

杭柏林,徐 军,胡建和. 鸡内源性抗菌肽 LEAP-2 的生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(6):46-50.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.06.012

鸡内源性抗菌肽 LEAP-2 的生物信息学分析

杭柏林,徐 军,胡建和

(河南科技学院动物科技学院,河南新乡 453003)

摘要:为了解鸡内源性抗菌肽 LEAP-2 的基本信息,根据鸡 LEAP-2 的氨基酸序列,通过软件对鸡 LEAP-2 的生物信息学进行分析。结果表明,鸡 LEAP-2 由 20 种氨基酸构成,等电点为 9.86,分子量为 8 835.65 u,为不稳定的疏水蛋白,定位于细胞核内,有 1 个跨膜区和 1 个信号肽,有 2 个糖基化位点和 8 个磷酸化位点,二级结构由 α 螺旋、延伸链、 β 折叠和无规则卷曲组成,三级结构和功能结构域类似于人 LEAP-2,存在多个抗原表位,根据系统进化树推测,鸡 LEAP-2 与日本鹌鹑 LEAP-2 进化关系最近。研究结果为鸡抗菌肽 LEAP-2 的深入研究提供了信息基础。

关键词:鸡;抗菌肽;Ⅱ型肝脏表达抗菌肽(LEAP-2);生物信息学;氨基酸序列

中图分类号:S852.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)06-0046-05

抗菌肽(antimicrobial peptides,简称 AMPs)是生物机体内具有抗细菌、抗病毒、抗肿瘤等多种生物学活性的多肽,是机体先天免疫系统的重要组成部分^[1-2]。抗菌肽具有低毒、高效、抗菌谱广、低耐药等特点,成为抗生素替代物研究中的佼佼者^[3-4]。Krause 等从人血液中分离到肝脏表达的抗菌肽 LEAP-1、2,其中Ⅱ型肝脏表达抗菌肽(liver-expressed antimicrobial peptide 2,简称 LEAP-2)有较强的抗微生物活性,但肽的序列、二级结构和表达等方面与其他已知肽类有差

异^[5]。从鸡体内分离到的 LEAP-2 由 76 个氨基酸构成,具有抗微生物(如沙门氏菌)的活性^[6]。但鸡 LEAP-2(cLEAP-2)的许多生物信息学内容还不是很清楚。因此,本研究基于 cLEAP-2 的氨基酸序列利用在线生物软件和程序进行生物信息学分析,为深入探讨其抗菌作用机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

鸡内源性抗菌肽 LEAP-2 的氨基酸来自网站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>,登录号为 NP_001001606,其序列为 MHCLKIMAFLLFFSLLSQVYCASLHQPPQLRLKRMTPFWRGVSLRPGVASCARDNSECITMLCRKNRCFLRTASE。

1.2 方法

1.2.1 抗菌肽理化性质分析 利用 www.expasy.org/tools 网站中的 ProtParam 工具对抗菌肽 cLEAP-2 进行理化性质参数的分析。

1.2.2 抗菌肽的二级结构预测 利用 <https://npsa-prabi>.

[J]. 中国医院药杂志,2014,10(34):782-786.

[7]Nagaoka T O,Gl I Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997,94(5):597-602.

[8]Gilbert J E,Levis R V,Wilkinson M J. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999,98(6/7):1125-1131.

[9]陈大霞,彭 锐,李隆云,等. 利用 SRAP 和 ISSR 标记分析川党参的遗传多样性[J]. 中国中药杂志,2009,3(34):255-259.

[10]郭宏波. 野生与栽培党参遗传多样性及其保存和保护策略研究[D]. 上海:复旦大学,2007.

[11]王晓明,谢碧霞,李俊彬,等. 金银花 ISSR 分子标记及遗传多样性分析[J]. 中南林业科技大学学报,2008,28(6):14-18.

[12]张建清,苏 雪,吴 琼,等. 药用植物党参的 RAPD 分析[J]. 中药材,2006,29(5):417-420.

