

富贵竹过氧化物酶全长基因的克隆与表达分析

陈春花¹, 张松¹, 陈苗^{1,2}, 胡汉桥^{1,2}, 薛迎斌^{2,3*}

(1. 广东海洋大学滨海农业学院, 广东湛江 524088; 2. 国家耐盐碱水稻技术创新中心华南中心, 广东湛江 524088; 3. 广东海洋大学化学与环境学院, 广东湛江 524088)

摘要 [目的]克隆富贵竹全长 POD 基因,检测富贵竹感染斯氏泛菌(*Pantoea stewartii*)后该基因的表达。[方法]用 PCR 克隆富贵竹(*Dracaena sanderiana*)POD 部分基因,用 hiTAIL-PCR 扩增该基因左右两侧序列。通过 RT-PCR 和 qPCR 确定 POD 基因在病原体感染时的表达。[结果]获得一个长度为 3 419 bp 的序列,登录号为 MZ450796。经基因结构预测,该序列包含 1 个转录起始位点、加尾信号和 4 个外显子。进化树分析表明,该基因编码的氨基酸序列与芦笋 POD 的氨基酸序列一致性最高。接种 *P. stewartii* 后,POD 基因的表达上调,3 d 达最大值。[结论]克隆了富贵竹全长 POD 基因,确定了 POD 基因在富贵竹叶片中表达和结构预测的正确性;POD 基因被 *P. stewartii* 诱导上调表达。

关键词 富贵竹;过氧化物酶;hiTAIL-PCR;斯氏泛菌

中图分类号 Q 943.2 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)11-0089-05

doi: 10. 3969/j. issn. 0517-6611. 2022. 11. 023



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Molecular Cloning and Expression Patterns of Full-length Peroxidases Gene from *Dracaena sanderiana*

CHEN Chun-hua¹, ZHANG Song¹, CHEN Miao^{1,2} et al (1. College of Coastal Agricultural Sciences of Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088; 2. South China Branch of National Saline-Alkali Tolerant Rice Technology Innovation Center, Zhanjiang, Guangdong 524088)

Abstract [Objective] Peroxidase (POD) plays an important role in the resistance of plant disease. The full-length POD gene was cloned and the expression of the gene was determined after *Dracaena sanderiana* was infected by *Pantoea stewartii*. [Method] The partial POD gene of *D. sanderiana* was cloned by PCR. HiTAIL-PCR was used to amplify the left and right parts of the POD gene. The expression of the gene was determined by RT-PCR and qPCR. [Result] A 3 419 bp sequence was obtained, the accession number was MZ450796. The sequence contained a transcription start site, a polyadenylation signal and four exons after the gene structure prediction. Phylogenetic tree analysis showed that the amino acid sequence encoded by this gene had the highest identity with that of *Asparagus officinalis* POD. The expression of the POD gene of *D. sanderiana* was up-regulated by *P. stewartia* and reached the maximum after 3 days. [Conclusion] The full-length POD gene is obtained. The POD gene expresses in the leaf of *D. sanderiana* and the predicted gene structure is correct. The expression of the POD gene of *D. sanderiana* was induced by *P. stewartia*.

Key words *Dracaena sanderiana*; Peroxidase; hiTAIL-PCR; *Pantoea stewartii*

植物在生长过程中难免会遭遇病虫害、干旱、盐渍、机械损伤、高温、低温等逆境胁迫。生物或非生物胁迫会使植物产生活性氧物质,活性氧的过量积累会对植物体内的蛋白质、DNA 与脂质等造成氧化,从而破坏其生物膜的结构和功能,对植物造成一定的伤害^[1-2]。过氧化物酶(peroxidase, POD)属于一个超家族包含 3 种不同类型的 POD:细胞内 I 类、真菌释放的 II 类和分泌的 III 类植物 POD^[3]。最常见的是 III 类分泌型 POD,其生物学功能是一种很好的活性氧清除剂,参与多种不同的生理功能,如细胞壁的合成、组织愈伤和生长素的合成与代谢等,以提高植物的抗逆性等^[4-6]。POD 活性与植物对细菌的抗病性具有相关性^[7-9]。目前已从多种作物中克隆了 POD 基因,如水稻^[10]、芋头^[11]、甘蔗^[12]、棉花^[13]和烟草^[14]等。

富贵竹(*Dracaena sanderiana* Sander),龙舌兰科,龙血树属,是常见常绿小乔木观赏植物,是湛江重要的花卉出口产品之一^[15-16]。富贵竹叶片枯萎病是由斯氏泛菌产吡啶亚种(*Pantoea stewartii* subsp. *Indologenes*)引起的一种严重病害^[16]。由于 POD 在植物抗病虫害、抗逆过程中起着重要作

