

犬黑皮质素受体-4 突变体 D298N 真核表达载体的构建及其在 MDCK 细胞中的表达

宋立先, 刘春红, 王占青, 高 蓉, 徐学振* (滨州医学院烟台附院, 山东烟台 264100)

摘要 [目的] 引进犬 MC4R 突变点, 构建突变体 D298N 表达载体并在 MDCK 细胞中获得表达。[方法] 设计带突变点 D298N 引物, 以犬 MC4R 基因组 DNA 为模板, 采用普通 PCR 和 Overlap-PCR 扩增编码区, 将产物克隆、酶切、测序鉴定。将测序正确的基因连接到 pcDNA3.1-myc-His/A 载体上, 将重组体 pcDNA3.1-myc-His/A-cMC4R-D298N 酶切、鉴定, 将测序正确的重组体转染到 MDCK 细胞中, 继续培养 3 d, 提取细胞总 RNA, 并采用 RT-PCR 方法检测基因表达。提取细胞总蛋白, Western Blot 鉴定蛋白表达。[结果] 构建带 D298N 突变点的真核表达载体, 提取质粒后有 2 处碱基不同, 分别是 777 位碱基 T→C, 892 位碱基 G→A (引入的突变位点)。转染到 MDCK 后, RT-PCR 和 Western Blot 均检测到重组体在基因水平和蛋白水平的表达。[结论] 成功构建犬的重组体真核表达载体并在 MDCK 细胞中表达。

关键词 犬; 黑皮质素受体-4; 真核表达载体; 定点诱变; D298N; MDCK 细胞

中图分类号 Q 782 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2022)20-0076-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.20.020

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Construction of Canine Melanocortin Receptor-4 Mutant D298N Eukaryotic Expression Vector and Its Expressed in MDCK Cells
SONG Li-xian, LIU Chun-hong, WANG Zhan-qing et al (Yantai Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Yantai, Shandong 264100)

Abstract [Objective] The canine MC4R mutation site was introduced, the mutant D298N expression vector was constructed and expressed in MDCK cells. [Method] We designed D298N primers with mutation site. Using canine MC4R genomic DNA as template, we amplified the coding region of mutation MC4R by normal PCR and overlap PCR. The product was cloned, digested by enzymes and sequenced. The correctly sequenced gene was connected to pcDNA3.1-myc-His/A vector. The recombinant pcDNA3.1-myc-His/A-D298N was digested by enzymes and identified; The correctly sequenced recombinant was transfected into MDCK cells and cultured for 3 days. The total RNA was extracted and the gene was detected by RT-PCR; The total protein was extracted and the protein was identified by Western blot. [Result] The eukaryotic expression vector with D298N mutation was constructed. We extracted the plasmid. There were two different bases in the recombinant expression plasmid, which were 777 base T→C, 892 base G→A (here is the introduced mutation site). After MDCK cells transfecting, the expression of recombinant at gene level and protein level was detected by RT-PCR and Western blot. [Conclusion] The recombinant eukaryotic expression vector of canine was successfully constructed and expressed in MDCK cells.

Key words Canine; Melanocortin receptor 4; Eukaryotic expressive vector; Site-directed mutagenesis; D298N; MDCK cell

黑皮质素受体系统由 5 个密切相关的 G 蛋白偶联受体组成(MC1R、MC2R、MC3R、MC4R 和 MC5R)。这些受体参与包括人类在内的多细胞动物许多重要的生物学过程^[1]。研究发现, 黑皮质素途径在体重调控中起着重要作用, 下丘脑黑皮质素信号的增强导致食物摄入减少和能量消耗增加。单基因肥胖伴 MC4R 功能障碍与能量平衡调节密切相关。此外, MC4R 基因突变与单基因肥胖和普通肥胖均有显著相关。MC4R 基因突变与脂肪量和肥胖相关(FTO)基因的相互作用显著增加肥胖风险, 尤其是青少年^[2]。据文献报道, 在美国有近 12 800 名肥胖患者与 MC4R 的缺陷有关^[3]。

研究发现, 有超过 15 亿的成人和儿童面临肥胖的困扰, 肥胖已经作为公共健康问题受到人们的广泛关注, 严重威胁人类健康^[4]。全球疾病负担小组估计, 2015 年 BMI 值升高导致 400 万人死亡, 其中 2/3 的人死于心血管疾病(CVD)^[5]。肥胖与 2 型糖尿病的关系早已被人们所认识, 并清楚地解释了许多国家 2 型糖尿病的高患病率。许多肥胖高危患者的特征是代谢和心血管危险因素并存^[6]。众所周