收稿日期:2016-10-21

基金项目:国家自然科学基金(编号:31672559);河南省高校科技创新团队支持计划(编号:15IRTSTHN);河南科技学院高层次人才启动项目(编号:2014020);河南科技学院 2015 年度大学生“百农英才”创新项目(编号:BNYC2015-2-09)。

作者简介:杭柏林(1978—),男,江苏海安人,博士,讲师,主要从事动物病原与新兽药研究。E-mail:yzhl001@126.com。

通信作者:胡建和,博士,教授,主要从事动物病原与新兽药研究。E-mail:xxjianhe@126.com。

传多样性。因此,建议在今后的党参育种过程中,考虑开展不同优良品种中种群间的杂交育种,以获得更广泛的遗传基础,培育出优良的新品种。

参考文献:

- [1]陈 丰,韩 丰,杨建敏,等. 洛龙党参贮藏保鲜技术研究[J]. 贵州农业科学,2009,37(9):216-217.
- [2]龚其海,赵 万,余 兰,等. 两种党参多糖对小鼠免疫功能影响的比较[J]. 遵义医学院学报,2012,4(34):268-270.
- [3]余 兰,陈 华,姜方明,等. 洛龙党参的多糖含量测定[J]. 贵州农业科学,2010,38(7):190-191.
- [4]周东新,祁建民,吴为人,等. 黄麻 DNA 提取与 RAPD 反应体系的建立[J]. 福建农业学报,2001(3):334-339.
- [5]白凤虎,李德芳,陈安国,等. 改良 CTAB 法用于提取红麻成熟叶片高质量 DNA 的研究[J]. 中国麻业科学,2007,29(3):158-161.
- [6]何 峰,唐 灿,王子雯,等. 巴中栀子遗传多样性的 ISSR 分析

ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html 网站的二级结构预测工具进行抗菌肽 cLEAP-2 的二级结构预测。

1.2.3 抗菌肽的跨膜区分析 利用 http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html 网站的 TMpred 网站的工具进行抗菌肽 cLEAP-2 的跨膜区分析。

1.2.4 抗菌肽的信号肽预测 利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> 网站的 Signal4.1Server 工具分析抗菌肽 cLEAP-2 的信号肽。

1.2.5 抗菌肽细胞内定位的预测 利用 http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/eu_predict.htm 网站的亚细胞定位分析工具 Sublocal v1.0 进行抗菌肽 cLEAP-2 的细胞内定位预测。

1.2.6 抗菌肽糖基化和磷酸化位点预测 利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/> 网站的 NetOGlyc 4.0 Server 工具和 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/> 网站的 NetPhos3.1Server 工具分析抗菌肽 cLEAP-2 的糖基化和磷酸化位点。

1.2.7 抗菌肽的三维空间结构分析 利用 http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=modelling_simple1 网站的工具进行抗菌肽 cLEAP-2 三级结构的预测。

1.2.8 抗菌肽保守结构域的预测 利用 <http://smart.embl-heidelberg.de/> 网站中的工具进行抗菌肽 cLEAP-2 保守结构域的预测。

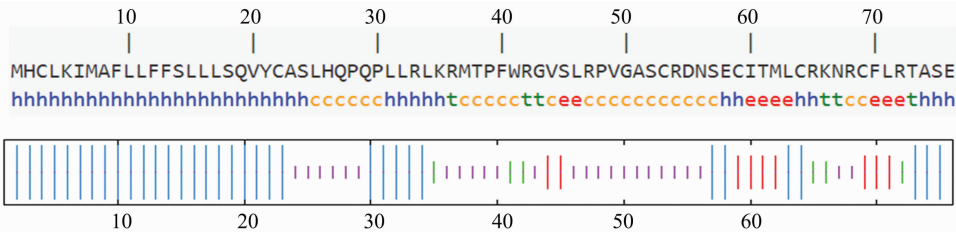
1.2.9 抗菌肽的抗原表位分析 利用 DNASTar 软件中的 Protean 工具进行抗菌肽 cLEAP-2 的抗原表位分析。

1.2.10 抗菌肽的氨基酸序列进化分析 在 GenBank 中检索到鸡和其他 42 个物种的 LEAP-2 的氨基酸序列。利用 DNASTar 软件中的 MegAlign 工具,采用 Jotun Hein 算法进行抗菌肽 cLEAP-2 的氨基酸序列进化分析。