用,因此有必要对富贵竹 POD 基因展开相关研究。然而,有关克隆富贵竹 POD 基因鲜见报道。CODEHOP (consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primer)可以根据近缘物种基因保守的氨基酸序列,并根据物种的密码子使用频率在线设计简并引物,再用 PCR 方法克隆未知基因^[17-18],然而利用简并引物只能获得基因部分序列。高效热不对称交错 PCR (high-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR, hiTAIL-PCR),可用于扩增已知序列两侧的未知序列^[19]。因此,将 CODEHOP 和 HiTAIL-PCR 结合起来,就能克隆出全长的未知基因,为研究基因的功能奠定基础。笔者通过设计简并引物,利用 PCR 及 hiTAIL-PCR 技术,克隆富贵竹 POD 基因的全长序列,并用生物信息学分析该基因的序列特征,利用 RT-PCR 检测 POD 基因在富贵竹叶片中的表达特性,以期揭示该基因在叶片中的调控作用,为富贵竹的抗病研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 田间种植富贵竹,取新鲜嫩叶。用 CTAB 法提取基因组 DNA;富贵竹种植于试验盆中,生长到 5~7 叶期时,按 Zhang 等^[16]方法接种病原体斯氏泛菌(*P. stewartii*),接种后 1、2、3、4 和 5 d 分别取每株富贵竹上最嫩叶片,立即置于液氮中,于 -80 °C 保存备用,用于提取 RNA。

1.2 方法

1.2.1 POD 全长基因的克隆。利用 POD 基因的简并引物 icode-POD-A2 和 icode-POD-C16(表 1)^[11],从富贵竹基因

基金项目 国家自然科学基金(32002131);广东省重点领域研发计划项目(2020B020219004)。

作者简介 陈春花(1993—),女,广东高州人,硕士研究生,研究方向:作物遗传育种。* 通信作者,讲师,博士,从事作物抗逆及养分高效利用研究。

收稿日期 2021-09-17

组 DNA 中扩增目标基因,克隆到 pMD-18T 载体 (TaKaRa 公司) 上,测序后得到 POD 基因的部分序列。根据 POD 基因部分序列,设计反向引物 POD-0a、POD-1a 和 POD-2a 以及 POD-0b、POD-1b 和 POD-2b,采用 hiTAIL-PCR 技术分别扩增富贵竹 POD 基因两侧的 DNA。所用的引物见表 1。将两侧的 DNA 分别克隆到 pMD-18T 载体 (TaKaRa 公司) 上,测序后得到 POD 基因的两侧序列,经拼接后得到 POD 基因的全长序列。

1.2.2 基因序列的生物信息学分析。用 DNASTAR 软件对所克隆的基因片段进行拼接,获得了全长 POD 基因,用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 网站进行 Blast 分析。在 Softberry (<http://www.softberry.com/>) 中选择植物基因组基因预测软件,并选择单子叶植物作为参考基因组,预测基因的结构。利用 NCBI 中 BLASTP 工具查找 POD 同源蛋白氨

基酸序列,利用 Mega 6.0 软件对不同生物的 POD 同源基因编码氨基酸序列进行多重序列比对,构建系统发育树。

1.2.3 RNA 的分离及 RT-PCR 分析。用 TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit (TaKaRa) 提取总 RNA。用 Prime-Script™ RT-PCR Kit (Takara) 进行 RT-PCR 检测。POD-2F、POD-3R 和 POD-3F、POD-4R 引物用于 POD 基因检测在叶片中的表达及预测基因结构是否正确。用 SYBR® Premix Ex Taq™ II kit (Takara) 进行基因的荧光定量分析 POD 基因在病原物感染后表达情况。18S rRNA 和 18S rRNAR 作为 qPCR 的参考基因^[20],POD-3F 和 POD-4R 用作检测 POD 基因的表达量,RT-PCR 及 qPCR 所用的引物见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因的相对表达量^[21],重复 3 次。POD 基因表达的差异性检验使用最小显著差异 LSD ($P < 0.05$)。

