

玉米磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(*PEPC*)基因的克隆及序列分析王重<sup>1,2</sup>, 樊哲儒<sup>1,2</sup>, 张跃强<sup>1,2\*</sup>, 李剑峰<sup>1,2</sup>, 高新<sup>1,2</sup>

(1. 新疆农业科学院核技术生物技术研究所, 新疆乌鲁木齐 830091; 2. 农业部荒漠绿洲作物生理生态与耕作重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830091)

**摘要** [目的]获得玉米的 *PEPC* 基因, 并对其生物信息学进行分析。[方法]使用 RT-PCR 方法由玉米中获得 *PEPC* 全长 cDNA, 构建克隆载体后进行测序, 并对其序列进行生物信息学分析。[结果]获得的玉米 *PEPC* 基因 CDS 全长 2 913 bp, 编码的多肽链包含 970 个氨基酸, 为疏水性氨基酸, 由  $\alpha$ -螺旋(61.44%)、无规则卷曲(34.43%)和延伸链(4.12%)组成, 定位于细胞质, 不存在跨膜结构域, 其 175~970 位氨基酸组成了磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的功能结构域, 在 173~184、597~609 位具有 2 个磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活性位点。[结论]该研究克隆了玉米  $C_4$  型丙酮酸磷酸双激酶(*PPDK*)基因, 它所编码的氨基酸序列具备 *PPDK* 蛋白的保守序列和催化活性中心区域。

**关键词**  $C_4$  植物; 光合作用效率; *PEPC*; 生物信息学分析**中图分类号** S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)20-114-04**Cloning and Bioinformatics Analysis of Phosphoenolpyruvate Carboxylase (*PEPC*) in Maize**WANG Zhong<sup>1,2</sup>, FAN Zhe-ru<sup>1,2</sup>, ZHANG Yue-qiang<sup>1,2</sup> et al (1. Institute of Nuclear and Biological Technologies, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi, Xinjiang 830091; 2. Key Laboratory of Crop Ecophysiology and Farming System in Desert Oasis Region, Ministry of Agriculture, Urumqi, Xinjiang 830091)

**Abstract** [Objective] To clone the phosphoenolpyruvate carboxylase (*PEPC*) gene obtained from *Zea mays* and analyze it by bioinformatics. [Method] Primarily, the cDNA clone was constructed by RT-PCR amplified with the gene specific primers, then positive clones were sequenced and analyzed by bioinformatics. [Result] The electrophoresis showed that the coding sequence (CDS) of *PEPC* gene in *Zea mays* was 2 913 bp and the polypeptide chains coded by *PEPC* included 926 amino acids, which were hydrophobic amino acids consists of-helix (61.44%), random coil (34.43%) and extended strand (4.12%), with located in the cytoplasm. There was no transmembrane domain. The 175-970 amino acid composition the functional domains of phosphoenolpyruvate carboxylase, in 173-184; 597-609 bits had two phosphoenolpyruvate carboxylase active site with pyruvate orthophosphate dikinase basing on amino acids sequences comparison. [Conclusion] The *PEPC* gene in *Zea mays* has been obtained and the amino acids sequence coded by the gene was conserved and contained active catalyst central site of *PEPC*.

**Key words**  $C_4$  plant; Photosynthetic efficiency; *PEPC*; Bioinformatics analysis

光合作用是作物产量最重要的决定因素之一, 作物中 90% 以上的干重直接来源于光合作用。光合作用效率的高低与作物的产量具有直接的相关性<sup>[1]</sup>。但由于光呼吸普遍存在于  $C_3$  植物, 其消耗的光合同化碳素为 30% 左右, 甚至可达 50%~60%<sup>[2]</sup>,  $C_3$  植物的光合作用效率相对较低。Matsuoka 等<sup>[3]</sup>研究表明,  $C_3$  植物中光呼吸作用使光合作用效率降低了 40%。但陆生植物中 95% 以上, 尤其是水稻和小麦等世界主要粮食作物均为  $C_3$  植物<sup>[4]</sup>, 利用  $C_4$  植物中的高效光合基因对  $C_3$  植物的光合效率进行改良具有广阔的应用前景。

