

生物工程

# 黄腐酸对单针藻 *Monoraphidium* sp. FXY-10 油脂积累及 *me*、*pepc*、*accD* 基因表达量的影响

董训赞, 车绕琼, 赵永腾, 李 涛, 徐军伟, 赵 鹏, 余旭亚

(昆明理工大学 生命科学与技术学院, 昆明 650500)

**摘要:**研究了黄腐酸对单针藻 *Monoraphidium* sp. FXY-10 生长、油脂含量、活性氧(ROS)水平及与油脂合成相关基因表达的影响。采用两阶段培养方法(第一阶段异养培养, 第二阶段自养培养), 并添加黄腐酸诱导。结果表明:在 25 mg/L 黄腐酸诱导下, 6 d 时藻细胞中油脂含量可达 54.3%, 是对照组的 1.12 倍, 藻细胞内活性氧水平是对照组的 1.46 倍。此外, 油脂合成相关酶基因与油脂合成存在相关性, 黄腐酸诱导下, *me*、*accD*、*pepc* 基因表达量分别是对照组的 1.32 倍(4 d)、1.67 倍(4 d)及 1.71 倍(6 d)。研究表明, 黄腐酸提高油脂积累可能与活性氧水平及基因表达有关。

**关键词:** *Monoraphidium* sp. FXY-10; 黄腐酸; 油脂; ROS; 基因表达

中图分类号: TK6; Q81

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2018)07-0108-05

## Effects of fulvic acid on lipid accumulation and genes (*me*, *pepc*, *accD*) expression of *Monoraphidium* sp. FXY-10

DONG Xunzan, CHE Raoqiong, ZHAO Yongteng, LI Tao,  
XU Junwei, ZHAO Peng, YU Xuya

(Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

**Abstract:** The effects of fulvic acid on the biomass, lipid content, reactive oxygen(ROS) level and the expression of lipid biosynthesis-related genes of *Monoraphidium* sp. FXY-10 were studied. Two stage culture method(first heterotrophic and then photoautotrophic) was used and fulvic acid was added to induce. The results showed that the lipid content reached 54.3% in algal cells treated with 25 mg/L fulvic acid, which was 1.12 times of the control, and the intracellular ROS level was 1.46 times of the control. Moreover, the lipid biosynthesis-related genes was correlated with the lipid synthesis, and the expressions of *me*, *accD* and *pepc* were 1.32 times(4 d), 1.67 times(4 d) and 1.71 times(6 d) of the control. These results demonstrated that fulvic acid significantly increased microalgae lipid accumulation by changing the ROS level and gene expression.

**Key words:** *Monoraphidium* sp. FXY-10; fulvic acid; lipid; ROS; gene expression

人类利用能源的方式在继木柴向煤炭、煤炭向油气的转换已基本完成之后, 将经历油气向新能源的第三次重大转换<sup>[1]</sup>。化石燃料的过度开发和使用, 造成了严重的能源危机和环境问题。生物柴油

是一种清洁的可再生能源, 是化石能源的良好替代品。利用微藻生产生物柴油具有诸多优势<sup>[2-3]</sup>, 因此受到越来越多国内外学者的关注。

添加外源诱导剂可以影响微藻的生长和油脂的积累。Zhao 等<sup>[4]</sup>的研究表明, 外源添加 5 mmol/L 的甜菜碱可以显著提高微藻中油脂含量。而 10 mg/L 黄腐酸同样可作为植物诱导剂, 促进 *Haematococcus pluvialis* 的生长和虾青素的积累<sup>[5]</sup>。黄腐酸是有机肥的重要组成部分, 含有丰富的营养元素, 能

收稿日期: 2017-09-29; 修回日期: 2018-04-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(21766012, 21666012)

作者简介: 董训赞(1992), 男, 在读硕士, 研究方向为生物质能源(E-mail) xunzandong\_kmust@163.com。

通信作者: 余旭亚, 教授(E-mail) xuya\_yu@163.com。

够提高植物细胞对氮、磷等营养物质的吸收,促进植物的生长和代谢产物的积累<sup>[6]</sup>。同时,黄腐酸还有调节细胞内信号分子的转导、延缓植物的衰老等功能<sup>[7]</sup>。但黄腐酸对微藻生长及油脂合成的影响尚不明确,同时植物激素对微藻在基因水平影响的研究相对较少。从分子水平上研究植物激素对微藻油脂合成的影响,有利于了解植物激素诱导微藻油脂合成的分子机制。

