



口蹄疫病毒结构蛋白 VP1 容忍外源标签的能力

李平花, 马雪青, 寻广谨, 白兴文, 孙普, 袁红, 卢曾军, 刘在新*

中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 国家口蹄疫参考实验室,
甘肃 兰州 730046

摘要:【目的】利用口蹄疫病毒的反向遗传操作技术, 构建含不同外源标签口蹄疫病毒的全长克隆, 鉴定口蹄疫病毒结构蛋白 VP1 容忍不同外源标签的能力。【方法】通过融合 PCR 技术, 在 FMDV O/HN/93 全长感染性克隆的 VP1 G-H 环分别引入 V5、TC12、KT3、3FLAG 外源标签, 构建全长质粒。全长质粒经 *NotI* 线性化后转染表达 T7 RNA 聚合酶的稳定细胞, 拯救重组病毒。RT-PCR、序列测定、间接免疫荧光鉴定病毒, 噬斑和一步生长曲线分析重组病毒的生物学特性。【结果】成功拯救到表达 V5 或 KT3 表位标签的重组病毒, 未能拯救到表达 TC12 或 3×FLAG 的重组病毒。V5 和 KT3 表位标签的插入均影响了口蹄疫病毒的复制能力。【结论】重组口蹄疫病毒的成功拯救为未来标记疫苗以及口蹄疫病毒作为表达载体等的研究奠定了基础。

关键词: 口蹄疫病毒, 结构蛋白, 外源标签

口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)是严重威胁畜牧业发展的重大动物疫病, 其病原口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)在许多国家长期驻留, 不时引发疫情, 不仅给发病的国家和地区造成巨大的经济损失和家畜及其产品的贸易障碍, 而且给公共卫生和国家声誉造成严重的负面影响, 因此世界各国十分重视对该病的防控。

FMDV 属于小 RNA 病毒科(*Picornaviridae*)口蹄疫病毒属(*Aphthovirus*)。FMDV 粒子呈球形, 无囊膜, 由 20 面体对称的衣壳和一条单股正链 RNA

组成。病毒衣壳由 4 种结构蛋白 VP1、VP2、VP3 和 VP4 各 60 分子组成。其中 VP1、VP2、VP3 构成衣壳的表面, VP4 位于衣壳内部。FMDV 粒子 VP1 结构蛋白上有 1 个柔性的 β G- β H 环(130-160 位氨基酸), 该环不仅是 FMDV 诱导机体产生中和抗体的主要抗原位点^[1], 也是 FMDV 侵染细胞的关键区, 因为该区域含有高度保守的 Arg-Gly-Asp (RGD) 基序, 该基序介导病毒与细胞的整联蛋白(α V β 1、 α V β 3、 α V β 6 和 α V β 8 等)结合, 起始病毒的感染^[2]。

目前, 利用 RNA 病毒的反向遗传操作技术

基金项目: 甘肃省农业生物技术研究与开发项目(GNSW-2014-22); 甘肃省青年科技基金计划(1606RJYA256)

*通信作者。Tel/Fax: +86-931-8342587; E-mail: liuzaixin@caas.cn

收稿日期: 2016-08-29; 修回日期: 2016-10-14; 网络出版日期: 2016-12-08

构建含有表位标签的重组病毒,用于研究病毒的复制周期^[3]、病毒分离和浓缩技术^[4]、病毒标记疫苗^[5-6]、病毒蛋白和与宿主之间的相互作用^[7],病毒的示踪^[8-9]等方面显示了巨大的潜力。大量的研究表明FMDV VP1的G-H环可以容忍一些小标签[如FLAG(8aa)、HA(9aa)、6HIS]以及FMDV中和表位的插入^[10-13],含有这些标签或表位的重组FMDV为病毒的分离纯化、致病性以及FMD多价疫苗等的研究奠定了基础。本研究利用FMDV的反向遗传操作技术,在已构建的O型FMDV全长感染性cDNA克隆的骨架上,尝试在FMDV结构蛋白VP1的G-H环引入基因长度不同的一些外源标签(V5、TC12、KT3和3FLAG),构建重组的全长cDNA克隆,体内转染拯救重组病毒来鉴定FMDV结构蛋白VP1基因容忍不同外源标签的能力,进而为未来研究FMDV示踪、标记疫苗以及FMDV作为表达载体的研究提供技术支撑。