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(*PEPC*)是  $C_4$  光合途径的关键酶, 主要分布于  $C_4$  植物叶肉细胞的叶绿体内, 通过浓缩  $CO_2$  提高  $CO_2$  浓度从而为维管束鞘细胞的  $C_4$  途径提供充足的  $CO_2$ , 起到  $CO_2$ “泵”的作用。研究表明, 向  $C_3$  植物中导入  $C_4$  途径关键酶基因能够使  $C_3$  植物的光合效率提高<sup>[5]</sup>。

玉米属于典型的  $C_4$  植物, 光合作用效率较高。由玉米中克隆 *PEPC* 基因并对其序列进行生物信息学分析, 能够为今后利用该基因提高  $C_3$  植物的光合作用效率提供参考。笔者通过 RT-PCR 方法由玉米中克隆得到 *PEPC* 基因, 构建

克隆载体后进行测序并对该序列进行生物信息学分析。

**1 材料与方法**

**1.1 材料** 供试材料为玉米(*Zea mays*)品种 SC704, 种植于新疆农业科学院核技术生物技术研究所。

**1.2 试剂** Trizol、大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 $\alpha$  感受态购自 TIANGEN 公司, M-MLV RTase cDNA 试剂盒、Ex Taq 均购自 TaKaRa 公司,  $T_4$  DNA 连接酶、TA 克隆载体 pGEM-T Easy 购自 promega 公司, 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司, 其余试剂为进口或国产分析纯。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 测序服务由北京华大提供。

**1.3 方法**

**1.3.1 玉米总 RNA 提取。** 在光照充足的中午, 取玉米叶片迅速置于液氮中研磨, 使用 Trizol 提取总 RNA。提取完成后, 参照 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 程序合成 cDNA。

**1.3.2 *PEPC* 基因扩增。** 根据 GenBank 的玉米磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(*PEPC*)基因的 cDNA 序列, 设计一对引物, 即 P1: 5'-AGATCTGCAGATCTGCTCCAACCATCTCGCTCCGGT-3', P2: 5'-CTTAAGGGCACGTGGCCGCTAGCCAGTGTTCTGCAT-3'。PCR 反应程序: 98℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 30 s, 62℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 3 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 7 min。

**1.3.3 *PEPC* 基因克隆测序。** PCR 产物通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 将得到的目的条带切下, 使用凝胶回收

**基金项目** 新疆农业科学院青年基金项目(xjnkq-2013025)。**作者简介** 王重(1982-), 男, 陕西长安人, 助理研究员, 硕士, 从事小麦遗传育种工作。\* 通讯作者, 副研究员, 博士, 从事小麦遗传育种工作。**收稿日期** 2016-06-14

试剂盒回收 DNA,然后连接到 pGEM-T 载体,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞进行蓝白斑筛选,经菌液 PCR 与酶切鉴定,送北京华大测序。

**1.3.4 PEPC 序列生物信息学分析。**测序结果通过 NCBI ORF Finder、BLAST 及 ProParam 程序进行在线比对,确定序列完整编码框,并对蛋白质的基本理化性质进行预测;使用 TMHMM 和 SPORT 分析蛋白质跨膜结构域并预测其亚细胞定位;采用 ProtScale 分析蛋白的疏水性/亲水性;利用在线工具 PHD 预测蛋白质的二级结构;Smart 分析该酶的功能结构域;ProtFun 分析蛋白质功能;最后使用 PROSITE 分析多肽链的催化位点。

## 2 结果与分析

**2.1 玉米 PEPC 基因的克隆** 以玉米总 RNA 为模板进行 RT-PCR,将扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测,结果发现,在 3 kb 左右处有特异性条带(图 1),与已知 PEPC 基因的 cDNA 全长接近,回收目的片段并构建克隆载体进行测序。