2 结果与分析

2.1 抗菌肽 cLEAP-2 的理化性质

鸡内源性抗菌肽 cLEAP-2 分子式为 C₃₉₂H₆₃₅N₁₁₃O₉₉S₁₀,



数据为氨基酸位点;大写字母为氨基酸简写;h、t、e 和 c 分别代表 α 螺旋、 β 转角、延伸链和无规则卷曲;长竖线表示 α 螺旋,中竖线表示延伸链,次中竖线表示 β 转角,短竖线表示无规则卷曲

图1 cLEAP-2 的二级结构预测

2.3 抗菌肽 cLEAP-2 的跨膜区预测

经软件分析(参数:跨膜螺旋长度为 17~33aa,得分>500),cLEAP-2 存在跨膜区(图 2)。从里(inside,简称 i)到外(outside,简称 o),可能存在于第 6~23 位氨基酸残基之间(得分为2 090);从外到里,可能存在于第 3~21 位氨基酸残基之间(得分为1 748)。

2.4 抗菌肽 cLEAP-2 的信号肽预测

有 76 个氨基酸残基,由 20 种基本氨基酸组成,所含的氨基酸残基数量和含量见表 1。cLEAP-2 的分子量为 8 835.65 u,等电点为 9.86,带负电的残基(Asp + Glu)数为 3 个,带正电荷的残基(Arg + Lys)数为 11 个。在体外,cLEAP-2 的半衰期在哺乳动物细胞中为 30 h,在酵母中>20 h,在大肠杆菌中>10 h。经软件计算,不稳定指数为 57.27,表明 cLEAP-2 为不稳定蛋白。总 GRAVY 值为 0.205,表明 cLEAP-2 为疏水蛋白。

表 1 cLEAP-2 的氨基酸组成

序号	氨基酸	数量(个)	含量(%)
1	丙氨酸(Ala,简称 A)	4	5.3
2	精氨酸(Arg,简称 R)	8	10.5
3	天冬酰胺(Asn,简称 N)	2	2.6
4	天冬氨酸(Asp,简称 D)	1	1.3
5	半胱氨酸(Cys,简称 C)	6	7.9
6	谷氨酰胺(Gln,简称 Q)	3	3.9
7	谷氨酸(Glu,简称 E)	2	2.6
8	甘氨酸(Gly,简称 G)	2	2.6
9	组氨酸(His,简称 H)	2	2.6
10	异亮氨酸(Ile,简称 I)	2	2.6
11	亮氨酸(Leu,简称 L)	13	17.1
12	赖氨酸(Lys,简称 K)	3	3.9
13	甲硫氨酸(Met,简称 M)	4	5.3
14	苯丙氨酸(Phe,简称 F)	5	6.6
15	脯氨酸(Pro,简称 P)	4	5.3
16	丝氨酸(Ser,简称 S)	7	9.2
17	苏氨酸(Thr,简称 T)	3	3.9
18	色氨酸(Trp,简称 W)	1	1.3
19	酪氨酸(Tyr,简称 Y)	1	1.3
20	缬氨酸(Val,简称 V)	3	3.9

2.2 抗菌肽 cLEAP-2 的二级结构

经软件分析(参数>window width 为 17,similarity threshold 为 8,number of states 为 4),cLEAP-2 的二级结构(图 1)中, α 螺旋(36 个氨基酸残基参与)占 47.31%,延伸链(9 个氨基酸残基参与)占 11.84%, β 转角(6 个氨基酸残基参与)占 7.89%,无规则卷曲(25 个氨基酸残基参与)占 32.89%。

经软件分析(Cutoff 为 0.45),cLEAP-2 存在信号肽(图 3),位于第 1~22 位氨基酸残基之间,得分为 0.937。信号肽与成熟肽的剪切位点在第 22 位和第 23 位氨基酸残基之间。

2.5 抗菌肽 cLEAP-2 的细胞内定位

经软件分析,cLEAP-2 主要定位于细胞核内[可信度指数(reliability index)=4,预期准确率(expected accuracy=91%)]。

