

A型产气荚膜梭菌青海分离株 *virR* 基因序列与蛋白结构分析

李 清, 冶贵生*

(青海大学农牧学院动物医学系, 西宁 810016)

摘 要: 为了探究产气荚膜梭菌 *virR* 基因功能及其蛋白结构特点, 提取了产气荚膜梭菌青海分离株的基因组, 设计引物对 *virR* 基因进行 PCR 扩增和测序, 使用生物软件对该基因进行序列分析和蛋白预测。结果显示, 产气荚膜梭菌分离株 *virR* 基因长为 759 bp, 其编码 252 个氨基酸; 分离株 *virR* 基因与参考菌株 SM101、13、ATCC 13124、CP15、Del1、EHE-NE18、FORC 003、FORC 025、JIR4025、JP55、JP838、LLY N11、NCTC2837 以及 NCTC13170 的 *virR* 基因核苷酸序列同源性和氨基酸同源性均在 97% 以上; 二级结构预测显示分离株 *virR* 蛋白主要由 α 螺旋结构和 β 折叠组成; 三级结构预测表明分离株 *virR* 蛋白有 5 种可信用度较高的结构, 蛋白功能位点预测表明分离株 *virR* 蛋白具有 1 个 N-糖基化位点、1 个 cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点、2 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、3 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点以及 1 个 N-豆蔻酰化位点。

关键词: 产气荚膜梭菌; *virR* 基因; 序列分析; 蛋白结构

中图分类号: S852.61

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2019)05-0800-06

Sequence and protein structure analysis of *virR* gene of *Clostridium perfringens* type a isolated strain from Qinghai

LI Qing, YE Guisheng

(Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016)

Abstract: In order to explore the function of *virR* gene and its protein structure in *Clostridium perfringens*, this study extracted the genome of *Clostridium perfringens* Qinghai isolated strain, designed primers to PCR amplification and sequencing of *virR* gene, using DNA Star software and Online server for sequence analysis and protein prediction of this gene. The results showed that the *virR* gene of *Clostridium perfringens* isolated strain was 759 bp, which encoded 252 amino acids; the *virR* gene of isolated strain compared with reference strains SM101, 13, ATCC 13124, CP15, Del1, EHE-NE18, FORC 003, FORC 025, JIR4025, JP55, JP838, LLY N11, NCTC2837 and NCTC13170, the nucleotide sequence homology and amino acid homology of *virR* gene were all above 97%; The secondary structure prediction showed that the *virR* protein of the isolated strain was mainly composed of α -helical structure and β -sheets; tertiary structure prediction showed that the *virR* protein of the isolate has five highly reliable structures, and the functional site prediction indicates that the *virR* protein of isolated strain has one N-glycosylation site, one cAMP and cGMP dependence, a protein kinase phosphorylation site, two protein kinase C phosphorylation sites, three casein kinase II phosphorylation sites, and an N-myristoylation site.

Key words: *Clostridium perfringens*; *virR* gene; sequence analysis; protein structure

产气荚膜梭菌又称魏氏梭菌, 1891 年英国人 Welch 和 Nuttall 首次在一位死亡 8 h 的病人身上分离得到^[1]。该菌区别于其他梭菌的特点之一是在动物体内形成荚膜, 并且能产生大量气体, 因此得以命名^[2]。产气荚膜梭菌是革兰氏阳性菌, 兼性厌

氧并且会产生芽孢, 广泛地分布于人类生存的环境中, 比如污水、土壤甚至还有人畜的肠道或粪便, 是人畜共患的一种病原菌^[3]。可引起人畜的肠毒血症和坏死性肠炎, 也可导致人和动物的创伤性气性坏疽以及食物中毒^[4]。产气荚膜梭菌在一般厌氧条

收稿日期: 2019-02-28

基金项目: 国家自然科学基金(31760739, 31460672)和青海省高端创新人才千人计划共同资助。

作者简介: 李 清, 硕士研究生。E-mail: 972819987@qq.com

* 通信作者: 冶贵生, 博士, 副教授。E-mail: qhxjygs@163.com

件下就能生长,即使暴露于空气中仍能存活。其主要以芽孢形式存在,芽孢的抵抗能力强^[2]。产气荚膜梭菌至少能产生 15 种外毒素,其中重要的致死性毒素有 α 、 β 、 ϵ 、 ι 4 种^[5],按分泌毒素的类型可将该菌分为 A、B、C、D、E5 种^[6]。其中 A 型产气荚膜梭菌能引起人的食物中毒、肌肉蜂窝织炎、气肿疽、胃肠炎和动物的肠毒血症、坏死性肠炎、腹泻、气性坏疽等^[7]。

