

## 苜蓿中华根瘤菌 *desA* 基因功能的鉴定\*

马金成 周俊超 吴楚云 胡 喆 王海洪\*\*

(华南农业大学生命科学学院, 广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室, 广州 510642)

**摘要** 为研究苜蓿中华根瘤菌脂肪酸脱饱和酶 *desA* 基因在不饱和脂肪酸合成、共生结瘤固氮以及应对逆境胁迫中的功能, 为高效利用苜蓿中华根瘤菌提供理论依据, 本文通过异体遗传互补和脂肪酸组成薄层层析, 分析 *SmdesA* 编码蛋白是否具有脱饱和酶的活性并参与不饱和脂肪酸的合成, 构建 *SmdesA* 的缺失突变株和互补菌株, 比较各菌株在不同逆境胁迫条件下的生长速率以及回接宿主植物后与紫花苜蓿共生结瘤的能力. 结果表明 *SmdesA* 不能互补大肠杆菌 CY57 中 *EcfabA* 的突变, 但具有将饱和脂肪酸脱饱和形成不饱和的棕榈油酸和十八碳烯酸的能力. 另外, *SmdesA* 缺失突变对苜蓿中华根瘤菌的脂肪酸组成影响不大, 但会显著影响低温和高盐条件下菌株的生长速率以及与紫花苜蓿共生结瘤的能力. 我们推测, *SmdesA* 参与的脱饱和途径可能是苜蓿中华根瘤菌不饱和脂肪酸合成的补偿途径, 其编码的蛋白 DesA 不是不饱和脂肪酸合成的关键酶, 但在应对逆境胁迫和共生结瘤中具有重要的生物学功能.

**关键词** 苜蓿中华根瘤菌, 细菌脂肪酸合成, 脂肪酸脱饱和酶, DesA

**学科分类号** Q93

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2015.0101

细菌中不饱和脂肪酸的合成主要有两条途径, 厌氧的从头合成途径和需氧的脱饱和途径. 在细菌中, 从头合成途径称为 II 型脂肪酸合成途径, 包括起始反应和循环反应两部分. 在从头合成途径中, 不饱和脂肪酸的合成是饱和脂肪酸合成的支路途径. 在羟基癸脂酰通过 3- 羟基脂酰 ACP 脱水酶脱水后, 形成反 -2- 癸烯酰 ACP, 之后被异构酶异构为顺 -3- 癸烯酰 ACP, 接着被 3- 酮脂酰 ACP 合成酶进一步缩合, 进入循环反应中, 最后形成棕榈油酸或十八碳烯酸<sup>[1]</sup>. 这一途径首先在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中得到证实, 其中的关键酶是 FabA(3- 羟基脂酰 ACP 脱水异构酶)和 FabB(3- 酮脂酰 ACP 合成酶)<sup>[2]</sup>. 在不同的细菌中从头合成途径下不饱和脂肪酸合成的机制基本类似, 但是催化关键步骤的酶却有所差异<sup>[3]</sup>. 脱饱和途径是将已经合成好的长链饱和脂肪酸脱饱和和形成不饱和脂肪酸. 根据脂肪酸结合载体的差异, 可分为三类: a. 脂酰 CoA 脱饱和酶, 催化以 CoA 为载体的脂肪酸, 主要存在于动物、酵母和真菌细胞中, 与内质网相结合; b. 脂酰 ACP 脱饱和酶, 催化 ACP 为载体的脂肪酸, 存在于植物质体基质以及大多

数细菌细胞质中; c. 脂酰 - 酯脱饱和酶, 催化与甘油酯结合的脂肪酸, 存在于植物内质网膜、质体膜、蓝藻类囊体膜和细菌细胞膜上. 脂酰 - 酯脱饱和酶, 是细胞响应温度变化而改变膜脂不饱和程度的有效调节器, 它主要以细胞色素  $b_5$  以及铁氧还蛋白为电子供体, 可以识别特定酰基甘油骨架上特定空间位置的脂酰链, 目前报道的所有脂酰 - 酯脱饱和酶都是膜结合蛋白. 蓝藻 (*Synechocystis* sp.) PCC 6803 中最早分离出  $\Delta 12$  脱饱和酶 *desA* 基因<sup>[4]</sup>, 随后在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和大豆 (*Glycine max*) 中也报道了类似的  $\omega$ -6 脱饱和酶 *fad* 基因<sup>[5-6]</sup>. 在细菌中, 最先是在枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中报道了  $\Delta 5$  脱饱和 *desA* 基因<sup>[7]</sup>, 随后在铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 中发现了  $\Delta 9$  脱饱和酶 *desA* 基因<sup>[8]</sup>.

\* 国家自然科学基金(31200028, 31471743)和广东省自然科学基金(2014A030313455)资助项目.

\*\* 通讯联系人.

Tel: 020-85281389, E-mail: wanghh36@scau.edu.cn

收稿日期: 2015-04-13, 接受日期: 2015-07-14

根瘤菌是一种在土壤中广泛分布的革兰氏阴性菌, 共生条件下能将空气中游离的  $N_2$  转化为  $NH_3$  供给植物, 根瘤菌-豆科植物的共生固氮体系是生物固氮体系的重要组成部分<sup>[9]</sup>. 苜蓿中华根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*) Rm1021 是已经被广泛认识的根瘤菌, 能与二倍体和四倍体的苜蓿植物建立共生关系<sup>[10]</sup>. 其基因组已于 2001 年完成测序, 基因组为 6.7 Mb, 其中包括 3 个大的复制子: 3.65 Mb 的染色体、1.35 Mb 的 pSymA 以及 1.68 Mb 的 pSymB, 预测了 6 204 个编码蛋白, 这为研究该菌的生理生化代谢和与豆科植物的共生固氮机制提供了良好的基础<sup>[11-14]</sup>. 目前, 对苜蓿中华根瘤菌的研究主要集中在共生固氮机制和抗逆性这两个方面, 脂肪酸合成系统对苜蓿中华根瘤菌的共生固氮和抗逆性均有显著影响. 脂肪酸中间代谢产物酰基高丝氨酸内酯(AHLs)是根瘤菌中广泛存在的一类自体诱导物, 由这种物质介导的群体感应系统与根瘤菌和植物的共生作用密切相关<sup>[15]</sup>. 有报道称烯脂酰 ACP 还原酶基因 *fabI1* 的突变会导致苜蓿中华根瘤菌不能在高盐条件下生长, 结瘤率和细菌泳动也受到影响<sup>[9]</sup>. 因此, 对苜蓿中华根瘤菌脂肪酸合成相关基因的研究有助于加深对抗逆性和共生固氮机制的理解, 为高效利用苜蓿中华根瘤菌提供参考.

