

束忠涛, 王冉, 沈元朝, 等. 噬菌体裂解酶基因 *Lys BT1* 在普通小球藻中的表达[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(4): 734-739.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.04.017

## 噬菌体裂解酶基因 *Lys BT1* 在普通小球藻中的表达

束忠涛<sup>1,2</sup>, 王冉<sup>2</sup>, 沈元朝<sup>2</sup>, 张汉泽<sup>1,2</sup>, 朱树娇<sup>2</sup>, 王姝璇<sup>2</sup>, 孙利厂<sup>2</sup>

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 噬菌体裂解酶因高效、安全的杀菌特性成为潜在的抗菌药物, 并受到广泛关注。本试验在前期通过基因表达制备高效噬菌体裂解酶 *Lys BT1* 的基础上, 深度解析 *Lys BT1* 与细菌上裂解酶受体相互作用的结构特点, 成功构建出质粒 pCAMBIA 1301-*BT1*。将该质粒通过电转化的方式导入普通小球藻中, 电转条件为: 电场强度 1.5 kV、脉冲距离 2 mm、脉冲时间 0.2 ms, 瞬时表达后成功进行了活性测定, 从而验证了普通小球藻作为裂解酶表达载体的可行性, 为噬菌体裂解酶的表达系统研发提供了一条可行路径。

**关键词:** 噬菌体裂解酶; 小球藻; 电转化; 抗菌药物

**中图分类号:** Q939.48 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)04-0734-06

## Expression of bacteriophage lyase gene *Lys BT1* in *Chlorella vulgaris*

SHU Zhong-tao<sup>1,2</sup>, WANG Ran<sup>2</sup>, SHEN Yuan-chao<sup>2</sup>, ZHANG Han-ze<sup>1,2</sup>, ZHU Shu-jiao<sup>2</sup>, WANG Shu-xuan<sup>2</sup>, SUN Li-chang<sup>2</sup>

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** Bacteriophage lyase has become a potential antibacterial drug due to its high efficiency and safe bactericidal properties, and has been widely concerned. In this study, based on the preparation of high-efficiency bacteriophage lyase *Lys BT1* by gene expression in the early stage, we deeply analyzed the structural characteristics of *Lys BT1* interacting with the lyase receptor on bacteria, and successfully constructed the plasmid pCAMBIA 1301-*BT1*. The plasmid was introduced into *Chlorella vulgaris* by electrotransformation. The electrotransformation conditions were as follows: electric field intensity of 1.5 kV, pulse distance of 2 mm, and pulse time of 0.2 ms. After transient expression, the activity determination was successfully carried out. Therefore, the feasibility of *Chlorella vulgaris* as a lyase expression vector was verified, which provided a feasible path for the development of bacteriophage lyase expression system.

**Key words:** bacteriophage lyase; *Chlorella vulgaris*; electrotransformation

收稿日期: 2023-08-31

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(22)2017]; 江苏省政策引导类计划一带一路创新合作项目(BZ2021009); 国家重点研发计划项目(2021YFE0101800)

作者简介: 束忠涛(1996-), 男, 安徽安庆人, 硕士研究生, 主要从事食品安全研究; (E-mail) 404339600@qq.com。王冉为共同第一作者。

通讯作者: 孙利厂, (E-mail) sunlc@jaas.ac.cn

噬菌体裂解酶(Bacteriophage lyase) 现已在多个领域显示其优越性和独特性, 有望成为后抗生素时代控制食源性致病菌、腐败菌, 保障食品安全的有效杀菌剂<sup>[1]</sup>。目前使用较多的外源表达系统主要有大肠杆菌<sup>[2]</sup>和酵母<sup>[3]</sup>等, 但这些表达系统仍存在安全性不高、易污染、表达量低等问题。基因工程植物具有不同于培养细胞的性能特征, 如光合生长和易于分级, 然而, 由于繁琐的遗传方法、缓慢的生长速

度、较低的产量以及监管方面的限制等,其发展潜力还没有得到充分实现。微藻的生长条件要求简单,且微藻具备植物基因组转录后翻译处理能力,同时微藻具备微生物快速生长和高密度培养特性<sup>[4]</sup>。目前作为表达载体的微藻有莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)<sup>[5]</sup>、杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)<sup>[6]</sup>、三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)<sup>[7]</sup>、普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)<sup>[8]</sup>等。

