

耐热荧光素酶的表达及热稳定焦磷酸测序体系的建立

徐澍^{1,2}, 邹秉杰¹, 王建平¹, 武海萍², 周国华^{1,2,3}

1 中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京 210009

2 华东医学生物技术研究所, 江苏 南京 210002

3 南京大学医学院临床学院 (南京军区南京总医院) 药理科, 江苏 南京 210093

徐澍, 邹秉杰, 王建平, 等. 耐热荧光素酶的表达及热稳定焦磷酸测序体系的建立. 生物工程学报, 2012, 28(6): 763-771.

Xu S, Zou BJ, Wang JP, et al. Expression of thermostable recombinant *Luciola lateralis* luciferase and development of heat-stable pyrosequencing system. Chin J Biotech, 2012, 28(6): 763-771.

摘要: 焦磷酸测序是一种基于生物发光反应的实时 DNA 序列测定技术, 其反应体系中的荧光素酶决定测序反应的灵敏度。传统焦测序反应使用的是野生型北美荧光素酶 *Photinus pyralis* luciferase (PpL), 该酶热稳定性较差, 因此由该酶配制的焦磷酸测序反应体系对热不稳定, 影响焦磷酸测序的灵敏度。为了建立热稳定的焦磷酸测序反应体系, 全合成了耐热突变日本萤火虫荧光素酶的编码序列, 并将其插入到表达载体 pET28a(+) 中构建重组质粒, 将重组质粒转化到大肠杆菌中, 筛选得到的阳性重组菌成功表达了 N 端带有 6×His (组氨酸) 标签的耐热突变日本萤火虫荧光素酶。利用镍亲和层析法, 纯化得到了分子量约为 60 kDa 且比活为 4.29×10^{10} RLU/mg 的重组蛋白。对重组耐热日本萤火虫荧光素酶的热稳定性研究结果表明, 该酶在 50 °C 时仍具有活性, 在 40 °C 下孵育 25 min 后活性保留了 90% 以上。与基于野生型北美荧光素酶的焦磷酸测序体系相比, 由耐热日本萤火虫荧光素酶配制的测序反应体系对热稳定性有了极大的提高, 该测序反应液在 37 °C 放置 1 h 后仍能够得到正确的测序结果。研究结果为建立稳定可靠的现场及时快速焦磷酸测序反应体系奠定了基础。

关键词: 日本萤火虫荧光素酶, 热稳定性, 焦磷酸测序

Received: October 28, 2011; **Accepted:** February 14, 2012

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 20975113), Key Technology R&D Program of Jiangsu Province (No. BE2010604).

Corresponding author: Guohua Zhou. Tel: +86-25-84514223; E-mail: ghzhou@nju.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 20975113), 江苏省科技支撑计划 (No. BE2010604) 资助。

Expression of thermostable recombinant *Luciola lateralis* luciferase and development of heat-stable pyrosequencing system

Shu Xu^{1,2}, Bingjie Zou¹, Jianping Wang¹, Haiping Wu², and Guohua Zhou^{1,2,3}

¹ School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, Jiangsu, China

² Huadong Research Institution for Medicine and Biotechnics, Nanjing 210002, Jiangsu, China

³ Department of Pharmacology, Jinling Hospital, School of Medicine, Nanjing University, Nanjing 210093, Jiangsu, China

Abstract: Pyrosequencing is a tool based on bioluminescence reaction for real-time analyzing DNA sequences. The sensitivity of pyrosequencing mainly depends on luciferase in reaction mixture. However, the instability of pyrosequencing reagents caused by fragile wild *Photinus pyralis* luciferase (PpL) in conventional pyrosequencing usually leads to unsatisfied results, which limits the application of pyrosequencing. In order to improve the stability of pyrosequencing reagents, the coding sequences of mutant thermostable *Luciola lateralis* luciferase (rt-LIL) was synthesized, and inserted into the plasmid of pET28a(+) to express the thermostable rt-LIL with a 6×His-tag in the N terminal. The purified rt-LIL with the molecular mass of 60 kDa was obtained by Ni-affinity chromatography. The specific activity of rt-LIL was determined as 4.29×10^{10} RLU/mg. Moreover, the thermostability of rt-LIL was investigated, and the results showed that rt-LIL had activity at 50 °C, and remained 90% of activity after incubated at 40 °C for 25 min. Finally, rt-LIL was used to substitute commercial *Photinus pyralis* luciferase in conventional pyrosequencing reagent to get thermostable pyrosequencing reagent. Comparing with conventional pyrosequencing reagent, the thermostable pyrosequencing reagent is more stable, and it's activity would not lose when incubated at 37 °C for 1 h. This study laid foundation of establishing reliable and stable pyrosequencing system which would be applied in Point-of-Care Testing.