比较苜蓿中华根瘤菌与枯草芽孢杆菌的基因组序列, 发现苜蓿中华根瘤菌基因组中有注释为脂肪酸脱饱和酶的同源基因: *desA*. 但是迄今为止, 尚未见有关于苜蓿中华根瘤菌 *SmdesA* 基因的报道, 为此本课题组采用遗传互补和缺失突变的手段研究苜蓿中华根瘤菌脱饱和酶基因在不饱和脂肪酸合成等方面的功能.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、质粒和培养基

本研究使用的大肠杆菌菌株有 MG1655、DH5 $\alpha$ 、S17-1<sup>[16]</sup>和 CY57(*fabA*(Ts))<sup>[17]</sup>, 苜蓿中华根瘤菌野生型 Rm1021, 其他菌株均为上述菌株的衍生菌株. 使用的质粒有 pMD19-T、pBAD24m<sup>[18]</sup>、pVLT33、p34S-Gm<sup>[19]</sup>和 pK18mobsacB<sup>[20]</sup>, 其他载体均为上述质粒的衍生质粒(具体构建见下文). LB 用作培养大肠杆菌的丰富培养基, RB 作为检测脂肪酸合成突变菌株的培养基. TY 培养基: 5 g/L Trypton, 5 g/L Yeast Extract, 0.07 g/L CaCl<sub>2</sub>, pH 6.5,

用于在 28℃ 培养根瘤菌和筛选 *DesA* 突变株, 需要时添加 5% 或 10% 的蔗糖做负筛选剂. 低氮培养基: 0.2 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2 g/L NaCl, 0.12 g/L CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.025 g/L Na<sub>2</sub>FeEDTA, 0.004 g/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 以及必要的微量元素. MS 培养基: 取 MS 培养基母液用双蒸水定容至 1L. 常用的试剂和抗生素的使用浓度如下: 100 mg/L 氨苄青霉素(Amp), 30 mg/L 卡那霉素(Km), 30 mg/L 氯霉素(Cm), 30 mg/L 庆大霉素(Gm), 0.02% L-阿拉伯糖(Ara). B5 培养基: 250 mg/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 150 mg/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 150 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 27.8 mg/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 37.3 mg/L Na<sub>2</sub>-EDTA, 60 mg/L KNO<sub>3</sub>, 0.01 mg/L H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub>, 0.01 mg/L H<sub>2</sub>MO<sub>4</sub>, 0.01 mg/L MnSO<sub>4</sub>, 用自来水溶解配制.

#### 1.1.2 试剂

限制性内切酶、T4 连接酶、Taq、*pfu* DNA 聚合酶、Marker DL2000 等试剂、T 载体克隆、质粒提取和 DNA 凝胶回收等试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司; 氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素、庆大霉素等购自北京鼎国公司; IPTG 等试剂购自 Sigma 公司. PCR(polymerase chain reaction)扩增引物寡核苷酸由上海 Sangon 公司合成. [1-<sup>14</sup>C]乙酸钠 (192 × 10<sup>10</sup> Bq/mol) 购自 American Radiolabeled Chemicals 公司.

### 1.2 重组 DNA 技术

本研究所使用的 PCR 引物见表 1, 以苜蓿中华根瘤菌 Rm1021 基因组 DNA 为模板, 用 *pfu* DNA 聚合酶 PCR 扩增 *SmdesA* 基因. 回收 PCR 扩增产物, 经 Taq DNA 聚合酶催化末端加尾后, 连接至 pMD19-T 载体, 并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 筛选阳性克隆, DNA 序列测定验证 T 载体上携带的基因序列, 得到质粒 pMJC1. 用 *EcoR* I 和 *Xba* I 消化 pMJC1, 回收酶切产物并克隆到载体 pBAD24m, 得到互补表达载体 pMJC2. 用同样的方法将 *SmdesA* 克隆到 pVLT33 上得到互补载体 pMJC3.

### 1.3 遗传互补分析与脂肪酸组成薄层层析分析

将构建好的 pMJC2 以及 pBAD24m 空载体分别转化进大肠杆菌 *fabA* 的温度敏感突变株 CY57 中, 涂布于 LB 平板上(含 Amp 抗生素), 30℃ 静置培养过夜, 筛选转化子, 将转化子分别划线转接在 RB 培养基(含 Amp, 阿拉伯糖)上, 并于 30℃ 和 42℃ 培养过夜, 观察细菌生长情况.

Table 1 Sequences of the PCR primers used in this work

Primer	Primer name	Primer sequence (5' to 3')
B1	pBAD reverse	GCTGAAAATCTTCTCTCATCC
B2	pBAD forward	CGCAACTCTCTACTGTTTCTC
M1	M13 forward	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
M2	M13 reverse	GAGCGGATAACAATTCACACAGG
S1	SacB forward	CGGCACTGTCGAAACTATCAC
S2	SacB reverse	TTTGTTACGCGGCTTGATGGG
A1	<i>SmdesA</i> EcoR I	GAGGAATTCACCATGAGCGCACATGTCTAT
A2	<i>SmdesA</i> Xba I	TATCTAGATTACTTCGCTTTTCGTC
P1	Up <i>EcoR</i> I	CGAATTCGACAATAAGTCGGGCAAGATG
P2	Up <i>Xba</i> I	TATCTAGAAACGAGTGAAGCGGGTGGAT
P3	Dn <i>Xba</i> I	TATCTAGATCATGAAGATGGACGAAAGACG
P4	Dn <i>Hind</i> III	CGCAAGCTTACGCAAAGGGAGAACGAATA
P5	Check Up	GCCGAGAACGAGCGAATCCTAG
P6	Check Dn	ACCACGAGCAGAAGCGATCCT

将上述遗传互补分析的大肠杆菌接种在 5 ml LB 培养基中, 30℃ 条件下培养过夜; 接种 200  $\mu$ l 过夜培养液到 5 ml RB 培养基中, 30℃ 条件下培养 4 h, 当菌液培养到  $A_{600}$  为 0.6, 42℃ 培养 2 h 添加 20% L-阿拉伯糖 5  $\mu$ l 和 [1- $^{14}$ C]乙酸钠 5  $\mu$ l, 继续培养 2~3 h 到对数生长期; 4 000 r/min 离心 10 min 去除上清, 并采用 NaOH 甲醇 / 盐酸甲醇的方法抽提各菌株的磷脂<sup>[18]</sup>; 脂肪酸组成采用薄层层析, 用磷屏成像系统检测放射性信号<sup>[21-23]</sup>.