普通小球藻是小球藻中目前最广泛培养的藻种之一<sup>[9]</sup>,富含蛋白质和各种其他营养物质,蛋白质含量超过50%<sup>[10]</sup>,具有重要的商业价值,也是目前研究和认证的人类食品之一<sup>[11]</sup>。因其生长速度快、易培养和可塑性强的特性,常被作为外源基因表达平台的首选。Hawkins 和 Nakamura<sup>[12]</sup> 1999 年使用 PEG 转化法将人生长激素基因(*hGH*) 在普通小球藻中成功进行了瞬时表达。Koo 等<sup>[13]</sup> 采用电击法将牛乳铁蛋白 N-端肽段成功在普通小球藻中获得表达。Ng 等<sup>[14]</sup> 通过农杆菌介导的方法在普通小球藻中成功诱导表达 *YoeBSpn-GFP* 和 *PezT-GFP* 融合基因,并测试了其致病性。Shin<sup>[8]</sup> 2020 年在氮缺失的条件下成功诱导表达获得 hG-cSf 多肽。

本试验在前期表达制备高效噬菌体裂解酶 *Lys-BTI* (广谱噬菌体裂解酶) 的基础上,采用噬菌体基因组深度解析及高分辨率 X 射线晶体和冷冻电镜技术,深度解析裂解酶 *Lys BTI* 与细菌上裂解酶受体互作的酶活性结构特点、决定裂解谱的关键结构、酶结构功能的鉴定与预测。针对超级耐药细菌宽谱裂解酶的设计,本研究以细菌上裂解酶的受体为靶标,基于酶结构的分子改良、修饰和裂解酶活性中心定向设计,研制出对耐药菌的宽谱裂解酶,并提高裂解酶的稳定性和抑菌活性;通过 CRISPR 定点基因编辑技术在普通小球藻中进行基因改造,成功构建质粒 pCAMBIA 1301-*BTI*,并在普通小球藻中完成表达。

## 1 材料及方法

### 1.1 试验材料

普通小球藻、Trelief<sup>TM</sup>5 $\alpha$  感受态细胞、大肠杆菌 ATCC 25922 等均由笔者所在实验室保存;高纯度质粒 DNA 小量提取试剂盒购自北京擎科生物科技股份有限公司;LB 肉汤培养基购自 BD Difco 公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 藻种的培养和生长曲线的测定 将对数生

长末期的小球藻培养液按 10% 的接种量接入装有 50 ml 培养基的 150 ml 锥形瓶中,置于光照培养箱中静置培养。培养条件为:光照度 2 640 lx,湿度 72%,光/暗周期 12 h/12 h,培养温度为(28.0 $\pm$ 0.5)  $^{\circ}$ C。定期测定藻液 560 nm 处的吸光度(OD),检测小球藻的生长速度。

1.2.2 质粒构建 参照本研究室前期方法<sup>[15]</sup> 进行试验。裂解酶基因克隆及表达载体构建方法如下:首先,提取噬菌体 V-EcoM-C1 的基因组,然后以其为模板、以 *Lys BTI*-F、*Lys BTI*-R 为引物扩增噬菌体裂解酶基因。扩增程序:预变性温度 95  $^{\circ}$ C,持续 5 min;变性温度 95  $^{\circ}$ C,持续 30 s,退火温度 62  $^{\circ}$ C,持续 30 s,延伸温度 72  $^{\circ}$ C,持续 1 min,共 30 个循环;最后延伸温度 72  $^{\circ}$ C,持续 10 min。回收目的片段后用 *EcoR* I 和 *Not* I 进行双酶切。将双酶切后的目的片段连接至经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切后的 pCAMBIA 1301 载体,再将构建好的重组质粒 pCAMBIA 1301-*BTI* 转化至 Trelief<sup>TM</sup>5 $\alpha$  感受态细胞中,筛选阳性克隆并测序验证表达载体 pCAMBIA 1301-*BTI*。

1.2.3 重组克隆转化 取两支 100  $\mu$ l 冰上融化的 Trelief<sup>TM</sup>5 $\alpha$  感受态细胞,分别加入 10  $\mu$ l 构建好的重组质粒 pCAMBIA 1301-*BTI*,温和吹打混匀后转移至冰上,静置 30 min;在 42  $^{\circ}$ C 水浴锅中热激 45~60 s,然后迅速转移至冰浴中,静置 2 min。向离心管中加入 700  $\mu$ l 无抗性 LB 培养液,37  $^{\circ}$ C 200 r/min 复苏 60 min,再吸取 80  $\mu$ l 复苏液均匀涂布到含有 50  $\mu$ g/ml 卡那霉素的 LB 固体平板上,将平板倒置放于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中过夜培养,在 10 ml 的 EP 管中加入 5 ml 的 LB 培养基,挑取抗性平板上的单菌落在培养基中搅拌,过夜培养。