本实验以 *Monoraphidium* sp. FXY-10 为对象,研究了黄腐酸对微藻生物量、油脂含量、活性氧水平及油脂合成相关基因(*me*、*pepc*、*accD*)表达的影响,为促进微藻油脂的工业化生产提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用的单针藻 *Monoraphidium* sp. FXY-10,为昆明理工大学生命科学与技术学院-生物炼制实验组筛选,并保存于 kuh 1 培养基中。

植物激素:黄腐酸,由昆明理工大学生命科学与技术学院-天然产物制药组提供。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 微藻的培养

以 *Monoraphidium* sp. FXY-10 为研究对象,以 kuh 1 培养基(EDTA-2Na:1.029 mg/L; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O:0.695 mg/L; KNO<sub>3</sub>:1.011 mg/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O:85 mg/L; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O:621 mg/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O:246.5 mg/L; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O:1.47 mg/L; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>:0.061 mg/L; ZnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O:0.287 mg/L; MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O:0.17 mg/L; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O:0.002 5 mg/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O:0.012 35 mg/L)作为基础培养基,添加 10 g/L 的葡萄糖,在光照强度 3.5 × 10<sup>3</sup> lx、培养温度(25 ± 1)℃、摇床转速 150 r/min 的条件下异养培养 8 d。将异养培养的藻液接种到 kuh 1 培养基中(接种量为 7 × 10<sup>7</sup> cells/mL),作为对照组;同时,添加黄腐酸(25 mg/L)为诱导组,在光照强度 3.5 × 10<sup>3</sup> lx、培养温度(25 ± 1)℃、摇

床转速 150 r/min 的条件下培养 10 d,每组设置 3 个平行。

#### 1.2.2 生物量与油脂含量的测定

根据藻细胞与吸光度 A<sub>750</sub> 在一定的范围内呈线性关系,得出单针藻 *Monoraphidium* sp. FXY-10 在 750 nm 处的干重与吸光度的关系:  $Y = 0.322 6X - 0.002 5$ ,  $R^2 = 0.999 7$ ,式中:Y 为生物量, g/L; X 为吸光度。

新鲜藻液 12 000 g 离心 5 min, -80℃ 冷冻过夜后,冷冻干燥。干藻粉( $w$ , 0.3 ~ 0.5 g)与石英砂按质量比 1:2 混合研磨,用 3 mL 的氯仿-甲醇溶液(体积比 2:1)清洗,转移至 50 mL 的离心管中,150 r/min 振荡 20 min 后,20℃、8 000 g 离心 5 min,将上清液收集于另一个离心管中。重复上述步骤 2 次,合并 3 次上清液。合并的上清液离心后转移至已称重( $w_1$ )的干燥离心管中,40℃ 烘干至恒重( $w_2$ )。油脂含量计算公式如下:

$$\text{油脂含量} = (w_2 - w_1) / w \times 100\%$$

#### 1.2.3 活性氧(ROS)的测定

利用细胞渗透荧光探针 2',7'-二氯二乙酸酯(DCFH-DA)对活性氧进行测定<sup>[8]</sup>。取 5 mL 新鲜藻液,8 000 g 离心 5 min,弃上清。加入 DCFH-DA (10 mmol/L)溶液重悬,使细胞浓度达到 1 × 10<sup>5</sup> cells/mL,37℃、150 r/min 黑暗染色 30 min,在 12 000 g、4℃ 的条件下离心 5 min,用磷酸缓冲液 PBS(0.05 mol/L, pH 7)洗涤 2 次,除去未进入细胞的 DCFH-DA。加入 2 ~ 3 mL 的 0.1 μmol/L 的 PBS 溶液重悬。用荧光分光光度计测定样品在激发波长 488 nm、发射波长 525 nm 处的荧光强度。

#### 1.2.4 油脂合成相关基因表达分析

本实验由 Primer 5.0 软件设计,上海生工生物工程技术服务有限公司合成 *me*、*pepc*、*accD* 上下游扩增引物(表 1)。扩增所得序列测序(上海生工)后 BLAST 比对,并以此为模板设计荧光定量引物(表 2)。

表 1 基因克隆引物

引物	引物序列(5'-3')	退火温度/℃	扩增片段大小/bp
<i>accD</i> F	GGCGTGATGGAGTTTGG	57	512
<i>accD</i> R	CACCGTAGGGGATGAGGC		
<i>me</i> F	TCGGCGTGAGCACTATCGGTG	57	111
<i>me</i> R	CGGACTGGTTGCTGGGGTTG		
<i>pepc</i> F	CCATCCCCTGGGTGTTTGCC	57	292
<i>pepc</i> R	CGCAGCACCTCCGCCTTTGT		