双组份信号系统(two-component signal system, TCS)是细菌中最普遍的信号传导系统,其在细菌芽孢形成、渗透调节、致病性、分化代谢、氧感应、金属耐受性、趋化性以及营养缺陷识别等生命过程中起着重要的作用,同时它还可以感应、传导外界环境的刺激,调节菌体内特定基因的适应性表达,在细菌抵抗不良环境时发挥着极其重要的作用^[8]。双组份信号系统通常是由组氨酸激酶(histidine kinase, HK)和反应调节因子(response regulator, RR)组成。前者可感应特定环境刺激,而后者介导细胞应答^[9-10]。产气荚膜梭菌基因组大约编码了 18 组 TCS 和个别的孤儿反应调节因子或组氨酸激酶^[11]。Chen 等^[12]通过构建产气荚膜梭菌 CN3718 菌株的 *virR* 基因无效突变体来检测 *VirSR* 双组份信号系统调控毒素的表达,结果表明 *VirSR* 双组份信号系统影响 α -毒素(CPA)和穿孔溶解素 O(PFO)的产生,但不影响 ϵ -毒素(ETX)的产生。产气荚膜梭菌参与毒素基因调控的有 *virX*、孤儿组氨酸激酶 *ReeS*、孤儿反应调节因子 *RevR* 及 *VirSR*^[13]。

研究发现 *VirSR* 双组份信号系统可调控产气荚膜梭菌 *colA* 基因, *pfoA* 基因和 *plc* 基因的表达^[13-14],还可调控产生胞外酶的基因^[15]。本研究利用 PCR 技术对 A 型产气荚膜梭菌青海分离株 *VirSR* 双组份信号系统中的 *virR* 基因进行扩增和测序,而后对 *virR* 蛋白进行结构预测,以期对产气荚膜梭菌青海分离株 *VirSR* 双组份信号系统调控功能的研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 A 型产气荚膜梭菌青海分离株(QH-1)由青海大学农牧学院动物医学系青藏高原疾病研究室分离保存^[16]。

1.1.2 试剂 TaKaRa MiniBEST 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、Taq DNA 聚合酶均由 TaKaRa 公司提供。

1.1.3 软件 DNA Star 生物软件, TMHMM V.2.0

服务器, SignalP 4.1 服务器, I-Tasser 服务器, Predict Protein 服务器。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 根据已发表的产气荚膜梭菌 *virR* 基因(登录号: U04966.1)序列设计引物,目的基因长度为 759 bp。引物序列如下: *virR*-F: ATGATAAAATTACATAAGAAATA, *virR*-R: TTAACATATTAATCCCC。

1.2.2 产气荚膜梭菌基因组 DNA 的提取 参照细菌 DNA 基因组提取试剂盒说明书提取产气荚膜梭菌分离株基因组 DNA。

1.2.3 *virR* 基因 PCR 扩增 参照说明书以 50 μ L 体系向 PCR 管中以体积从大到小的顺序依次加入以下试剂: 37.5 μ L RNase-Free ddH₂O, 5 μ L PCR 缓冲液, 4 μ L dNTPs, 1 μ L *virR*-F, 1 μ L *virR*-R, 1 μ L 模板(基因组 DNA), 0.5 μ L Taq DNA 聚合酶。

PCR 扩增条件如下: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 45 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

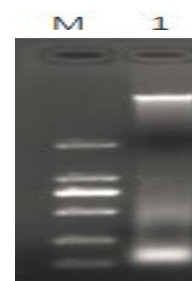
1.2.4 *virR* 基因序列分析 纯化后的 PCR 扩增产物由生物公司进行测序, DNASTar 软件进行序列分析以及同源比对。

1.2.5 *virR* 蛋白结构预测 使用 DNASTar 软件对产气荚膜梭菌分离株 *virR* 蛋白的表面可及性、亲水性以及二级结构等方面进行预测;应用 I-Tasser、PredictProtein、TMHMM V.2.0、SignalP 4.1 服务器分别对 *virR* 三级结构、蛋白功能位点、跨膜结构域以及信号肽进行预测。