Keywords: *Luciola lateralis* luciferase, thermostability, pyrosequencing

焦磷酸测序 (Pyrosequencing) 技术是在 DNA 聚合酶 (DNA polymerase)、三磷酸腺苷硫酸化酶 (ATP sulfurylase)^[1-2]或者丙酮酸磷酸双激酶 (PPDK)^[3]、荧光素酶 (Luciferase)^[4-5]和三磷酸腺苷双磷酸酶 (Apyrase) 协同作用, 以及单链结合蛋白质^[6]的辅助作用下, 实时检测碱基序列的一种分析技术^[7-8]。因其操作简便、定量性能好、可自动化检测, 已被广泛用于基因单核苷酸多态性 (SNP) 分析^[9-10]、病毒与细菌的基因型检测^[11-12]、不同来源基因表达量的差异分析^[13-15],

以及 microRNA 检测^[16]等领域^[17-18]。然而, 在传统的焦磷酸测序反应体系中, 荧光素酶大多为野生型北美萤火虫荧光素酶, 该酶稳定性较差, 在室温条件下很容易失活。通常测定 30 个碱基的序列, 需要在室温条件下进行焦磷酸测序反应 30 min 以上, 这会造成整个焦磷酸测序体系的灵敏度下降, 影响测序结果的重复性和测序长度; 同时也给焦磷酸测序试剂的储存和运输带来了困难。因此, 寻找一种稳定、耐热的荧光素酶替代北美萤火虫荧光素酶很有必要, 有利于焦磷酸测序技术的

推广和应用。

本课题组已于先前表达了经定点突变改造的北美萤火虫荧光素酶^[5], 其热稳定性有了一定提高, 并被成功应用于焦磷酸测序。但是, 该重组北美荧光素酶活性较低, 且在大肠杆菌表达系统中的可溶性较差, 不利于荧光素酶的批量制备。据报道, 野生型日本萤火虫荧光素酶 (*Luciola lateralis* luciferase, LIL) 较野生型北美萤火虫荧光素酶具有更高的活性; 如对该酶进行定点突变, 其热稳定性将进一步提高^[19]。

本研究基于文献中定点突变日本萤火虫荧光素酶热稳定性的初步结果^[19], 依据大肠杆菌密码子偏爱性^[20]设计并全合成了 Ala217Leu 突变的重组耐热日本萤火虫荧光素酶 (Recombinant thermostable *Luciola lateralis* luciferase, 以下简称 rt-LIL) 基因的编码序列, 构建重组质粒并成功表达了 N 端带有 6×His (组氨酸) 标签 rt-LIL。在此基础上将该酶应用于焦磷酸测序反应体系中, 建立了比传统焦磷酸测序体系更加稳定和灵敏的测序体系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器

Ultraschallprozessor 超声细胞破碎仪 (德国 Dr.hielscher); DNA 切胶纯化试剂盒 (大连宝生物); 镍亲和层析柱 (美国 GE Healthcare); GenGenius 凝胶电泳成像仪 (美国 Syngene); BPCL 微弱荧光测定仪 (中国科学院生物物理研究所); Gene Spe III 7A0-0038 型紫外可见分光光度计 (日本 NaKa Instruments); THZ-03M2R 小型冷冻空气浴恒温摇床 (上海申能博彩生物科技有限公司); 电热恒温培养箱 (沈阳利港净化设备有限公司) 等。

度计 (日本 NaKa Instruments); THZ-03M2R 小型冷冻空气浴恒温摇床 (上海申能博彩生物科技有限公司); 电热恒温培养箱 (沈阳利港净化设备有限公司) 等。