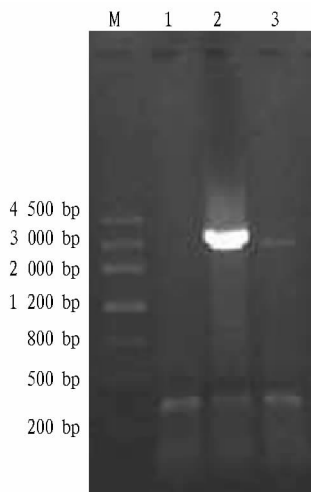


图 1 玉米 PEPC RT-PCR

Fig.1 RT-PCR product of *Zea mays* PEPC cDNA

**2.2 玉米 PEPC 基因的核酸与蛋白质序列** 测序结果使用 Contig Express 进行拼接,然后在 NCBI 上使用 ORF Finder 查找其开放阅读框并进行 BLAST,再利用 ProtParam<sup>[6]</sup> 软件分析其氨基酸序列的理化性质。玉米 PEPC 开放阅读框的长

度为 2 913 bp,GC 含量为 62.1%;BLAST 结果显示,核酸序列与玉米 PEPC(NM\_001111948)最大相似性达 99%;氨基酸序列与玉米 PEPC(NP\_001105418.1)最大相似性为 99%;其编码的多肽大小为 109.31 ku;理论等电点为 5.73;含量最高的氨基酸为 Leu、Glu 和 Ala,不含有 Pyl 和 Sec;负电荷残基总数(Asp + Glu)为 137 个,正电荷残基总数(Arg + Lys)为 119 个;不稳定指数约为 44.65,推测其为不稳定蛋白;脂溶指数为 89.48;亲水性系数为 -0.337,推测玉米 PEPC 为亲水性蛋白质。

**2.3 玉米 PEPC 跨膜结构域的预测和分析** TMHMM2.0 Server 程序分析表明,玉米 PEPC 整条肽链都位于膜外,不存在跨膜结构域。使用 PSORT 对其亚细胞定位进行预测,结果显示,其可能定位于细胞质。

**2.4 玉米 PEPC 的疏水性/亲水性预测和分析** 通过 Protscal 程序对玉米 PEPC 序列的疏水性/亲水性进行分析,结果见图 2。由图 2 可知,PEPC 整条多肽链中亲水性氨基酸均匀分布,且多于疏水性氨基酸,绝大多数氨基酸分值 < 0。整条多肽链表现为亲水性,即 PEPC 属于亲水性蛋白,这与其基本理化性质的预测结果一致。表明玉米 PEPC 中并无明显的疏水区,推测其中可能不存在跨膜蛋白,这也与跨膜结构域的预测和分析结果一致。

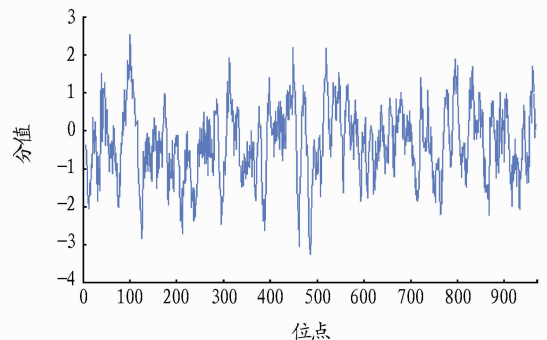


图 2 玉米 PEPC Protscal 分析

Fig.2 Analysis of *Zea mays* PEPC hydropathicity by Protscal

**2.5 玉米 PEPC 二级结构预测与分析** 通过 PHD 软件预测和分析玉米 PEPC 氨基酸序列的二级结构<sup>[7-9]</sup>,结果见图 3。由图 3 可知,玉米 PEPC 二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋(61.44%)、