#### 1.4 苜蓿中华根瘤菌 *desA* 突变株的构建

pK18mobsacB 系列自杀性载体用于苜蓿中华根瘤菌 *SmdesA* 基因缺失突变株的构建<sup>[20]</sup>. 以苜蓿中华根瘤菌 Rm1021 基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 分别扩增出 *SmdesA* 基因的上下游片段(Up, Down), 搭桥 PCR 将 *SmdesA* 基因上下游片段连接起来扩增得到 *SmdesA* (UpDn), 连接到 pMD19-T, 送测序. *SmdesA* (UpDn)用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 消化 DNA 片段后, 连接到用相应限制性内切酶消化的 pK18mobsacB 载体上, 得到 pK18mobsacB-*SmdesA* UpDn. 用限制性内切酶 *Hind* III 酶切 p34S-Gm 回收 Gm 片段, 将其接到 pK18mobsacB-*SmdesA* UpDn 载体上, 得到 pK18mobsacB-*SmdesA* UpDnGm, 命名为 pMJC4. 将 pMJC4 转化大肠杆菌 S17-1 菌株, 与苜蓿中华根瘤菌野生型菌株 RM1021 在 TY 平板上 30℃ 共培养 48 h, 然后将接产物用 1 ml TY 液体培养基悬浮并稀释至 1/10<sup>5</sup> 后布于添加有 Km、Gm 和 Cm

抗性的 TY 平板上, 30℃ 培养 72~96 h 后得到单菌落. 选取单菌落培养抽提细菌总 DNA. 通过 S1/S2 引物和 P1/P4 引物进行 PCR 检测, 获得一次重组菌株(整个质粒整合到苜蓿中华根瘤菌基因组中). 将一次重组菌株在添加 Cm 的 TY 液体培养基中 30℃ 培养 72 h, 将培养物稀释布于添加 Cm 的 TY 固体培养基上, 将生长出来的单菌落分别转移到含有 10% 蔗糖、Cm 和 Km、Gm 两种不同的 TY 固体培养基上, 进行二次重组菌落的筛选. 挑取对蔗糖不敏感而对 Km 和 Gm 敏感的单菌落培养并抽提总 DNA, 对备选菌株进行 PCR 验证.

#### 1.5 突变株脂肪酸抽提和组分测定

脂肪酸抽提的方法参照文献[18], 具体如下. 挑取单菌落于 10 ml 新鲜的 TY 培养基中, 30℃ 震荡培养 72 h. 4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体. 用 1 ml 的 NaOH- 甲醇溶液悬浮细菌, 置于沸水中 1 h, 期间每隔 10 min 震荡菌液数次. 加入 2 ml 的 HCl- 甲醇溶液, 充分混匀后置于 80℃ 水浴 30 min. 水浴结束后迅速冷却到 20℃ 以下, 加入 1 ml 石油醚, 充分混匀后 4 000 r/min 离心 5 min 使其分层, 取上层液体至新的离心管中. 重复上步 2 次, 共得到 3 ml 的液体. 置于通风橱或真空干燥器内, 石油醚挥发后得到脂肪酸, -20℃ 保存备用. 通过 GC-MS 分析脂肪酸组成成分.

#### 1.6 突变株生长曲线的测定

挑取各菌株的单菌落于新鲜的液体培养基中, 震荡培养至  $A_{600}$  为 0.6 左右. 将种子液按 2% 的比

例接种到新鲜的液体培养基中震荡培养, 每 2 h 测定一次  $A_{600}$ , 绘制生长曲线. 选取对数生长期数据, 计算样品的生长代时.

### 1.7 苜蓿中华根瘤菌回接宿主植物实验

#### 1.7.1 试管栽培结瘤实验

大试管分装 30 ml B5 培养基, 放置折叠好的滤纸提供支撑并加棉塞, 121℃ 高压灭菌; 取新鲜饱满的紫花苜蓿种子, 用 75% 的乙醇(含 0.1% 的升汞)表面消毒 5 min, 无菌水洗涤 3 遍, 均匀播撒在盆装的土壤中, 30℃ 自然光照, 栽培至种子发芽长至土壤上方 5 cm 后, 将整株连根取出, 放入上述大试管中, 每支试管栽培 1 株; 以每天 16 h 光照, 30℃ 栽培植物 10 d 后, 挑选长势较好的植株并更换新鲜培养液; TY 培养基培养的野生型和突变株以每株 200  $\mu$ l 的菌液量接种, 每个处理接种 10 株并编号, 同时设置空白对照, 继续培养植株; 每天观察植物结瘤情况和结瘤数; 以共生结瘤植物栽培时间(d)为横坐标, 每种菌株接种植物的平均结瘤数为纵坐标, 绘制结瘤曲线.

#### 1.7.2 土壤栽培结瘤实验

栽培用土壤, 160℃ 干热灭菌 2 h, 冷却后分装入新塑料花盆中, 每盆中均匀播撒 20 颗无菌处理的紫花苜蓿种子, 上方再覆盖一层灭菌土, 8 盆一起放入金属托盘中; 以每天 16 h 光照, 30℃ 恒温

栽培植物 10 d 左右待种子发芽; 茎叶长至土壤上方 5 cm 左右, 用镊子将长势较差的植株移除, 每个塑料花盆中留 9 株植物, 将 TY 培养基培养的野生型和突变株以每盆 5 ml 的菌液量接种, 每个处理接种 8 盆放置同一金属托盘中并编号, 同时设置空白对照; 继续培养植株 50 d 将每盆植株连土壤一起倒出, 用自来水小心洗净根部的土壤; 统计每盆植株中每株植物的平均结瘤数, 并绘制结瘤柱形图.

## 2 结果与分析

### 2.1 生物信息学分析

利用枯草芽孢杆菌的脂肪酸脱饱和酶 BsDesA 蛋白序列, 同源比对苜蓿中华根瘤菌 Rm1021 的基因组, 发现苜蓿中华根瘤菌的 SmDesA 与 BsDesA 的蛋白质相似性达到了 44%(图 1). 同时, 在 SmDesA 中也发现了脂肪酸脱饱和酶家族的 3 个关键性的保守基序: 1 个 HX<sub>3</sub>H 基序以及 2 个 HXXHH 基序, 这 3 个保守基序中的组氨酸可能是作为金属螯合配基, 在反应中心结合氧, 使氧分子接收来自于被还原的细胞色素 b<sub>5</sub> 和铁氧还蛋白的电子. 根据生物信息学的分析, 苜蓿中华根瘤菌 DesA 可能具有脂肪酸脱饱和酶的功能, 为了验证这一观点, 本课题组开展了以下的研究.

