

耐辐射奇球菌中多效蛋白 PprA 功能的研究进展

范美婷 马云 何淑雅

【摘要】 耐辐射奇球菌(DR)是研究辐射抗性的模式生物, PprA 蛋白(pleiotropic protein promoting DNA repair)是 DR 中一种特有的、促进 DNA 修复的多效蛋白。笔者对 PprA 蛋白在 DNA 损伤修复和维持基因组稳定性等方面的功能进行了综述, 另通过运用生物信息学方法预测其结构域及与 PprA 蛋白相互作用的蛋白, 进一步了解其发挥作用的机制和途径。

【关键词】 PprA 蛋白; DNA 损伤修复; 基因组稳定; 辐射, 电离; 生物信息学; 耐辐射奇球菌

Research progress and prediction on pleiotropic protein PprA from *Deinococcus radiodurans* Fan Meiting*, Ma Yun, He Shuya. *Department of Radiation Medicine, School of Public Health, University of South China, Hengyang 421001, China

Corresponding author: He Shuya, Email: skyhe2000@Hotmail.com

【Abstract】 *Deinococcus radiodurans* (DR) is a model organism to study radiation resistance. PprA protein (pleiotropic protein promoting DNA repair) is a unique, pleiotropic protein promoting DNA repair in DR. This article reviewed its possible function in DNA damage repairing, maintenance of genome stability and other aspects. Furthermore, we analyze its domain of pprA genes and by bioinformatics and predict interaction protein with PprA protein, in order to predict its function and understand the mechanisms and pathways it plays.

【Key words】 PprA protein; DNA damage repair; Genome stability; Radiation, ionizing; Bioinformatics; *Deinococcus radiodurans*

耐辐射奇球菌(*Deinococcus radiodurans*, DR)是一种红色、非致病性的革兰氏阴性菌, 对电离辐射、紫外线、干燥和过氧化氢等一些其他 DNA 损伤因素都具有极强抗性。DR 是 1956 年由美国科学家 Anderson 等^[1]在经辐照灭菌后仍然变质的肉罐头中首次分离出来的, 是地球上发现的辐射抗性最强的生物之一。DR 并不具有特别的保护 DNA 不受辐射损伤的机制, 其超强的辐射抗性主要得益于高效准确的 DNA 修复能力^[2-3]。另外, DR 超强的辐射抗性与其特殊的细胞结构^[4]、超强的抗氧化能力^[5]以及细胞清除能力^[6]密不可分。

White 等^[7]在 1999 年公布了 DR 最常用的一个菌 R1 的完全基因组序列。DR R1 基因组由 4 个环状分子构成, 包括 2 条染色体, 一大一小 2 个质

粒, 全长 3 284 156 bp, 共携有 3197 个可预测基因, 其中功能未知的独特基因有 1002 个。在这 1002 个独特的基因中, *pprA* 基因(pleiotropic gene promoting DNA repair)是于 1998 年由杜泽吉等^[8]首次在 DR 中发现并克隆。PprA 蛋白是 DR 中独有的功能未知的一种多效蛋白, *pprA* 基因在促进 DNA 损伤修复和维持基因组的稳定性等方面可能发挥重要作用, 但机制不清, 且推测其作用可能涉及其他方面。

1 促进 DNA 损伤修复

在 DR 中发现并克隆 *pprA* 基因之后, 到目前为止, 在已有的数据库里还没有找到与其同源的模式。Devigne 等^[9]的体外实验表明, *pprA* 基因产物能够优先与双链断裂的 DNA 结合, 抑制大肠杆菌核酸外切酶 III 的活性, 并刺激 ATP 依赖性假定蛋白 DRB0100 和辅酶 I (NAD)依赖性的 DNA 连接酶以及 T4 连接酶^[10]催化的 DNA 的末端连接反应。PprA 的作用类似于真核的 Ku 蛋白, 推测 PprA 在 DR 中参与非同源重组的末端连接(nonhomologous