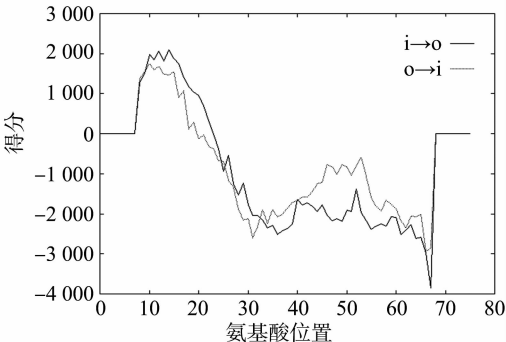


图2 cLEAP-2 的跨膜区预测

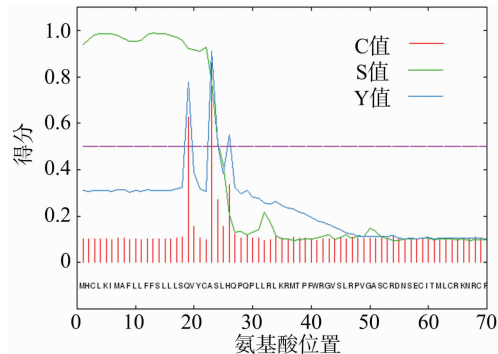


图3 cLEAP-2 的信号肽预测

2.6 抗菌肽 cLEAP-2 的糖基化和磷酸化位点

经软件分析,cLEAP-2 存在糖基化位点(得分>0.5),分别是第 45、52 位的丝氨酸残基(得分分别为 0.746、0.705)。对丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)和酪氨酸(Tyr)的磷酸化进行分析,结果见表 2,有 5 个丝氨酸残基和 3 个苏氨酸残基存在 8 个磷酸化位点(得分均>0.5),但没有酪氨酸的磷酸化位点。推测不同的位点可被不同的激酶引发磷酸化。

表 2 cLEAP-2 的磷酸化位点预测

序号	磷酸化位点		催化激酶 (得分)
	位点	氨基酸	
1	24	丝氨酸(S)	PKC(0.703),cdc2(0.535)
2	38	苏氨酸(T)	unsp(0.927),cdk5(0.593)
3	45	丝氨酸(S)	PKA(0.748),PKC(0.587)
4	52	丝氨酸(S)	unsp(0.995),PKC(0.787)
5	57	丝氨酸(S)	unsp(0.906),PKA(0.654),RSK(0.544)
6	61	苏氨酸(T)	PKC(0.513)
7	73	苏氨酸(T)	PKG(0.598),CK II(0.529)
8	75	丝氨酸(S)	PKA(0.686),RSK(0.558)

注:PKC 为蛋白激酶 C,PKA 为蛋白激酶 A,PKG 为蛋白激酶 G,cdc2 为细胞分裂周期蛋白 2,cdk5 为细胞周期素依赖蛋白激酶 5,RSK 为核糖体 S6 激酶,CK II 为酪蛋白激酶 2,unsp 为某种非特异性蛋白激酶(即不在系统中的某种激酶)。

2.7 抗菌肽 cLEAP-2 的三级结构预测

经软件分析,cLEAP-2 的三级结构见图 4。cLEAP-2 的第 37~76 位氨基酸与 SWISS-MODEL TEMPLATE LIBRARY 中模板[2L1qA](99.9 Å) HUMAN LIVER EXPRESSED ANTIMICROBIAL 的序列相似度为 80%,E 值为 9.02×10^{-11} ,预测结果的 QMEAN Z 值为 -1.13。cLEAP-2 由 α 螺旋、延伸链、 β 转角和无规则卷曲构成,与预测的二级结构结果一致。

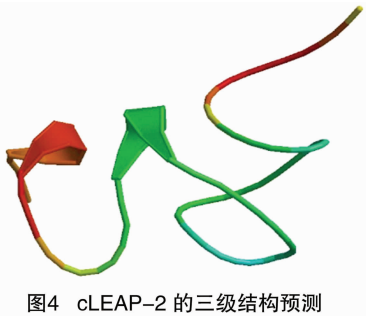


图4 cLEAP-2 的三级结构预测

2.8 抗菌肽 cLEAP-2 的功能结构域预测

经软件分析,cLEAP-2 与 Pfam 数据库中 LEAP-2 的结构相似(E 值为 7.8×10^{-44})。cLEAP-2 的第 37~76 位氨基酸与 PDB:2L1q | A 相似(E 值为 1.0×10^{-17}),第 1~22 位氨基酸残基为信号肽功能结构域,这与前面的预测结果相一致。Low complexity region 位于第 9~18 位氨基酸残基(图 5)。