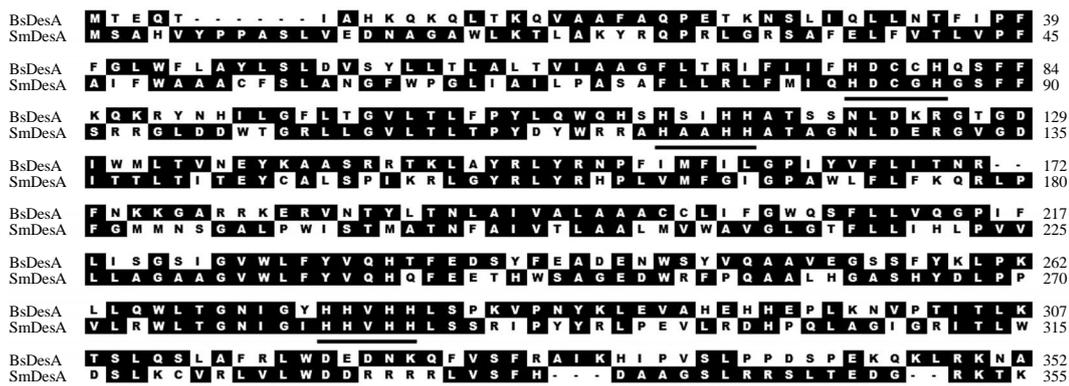


Fig. 1 The alignment of bacteria DesA proteins

Alignments of *S. meliloti* SmDesA with homologs from *B. subtilis* is shown. Identical residues are indicated by white letters. The active-site residues, His-X-X-X-His and His-X-X-His-His in DesA are underlined. The homology over the entire lengths of the proteins shown was 44.0%.

### 2.2 Smdesa 遗传互补大肠杆菌突变株

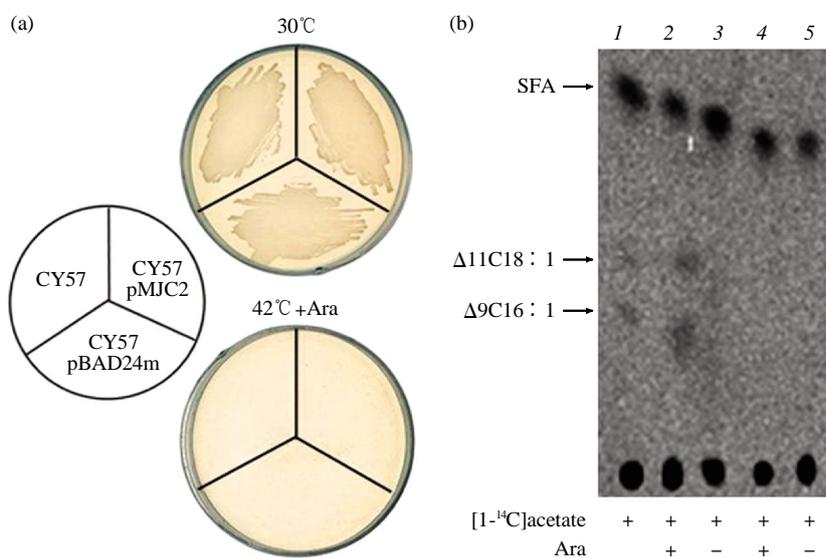
为了在体内验证 *Smdesa* 编码的蛋白是否具有脱饱和的功能, 本研究将 *Smdesa* 基因克隆到 pBAD24m 互补载体, 然后转化至大肠杆菌 *fabA* 的温度敏感突变株 CY57. *EcfabA* 是大肠杆菌不饱和

脂肪酸合成的关键基因, 很多研究都报道了 *EcfabA* 是大肠杆菌生长的必需基因<sup>[2, 24]</sup>. *fabA* 的温度敏感突变株 CY57 在 30℃ 正常生长, 在 42℃ 时, 由于 *fabA* 基因失去活性, 不饱和脂肪酸合成受阻, 不能正常生长. 将 pMJC2 和 pBAD24m 空载转化

CY57 后, 在添加有阿拉伯糖的 RB 平板上检测转化子的生长状况. 结果发现, 携带外源质粒的 CY57 菌株同携带载体质粒 pBAD24m 的菌株一样均不能在 42℃ 生长(图 2a), 也即 *SmdesA* 不能恢复 CY57 的生长表型, 这表明 *SmdesA* 并不能互补 CY57 中 *EcfabA* 的缺失.

虽然上述实验中 *SmdesA* 不能恢复 CY57 的生长表型, 我们并不能排除 *SmdesA* 编码的蛋白参与不饱和脂肪酸的合成. 为进一步验证 *SmDesA* 的功能, 本研究用 [1-<sup>14</sup>C] 乙酸钠标记各转化菌株, 通过薄层层析分析各菌株的脂肪酸组成, 结果如图 2b 所示. 转化 pBAD24m 的 CY57 菌株, 由于其 3-羟

基脂酰 ACP 脱水异构酶失活, 所以没有不饱和脂肪酸的合成, 层析板上仅有饱和脂肪酸的条带, 未见有不饱和脂肪酸的条带(图 2b 泳道 4~5). 转化 pMJC2(*SmdesA*) 的 CY57 菌株, 在没有添加阿拉伯糖作为诱导剂的条件下, 只能合成很微量的不饱和脂肪酸(图 2b 泳道 3). 在添加阿拉伯糖诱导时, 能够合成大量的不饱和脂肪酸(图 2b 泳道 2), 并且合成的种类与野生型菌株 MG1655 一致(图 2b 泳道 1). 这表明 *SmdesA* 确实具有脱饱和酶的活性, 能将饱和的脂肪酸脱饱和形成不饱和的棕榈油酸和十八碳烯酸.



**Fig. 2 Growth of transformants and thin-layer chromatographic analysis of fatty acid composition of *E. coli fabA(ts)* mutant CY57 with plasmid carrying *SmdesA* gene**

(a) *E. coli* strains CY57 carrying the pBAD24M or pBAD24M-derived plasmid pMJC2 (*SmdesA*) were grown at 30°C and 42°C on RB medium containing arabinose. (b) Argention thin-layer chromatographic analysis of [1-<sup>14</sup>C]acetate labeled *E. coli* CY57 with plasmid carrying *SmdesA*. The migration positions of the methyl esters of the fatty acids species are shown. 1: MG1655; 2, 3: CY57 carrying plasmid pMJC2; 4, 5: CY57/pBAD24M.