知, 过度肥胖对流感易感性增加, 包括近年在全世界范围流行的新型冠状病毒, 对人类的危害堪称是灾难性的。人们通常认为, 饮食结构不恰当和缺乏运动是导致肥胖的主要原因, 但是有些人即使是健康的生活方式, 仍然会面临肥胖的困扰, 因为导致肥胖的原因除了生活方式, 还有基因因素参与^[7]。有学者在对 UK 生物银行的 0.5 亿份样本进行筛查, 发现了 61 个 MC4R 突变体, 通过分析发现, 均与 BMI、肥胖相关代谢性心脏病密切相关^[8]。因此, 迫切需要深入探究 MC4R 突变导致的肥胖。

MC4R 是一个有 996 个碱基配对的七次跨膜受体, 定位染色体 18Q21.3 上, 主要分布于下丘脑^[7]。犬被认为是研究人类疾病和包括肥胖在内的功能失调机制的理想生物医学模型^[9]。犬 MC4R 基因由编码 332 个氨基酸的单一外显子组成, 定位在 1 号染色体上, 在各物种之间存在高度同源性^[10]。为了探讨 MC4R 突变和肥胖之间的关系, 笔者成功构建了犬 D298N 突变体的真核表达载体, 后将其导入 MDCK 细胞内, 旨在为进一步探讨 MC4R 突变引起的蛋白功能变化提供信息, 同时也为人类肥胖的基因治疗提供科研数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株及细胞系。带 His 标签的 pcDNA3.1 载体、DH5 α 、PMD18-T Vector、MDCK 细胞。

基金项目 辽宁省科技基金项目(2007408001-6)。

作者简介 宋立先(1982—), 女, 山东德州人, 主治医师, 硕士, 从事免疫学、细胞分子生物学研究。*通信作者, 副主任医师, 硕士生导师, 从事组织工程学研究。

收稿日期 2021-12-02

1.1.2 主要试剂。Beagle 犬新鲜血液;聚合酶 *rTaq* DNA、X-Gal、异丙基硫代半乳糖苷、限制性内切酶 (*Xho*I 和 *Bam*H I)、DNA Marker、T4-DNA 连接酶、RNA PCR 提取试剂盒;Trizol Reagent、培养基、Anti-myc 抗体;G418 抗生素、FuGENE HD 转染试剂盒;胎牛血清等。

1.2 方法

1.2.1 引物设计。根据 GenBank 犬 MC4R 基因,设计引物序列:上游引物 A,5'-CGGGATCCGCCAGGATGAACTCCAC-CCTTCAGC-3';中间引物 B,5'-ATGAGAGGGTTGATGATG-GAG-3';中间引物 C,5'-CTCCATCATCAACCCTCTCAT-3';下游引物 D,5'-CCGCTCGAGGTATCTGCTAGACAAGTCAC-3'。引物 AB 扩增基因长度为 115 bp,引物 CD 扩增基因长度为 902 bp,引物 AD 扩增基因长度为 1 019 bp。

1.2.2 提取犬血 DNA,扩增 D298N 突变体基因 PCR。

(1)以引物 AB、CD 进行 PCR 反应获得基因片段,分别命名为产物 AB、CD。扩增完毕取目的产物 20 μL,用凝胶电泳进行检测,然后将凝胶进行回收、纯化,取 2 μL 进行电泳检测。

(2)以引物 AB、CD 产物为模板,用引物 A、D 进行 PCR 反应获得突变体的 DNA 片段。扩增完毕取目的产物 20 μL,用凝胶电泳进行检测,然后将凝胶进行回收、纯化,取 2 μL 进行电泳检测。

1.2.3 获得的 DNA 片段进行 TA 克隆、测序。将突变体 D298N 的 DNA 片段连接到 pMD18-T 载体,命名 pMD18-T-cMC4R-D298N,转化到 DH5α 感受态细胞进行蓝白斑筛选,提取质粒,用 *Bam*H I、*Xho* I 进行酶切鉴定,筛选阳性质粒送测序,并与犬 MC4R 基因序列进行比较。

1.2.4 重组真核表达载体构建、测序。用 *Bam*H I、*Xho* I 将 TA 克隆阳性质粒和带 His 标签的 pcDNA3.1 真核表达载体进行双酶切、电泳,回收目的片段。用 T4 DNA 连接酶将带 His 标签的 pcDNA3.1 真核表达载体和 MC4R 片段在 16 ℃ 条件下 14 h 进行连接,将产物转化到 DH5α 细胞,用抗生素平板筛选,挑取单克隆菌落鉴定。测序正确后扩大培养,提取质粒 DNA。

