

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2023.05.020

拟南芥 GOX1 基因的克隆和表达分析

田蜜蜜, 穆秀杰, 张瑞含, 韩毅

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要:乙醇酸氧化酶 1(glycolate oxidase 1, GOX1)是拟南芥光呼吸过程中的关键酶之一,可将乙醇酸氧化为乙醛酸和过氧化氢。文章以野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) Columbia(Col-0)为研究材料,通过反转录(reverse transcription, RT)和聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术获得 GOX1 基因 1 104 bp 的 CDS 序列,运用生物信息学技术初步分析其基因功能,并构建带有 His 标签的 PET28a(+)-GOX1 原核表达载体,转化至大肠杆菌感受态 BL21 中,采用 SDS-PAGE 电泳检测诱导表达后的蛋白产物。GOX1 基因编码 367 个氨基酸,相对分子质量为 40 341.48,理论等电点为 9.16,属于亲水性蛋白,定位于过氧化物酶体。SDS-PAGE 在 40 kDa 处检测到目的条带,与理论值预测一致。通过对 GOX1 基因的表达分析,为进一步探究蛋白功能和调控机制奠定了基础。

关键词:乙醇酸氧化酶 1(GOX1);基因克隆;生物信息学分析;原核表达

中图分类号:Q786

文献标志码:A

文章编号:1003-5060(2023)05-0698-06

Cloning and expression analysis of GOX1 gene in *Arabidopsis thaliana*

TIAN Mimi, MU Xiujie, ZHANG Ruihan, HAN Yi

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: Glycolate oxidase 1(GOX1) is one of the key enzymes in the photorespiration process of *Arabidopsis thaliana*, which can oxidize glycolic acid to glyoxylic acid and hydrogen peroxide. In this paper, wild-type *Arabidopsis thaliana* Columbia(Col-0) was used as the research material. The 1 104 bp CDS sequence of GOX1 gene was obtained by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) technology, its gene function was analyzed preliminarily using bioinformatics technology, PET28a(+)-GOX1 prokaryotic expression vector with His tag was transformed into *E. coli* competent BL21, and SDS-PAGE electrophoresis was used to detect the protein product after induced expression. The GOX1 gene encodes 367 amino acids, the relative molecular mass is 40 341.48, and the theoretical isoelectric point is 9.16. It is a hydrophilic protein and is located in peroxisomes. SDS-PAGE detected the band of interest at 40 kDa, which was consistent with the theoretical prediction. Through the analysis of GOX1 gene expression, it has laid the foundation for further exploration of protein function and regulation mechanism.

Key words: glycolate oxidase 1(GOX1); gene cloning; bioinformatics analysis; prokaryotic expression

光合作用是绿色植物吸收光能将二氧化碳和水转化为有机物同时释放氧气的过程。光合作用为植物的生长发育提供物质和能量^[1]。光呼吸作用伴随着光合作用同时进行,是绿色植物在光照

条件下消耗氧气同时释放二氧化碳的过程^[2]。研究表明,光呼吸和光合作用不仅在代谢途径上彼此相关,在代谢调节上也相互制约^[3]。光呼吸作用始于核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶(Ribu-

收稿日期:2021-03-16;修回日期:2021-04-30

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31300225)

作者简介:田蜜蜜(1995—),女,安徽安庆人,合肥工业大学硕士生;

韩毅(1982—),男,安徽马鞍山人,博士,合肥工业大学教授,硕士生导师。

lose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco)所催化的反应^[4]。在叶绿体内,Rubisco催化的加氧反应产生1分子的2-磷酸乙醇酸和3-磷酸甘油酸,2-磷酸乙醇酸在2-磷酸乙醇酸磷酸酶催化作用下,去磷酸化生成乙醇酸^[5]。乙醇酸在乙醇酸甘油酸转运体和胆汁酸钠同向转运体的作用下运输到细胞质,然后通过未知的孔蛋白或通道进入过氧化物酶体^[6]。在过氧化物酶体中,乙醇酸氧化酶(glycolate oxidase,GOX)催化乙醇酸生成乙醛酸并产生过氧化氢^[7]。GOX是植物光呼吸过程中的关键酶之一,不仅在光呼吸过程中发挥了重要的作用,还参与到植物的各种胁迫响应过程中,并且其活性也受到多种胁迫的诱导。例如豌豆在干旱胁迫条件下其GOX活性显著上调^[8];病原菌入侵的条件下,大麦的GOX活性也大幅上升^[9]。此外,GOX催化乙醇酸产生的过氧化氢参与到植物的胁迫响应过程中,从而激活一系列的下游防御反应^[10]。