1.1.2 试剂

Hind III、*Nde* I 限制性内切酶 (大连宝生物); 腺苷酰硫酸 (APS)、三磷酸腺苷双磷酸酶 (Apyrase)、D-荧光素 (美国 Sigma); 商品荧光素酶 (美国 Promega); α -硫代脱氧三磷酸腺苷 (dATP α S)、脱氧三磷酸鸟苷 (dGTP)、脱氧三磷酸胸苷 (dTTP) 和脱氧三磷酸胞苷 (dCTP) (美国 Amersham Pharmacia Biotech); 原核表达质粒 pET28a(+) (美国 Novagen); Klenow DNA polymerase (exo⁻)与三磷酸腺苷硫酸化酶 (ATP sulfurylase) 为本实验室制备; 宿主菌 ArcticExpress 为本实验室保存; 其他试剂均为分析纯, 所有试剂均用灭菌去离子水配制。

1.2 方法

1.2.1 工程菌的构建及诱导表达

根据荧光素酶的全长编码序列 (GenBank Accession No. X66919.1) 设计待全合成的日本萤火虫荧光素酶基因的编码序列, 将其中编码 Ala 的 217 密码子 GCA 改为编码 Leu 的 CTT, 并在其 5' 和 3' 端分别加上 CAT 和 AAGCTT 以分别获得内切酶 *Nde* I 和 *Hind* III 的酶切识别位点 CATATG 和 AAGCTT, 序列长度 1 656 bp 由上海捷瑞生物工程有限公司合成。双酶切 (*Hind* III/*Nde* I) 后插入到用同样酶消化过的表达质粒 pET28a(+) 中, 构建得到重组质粒 pET28a(+)-LIL, 转化到宿主菌 ArcticExpress, 重

组菌送上海英骏生物有限公司测序筛选阳性克隆。将阳性重组菌接种于 5 mL LB (Kan⁺) 液体培养基中, 37 °C、160 r/min 振荡过夜, 次日按 1% 的接种量接种到 100 mL LB (Kan⁺) 中, 37 °C、160 r/min 振荡培养 3 h 后加入 IPTG (终浓度 0.1 mmol/L), 25 °C、160 r/min 诱导表达过夜。

1.2.2 rt-LIL 的纯化及活性测定

收集诱导表达的菌体, 超声破菌, 离心, 由于重组蛋白含有组氨酸标签, 上清用镍亲和层析纯化, 用 30、50 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱杂蛋白, 300 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱目的蛋白, 将洗脱得到的目的蛋白用截留分子量为 30 000 Da 的超滤离心管进行超滤除盐, 所得产物用 SDS-PAGE 分析。

将商品北美荧光素酶稀释成不同活力浓度 (1 115、2 230、4 460、8 920、17 800 U/ μ L), 分别取 1 μ L 加入到 10 μ L 测活反应液 (0.1 mol/L Tris-HAc, pH 7.75; 0.5 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA); 5 mmol/L Mg(Ac)₂; 0.4 g/L 聚乙烯基吡咯烷酮 (PVP); 0.02% 牛血清白蛋白 (BSA); 1 μ mol/L 二硫苏糖醇 (DTT); 0.4 mmol/L D-荧光素; 1 mmol/L ATP) 中, 混匀后置于 BPCL 微弱发光测定仪测定光信号 (Counts), 制作信号 (Counts) - 酶活力 (Units) 标准曲线。将纯化超滤后的产物在相同条件下测定信号, 根据标准曲线计算酶活, 再根据紫外检测蛋白浓度结果计算比活^[5]。

1.2.3 rt-LIL 的热稳定性考察

将 rt-LIL 分别放置在 25 °C、30 °C、35 °C、

37 °C、40 °C、45 °C、50 °C 水浴中孵育 10 min, 迅速取出放入冰水中冷却 1 min, 取 1 μ L 加入到 10 μ L 测活反应液, 测定其信号强度, 以不经孵育的 rt-LIL 得到的信号为 100%, 计算各温度孵育后的重组酶的相对信号, 以相对信号强度对孵育温度作图, 并与商品北美荧光素酶作对比。另取 rt-LIL, 在 40 °C 水浴中分别放置 0、5、10、15、20、25 min, 迅速取出放入冰水冷却 1 min, 取 1 μ L 加入到 10 μ L 测活反应液测定其信号强度, 以不经孵育的 rt-LIL 得到的信号为 100%, 计算各温度孵育后的 rt-LIL 的相对信号, 以相对信号强度对孵育温度作图, 并与商品北美荧光素酶作对比。