表 1 试验所用引物

Table 1 Primers used in the study

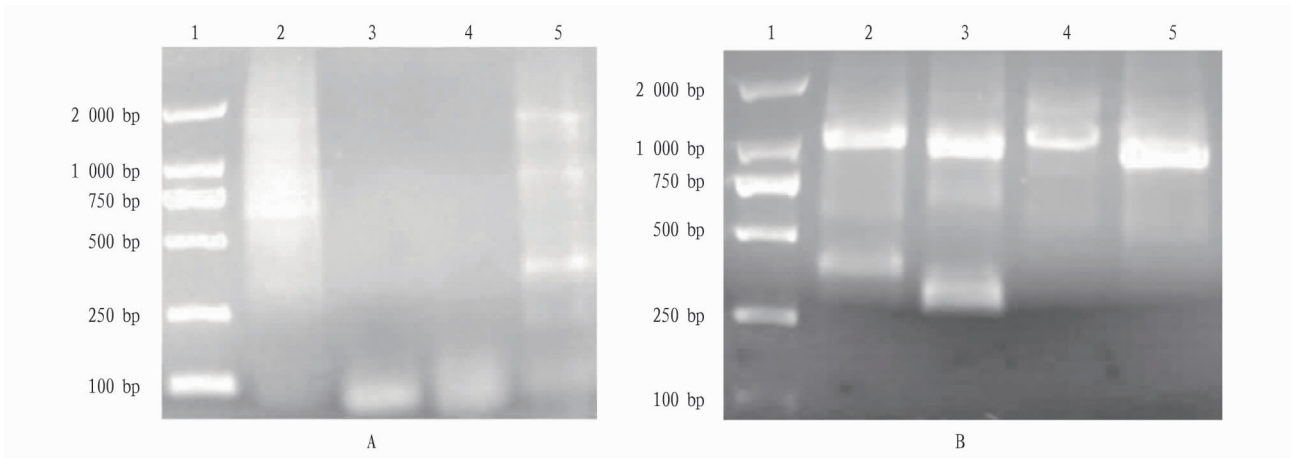
引物 Primer	核苷酸序列 Nucleotide sequence	用途 Function
icode-POD-A2	GCCGATGTTCTTCCATG _{gatgytgyt}	PCR
icode-POD-C16	CCCATCTTAATCATGGCCkynrcraartc	
LAD1-1	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC (G/C/A)N (G/C/A)NNNGGAA	hiTail-PCR
LAD1-2	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC (G/C/T)N (G/C/T)NNNGGTT	
LAD1-3	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC (G/C/A) (G/C/A)N (G/C/A)NNNCCAA	
LAD1-4	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC (G/C/T) (G/A/T)N (G/C/T)NNNCGGT	
AC1	ACGATGGACTCCAGAG	
POD-0a	GCATGCCATCCCTGGAGAAATGTAAAT	
POD-1a	ACGATGGACTCCAGTCCGGCCGGGTTTTGTAAACGAAAGACACACC	
POD-2a	GACCCATCAAAAAAAGTACCGACAGCG	
POD-0b	GAACCTGGCTTCGTTGGACCTGCG	
POD-1b	ACGATGGACTCCAGTCCGGCCAAACATGCAGGGGCTGCTGCACTC	
POD-2b	CAAGACCTACGGCGATGGTACGGG	
POD-2F	TTCATTGGAGAGCAAACCG	RT-PCR, qPCR
POD-3R	ATGTCCTTAACCGAGAGGC	
POD-3F	ATCCACCTCCATCCTCG	
POD-4R	CAGTTCGCCCTCCTCTTG	
18S rRNA	CCATCCCTCCCTAGTTAGCTTCT	
18S rRNAR	CCTGTCGGCCAAGGCTATATAC	

2 结果与分析

2.1 POD 全长基因的克隆 利用简并引物 icode-POD-A2 和 icode-POD-C16 从富贵竹的基因组中扩增出约 1 500 bp 的产物。克隆到载体后,得到 1 501 bp 的序列。将基因的核苷酸序列进行 Blast 同源性分析,结果表明:在 2% 覆盖率下,与小麦 POD 基因的核苷酸序列有 97.22% 的一致性;在 15% 的覆盖率下,与短柄草 POD 基因的核苷酸序列有 71.79% 的一致性。说明克隆到的序列为富贵竹的 POD 基因,但与其他物种的 POD 基因序列差异较大。为了克隆出富贵竹 POD 基因的全长序列,利用基因的部分序列设计 hiTail-PCR 引物,扩增该基因的左右两侧 DNA。POD-0b 与 LAD1-1 和 LAD1-4 引物的组合进行预扩增,扩增出拖带 DNA,其间有弱的 DNA 条带 (图 1A)。将预扩增产物稀释后作为模板,用 POD-1b 引物分别与 AC1 引物进行初级扩增,经检测后均出现条带;将初级扩增产物稀释后作为模板,用 POD-2b 和引物 AC1 进行次级扩增,经检测后出现特异性条带。POD-2b 扩增产物的大小比 POD-1b 扩增的条带小,与预期设计引物