拟南芥GOX基因家族中有GOX1(At3g14420)、GOX2(At3g14415)、GOX3(At4g18360)、HAOX1(At3g14130)和HAOX2(At3g14150)5个成员^[11]。相对于其他4个成员而言,缺乏GOX1的拟南芥体内表现出更高水平的乙醇酸的积累,表明GOX1是代谢乙醇酸并产生过氧化氢的主要异构体,并且在光呼吸进程中起主要的作用^[12]。因此GOX1对于研究植物抵抗逆境胁迫机制有重要意义。本研究从野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)Columbia(Col-0)中克隆GOX1基因并对其进行生物信息学分析,为探索该基因的蛋白功能提供了理论依据,为进一步研究其抗逆机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

野生型拟南芥、原核表达载体PET28a(+),大肠杆菌DH5 α 克隆菌株、大肠杆菌BL21表达菌株均由本实验室保存。

1.1.2 实验试剂与仪器

反转录酶、dNTP聚合物、限制性内切酶(*Nhe*I、*Hind*III)、Taq酶、T₄DNA连接酶、咪唑(C₃H₄N₂)、His标签镍柱、质粒提取试剂盒、切胶纯化试剂盒、琼脂粉、酵母提取物、胰蛋白酶、卡纳霉素(Kana,使用终质量浓度为50 μ g/mL)。

主要仪器有聚合酶链式反应(polymerase

chain reaction,PCR)仪、凝胶成像仪器分析系统、电泳仪、高温高压灭菌锅、恒温培养箱、超净工作台、真空泵等恒温培养振荡器、紫外分光光度计、冷柜等。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析

用ExpASy-ProtParam工具(<https://web.expasy.org/protparam/>)在线软件对GOX1基因编码的氨基酸进行基本理化性质的分析;采用ProtScale在线工具(<https://web.expasy.org/protscale/>)对GOX1蛋白进行亲/疏水性分析;采用PSORT Prediction(<http://psort1.hgc.jp/form.html>)在线软件分析GOX1蛋白的亚细胞定位;采用NetPhos3.1Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)在线软件对GOX1蛋白进行磷酸化位点分析;利用NCBI数据库BLUST工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析GOX1蛋白的保守功能结构域;采用NPS@:SOPMA secondary structure prediction和SWISS-MODEL预测GOX1蛋白的二级结构和三级结构。

1.2.2 引物设计与合成

从tair网站搜索目的基因GOX1的CDS序列(GOX1的基因登录号为AT3G14420),再使用Primer5.0设计引物。上游引物GOX1-F:5'-CATGCTAGCATGGAGATCACTAACGTTACCGA-3'(下划线部分为*Nhe*I酶切位点);下游引物GOX1-R:5'-CCCAAGCTTCTATAACCTGGCTGAAGGACGT-3'(下划线部分为*Hind*III酶切位点)。

1.2.3 总RNA的提取和反转录cDNA

采用Trizol法对总RNA进行提取,利用反转录(reverse transcription,RT)得到cDNA,反应体系(10 μ L)如下:2 μ L 5 \times PrimeScript RT Mix;2 μ g Total RNA;RNase Free ddH₂O补齐至10 μ L。反应条件为:25 $^{\circ}$ C、10 min;42 $^{\circ}$ C、30 min;85 $^{\circ}$ C、5 min;4 $^{\circ}$ C、3 min。

1.2.4 GOX1基因的扩增和纯化

以拟南芥cDNA为模板,扩增GOX1基因的CDS序列。PCR(50 μ L)反应体系如下:5.0 μ L 10 \times buffer;4.0 μ L dNTP;2.0 μ L GOX1-F;2.0 μ L GOX1-R;0.6 μ L Taq酶;2.0 μ L Template DNA;34.4 μ L ddH₂O。

