 1 μ L; 下游引物 1 μ L; 超纯水 8.5 μ L; RT 反应液 2 μ L。空白对照以超纯水代替模版 DNA。反映程序为: 预变性 95 °C、2 min; 变性 95 °C、15 s; 退火及延伸 63 °C、30 s、40 个循环。循环结束后进行溶解曲线分析。实验使用 18S RNA 作为内参基因。

表 1 荧光定量 PCR 引物

Table 1 List of RT-PCR primers

	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
18s RNA	TTGCTGGTTGCCGTCCTTCTTAGA	CTCGCTGGCTCTGTCAAGTGTA
糖苷水解酶	AGATCGAGAATGGTGTAGATGCC	TGCATCCGTCTTCCTTTCAACTA
30S 核糖体蛋白 S4	ACTTCATAGGGATCCGGTTCTTG	CAATGATAGCGGGAGTAGGACAA

2 结果与讨论

2.1 生长形态观察

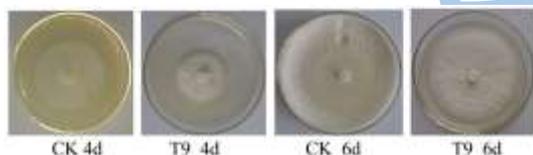


图1 CK、T9在固体PDA培养基上生长情况

Fig.1 CK and T9 grown in PDA solid culture

由图 1 可以看出, CK、T9 生长形态以及生长速度明显不同, 在第四天 CK 菌圈明显比 T9 大, 说明其菌丝体伸展的较长。CK 的菌圈直径为 5 cm, T9 的菌圈直径为 3 cm。在第六天 CK 中间区域基本无变化, 周围区域开始变厚, 而且有继续向培养皿的壁上生长的趋势。T9 继续生长, 其菌圈范围大约有 8 cm, 但是仍未长满整个 PDA 平板。从图 1 也可以清楚的看到, T9 菌体明显较厚, 并且中间有网孔结构。

2.2 透射电镜观察

从透射电镜结果 (图 2) 可以看出, CK 菌丝体细胞壁较厚, T9 的比较薄。并且从横截面看 CK 的细胞壁最厚的可以达到总菌体横截面直径的 1/3。但 T9 细胞壁较薄, 并且普遍的厚度只有总横截面直径的 1/10 或者更低。说明经过诱变, T9 的细胞壁发生了明显的变化。

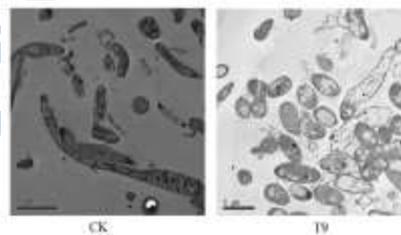


图2 CK、T9透射电镜观察

Fig.2 TEM of CK and T9

2.3 漆酶酶活测定

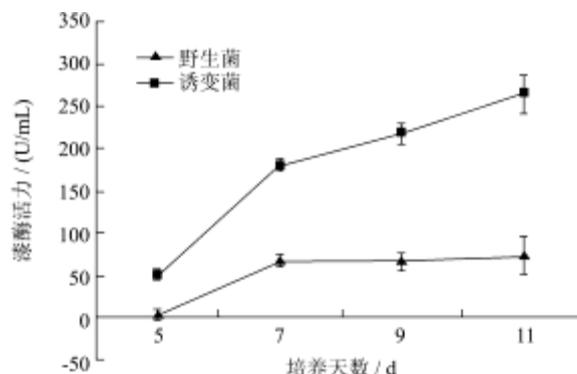


图3 野生及诱变粗毛革孔菌漆酶产酶规律

Fig.3 Laccase producing law of *Corioloropsis gallica* and its mutant

采用 1.3.3 的方法, 研究野生及诱变粗毛革孔菌胞外漆酶活力随时间变化的规律。以 ABTS 法^[5]测定漆酶酶活, 检测结果 (图 3) 表明诱变菌漆酶活力在各个时期都明显高于野生菌, T9 产漆酶单位酶活明显比野生菌要高。两菌在第 5 d 到第 7 d 之间漆酶活力快速