的结果相符合 (图 1B)。将图 1B 中 3 和 5 的次级扩增产物分别克隆到 T 载体中,筛选阳性菌,提取重组质粒测序。POD 基因的序列能与简并引物扩增基因的序列拼接到一起,说明克隆出 POD 基因的一侧基因。同样用 POD-0a、POD-1a 和 POD-2a 成功地克隆了基因另一侧,所获得的序列与简并引物扩增基因的序列拼接到一起,经拼接后得到一个长度为 3 419 bp 的序列。经 Blast 同源性分析,在覆盖率 5% 的情况下,该全长基因与芦笋的 POD 基因序列一致性为 79.80%,表明该序列为 POD 基因。

在 softberry 网站上选择玉米作为参考基因序列,进行基因结构预测,预测的基因结构如图 2 所示。该基因包括 4 个外显子,分别位于 788~985、1 200~1 391、1 474~1 639 和 2 128~2 519 bp 处。该基因在 371 bp 处有一个转录起始位点 (transcriptional start site, TSS),在 2 450 bp 处有加尾信号 (polyA)。因此,该序列包括一个完整的启动子和加尾信号,是一个全长基因,接收号为 MZ450796。



注:A. 1 为 marker DL 2000;2~5 分别为引物 POD-0b 与引物 LAD1-1、LAD1-2、LAD1-3 和 LAD1-4 的预扩增产物。B. 1 为 marker DL 2000;2、4 分别对应图 1A 泳道 2、5 预扩增产物作模板的初级扩增产物; 3、5 分别对应图 1A 泳道 2、4 初级扩增产物的次级扩增产物

Note: A. 1 was DL 2000 DNA markers;2-5 were pre-amplification products using the primers LAD1-1,LAD1-2,LAD1-3, and 1-4 with POD-0b, respectively. B. 1 was DL 2000 DNA markers;2,4 were primary high-tail PCR products with the pre-amplification products as templates of lane 2,5 in Fig. 1 A, respectively;3,5 were secondary high-tail PCR products with primary high-tail PCR products of lane 2,4 as templates respectively

图 1 hiTAIL-PCR 扩增结果
Fig. 1 PCR amplification profiles of HiTAIL-PCR

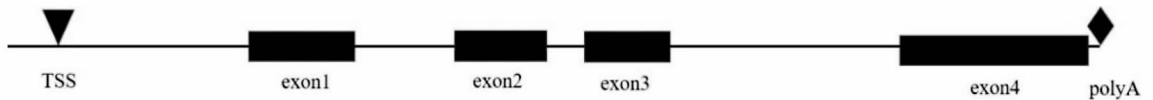


图 2 POD 基因预测的结构
Fig. 2 The structure of the predicted POD gene

用该基因的氨基酸序列进行 Blast 搜索,获得与该基因同源的其他植物蛋白氨基酸序列,用 Mega 6.0 软件构建进化树,结果见图 3。该基因的氨基酸与芦笋 POD 的氨基酸序

列同源性最高,聚为一类。在覆盖率 100%时,芦笋 POD 氨基酸序列的一致性为 74.30%,进一步证明拼接后的序列为富贵竹 POD 基因。说明成功克隆出富贵竹 POD 的全长基因。