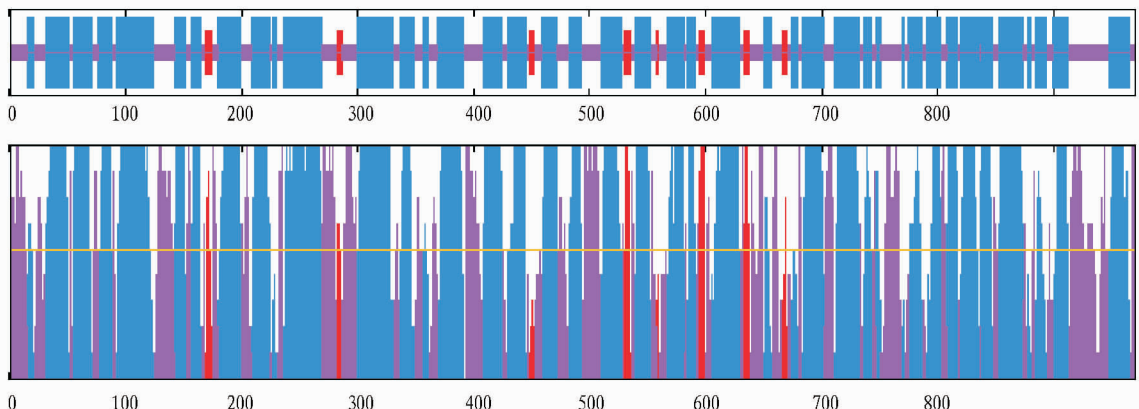


图 3 玉米 PEPC 二级结构预测结果

Fig.3 Forecast of *Zea mays* PEPC secondary structure by PHD

无规则卷曲(34.43%)和延伸链(4.12%)组成, $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲均匀分布于整条肽链,而延伸链则较为集中地分布于多肽链中段。

**2.6 玉米 PEPC 功能结构域预测与分析** 使用 SMART<sup>[10-11]</sup> 序列分析软件对玉米 PEPC 氨基酸序列的功能结构域进行分析,结果见图 4<sup>[7-9]</sup>。由图 4 可知,磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的功能结构域由位于 175~970 位的 796 个氨基酸组成。使用 ProtFun<sup>[12]</sup> 预测玉米 PEPC 的功能,结果表



图 4 玉米 PEPC 功能结构域分析

Fig. 4 Analysis of *Zea mays* PEPC functional domain

明,其最主要的功能是参与氨基酸生物合成,此外,还可能参与脂肪酸代谢、蛋白质翻译、辅因子的生物合成以及其他中间代谢过程。

**2.7 玉米 PEPC Motifs 预测和分析** 利用 ScanProsite<sup>[6]</sup> 对玉米 PEPC 氨基酸序列进行预测和分析,结果表明,其在 173~184、597~609 位氨基酸处具有 2 个磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活性位点。此外,该多肽链还具有 13 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(Protein kinase C phosphorylation site),12 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(Casein kinase II phosphorylation site),14 个 N-豆蔻酰化位点(N-myristoylation site),1 个 cAMP 和 cGMP 依赖蛋白激酶磷酸化位点(cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site),3 个 N-糖基化位点(N-glycosylation site),1 个酰胺化位点(Amidation site)(表 1)。

表 1 玉米 PEPC Motifs 预测

Table 1 Forecast of *Zea mays* PEPC Motifs

结构域 Motifs	定位 Location	结构域 Motifs	定位 Location
磷酸烯醇式丙酮酸活性位点 Phosphoenolpyruvate carboxylase active site	173~184;597~609	cAMP 和 cGMP 依赖蛋白激酶磷酸化位点 cAMP ~ and cGMP - dependent protein kinase phosphorylation site	121~124
蛋白激酶 C 磷酸化位点 Protein kinase C phosphorylation site	3~5;56~58;77~79;146~148;181~183;459~461;477~479;604~606;667~669;708~710;771~773;908~910;958~960	N-糖基化位点 N-glycosylation site	167~170;279~282;665~668
酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 Casein kinase II phosphorylation site	29~32;56~59;141~144;157~160;206~209;236~239;407~410;408~411;422~425;435~438;477~480;604~607	酰胺化位点 Amidation site	495~498
N-豆蔻酰化位点 N-myristoylation site	84~89;89~94;135~140;351~356;632~637;642~647;648~653;757~762;766~771;767~772;793~798;950~955;961~966;965~970		