1 材料和方法

1.1 质粒和细胞

FMDV O/HN/93的全长感染性克隆 pOFS^[14]

和含该病毒基因1-5340 nt的pOZK-Z123^[14]为兰州兽医研究所宿主抗感染与免疫课题组构建保存。表达T7 RNA聚合酶的BSR/T7稳定细胞系由德国Karl-Klaus Conzelmann教授惠赠。BHK-21细胞为兰州兽医研究所宿主抗感染和免疫课题组保存。

1.2 试剂

RNA提取试剂盒购自QIAGEN公司;质粒抽提试剂盒、胶纯化回收试剂盒、扩增酶、限制性内切酶、T4连接酶、AMV反转录酶以及JM109感受态细胞购自大连宝生物有限公司;LipofectamineTM2000、DMEM购自Invitrogen公司。

1.3 引物

根据已构建的O/HN/CHA/93株全长序列,设计融合PCR引物(表1),由上海桑尼生物技术有限公司合成。

1.4 含标签口蹄疫病毒全长质粒的构建

标签基因的插入采用融合PCR技术。以pOZK-Z123质粒为模板,分别用OZ2903(+)/RKT3(-)、OZ2903(+)/RV5(-)、OZ2903(+)/R3FLAG(-)和OZ2903(+)/RTC12(-)4对引物扩增A1-A4

表 1. 构建重组病毒所用引物

Table 1. Primers used for the construction of the recombinant virus

Primer names	Primer sequences (5'→3')
OZ2903(+)	CAACCTACACTTCATGTTCCACAGG
OZ3815(-)	TGCTTGTGTCTAGCGTCACTCG
RKT3(+)	AAGCCTCCAACCTCCACCTGAGCCTGAACTAACGTGAGGGGTGACCTT
RKT3(-)	AGTTTCAGGCTCAGGTGGAGGAGTTGGAGGCTTGGCGTCACTGTACTTACA
RV5(+)	GGTAAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGAACGTGAGGGGTGACCTT
RV5(-)	CGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGGCTTACCGGCGTCACTGTACTTACA
RTC12(+)	TTCCTCAATTGTTGTCCTGGCTGTTGTATGGAACCTCGCGTGAGCAACGTGAGG
RTC12(-)	AGGTTCCATAACAACAGCCAGGACAACAATTGAGGAAGGCGTCACTGTACTTACA
R3FLAG(+)	GACTACAAAGACCACGACGGGGATTACAAAGATCACGACATCGATTACAAGGACGACGACGACAAGCGCGTGAGCAACGTGAGG
R3FLAG(-)	CTTGTGTCGTCGTCCTTGTAAATCGATGTCGTGATCTTTGTAATCCCCGTCGTGGTCTTTGTAGTCGGCGTCACTGTACTTACA

片段; RKT3(+)/OZ3815(-)、RV5(+)/OZ3815(-)、R3FLAG(+)/OZ3815(-)和RTC12(+)/OZ3815(-) 4对引物扩增 B1-B4 片段。然后以 OZ2903(+)/OZ3815(-) 为引物,以纯化的 A1 和 B1、A2 和 B2、A3 和 B3、A4 和 B4 片段为模板,PCR 融合扩增 A1+B1、A2+B2、A3+B3 和 A4+B4 4 个片段。所有融合的 PCR 片段用 *Bss*H II/*Xma* I 酶消化后插入用同样酶消化的 pOZK-Z123 质粒中,得到重组质粒 pOZK-Z123KT3、pOZK-Z123V5、pOZK-Z1233FLAG 和 pOZK-Z123TC12。4 个重组质粒分别用 *Bgl* II 和 *Spe* I 内切酶消化鉴定。鉴定正确的重组质粒用 *Bgl* II 和 *Spe* I 酶消化后回收约 5400 bp 的片段,然后将其插入用同样酶消化的 pOFS 质粒中,得到含不同标签的 FMDV 重组全长质粒 pFMDV-KT3、pFMDV-V5、pFMDV-3FLAG 和 pFMDV-TC12。所有构建的全长重组质粒用 *Bgl* II 和 *Not* I 酶切鉴定。将酶切鉴定正确的重组质粒送上海桑尼生物有限公司测序验证构建重组质粒的正确性。插入标签基因的口蹄疫病毒全长重组质粒的示意图见图 1。