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2015.02.010

基金项目: 国家自然科学基金(81272993)

作者单位: 421001 衡阳, 南华大学公共卫生学院放射医学教研室(范美婷, 何淑雅); 421001 衡阳, 南华大学生物化学与分子生物学教研室(马云, 何淑雅); 421001 衡阳, 湖南省分子靶标新药协同创新中心(马云, 何淑雅)

通信作者: 何淑雅(Email: skyhe2000@Hotmail.com)

end joining, NHEJ)^[10], 在 DNA 损伤修复中发挥重要作用。但是 NHEJ 在 DR 中从未在实验上成立过, DR 中是否存在 NHEJ 也存在争议^[11]。Tanaka 等^[12]研究证实, *pprA* 基因产物是 DR 辐射抵抗所必需的, 并且认为 PprA 能促进同源重组修复过程的顺利进行。电离辐射和紫外线辐照后 PprA 高度表达^[13], *pprA* 突变株比野生株生长缓慢, 且对电离辐射、紫外线、丝裂霉素 C 高度敏感。 $\Delta pprA$ - $\Delta recA$ 双突变株与 *recA* 单突变株辐射抗性相当, 表明 PprA 可能与 RecA 存在相互作用, 可能通过同一途径发挥作用。进一步的实验表明, $\Delta pprA$ - $\Delta recA$ 双突变株 DNA 片段重组的慢动力学与 $\Delta recA$ 单突变株的一样, 提示 PprA 在 RecA 依赖的重组修复中并不占有重要地位^[9]。在自然状态下, *pprA* 基因产物在同源重组中是非必要的, 但尽管如此, 在辐射损伤的修复过程中, PprA 可能参与 RecA 依赖的修复过程^[9]。最近的研究表明, *pprA* 突变株对 γ 照射极度敏感, 而回补 *pprA* 基因能够恢复其对 γ 照射的抗性^[14]。

辐射造成 DNA 损伤后, PprI 感受到损伤信号后上调 RecA 与 PprA 蛋白的表达; RecA 通过与 DNA 损伤后产生的单链片段结合而被激活, 从而促进 LexA1 与 LexA2 的裂解; 被 LexA2 下调的某未知蛋白表达量升高而进一步增强 *pprA* 启动子的活性。细胞最终通过 RecA 蛋白参与的重组修复与 PprA 蛋白参与的末端连接修复来应对辐射造成的 DNA 损伤^[15]。但是 *recA* 与 *pprA* 却都只能部分回补 *pprI* 突变株的电离辐射抗性, 表明 PprI 在响应辐射损伤应答时很可能调控其他修复基因的参与。而且 Lu 等^[15]通过比较 DR 野生型与 *pprI* 突变株在辐射前后的蛋白组差异后发现, 作为低剂量电离辐射下的应答, *pprI* 基因存在时, RecA 与 PprA 在内的 31 种蛋白表达量显著上调, 染色体免疫共沉淀实验证实, PprI 蛋白能够与 *recA* 和 *pprA* 的启动子结合^[16]。

PprA 作为一种 DNA 结合蛋白, 可以通过与其他蛋白相互作用发挥抗辐射功能。Das 等^[17]发现一种蛋白 DRA0282, 该蛋白为一种双链 DNA 结合蛋白, 该蛋白缺失突变株的辐射生存率比野生菌株降低约 10 倍, 而 $\Delta pprA$ 缺失突变体和 $\Delta pprA$ - $\Delta dra0282$ 双缺失突变株在相同的辐射剂量下其生存率则降低了 100 倍, 因此推测 DRA0282 主要作

用于 *pprA* 介导的 DNA 损伤修复过程。

PprA 在电离辐射和干燥后高度表达, 并且能够被 LexA2^[18]、*pprM*^[19]和 RecX^[20]所抑制, 与 LexA2 下调导致 *pprA* 启动子的活性增强相对应。而且 PprM 属于 PprI 依赖的信号转导途径, PprI 能够调控 PprM 的表达^[18]。*pprA* 在体内外都能够介导刺激大肠杆菌还原酶 KatE 的表达, 大肠杆菌中过表达 *pprA* 能够使其对过氧化氢抗性增强 2 到 3 倍^[21]。但是目前没有相关实验表明 DR 中 *pprA* 介导 KatE 的表达。