Trizol 法提取不同质量浓度黄腐酸处理的藻细胞 RNA,利用逆转录试剂盒(TaKaRa)将 RNA 逆转

录合成 cDNA,以其为模板,进行 RT-PCR 扩增,检测不同质量浓度黄腐酸对单针藻 FXY-10 的 *me*,

*pepc*, *accD* 表达的影响。通过 ABI 7500 荧光定量仪对 *me*, *pepc*, *accD* 表达进行定量, RT-PCR 的数据结果用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  的方法处理分析<sup>[9]</sup>。以 18s 基因作为

内标以调节 RNA 的用量和循环数,使内标基因在诱导条件下的表达丰度一致,最终得到基因表达量之间的倍数关系。

表 2 油脂合成相关基因荧光定量引物

酶/基因	简写	引物序列(5'-3')	退火温度/°C	链长/bp
18s RNA	18s RNA	GGGAGTATGCTCGCAAGG	57	242
		GACTATTTAGCAGGCTGAGGT		
Malic enzyme	ME	TCCGGCTGAGCACTATCGGTG	57	110
		CGGACTGGTTGGTGGGGTTG		
Phosphoenolpyruvate carboxylase	PEPC	CCATCCCCTGGGTGTTTGCC	57	292
		CGCAGCACCTCCGCCCTTTGT		
acetyl-CoA carboxylase beta subunit	accD	GGGCGTGATGGAGTTTG	57	213
		AGGTTGGCCTCGTTCTG		

### 1.2.5 统计分析

本文全部实验均设置 3 组平行,利用 ANOVA (SPSS19.0) 一步法分析实验数据。最小显著性差异进行多重比较检验调查不同实验的组间差异,且当  $P < 0.05$  具有显著性意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 黄腐酸诱导对微藻生长的影响

黄腐酸诱导条件下单针藻生长的变化趋势如图 1 所示。由图 1 可知,诱导的前 4 d,生物量基本保持不变,而后开始逐渐增加,培养至 10 d 时,诱导组和对照组的生物量从 1.83 g/L 分别增加了 25.14% (2.29 g/L) 和 24.59% (2.28 g/L)。外源黄腐酸的添加并不影响单针藻 *Monoraphidium* sp. FXY-10 的生长。研究表明,外源添加低浓度的赤霉素诱导,长茎葡萄藻的质量相对增加率和比生长速率与对照组差异不显著<sup>[10]</sup>。而添加  $10^{-3}$   $\mu\text{mol/L}$  的胺鲜酯诱导培养, *Chlorella sorokiniana* 生物量仅为对照组的 30.17%<sup>[11]</sup>。这些结果表明,不同的植物激素对微藻生长的影响可能不同。

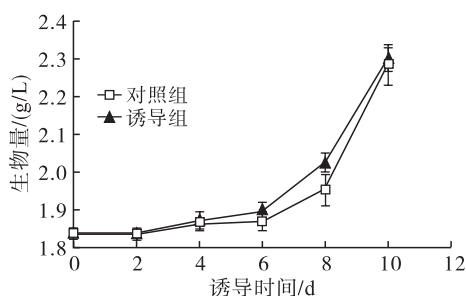


图 1 黄腐酸诱导对微藻生物量的影响

### 2.2 黄腐酸诱导对微藻油脂合成的影响

黄腐酸诱导对单针藻 *Monoraphidium* sp. FXY-10 中油脂含量的影响见图 2。由图 2 可知,对照组中,在 6 d 时微藻的油脂含量增加到 48.4%,而在黄腐酸的作用下,油脂含量最高达到 54.3%,

是对照组的 1.12 倍。诱导培养后期,虽然油脂含量均呈现下降趋势,但显著高于对照组 ( $P < 0.01$ )。生长后期大部分营养耗尽,所剩物质不足以维持细胞内大量积累油脂,因此油脂积累量较低。研究表明,所有的脂肪酸均有不同的抑藻作用<sup>[12]</sup>。黄腐酸诱导的 8~10 d,藻细胞内油脂含量较低,但生物量增长加快(见图 1)。