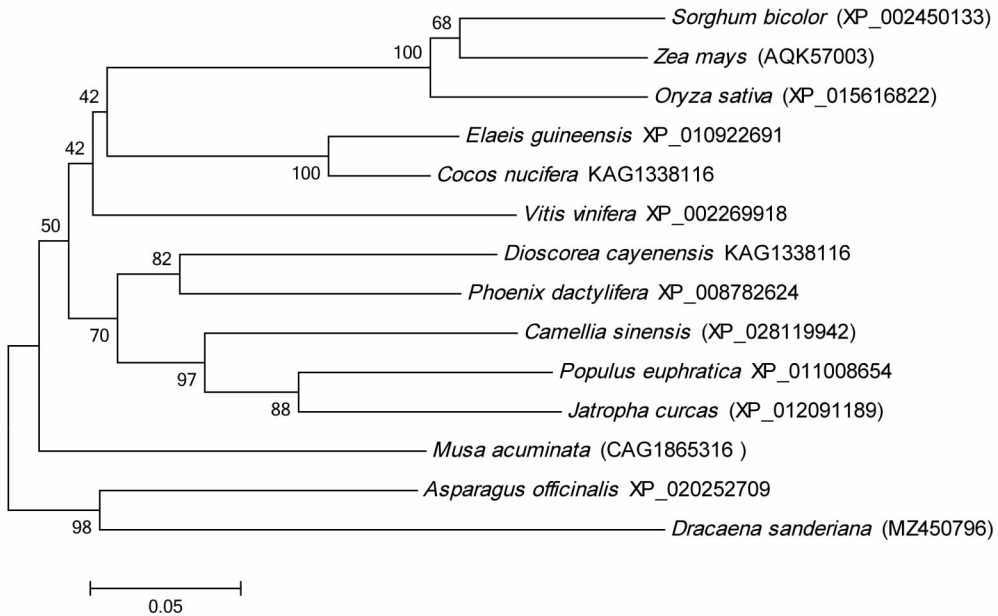


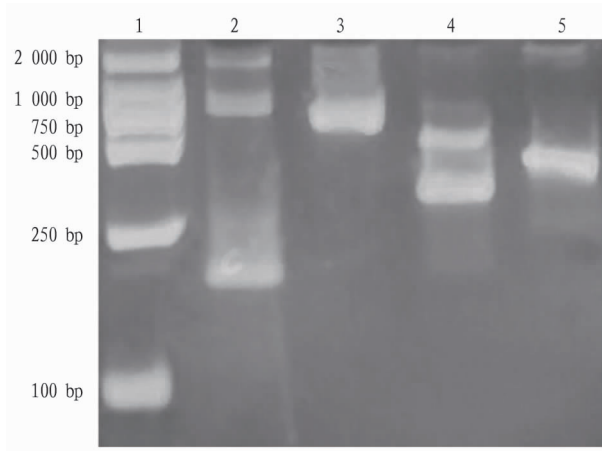
图 3 富贵竹 POD 与其他植物 POD 蛋白系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of POD of *D. sandariana* and POD in other plants

2.2 POD 基因的表达 根据预测的基因结构,引物 POD-2F 和 POD-3R 预计从基因组中扩增 387 bp 的片段,从 cDNA 中扩增 305 bp 片段;引物 POD-3F 和 POD-4R 预计从基

因组中扩增 679 bp 的片段,从 cDNA 中扩增 191 bp 片段。用 RT-PCR 检测基因在叶片中的表达,结果见图 4。从图 4 可以看出,第 2、3 泳道的产物与预期的 191 bp 和 679 bp 相近,

第4、5泳道的产物与预期的305 bp和387 bp相近。RT-PCR中扩增的产物都有一条带的大小与基因组扩增的大小相近,其原因是提取RNA后,没有用DNA酶降解RNA中基因组DNA。结果表明,POD基因在叶片中表达且克隆出的全长基因预测结构是正确的。



注:1. marker DL 2000;2、3. POD-3F和POD-4R分别从cDNA和基因组DNA模板扩增的产物;4、5.以POD-2F和POD-3R分别从cDNA和基因组DNA模板扩增的产物

Note:1. Marker DL 2000;2,3. The amplification products with cDNA and genomic DNA as templates using primers of POD-3F and POD-4R respectively;4,5. The amplification products with cDNA and genomic DNA as templates using primers of POD-2F and POD-3R respectively

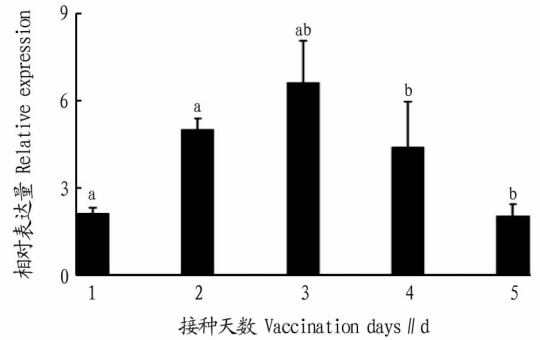
图4 RT-PCR扩增产物电泳图

Fig.4 Electrophoresis of RT-PCR amplified products

根据RT-PCR的结果,选择从cDNA中扩增大小为191 bp的POD-3F和POD-4R进行荧光定量PCR。提取接种后1、2、3、4和5 d富贵竹嫩叶的RNA,用无RNA酶的DNA酶降解RNA中残留的基因组DNA后,用18S rRNA作参照基因进行qPCR,结果见图5。从图5可以看出,POD基因的表达在接种*P. stewartii*后表达量上升,到接种3 d,其相对表达量达最大值6.63,之后POD基因的表达开始下降。因此,POD基因的表达受病原物诱导表达。