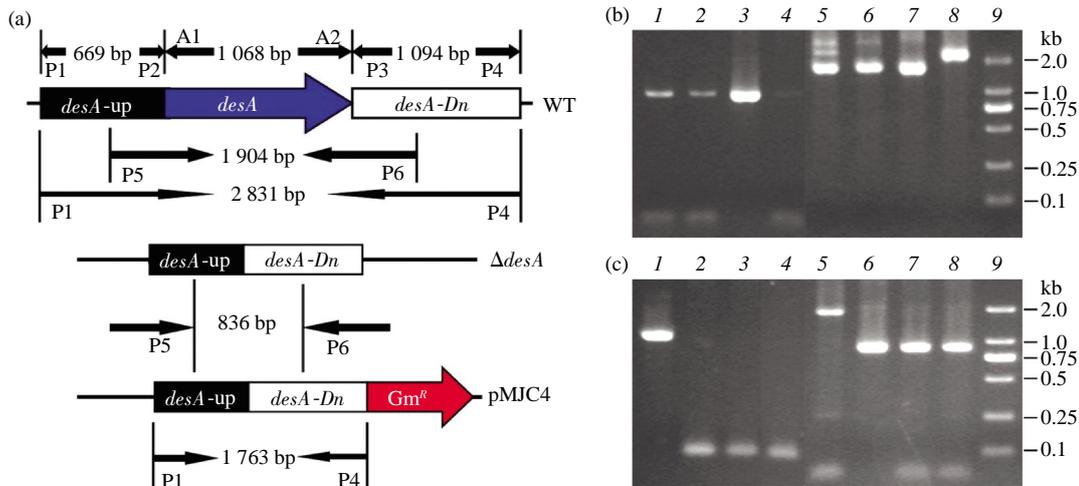
### 2.3 *SmdesA* 突变株的构建和脂肪酸组成测定

通过上述异体遗传互补和同位素标记细胞膜磷脂脂肪酸组成薄层层析实验, 证明了苜蓿中华根瘤菌 *SmdesA* 的确编码有功能的脂肪酸脱饱和酶. 为了进一步研究 *SmdesA* 的生理功能, 我们构建了 *SmdesA* 基因的 pK18mobsacB 自杀性载体 pMJC4 和回复互补载体 pMJC3. 将 pMJC4(pK18mobsacB-*desA*UpDnGm) 转化大肠杆菌 S17-1 菌株, 通过接合转移进入苜蓿中华根瘤菌野生型菌株 SM1021 细

胞, 发生同源重组, 一次重组时整个质粒整合到苜蓿中华根瘤菌基因组中, 经过二次重组目的基因被敲除, 得到无抗性标记的突变株, 基因敲除原理如图 3a 所示. 为了筛选 *SmdesA* 缺失突变体, 首先对一次筛选平板(含 Km、Gm 和 Cm 的 TY)上存活的转化子进行菌落 PCR 验证, 结果如图 3b 所示, 抗性菌落 F1 和 F2 采用引物组合 S1/S2 能扩增出 ScaB 片段来(图 3b 泳道 1 和 2), 而 P1/P4 引物组合则能扩增出一条 1.7 kb 和一条较弱的 2.8 kb 的特

异性片段(图 3b 泳道 5 和 6), 表明这两个单菌落均是 *SmdesA* 一次重组菌株. 我们选取 F1 菌株进行纯化, 转移到含有 10% 蔗糖、Cm 和 Km、Gm 两种不同的 TY 培养基上, 进行二次重组菌落的筛选, 选取对蔗糖不敏感而对 Km 和 Gm 敏感的备选菌落采用 A1/A2 和 P5/P6 引物组合进行 PCR 检测, 结果表明 3 个单菌落 S1、S2 和 S3 不能扩增出 *SmdesA* 的全长序列, 但能扩增出 836 bp 的特异片

段(图 3c 泳道 2~4 和 6~8). 选取 S1 菌株进行基因组 *desA* 缺失区域的测序, 结果显示 *SmdesA* 被成功敲除, 将缺失突变株命名为  $\Delta desA$ . 将构建好的 *SmdesA* 互补载体 pMJC3 转化大肠杆菌 S17-1 菌株, 通过接合转移进入  $\Delta desA$  突变株中, 涂布含有 Km 和 Cm 的 TY 平板, PCR 筛选得到的抗性菌落为  $\Delta desA$  互补菌株, 命名为  $\Delta desA/pMJC3$ .



**Fig. 3 Construction and characterization of the  $\Delta SmdesA$  mutation in *S. meliloti***

(a) *SmdesA* gene and knockout construct. The map of the wild-type allele and knockout construct pMJC4 are indicated. The length of homologous sequence (bp) and the position of primers P1/P4, A1/A2 and P5/P6 used to screen *S. meliloti* transformants are indicated. (b) Characterization of the first homologous recombination mutation by PCR. Two first-homologous recombination transformants F1 (lane 1 and 5), F2 (lane 2 and 6), pMJC4 (lane 3 and 7) and wild type Rm1021 (lane 4 and 8) were firstly screened by PCR with specific primers B1 and B2 (lanes 1~4) and then confirmed with primers P1 and P4 (lanes 5~8). Molecular mass markers were indicated in right margins. (c) Construction of  $\Delta SmdesA$  mutations were assayed by colony PCR. Three  $\Delta SmdesA$  transformants S1 (lane 2 and 6), S2 (lane 3 and 7), S3 (lane 4 and 8) and wild type Rm1021 (lane 1 and 5) were firstly screened by PCR with specific primers A1 and A2 (lanes 1~4) and then confirmed by PCR with P5 and P6 (lanes 5~8).

为了检测 *SmdesA* 突变是否影响苜蓿中华根瘤菌的脂肪酸合成, 我们抽提了  $\Delta desA$  突变株、互补菌株与野生型菌株的脂肪酸, 甲酯化之后通过 GC-MS 测定各菌株的脂肪酸组成, 结果如表 2 所示. 苜蓿中华根瘤菌细胞中含有大量的不饱和脂肪酸, 其中以 C18:1 的不饱和脂肪酸为主, 野生型菌株的不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸之比(UFA:SFA)为 3.34. 当 *SmdesA* 完全缺失突变后, 其 UFA:SFA 下降为 2.85, 且  $\Delta desA$  突变株中棕榈油酸(16:1)和十八碳烯酸(18:1)的含量都有小幅的下降, 但无统计学意义; 与野生型菌株相比,  $\Delta desA$  突变株棕榈酸(16:0)的含量有显著性升高, 而硬脂酸(18:0)的含量则有显著性降低(表 2). 这

**Table 2 Fatty acid composition of *S. meliloti* wild type, mutant strain and revertant strain**

Fatty acid	Wild-type	$\Delta desA$	$\Delta desA/pMJC3$
C14:0	8.03±0.19	10.16±1.03	8.74±0.35
C16:1	4.53±0.04	4.15±0.04	4.28±0.08
C16:0	8.90±0.61	12.25±0.46 <sup>a)</sup>	10.36±0.59 <sup>b)</sup>
C18:1	71.52±1.19	69.11±0.86	70.75±1.09
C18:0	5.83±0.27	3.34±0.14 <sup>a)</sup>	4.99±0.29 <sup>b)</sup>
UFA:SFA	3.34	2.85	3.11

<sup>a)</sup> $P < 0.01$ , compared with wild-type. <sup>b)</sup> $P < 0.05$ , compared with wild-type.