1.2.4 质粒的提取及验证 采用北京擎科生物科技股份有限公司高纯度质粒 DNA 小量提取试剂盒提取,并进行核酸验证。

1.2.5 瞬时转化 取对数生长期的普通小球藻,稀释含量梯度至  $1 \times 10^8$  左右;取藻液 3~5 ml 用 BG11 洗涤 3 次,5 000 r/min 5 min;加入山梨醇和甘露醇各 100  $\mu$ l;3 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,加入 HEPES 缓冲液(2.38 g 溶于 9 ml)混匀,提前用 PE 紫外灯处理电转杯(注意是否吹干),预冷备用,将电转杯冰浴 30 min 后放入电击转化仪中进行电击转化,电场强度为 1.5 kV,脉冲距离 2 mm,脉冲时间为 0.2 ms,立即加入 100  $\mu$ l 预冷的 BG11 液体培养基,将混

合液转入无菌离心管中,再加入 0.9 ml BG11 培养基,然后在光照条件下恢复培养 48 h。

1.2.6 荧光显微镜镜检 取 20  $\mu\text{l}$  恢复后的藻液在荧光显微镜下观察。在无光和有光两种不同条件下观察、对比荧光显微镜下的小球藻。

1.2.7 噬菌体裂解酶活性测定 将恢复 24 h 后的小球藻放入离心机中按 12 000 r/min 离心 2 min,收集上清液。将沉淀的藻体用 BG11 悬浮,再放入超声波破碎仪中按 300 W 15 min 破碎,离心收集上清液。通过点样双层(底层为 1.2% LB,上层为 0.6% LB 和菌液的混合物)方式检验上清液中酶的活性,本次所选菌株为大肠杆菌 ATCC 25922。

1.2.8 最小抑菌浓度测定 将 ATCC 25922 以挑取单菌落的方式接种于 LB 液体培养基中,培养 4~6 h 至对数期,用 PBS 洗涤 3 次,调整至  $OD_{600}$  为 0.6,再用 LB 培养基按照 1:100 稀释后备用。将分离、纯化、浓缩后的噬菌体裂解酶质量浓度调整至 512  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,在 96 孔板前 3 排的第 1 列加入 200  $\mu\text{l}$  裂解酶,第 2~12 列各加入 100  $\mu\text{l}$  PBS,从第 1 孔吸取 100  $\mu\text{l}$  裂解酶依次向后倍比稀释至第 10 孔,1~11 孔添加 100  $\mu\text{l}$  稀释后的菌液,12 孔加 100  $\mu\text{l}$  LB。每梯度裂解酶浓度设置 3 组对照,并设置空白对照和阳性对照,在 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中静置培养 24 h,以完全不生长细菌的裂解酶质量浓度为最小抑菌浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 小球藻的生长曲线

按 10% 的接种量培养,培养 21 d,如图 1 所示,在培养的第 14~15 d 生长速率达到最快,认为此期处于对数生长期。

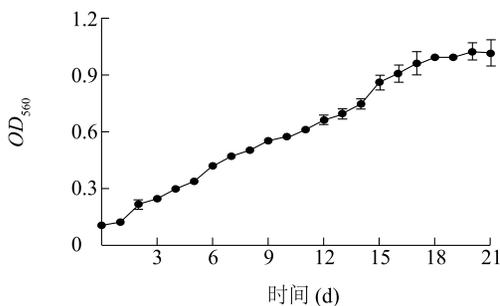


图 1 普通小球藻生长曲线

Fig.1 Growth curve of *Chlorella vulgaris*

### 2.2 表达的阳性克隆筛选

正常的 Trelief<sup>TM</sup>5 $\alpha$  感受态细胞对卡那霉素敏感,在培养基中无法生长,只有携带重组质粒 pCAMBIA 1301-BT1 的 Trelief<sup>TM</sup>5 $\alpha$  感受态细胞能成功在卡那霉素抗性培养基中生长,图 2 显示,在含卡那霉素培养基(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )上有单菌落生长,因此可以推断,重组质粒 pCAMBIA 1301-BT1 在 Trelief<sup>TM</sup>5 $\alpha$  感受态细胞中转染成功。