1.2.5 将基因转染到 MDCK 细胞。将处于对数生长期的 MDCK 细胞重悬在培养基中,接种细胞,培养 24 h,使细胞融合率达 75%,把空质粒及重组质粒转染到 MDCK 细胞内。转染 24 h 后,继续培养 1~2 h,收集细胞。

1.2.6 用 RT-PCR 方法检测基因的表达。转染 3 d 后,提取未转染细胞、空载体转染细胞、重组体转染细胞的总 RNA,进行凝胶电泳检测。用 RNA PCR 试剂盒进行 RNA 反转录。用 cDNA 做模板,引物 A 和 D 进行 PCR 反应。取 20 μL PCR 产物,用凝胶电泳检测。

1.2.7 用 Western blot 方法检测蛋白的表达。转染 3 d 后,用 EDTA-胰酶对未转染的细胞、空载体转染细胞、重组体转染细胞进行消化,并提取蛋白质,将蛋白质进行定量检测(分光光度计),然后灌胶、点样、电泳、转膜、封闭,加入 His 抗体,孵育过夜,与羊抗鼠二抗反应、显色。

2 结果与分析

2.1 犬的基因组 DNA 条带 用 Beagle 犬的新鲜全血提取 DNA,结果见图 1。

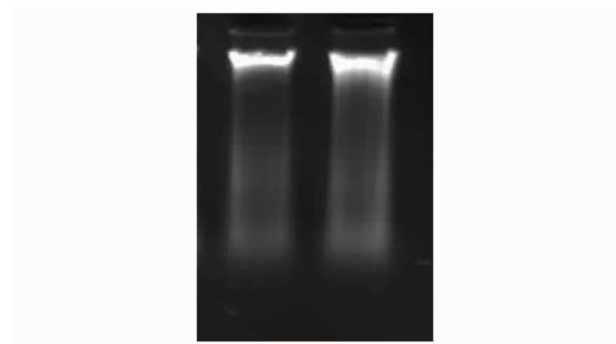
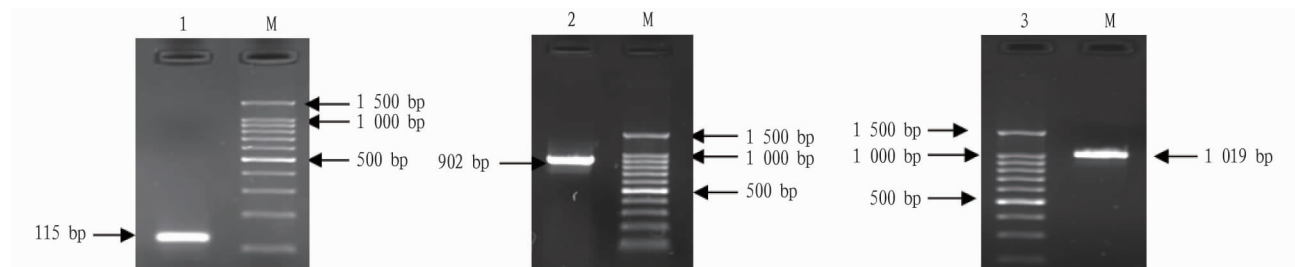


图 1 犬基因组 DNA 1%琼脂糖凝胶分离结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis (1%) of genome DNA isolated from canis

2.2 犬突变体 D298N-MC4R 目的片段电泳结果 用 overlap PCR 技术首先扩增 115 和 902 bp 2 个片段,再以这 2 个扩增得到的片段为模板,扩增 D298N-cMC4R 目的片段,扩增产物约 1 000 bp(图 2)。



注:1.犬 MC4R 115 bp 目的产物;2.犬 MC4R 902 bp 目的产物;3.D298N-cMC4R 目的产物;M.DNA Marker 100 bp

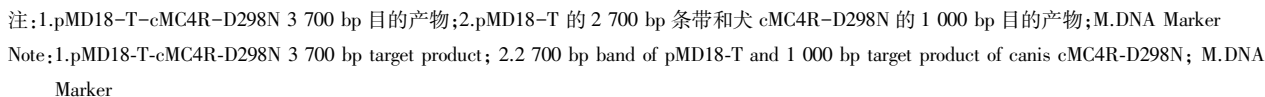
Note:1.Canis MC4R115 bp PCR product;2.Canis MC4R 902 bp PCR product;3.Canis D298N-cMC4R PCR product; M.DNA Marker 100 bp