1.5 病毒的拯救

构建正确的全长质粒用 *Not* I 消化,3 h 后用片段回收试剂盒纯化作为转染模板。单层 BSR/T7 细胞(培养在六孔板)生长至 70%-80% 时用 Lipofectamine™2000 介导转染(转染步骤按试剂盒

操作手册进行)。转染 5 h 后加入 1 mL 含 8%胎牛血清的 DMEM 培养基,置 37 °C 5% CO₂ 培养箱继续培养,每日观察至细胞病变(Cytopathic effect, CPE),72 h 后收获转染细胞,冻融 2-3 次后,在 BHK-21 细胞上继续传代。

1.6 拯救病毒的鉴定

1.6.1 RT-PCR 和序列测定:收集的转染上清按 10% (体积比)接种在 BHK-21 细胞单层上连续传代,观察出现 CPE 的时间。并将转染上清和第 8 代病毒提取总 RNA 进行 RT-PCR 和序列测定,分析基因工程病毒的正确性和引入标签的遗传稳定性。

1.6.2 间接免疫荧光:将收集的转染上清和亲本病毒 O/HN/93 接种生长至 70%-80%满的单层 BHK-21 细胞,孵育 6 h 后用磷酸缓冲液(PBS)漂洗 3 次,用 3.7%多聚甲醛室温固定 20 min, PBS 缓冲液洗涤 3 次,用 50 mmol/L 氯化铵室温通透 10 min, PBS 缓冲液洗涤 3 次,加一抗(V5 和 KT3 单克隆抗体) 37 °C 孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次,然后加 FITC 标记的二抗 37 °C 孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次后用 Olympus 荧光显微镜下观察并拍照。

1.6.3 噬斑表型和一步生长曲线:将第 6 代重组病毒和亲本病毒分别做 10 系列稀释,然后将不同稀释度病毒分别接种长满的单层 BHK-21 细胞(200 μL/孔,6 孔板),置于 37 °C CO₂ 培养箱,每

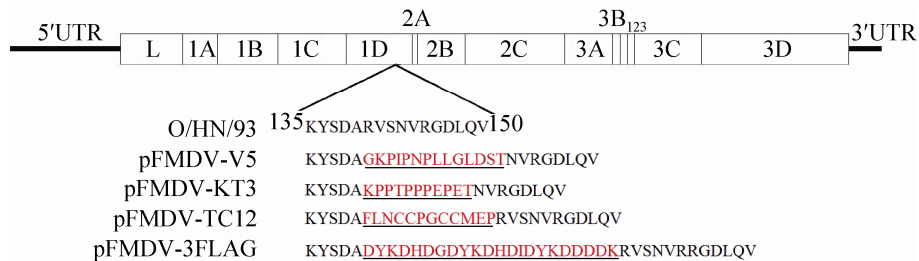


图 1. 插入外源标签口蹄疫病毒 O/HN/93 株全长 cDNA 克隆的构建示意图

Figure 1. Schematic diagram of the construction of FMDV O/HN/93 full-length cDNAs containing foreign tags.

10 min 摇动 1 次, 1 h 后加入 2 mL 黄芪胶混合液 (1 份 2×MEM, 1 份 1.2% 黄芪胶, 1% 血清) 静止培养, 48 h 后吸弃培养液, 固定、染色后观察病毒的噬斑表型。将第 6 代重组病毒和亲本病毒以 1 个 MOI 的病毒感染量接种长满的单层 BHK-21 细胞 (25 mL 培养瓶), 吸附 1 h 后弃接种的病毒液, 用 MEM 洗 2 次后, 加 5 mL MEM 培养基置于 37 °C CO₂ 继续培养, 并在不同时间 (4、8、12、16、20 h) 收取样品后测定病毒效价 (实验进行 3 次重复), 并按照 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀, 绘制一步生长曲线。

2 结果和分析

2.1 含标签基因全长质粒的鉴定

用特定的引物分别扩增出与预期大小相符的 A1-A4、B1-B4、A1+B1、A2+B2、A3+B3 和 A4+B4 目的片段 (图略)。酶切鉴定结果表明所有融合的 PCR 片段成功插入到口蹄疫病毒全长质粒 pOFS 中 (图 2, 3)。酶切鉴定正确的全长质粒进行序列的测定, 结果表明插入了预期的目的基因 (图略)。