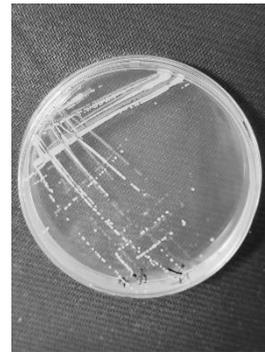


图 2 携带目的质粒的 Trelief<sup>TM</sup>5 $\alpha$  感受态细胞

Fig.2 Trelief<sup>TM</sup>5 $\alpha$  receptor cells carrying the target plasmid

### 2.3 阳性克隆的核酸分析

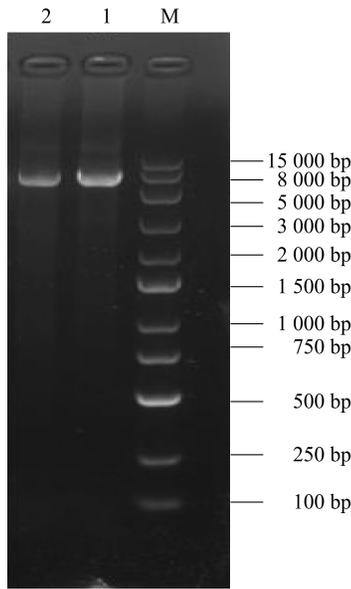
试验通过提取过夜培养的 Trelief<sup>TM</sup>5 $\alpha$  感受态细胞 DNA 做电泳,从图 3 可以看出试验组在 12 000 bp 附近有条带,与拟转染的噬菌体裂解酶相对分子量相符。

### 2.4 转染后小球藻的荧光反应

以转入质粒的小球藻作为试验组,未导入质粒的小球藻作为空白对照组,将两组小球藻在白光和激发光的条件下于荧光显微镜下观察,在白光条件下,两组均能看到清晰藻体;在激发光条件下,试验组有明显的红色荧光,而对照组一片黑暗(图 4)。重组质粒 pCAMBIA 1301-BT1 有荧光标签,故推断试验组成功表达了质粒 pCAMBIA 1301-BT1。

### 2.5 噬菌体裂解酶的活性

取适量成功转染阳性的小球藻液,离心分离藻液上清液和小球藻破碎后上清液来检测小球藻表达的噬菌体裂解酶的活性。如图 5 所示,离心分离藻液的上清液对大肠杆菌 ATCC 25922 无明显的杀菌效果,小球藻破碎后离心后的上清液对大肠杆菌 ATCC 25922 有良好的杀菌效果。试验结果表明,小



M 为 Maker, 1, 2 为提取的 Trelief™ 5α 感受态细胞 DNA。

图 3 核酸验证

Fig.3 Nucleic acid verification

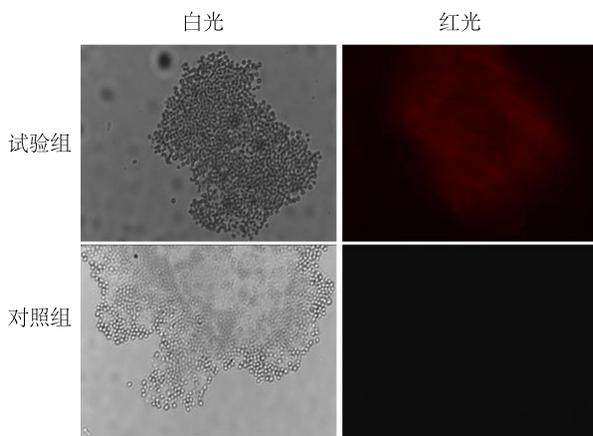


图 4 小球藻导入质粒后荧光验证

Fig.4 Fluorescence verification after plasmid introduction in *Chlorella vulgaris*

球藻系统表达的噬菌体裂解酶能成功裂解致病菌,且该裂解酶杀菌活性良好。

### 2.6 噬菌体裂解酶的最小抑菌质量浓度

如图 6 所示,质量浓度在 32  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时有明显分界点,在大于该质量浓度时有明显的抑菌效果,小于该质量浓度时则抑菌效果较差,由此得出最小抑菌质量浓度为 32  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。