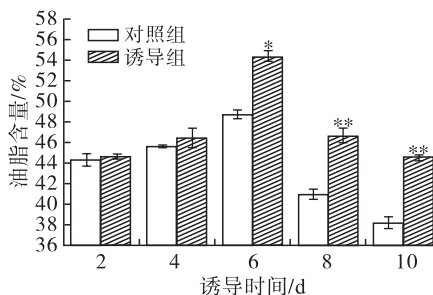


图 2 黄腐酸诱导对微藻油脂含量的影响

### 2.3 黄腐酸诱导对藻细胞内活性氧水平的影响

黄腐酸诱导对藻细胞内活性氧水平的影响见图 3。

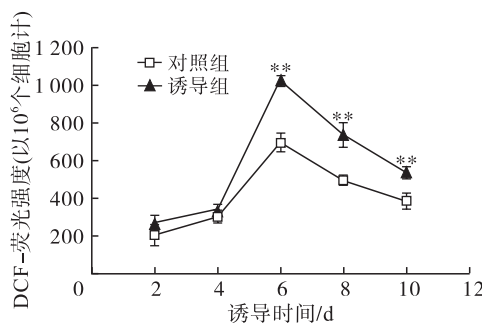


图 3 黄腐酸诱导藻细胞内活性氧水平的影响

由图 3 可知,在自养培养过程中,藻细胞内活性氧水平呈现先升高后降低的趋势。在黄腐酸的诱导下,在 6、8、10 d 时藻细胞内活性氧水平均显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ),分别是对照组的 1.46、1.47、1.38 倍。研究表明,在生物和非生物胁迫刺激下,

活性氧容易形成<sup>[13]</sup>。在植物系统中,活性氧是由细胞内叶绿体、线粒体和细胞膜上的电子传输活动中氧分子上的电子泄露形成的。自养阶段的前4 d,活性氧含量相对较少,可能是由于微藻本身具有防止自由基、活性氧早期形成的非酶机制和清除自由基、活性氧的酶促防御系统<sup>[14]</sup>。本实验研究发现,诱导培养到6 d,活性氧含量显著( $P < 0.01$ )增加,同时油脂含量达到最高(见图2)。诱导后期,藻细胞内的活性氧含量降低,可能主要是由脂质过氧化引起的,对藻细胞起到了保护作用。此外,促进微藻细胞内氧气的利用,有利于降低细胞内活性氧的水平,保护微藻细胞<sup>[15]</sup>。

#### 2.4 黄腐酸诱导对单针藻油脂合成相关基因的影响

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)是植物光合作用、呼吸作用中的关键性酶,催化磷酸烯醇式丙酮酸在体内转化为苹果酸或天冬氨酸。即便是在CO<sub>2</sub>浓度很低的情况下,PEPC也有很强的固定CO<sub>2</sub>的能力。黄腐酸诱导下,*pepc*相对表达量的变化趋势如图4所示。

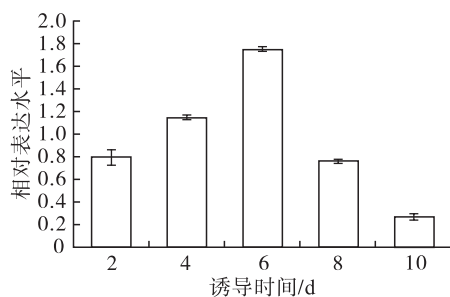


图4 黄腐酸诱导对微藻中*pepc*相对表达量的影响

由图4可知,在黄腐酸的诱导下,诱导时间为4 d和6 d时*pepc*表达量分别比对照组上调至1.14倍和1.71倍。诱导前期,*pepc*相对表达量较高,有利于藻细胞进行CO<sub>2</sub>的固定,进行光合作用,促进微藻的固碳作用。自养后期*pepc*相对表达量下调可以促进植物微生物等物种中甘油三酯的生物合成,有利于油脂的积累。

油脂含量的增加依赖于光合作用中光反应阶段提供的ATP和NADPH<sup>[16]</sup>。苹果酸酶(ME)催化苹果酸发生不可逆的脱羧反应,生成丙酮酸、NADPH和CO<sub>2</sub>,生成的NADPH可用于脂肪酸的合成,CO<sub>2</sub>可以补充光合作用过程中对碳的需求。黄腐酸诱导对*me*相对表达量的影响如图5所示。由图5可知,黄腐酸诱导下,*me*的相对表达量增加,在4 d最高,是对照组的1.32倍,同时进而促进了微藻油脂含量的增加。有研究指出,*me*是产油真菌脂肪酸合成过程中的限速酶<sup>[17]</sup>。氮缺陷可以促进油脂的积累,与