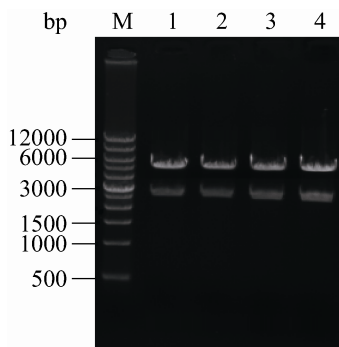


图 2. 半长重组质粒的酶切鉴定

Figure 2. Identification of recombinant plasmid with restriction enzyme digestion. M: DNA marker; lane 1–4: the plasmids pOZK-Z123KT3, pOZK-Z123V5, pOZK-Z1233FLAG and pOZK-Z123TC digested with *Spe* I and *Bgl* II.

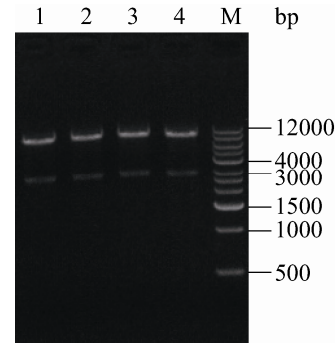


图 3. 全长重组质粒的酶切鉴定

Figure 3. Identification of recombinant plasmid with restriction enzyme digestion. Lane 1–4: the plasmids pFMDV-KT3, pFMDV-V5, pFMDV-3FLAG and pFMDV-TC12 digested with *Bgl* II and *Not* I; M: DNA marker.

2.2 病毒的拯救

pFMDV-KT3、pFMDV-V5 质粒转染 BSR/T7 细胞 60 h 后, 细胞出现明显的 CPE, 而转染 pFMDV-3FLAG 和 pFMDV-TC12 质粒的细胞 72 h 后仍看不到任何变化, 与对照细胞一致。72 h 后收集所有转染的上清在 BHK-21 细胞上连续传代。接种转染 pFMDV-KT3 和 pFMDV-V5 质粒上清的 BHK-21 细胞在 36 h 后均出现明显的 CPE (图 4), 而转染 pFMDV-3FLAG 和 pFMDV-TC12 质粒的上清在 BHK-21 细胞上连续传 4 代, 仍看不到 CPE。结果表明在 FMDV 结构蛋白 VP1 基因中插入 KT3 或 V5 标签能拯救到活的病毒, 而插入 3×FLAG 或 TC12 标签拯救不到活的病毒。拯救的 2 个重组病毒命名为 rFMDV-KT3 和 rFMDV-V5。

2.3 拯救病毒的鉴定

2.3.1 拯救病毒的增殖培养和遗传稳定性分析:

拯救的重组病毒连续传代, 出现明显 CPE 的时间越来越短, 传到第 5 代时趋于稳定, 90% 以上细胞病变时间为 12 h。对转染上清和第 8 代病毒的 VP1 基因片段进行序列的测定, 结果表明拯救病

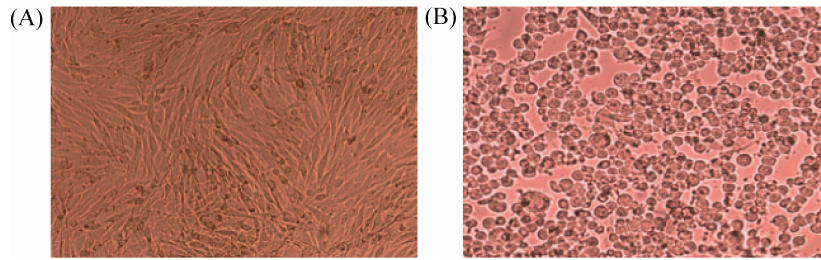


图 4. 重组 FMDV 在 BHK-21 中的致细胞病变

Figure 4. The cytopathic effect on the recombinant FMDV infected BHK-21. A: normal BHK-21; B: CPE occurred on rescued virus infected BHK-21.