图 2 D298N-cMC4R PCR 产物电泳分析

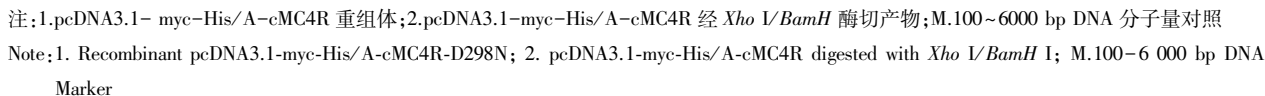
Fig.2 Analysis of D298N-cMC4R PCR gel electrophoresis

2.3 载体 pMD18-T-cMC4R-D298 的酶切、测序 载体 pMD18-T 的分子量约 2.7 kb,扩增 PCR 产物约 1.0 kb,预测 pMD18-T-cMC4R-D298N 的大小约为 3.7 kb,提取 pMD18-

T-cMC4R-D298N 酶切、凝胶电泳回收产物(图 3)。测序结果重组表达质粒 2 处碱基不同,碱基 T(777 位)→C,碱基 G(892)→A(引入的突变位点)。



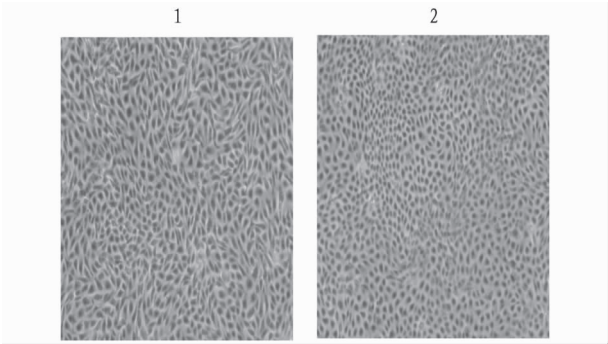
2.4 重组体酶切、测序 pcDNA3.1-myc-His/A 分子量约 5.5 kb,PCR 扩增产物大小约 1 000 bp,可以预测 pcDNA3.1-myc-His/A-cMC4R 的大小 6.5 kb,提取的重组体酶切、凝胶电泳回收产物见图 4。测序结果同 T-A 克隆结果见图 5,第 298 位的天冬氨酸变成天冬酰胺,表明成功构建带突变位点的目的载体。



Query	721	ATGAAGGGTGCATTACCTTGACCATACTCATTGGGGTCTTCGTCGCTGCTGGGCCCA	780
Sbjct	721	ATGAAGGGTGCATTACCTTGACCATACTCATTGGGGTCTTCGTCGCTGCTGGGCCCA	780
Query	781	TTCTTCCTCCACTTGATATTCTACATCTCTTGTCCCCAGAATCCATACTGTGTGTGCTTC	840
Sbjct	781	TTCTTCCTCCACTTGATATTCTACATCTCTTGTCCCCAGAATCCATACTGTGTGTGCTTC	840
Query	841	ATGTCTCACTTTAACTTGTACCTCATTCTGATCATGTGTAACCTCCATCATCACCCCTCTC	900
Sbjct	841	ATGTCTCACTTTAACTTGTACCTCATTCTGATCATGTGTAACCTCCATCATCACCCCTCTC	900

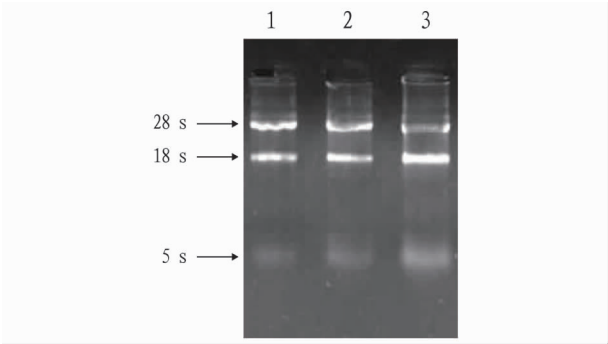
2.5 重组体转染 MDCK 细胞、RT-PCR 检测目的基因表达 将重组表达载体 pcDNA3.1-myc-His/A-cMC4R-D298N 转染入 MDCK 细胞(图 6)培养 3 d,提取细胞总 RNA 并检测,结果见图 7。用 RT-PCR 进行反转录,凝胶电泳结果见图 8。从图 8 可见,空载体转染细胞组、未转染细胞组在 1 000 bp 处无条带,表明无目的基因表达;转染重组体细胞组在约 1 000 bp 处有亮带,表明目的基因成功表达。