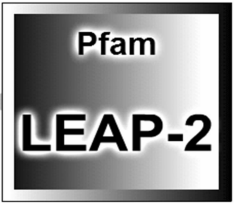


图5 cLEAP-2 的功能结构域预测

2.9 抗菌肽 cLEAP-2 的抗原表位分析

经软件分析,由图 6 可知 cLEAP-2 的亲水性、表面可及性、柔韧性和抗原性等指数。亲水性指数>0、抗原性指数>0、可及性指数>1 时,可能存在抗原表位。据此综合分析,认为 cLEAP-2 可能存在多个抗原表位。

2.10 抗菌肽 cLEAP-2 的氨基酸系统进化

将鸡内源性抗菌肽 cLEAP-2 的氨基酸序列与其他 42 个物种的 LEAP-2 的氨基酸序列进行系统进化分析,获得系统树。由图 7 可知,鸡(*Gallus gallus*)内源性抗菌肽 cLEAP-2 与日本鹌鹑(*Coturnix japonica*)LEAP-2 的进化关系最近,而与漠林鼠(*Neotoma lepida*)LEAP-2 的进化关系最远。

3 讨论

鸡内源性抗菌肽 LEAP-2 是阳离子性抗菌肽^[6]。本研究通过在线软件分析,发现 cLEAP-2 带 11 个正电荷的氨基酸残基和 2 个负电荷的氨基酸残基,分析其总体带正电荷,认为 cLEAP-2 是阳离子型抗菌肽。

一般认为,抗菌肽的分子量小,没有免疫原性^[7],且免疫学中认为分子量在 10 000 以上的物质有较好的抗原性^[8-9]。cLEAP-2 由 76 个氨基酸残基构成,分子量为 8 835.65 u。然而,分子量虽小,但分子结构复杂的物质也具有抗原性^[8]。抗原表位可由 5~17 个氨基酸残基构成^[10]。经 DNASTar 软件分析,cLEAP-2 可能存在几个抗原表位。因此,cLEAP-2 存在抗原表位可能与其存在三维空间结构有关。但这还需要进一步深入探讨。