毒含有预期的标签(如图 1 中氨基酸序列所示), 2 个重组病毒在细胞上连续传至第 8 代, 标签基因稳定存在。

2.3.2 免疫荧光检测结果 pFMDV-KT3 和 pFMDV-V5 质粒转染的上清和亲本病毒的免疫荧光结果表明 rFMDV-KT3 感染的细胞能够与 KT3 和 FMDV 3B 单抗反应显示特异的绿色荧光; rFMDV-V5 感染的细胞能够与 V5 和 FMDV 3B 单抗反应显示特异的绿色荧光, 而亲本病毒感染的细胞与 V5 和 KT3

单抗均不反应, 而与 3B 单抗反应, 可见绿色荧光(图 5)。这些结果说明拯救的重组病毒分别表达 KT3 和 V5 标签。

2.3.3 噬斑试验和一步生长曲线: 病毒的噬斑实验结果表明, 2 个重组病毒和亲本病毒均可在 BHK-21 细胞上形成噬斑, 但亲本病毒形成的噬斑主要以大斑为主, 而 2 个重组病毒的噬斑形态比亲本病毒小, 说明 2 个标签的插入影响了病毒在 BHK-21 细胞上的复制能力(图 6-A)。病毒的一步

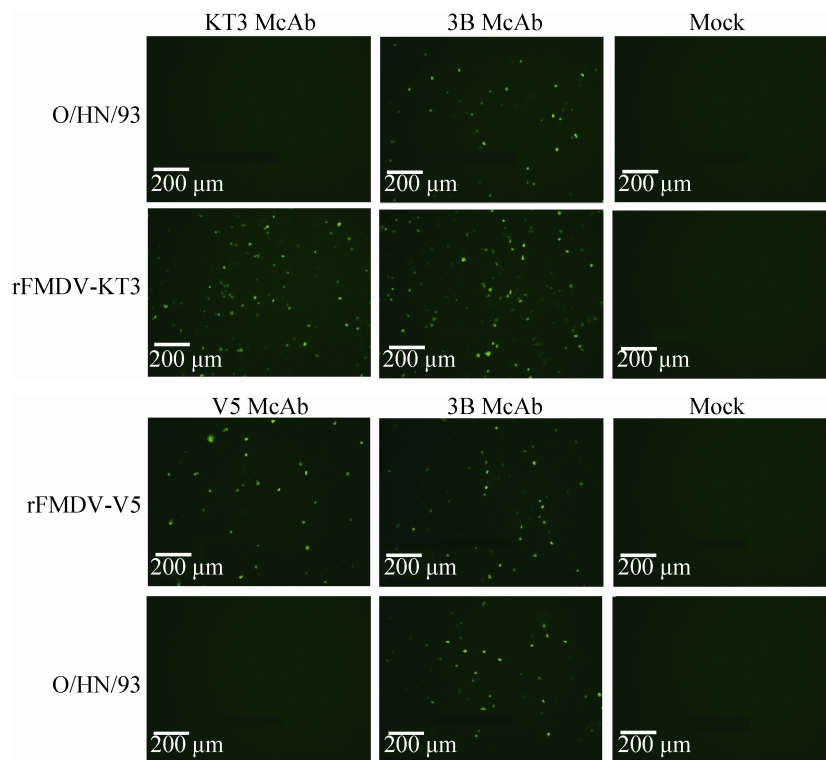


图 5. 重组 FMDV 的 IFA 鉴定

Figure 5. Identification of the recombinant FMDVs by IFA.

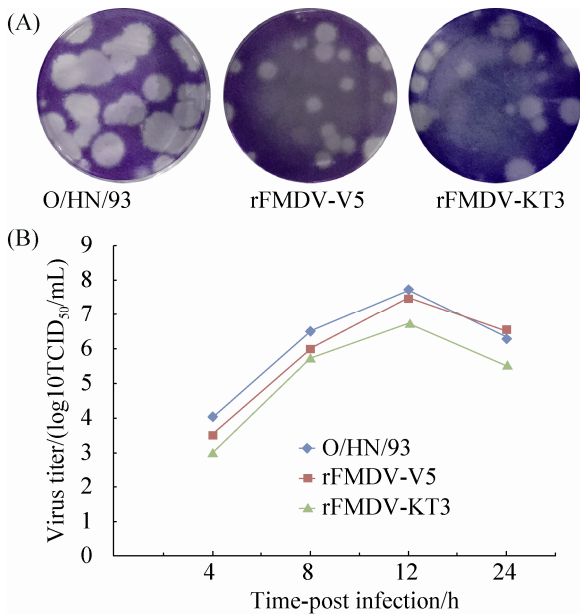


图 6. 重组病毒的噬斑形态和一步生长曲线

Figure 6. The plaque phenotype and one-step growth curves of the recombinant viruses. A: the plaque phenotype of the recombinant viruses; B: one-step growth curves of the recombinant viruses.