1.2.4 rt-LIL 所在焦磷酸测序体系的稳定性考察

为了验证 rt-LIL 在焦磷酸测序反应中的稳定性, 将 rt-LIL 加入到焦磷酸测序反应液体系 (0.1 mol/L Tris-HAc, pH 7.75; 0.5 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA); 5 mmol/L Mg(Ac)₂; 0.4 mg/mL 聚乙烯基吡咯烷酮 (PVP); 0.02% 牛血清白蛋白 (BSA); 1 μ mol/L 二硫苏糖醇 (DTT); 0.4 mmol/L D-荧光素; 2 μ mol/L 腺嘌呤-5'-磷酸硫酸 (APS); 0.2 U/mL ATP 硫化酶; 90 U/mL Klenow (exo⁻); 22.4 mg/L 荧光素酶; 0.16 U/mL Apyrase) 中, 分别在 37 °C 孵育 0、30、60 min 后, 测定人工合成单链模板 (序列为 AGTTAAGCT ATATAAGA AGCTGAAAAGAGAA, 下划线部分为测定序列) 的碱基序列, 并以传统焦测序反应体系作对照, 在相同条件下测定相同模板。

2 结果

2.1 rt-LIL 的诱导表达

将筛选得到的阳性重组菌进行诱导表达,产物进行 SDS-PAGE 分析,并与含有表达载体 pET28a(+)的对照菌进行对比,结果如图 1 所示。与无目的序列的对照菌的破菌上清与总蛋白(图 1 中的泳道 3、4)相比,阳性重组菌的破菌上清与总蛋白中均可观察到分子量约为 60 kDa 的重组蛋白条带(图 1 中的泳道 1、2),该重组蛋白的分子量与重组日本萤火虫荧光素酶的分子量相符,初步判定该条带即为 rt-LIL。虽然破菌上清中的目的蛋白(图 1 中泳道 1)没有总蛋白中的目的蛋白(图 1 中泳道 2)含量高,但其所占比例与总蛋白中目的蛋白所占比例相当,说明 rt-LIL 大部分以可溶形式表达,能够方便地通过镍亲和层析的方式纯化。

2.2 rt-LIL 的纯化及活性测定

将细胞破碎液上清进行镍亲和层析纯化,用 30、50 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱杂蛋白,300 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱目的蛋白,再将洗脱产物超滤浓缩除盐,最后采用 SDS-PAGE 分析纯化后的重组酶,如图 2 所示,结果表明经镍亲和层析纯化后的重组耐热荧光素酶纯度较高。以市售北美荧光素酶作为标准品,测定信号强度-活力单位标准曲线,根据该标准曲线及紫外测定的蛋白浓度计算出重组耐热荧光素酶的比活为 4.29×10^{10} RLU/mg,比市售北美荧光素酶的比活(3.9×10^{10} RLU/mg)高,说明 rt-LIL 可以替代传统焦测序反应体系中的荧光素酶。

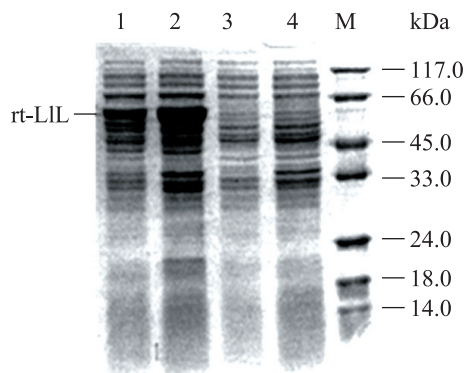


图 1 重组日本萤火虫荧光素酶的蛋白电泳

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of recombinant thermostable *Luciola lateralis* luciferase(rt-LIL). 1: supernatant of the lysate of ArcticExpress transformed with pET28a(+)-LIL after induced; 2: total protein of the ArcticExpress transformed with pET28a(+)-LIL after induced; 3: supernatant of the lysate of ArcticExpress transformed with pET28a(+) after induced; 4: total protein of the ArcticExpress transformed with pET28a(+) after induced; M: protein marker.