此同时*me*的相对表达量显著提高<sup>[18]</sup>。

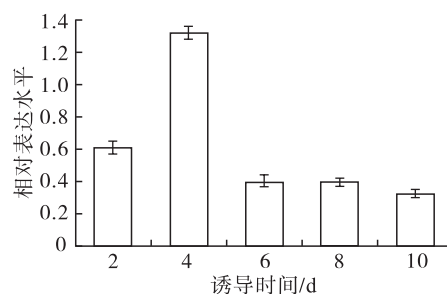


图5 黄腐酸诱导对微藻中*me*相对表达量的影响

乙酰辅酶A羧化酶(*accD*)催化是油脂合成的第一步反应。植物中的*accD*存在两种形式:异质型和同质型。存在于细胞质中的异质型在油脂的合成中起着独到的作用。黄腐酸诱导对微藻中*accD*相对表达量的影响如图6所示。

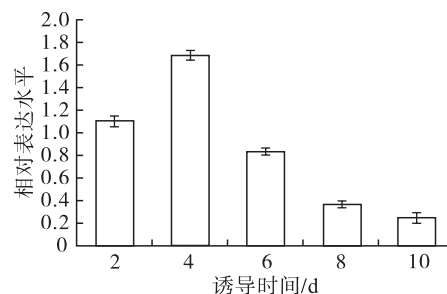


图6 黄腐酸诱导对微藻中*accD*相对表达量的影响

由图6可知,在黄腐酸诱导下*accD*的相对表达量逐渐增加,在4 d时达到最高,是对照组的1.67倍。有研究表明,通过高表达*accD*中的4个亚基的基因,使得*accD*的活性增强,从而使得脂肪酸的合成增加了6倍<sup>[19]</sup>。在兼养条件下,过量表达微藻*Chlorella sorokiniana* CCTCC M209220中的*accD*基因,发现油脂含量增加<sup>[20]</sup>。本实验结果表明,*accD*基因在4 d时相对表达量最高,大幅度刺激了油脂的合成,与图2中油脂含量升高相一致。这与前人的报道,*accD*与油脂的合成呈正相关一致。因此,这些结果进一步表明黄腐酸可以上调油脂合成基因的表达进而促进微藻油脂的积累。

### 3 结论

在添加黄腐酸(25 mg/L)诱导培养条件下,单针藻*Monoraphidium* sp. FXY-10生物量与对照组相比变化不大,但可以促进油脂含量的增加,使藻细胞中油脂含量达到54.3%,是对照组的1.12倍。此外,在黄腐酸诱导过程中,活性氧水平的增加与油脂合成相关基因(*pepc*、*me*、*accD*)表达量的上调,都可以促进微藻油脂的积累。

#### 参考文献:

- [1] 邹才能,赵群,张国生,等. 能源革命:从化石能源到新能源[J]. 天然气工业, 2016, 36(1):1-10.