另外有研究证实, $\Delta pprA$ - $\Delta rqaA$ (RqaA、DR2518、真核型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶)双缺失突变株增强了 $\Delta pprA$ 单突变株的辐射敏感性, 但是与 $\Delta rqaA$ 单缺失突变株的辐射抗性相似, 表明磷酸化的 PprA 在 DR 辐射抵抗中发挥作用。PprA 磷酸化可能增强了其与 DNA 的亲合力, 提高了 T4 DNA 连接酶在分子间连接的支撑作用^[22]。

通过分析 PprA 与双链 DNA 的相互作用发现, PprA 结合到 DNA 双链断裂处与 PprA 浓度有关。当 PprA 浓度大于 1.3 $\mu\text{mol/L}$ 时, PprA 形成大的分子复合物^[23]。

2 维持基因组的稳定性

近来发现, PprA 有助于 DR 抵抗萘啶酮酸(一种拓扑异构酶 II、IV 抑制剂), 并且在 DNA 损伤后, PprA 能够与 DR 拓扑异构酶相互作用, 纯化的 PprA 蛋白能增强 IB 型拓扑异构酶(DraTopoIB)催化 DNA 超螺旋的松散, 有利于维护基因组的稳定性^[24]。

辐射和干燥处理后, *ddrA* (DR0423)、*ddrB* (DR0070)、*ddrC*(DR0003)、*ddrD*(DR0326)和 *pprA* 的转录明显升高^[12], 在 $\Delta ddrA$ 及 $\Delta ddrD$ 背景下引入 *pprA* 缺失的菌株对致死剂量的紫外线照射极度敏感, 在 1000 J/m² 的紫外线照射下, $\Delta ddrA$ - $\Delta pprA$ 和 $\Delta ddrD$ - $\Delta pprA$ 双缺失突变株比 $\Delta pprA$ 单缺失突变株的敏感性分别增加了 100 倍和 1000 倍。这些结果表明, PprA 可能在功能上与 DdrA 和 DdrD 有重复, 可能是因为它们具有相同的催化功能或者它们在独立的过程中对紫外线照射具有相同的影响。同源重组和切除修复在紫外线介导下的 DNA 损伤启示我们, DdrA、DdrD 和 PprA 可能在这些过程中发挥作用。在 DR 中 DdrA^[25-26]结合到 DNA 链末

端防止 DNA 在高剂量电离辐射下被内源性核酸外切酶降解, DdrA 可能是 DNA 末端保护系统的一部分, 能够协助维持 DNA 损伤后基因组的稳定性。因此, DdrA 和 PprA 对紫外线损伤修复共同发挥作用。但是 DdrD 和 PprA 在紫外线抗性中似乎是独立过程的两个成员, DdrD 似乎在电离辐射抗性中仅仅是个小角色。推测这 3 种蛋白通过维持基因组的稳定性, 为 DR 提供足够长的修复时间^[27]。通过将 *Deinococcus deserti* 暴露于 3 kGy γ 照射后分析可溶性蛋白质组学发现^[27], 在照射后的第一个阶段 DNA 损伤相应蛋白 DdrB、SSB 和两种不同的 RecA 蛋白 (RecAP 和 RecAC) 出现积聚, PprA、DdrD 和两种解旋酶亚基 (GyrA 和 GyrB) 也能够被检测到。PprA、DdrD、DdrB、SSB、RecA 和解旋酶出现在辐照修复早期, 推测可能参与辐射早期修复途径。