生长曲线显示 2 个重组病毒在不同时间的病毒复制滴度均低于父本病毒(rFMDV-V5 除 16 h 外), 说明标签的插入影响了 FMDV 在不同时间的复制能力, 但 KT3 标签的插入对 FMDV 复制的影响比插入 V5 标签对 FMDV 复制的影响大(图 6-B)。

3 讨论

大量的研究表明 TC 标签(含 6 或 12 个氨基酸)是一个广泛应用的基序。该基序中含有 2 对半胱氨酸组成的发卡样结构, 这个结构可以特异地结合膜渗性双硫染料, 当两者特异性结合后, 嵌合型蛋白就会特异地发出红色荧光, 而含有该基序的重组病毒被大量用于各种 RNA 病毒在活细胞生命周期中动态过程的研究^[8-9,15]。本研究利用 FMDV 已经建立的全长感染性克隆, 在 FMDV

VP1 基因中引入 TC 标签, 目的是拯救含该基序的 FMDV, 使研究 FMDV 在活细胞中示踪的设想成为可能。但实验中反复转染含该标签的全长质粒以及盲传转染的上清, 均未拯救到含该标签的重组 FMDV, 表明 FMDV 不能容忍 TC12 标签的插入。推测原因可能是这些短肽的插入影响了病毒蛋白的结构, 从而导致无法拯救出活的病毒。另外, 本研究同时报道尝试 FMDV 容忍与免疫相关的 V5、KT3 和 3×FLAG 标签的能力。研究结果表明 O/HN/93 株 FMDV VP1 基因中插入 V5 和 KT3 标签, 能够拯救到活的 FMDV, 但插入 3×FLAG 不能拯救到活的病毒, 说明 FMDV 能够容忍 V5 和 KT3 标签的插入, 不能容忍 3 个 FLAG 标签的插入(已有报道可以容忍 1 个 FLAG 标签的插入)。表达 V5 和 KT3 标签的重组病毒在 BHK-21 细胞上连续传代 8 次(P8)引入的标签稳定存在。一步生长曲线和噬斑表型实验结果表明 V5 标签的插入没有明显影响 FMDV 在 BHK-21 细胞上的复制, 而 KT3 标签的插入明显影响了 FMDV 在 BHK-21 细胞上的复制。

本研究首次表明 FMDV 可以容忍 V5 或 KT3 标签的插入, 含标签病毒的成功拯救为未来 FMD 标记疫苗的研制奠定了基础, 同时也为 FMDV 作为载体表达其他 RNA 病毒不同长度表位基因等的研究提供技术支撑。

参考文献

- [1] Acharya R, Fry E, Stuart D, Fox G, Rowlands D, Brown F. The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature*, 1989, 337(6209): 709–716.
- [2] Logan D, Abu-Ghazaleh R, Blakemore W, Curry S, Jackson T, King A, Lea S, Lewis R, Newman J, Parry N, Rowlands D, Stuart D, Fry E. Structure of a major immunogenic site on