PCR反应条件为:94 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸1 min,30个

循环;72 °C 延伸 10 min。

使用普通 DNA 产物纯化试剂盒按步骤纯化目的基因扩增产物。

1.2.5 重组载体的构建和转化

利用 *Nhe* I、*Hind* III 限制性内切酶双酶切载体质粒和目的基因扩增产物,胶回收酶切后的基因片段和载体片段,使用 T4 连接酶 16 °C 中过夜连接。连接体系(10 μ L)如下:2 μ L 5 \times buffer; 1 μ L T4 DNA 连接酶;2 μ L 双酶切纯化 GOX1 基因片段;4 μ L 双酶切 PET28a(+)载体片段;1 μ L ddH₂O。

将连接后的产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,用卡纳霉素琼脂平板筛选阳性克隆,37 °C 过夜培养。挑选阳性克隆进行 PCR 和双酶切(*Nhe* I/*Hind* III)鉴定,结果为阳性重组质粒,送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序正确后,将重组载体命名为 PET28a(+)-GOX1。将重组载体 PET28a(+)-GOX1 转化至 BL21 感受态细胞,随机挑选单克隆进行 PCR 鉴定,确认阳性菌落。

1.2.6 目的蛋白的诱导表达及纯化

将转化大肠杆菌 BL21 的阳性单菌落接种在 4 只含有 50 μ g/mL Kana 的 400 mL 液体培养基中,在 200 r/min、37 °C 的条件下摇至菌的 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 即可,在每只锥形瓶中加入 IPTG 120 μ L(终浓度 0.2 mmol/L),20 °C 的条件下表达 16~24 h。

采用 solution1(0.3 mol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl,pH 值为 7.6)重悬菌液沉淀,破细胞 30 min,收集上清真空抽滤,用镍柱纯化诱导蛋白。分别用 solution1、solution2(20 mmol/L Tris-HCl,0.3 mol/L NaCl,50 mmol/L 咪唑,pH 值为

7.6)洗脱杂蛋白,然后用 solution3(20 mmol/L Tris-HCl,0.3 mol/L NaCl,0.3 mol/L 咪唑,pH 值为 7.6)洗脱目的蛋白。利用透析法除去咪唑,将 GOX1 蛋白保存在-80 °C 备用。

1.2.7 目的蛋白质量浓度和酶活的检测

以牛血清蛋白为标准蛋白制作标准曲线,将目的蛋白稀释合适的倍数后,使用紫外分光光度计在 595 nm 波长下测吸光度,再计算蛋白质量浓度。乙醇酸氧化酶催化乙醇酸氧化成乙醛酸,生成的乙醛酸与苯肼反应生成苯腙。苯腙在 324 nm 处有强烈的吸收,使用紫外分光光度计测定样品在 324 nm 处吸光度的变化,测定时间^[11]为 5 min。

2 结果与分析

2.1 GOX1 基因的基本理化性质分析

GOX1 基因编码一条含 367 个氨基酸的肽链,分子式为 C₁₇₉₅ H₂₈₉₃ N₅₀₁ O₅₂₉ S₁₂,相对分子质量为 40 341.48,理论等电点为 9.16,脂溶性指数为 94.14。该蛋白的不稳定参数为 34.03,属于稳定性蛋白(小于 40 为稳定)。在氨基酸残基的组成上,丙氨酸(Ala)占比最高,达到 11.2%。使用 NCBI Conserved Domain 软件对 GOX1 蛋白进行保守结构域分析,结果如图 1a 所示。由图 1a 可知,该蛋白属于 PLN02493 超级家族。采用 ExPASy-ProtScale 对亲疏水性进行分析,结果如图 1b 所示,由图 1b 可知,GOX1 蛋白为亲水性蛋白。对 GOX1 蛋白进行磷酸化位点预测分析,结果如图 1c 所示,由图 1c 可知,该蛋白含有 31 个磷酸化位点,分别为 14 个丝氨酸(Ser)、12 个苏氨酸(Thr)、5 个酪氨酸(Tyr)。

