

doi: 103969/j.issn.0490-6756.2017.03.032

拟南芥 *AtDWD* 与 DDB1 相互作用研究

吴叶天, 李德款, 杨毅

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘要: 本文通过酵母双杂交实验(Y2H)和双荧光互补实验(BIFC)分别从体外和体内条件下检测了 *AtDWD* 与 CUL4 型 E3 连接酶的底物识别蛋白结合蛋白 DDB1a 和 DDB1b 的相互作用,发现 *AtDWD* 与 DDB1b 有较强的相互作用,而与 DDB1a 的相互作用较弱,相互作用区域位于 *AtDWD* 的 C 末端部位.说明了 *AtDWD* 是潜在的 CUL4 型 E3 连接酶的底物识别亚基.此外,本文中还发现 *AtDWD* 过表达植株对冷冻胁迫更加敏感.*AtDWD* 可能参与冷胁迫信号通路.

关键词: DDB1; *AtDWD*; E3 连接酶; 植物冷冻胁迫

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)02-0411-06

The research of *AtDWD* interacting with DDB1

WU Ye-Tian, LI De-Kuan, YANG Yi

(Key Laboratory of Bio-resource and Eco-environment of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: In our study, the yeast two-hybrid assay (Y2H) and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) have been applied to investigate the interaction between *AtDWD* and DDB1a/DDB1b (the CUL4-based E3 ligase interacts with the substrate receptor to target special substrates) in vitro and in vivo. It has shown strong interaction between *AtDWD* and DDB1b, but weak interaction between *AtDWD* and DDB1a. Moreover, the C-terminal of *AtDWD* was where the interaction happened. The results suggested that *AtDWD* might be a substrate receptor protein of CUL4-based E3 ligase. On the other hand, the *AtDWD*-overexpression transgenic plants' were sensitive to freeze. *AtDWD* may play a role in plant reacting in freezing stress.

Keywords: DDB1; *AtDWD*; E3 ubiquitin ligase; Plant freezing stress

1 引言

泛素化—蛋白酶体途径是包括植物在内的真核生物调控细胞内蛋白质稳定性的一条主要通路.蛋白质被泛素化的过程需要泛素激活酶(E1),泛素结合酶(E2),以及泛素连接酶(E3)的参与,而其中泛素连接酶(E3)直接结合底物,E3对底物的特

异性识别决定了整条通路特异性^[1,2].

E3 泛素连接酶有很多不同的种类.有的由单个蛋白质构成,被称为单亚基 E3;有的由多个蛋白质组成的复合体构成,被称为多亚基 E3.多亚基 E3 中有一类以 cullin 支架蛋白为基础构成,在植物中这类 E3 有 4 种,分别被称为 CUL1 型/SCF 型 E3、CUL2 型/APC 型 E3、CUL3 型/BCR 型 E3

收稿日期: 2016-01-04

基金项目: 国家自然科学基金(31171586); 973 计划(2015CB755702)

作者简介: 吴叶天(1991-), 男, 江西景德镇人, 硕士研究生, 研究方向为植物遗传与分子生物学. E-mail: 328861223@qq.com

通讯作者: 杨毅. E-mail: yangyi528@vip.sina.com

和 CUL4 型/DCX 型 E3^[3,4,5].

CUL4 型 E3 由 RBX1/ROC1、CUL4、DDB1 以及底物识别蛋白质构成, RBX1 起着募集 E2 泛素结合酶的作用, CUL4 连接着 RBX1 和 DDB1, 底物识别蛋白特异性结合底物蛋白, DDB1 在 CUL4 型 E3 连接酶中起着 CUL4 和底物识别蛋白质之间的桥梁作用^[6,7]. 在拟南芥中 DDB1 不单单指一个特定蛋白质, 而由 DDB1a 和 DDB1b 这 2 个高度同源的蛋白质在起作用^[8,9]. 已经有过报道的 CUL4 型 E3 连接酶底物识别蛋白中很大一部分有着一个共同点——含有 DWD 基序, 而 *AtDWD* 中含有 DWD 基序, 之前有文献报道在酵母双杂交实验中 *AtDWD* 和 DDB1a 间有相互作用^[10].

在其它文献中 *AtDWD* 被作为核孔蛋白质复合体的一员被研究, 发现 HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 1 (*HOS1*) 是与 *AtDWD* 免疫共沉淀的蛋白质之一^[11]. 而 *HOS1* 则是调控植物冷应激的重要基因, 本文因此进一步检测了 *AtDWD* 与 DDB1a/DDB1b 的相互作用. 此外, 检测了相关植株的耐冻情况.