2.6 Western blot 检测蛋白表达 犬的 MC4R 基因由 332 个氨基酸组成,编码蛋白的分子量为 36.9 kD。载体融合标签分子量大小约为 3 kD,重组体表达的融合蛋白预期大小约为 40 kD。Western blot 检测蛋白表达结果见图 9,可见融合蛋白在 40 kD 处显示亮带,空载体和未转染组处无亮带,因为 myc 基因作为癌基因,细胞本身也有少量表达,因此空载体和未转染细胞组在 40 kD 处有暗带。



注:1.100 倍光镜下未转染细胞;2.100 倍光镜下转染 3 d 后细胞
Note:1.The cells without transfection(100×); 2.The cells were trans-
fected with recombinant plasmid after 3 days(100×)

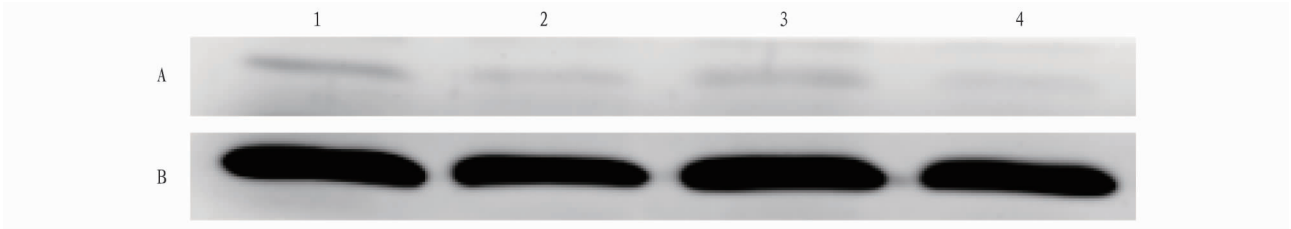
图 6 MDCK 细胞
Fig.6 Photos of MDCK cells



注:1.转染重组体 MDCK 细胞总 RNA;2.转染空载体 MDCK 细胞总 RNA;3.未转染 MDCK 细胞总 RNA
Note:1.Transfection of recombinant MDCK cell total RNA;2.Transfection of empty vector MDCK cell total RNA;3.Non transfection of MDCK cell total RNA

图 7 MDCK 细胞总 RNA 电泳分析

Fig.7 Electrophoresis analysis of total RNA in MDCK cells

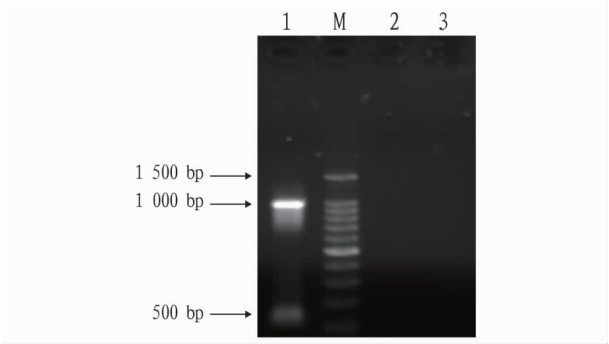


注:A,1.D298N 重组体转染细胞组;2.空载体转染细胞组; 3.转染野生型重组体细胞组;4.未转染细胞组。B,Beta actin 内参
Note:A,1.Transfected D298N recombinant cells group;2.Transfected empty vector cells group;3.Transfected wild-type recominant cells group;4.No trans-
fected cells group.B,Beta actin internal parameter

图 9 Westerh blot 检测蛋白表达结果

Fig.9 Protein expression detected by Westerh blot

各种 MC4R 信号通路发生截然不同的变化,并突出了受体突变综合表征的重要性,是单基因肥胖最常见的原因。迄今为止,在肥胖患者中发现的许多突变在体外系统的过度表达中具有功能特征,其中大部分缺少 Gs 信号途径^[12]。近年来,有对牛、鸡、猪、犬的 MC4R 基因的相关研究,其中研究较多的为猪和犬。黑皮质素受体所有亚型中位于第 298 位的 Asp298 的基因序列高度保守^[13]。有文献报道,在猪 MC4R 基因 298 位氨基酸突变与猪背膘的肥厚呈相关性^[14],而犬的