3 讨论

过氧化物酶(POD)在植物正常生长和应激反应中发挥着重要作用,是植物重要的保护酶类,在高等植物中分布较为广泛。因此,克隆植物POD基因并研究其功能具有重要意义。当前随着三代测序技术的发展,可以迅速完成对植物基因组的高深度测序,从而获得该物种大量的基因序列^[22],但植物基因组测序仍存在倍性和杂合度的挑战,且成本较高。因此,从植物基因组中克隆出基因仍具有广泛的应用前景,且目前在许多植物中已经克隆到POD基因的报道。其中有根据物种已有POD基因的序列,设计特异性引物扩增基因或基因的cDNA^[12,14,23-24]。然而目前尚缺乏富贵竹POD基因序列。在芋头中,在没有基因序列的情况下,利用CODEHOP设计简并引物扩增了POD基因,并用HiTAIL-PCR获得芋头POD部分基因^[11]。该研究利用POD基因简并引



注:不同柱上不同小写字母表示处理间在0.05水平差异显著

Note: Different lowercase letters on the different columns indicate significant difference at 0.05 level

图5 POD基因在接种病原细菌不同天数后的相对表达量

Fig.5 Expression of POD gene after inoculating pathogenic bacteria for different days

物从富贵竹中扩增出POD的部分基因,利用hiTAIL-PCR技术成功克隆出该基因的侧翼序列,成功克隆出包含全部启动子和加尾信号的POD全长基因。

用RT-PCR方法定性证实了POD基因在叶片中表达。叶片在植物的抗病虫、抗逆过程中具有重要功能,因此POD基因在叶片中的表达可能在这些过程中起着重要作用。在RT-PCR中,由于在提取RNA时经常有DNA的污染。在不同的外显子上设计引物,并用基因组扩增产物作对照,扩增产物与基因组的扩增产物大小,与预期从cDNA上扩增产物大小一致。一方面证实了RT-PCR的产物是来自cDNA,是基因表达的真实产物,同时也证实了预测POD基因结构的准确性。水稻的4个POD基因,只有2个被黄单孢杆菌诱导表达,接种12~24 h表达量达最大,然后逐渐下降^[7]。甜橙的12个POD基因,在感病品种被黄单孢杆菌感染后,2个POD表达上升,接种48 h表达量达到最大值,然后逐渐下降^[9]。从富贵竹中克隆的POD基因接种*P. stewartii*后表达量上升,3 d时相对表达量达最大值,然而之后逐渐下降,说明该POD基因被病原物诱导表达,可能与富贵竹的抗病性有关。

4 结论

通过简并引物扩增并克隆了富贵竹POD部分基因,利用已克隆的POD基因部分序列设计hiTAIL-PCR引物扩增该基因左右两侧DNA,最终获得一个长度为3419 bp的序列。经基因结构预测,该序列包含1个转录起始位点、加尾信号和4个外显子。该基因编码的氨基酸序列与芦笋POD的氨基酸序列一致性最高,获得了POD全长基因。通过RT-PCR确定了POD基因在富贵竹叶片中表达,并确定了基因结构预测的正确性。qPCR结果表明,POD基因被*P. stewartii*诱导上调表达。

参考文献

- [1] MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance [J]. Trends in plant science, 2002, 7(9):405-410.
- [2] APEL K, HIRT H. Reactive oxygen species; Metabolism, oxidative stress, and signal transduction [J]. Annual review of plant biology, 2004, 55:373-399.