2 材料与方法

2.1 材料

植物材料: 野生型 Col、*AtDWD* 过表达植株、*Atdwd* 突变体(杂合子)和本生烟 (*N. benthamiana*), 均为本实验室保存.

菌株: 大肠杆菌 DH5 α 菌株、酵母 AH109 菌株和农杆菌 GV3101 菌株, 均为本实验室保存.

载体: 酵母双杂交实验使用诱饵蛋白质表达载体 pGBKT7(BD), 筛选蛋白质表达载体 pGADT7(AD), 由本实验室保存. 烟草双荧光实验所用载体改造自 pEarleyGate201-YC 和 pEarleyGate202-YN, 简称为 CE 与 NE, 由本实验室保存.

试剂: 构建载体所需限制性内切酶和 T4 Ligation Kit 购自 Fermentas, 酵母双杂交所需试剂购自 Clontech, 乙酰丁香酮(AS)购自 Sigma, Trizol 试剂盒购自 Takara, 反转录试剂盒购自 TOYOBO, 其余常用试剂为实验室现存.

2.2 方法

2.2.1 目的基因分离与扩增 拟南芥种子 1mL 75%乙醇处理 1min, 1mL 0.1%升汞表面消毒, 再

用 1mL 无菌水洗涤 3~5 次, 均匀播种在 MS 平板上, 2w 后用 Trizol 试剂盒提取 RNA, 然后反转录 RNA 获得 cDNA. 方法参照试剂盒说明书.

设计引物(表 1, 表 2)从拟南芥 cDNA 中通过 PCR 获取目的基因 *AtDWD*、DDB1a、DDB1b. PCR 扩增操作如下: 向 20 μ L 离心管管内加入 4 μ L 5 \times PS Buffer, 1.6 μ L dNTPs(2.5mM each), 1 μ L 上游引物(10 μ M), 1 μ L 下游引物(10 μ M), 1 μ L 拟南芥 cDNA, 0.2 μ L PrimerStar DNA Polymerase (2.5U/ μ L)和 11.2 μ L dd H $_2$ O 混匀, 转入 PCR 仪中, PCR 过程为: 95 $^{\circ}$ C 变性 3min, 然后按 98 $^{\circ}$ C 10s, 55 $^{\circ}$ C 15s, 72 $^{\circ}$ C 片段长度 \times 5s/kb 进行 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min.

PCR 产物进行琼脂凝胶电泳, 对目的片段切割, 使用胶回收试剂盒进行回收得到目的片段.

2.2.2 载体构建 用相应的限制性内切酶酶切之前回收得到的目的片段, 以及相应的载体. 各自回收后使用 DNA Ligase Kit 进行连接. 利用热激法将连接产物转化入 DH5 α 感受态细胞中. 构建的载体包括: AD-*AtDWD*、AD-*AtDWD*1-145、AD-*AtDWD*145-350、AD-*AtDWD*145-229、AD-*AtDWD*229-350、BD-DDB1a 和 BD-DDB1b 用于酵母双杂交实验; *AtDWD*-CE、DDB1a-NE 和 DDB1b-NE 用于烟草双荧光实验.

2.2.3 酵母双杂交(Y2H) 酵母双杂交实验方法参考 Clontech 操作手册和相关文献^[12]. AD-*AtDWD* 和 BD-DDB1a 共转酵母, 检测酵母生长情况; AD-*AtDWD* 和 BD-DDB1b 共转酵母, 检测酵母生长情况.

2.2.4 烟草双荧光(BIFC) 烟草双荧光实验方法参考相关文献^[13]. *AtDWD*-CE 和 DDB1a-NE 共转烟草, 检验烟草荧光情况; *AtDWD*-CE 和 DDB1b-NE 共转烟草, 检验烟草荧光情况. 本实验正对照使用 RCAR1-NE 和 ABI1-CE^[14]; 负对照使用 RCAR1-NE 和空的 CE.

2.2.5 植物冷冻测试 植物冷冻测试实验方法和冷胁迫条件参考相关文献^[11]. 选取 *Atdwd* 杂合突变体、2 个 *AtDWD* 过表达株系和野生型拟南芥 2 周大的植株, 先置于 4 $^{\circ}$ C 8h, 之后逐渐降温 2h 到 -2 $^{\circ}$ C, 保持 -2 $^{\circ}$ C 2h, 转回 4 $^{\circ}$ C 12h 解冻, 放回恒温培养箱, 2d 后统计其存活率.