2 结果与分析

2.1 产气荚膜梭菌青海分离株基因组 DNA 的提取

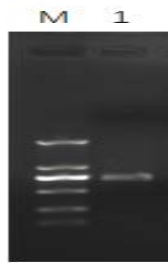
提取产气荚膜梭菌青海分离株基因组 DNA 后,经琼脂糖凝胶电泳检测结果显示(图 1),条带清晰,提取效果良好。



M: DL2000 DNA 标准; 1: 基因组 DNA
M: DL 2000 DNA Marker; 1: genomic DNA

图 1 基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA



M: DL2000 DNA 标准; 1: *virR* 基因
M: DL 2000 DNA Marker; 1: *virR* gene

图 2 *virR* 基因琼脂糖凝胶电泳

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of *virR* gene

2.2 产气荚膜梭菌青海分离株 *virR* 基因扩增

产气荚膜梭菌青海分离株 *virR* 基因 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 结果显示 (图 2) 目的基因条带单一, 扩增效果良好。

2.3 *virR* 基因序列分析

2.3.1 核苷酸序列分析 产气荚膜梭菌分离株 *virR* 基因的核苷酸序列长度为 759 bp, 其碱基组成中腺嘌呤和胸腺嘧啶所占的比重较大, 占总核苷酸量的 74.44% (表 1)。

表 1 *virR* 基因核苷酸序列分析
Table 1 Nucleotide sequence analysis of *virR* gene

指标 Item	A	G	C	T	A+T	C+G
含量/% Content	41.77	18.05	7.51	32.67	74.44	25.56
碱基数/bp Base No.	317	137	57	248	565	194

表 2 *virR* 蛋白氨基酸序列分析
Table 2 Amino acid sequence analysis of *virR* protein

指标 Item	碱性氨基酸 Basic amino acids	酸性氨基酸 Acidic amino acids	非极性氨基酸 Non-polar amino acids	极性氨基酸 Polar amino acid
数量 Number	45	37	89	58
氨基酸种类 Amino acid species	K,R	D,E	A,I,L,F,W,V	N,C,Q,S,T,Y