表明, *SmdesA* 确实参与不饱和脂肪酸的合成, 对苜蓿中华根瘤菌脂肪酸的不饱和度有一定的贡献, 但 *SmdesA* 所介导的途径并非合成不饱和脂肪酸的主要途径.

#### 2.4 *SmdesA* 缺失突变对菌株生长的影响

上述脂肪酸组成分析表明, 苜蓿中华根瘤菌脂肪酸组成中有极高的不饱和度, 十八碳烯酸的含量高达 70% 左右, 这是否预示着苜蓿中华根瘤菌不饱和脂肪酸在应对冷胁迫等逆境时发挥重要作用. 为此我们测定了在不同生理条件下, *SmdesA* 缺失突变对苜蓿中华根瘤菌生长的影响, 结果如表 3 所示. 在正常生理条件下 *SmdesA* 的缺失突变并没有明显影响苜蓿中华根瘤菌的生长表型, 但在低温 (12°C) 和高盐 (2.5% NaCl) 条件下,  $\Delta desA$  突变株的代时较野生型菌株均显著延长了 1 倍左右. 另外, 在酸性 (pH 5.0) 和碱性 (pH 8.2) 条件下, *SmdesA* 缺失对菌株的生长不具有显著性影响, 代时基本接近

野生型菌株. 由此我们推测 SmDesA 脱饱和酶通过改变不饱和脂肪酸组成调节细胞的流动性来影响苜蓿中华根瘤菌的抗逆性.

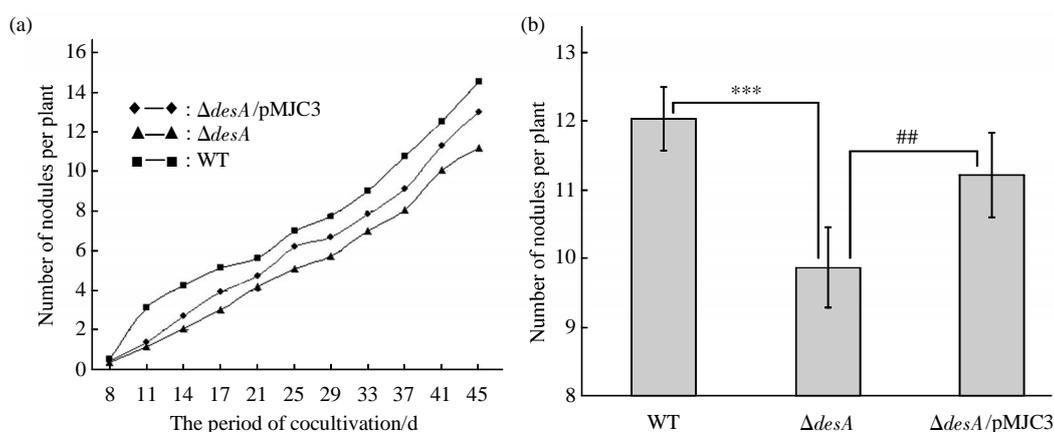
#### 2.5 *SmdesA* 缺失突变对宿主植物结瘤的影响

根瘤菌与共生植物之间的共生结瘤是其最重要的生理性状以及在农业生产中起十分重要的作用, 结瘤率是苜蓿中华根瘤菌的重要生理指标. 为了探讨 *desA* 基因突变对其结瘤能力的影响, 本研究将苜蓿中华根瘤菌 Rm1021、 $\Delta desA$  和  $\Delta desA/pMJC3$  回接到宿主植物紫花苜蓿的幼根, 通过试管栽培和土壤栽培分析各菌株与紫花苜蓿共生结瘤情况. 试管栽培结瘤实验结果如图 4a 所示, 与野生型 Rm1021 相比,  $\Delta desA$  和  $\Delta desA/pMJC3$  菌株均在接种后第 8~11 天开始结瘤,  $\Delta desA$  菌株每次统计的平均结瘤数明显低于野生型 Rm1021, 这说明了苜蓿中华根瘤菌的 *desA* 基因突变后会影响到其与苜蓿植物的共生结瘤; 而  $\Delta desA/pMJC3$  菌株平均结瘤数也低于野生型 Rm1021, 这表明 *desA* 基因过量表达能部分恢复  $\Delta desA$  菌株与苜蓿植物的结瘤能力, 但由于  $\Delta desA/pMJC3$  菌株生长受 IPTG 诱导调控而影响了最终的结瘤率. 土壤栽培结瘤实验结果与试管栽培结瘤实验基本一致 (图 4b), 野生型 Rm1021、 $\Delta desA$  和  $\Delta desA/pMJC3$  菌株的平均结瘤数分别为 12.0 个/株、9.8 个/株和 11.2 个/株, 统计分析表明, 突变菌株的结瘤率明显比野生型菌株低 ( $P < 0.001$ ), 这表明 *SmdesA* 缺失突变使苜蓿中华根瘤菌的结瘤能力降低.

**Table 3** Generation time of *S. meliloti* wild-type, mutant strain and revertant strain

Culture conditions	Wild-type	$\Delta desA$	$\Delta desA/pMJC3$
30°C, pH 6.5, 0.1% NaCl	5.26±0.94	7.86±1.10	5.39±0.91
12°C, pH 6.5, 0.1% NaCl	12.12±2.43	24.35±1.30 <sup>a)</sup>	12.59±1.62
30°C, pH 6.5, 2.5% NaCl	5.64±0.62	10.79±0.91 <sup>a)</sup>	7.02±0.45
30°C, pH 8.2, 0.1% NaCl	6.03±1.41	8.46±1.20	8.03±1.22
30°C, pH 5.0, 0.1% NaCl	3.38±0.10	3.79±0.24	3.61±0.11

<sup>a)</sup>  $P < 0.01$ , compared with wild-type.



**Fig. 4** Analysis of effective nodules' number of alfalfa by applying *S. meliloti* Rm1021,  $\Delta desA$  and  $\Delta desA/pMJC3$

(a) Statistics of nodules' number of alfalfa inoculated with *S. meliloti* Rm1021,  $\Delta desA$  and  $\Delta desA/pMJC3$  in culture tube, each strain inoculation of 10 plants. (b) Nodules' number of alfalfa cultured for 50 days in soil cultivation after inoculated with *S. meliloti* stains, each bacteria inoculated 72 plants cultured in 8 plastic flower pots (9 plants every pot). \*\*\* $P < 0.001$ ,  $\Delta desA$  vs wild-type, ## $P < 0.01$ ,  $\Delta desA$  vs  $\Delta desA/pMJC3$ . The data is presented as the  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=9$ .