### 3 讨论

与主要粮食作物小麦、水稻等 C<sub>3</sub> 植物相比,玉米等 C<sub>4</sub> 植物具有 CO<sub>2</sub> 补偿点低、几乎无光呼吸等优点,尤其是在高温、干旱、强光等条件下,C<sub>4</sub> 植物具有明显的生长优势及水分利用率<sup>[13-14]</sup>,同时兼具较高的水分和氮素利用率以及光合作用效率,干物质产量较高<sup>[1]</sup>。因此,人们一直努力通过各种方式使 C<sub>3</sub> 植物具备 C<sub>4</sub> 植物的光合特性,以提高其光合作用效率,从而达到大幅增加产量的目的。以前人们通过 C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub> 植物杂交,希望 C<sub>3</sub> 植物能够获得 C<sub>4</sub> 植物同化 CO<sub>2</sub> 的高效特性,但效果并未达到预期<sup>[15]</sup>。近几年随着基因工程技术的发展,将 C<sub>4</sub> 光合途径转入 C<sub>3</sub> 植物取得了较大突破,在小麦中高粱 PEPC 基因能够高效表达<sup>[16]</sup>,高粱、玉米的 PEPC 基因显著提高了水稻的光合效率<sup>[17-18]</sup>。但在双子叶植物烟草中甘蔗和玉米的 PEPC 基因不能高效表达<sup>[19]</sup>,表明 C<sub>4</sub> 基因在 C<sub>3</sub> 植物中的表达受种系发生距离的影响。

在 C<sub>4</sub> 光合作用途径的所有酶中,磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶是最重要的酶之一<sup>[20]</sup>。在 Mn<sup>2+</sup> 或 Mg<sup>2+</sup> 存在的情况下,它催化磷酸烯醇式丙酮酸羧化为草酰乙酸,然后草酰乙酸转化为苹果酸,同时释放出 CO<sub>2</sub> 和丙酮酸,丙酮酸再转化为磷酸烯醇式丙酮酸。该研究克隆的玉米 PEPC 基因所编码的蛋白包含 970 个氨基酸,通过 SMART 对其编码的氨基酸序列进行功能域分析,结果表明,该序列 175~970 位氨基酸组

成了磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的功能结构域,且在 173~184、597~609 位具有 2 个磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活性位点,推测其具备磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的催化活性。

人们在 *Hydrilla verticillata*<sup>[21-22]</sup> 和 *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae)<sup>[23]</sup> 中进一步研究证实 C<sub>4</sub> 循环和 C<sub>3</sub> 循环能够在单细胞内完成,表明植物的光合代谢存在多种类型。研究发现,逆境条件(如盐害<sup>[24]</sup>、干旱<sup>[25-27]</sup>、低温<sup>[28-30]</sup>及营养胁迫<sup>[30]</sup>等)会改变不同类型光合酶在不同作物或不同器官的表达模式。因此,推断 PEPC 除与光合作用直接相关外,还可能在抗逆生理上发挥作用。PEPC 的功能多效性对于提高作物光合作用以及抗逆性具有重要意义,有待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] 侯爱菊,徐德昌.植物高光效基因育种[J].中国生物工程杂志,2005,25(9):19-23.
- [2] 张其德,张世平.2,3-环氧丙酮钾对水稻光合功能的改善[J].植物学报:英文版,1988,30(1):54-61.
- [3] MATSUOKA M, FURBANK R T, FUKAYAMA H, et al. Molecular engineering of C<sub>4</sub> photosynthesis [J]. Annual review of plant physiology and plant molecular biology, 2001, 52: 297-314.
- [4] KU M S B, AGARIE S, NOMURA M, et al. High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants [J]. Nature biotechnology, 1999, 17: 76-80.
- [5] 李艳,许为钢,胡琳,等.玉米磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因高效表达载体构建及其导入小麦的研究[J].麦类作物学报,2009,29(5):741-746.