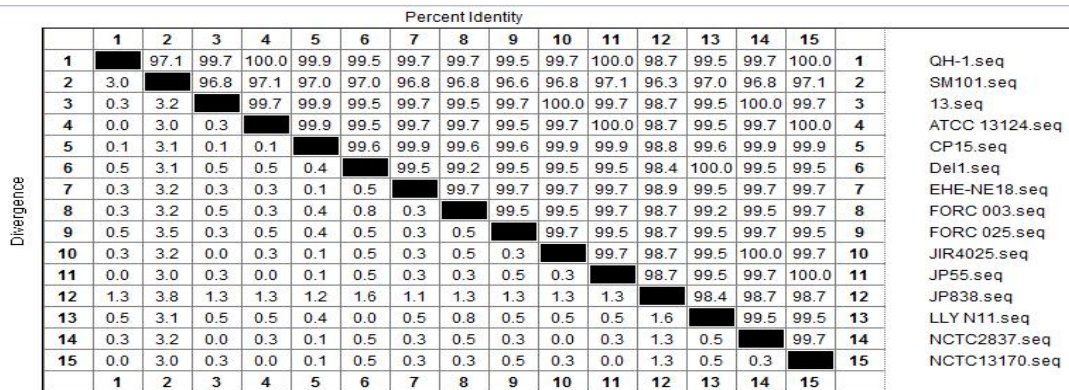


图 3 *virR* 基因核苷酸序列同源百分比

Figure 3 The homologous percentage of nucleotide sequence of *virR* gene

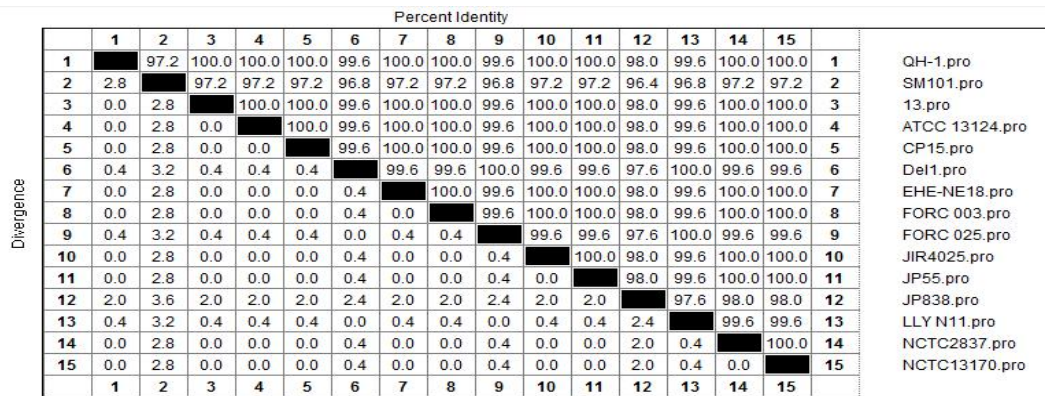


图 4 *virR* 蛋白氨基酸序列同源百分比

Figure 4 The homologous percentage of amino acid sequence of *virR* protein

2.3.2 氨基酸序列分析 产气荚膜梭菌分离株 *virR* 基因的氨基酸序列结果分析 (表 2) 显示, *virR* 基因所编码的氨基酸序列长度为 252 aa, 其中疏水性和亲水性氨基酸的含量较高, 约占总氨基酸的 58.33%。蛋白分子质量为 30 159.58 u, 等电点为 9.035。

2.3.3 *virR* 基因同源比对分析 将产气荚膜梭菌青海分离株 *virR* 基因与 14 株参考产气荚膜梭菌菌株进行核苷酸与氨基酸序列的同源比对分析, 参考菌株如下: SM101 菌株 (登录号: CP000312.1)、13 菌株 (登录号: BA000016.3)、ATCC 13124 菌株 (登录号: CP000246.1)、CP15 菌株 (登录号: CP019468.1)、Del1 菌株 (登录号: CP019576.1)、EHE-NE18 菌株 (登录号: CP025501.1)、FORC 003 菌株 (登录号: CP009557.1)、FORC 025 菌株 (登录号: CP013101.1)、JIR4025 菌株 (登录号: U04966.1)、JP55 菌株 (登录号: CP010993.1)、JP838 菌株 (登录号: CP010994.1)、LLY N11 菌株 (登录号: CP023410.1)、NCTC2837 菌株 (登录号: LS483461.1) 以及 NCTC13170 菌株 (登录号: LS483393.1)。

比对结果表明青海分离株与 SM101 菌株、13 菌株、ATCC 13124 菌株、CP15 菌株、Del1 菌株、EHE-NE18 菌株、FORC 003 菌株、FORC 025 菌株、JIR4025 菌株、JP55 菌株、JP838 菌株、LLY N11 菌株、NCTC2837 菌株以及 NCTC13170 菌株的核

苷酸序列同源性分别为 97.1%、99.7%、100%、99.9%、99.5%、99.7%、99.7%、99.5%、99.7%、100%、98.7%、99.5%、100%及 99.7%。青海分离株核苷酸序列与参考菌株的同源性在 97%以上, 而且与 ATCC 13124 菌株、JP55 菌株及 NCTC13170 菌株同源性为 100%。

青海分离株与 SM101 菌株、13 菌株、ATCC 13124 菌株、CP15 菌株、Del1 菌株、EHE-NE18 菌株、FORC 003 菌株、FORC 025 菌株、JIR4025 菌株、JP55 菌株、JP838 菌株、LLY N11 菌株、NCTC2837 菌株以及 NCTC13170 菌株的氨基酸序列同源性分别为 97.2%、100%、100%、100%、99.6%、100%、100%、99.6%、100%、100%、98%、99.6%、100%及 100%。青海分离株氨基酸序列与参考菌株的同源性在 97%以上, 而且与 13 菌株、CP15 菌株、ATCC 13124 菌株、EHE-NE18 菌株、NCTC2837 菌株、JIR4025 菌株、FORC 003 菌株、JP55 菌株及 NCTC13170 菌株等 9 株菌的同源性为 100%。

2.4 蛋白质结构预测

2.4.1 二级结构预测 采用 Chou 方法预测分离株 *virR* 蛋白, 结果表明 *VirR* 蛋白 α 螺旋结构较多, 占 59.7%, 主要分布区域为 1~22、37~62、67~90、123~144、158~175 及 236~253 位氨基酸; β 折叠占 28.9%, 主要分布区域为 95~107、115~124 为 129~150; β 转角占了 20.6%。