最近的研究表明, 在正常条件下, PprA 在拟核及其他位置均有定位, 但是在辐射修复早期 PprA 定位于拟核内, 4 Gy 辐射 2 h 后细胞恢复增长, PprA 开始出现于其他位置。羧定酮酸处理后, PprA 跨越拟核开始扩散。DR Δ *gyrA* 突变株表现出生长抑制, Δ *gyrA*- Δ *pprA* 双突变株表现出更明显的抑制。有趣的是 Δ *gyrA*- Δ *pprA* 双突变株对 γ 射线的辐射抗性是野生株的 1/20, 但是与 Δ *gyrA* 单突变株的辐射抗性类似。根据 PprA 在辐射后定位的动态改变以及其与解旋酶 A 功能的相互作用, 推测 PprA 与解旋酶 A 有共同通路, 可能通过拓扑异构酶 II 在子代细胞基因组分离的保真性中起作用^[14]。*ddrO* 的缺失会使 PprA 与 GyrA 蛋白高表达, PprA 与 GyrA 都受到 DdrO 的负性调控, 进一步说明两者在功能上的一致性^[28]。

3 PprA 蛋白功能预测

为了进一步分析 PprA 在 DR 中发挥作用的机制和途径, 我们从其结构出发, 利用生物信息学对其结构域进行分析, 推测其功能。利用 CDD (Conserved domains Database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 在线工具对 *pprA* 基因的结构域进行分析, 发现其结构域中有 3 种预测 E-value 值小于 10^{-5} , 分别是在其 85~840 个碱基处的 COG4941 domain, 预测 E-value 值为 $1.37e-06$, 预测含有 TPR 重复结构域的 RNA 聚合酶 σ 因子, 与基因 DNA 的遗传信息转录为 RNA 相关; 在 140~

685 个碱基中含有 RecX 超家族结构域, 预测 E-value 值为 $2.44e-06$, RecX 是一种假定的细菌调节蛋白, 编码 RecX 的基因位于 *recA* 下游, 且与 RecA 蛋白存在相互作用; 在 138~854 个碱基中含有 PHA03307 domain, 预测 E-value 值为 $8.54e-06$, 具有转录调控功能; 另外还有 DUF566 超家族、PRP38_assoc 超家族、Cupin_2 超家族和 Protamine_P1 超家族, 预测 E-value 值大于 10^{-5} , 多为未知功能蛋白家族。推测 PprA 可能具有转录调控作用, 与 RNA 的合成有关, 且属于 RecX 超家族, 与 RecA 蛋白存在相互作用 (已有实验证实)。

此外我们还利用在线软件 STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, http://string-db.org/newstring.cgi/show_input_page.pl) 预测了与 PprA 相互作用的蛋白。通过分析, 选择中等可信得分 (4 分以上) 得到 19 个可能与 PprA 相互作用的蛋白, 而且这些蛋白之间也存在着相互作用, 构成了蛋白相互作用的网络 (图 1)。其关联越强, 线条越粗。虽然与 PprA 相互作用的 19 个蛋白得分不是很高, 但是根据已有文献报道可知, PprA 与其中的 LexA2 (DRA0074)^[18]、PprI^[15-16] (DR0167)、RecA (DR2340)^[16]、DdrA (DR0423)^[12,25-26] 和 GyrA (DR0906)^[14,28] 的关系非常密切, 说明所预测的结果可信。其中有 4 个蛋白是通过基因组的相关性得到的, 分别是位于 *pprA* 下游的 DRA0347 和 *aldA* (DRA0348), 分别编码具有水解酶活性的假定蛋白和参与代谢的乙醛脱氢酶 (*aldA*), 位于 *pprA* 上游的 *lexA* (DRA0344) 和 *orf144c* (DRA0345), 分别发挥抑制 DNA 的损伤修复和红霉素酯酶的作用, LexA 与 PprA 的关系已有实验证实。通过分析 PprA 相互作用的这 19 个蛋白质的功能, 分析 PprA 的功能涉及到: DNA 损伤修复、维持基因组稳定性、抗氧化、RNA 合成与修复和 DNA 合成等多个方面。其中 DNA 损伤修复、维持基因组稳定性已被文献报道所证实, 另外预测到的与 PprA 蛋白有相互作用的蛋白涉及到 RNA 连接酶、还原酶、tRNA 核苷酸基转移酶、乙醛脱氢酶等, 推测 PprA 可能参与到转录后加工等过程, 参与 DR 的代谢、抗氧化性、RNA 修复和 DNA 合成等。