注:1.转染重组体的 MDCK 细胞 RT-PCR 结果;2.转染空载体的 MDCK 细胞 RT-PCR 结果;3.未转染的 MDCK 细胞 RT-PCR 结果;M.100 bp DNA 分子量对照

Note:1. RT-PCR result of cells transfected with recombinant plasmid;
2. RT-PCR result of cells transfected with empty vector; 3. RT-PCR result of nontransfected cells; M. 100 bp DNA maker

图 8 犬 MC4R-D298N RT-PCR 产物电泳分析

Fig.8 The RT-PCR results of Canis MC4R-D298N

3 讨论

随着肥胖病例逐年上升,迫切需要找到一种能调节体重和食欲的治疗方法。MC4R 是新疗法的一个有吸引力的潜在靶点,MC4R 被激活后,MC4R 调节能量平衡并减少脂肪生成。同时可以识别多种细胞外刺激物,包括小分子、离子、光子、肽和蛋白质,并将刺激物穿过不渗透的膜屏障传递到细胞内区域,从而影响细胞功能的变化。信号通过蛋白质相互作用和激活事件的级联传递,从而引起细胞功能的细胞内生化学介质(如第二信使)水平的变化,从而调节多种生理功能。MC4R 调节脂肪组织的形成和能量平衡,被认为是新型肥胖治疗的单基因靶点^[11]。

MC4R 作为瘦素-黑素皮质素途径的一部分,在下丘脑体重调节和能量消耗中起着关键作用。MC4R 突变可导致

该位点是否存在突变及突变后对蛋白功能是否有影响,目前尚鲜见文献报道。然而,今后要想深入研究蛋白功能,载体构建即是第一步工作。

笔者所在课题组曾在前期研究中成功构建犬 MC4R-D90N 突变体的真核表达载体,并在融合蛋白中成功表达^[15]。目前国内有关犬 MC4R-D298N 氨基酸突变的研究较少,基于此,笔者构建了突变体 MC4R-D298N 重组真核表达载体,第 298 位的天冬氨酸变成天冬酰胺,后转染到犬的细

胞中并获得成功表达。更多突变位点的发现,尤其是高度保守区域氨基酸突变能否导致蛋白功能变化为进一步探索肥胖的原因提供了更多信息。针对肥胖患者饮食调控的治疗过程中,手术治疗并未在长期临床效果中获益,更加强调了 MC4R 激动剂药物治疗的重要性,且只有通过基因筛查后才可以评估患者是否适合手术治疗。因此,针对治疗肥胖患者的药物研发更加重要。筛选导致肥胖的危险基因,当前不仅是为了研究常规治疗肥胖药物,甚至可为儿科内分泌学筛选导致肥胖的基因提供指导意见^[16]。因此,可以通过基因突变位点的筛查,对存在 MC4R 基因突变的儿童进行前期干预,包括饮食、运动及药物干预。综上所述,该研究为 MC4R 基因突变引起蛋白功能变化、MC4R 与配体结合后 2 个信号传导通路之间联系机制提供了前期科研基础,同时为临床治疗肥胖药物及从儿童期预防肥胖的前期干预提供了科研数据。