分析后发现 cLEAP-2 存在信号肽。这与高荣琨等的研究结果^[11]相一致。信号肽可使新合成的多肽分泌到细胞外,

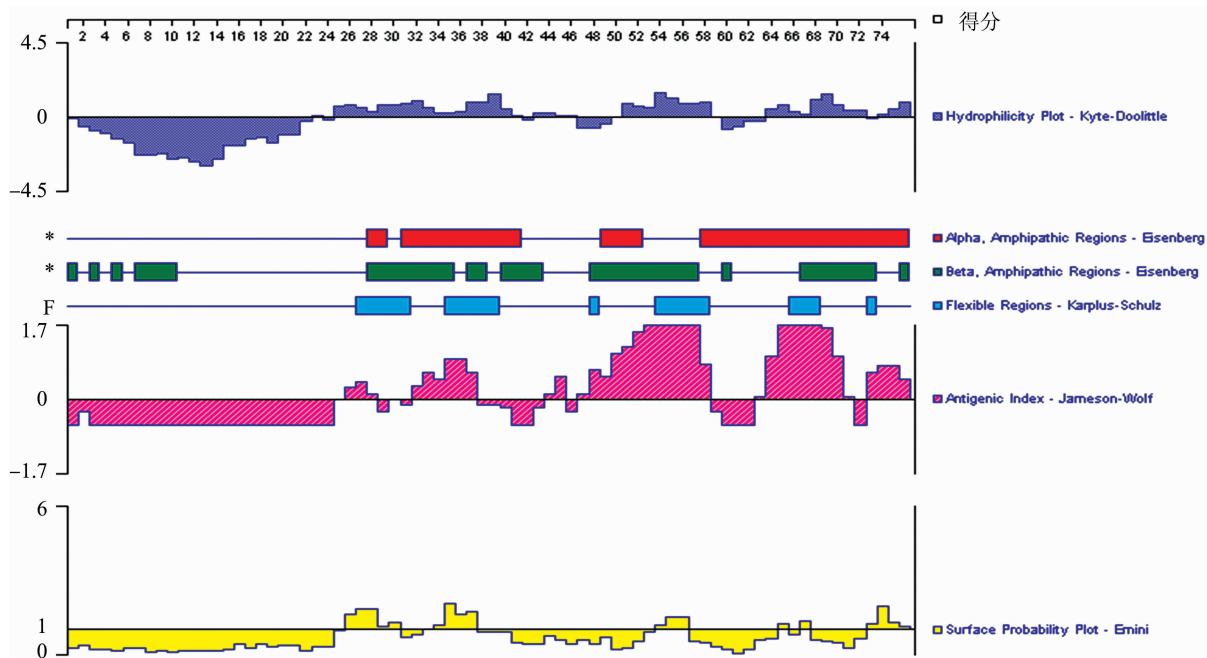


图6 DNASTar 分析结果

从而发挥生理功能^[12]。由此推测,cLEAP-2 表达后,可到达细胞外发挥抗病原微生物等正常生理活性。同时,分析后发现,cLEAP-2 定位于细胞核内,对该定位的生物学作用还有待深入研究。

螺旋结构是抗菌肽发挥抗菌活性的重要结构基础^[13]。经分析,cLEAP-2 的二级结构中存在多个 α 螺旋区及其他结构。可以推测,这些 α 螺旋可能是 cLEAP-2 发挥抗菌作用的结构基础。这一点得到功能结构域预测的佐证。

蛋白的磷酸化和糖基化可以改变蛋白的构象和增加蛋白的稳定性,从而调节蛋白的许多生物学功能^[14-15]。经预测发现,cLEAP-2 有 2 个糖基化位点和 8 个磷酸化位点。同时预测发现 cLEAP-2 是不稳定的疏水蛋白。因此,糖基化和磷酸化可能使 cLEAP-2 变得稳定,从而使得 cLEAP-2 能很好地发挥其功能。

分子进化依赖于核酸和蛋白质的序列信息,是阐明物种间相互关系的分子基础^[16]。通过系统发育树分析发现,鸡源抗菌肽 LEAP-2 与日本鹌鹑的 LEAP-2 之间的关系最近,表明抗菌肽 LEAP-2 在鸡和日本鹌鹑中相对保守。

耐药性或多重耐药性细菌与真菌的出现使得现有抗菌药物的疗效低下或无效,对人类和动物健康的威胁日趋严重^[7,17],寻找新的抗菌物质具有重要意义^[18-19],抗菌肽被认为是理想的抗生素替代物^[17]。鸡体内的抗菌肽类型主要有 β -防御素、cathelicidin 和 LEAP-2^[1],这几种抗菌肽在结构和功能上均有差异。目前,对鸡抗菌肽 LEAP-2 的研究还很少。因此,通过生物软件分析鸡抗菌肽 LEAP-2 的生物信息学内容为深入研究其功能与应用奠定基础。