提高,野生菌在第7d之后进入平台期,诱变菌在第7d之后漆酶活力继续提高,在第11d或13d进入平台期。

2.4 RAPD 扩增结果分析

表 2 13 条引物序列及其扩增结果

Table 2 Sequence of 13 primers and amplifying results

引物	序列	扩增带数/条	多态性带数/条	多态性带的比例/%
S2001	TTCCCCACCC	5	1	20
S184	CACCCCCTTG	11	2	18.2
S186	GATACCTCGG	9	1	11.1
S193	GTCGTTCCTG	7	2	14.3
S196	AGGGGGTTCC	7	1	14.3
S225	TCCGAGAGGG	5	1	20.0
S252	TCACCAGCCA	10	1	10.0
S273	CACAGCGACA	11	3	27.3
S261	CTCAGTGTCC	8	2	25.0
S347	CCTCTCGACA	8	3	37.5
S353	CCACACTACC	8	1	12.5
S376	GAGCGTCGAA	8	1	12.5
S381	GGCATGACCT	7	1	14.3

RAPD (Random amplified polymorphic DNA) 技术由于简便、快速、经济、需样量少、多态性好的特点,已成功应用于遗传多样性检测、基因定位、品系鉴定、医学诊断、遗传图谱构建和系统学研究等诸多领域^[6]。但是 RAPD 扩增也有其不稳定性,由于众多因素都可能影响到扩增结果,使得 RAPD 扩增结果不稳定。同时,对于真菌来说,RAPD 扩增出来的多态性并不能够完全反映其基因的变化。真核生物 DNA 分子含有大量内含子,能够表达的基因序列很少,扩增量可能达不到检测的水平,所以 RAPD 的多态性不直接等同于基因水平上的多态性,并非真正意义上的基因突变,但是这种 DNA 序列上的碱基缺失、重复、移码等是产生基因突变的原因。利用 RAPD 检测多态性可分为三种类型^[7]: 扩增产物的长度多态性,扩增条带的有无(零等位),以及条带强度等。

利用RAPD技术进行变异体研究分析,前人也做了相应的研究。郭传翔^[8]利用RAPD技术进行了桃芽变品种的RAPD分析。李杰勤^[9]对蓝天堂黑麦草的NaN₃诱变株进行RAPD分析,结果在100条引物中筛选出3条引物能扩增出有差异的条带,证明蓝天堂黑麦草发生了诱变。本研究通过RAPD扩增,从140条引物中筛选出能够稳定扩增并且有差异条带的13条引物。为了保证RAPD实验中所选取的引物能够稳定扩增,实验共进行