表 1 酵母双杂交实验所需载体的引物

Tab. 1 Primers for Y2H

引物名称	酶切位点	引物序列 5'→3'
<i>AtDWD</i> UP	<i>EcoR</i> I	CTTGAATTCATGGCAACTTTTGGTGCG
<i>AtDWD</i> DN	<i>Xho</i> I	ACTCTCGAGATCAGACTAAGCAACGCTCATT
DDB1A UP	<i>EcoR</i> I	GGAATTCATGAGCTCATGGAACCTACGTTG
DDB1A DN	<i>Cla</i> I	CCATCGATTCAGTGAAGCCTAGTGAGTTCTT
DDB1B UP	<i>EcoR</i> I	GGAATTCATGAGCGTATGGAACCTACGCCGTTA
DDB1B DN	<i>Bam</i> H I	CGCGGATCCTCAGTGAAGCCTAGTGAGTTCTTC
<i>AtDWD103</i> DN	<i>Xho</i> I	CCGCTCGAGAGACAACAAGGGCCACATTTT
<i>AtDWD104</i> UP	<i>EcoR</i> I	CGGAATTCGGTGGTCAACCTGTAACCTGTT
<i>AtDWD229</i> DN	<i>Xho</i> I	CCGCTCGAGTTGAGAATCATCCAGATGATG
<i>AtDWD230</i> UP	<i>EcoR</i> I	CGGAATTCAGAGCAAAAACTTCACATTC
<i>AtDWD144</i> DN	<i>Xho</i> I	CCGCTCGAGCTGTCTTGTGTCCCAATATTT
<i>AtDWD145</i> UP	<i>EcoR</i> I	CGGAATTCAAAATCTGTACATACCCAA

表 2 BIFC 实验所需载体的引物

Tab. 2 Primers for BIFC

引物名称	酶切位点	引物序列 5'→3'
DDB1B UP		ATGAGCGTATGGAACCTACGC
DDB1B DN	<i>Mlu</i> I	GCGACGCGTAGTGAAGCCTAGTGAGTTCTTC
DDB1A DN	<i>Mlu</i> I	GCGACGCGTTGTGAAGCCTAGTGAGTTCTTCAAC
DDB1A UP		ATGAGCTCATGGAACCTACGTTG
<i>AtDWD</i> UP		ATGGCAACTTTTGGTGCG
<i>AtDWD</i> DN	<i>Mlu</i> I	GCGACGCGTCTTTTCTGCCGGTTGCTC

3 结果与分析

3.1 *AtDWD* 序列分析

AtDWD 在拟南芥基因组中编号为 At1g 80670. 与 *CUL4* 相互作用的蛋白质中有一类有着至少一个类似的氨基酸基序, 被称为 DWD 基序^[10].

利用 MEGA3.1 对 *AtDWD* 蛋白质氨基酸序列分析可知, 其有 2 个 DWD 基序, 分别位于 128~144 位氨基酸处和 261~275 位氨基酸处(图 1). 保守的氨基酸会被标上颜色, 疏水氨基酸被涂上黄色背景, 小氨基酸被涂上灰色背景.

3.2 DDB1a 和 DDB1b 与 *AtDWD* 的相互作用

为了检验体外条件下, DDB1a 和 DDB1b 与 *AtDWD* 相互作用情况, 我们进行了酵母双杂交实验.

同时转入 *AtDWD* 与 DDB1a 酵母双杂交载体的酵母菌在 SD/-Trp-Leu-His 缺乏 3 种氨基酸的培养基上可以生长(图 2A), 但是不能在 SD/-Trp-Leu-His-Ade 缺乏 3 种氨基酸和腺嘌呤的更严格的筛选培养基上生长, 而转入 *AtDWD* 与 DDB1b 酵母双杂交载体的酵母菌即使在 SD/-Trp-Leu-

His-Ade 缺乏 3 种氨基酸和腺嘌呤的更严格的筛选培养基上也生长良好(图 2B). 说明 *AtDWD* 与 DDB1b 有较强的相互作用, 而 *AtDWD* 与 DDB1a 的相互作用较弱.

为了检验体内条件下, DDB1a 和 DDB1b 与 *AtDWD* 相互作用情况, 我们进行了烟草双荧光实验. DDB1b 与 *AtDWD* 的烟草双荧光载体转入烟草后烟草叶片中出现了明显的荧光, 荧光勾勒出叶表皮细胞完整的轮廓, 而细胞核中也发出明显的荧光, 形成了一个明显的亮点. 表明 DDB1b 和 *AtDWD* 在植物体内有相互作用, 有相互作用的区域包括细胞核和细胞质(图 2C).