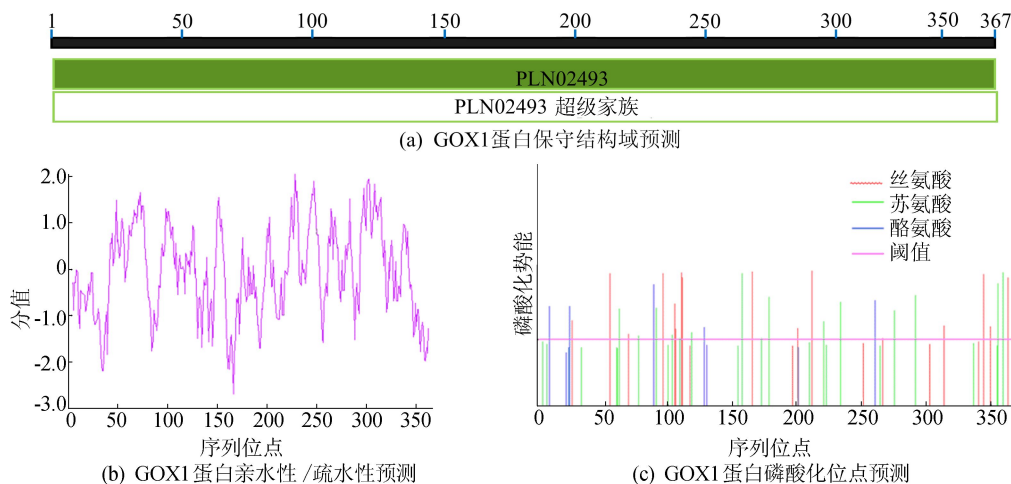
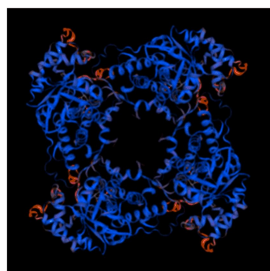
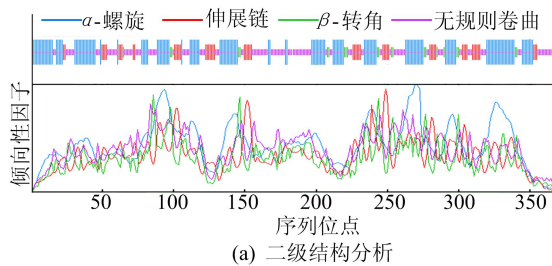


图 1 GOX1 蛋白一级结构理化性质分析

2.2 二级结构和三级结构预测

GOX1 蛋白的二级结构运用 SOPMA 在线软件进行分析,如图 2a 所示。由图 2a 可知,该蛋白的二级结构元件包括 α -螺旋(41.14%)、无规则卷曲(37.06%)、伸展链(15.80%)和 β 转角(5.99%), α -螺旋和无规则卷曲为该蛋白二级结构的主要元件。运用 SWISS-MODEL 建模软件对 GOX1 蛋白三级结构进行预测分析,模型是以同源建模的方式模拟而出,是在二级结构基础上盘绕、折叠产生的特定空间结构,如图 2b 所示。



(a) 二级结构分析
(b) 三级结构分析
图 2 GOX1 蛋白二级、三级结构分析

2.3 GOX1 的 PCR 扩增分析

以拟南芥野生型 CDS 为模板,以 GOX1-F 和 GOX1-R 为引物进行扩增,核酸琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 3 所示。

从图 3 可以看出,扩增产物有一条特异性带,与拟南芥 GOX1 基因的大小相符(GOX1 大小为 1 104 bp)。

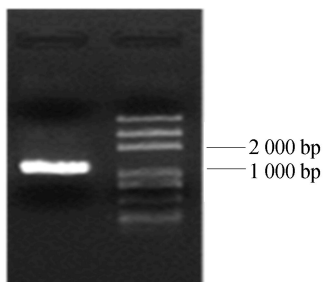


图 3 PCR 扩增 GOX1 基因片段核酸琼脂糖凝胶电泳图

2.4 PET28a(+)-GOX1 原核表达载体的鉴定

提取阳性菌落质粒进行测序,结果显示质粒

中连接的目的基因与 GOX1 基因片段完全相符,未发生任何突变,将送去测序的菌落进行扩播,提取质粒并转入表达菌株 BL21,挑取单克隆进行菌落鉴定。利用 Primer 5 软件在 PET28a(+)载体上设计引物 PET28a(+)-F(TAGTTATTGCT-CAGCGGTGG) 和 PET28a(+)-R(TCAT-GAGCGCTTGTTCGGC),利用 PCR 扩增确认 GOX1 与载体是否成功连接,其电泳图如图 4 所示,从图 4 可以看出,条带在 1 00~2 000 bp 中间的位置,与实际大小 1 500 bp 相符,选取含目的基因的单克隆作为诱导菌种。