- [3] WELINDER K G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases [J]. *Current opinion in structural biology*, 1992, 2(3): 388-393.
- [4] HIRAGA S, YAMAMOTO K, ITO H, et al. Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase genes [J]. *FEBS letters*, 2000, 471(2/3): 245-250.
- [5] HIRAGA S, SASAKI K, ITO H, et al. A large family of class III plant peroxidases [J]. *Plant cell physiology*, 2001, 42(5): 462-468.
- [6] TOGNOLLI M, PENEL C, GREPPIN H, et al. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Gene*, 2002, 288(1/2): 129-138.
- [7] CHITTOOR J M, LEACH J E, WHITE F F. Differential induction of a peroxidase gene family during infection of rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* [J]. *Molecular plant-microbe interactions*, 1997, 10(7): 861-871.
- [8] SHIGETO J, TSUTSUMI Y. Diverse functions and reactions of class III peroxidases [J]. *New phytologist*, 2016, 209(4): 1395-1402.
- [9] LI Q, DOU W F, QI J J, et al. Genomewide analysis of the CIII peroxidase family in sweet orange (*Citrus sinensis*) and expression profiles induced by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and hormones [J/OL]. *Journal of genetics*, 2020, 99(1) [2021-04-18]. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12041-019-1163-5>.
- [10] PASSARDI F, LONGET D, PENEL C, et al. The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(13): 1879-1893.
- [11] 莫俊杰, 梁钾贤, 胡汉桥, 等. 芋头过氧化氢酶基因克隆 [J]. *广东农业科学*, 2016, 43(9): 37-43.
- [12] 苏亚春, 王竹青, 李竹, 等. 甘蔗过氧化氢酶基因 *ScPOD02* 的克隆与功能鉴定 [J]. *作物学报*, 2017, 43(4): 510-521.
- [13] 郭嫒, 郭旺珍, 张天真. 两个陆地棉过氧化氢酶 cDNA 的克隆和鉴定 [J]. *作物学报*, 2007, 33(6): 891-897.
- [14] 杨尚谕, 李立芹, 陈倩, 等. 烟草过氧化氢酶基因 *NiPOD1* 的克隆及表达模式分析 [J]. *华北农学报*, 2018, 33(3): 106-112.
- [15] 刘付东标. 富贵竹室内加工技术研究 [J]. *园艺学报*, 2002, 29(4): 389-391.
- [16] ZHANG S, XU Z Y, LE R, et al. First report of leaf blight wilt on *Dracaena sanderiana* by *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* in China [J]. *Plant disease*, 2020, 104(6): 1854.
- [17] BOYCE R, CHILANA P, ROSE T M. iCODEHOP: A new interactive program for designing Consensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers from multiply aligned protein sequences [J]. *Nucleic acids research*, 2009, 37: W222-W228.
- [18] ROSE T M, HENIKOFF J G, HENIKOFF S. CODEHOP (Consensus-DEgenerate hybrid oligonucleotide primer) PCR primer design [J]. *Nucleic acids research*, 2003, 31(13): 3763-3766.
- [19] LIU Y G, CHEN Y L. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences [J]. *BioTechniques*, 2007, 43(5): 649-656.
- [20] MANOLI A, STURARO A, TREVISAN S, et al. Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize [J]. *Journal of plant physiology*, 2012, 169(8): 807-815.
- [21] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [22] 陈勇, 柳亦松, 曾建国. 植物基因组测序的研究进展 [J]. *生命科学研究*, 2014, 18(1): 66-74.
- [23] 乔枫, 耿贵工, 曾阳, 等. 枸杞抗坏血酸过氧化氢酶基因的克隆与表达分析 [J]. *中国农业大学学报*, 2019, 24(4): 64-72.
- [24] 朱海生, 刘建汀, 王彬, 等. 丝瓜过氧化氢酶基因的克隆及其在果实褐变中的表达分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2018, 26(1): 43-52.

(上接第 84 页)