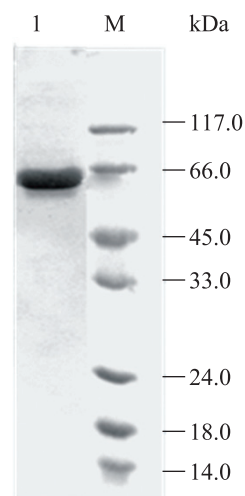


图 2 纯化产物的蛋白电泳

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of purified recombinant thermostable *Luciola lateralis* luciferase. M: protein marker; 1: purified rt-LIL.

2.3 rt-LIL 的热稳定性

为了考察 rt-LIL 的热稳定性,将重组酶在不同温度的水浴中孵育 10 min,然后测定其活性变化,以及将重组酶在 40 °C 水浴中放置不同时间后,再测定其活性变化,同时与商品北美荧光素酶作比较,结果如图 3 所示。从图 3 中可以看到,市售商品化北美荧光素酶在高于 37 °C 的环境中活性迅速下降,在 40 °C 孵育时,随孵育时间的延长,活性急剧下降,5 min 时相对活性已下降到 30% 以下,10 min 后活性降到 10% 以下,20 min 后几乎检测不到活性;而 rt-LIL 在 37~45 °C 环境中活性下降小于 30%,在 40 °C 水浴中孵育 25 min 活性依然保留 90%。以上结果表明,重组耐热荧光素酶较商品北美荧光素酶具有更好的热稳定性,这为提高焦磷酸测序反应体系的稳定性奠定了基础。

2.4 使用 rt-LIL 的焦磷酸测序体系的热稳定性

为了建立相对传统焦测序反应体系更加稳定灵敏的测序反应体系,分别采用上述成功表达的热稳定重组日本萤火虫荧光素酶和北美荧光素酶进行焦磷酸测序反应,并在测序反应前将该体系置于 37 °C 条件下分别孵育 0、30、60 min,然后在 37 °C 条件下测序,其序列测定结果如图 4 所示,结果表明传统焦磷酸测序体系在 37 °C 孵育 30 min 后,测序信号强度下降了 80% 以上(图 4A-B),孵育 60 min 后,几乎测不到信号(图 4A-C);而应用重组耐热日本萤火虫荧光素酶的焦磷酸测序体系在 37 °C 孵育 60 min,其测序信号强度基本保持不变(图 4D-F)。这一结果表明重组耐热荧光素酶可以显著提高焦磷酸测序反应体系的稳定性。