- [2] STEPHENSON P G, MOORE C M, TERRY M J, et al. Improving photosynthesis for algalbiofuels: toward a green revolution [J]. Trends Biotechnol, 2011, 29(12):615.
- [3] CARIOCA J O, HILUY FILHO J J, LEAL M R, et al. The hard choice for alternative biofuels to diesel in Brazil [J]. Biotechnol Adv, 2009, 27(6):1043 – 1050.
- [4] ZHAO Y, LI D, DING K, et al. Production of biomass and lipids by the oleaginous microalgae *Monoraphidium* sp. QLY – 1 through heterotrophic cultivation and photo – chemical modulator induction [J]. Bioresour Technol, 2016, 211:669 – 676.
- [5] ZHAO Y, SHANG M, XU J W, et al. Enhanced astaxanthin production from a novel strain of *Haematococcus pluvialis*, using fulvic acid [J]. Process Biochem, 2015, 50(12):2072 – 2077.
- [6] PICCOLO A, NARDI S, CONCHERI G. Structural characteristics of humic substances as related to nitrate uptake and growth regulation in plant systems [J]. Soil Biol Biochem, 1992, 24(4):373 – 380.
- [7] AHMAD R, JABEEN N. Demonstration of growth improvement in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by the use of organic fertilizers under saline conditions [J]. Pak J Bot, 2009, 41(3):1373 – 1384.
- [8] HEO S J, KO S C, KANG S M, et al. Cytoprotective effect of fucoxanthin isolated from brown algae *Sargassum siliquastrum*, against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – induced cell damage [J]. Eur Food Res Technol, 2008, 228(1):145 – 151.
- [9] LLIAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real – time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method [J]. Methods, 2001, 25(4):402 – 408.
- [10] 陶翠丽, 袁重桂, 阮成旭, 等. 不同植物激素对长茎葡萄蕨藻生长的影响 [J]. 福州大学学报, 2017, 45(2):291 – 295.
- [11] BABU A G, WU X, KABRA A N, et al. Cultivation of an indigenous *Chlorella sorokiniana*, with phytohormones for biomass and lipid production under N – limitation [J]. Algal Res, 2017, 23:178 – 185.
- [12] 彭桂莹, 陈永玲, 韩玉珍, 等. 乳酸对铜绿微囊藻的抑藻效应及机理 [J]. 中国环境科学, 2016, 36(4):1167 – 1172.
- [13] MALLICK N, MOHN F H. Reactive oxygen species: response of algal cells [J]. J Plant Physiol, 2000, 157(2):183 – 193.
- [14] 杨淑慎, 高俊凤. 活性氧、自由基与植物的衰老 [J]. 西北植物学报, 2001, 21(2):36 – 41.
- [15] CHEN G Q. Lipid and fatty acid composition and their biosyntheses in relation to carotenoid accumulation in the microalgae *Nitzschia laevis* (Bacillariophyceae) and *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) [J]. Biol Sci, 2007, 32(1):1991 – 1998.
- [16] 车绕琼, 黄力, 王琳, 等. 葡萄糖对单针藻异养、兼养生长及油脂合成的影响 [J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(11):46 – 51.
- [17] ZHANG Y, ADAMS I P, RATLEDGE C. Malic enzyme: the controlling activity for lipid production? Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5 – fold increase in lipid accumulation [J]. Microbiology, 2007, 153(7):2013 – 2025.
- [18] IKARAN Z, SUAREZ – ALVAREZ S, URRETA I, et al. The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *Chlorella vulgaris* var L3 [J]. Algal Res, 2015, 10:134 – 144.
- [19] DAVIS M S, SOLBIATI J, CRONAN J E. Overproduction of acetyl – CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli* [J]. J Biol Chem, 2000, 275(37):28593 – 28598.
- [20] 王琳, 余旭亚, 赵鹏, 等. 微藻油脂生物合成与 ACCase、PEPC 相关性的研究进展 [J]. 中国油脂, 2013, 38(2):56 – 60.
- [12] 马晓燕, 吴茂玉, 朱凤涛, 等. 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取功能性油脂的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(13):358 – 362.
- [13] 李冰. 正丁烷亚临界萃取文冠果籽油工艺的响应面优化 [J]. 中国油脂, 2015, 40(2):19 – 23.
- [14] 管晓盛, 车科, 肖苏尧, 等. 正丁烷亚临界萃取茶籽油的工艺研究 [J]. 现代食品科技, 2012, 28(1):56 – 60.
- [15] 张明, 万楚筠, 黄凤洪. 正丁烷亚临界萃取菜籽脱皮低温压榨饼中油脂 [J]. 中国油脂, 2015, 40(5):14 – 17.
- [16] WANG P, ZHANG Q H, WANG Y W, et al. Assessment of Soxhlet extraction, accelerated solvent extraction and microwave – assisted extraction for the determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in soil and fish samples [J]. Anal Chim Acta, 2010, 663(1):43 – 48.
- [17] 张梦, 程露萍, 李昌灵, 等. 三种浸提方法从普通小球藻中提取油脂的比较研究 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(8):245 – 248.
- [18] 方敏, 丁小霞, 李培武, 等. 索氏抽提测定含油量的方法改良及其应用 [J]. 中国油料作物学报, 2012, 34(2):210 – 214.
- [19] 中国营养学会. 中国居民膳食营养素参考摄入量 [M]. 北京:中国轻工业出版社, 2013.
- [20] 李宁, 张宏群, 张征, 等. 济南市成人铜和锰摄入量及血清铜和锰含量参考值范围 [J]. 环境与健康杂志, 2009, 26(1):66 – 67.
- [21] 王涛, 殷建忠, 杨科峰, 等. 矿区成年居民膳食铜、铁和锌的摄入量调查及测定方法比较 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2010, 30(11):1412 – 1415.

(上接第 96 页)