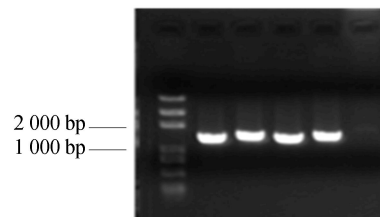


图 4 菌落 PET28a(+)-GOX1/BL21 PCR 电泳图

2.5 GOX1 蛋白的诱导及纯化

在 22 °C 条件下,0.2 mmol/L IPTG 诱导 12~16 h,诱导后的蛋白 SDS-PAGE 电泳检测结果如图 5 所示。图 5 中:M 代表 Marker;泳道 1 代表 PET28a(+)空载;泳道 2 代表 PET28a(+)-GOX1 诱导前蛋白表达情况;泳道 3 代表 PET28a(+)-GOX1 诱导后蛋白表达情况;泳道 4 代表 PET28a(+)-GOX1 诱导后经破细胞处理后的上清;泳道 5 代表 PET28a(+)-GOX1 诱导后经破细胞处理后的沉淀。

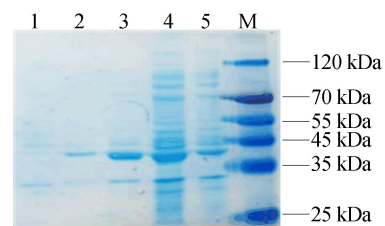


图 5 GOX1 蛋白诱导后的 SDS-PAGE 电泳图

此外,诱导的粗蛋白利用镍柱纯化,在蛋白上样后,带有 His 标签的融合蛋白特异性结合到柱子里,其他的杂蛋白随之流出。镍与咪唑发生竞争性结合,目的蛋白则被洗脱下来,即 GOX1 与杂蛋白成功分离,SDS-PAGE 电泳检测不同阶段的洗脱液,如图 6 所示。图 6 中:M 代表 Marker;泳道 1~3 代表杂蛋白的洗脱;泳道 4~6 代表目

的蛋白洗脱的结果,泳道 4 的洗脱液含大量的目的蛋白,利用透析袋将该洗脱液的咪唑脱去后,将目的蛋白置于 -80°C 保存。

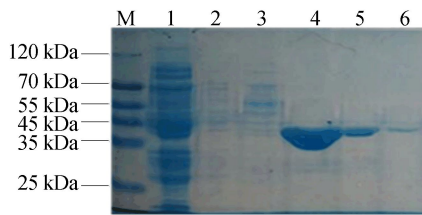


图 6 GOX1 蛋白纯化后的 SDS-PAGE 电泳图

2.6 GOX1 蛋白的质量浓度及酶活检测分析

以牛血清蛋白为标准蛋白制作标准曲线,根据此标准曲线计算出表达的 GOX1 蛋白质量浓度为 $0.17 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。以乙醇酸为底物,测得酶活约为 $2.14 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ 。

3 讨 论

由于受到天气、区域环境和其他因素的影响,植物通常会在各种逆境胁迫下生长;不断变化的环境通常给植物带来一定胁迫。例如干旱、低温、盐碱地以及二氧化碳浓度的增加等都会影响植物的生长发育,对农作物的产量和品质构成越来越严重的威胁。

植物在遭遇逆境胁迫时,会产生大量对细胞有害的活性氧(reactive oxygen species, ROS),包括超氧阴离子(O_2^-)、羟自由基($\cdot\text{OH}$)、过氧化氢(H_2O_2)和单线态氧($^1\text{O}_2$)等。其中过氧化氢是唯一可调节特定生物过程或介导植物在环境胁迫下对逆境的抗性的 ROS 信号分子^[13],植物细胞中过氧化氢的迅速积累与其对各种生物和非生物胁迫的应激有关。例如在干旱胁迫条件下,植物细胞内的脱落酸含量上升,诱导过氧化氢的产生,激活细胞膜表面的钙离子通道,从而导致气孔关闭。同时,过氧化氢作为一种重要的活性氧,可以进行跨膜运输,并且在植物与病原体之间的相互作用过程中进行信号转导。