参考文献

- CAI M Y, HRUBY V J. The melanocortin receptor system: A target for multiple degenerative diseases [J]. *Current protein and peptide science*, 2016, 17(5): 488-496.
- HAINER V, ALDHOON HAINEROVÁ I, KUNEŠOVÁ M, et al. Melanocortin pathways: Suppressed and stimulated melanocortin-4 receptor (MC4R) [J]. *Physiological research*, 2020, 69(S2): S245-S254.
- AYERS K L, GLICKSBERG B S, GARFIELD A S, et al. Melanocortin 4 receptor pathway dysfunction in obesity: Patient stratification aimed at MC4R agonist treatment [J]. *The journal of clinical endocrinology & metabolism*, 2018, 103(7): 2601-2612.
- GAVINI C K, COOK T M, RADEMACHER D J, et al. Hypothalamic C2-domain protein involved in MC4R trafficking and control of energy balance [J]. *Metabolism clinical and experimental*, 2020, 102: 1-11.
- AFSHIN A, FOROUZANFAR M H, REITSMA M B, et al. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years [J]. *The New England journal of medicine*, 2017, 377(1): 13-27.
- PICHÉ M E, TCHERNOF A, DESPRÉS J P. Obesity phenotypes, diabetes, and cardiovascular diseases [J]. *Circulation research*, 2020, 126(11): 1477-1500.
- YU K P, LI L, ZHANG L, et al. Association between MC4R rs17782313 genotype and obesity: A meta-analysis [J]. *Gene*, 2020, 733: 1-9.
- LOTTA L A, MOKROSI NSKI I, DE OLIVEIRA E M, et al. Human gain-of-function MC4R variants show signaling bias and protect against obesity [J]. *Cell*, 2019, 177(3): 597-607.
- MANKOWSKA M, NOWACKA-WOSZUK J, GRACZYK A, et al. Polymorphism and methylation of the MC4R gene in obese and non-obese dogs [J]. *Molecular biology reports*, 2017, 44(4): 333-339.
- 王光川, 巴彩凤, 苏荣健, 等. 犬黑皮质素受体 4 真核表达载体的构建及表达 [J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(31): 13564-13567.
- GONÇ ALVES J P, PALMER D, MELDAL M. MC4R agonists: Structural overview on antiobesity therapeutics [J]. *Trends in pharmacological sciences*, 2018, 39(4): 402-423.
- PAISDZIOR S, DIMITRIOU I M, SCHÖPE P C, et al. Differential signaling profiles of MC4R mutations with three different ligands [J]. *International journal of molecular sciences*, 2020, 21(4): 1-20.
- KIM K S, REECY J M, HSU W H, et al. Functional and phylogenetic analyses of a melanocortin-4 receptor mutation in domestic pigs [J]. *Domestic animal endocrinology*, 2004, 26(1): 75-86.
- 李星润, 兰国湘, 王孝义, 等. 猪 MC4R 基因 Asp298Asn 位点多态性及其与生长性状的关联 [J]. *畜牧与兽医*, 2016, 48(2): 23-27.
- 魏嘉, 王光川, 武洁, 等. 犬 MC4R 突变体 D90N 真核表达载体的构建及表达 [J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(12): 6118-6121, 6124.
- RAFFAN E, DENNIS R J, O'DONOVAN C J, et al. A deletion in the canine POMC gene is associated with weight and appetite in obesity-prone labrador retriever dogs [J]. *Cell metabolism*, 2016, 23(5): 893-900.
- 张洪江, 程金花, 余新晓, 等. 贡嘎山冷杉纯林枯落物储量及其持水特性 [J]. *林业科学*, 2003, 39(5): 147-151.
- 夏江宝, 陆兆华, 高鹏, 等. 黄河三角洲滩地不同植被类型的土壤贮水功能 [J]. *水土保持学报*, 2009, 23(5): 72-75, 95.
- 郑子成, 张锡洲, 李廷轩, 等. 玉米生长期土壤抗蚀性特征及其影响因素分析 [J]. *农业工程学报*, 2014, 30(4): 100-108.
- 白秀梅, 韩有志, 郭汉清. 关帝山不同植被恢复类型土壤抗蚀性研究 [J]. *水土保持学报*, 2014, 28(2): 79-84.
- 袁颖丹, 曹晓敏, 陈煦, 等. 武功山山地草甸不同海拔高度土壤机械组成与养分特性关系 [J]. *中南林业科技大学学报*, 2017, 37(7): 118-122.
- 陈爱民, 严思维, 林勇明, 等. 泥石流频发区不同林龄新银合欢土壤抗蚀性评价 [J]. *北京林业大学学报*, 2016, 38(9): 62-70.
- 吴丽丽, 张仁陟, 康立军. 紫色丘陵区坡耕地生物埂的土壤抗蚀性综合评价 [J]. *中国生态农业学报*, 2014, 22(11): 1310-1317.
- 韩贞贵, 毛天旭, 屠丹, 等. 长江源区草地覆盖变化对土壤团聚体分布及稳定性的影响 [J]. *草地学报*, 2020, 28(3): 801-807.
- 闫思宇, 王景燕, 龚伟, 等. 川南山地林分变化对土壤物理性质和抗蚀性的影响 [J]. *长江流域资源与环境*, 2016, 25(7): 1112-1120.
- 黄进, 杨会, 张金池. 桐庐生态公益林主要林分类型土壤抗蚀性研究 [J]. *水土保持学报*, 2010, 24(1): 49-52, 64.
- 邱陈扬. 浙江省瓯江流域源头区林地土壤抗蚀特性及影响因素研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- 刘彦文, 刘成武, 何宗宜, 等. 基于像元尺度耕地质量局部空间自相关的基本农田划定 [J]. *农业机械学报*, 2019, 50(5): 260-268, 319.
- 杜婉婷, 李淑杰, 曹竞文, 等. 多尺度下的珲春市耕地质量空间自相关分析 [J]. *东北师大学报(自然科学版)*, 2018, 50(4): 134-141.
- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 土地利用现状分类: GB/T 21010—2017 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- 何炬, 张雪松. 县·乡镇两级尺度下耕地质量空间自相关分析: 以湖北省广水市为例 [J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(14): 7-11.
- SONG W, WU K N, ZHAO H F, et al. Arrangement of high-standard basic farmland construction based on village-region cultivated land quality uniformity [J]. *Chinese geographical science*, 2019, 29(2): 325-340.
- 张晗, 赵小敏, 欧阳真程, 等. 基于空间自相关的耕地质量空间差异特征及耕地保护分区: 以江西省上高县为例 [J]. *水土保持研究*, 2018, 25(1): 304-312.
- 李武艳, 朱从谋, 王华, 等. 浙江省耕地质量多尺度空间自相关分析 [J]. *农业工程学报*, 2016, 32(23): 239-245, 315.
- 李国煜, 张延玉, 钟通. 基于耕地质量指数空间自相关的耕地保护分区: 以福清市为例 [J]. *绿色科技*, 2016(14): 208-213.
- 任平, 吴涛, 周介铭. 基于 GIS 和空间自相关模型的耕地空间分布格局及变化特征分析: 以成都市龙泉驿区为例 [J]. *中国生态农业学报*, 2016, 24(3): 325-334.