了4轮,逐步排除特异性不好、以及扩增不稳定的引物,以确保扩增的质量和结果的可靠性。

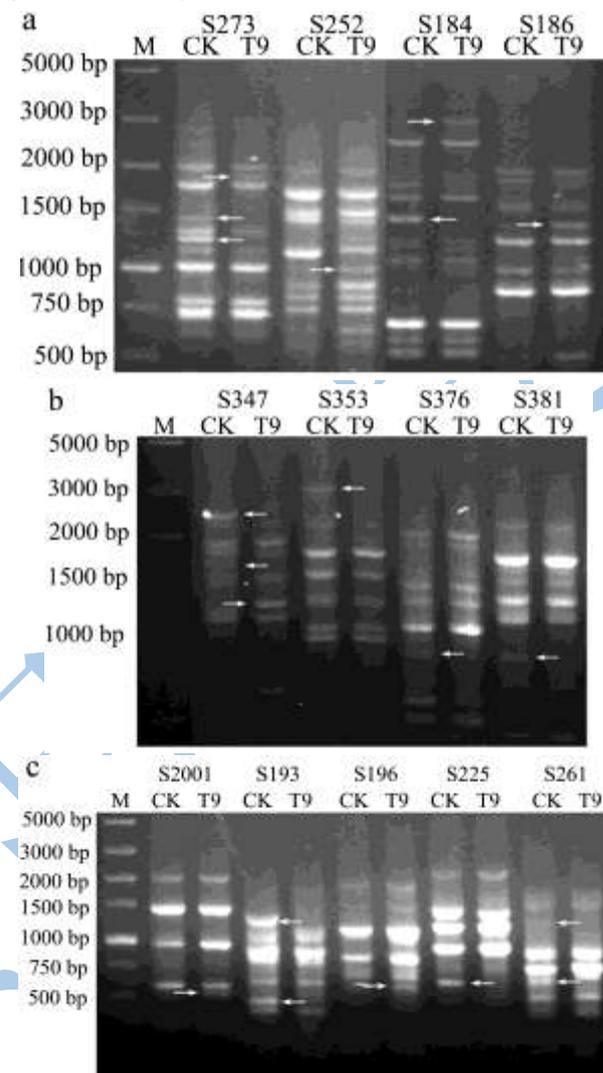


图4 随机引物扩增结果

Fig.4 Results of random amplified polymorphic DNA

Note: The white arrow indexed the polymorphic loci; The primer code was shown above the result.

用 140 条随机引物(生工生物)分别对 CK 和 T9 的 DNA 进行 RAPD 扩增。经过四轮扩增,从中选出 13 条扩增效率高、谱带清晰且能够稳定扩增并且有特异片段的引物。此 13 条引物分别为 S2001、S184、S186、S193、S196、S225、S252、S261、S273、S347、S353、S376、S381(序列见表 2)。由图 4 的扩增结果可以看出,所扩增出的谱带大小在 100~3000 bp。此 13 条引物共扩增出 104 个条带,特异性条带共有 20 条,平均特异性条带为 19.2%,平均每条引物扩增出条带 8.0 个位点。其中,S347 扩增出的多态性带的比例最高,达到 37.5%;S273、S184 扩增的条带数目最多,为 11 条。

本研究只是做了粗毛革孔菌及其变异体 RAPD 分

析的一部分工作。后续研究还可以得到更多的数据，比如扩大RAPD的引物数量，多进行切胶回收并对差异片段进行分析，之后进行荧光定量分析两者之间是否有表达的差异，还可以进行RNA干扰^[10]或者基因的定向敲除^[11]以确定是否是该序列的影响导致其差异的产生。

2.5 挑选单克隆

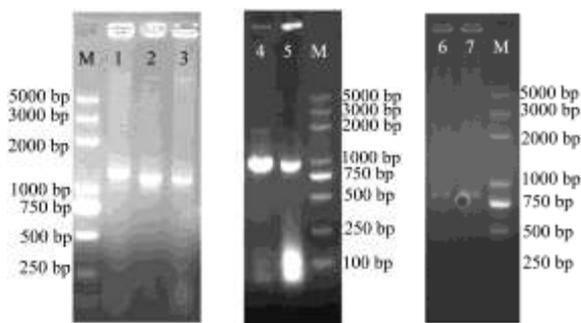


图5 引物 S193、S381、S225 特异性条带转化后的菌落 PCR 结果

Fig.5 The results of colony-PCR of the polymorphic loci transformation from primer S 193, S 381, S 225

从20条特异条带中选择3条易于切胶回收的片段进行切胶回收，切胶回收的扩增引物有 S193、S225、S381。扩增之后，在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳，EB 染色之后利用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒（生工

生物）进行切胶回收。回收产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳以检测回收效率以及有无其它 DNA 污染，并根据分子量大小确定是否为目的条带。

结果分析显示，扩增的差异条带回收效率较好，回收的 DNA 片段大小与特异性片段大小一致，为目的条带。选择目的 DNA 进行连接转化。为了确定转化子是否为阳性克隆，又进行了菌落 PCR 扩增。菌落 PCR 扩增结果如图 5，挑选阳性克隆，扩大培养，并送华大基因测序。