在植物的细胞代谢过程中,有多种产生过氧化氢的方式,例如线粒体内的电子转移,叶绿体中发生的梅勒反应和过氧化物酶体中发生的光呼吸作用。而光呼吸途径产生的过氧化氢主要来源于 GOX 催化乙醇酸氧化的过程,因此人们认为 GOX 在植物抗逆防御反应过程中起着至关重要的作用,然而大多数情况下其响应胁迫的机制和信号途径还不清楚,有待进一步研究。

4 结 论

拟南芥因为其具有植株小、结实多、生命周期短;形态特征分明,突变表型易于观察;自交繁殖,易于保持遗传稳定性;基因组简单、遗传操作简便、适宜在实验室培养等优点,所以被认为是全球应用最广泛的模式生物。本研究通过 RT 和 PCR 技术,从野生型拟南芥克隆了 GOX1 基因,并对其进行生物信息学分析。研究表明,该基因的 CDS 序列为 1 104 bp,编码一个由 367 个氨基酸组成的非分泌蛋白,主要由 α -螺旋(41.14%)、无规则卷曲(37.06%)、少量的延伸链(15.80%)和 β -转角(5.99%)构成。

在未来的工作中,将会进一步研究蛋白的体外功能以及通过转基因技术验证拟南芥 GOX1 基因调控生长发育的机理,更深层次地解释 GOX1 基因参与胁迫响应的分子机制。

[参 考 文 献]

- [1] 薛娴,许会敏,吴鸿洋,等. 植物光合作用循环电子传递的研究进展[J]. 植物生理学报, 2017, 53(2): 145-158.
- [2] 张智胜,彭新湘. 光呼吸的功能及其平衡调控[J]. 植物生理学报, 2016, 52(11): 1692-1702.
- [3] 牛健康,马爱冬. 植物乙醇酸氧化酶的研究进展[J]. 菏泽学院学报, 2007, 29(5): 91-94.
- [4] OGREN W L, BOWES G. Ribulose diphosphate carboxylase regulates soybean photorespiration[J]. Nat New Biol, 1971, 230(13): 159-160.
- [5] SOMERVILLE C R, OGREN W L. A phosphoglycolate phosphatase-deficient mutant of *Arabidopsis* [J]. Nature, 1979, 280(5725): 833-836.
- [6] SOUTH P F, WALKER B J, CAVANAGH A P, et al. Bile acid sodium symporter BASS6 can transport glycolate and is involved in photorespiratory metabolism in *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Cell, 2017, 29(4): 808-823.
- [7] QUEVAL G, EMMANUELLE I B, HOEBERICHTS F A, et al. Conditional oxidative stress responses in the *Arabidopsis* photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H_2O_2 -induced cell death [J]. Plant Journal, 2007, 52(4): 640-657.
- [8] MUKHERJEE S P, CHOUDHURI M A. Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings [J]. Physiologia Plantarum, 2006, 58(2): 166-170.
- [9] SCHAFFER P, HUCKELHOVEN R, KOGEL K H, et al. The white barley mutant *albostrians* shows a supersusceptible but symptomless interaction phenotype with the hemi-

- biotrophic fungus bipolaris sorokiniana[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2004, 17(4): 366-373.
- [10] ROJAS C M, MYSORE K S. Glycolate oxidase is an alternative source for H₂O₂ production during plant defense responses and functions independently from NADPH oxidase [J]. Plant Signaling & Behavior, 2012, 7(7): 752-755.
- [11] ROJAS C M, SENTHILKUMAR M, WANG K, et al. Glycolate oxidase modulates reactive oxygen species-mediated signal transduction during nonhost resistance in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2012, 24(1): 336-352.
- [12] KERCHEV P, WASZCZAK C, LEWANDOWSKA A, et al. Lack of glycolate oxidase1, but not glycolate oxidase2, attenuates the photorespiratory phenotype of Catalase2-Deficient *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2016, 171(3): 1704-1719.
- [13] NEILL S, DESIKAN R, HANCOCK J, et al. Hydrogen peroxide signaling [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002, 5(5): 388-395.