(上接第 49 页)

- 张洪江, 程金花, 余新晓, 等. 贡嘎山冷杉纯林枯落物储量及其持水特性 [J]. *林业科学*, 2003, 39(5): 147-151.
- 夏江宝, 陆兆华, 高鹏, 等. 黄河三角洲滩地不同植被类型的土壤贮水功能 [J]. *水土保持学报*, 2009, 23(5): 72-75, 95.
- 郑子成, 张锡洲, 李廷轩, 等. 玉米生长期土壤抗蚀性特征及其影响因素分析 [J]. *农业工程学报*, 2014, 30(4): 100-108.
- 白秀梅, 韩有志, 郭汉清. 关帝山不同植被恢复类型土壤抗蚀性研究 [J]. *水土保持学报*, 2014, 28(2): 79-84.
- 袁颖丹, 曹晓敏, 陈煦, 等. 武功山山地草甸不同海拔高度土壤机械组成与养分特性关系 [J]. *中南林业科技大学学报*, 2017, 37(7): 118-122.

(上接第 66 页)

- 宋戈, 张文琦. 粮食作物种植视角下东北粮食主产区耕地利用的时空分化特征 [J]. *农业工程学报*, 2020, 36(15): 1-8.
- 苏锐清, 曹银贵, 王文旭, 等. 京津冀潮白河区域 2001—2017 年耕地利用变化时空特征分析 [J]. *农业资源与环境学报*, 2020, 37(4): 574-582.
- 谭木魁, 韩思雨, 张路. 粮食安全视角下粮食主产区耕地休耕规模及动态仿真研究 [J]. *中国土地科学*, 2020, 34(2): 9-17.
- 盛艳, 姚云峰, 秦富仓. 基于地形因素的赤峰市城市乡土地利用空间格局变化 [J]. *河海大学学报(自然科学版)*, 2014, 42(5): 388-393.
- 孙聪康, 徐俊丽, 余敦, 等. 多尺度下崇义县耕地质量空间分布差异特征研究 [J]. *中国生态农业学报*, 2019, 27(4): 601-612.
- 杨建宇, 徐凡, 赵龙, 等. 基于综合质量空间自相关性分析的耕地保护分区方法 [J]. *农业机械学报*, 2017, 48(3): 156-163.
- 朱磊, 杨爱民, 夏鑫鑫, 等. 基于空间自相关的 1975—2015 年玛纳斯河流域耕地时空特征变化分析 [J]. *中国生态农业学报*, 2020, 28(6): 887-899.
- 李灿, 黄萌萌. 基于空间自相关的丘陵山区耕地质量保护分区 [J]. *国土资源科技管理*, 2020, 37(2): 106-115.
- 范晓峰. 基于耕地质量指数局部空间自相关的耕地保护分区研究: 以敦化市为例 [J]. *西部大开发(土地开发工程研究)*, 2018, 3(12): 7-12.
- 姜广辉, 张瑞娟, 张翠玉, 等. 基于空间集聚格局和边界修正的基本农田保护区划定方法 [J]. *农业工程学报*, 2015, 31(23): 222-229.