- foot-and-mouth disease virus. *Nature*, 1993, 362(6420): 566–568.
- [3] Merz A, Long G, Hiet MS, Brügger B, Chlanda P, Andre P, Wieland F, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R. Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(286): 3018–3032.
- [4] Prentoe J, Bukh J. Hepatitis C virus expressing flag-tagged envelope protein 2 has unaltered infectivity and density, is specifically neutralized by flag antibodies and can be purified by affinity chromatography. *Virology*, 2011, 409(2): 148–155.
- [5] Beach NM, Smith SM, Ramamoorthy S, Meng XJ. Chimeric porcine circoviruses (PCV) containing amino acid epitope tags in the C terminus of the capsid gene are infectious and elicit both anti-epitope tag antibodies and anti-PCV type 2 neutralizing antibodies in pigs. *Journal of Virology*, 2011, 85(9): 4591–4595.
- [6] Holinka LG, Fernandez-Sainz I, O'Donnell V, Prarat MV, Gladue DP, Lu Z, Risatti GR, Borca MV. Development of a live attenuated antigenic marker classical swine fever vaccine. *Virology*, 2009, 384(1): 106–113.
- [7] Teterina NL, Pinto Y, Weaver JD, Jensen KS, Ehrenfeld E. Analysis of poliovirus protein 3A interactions with viral and cellular proteins in infected cells. *Journal of Virology*, 2011, 85(9): 4284–4296.
- [8] Arhel NJ, Charneau P. Bisarsenical labeling of HIV-1 for real-time fluorescence microscopy // Prasad VR, Kalpana GV. HIV Protocols. Totowa, NJ: Humana Press, 2009: 151–159.
- [9] Das SC, Panda D, Nayak D, Pattnaik AK. Biarsenical labeling of vesicular stomatitis virus encoding tetracysteine-tagged m protein allows dynamic imaging of m protein and virus uncoating in infected cells. *Journal of Virology*, 2009, 83(6): 2611–2622.
- [10] Seago J, Jackson T, Doel C, Fry E, Stuart D, Harmsen MM, Charleston B, Juleff N. Characterization of epitope-tagged foot-and-mouth disease virus. *Journal of General Virology*, 2012, 93(Pt 11): 2371–2381.
- [11] Rai DK, Segundo FDS, Schafer E, Burrage TG, Rodriguez LL, de Los Santos T, Hoepflich PD, Rieder E. Novel 6×His tagged foot-and-mouth disease virus vaccine bound to nanolipoprotein adjuvant *via* metal ions provides antigenic distinction and effective protective immunity. *Virology*, 2016, 495: 136–147.
- [12] Yang B, Yang F, Zhang Y, Liu HN, Jin Y, Cao WJ, Zhu ZX, Zheng HX, Yin H. The rescue and evaluation of FLAG and HIS epitope-tagged Asia 1 type foot-and-mouth disease viruses. *Virus Research*, 2016, 213: 246–254.
- [13] Wang HW, Xue M, Yang DC, Zhou GH, Wu DL, Yu L. Insertion of type O-conserved neutralizing epitope into the foot-and-mouth disease virus type Asia1 VP1 G-H loop: effect on viral replication and neutralization phenotype. *Journal of General Virology*, 2012, 93(Pt 7): 1442–1448.
- [14] Li PH, Bai XW, Sun P, Li D, Lu ZJ, Cao YM, Fu YF, Bao HF, Chen YL, Xie BX, Liu ZX. Evaluation of a genetically modified foot-and-mouth disease virus vaccine candidate generated by reverse genetics. *BMC Veterinary Research*, 2012, 8: 57.
- [15] Rudner L, Nydegger S, Coren LV, Nagashima K, Thali M, Ott DE. Dynamic fluorescent imaging of human immunodeficiency virus type 1 gag in live cells by biarsenical labeling. *Journal of Virology*, 2005, 79(7): 4055–4065.

Capacity of the structural protein VP1 of foot-and-mouth disease virus potentially accommodating insertion of different foreign tags

Pinghua Li, Xueqing Ma, Guangjin Xun, Xingwen Bai, Pu Sun, Hong Yuan, Zengjun Lu, Zaixin Liu*

State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, National Foot-and-Mouth Disease Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu Province, China

Abstract: [Objective] To identify the capacity that the structural protein VP1 of foot-and-mouth disease virus potentially accommodate insertion of different foreign tags, we constructed recombinant FMDVs containing foreign tags using FMDV reverse genetics system. [Methods] Using overlap extension PCR method, we introduced V5, TC12, KT3, 3×FLAG tag genes into G-H loop of VP1 capsid protein of FMDV. Linearized recombinant plasmids were transfected into BSR/T7 cells expressing T7 RNA polymerase to rescue the recombinant viruses. The recombinant viruses were analyzed by RT-PCR, indirect immunofluorescence, plaque phenotype and one-step growth curves. [Results] We successfully rescued the recombinant FMDVs expressing V5 and KT3 tag but could not rescue the recombinant FMDV containing TC12 and 3×FLAG tags. The introduction of V5 and KT3 tags both affected the replication capacity of FMDV. [Conclusion] Our results will lay foundations to study marker vaccine and FMDV vector in future.

Keywords: foot-and-mouth disease virus, structural proteins, foreign tags

(本文责编: 李磊)

Supported by the Agricultural Biotechnology Research and Application Development Project of Gansu Province (GNSW-2014-22) and by the Natural Science Foundation of Gansu Province (1606RJYA256)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-931-8342587; E-mail: liuzaxin@caas.cn

Received: 29 August 2016; Revised: 14 October 2016; Published online: 8 December 2016