(责任编辑 闫杏丽)

(上接第 651 页)

不平衡推力法、简化 Bishop 条分法和有限元强度折减法对机场某典型剖面进行了综合分析比较,得到如下结论:

(1) 以上 3 种方法计算所得的边坡稳定安全系数相接近,计算结果误差不超过 6%。该剖面边坡在暴雨工况下的稳定安全系数为 1.163,处于不稳定状态。其他工况下稳定安全系数大于 1.35,具备一定的安全储备,边坡处于整体稳定状态。

(2) 天然与暴雨工况下,经过清表糙坡处理后,3 种方法计算的安全系数分别增加了 98%、88%、73% 和 118%、109%、118%。根据拟建工程特征,可以对边坡地表土层进行清除和糙坡处理,加强高填方边坡的安全稳定性。

[参 考 文 献]

- [1] 侯俊伟,唐秋元,李杨秋,等. 西南某山区机场高填方边坡稳定性研究[J]. 重庆交通大学学报(自然科学版), 2016, 35(3): 82-88.
- [2] 高奋飞,严克渊,潘盛泽. 西南某机场高填方边坡稳定性分析[J]. 资源环境与工程, 2014, 28(4): 386-389.
- [3] 胡勇生,燕俊松,唐宁. 贵州某拟建机场高填方边坡破坏模式及稳定性分析[J]. 地质灾害与环境保护, 2018, 29(3): 40-44.
- [4] 刘子振. 边坡稳定性极限平衡法和有限元法综合分析[D]. 长沙:中南林业科技大学, 2007.
- [5] 贾伟. 基于极限平衡法和强度折减法的边坡稳定性分析[J]. 云南冶金, 2014, 43(4): 1-6.
- [6] 唐薇,廖义玲,梁风. 基于强度折减理论对金工立交高填方边坡的稳定性分析[J]. 路基工程, 2013(1): 56-59.
- [7] 陈金明,李哲,韩映,等. 斜坡地基上高填方边坡的变形及稳定性研究[J]. 路基工程, 2017(4): 52-56.
- [8] 赵建军,余建乐,解明礼,等. 降雨诱发填方路堤边坡变形机制物理模拟研究[J]. 岩土力学, 2018, 39(8): 2933-2940.
- [9] 何成兵,喻兴,刘宏. 西南某高填方机场不同工况下的边坡稳定性分析[J]. 水利科技与经济, 2018, 24(2): 34-38.
- [10] 中华人民共和国住房和城乡建设部. 建筑边坡工程技术规范: GB 50330—2013 [S]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2014: 1-32.
- [11] 栾茂田,武亚军,年廷凯. 强度折减有限元法中边坡失稳的塑性区判据及其应用[J]. 防灾减灾工程学报, 2003, 23(3): 1-8.
- [12] 黄昱清. 某露天矿高陡边坡稳定性分析与治理工程研究[D]. 武汉: 武汉工程大学, 2012.
- [13] 陈建平. 边坡强度折减法判据及点安全系数研究及工程应用[D]. 赣州: 江西理工大学, 2012.
- [14] ZIENKIEWICZ O C, HUMPHESON C, LEWIS R W. Associated and non-associated visco-plasticity in soil mechanics[J]. Geotechnique, 1975, 25(4): 671-689.
- [15] 费康,张建伟. ABAQUS 在岩土工程中的应用[M]. 北京: 中国水利水电出版社, 2010.
- [16] 李月峰. 高填土边坡稳定性分析[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2012.
- [17] 郑颖人,赵尚毅. 有限元强度折减法在土坡与岩坡中的应用[J]. 岩石力学与工程学报, 2004, 23(19): 3381-3388.
- [18] 姜立新. 基于强度折减的有限元方法求边坡稳定安全系数[J]. 建筑技术, 2009, 40(6): 535-538.
- [19] 陶宇,梁伟桥,谢卫兵. 有限元强度折减法分析边坡稳定性的判据研究[J]. 工业建筑, 2019, 49(2): 103-106.
- [20] 杨光华,张玉成,张有祥. 变模量弹塑性强度折减法及其在边坡稳定分析中的应用[J]. 岩石力学与工程学报, 2009, 28(7): 1506-1512.
- [21] 唐宁. 贵州某机场高填方边坡稳定性研究[D]. 成都: 成都理工大学, 2017.
- [22] 吴丹泽. 山区机场高填方边坡稳定性分析及处治方案研究[J]. 北方交通, 2017(8): 64-67.

(责任编辑 张 镛)