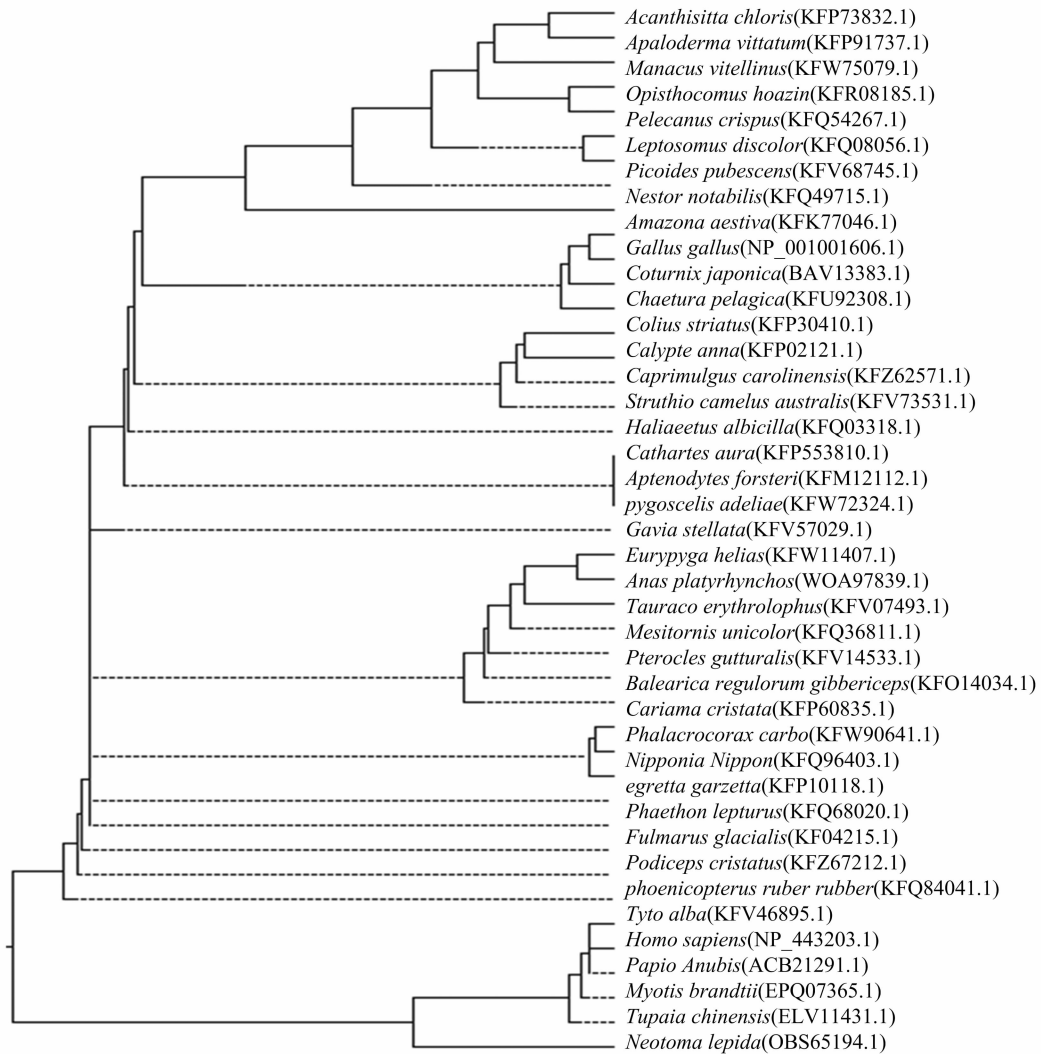
4 结论

本研究结果揭示,鸡内源性抗菌肽 LEAP-2 为不稳定的、带正电荷的疏水性蛋白,有 1 个跨膜区和 1 个信号肽,有 2 个糖基化位点和 8 个磷酸化位点,二级结构主要由 α -螺旋

和无规则卷曲构成,三级结构和功能结构域与人 LEAP-2 有很高的相似度,存在抗原表位,与日本鹌鹑有非常近的进化关系。

参考文献:

- [1] 胡建和,杭柏林,徐彦召,等. 动物源抗菌肽[M]. 北京:科学出版社,2005:76-78.
- [2] Giuliani A, Rinaldi A C. Antimicrobial peptides: methods and protocols[M]. [S.l.]:Humana Press,2010:1-2.
- [3] 陈琛,王新华,薄新文. 绵羊生殖道抗菌肽[J]. 生物化学与生物物理进展,2009,36(11):1483-1489.
- [4] 胡梦红,王有基. 传统抗生素替代物抗菌肽在水产养殖中的应用前景[J]. 北京水产,2007(1):47-49.
- [5] Krause A, Sillard R, Kleemeier B, et al. Isolation and biochemical characterization of LEAP-2, a novel blood peptide expressed in the liver[J]. Protein Science,2003,12(1):143-152.
- [6] Townes C L, Michailidis G, Nile C J, et al. Induction of cationic chicken liver-expressed antimicrobial peptide 2 in response to *Salmonella enterica* infection[J]. Infection and Immunity,2004,72(12):6987-6993.
- [7] 李瑞芳,卢研博,陈士华,等. 动物内源性多肽 CGA-N46 生物信息学分析[J]. 动物医学进展,2013,34(4):43-46.
- [8] 崔治中. 兽医免疫学[M]. 2 版. 北京:中国农业出版社,2015:35-36.
- [9] Day M J, Schultz R D. Veterinary immunology: principles and practice[M]. [S.l.]:Manson Publishing Ltd,2011:19-20.
- [10] 郭于川,左丽. 医学免疫学[M]. 北京:科学出版社,2014:22-25.
- [11] 高荣琨,翟晓西,白秀花,等. 鸡抗菌肽 LEAP-2 基因克隆及序列特征分析[J]. 畜牧与兽医,2013,45(8):85-87.
- [12] 韦雪芳,王冬梅,刘思,等. 信号肽及其在蛋白质表达中的应用[J]. 生物技术通报,2006,22(6):38-42.
- [13] 董天堂,田子罡,王建华. α -螺旋形抗菌肽结构参数与功能活