### 3 结论与讨论

细菌不饱和脂肪酸合成的脱饱和途径是通过脱饱和酶对已经存在的脂肪酸进行需氧的脱饱和, 如枯草芽孢杆菌的脱饱和酶 *DesA* 是在 16:0 脂肪酸的  $\Delta 9$  位置引入双键, 该脱饱和酶的表达是受低温诱导的<sup>[7]</sup>. 在铜绿假单胞菌中存在两条不同的脱饱和酶途径: *DesA* 在膜磷脂 sn-2 位置脂酰链的  $\Delta 9$  部位引入不饱和双键, 可以补偿厌氧的 *FabA-FabB* 从头合成途径; *DesB/C* 将游离的硬脂酰辅酶 A (18:0-CoA) 脱饱和为十八碳酰辅酶 A (18:1-CoA), 并通过酰基甘油磷酸转移酶 (*PlsB/C*) 进入细胞膜, 其表达受 *DesT* 翻译阻遏物的抑制<sup>[8]</sup>. 生物信息学表明, 苜蓿中华根瘤菌中存在 *desA* 同源基因, 且 *SmDesA* 中含有脂肪酸脱饱和酶家族的 3 个关键性的保守基序: 1 个  $HX_3H$  基序以及 2 个  $HXXHH$  基序. 因此, 我们推测中华苜蓿根瘤菌基因组中标注为 *desA* 基因编码的蛋白很可能就是该细菌的脂肪酸脱饱和酶, 生物信息学的数据还需要相关实验数据的支持, 而 *desA* 基因的功能尚未有报道.

本课题组通过异体遗传互补和脂肪酸组成分析研究了 *SmdesA* 的生物学特性, 在不添加外源不饱和脂肪酸的条件下 *SmdesA* 不能恢复 *CY57* 突变株的生长, 究其原因可能是由于底物专一性或者是酶的活力不足, 从而使互补菌株不能合成足够的饱和脂肪酸来弥补大肠杆菌 *fabA* 的缺失, 用于维持细胞的生长, 类似的情况在其他细菌脂肪酸合成系统的相关基因中都有报道<sup>[2, 25-26]</sup>. 同位素标记薄层层析分析证明了这一观点, 在添加诱导剂阿拉伯糖的条件下, 携带有 *SmdesA* 的 *CY57* 菌株的确能够产生饱和脂肪酸, 并且合成的种类与大肠杆菌野生型 *MG1655* 一致(图 3). 脂肪酸组成测定表明虽然  $\Delta desA$  突变株中棕榈油酸(16:1)和十八碳烯酸(18:1)的含量较野生型均有小幅的下降, 但不饱和度(ratio of unsaturated fatty acid, 主要饱和脂肪酸与饱和脂肪酸含量的比值, UFA/SFA)与野生型菌株相差不大(表 2). 本课题前期研究显示, 苜蓿中华根瘤菌 *SmfabA* 和 *SmfabB* 是从头合成饱和脂肪酸的关键酶, *SmfabA* 和 *SmfabB* 的缺失致死性说明从头合成途径是苜蓿中华根瘤菌的主要饱和脂肪酸合成途径<sup>[2]</sup>. 因此我们推测 *SmdesA* 参与的脱饱和途径可能是苜蓿中华根瘤菌饱和脂肪酸合成的补偿途径.

枯草芽孢杆菌的脱饱和酶 *BsDesA* 是跨膜蛋

白, 其表达是受低温诱导, 在该菌应对冷胁迫等逆境时发挥重要的作用<sup>[7]</sup>. 苜蓿中华根瘤菌的共生结瘤固氮以及应对逆境胁迫作用均与生物膜中的饱和脂肪酸密切相关, *SmdesA* 的缺失突变后没有明显影响正常生理条件下的生长表型, 但在低温和高盐的条件下,  $\Delta desA$  突变株的代时显著增加, 生长受到了抑制(表 3). 我们推测 *SmdesA* 通过将细胞膜上饱和脂肪酸脱饱和和形成饱和脂肪酸, 影响细胞膜的流动性和 LPS 种类以及细胞膜通道的通透性, 从而在应对冷胁迫和高渗透压等逆境中发挥一定的作用. 在酸性条件下, 野生型和突变株都出现了生长加快的情况, 这可能与苜蓿中华根瘤菌能够分泌一些碱性物质来调节生存环境中的 pH 有关<sup>[27]</sup>. 根瘤菌根瘤的形成是由豆科植物的根茎分泌黄酮类或异黄酮类物质, 随后激活根瘤菌中结瘤相关基因 (*nod*, *nol* 和 *noe*) 的表达, 这些基因编码的结瘤蛋白进而合成根瘤菌的结瘤因子(LCOs). 结瘤因子由 3~5 个  $\beta$ -1,4 糖苷键连接的乙酰氨基葡萄糖构成其基本骨架, 在非还原端酰胺基团脱乙酰基的氨基上连接一个  $C_{16-20}$  的多饱和脂肪酸. 豆科植物凝集素能与根瘤菌的酸性荚膜多糖(EPS/CPS)、脂多糖(LPS)产生相互作用, 在根瘤菌与植物根毛的识别过程中, 起着重要的调控作用, 另外凝集素可以与根瘤菌结瘤因子的寡聚丁质部分或者脂肪酸链特异性结合, 参与到共生结瘤过程中<sup>[28]</sup>. 本研究表明 *desA* 缺失突变致使苜蓿中华根瘤菌宿主结瘤能力显著地降低(图 4), 我们推测虽然 *DesA* 并非合成饱和脂肪酸的关键酶, 但确实参与苜蓿中华根瘤菌的饱和脂肪酸的合成, 从而影响了该菌结瘤因子脂酰基的形成以及共生结瘤能力. 对根瘤菌 2D 电泳的分析表明, 一些涉及到维生素合成及与逆境胁迫相关的蛋白在根瘤菌结瘤过程中起重要作用, 而且其中某些蛋白仅在根瘤菌中发现<sup>[29]</sup>. 细菌有着复杂的代谢调控网络, 一个蛋白往往参与到多个代谢途径中, 应对不同外界环境的变化. 苜蓿中华根瘤菌 *DesA* 虽然不是饱和脂肪酸合成的关键酶, 但其在应对逆境胁迫和共生结瘤过程具有重要的生物学意义.