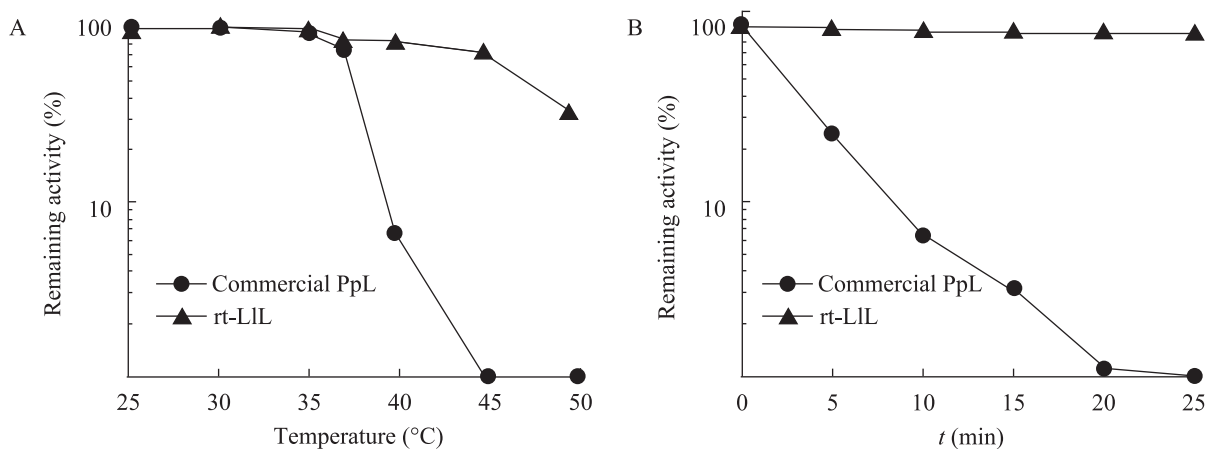


图 3 自表达重组荧光素酶与商品化荧光素酶的耐热性比较

Fig. 3 Comparison of thermostability between home-made rt-LIL and Promega-*Photinus pyralis* luciferase. (A) Remaining activity of rt-LIL and commercial *Photinus pyralis* luciferase after incubated at various temperatures for 10 min, respectively. (B) Remaining activity of rt-LIL and commercial *Photinus pyralis* luciferase after incubated at 40 °C for different time, respectively.