Acanthisitta chloris—刺鸫, *Apaloderma vittatum*—斑尾非洲咬鹃, *Manacus vitellinus*—金领娇鹀, *Opisthocomus hoazin*—麝雉,

Pelecanus crispus—卷羽鹈鹕, *Leptosomus discolor*—鸚鵡, *Picoides pubescens*—绒啄木鸟, *Nestor notabilis*—啄羊鹈鹕,

Amazona aestiva—青绿顶亚马逊鸚鵡, *Gallus gallus*—原鸡, *Coturnix japonica*—日本鹌鹑, *Chaetura pelagica*—烟囪刺尾雨燕,

Colius striatus—斑鼠鸟, *Calypte anna*—安氏蜂鸟, *Caprimulgus carolinensis*—卡罗琳夜鹰, *Struthio camelus australis*—非洲鸵鸟南非亚种,

Haliaeetus albicilla—白尾海雕, *Cathartes aura*—红头美洲鸢, *Aptenodytes forsteri*—皇帝企鹅, *pygoscelis adeliae*—

阿德利企鹅, *Gavia stellata*—红喉潜鸟, *Eurypyga helias*—日鸚, *Anas platyrhynchos*—绿头鸭, *Tauraco erythrolophus*—红冠

蕉鹀, *Mesitornis unicolor*—褐拟鹀, *Pterocles gutturalis*—黄喉沙鸡, *Balearica regulorum gibbericeps*—灰冠鸛普通亚种,

Cariama cristata—红腿叫鸛, *Phalacrocorax carbo*—普通鸛, *Nipponia nippon*—日本冠鸛, *egretta garzetta*—小白鹭,

Phaethon lepturus—白尾热带鸟, *Fulmarus glacialis*—暴雪鹱, *Podiceps cristatus*—凤头鸛, *phoenicopterus ruber rubber*—加勒比亚火鸟,

Tyto alba—猴面鹰, *Homo sapiens*—人, *Papio Anubis*—东非狒狒, *Myotis brandtii*—布兰德蝙蝠, *Tupaia chinensis*—中国树鼩,

Neotoma lepida—沙漠林鼠

图7 cLEAP-2 的氨基酸序列与其他物种的系统进化树

性的关系[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(9): 116-119.

[14] 章晓联. 蛋白糖基化与免疫[J]. 中国免疫学杂志, 2004, 20(4): 290-293.

[15] 刘东花, 卫阳飞. 牦牛 *HSP66* 基因的生物信息学和表达分析[J]. 华北农学报, 2016, 31(1): 35-39.

[16] 刘振宇, 谢嘉岩, 吴祖建, 等. 孔石莼质体蓝素氨基酸序列分析和分子进化[J]. 分子植物育种, 2005, 3(2): 203-208.

[17] 韩文瑜, 孙长江. 抗菌肽的研究现状与展望[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(10): 11-19.

[18] 裴纪莹, 陈相艳, 吴发萍, 等. 解淀粉芽孢杆菌 NCPSJ7 菌株高产抗菌物质的发酵条件优化[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(1): 311-315.

[19] 吴永继, 宋剑武, 孙燕杰, 等. 穿心莲水提物联合抗菌药对含 *fosA3* 大肠杆菌的作用[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(6): 348-351.