2.6 测序结果以及生物信息学分析

测序结果在 NCBI 数据库进行 BLASTx 分析（表 3）。结果表明，S381 扩增的特异序列和云芝（*Trametes versicolor*）中的两个假想蛋白相似度较大。S225 扩增的特异序列与 *Oribacterium sp. oral taxon 108* 的 30S 核糖体蛋白 S4 相似度很大，达到 45%。S193 扩增的特异序列与污叉丝孔菌（*Dichomitus squalens*）以及云芝（*Trametes versicolor*）的糖苷水解酶相似度很大，分别达到 71% 和 61%。以上片段只存在于原始株而在突变株中没有得到扩增结果，表明在染色体的相应位置，该片段所在的结构基因发生了位置变化（染色体的重组，缺失，倒位，或者易位），由于这种位置效应的产生，可能导致突变株性状发生明显的变异。

表 3 特异性条带的 BLASTX 分析

Table 3 BLASTX analysis of polymorphic loci

随机引物扩增特异条带	同源比对结果	来源	分值	E 值	相似性 /%
S381 特异条带	假想蛋白 hypothetical protein TRAVEDRAFT_17554	云芝 <i>Trametes versicolor</i> FP-101664 SS1	58.1	1.8	48
	假想蛋白 hypothetical protein TRAVEDRAFT_43397	云芝 <i>Trametes versicolor</i> FP-101664 SS1			
S225 特异条带	30S 核糖体蛋白 S4 30S ribosomal protein S4	<i>Oribacterium sp. oral taxon</i> 108	40.4	0.25	45
	30S 核糖体蛋白 S4 30S ribosomal protein S4	<i>Oribacterium sp. ACB1</i>			
S193 特异条带	糖苷水解酶 glycoside hydrolase	污叉丝孔菌 <i>Dichomitus squalens</i> LYAD-421 SS1	157	1E-29	71
	糖苷水解酶 glycoside hydrolase	云芝 <i>Trametes versicolor</i> FP-101664 SS1			

2.7 荧光定量 PCR

提取的 RNA 经过检测质量良好。进行荧光定量分析，使用 $2^{-(\Delta \Delta C_t)}$ 法进行计算，粗毛革孔菌野生株及突变株在 TNI 培养基中第 3 d 的糖苷水解酶转录量，

CK 是 T9 的 5.25 倍，在第 7 d，糖苷水解酶的转录量 CK 是 T9 的 70.03 倍。表达量有明显差异。30S 核糖体蛋白 S4 在第 3 d 的转录量，CK 是 T9 的 2.97 倍；在第 7 d，CK 是 T9 的 5.46 倍。两菌株在第 3 d 和第 7 d 的糖苷水解酶和 30 S 核糖体蛋白 S4 的转录量存在

明显的差异。

据瞿礼嘉^[12]报道哺乳动物核糖体 S4 蛋白定位在 40 S 和 60 S 亚基相连接处,同起始因子 eIF-3 相互作用,可能与核糖体与 mRNA 的结合有关。王卫杰^[13]也同样认同上述观点,同时也指出核糖体 S4 蛋白被认为是更直接地涉及核糖体功能的小亚基蛋白质。而核糖体和 mRNA 的结合会对基因的表达起到重要的作用,假如这个过程受到影响,基因的表达也会随之改变。

大部分植物的糖苷水解酶是参与植物细胞壁多聚体的代谢,而且还会具有其它功能比如植物多聚糖的生物合成和调节、信号、植物次生代谢已经糖脂代谢有关^[4]。透射电镜观察结果确实是发现 CK 的细胞壁比 T9 的厚。本研究结果和 Zoran Minic 的报道结果一致,这也间接佐证了 S381 扩增出的 809 bp 的片段的差异可能存在。同时,细胞壁的厚度与蛋白质分泌胞外有直接的关系,如果细胞壁加厚,作为胞外酶的漆酶的分泌是否会因此而受到影响也需要进一步的探讨和研究才能得出结论。

3 结论

3.1 本研究对粗毛革孔菌野生株和突变株进行了性状分析,得出突变株的细胞壁变得较薄,而且通过 RAPD 扩增发现糖苷水解酶在两菌株中的扩增中存在差异位点。可能是由于诱变导致糖苷水解酶表达产生变化而导致细胞壁表现差异。