综上所述, PprA 的文献提示功能、结构预测及相互作用预测功能本文总结见图 2。

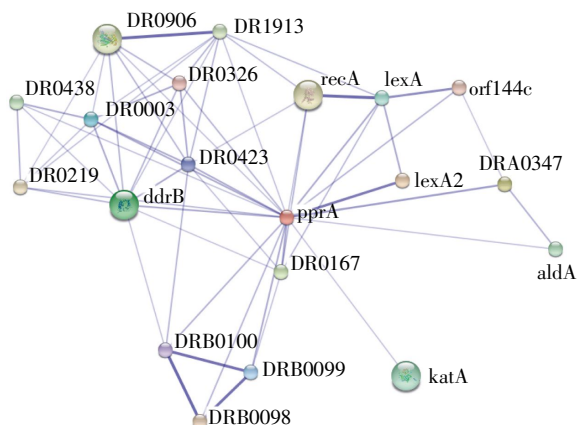


图1 STRING 预测 PprA 相互作用蛋白

Fig.1 Prediction interaction protein with PprA by STRING

4 总结与展望

PprA 是一种 DNA 结合蛋白，能够与多种蛋白发生相互作用，不仅能在辐射抗性方面发挥作用，也是维持基因组稳定性方面的重要成员。关于预测的 PprA 的氧化抗性、RNA 修复、DNA 合成等功能，虽然目前暂无实验数据支持，但不失为值得今后重点研究及关注的领域。

pprA 只是 DR 中一个相对重要的基因，DR 的辐射抗性不能单单归因于某一个方面，而是细胞内所有因素综合调控的结果。DR 的耐辐射损伤与修复是一个复杂的网络系统，各种基因与其表达的蛋白在网络中发挥各自的作用，保障了 DR 在高强度

辐射下的生存。PprA 蛋白结合免疫荧光技术，可用于哺乳动物细胞培养中可视化辐射诱导的 DNA 链断裂，从而用来评估 DNA 损伤应答。这种检测方法也适用于在环境和制药领域的基因毒性试验^[29]。随着转录组学等技术的发展，PprA 蛋白的调控机制研究将不断深入，对揭示 DNA 损伤的修复机理具有重要理论意义，进而对 DR 在环境保护、能源利用、农业生产和生物修复、人类健康等方面具有重要实践指导意义。

参 考 文 献

- [1] Anderson AW, Nordan HC, Can RF, et al. Studies on a radio-resistant micrococcus Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation[J]. Food Technol, 1956, 10(3): 575-578.
- [2] Minton KW. Repair of ionizing radiation damage in the radiation resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*[J]. Mutat Res, 1996, 363(1): 1-7.
- [3] Repar J, Cvjetan S, Slade D, et al. RecA protein assures fidelity of DNA repair and genome stability in *Deinococcus radiodurans* [J]. DNA Repair(Amst), 2010, 9(11): 1151-1161.
- [4] Levin-Zaidman S, Englander J, Shimoni E, et al. Ringlike structure of the *Deinococcus radiodurans* genome: a key to radioresistance? [J]. Science, 2003, 299(564): 254-256.
- [5] Ghosal D, Omelchenko MV, Gaidamakova EK, et al. How radiation kills cells: survival of *Deinococcus radiodurans* and *Shewanella oneidensis* under oxidative stress[J]. FEMS Microbiol Rev, 2005, 29(2): 361-375.