- [6] GASTEIGER E, GATTIKER A, HOGLAND C, et al. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 3784–3788.
- [7] 王庭华, 邹晓莉. 蛋白质理论与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 171.
- [8] COMBET C, BLANCHET C, GEURJON C, et al. Network protein sequence analysis [J]. *TIBS*, 2000, 25(3): 147–150.
- [9] GEURJON C, DELEAGE G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments [J]. *Comput Appl Biosci*, 1995, 11: 681–684.
- [10] SCHULTZ J, MILPETZ F, BORK P, et al. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 5857–5864.
- [11] LETUNIC I, DOERKS T, BORK P. SMART 6: Recent updates and new developments [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: 229–232.
- [12] JENSEN L J, GUPTA R, BLOM N, et al. Prediction of human protein function from post-translational modifications and localization features [J]. *J Mol Biol*, 2002, 319(5): 1257–1265.
- [13] 罗红艺. C<sub>4</sub> 植物和 CAM 植物的比较 [J]. 高等函授学报(自然科学版), 2001, 14(5): 35–38.
- [14] 腾胜, 钱前, 黄大年. C<sub>4</sub> 光合途径的分子生物学和基因工程研究进展 [J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(2): 198–201.
- [15] CAMERON R G, BASSETT C L, BOUTON J H, et al. Transfer of C<sub>4</sub> photosynthetic character through hybridization of *Flaveria* species [J]. *Plant Physiol*, 1989, 90: 1538–1545.
- [16] CHEN X Q, ZHANG X D, LIANG R Q, et al. Expression of the intact C<sub>4</sub> type PEPC gene cloned from maize in transgenic winter wheat [J]. *Chin Sci Bull*, 2004, 49: 2137–2143.
- [17] XIANG X C, HE L B, SUN J M, et al. Effect of maize PEPC gene in different genetic backgrounds of CMS maintainers and tolerance to photooxidation in the PEPC transgenic line [J]. *Chin J Rice Sci*, 2009, 23(3): 257–262.
- [18] KU M S B, AGARIE S, NOMURA M, et al. High level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 76–81.
- [19] HUDASPEETH R L, GRNLA J W, DAI Z Y, et al. Expression on maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic tobacco [J]. *Plant Physiol*, 1982, 98: 458–464.
- [20] 赵艳, 陈丽梅, 李昆志. C<sub>4</sub> 光合作用关键酶 PEPC 的反应机制 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(23): 6113–6114, 6118.
- [21] RAO S K, MAGNIN N C, REISKIND J B, et al. Photosynthetic and other phosphocnolpyruvate carboxylase isoforms in the single-cell, facultative C(4) system of *Hydrilla verticillata* [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130(2): 876–886.
- [22] MAGNIN N C, COOLEY B A, REISKIND J B, et al. Regulation and localization of key enzymes during the induction of Kranz-leser, C<sub>4</sub> type photosynthesis in *Hydrilla verticillata* [J]. *Plant Physiol*, 1997, 115: 1681–1689.
- [23] VOZNESEUSKAYA E V, FRANESECHI V R, KHIRATS O, et al. Proof of C<sub>4</sub> photosynthesis without Kranz anatomy in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae) [J]. *Plant J*, 2002, 31: 649–662.
- [24] CUSHMAN J C, MEYER G, MICHALOWSKI C B, et al. Salt stress leads to differential expression of two isogenes of phosphocnolpyruvate carboxylase during Crasulacean acid metabolism induction in the common ice plant [J]. *Plant cell*, 1989, 1: 715–725.
- [25] FONTAINE V, CABANE M, DIZENGREMD P. Regulation of phosphocnolpyruvate carboxylase in *Pinus halepensis* needles submitted to ozone and water stress [J]. *J Physiol Plant*, 2003, 117(4): 445–452.
- [26] HUO S P, YAN Q J, SONG G Y, et al. Progress in morphological and physiological and biochemical indexes of drought resistance [J]. *Agricultural research in the arid areas*, 1995, 13(3): 67–73.
- [27] JEANNEAU M, GERENTES D, FOUALASEAR X, et al. Improvement of drought tolerance in maize: Towards the functional validation of the *Zm-Asr1* gene and increase of water use efficiency by over-expressing C<sub>4</sub> – PEPC [J]. *Biochimie*, 2002, 84(11): 1127–1135.
- [28] NAIDU S L, MOOSE S P, AL-SHOAIBI A K, et al. Cold tolerance of C<sub>4</sub> photosynthesis in *Miscanthus × Giganteus*: Adaptation in amount and sequence of C<sub>4</sub> photosynthetic enzymes [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132(3): 1688–1697.
- [29] KUBIEN D S, VON CAEMMERER S, FURBANK R T, et al. C<sub>4</sub> photosynthesis at low temperature. A study using transgenic plants with reduced amounts of Rubisco [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132(3): 1577–1585.
- [30] GONZALEZ M C, SANEHEZ R, CEJUDO F J. Abiotic stresses affecting water balance induce phosphocnolpyruvate carboxylase expression in roots of wheat seedlings [J]. *Planta*, 2003, 216(6): 985–992.