左侧为藻液直接离心后的上清点样,右侧为藻体破碎并离心后的点样。

图 5 噬菌体裂解酶活性

Fig.5 Activity of bacteriophage lyase

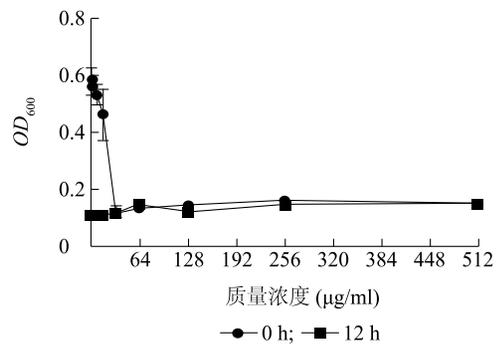


图 6 噬菌体裂解酶最小抑菌质量浓度

Fig.6 Minimum inhibitory concentration of bacteriophage lyase

## 3 讨论

自从科研人员首次尝试在小球藻中表达异源蛋白质以来,相关研究已经取得一定进展。尽管异源蛋白质的产量相对较低,但小球藻具有快速生长、易于培养以及进行翻译后修饰的能力等显著优势,因此发展前景广阔。当前如何提高生产能力仍然是小球藻异源蛋白质商业化的主要挑战,这取决于开发用于改进蛋白质表达、培养系统和下游基于生物炼制的综合生产的新型遗传工具箱方面的重大研究进展。这些领域的创新和突破将大大提高生产能力、降低生产成本,从而使小球藻成为异源蛋白质表达的竞争宿主。目前已报道的小球藻有效遗传转化方法主要有农杆菌侵染法<sup>[16]</sup>、基因枪法<sup>[17]</sup>、电击转化法<sup>[18]</sup>、聚乙二醇融合法<sup>[19]</sup>等。电击转化法是小球

藻转化系统中较为常用的转化方法<sup>[20]</sup>,牟云等<sup>[21]</sup>成功通过构建电击转化体系在沙漠小球藻中表达人乳铁蛋白;Zhang等<sup>[22]</sup>以电穿孔的方式将来自大豆的转录因子基因 *GmDof4* 转化到小球藻中。普通小球藻作为可持续的、安全的生物制造商业理想分子平台,尽管目前遗传工具的开发略显落后,没有能进行商业化的生物治疗平台<sup>[23]</sup>,但在这一领域普通小球藻具有不可替代的潜力。近年来,虽然关于外源基因在小球藻中转化表达的研究不断取得进展<sup>[24]</sup>,但是仍然存在很难进行基因工程改良、外源蛋白质表达水平低且不稳定<sup>[25-26]</sup>等问题。

*Lys BTI* 作为一种嵌合式广谱噬菌体裂解酶,在通过基因分析、筛选和预测后,剪切出具有所需能力的基因片段,并利用 CRISPR 定点基因编辑技术在小球藻中进行基因改造,实现裂解酶基因多拷贝整合和小球藻、枯草芽孢杆菌高效表达裂解酶代谢工程改造,实现裂解酶基因高效表达,并以小球藻构建微藻载药系统。将含有 *Lys BTI* 基因片段进行整合,构建出质粒 pCAMBIA 1301-*BTI*,通过克隆和验证后,利用电转化法将质粒导入普通小球藻,通过荧光显微镜镜检证明噬菌体裂解酶基因在小球藻中表达成功,并通过对目标菌的杀菌活性和最小抑菌质量浓度试验验证表达的裂解酶有着良好的抑菌杀菌效果。本试验为噬菌体裂解酶的表达系统研发提供了一条新思路。不过,目前该表达系统只能瞬时表达裂解酶基因,后续仍需要进一步完善。

## 4 结论

本试验利用普通小球藻作为表达平台,成功表达了具备良好活性的裂解酶 *Lys BTI*。这为裂解酶大规模生产提供了一种可能,但目前仍处于待完善阶段,未来可研发稳定转化裂解酶 *Lys BTI* 的普通小球藻系统,应用于食品和医药行业。