### 参 考 文 献

- [1] Cronan J E Jr, Birge C H, Vagelos P R. Evidence for two genes specifically involved in unsaturated fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1969, **100**(2): 601-604
- [2] 胡 喆, 马金成, 蒋晶晶, 等. 苜蓿中华根瘤菌 *fabA* 和 *fabB* 基因功能的鉴定. *生物化学与生物物理进展*, 2013, **40**(11): 1148-1159

- Hu Z, Ma J C, Jiang J J, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2013, **40**(11): 1148-1159
- [3] Marrakchi H, Choi K H, Rock C O. A new mechanism for anaerobic unsaturated fatty acid formation in *Streptococcus pneumoniae*. J Biol Chem, 2002, **277**(47): 44809-44816
- [4] Wada H, Gombos Z, Murata N. Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation. Nature, 1990, **347**(6289): 200-203
- [5] Heppard E P, Kinney A J, Stecca K L, *et al.* Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal omega-6 desaturase genes in soybeans. Plant Physiol, 1996, **110**(1): 311-319
- [6] Somerville C. Direct tests of the role of membrane lipid composition in low-temperature-induced photoinhibition and chilling sensitivity in plants and cyanobacteria. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, **92**(14): 6215-6218
- [7] Aguilar P S, Cronan J E Jr, De Mendoza D. A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. J Bacteriol, 1998, **180**(8): 2194-2200
- [8] Zhu K, Choi K H, Schweizer H P, *et al.* Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol, 2006, **60**(2): 260-273
- [9] 刘影, 朱家璧, 俞冠翹, 等. 苜蓿中华根瘤菌烯脂酰 ACP 还原酶基因 *fabII* 的功能研究. 科学通报, 2009, **54**(24): 3830-3833  
Liu Y, Zhu J B, Yu G Q, *et al.* Chin Sci Bull, 2009, **54**(24): 3830-3833
- [10] Meade H M, Long S R, Ruvkun G B, *et al.* Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. J Bacteriol, 1982, **149**(1): 114-122
- [11] Galibert F, Finan T M, Long S R, *et al.* The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Science, 2001, **293**(5530): 668-672
- [12] Finan T M, Weidner S, Wong K, *et al.* The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N<sub>2</sub>-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, **98**(17): 9889-9894
- [13] Capela D, Barloy-Hubler F, Gouzy J, *et al.* Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, **98**(17): 9877-9882
- [14] Barnett M J, Fisher R F, Jones T, *et al.* Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, **98**(17): 9883-9888
- [15] 郑会明, 钟增涛, 陈一楠, 等. 根瘤菌与群体感应. 生态学杂志, 2005, **24**(05): 547-550  
Zheng H M, Zhong Z T, Chen Y N, *et al.* Chin J Ecol, 2005, **24**(5): 547-550
- [16] Zhu L, Lin J, Ma J, *et al.* Triclosan resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is due to FabV, a triclosan-resistant enoyl-acyl carrier protein reductase. Antimicrob Agents Chemother, 2010, **54**(2): 689-698
- [17] Cronan J E Jr. Regulation of the fatty acid composition of the membrane phospholipids of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA, 1974, **71**(9): 3758-3762
- [18] 王玉琪, 孙益嵘, 陈艺彩, 等. 粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*) $\beta$  酮脂酰 ACP 合成酶 II 同源蛋白功能分析. 生物化学与生物物理进展, 2007, **34**(08): 844-850  
Wang Y Q, Sun Y R, Chen Y C, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2007, **34**(08): 844-850
- [19] Dennis J J, Zylstra G J. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. Appl Environ Microb, 1998, **64**(7): 2710-2715
- [20] Schafer A, Tauch A, Jager W, *et al.* Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. Gene, 1994, **145**(1): 69-73
- [21] Ulrich A K, De Mendoza D, Garwin J L, *et al.* Genetic and biochemical analyses of *Escherichia coli* mutants altered in the temperature-dependent regulation of membrane lipid composition. J Bacteriol, 1983, **154**(1): 221-230
- [22] Wang H, Cronan J E. *Haemophilus influenzae* Rd lacks a stringently conserved fatty acid biosynthetic enzyme and thermal control of membrane lipid composition. J Bacteriol, 2003, **185**(16): 4930-4937
- [23] Wang H, Cronan J E. Only one of the two annotated *Lactococcus lactis* *fabG* genes encodes a functional beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase. Biochemistry, 2004, **43**(37): 11782-11789
- [24] Wang H, Cronan J E. Functional replacement of the FabA and FabB proteins of *Escherichia coli* fatty acid synthesis by *Enterococcus faecalis* *FabZ* and *FabF* homologues. J Biol Chem, 2004, **279**(33): 34489-34495
- [25] Heath R J, Rock C O. A triclosan-resistant bacterial enzyme. Nature, 2000, **406**(6792): 145-146
- [26] McMurry L M, Oethinger M, Levy S B. Triclosan targets lipid synthesis. Nature, 1998, **394**(6693): 531-532
- [27] Zahran H H. *Rhizobium-legume* symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Microbiol Mol Biol Rev, 1999, **63**(4): 968-989
- [28] Geiger O, Thomas-Oates J E, Glushka J, *et al.* Phospholipids of *Rhizobium* contain nodE-determined highly unsaturated fatty acid moieties. J Biol Chem, 1994, **269**(15): 11090-11097
- [29] Djordjevic M A. *Sinorhizobium meliloti* metabolism in the root nodule: A proteomic perspective. Proteomics, 2004, **4**(7): 1859-1872

## Identification and Function Research of *desA* of *Sinorhizobium meliloti*\*

MA Jin-Cheng, ZHOU Jun-Chao, WU Chu-Yun, HU Zhe, WANG Hai-Hong\*\*

(College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Protein Function and Regulation in Agricultural Organisms, Guangzhou 510642, China)

**Abstract** Unsaturated fatty acids play important roles in *Sinorhizobium meliloti* adaptation to external environment stress and symbiotic nodulation. The symbiotic plasmid A of *S. meliloti* encodes a DesA homologue, which has 44% identity to *Bacillus subtilis* DesA. However, whether *S. meliloti* DesA is able to play functions in fatty acid synthesis was not determined. We report that though *SmdesA* gene could not restore the growth of *E. coli fabA* temperature sensitive mutant CY57 under non-permissive conditions, argentation thin layer chromatography assay show that CY57 carrying *desA* encoded plasmid could produce palmitoleic acid and octadecadienoic acid. This indicate that *SmdesA* encodes acyl-lipid desaturase. In addition, deletion of *SmdesA* gene have led to a little effects on the fatty acid composition of *S. meliloti*, but show a significant impact on growth rate in low temperature and high salt conditions, and the ability of alfalfa symbiotic nodulation. DesA is not the key enzyme of unsaturated fatty acid synthesis of *S. meliloti*, but it plays important biological roles in *S. meliloti* dealing with environment stress and nodular process.

**Key words** *Sinorhizobium meliloti*, unsaturated fatty acids synthesis, fatty acid desaturase, DesA

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2015.0101

---

\*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31200028, 31471743) and The Natural Science Foundation of Guangdong Province (2014A030313455).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-20-85281389, E-mail: wanghh36@scau.edu.cn

Received: April 13, 2015 Accepted: July 14, 2015