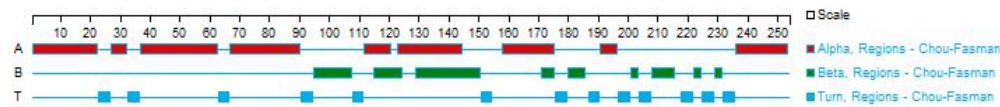


图 5 *virR* 蛋白二级结构预测

Figure 5 The prediction of secondary structure of *virR* protein

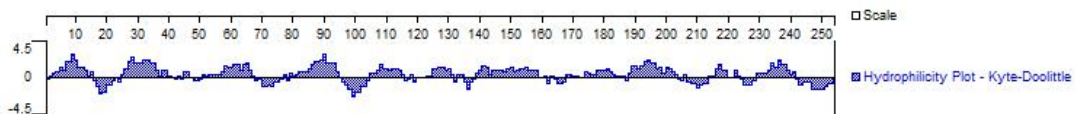


图 6 *virR* 蛋白亲水性预测

Figure 6 The hydrophilic prediction of *virR* protein

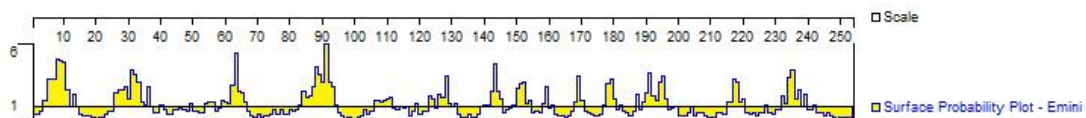


图 7 *virR* 蛋白表面可及性预测

Figure 7 The *virR* protein surface accessibility prediction

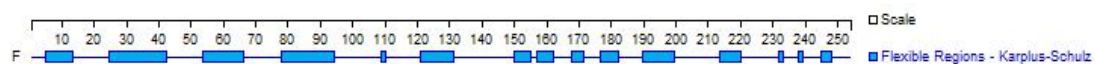
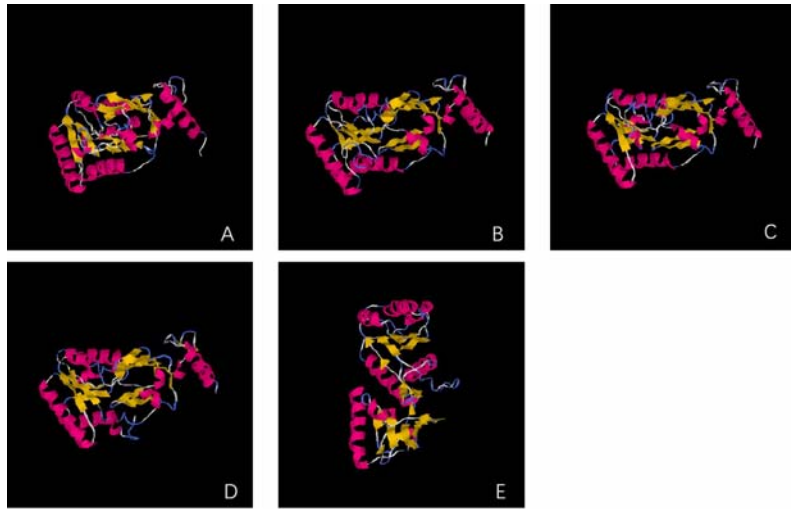


图 8 *virR* 蛋白柔韧性预测

Figure 8 The *virR* protein Flexibility Prediction



A-E 为 *VirR* 蛋白三级结构的 5 个预测模型 A-E is Five Prediction Models for the Tertiary Structure of *VirR* Proteins

图 9 *virR* 蛋白三级结构

Figure 9 The *virR* protein tertiary structure

2.4.2 亲水性预测 分离株 *virR* 蛋白亲水性预测结果显示(图 6), *virR* 蛋白主要的亲水区域为 2~15、25~40、51~67、79~94、139~158、174~186、188~203 及 229~241 位氨基酸。

2.4.3 表面可及性预测 分离株 *virR* 蛋白表面可及性预测结果(图 7)显示 *virR* 蛋白表面可及性较高的区域为 4~11、26~36、59~66、89~94、123~131、149~154、189~196、215~220 及 232~237 位氨基酸。