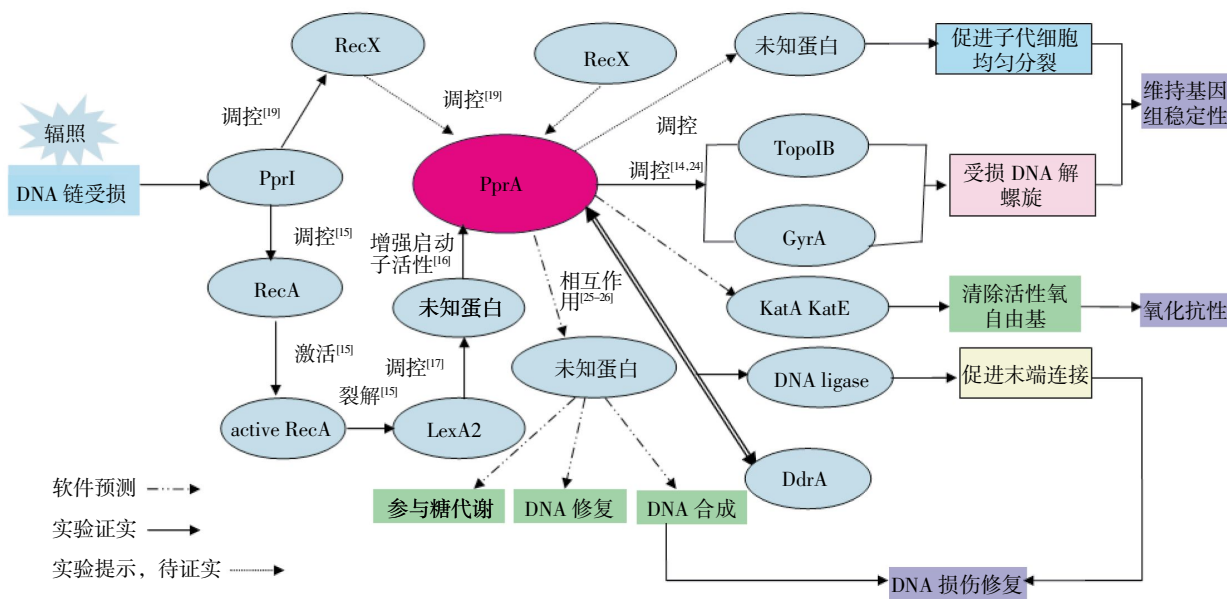


图2 辐照后耐辐射奇球菌 PprA 调控模型

Fig.2 PprA regulatory model from *Deinococcus radiodurans* after irradiated

- [6] Slade D, Lindner AB, Paul G, et al. Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans* [J]. *Cell*, 2009, 136(6): 1044–1055.
- [7] White O, Eisen JA, Heidelberg JF, et al. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1 [J]. *Science*, 1999, 286(5444): 1571–1577.
- [8] 杜泽吉, 田海林, 鸣海一成, 等. 抗辐射菌 *Deinococcus radiodurans* 一种新的 DNA 修复基因 *pprA* 的分子克隆测序及特性研究(英文)[J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 1998, 16(4): 26–32.
- [9] Devigne A, Mersaoui S, Bouthier-De-La-Tour C, et al. The PprA protein is required for accurate cell division of γ -irradiated *Deinococcus radiodurans* bacteria [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2013, 12(4): 265–272.
- [10] Narumi I, Satoh K, Cui S, et al. PprA: a novel protein from *Deinococcus radiodurans* that stimulates DNA ligation [J]. *Mol Microbiol*, 2004, 54(1): 278–285.
- [11] Zahradka K, Slade D, Bailone A, et al. Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans* [J]. *Nature*, 2006, 443(7111): 569–573.
- [12] Tanaka M, Earl AM, Howell HA, et al. Analysis of *deinococcus radiodurans*'s transcriptional response to ionizing radiation and desiccation reveals novel proteins that contribute to extreme radioresistance [J]. *Genetics*, 2004, 168(1): 21–33.
- [13] Liu Y, Zhou J, Omelchenko MV, et al. Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7): 4191–4196.
- [14] Kota S, Charaka VK, Misra HS. PprA, a pleiotropic protein for radioresistance, works through DNA gyrase and shows cellular dynamics during postirradiation recovery in *Deinococcus radiodurans* [J]. *J Genet*, 2014, 93(2): 349–354.
- [15] Lu H, Gao G, Xu G, et al. *Deinococcus radiodurans* PprI switches on DNA damage response and cellular survival networks after radiation damage [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8(3): 481–494.
- [16] Lu H, Chen H, Xu G, et al. DNA binding is essential for PprI function in response to radiation damage in *Deinococcus radiodurans* [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2012, 11(2): 139–145.
- [17] Das AD, Misra HS. Characterization of DRA0282 from *Deinococcus radiodurans* for its role in bacterial resistance to DNA damage [J]. *Microbiology*, 2011, 157(Pt 8): 2196–2205.
- [18] Satoh K, Ohba H, Sghaier H, et al. Down-regulation of radioresistance by LexA2 in *Deinococcus radiodurans* [J]. *Microbiology*, 2006, 152(Pt 11): 3217–3226.