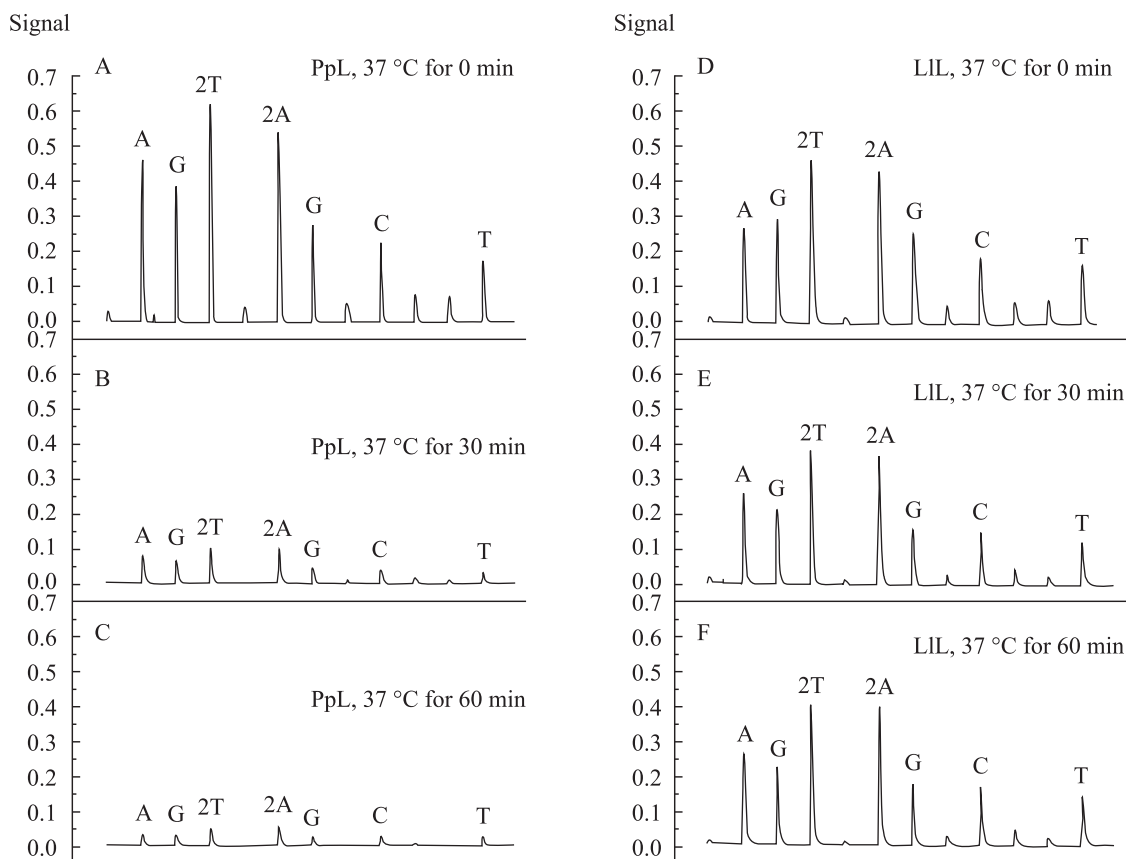


图4 使用自表达重组荧光素酶的焦磷酸测序反应与使用传统试剂的焦磷酸测序反应在 37 °C 条件下的测序结果比较

Fig.4 Programs of artificial single-strand DNA template by using conventional pyrosequencing reagent and the rt-LIL contained pyrosequencing reagent incubating at 37 °C for different time. The order of dNTPS dispensing is C-A-G-T. (A) Conventional pyrosequencing reagent incubated in 37 °C for 0 min. (B) Conventional pyrosequencing reagent incubated in 37 °C for 30 min. (C) Conventional pyrosequencing reagent incubated in 37 °C for 60 min. (D) rt-LIL contained pyrosequencing reagent incubated at 37 °C for 0 min. (E) rt-LIL contained pyrosequencing reagent incubated at 37 °C for 30 min. (F) rt-LIL contained pyrosequencing reagent incubated at 37 °C for 60 min.

3 讨论

为了建立稳定灵敏的焦磷酸测序反应体系，克隆表达了突变型日本萤火虫荧光素酶，其对热稳定性显著优于野生型北美荧光素酶，该酶在 40 °C 环境中放置 25 min 后活性保留 90% 以上。焦磷酸测序结果表明重组耐热荧光素酶可以代

替野生型北美荧光素酶，并且与传统焦测序反应体系相比，稳定性有了显著提高，测序反应液在 37 °C 的条件下放置 1 h 后其灵敏度基本不变。

对热稳定的反应试剂对于焦磷酸测序方法的推广应用十分重要，在传统焦磷酸测序反应体系中，野生型荧光素酶的对热稳定性差，会导致焦磷酸测序反应试剂的灵敏度下降，所以商品化

焦测序试剂要求在 28 °C 的条件下反应, 并且一旦配制后必须尽快使用, 这一要求难以使焦测序试剂在野外高温的环境中使用。本课题组成功研制了便携式小型焦测序仪^[14], 可用于现场快速筛查病原微生物 (如禽流感病毒^[11]), 该仪器就必须配套使用由突变型日本萤火虫荧光素酶配制的焦测序反应液。焦磷酸测序技术是现场及时检测 (POCT) 的一种重要工具, 本研究结果使焦测序对运行环境和使用条件的要求极大降低, 可在高温环境中完成焦测序反应, 从而拓宽了焦测序技术的应用领域。