2.4.4 蛋白柔韧性预测 分离菌株 *virR* 蛋白柔韧性预测结果显示(图 8), *virR* 蛋白柔韧性区域主要分布在 5~13、25~42、54~66、78~94、121~131 及 190~199 位氨基酸。

2.4.5 三级结构预测 使用 I-Tasser 服务器获得五种分离株 *virR* 蛋白三级结构预测模型, 即模型 A (C-score=-0.31)、模型 B (C-score=-0.94)、模型 C (C-score=-1.85)、模型 D (C-score=-2.07)、模型 E (C-score=-3.20)。这 5 个模型 C-score 值均在[-5, 2]置信区间内, 主要由 α 螺旋和 β 折叠组成。

2.4.6 蛋白翻译后修饰位点预测 分离株 *virR* 蛋白修饰位点预测结果显示, *virR* 蛋白含有 1 个 N-糖基化位点, 是 36~39 位的 NLSK; 1 个 cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点, 142~145 位的 KRYT; 2 个蛋白激酶 C 磷酸化位点, 分别是 84~86 位的 TAR 和 148~150 位的 TIK; 3 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点, 分别为 55~58 位的 TGED、80~83 位的 TGME 和 148~151 位的 TIKD; 1 个 N-豆蔻酰化位点, 81~86 位的 GMETAR。

2.4.7 信号肽预测及跨膜结构域预测 使用 SignalP 4.1 服务器进行信号肽预测, 结果表明 *virR* 蛋白无信号肽; 应用 TMHMM V.2.0 服务器预测跨膜结构域, 结果显示 *virR* 蛋白无跨膜结构。

3 讨论

VirSR 双组份信号系统能调控毒素分泌相关基因, 对宿主细胞诱导的毒素产生着重要的作用^[17-18]。QH-1 菌株 *virR* 基因与参考菌株的同源比对分析显示, *virR* 基因的核苷酸序列同源性均在 97% 以上, 说明 *virR* 基因保守性较高。QH-1 菌株 *virR* 蛋白氨基酸序列分析结果显示, *virR* 由 20 种氨基酸组成, 其中亮氨酸的含量最高, 色氨酸最少。亲水性预测结果显示总平均亲水指数为 0.33, 推测该蛋白可能是一个亲水性蛋白。二、三级结构预测结果显示 *VirR* 蛋白以 α 螺旋和 β 折叠为主。信号肽是位于分泌性蛋白质 N 端的一段疏水肽段, 一般有 15~30 个氨基酸长度, 其包括 3 个部分: 疏水核心区、信号肽的 C 端和 N 端。信号肽在新合成的多肽链中指导蛋白质进行跨膜转移和定位。跨膜区是膜内蛋白与膜脂结合的主要部位, 一般由 20 个左右的疏水氨基酸组成, 形成螺旋。膜蛋白在细胞中具有重要作用, 由胞外区、跨膜区和胞内区组成, 而蛋白在细胞膜内的部分为跨膜区^[19]。而产气荚膜梭菌分离株 *VirR* 蛋白分析后发现该蛋白无跨膜区和信号肽序列, 可能是一种胞内蛋白。双组份信号系统通常会感知环境信号并将该信息传输到细胞中, 如果传感器组氨酸激酶 *VirS* 检测到刺激, 它会自动磷酸化蛋白质 C-末端结构域中的保守组氨酸残基, 然后将磷酸基

转移至同源反应调节器 *virR* 的保守天冬氨酸残基, 磷酸化反应调节通常通过与特定基因的启动子区域结合起到转录调节因子的作用^[11]。产气荚膜梭菌分离株 *virR* 蛋白预测有五种蛋白修饰位点, 分别为 cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点、N-糖基化位点、蛋白激酶 C 磷酸化位点、酪蛋白激酶 II 磷酸化位点以及 N-豆蔻酰化位点。N-糖基化影响蛋白质的功能, 参与信号转导等重要的生物进程^[20]。N-豆蔻酰基化的功能与调节蛋白和膜可逆性结合相关^[21]。蛋白质磷酸化是蛋白质生物合成后活性调节的一种化学修饰, 对蛋白具有重要的生物学意义^[22]。蛋白激酶 C (PKC) 也是一类重要的信号传导蛋白, 激活后的 PKC 可磷酸化多种蛋白质并发挥不同的作用^[23]。