- [19] Ohba H, Satoh K, Sghaier H, et al. Identification of PprM: a modulator of the PprI-dependent DNA damage response in *Deinococcus radiodurans* [J]. *Extremophiles*, 2009, 13(3): 471–479.
- [20] Sheng D, Jao J, Li M, et al. RecX is involved in the Switch between DNA damage response and normal metabolism in *D. radiodurans* [J]. *J Biochem*, 2009, 146(3): 337–342.
- [21] Kota S, Misra HS. PprA: A protein implicated in radioresistance of *Deinococcus radiodurans* stimulates catalase activity in *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72(4): 790–796.
- [22] Rajpurohit YS, Misra HS. Structure-function study of deinococcal serine/threonine protein kinase implicates its kinase activity and DNA repair protein phosphorylation roles in radioresistance of *Deinococcus radiodurans* [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(11): 2541–2552.
- [23] Adachi M, Hirayama H, Shimizu R, et al. Interaction of double-stranded DNA with polymerized PprA protein from *Deinococcus radiodurans* [J]. *Protein Sci*, 2014, 23(10): 1349–1358.
- [24] Kota S, Charaka VK, Ringgaard S, et al. PprA contributes to *Deinococcus radiodurans* resistance to nalidixic acid, genome maintenance after DNA damage and interacts with deinococcal topoisomerases [J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85288[2015-02-01]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0085288>.
- [25] Harris DR, Ngo KV, Cox MM. The stable, functional core of DdrA from *Deinococcus radiodurans* R1 does not restore radioresistance in vivo [J]. *J Bacteriol*, 2008, 190(19): 6475–6482.
- [26] Harris DR, Tanaka M, Saveliev SV, et al. Preserving genome integrity: the DdrA protein of *Deinococcus radiodurans* R1 [J/OL]. *PLoS Biol*, 2004, 2(10): e304[2015-02-01]. <http://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0020304>.
- [27] Selvam K, Duncan JR, Tanaka M, et al. DdrA, DdrD, and PprA: components of UV and mitomycin C resistance in *Deinococcus radiodurans* R1 [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69007[2015-02-01]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0069007>.
- [28] Devigne A, Ithurbide S, Bouthier de la Tour C, et al. DdrO is an essential protein that regulates the radiation desiccation response and the apoptotic-like cell death in the radioresistant *Deinococcus radiodurans* bacterium [J/OL]. *Mol Microbiol*, 2015[2015-03-05]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25754115>. [Epub ahead of print Mar J, 2015].
- [29] Satoh K, Wada S, Kikuchi M, et al. Method for detecting DNA Strand breaks in mammalian cells using the *Deinococcus radiodurans* PprA protein [J]. *Mutat Res*, 2006, 596(1–2): 36–42.

(收稿日期: 2015-03-07)