DDB1a 与 *AtDWD* 的烟草双荧光载体转入烟草后烟草叶片中出现了微弱的荧光, 比起副对照荧光要强一些, 不过还是非常弱, 而且细胞核中没有显现出荧光(图 2A).

烟草双荧光实验进一步说明了, 体内条件下 DDB1b 与 *AtDWD* 具有相互作用, 相互作用的区域包括细胞核和细胞质中, 而 *AtDWD* 与 DDB1a 在体内条件下相互作用弱.

```

1 MATFGAPATA NSNPNKSYEV TPSPADSISS LSFSPRADIL VATSWDNQVR+
51 CWEISRSGAS LASAPKASIS HDQPVLCSAW KDDGTTVFSG GCDKQAKMWP+
101 LLSGGQPVTV AMHEGPAAAM AWIPGMNLLA TGSWDKTLKY WDTRQQNPFVH+
151 TQQLPDKCYT LSVKHPLMVV GTADRNLIVF NLQNPQTEFK RIQSPLKYQT+
201 RCVTAFFPDQQ GFLVGSIEGR VGVHHLDDSQ QSKNFTFKCH RDGNDIYSVN+
251 SLNFHPVHGT FATAGSDGAF NFWDKDSKQR LKAMSRCNQP IPCSSFNHDG+
301 SIYAYAACYD WSKGAENHNP ATAKSSIPLH LPQESEVKAK PRVGATGRK+

```

图 1 *AtDWD* 中的 DWD 基序
Fig. 1 DWD Motifs in *AtDWD*

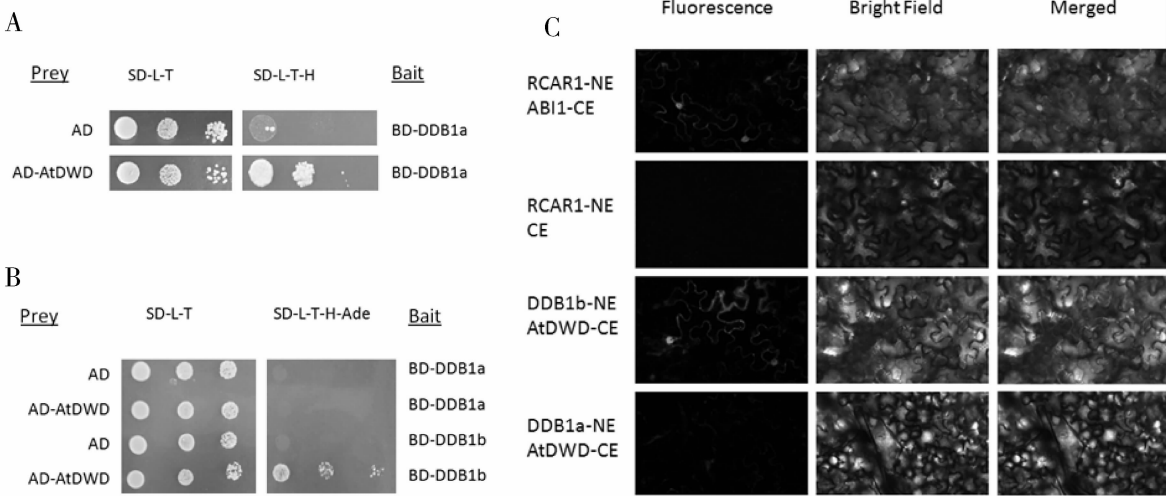


图 2 DDB1a 和 DDB1b 与 *AtDWD* 的相互作用
Fig. 2 Interaction of DDB1a/DDB1b with *AtDWD*

3.3 酵母双杂交实验检测 *AtDWD* 分段与 DDB1b 相互作用

由对 *AtDWD* 序列分析所知道的 DWD 基序位置, *AtDWD* 被分为 1-145 和 145-350 这 2 段, 每段各包括一个 DWD 基序, 酵母双杂交实验发现 *AtDWD*1-145 与 DDB1b 没有表现出相互作用而 *AtDWD*145-350 与 DDB1b 表现出相互作用(图 3)。之后 *AtDWD*145-350 被分为 *AtDWD*145-229 和 *AtDWD*229-350 两段, DWD 基序在 *AtDWD*229-350 这段中, 但是 *AtDWD*145-229 和 *AtDWD*229-350 这两段都没有表现出与 DDB1b 的相互作用(图 3)。