### 参考文献:

- [1] 黄振华,张昭寰,吴倩,等. 噬菌体及其裂解酶:后抗生素时代的有效杀菌剂[C]. 中国食品科学技术学会. 中国食品科学技术学会第十八届年会摘要集. 北京:中国食品科学技术学会,2022:146-147.
- [2] 王瑜欣,李静,付开来,等. 噬菌体裂解酶 *Lysin1902* 原核表达及其与  $\epsilon$ -聚赖氨酸联用效果评价[J]. 微生物学报,2023,63(2):834-844.
- [3] 缪西鹏. 产气荚膜梭菌多重 PCR 检测方法的建立及其噬菌体裂解酶在真核系统中的表达[D]. 银川:宁夏大学,2022.
- [4] WALKER T L, PURTON S, BECKER D K, et al. Microalgae as bioreactors[J]. Plant Cell Reports,2005,24(11):629-641.
- [5] 杨泽焯,张雨靖,高文英,等. *gpd1* 基因莱茵衣藻表达载体构建及农杆菌介导转化莱茵衣藻[J]. 西北大学学报,2017,47(1):75-81.
- [6] AKBARI F, ESKANDANI M, KHOSROUSHAHI A Y. The potential of transgenic green microalgae; a robust photobioreactor to produce recombinant therapeutic proteins[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology,2014,30(11):2783-2796.
- [7] HEMPEL F, MAIER U G. An engineered diatom acting like a plasma cell secreting human IgG antibodies with high efficiency[J]. Microbial Cell Factories,2012,11(1):126.
- [8] SHIN J H, CHOI J, JEON J, et al. The establishment of new protein expression system using N starvation inducible promoters in *Chlorella*[J]. Scientific Reports,2020,10(1):12713.
- [9] 杨博. 普通小球藻稳定遗传体系的建立及基因改造其光合固碳效率的研究[D]. 广州:华南理工大学,2016.
- [10] TAN C H, SHOW P L, LAM M K, et al. Examination of indigenous microalgal species for maximal protein synthesis[J]. Biochemical Engineering Journal,2020,154(15):107425.
- [11] AHMED J, KUMAR V. Effect of high-pressure treatment on oscillatory rheology, particle size distribution and microstructure of microalgae *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis*[J]. Algal Research,2022,62:102617.
- [12] HAWKINS R L, NAKAMURA M. Expression of human growth hormone by the eukaryotic alga, *Chlorella*[J]. Current Microbiology,1999,38(6):335-341.
- [13] KOO J, PARK D, KIM H. Expression of bovine lactoferrin N-lobe by the green alga, *Chlorella vulgaris*[J]. Algae,2013,28(4):379-387.
- [14] NG S L, HARIKRISHNA J A, BAKAR F A, et al. Heterologous expression of the *Streptococcus pneumoniae* yoeB and pezT toxin genes is lethal in *Chlorella vulgaris*[J]. Algal Research,2016,19:21-29.
- [15] 孙利厂,庞茂达,何灵尘,等. 肠出血性大肠埃希菌噬菌体裂解酶的毕赤酵母重组表达及裂解活性分析[J]. 扬州大学学报,2018,39(4):1-6.
- [16] CHA T S, YEE W, AZIZ A. Assessment of factors affecting agrobacterium-mediated genetic transformation of the unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology,2012,28(2):1771-1779.
- [17] GONG Y, HU H, GAO Y, et al. Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,2011,38(12):1879-1890.
- [18] MORRIS H J, CARRILLO O V, ALMARALES Á, et al. Protein hydrolysates from the alga *Chlorella vulgaris* 87/1 with potentialities in immunonutrition[J]. Biotechnology Aplicada,2009,26(2):162-165.

- [19] KIM D H, KIM Y T, CHO J J, et al. Stable integration and functional expression of flounder growth hormone gene in transformed microalga, *Chlorella ellipsoidea* [J]. Marine Biotechnology, 2002, 4 (1):63-73.
- [20] 曹苏珊, 薛静, 王倩楠, 等. 小球藻遗传转化技术研究进展 [J]. 水产科学, 2021, 40(2):294-300.
- [21] 牟云, 汪文伦, 许万云, 等. 人乳铁蛋白的沙漠小球藻表达系统的构建与鉴定 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45(19):138-142.
- [22] ZHANG J, HAO Q, BAI L, et al. Overexpression of the soybean transcription factor GmDof4 significantly enhances the lipid content of *Chlorella ellipsoidea* [J]. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7 (1):128.
- [23] JESTER B W, ZHAO H, GEWE M, et al. Development of spirulina for the manufacture and oral delivery of protein therapeutics [J]. Nature Biotechnology, 2022, 40:956-964.
- [24] 曹苏珊, 薛静, 王倩楠, 等. 小球藻遗传转化技术研究进展 [J]. 水产科学, 2021, 40(2):294-300.
- [25] RASALA B A, MUTO M, LEE P A, et al. Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Plant Biotechnology Journal, 2010, 8(6):719-733.
- [26] YANG B, LIU J, JIANG Y, et al. *Chlorella* species as hosts for genetic engineering and expression of heterologous proteins: Progress, challenge and perspective [J]. Biotechnology Journal, 2016, 11(10):1244-1261.

(责任编辑:黄克玲)