## (上接第 85 页)

- [2] 中国检验检疫科学研究院. 食品及饲料中常见禽类品种的鉴定方法第 6 部分: 鹌鹑成分检测 实时荧光 PCR 法: SN/T 3731. 6—2013 [S]. 北京: 国家认证认可监督管理委员会, 2013.
- [3] TAJIMA K, ENISHI O, AMARI M, et al. PCR detection of DNAs of animal origin in feed by primers based on sequences of short and long interspersed repetitive elements [J]. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, 2002, 66(10): 2247–2250.
- [4] 孙艳华, 张智勇, 牛晋阳, 等. PCR 法快速检测熟肉制品中肉类来源 [J]. 食品研究与开发, 2010, 31(5): 139–142.
- [5] SOARES S, AMARAL J S, MAFRA I, et al. Quantitative detection of poultry meat adulteration with pork by a duplex PCR assay [J]. *Meat science*, 2010, 85(3): 531–536.
- [6] KNOB A, TERRASAN C R F, CARMONA E C.  $\beta$ -Xylosidases from filamentous fungi: An overview [J]. *World journal of microbiology and biotechnology*, 2010, 26: 389–407.
- [7] 王海艳, 陈颖, 杨海荣, 等. 食品过敏原胡桃 PCR 检测方法研究 [J]. 中国食品学报, 2010, 10(1): 214–218.
- [8] 巢强国, 杨学明, 葛宇, 等. PCR 法检测食品中大肠杆菌 O157:H7 [J]. 食品科学, 2010, 31(8): 212–215.
- [9] 杨冬梅, 杨永存, 杨小柯, 等. 物种特异性基因扩增鉴别掺假食用植物油 [J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(9): 2120–2125.
- [10] 潘嘉慧, 田峻, 沈国权, 等. 胶体金免疫层析法检测食品中的呋喃唑酮代谢物残留 [J]. 兽药导刊, 2014, 11(16): 25–26.
- [11] WU L T, CURRAN M D, ELLIS J S, et al. Nucleic acid dipstick test for molecular diagnosis of pandemic H1N1 [J]. *Journal of clinical microbiology*, 2010, 48(10): 3608–3613.
- [12] 张永乐, 历小玉, 潘克女, 等. 甲型 H1N1 流感病毒快速诊断核酸试纸条的研制及应用 [J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(14): 2871–2873.
- [13] 汪琳, 罗英, 周琦, 等. 柏亚铎核酸试纸条在检测转 EPSPS 基因作物中的应用 [J]. 生物技术通讯, 2011, 22(2): 238–242.
- [14] 李志秋, 刘春龙, 王伟伟, 等. 免疫胶体金半定量检测牛初乳 IgG 含量方法的建立及初步应用 [J]. 中国奶牛, 2006(1): 12–15.
- [15] DA P P, SI S H, YAN H, et al. Comparison of a new gold-immunochromatographic assay for the detection of antibodies against avian influenza virus with hemagglutination inhibition and agar gel immunodiffusion assays [J]. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2007, 117(2): 17–25.
- [16] 张裕君, 贺艳, 赵卫东, 等. PCR 核酸试纸条法检测转基因黑曲霉 [J]. 食品研究与开发, 2013, 34(20): 62–64.
- [17] 黄欢, 李朔, 孙雨洲, 等. 长引物快速 PCR 结合核酸试纸条法可视化检测四种病原体 [J]. 标记免疫分析与临床, 2013, 20(6): 436–439.
- [18] WANG C F, ZHANG L F, SHEN X M, et al. Development of a nucleic acid lateral flow strip for detection of hepatitis C virus (HCV) core antigen [J]. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*, 2013, 32(2): 59–68.
- [19] 张裕君, 王金成, 魏亚东. 可视化核酸试纸条法快速检测松材线虫 [J]. 植物保护, 2013, 39(4): 94–98.
- [20] 杨贤, 黄欢, 殷竹君, 等. 高灵敏可视化核酸试纸条法快速检测 HBV DNA [J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(7): 1277–1281.