- [7] GAYAKWAD E M, PATEL K P, SHANKARLING G S. Sodium sulfate-hydrogen peroxide-sodium chloride adduct: Selective protocol for the oxidative bromination, iodination and temperature dependent oxidation of sulfides to sulfoxides and sulfones [J]. *New journal of chemistry*, 2019, 43(15): 6001-6009.
- [8] CHAKINALA A G, GOGATE P R, BURGESS A E, et al. Treatment of industrial wastewater effluents using hydrodynamic cavitation and the advanced Fenton process [J]. *Ultrasonics sonochemistry*, 2008, 15(1): 49-54.
- [9] 黄伟英, 刘菲, 鲁安怀, 等. 过氧化氢与过硫酸钠去除有机污染物的进展 [J]. *环境科学与技术*, 2013, 36(9): 88-95.
- [10] 杜佳垠. 过氧化氢作为鱼卵水霉病防治药物的应用 [J]. *河北渔业*, 2004(1): 33-35.
- [11] 朱兴一, 夏枚生, 胡彩虹, 等. 包膜硫酸钠/过氧化氢/氯化钠加合物对南美白对虾养殖水体的增氧效果 [J]. *水产科学*, 2006, 25(11): 541-544.
- [12] 雷行. 养殖水环境化学实验 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2006.
- [13] 雷双双. 麦草低温碱氧两段蒸煮及其全氯漂白 [D]. 南京: 南京林业大学, 2012.
- [14] 宋长太. 淡水养殖尾水达标排放相关知识解读 [J]. *渔业致富指南*, 2018(20): 20-22.
- [15] TREDWIN C J, NAIK S, LEWIS N J, et al. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: Review of adverse effects and safety issues [J]. *British dental journal*, 2006, 200(7): 371-376.
- [16] 宋红桥, 顾川川, 张宇雷. 水产养殖系统的尾水处理方法 [J]. *安徽农业通报*, 2019, 25(22): 85-87.
- [17] AYECHER R. Treatment by coagulation-flocculation of dairy wastewater with the residual lime of National Algerian Industrial Gases Company (NIGC-Ammab) [J]. *Energy procedia*, 2012, 18: 147-156.
- [18] 王峰. 半滑舌鳎循环水养殖系统优化与养殖效果研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- [19] 凌先俊. 氧化法去除饮用水中亚硝酸盐的实验研究 [D]. 合肥: 安徽建筑大学, 2016.
- [20] 谢芳. 沸石填料电化学反应器深度处理氨氮废水的研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2015.
- [21] GAYAKWAD E M, PATIL V V, SHANKARLING G S. Metal-free oxidation of aldehydes to acids using the $4\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{NaCl}$ adduct [J]. *Environmental chemistry letters*, 2017, 15(3): 459-465.
- [22] 黄翔鹤. 对虾高位池水环境养殖污染和浮游微藻生态调控机制研究 [D]. 上海: 东华大学, 2013.
- [23] HASHIMOTO, AKIHIRO. 用过氧化氢处理含磷酸的废水和方法 [J]. *水处理信息报导*, 2002(3): 40-41.
- [24] 王光玉, 韩亚萌, 冯亚丽, 等. 海洋光合细菌筛选及其对养殖水体修复效果的测定 [J]. *渔业现代化*, 2019, 46(3): 22-29.
- [25] 相欣奕. 氧化技术降解典型有机污染物研究 [D]. 重庆: 重庆大学, 2013.
- [26] BLOCK P A, BROWN R A, ROBINSON D. Novel activation technologies for sodium persulfate in situ chemical oxidation [C] // Proceedings of the fourth international conference on the remediation of chlorinated and recalcitrant compounds. Columbus, OH: Battelle Press, 2004.

(上接第 88 页)

- [29] SHI H P, ZHANG T Y, YI Y Q, et al. Long form PRLR (IPRLR) regulates genes involved in the triacylglycerol synthesis in goat mammary gland epithelial cells [J]. *Small Rumin Res*, 2016, 139: 7-14.
- [30] RADHAKRISHNAN A, RAJU R, TULADHAR N, et al. A pathway map of prolactin signaling [J]. *J Cell Commun Signal*, 2012, 6(3): 169-173.
- [31] GALLEGO M I, BINART N, ROBINSON G W, et al. Prolactin, growth hormone, and epidermal growth factor activate Stat5 in different compartments of mammary tissue and exert different and overlapping developmental effects [J]. *Dev Biol*, 2001, 229(1): 163-175.
- [32] DOBOLYI A, OLÁH S, KELLER D, et al. Secretion and function of pituitary prolactin in evolutionary perspective [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 1-16.
- [33] PEREZ-MILLAN M I, LUQUE G M, RAMIREZ M C, et al. Selective disruption of dopamine D2 receptors in pituitary lactotrobes increases body weight and adiposity in female mice [J]. *Endocrinology*, 2014, 155(3): 829-839.
- [34] KELLY P A, BINART N, FREEMARK M, et al. Prolactin receptor signal transduction pathways and actions determined in prolactin receptor knock-out mice [J]. *Biochem Soc Trans*, 2001, 29(Pt2): 48-52.
- [35] KIM H, TOYOFUKU Y, LYNN F C, et al. Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy [J]. *Nat Med*, 2010, 16(7): 804-808.
- [36] DAS R, VONDERHAAR B K. Transduction of prolactin's (PRL) growth signal through both long and short forms of the PRL receptor [J]. *Mol Endocrinol*, 1995, 9(12): 1750-1759.
- [37] 邢光东. 鹅催乳素受体基因克隆和多克隆抗体制备及组织表达分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [38] FONTANESI L, GALIMBERTI G, CALÒ D G, et al. Identification and association analysis of several hundred single nucleotide polymorphisms within candidate genes for back fat thickness in Italian Large White pigs using a selective genotyping approach [J]. *J Anim Sci*, 2012, 90(8): 2450-2464.