3.2 突变株漆酶产量高达 303 U/mL,为工业应用奠定基础。同时高产漆酶的诱变株为研究漆酶的代谢机理提供良好的研究材料。

3.3 通过 RAPD 分析,表明在菌体内 30 S 核糖体蛋白 S4、糖苷水解酶的 DNA 序列可能发生变化。突变株漆酶产量增加可能是受到 30 S 核糖体蛋白 S4、糖苷水解酶的变化影响。

参考文献

[1] Paola Giardina, Vincenza Faraco, Cinzia Pezzella, et al. Laccases: a never-ending story [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010, 67(3): 369-385

[2] Upendra N. Dwivedi, Priyanka Singh, Veda P Pandey, et al. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2011, 68(2): 117-128

[3] José M Carbajo, Howard Junca, María C Terrón, et al. Tannic acid induces transcription of laccase gene cgcc1 in the white-rot fungus coriopsis gallica [J]. Canadian Journal of

Microbiology, 2002, 48(12): 1041-1047

[4] Soji Fakoya, Sandra Folarin Oloketuyi. Antimicrobial efficacy and phytochemical screening of mushrooms, lenzites betulinus, and coriopsis gallica extracts [J]. TAF Prev. Med. Bull., 2012, 11(6): 695-698

[5] David C Bressler, Phillip M Fedorak, Michael A. Pickard. Oxidation of carbazole, n-ethylcarbazole, fluorene, and dibenzothiophene by the laccase of coriopsis gallica [J]. Biotechnology Letters, 2000(22): 1119-1125

[6] 姜自锋,林乃铨,徐梅. RAPD 技术及其应用中的一些问题 [J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2002, 31(3): 356-360

JIANG Zi-feng, LIN Nai-quan, XU Mei. A review on some technical problems in RAPD application [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2002, 31(3): 356-360

[7] 李继红,邵寒霜,郑学勤. 利用 RAPD 技术快速鉴定番茄体细胞无性系变异 [J]. 热带亚热带植物学报, 1999, 7(4): 308-312

LI Ji-hong, SHAO Han-shuang, ZHENG Xue-qin. Rapid identification of tomato somaclonal variation with RAPD [J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 1999, 7(4): 308-312

[8] 郭传翔,潘海发,徐义流,等. 桃芽变品种的 RAPD 分析 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(31): 175-180

GUO Chuan-xiang, PAN Hai-fa, XU Yi-liu et al. RAPD analysis on peach buds change of varieties [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(31): 175-180

[9] 李杰勤,王丽华,詹秋文. 蓝天堂黑麦草的 NaN3 诱变及其 RAPD 分析 [J]. 草业科学, 2013, 22(1): 276-281

LI Jie-qin, WANG Li-hua, ZHAN qin-wen, et al. In vitro mutation induction by nan3 in ryegrass variety "blue heaven" and RAPD analysis for its variation [J]. Acta Praticulturae Sinica, 2013, 22(1): 276-281

[10] William G, Kaelin Jr. Use and abuse of RNAi to study mammalian gene function [J]. Science, 2012, 337: 421-422

[11] Gaurav K Varshney, Jing Lu, Derek E Gildea, et al. A large-scale zebrafish gene knockout resource for the genome-wide study of gene function [J]. Genome Res., 2013, 23: 727-735

[12] 瞿礼嘉,李东辉,张毅,等. 水稻核糖体蛋白 S4 基因的克隆及表达特性研究 [J]. 科学通报, 1999, 44(21): 2313-2319. QU Li-jia, LI Dong-hui, ZHANG Yi, et al. Characteristics of cloning and expression of ribosomal protein S4 rice gene [J]. Chinese Science Bulletin, 1999, 44(21): 2313-2319

[13] 王卫杰. 淡色库蚊核糖体蛋白 S4 基因克隆及其在澳氛菊酯

抗性作用中的初步研究 [D]. 南京:南京医科大学,2007.WANG Wei-jie. Cloning of a novel ribosomal protein S4 gene from culex pipiens pallens and preliminary characterization of its role in deltamethrin resistance [D].

Nanjing: Nanjing Medical University, 2007

- [14] Zoran Minic. Physiological roles of plant glycoside hydrolases [J]. Planta, 2008, 227(4): 723-740

现代食品科技