REFERENCES

- [1] Luo J, Wu WJ, Zou BJ, et al. Expression and purification of ATP sulfurylase from *Saccharomyces cerevisias* in *Escherichia coli* and its application in pyrosequencing. *Chin J Biotech*, 2007, 23(4): 623–627.
罗娟, 吴文娟, 邹秉杰, 等. 酿酒酵母 ATP-硫酸化酶在大肠杆菌中的表达纯化及其在焦测序中的应用. *生物工程学报*, 2007, 23(4): 623–627.
- [2] Zou BJ, Luo J, Wu HP, et al. Expression, immobilization and application of biotinylated ATP sulfurylase. *Prog Biochem Biophys*, 2009, 36(7): 923–928.
邹秉杰, 罗娟, 武海萍, 等. 生物素化 ATP 硫酸化酶的表达、固定化与应用. *生物化学与生物物理进展*, 2009, 36(7): 923–928.
- [3] Zou BJ, Chen ZY, Zhou GH. Expression of PPK from *Microbispora rosea* subsp. *aerata* in *Escherichia coli* and its application in pyrosequencing. *Chin J Biotech*, 2008, 24(4): 679–683.
邹秉杰, 陈之遥, 周国华. 热玫瑰小双孢菌来源的丙酮酸磷酸双激酶的表达及应用. *生物工程学报*, 2008, 24(4): 679–683.
- [4] Rong JJ, Cheng ZY, Zhou GH. Immobilization of luciferase by cloning and expression of biotinylated luciferase. *J Chin Biotechnol*, 2007, 27(9): 41–46.
戎晶晶, 陈之遥, 周国华. 生物素化荧光素酶的克隆表达及其固定化研究. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(9): 41–46.
- [5] Zhu SH, Zou BJ, Wu HP, et al. Preparation of thermostable biotinlyted firefly luciferase and its application to pyrosequencing. *Chinese J Anal Chem*, 2010, 38(4): 458–463.
朱术会, 邹秉杰, 武海萍, 等. 热稳定生物素化荧光素酶的制备及其在焦测序中的应用. *分析化学*, 2010, 38(4): 458–463.
- [6] Wang JP, Zou BJ, Chen ZY, et al. Characterization of recombinant single-stranded DNA-binding protein from *Escherichia coli* and its application in accurate pyrosequencing. *Chin J Biotech*, 2011, 27(10): 1513–1520.
王建平, 邹秉杰, 陈之遥, 等. 重组大肠杆菌单链结合蛋白性质表征及其在提高焦磷酸测序准确性中的应用. *生物工程学报*, 2011, 27(10): 1513–1520.
- [7] Zhou GH, Kajiyama T, Gotou M, et al. Enzyme system for improving the detection limit in pyrosequencing. *Anal Chem*, 2006, 78(13): 4482–4489.
- [8] Wu HP, Wu WJ, Chen ZY, et al. Highly sensitive pyrosequencing based on the capture of free adenosine 5' phosphosulfate with adenosine triphosphate sulfurylase. *Anal Chem*, 2011, 83(9): 3600–3605.
- [9] Huang H, Wu HP, Xiao PF, et al. Single-nucleotide polymorphism typing based on pyrosequencing chemistry and acryl-modified glass chip. *Electrophoresis*, 2009, 30(6): 991–998.
- [10] Zhou ZY, Poe AC, Limor J, et al. Pyrosequencing, a high-throughput method for detecting single nucleotide polymorphisms in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes of *Plasmodium falciparum*. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(11): 3900–3910.
- [11] Wang WP, Wu HP, Zhou GH. Detection of avian influenza A Virus using Pyrosequencing. *Chinese J Anal Chem*, 2008, 36(6): 775–780.
汪维鹏, 武海萍, 周国华. 焦测序法检测禽流感

- 病毒. 分析化学, 2008, 36(6): 775–780.
- [12] Yang HY, Xi T, Liang C, et al. Preparation of single-stranded DNA template for Pyrosequencing by linear-after-the-exponential-polymerase chain reaction. *Chinese J Anal Chem*, 2009, 37(4): 489–494.
杨会勇, 奚涛, 梁超, 等. 指数线性聚合酶链式反应法制备焦磷酸测序反应的单链模板. *分析化学*, 2009, 37(4): 489–494.
- [13] Zhang XD, Wu HP, Chen ZY, et al. Dye-free gene expression detection by sequence-tagged reverse-transcription polymerase chain reaction coupled with pyrosequencing. *Anal Chem*, 2009, 81(1): 273–281.
- [14] Song QX, Jing H, Wu HP, et al. Gene expression analysis on a photodiode array-based bioluminescence analyzer by using sensitivity-improved SRPP. *Analyst*, 2010, 135(6): 1315–1319.
- [15] Song QX, Wu HP, Feng F, et al. Pyrosequencing on nicked dsDNA generated by nicking endonucleases. *Anal Chem*, 2010, 82(5): 2074–2081.
- [16] Jing H, Song QX, Chen ZY, et al. Dye-free microRNA quantification by using pyrosequencing with a sequence-tagged stem-loop RT primer. *ChemBioChem*, 2011, 12(6): 845–849.
- [17] Jia HN, Chen ZY, Wu HP, et al. Pyrosequencing on templates generated by asymmetric nucleic acid sequence-based amplification (asymmetric-NASBA). *Analyst*, 2011, 136(24): 5229–5233.
- [18] Chen ZY, Fu XY, Zhang XD, et al. Pyrosequencing-based barcodes for a dye-free multiplex bioassay. *Chem Commun*, 2012, 48(18): 2445–2447.
- [19] Kajiyama N, Nakano E. Enhancement of thermostability of firefly luciferase from *Luciola lateralis* by a single amino acid substitution. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, 58(6): 1170–1171.
- [20] Tatsumi H, Kajiyama N, Nakano E. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a cDNA clone encoding luciferase of a firefly, *Luciola lateralis*. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1131(2): 161–165.