参考文献:

- [1] LUCEY B P, HUTCHINS G M. William H. Welch, MD, and the discovery of *Bacillus welchii*[J]. Arch Pathol Lab Med, 2004, 128(10): 1193-1195.
- [2] 李娜. 羊源产气荚膜梭菌的分离鉴定与 α 毒素的原核表达和免疫原性研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2013.
- [3] 李璐, 赵宝华. 产气荚膜梭菌主要致死性毒素的研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2011, 32(4): 94-98.
- [4] 陈小云, 关孚时, 张存帅, 等. 产气荚膜梭菌主要外毒素最新研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2005, 39(6): 29-33.
- [5] CARMAN R J, SAYEED S, LI J H, et al. *Clostridium perfringens* toxin genotypes in the feces of healthy North Americans[J]. Anaerobe, 2008, 14(2): 102-108.
- [6] 霍萍萍, 张聪敏, 胡明丽, 等. 产气荚膜梭菌 β 毒素研究进展[J]. 动物医学进展, 2013, 34(9): 90-94.
- [7] 许崇波, 朱平, 姚湘燕, 等. 产气荚膜梭菌 α 毒素保护性抗原基因的克隆与核苷酸序列分析[J]. 中国兽医学报, 1998, 18(2): 140-143.
- [8] 王艳. *Cupriavidus gilardii* CR3 中双组份编码基因 *copSR* 的铜抗性调控机制研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2017.
- [9] GALPERIN M Y. Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations[J]. J Bacteriol, 2006, 188(12): 4169-4182.
- [10] MASCHER T, HELMANN J D, UNDEN G. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2006, 70(4): 910-938.
- [11] CHEN J M, MA M L, UZAL F A, et al. Host cell-induced signaling causes *Clostridium perfringens* upregulate production of toxins important for intestinal infections[J]. Gut Microbes, 2014, 5(1): 96-107.
- [12] CHEN J M, ROOD J I, MCCLANE B A. Epsilon-toxin production by *Clostridium perfringens* type D strain CN3718 is dependent upon the *agr* operon but not the *VirS/VirR* two-component regulatory system[J]. mBio, 2011, 2(6): DOI:10.1128/mbio.00275-11.
- [13] OHTANI K, SHIMIZU T. Regulation of toxin gene expression in *Clostridium perfringens*[J]. Res Microbiol, 2015, 166(4): 280-289.
- [14] SHIMIZU T, BA-THEIN W, TAMAKI M, et al. The *virR* gene, a member of a class of two-component response regulators, regulates the production of perfringolysin O, collagenase, and hemagglutinin in *Clostridium perfringens*[J]. J Bacteriol, 1994, 176(6): 1616-1623.
- [15] CHEUNG J K, KEYBURN A L, CARTER G P, et al. The VirSR two-component signal transduction system regulates NetB toxin production in *Clostridium perfringens*[J]. Infect Immun, 2010, 78(7): 3064-3072.
- [16] 冶贵生, 邹勇. 餐厨废水中 A 型产气荚膜梭菌的分离与鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014(1): 103-104.
- [17] OHTANI K. Gene regulation by the *VirS/VirR* system in *Clostridium perfringens*[J]. Anaerobe, 2016, 41: 5-9.
- [18] BA-THEIN W, LYRISTIS M, OHTANI K, et al. The *virR/virS* locus regulates the transcription of genes encoding extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*[J]. J Bacteriol, 1996, 178(9): 2514-2520.
- [19] 王梦雅, 赵学亮, 徐明, 等. 山羊紧密连接相关蛋白 ZO-1 序列的生物信息学分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(21): 1-4.
- [20] 阮班军, 代鹏, 王伟, 等. 蛋白质翻译后修饰研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2014, 36(7): 1027-1037.
- [21] 谢立苹, 姚逸正, 朱虹, 等. 幽门螺杆菌 *cag* 致病岛 Cag I 蛋白的生物信息学分析[J]. 临床检验杂志, 2014, 32(11): 835-840.
- [22] DELOM F, CHEVET E. Phosphoprotein analysis: from proteins to proteomes[J]. Proteome Sci, 2006, 4: 15.
- [23] 赵海艳. 蛋白激酶 C 对 PRRSV 感染的影响以及 GP5 重组乳酸克鲁维酵母免疫效果的初步研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.