3.4 *AtDWD* 过表达株系表现出对冷冻胁迫敏感

野生型拟南芥 Col、*Atdwd* 突变体(杂合子)以及两个 *AtDWD* 过表达株系被选用进行植物冷冻测试。测试结束 2d 后观察植物表型, 大部分有绿色

叶片的存活植株属于 Col 和 *Atdwd* 突变体(杂合子); 两个 *AtDWD* 过表达株系中大部分被冻死, 植株失去绿色变得发白。(图 4)

根据植株表型统计各株系存活率, 可以认为 *AtDWD* 过表达株系表现出对冷冻胁迫敏感。

4 讨论

泛素化—蛋白酶体途径是包括植物在内的真核生物调控细胞内蛋白质稳定性的一条主要通路。本文探究了对拟南芥 *AtDWD* 基因表达的蛋白质作为 CUL4 型 E3 连接酶^[4,5]中的底物结合蛋白质的潜力。

首先, 本文研究了 *AtDWD* 与 DDB1 的相互作用。确定了 *AtDWD* 是 CUL4 型 E3 连接酶的一个亚基。

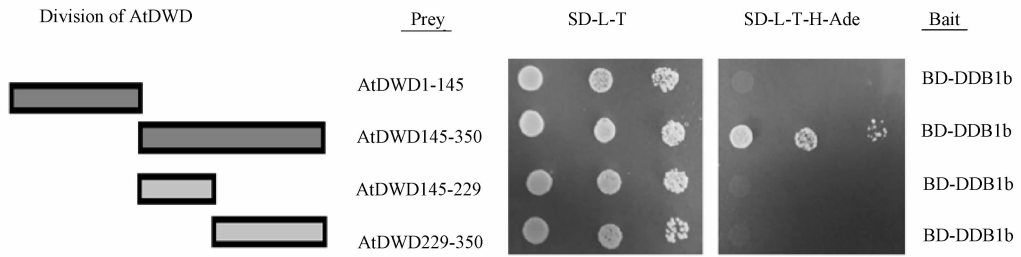


图 3 酵母双杂交实验检测 *AtDWD* 分段与 DDB1b 相互作用
Fig. 3 Interaction of DDB1b with *AtDWD* fragments in the yeast two-hybrid assays

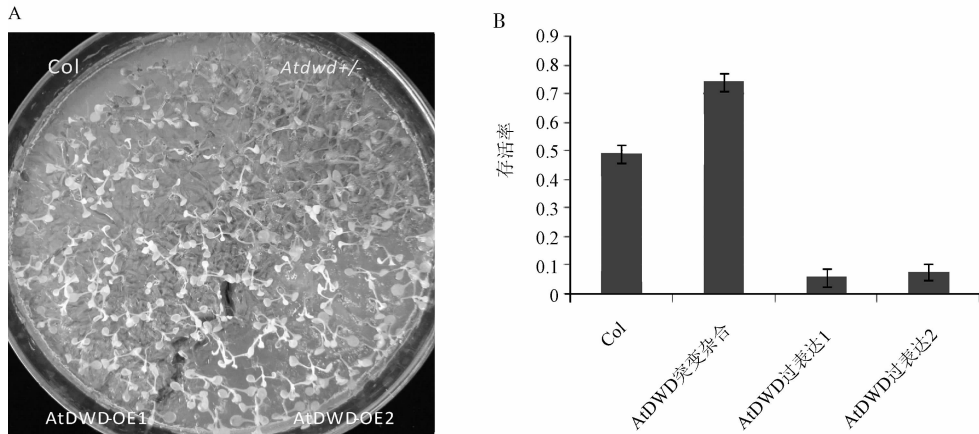


图 4 *AtDWD* 拟南芥株系接受冷冻处理后的存活情况
(A)野生型(Col)、杂合的 *AtDWD* 突变体(*Atdwd* +/-)、*AtDWD* 过表达株系 1 和 2(*AtDWD*-OE1、*AtDWD*-OE2)在冷冻处理后显示出了不同的表型。(B)*AtDWD* 拟南芥株系接受冷冻处理后的存活率统计。

Fig. 4 Survival of *AtDWD* transgenic plants after a freezing treatment

(A) Different phenotypes after a freezing treatment of WT (Col), *Atdwd* heterozygote (*Atdwd* +/-) and *AtDWD* over-expression 1 and 2 (*AtDWD*-OE1, *AtDWD*-OE2). (B) Survival rates of *AtDWD* transgenic plants after a freezing treatment.

DDB1 在 E3 泛素连接酶中起着 CUL4 和底物识别蛋白质之间的桥梁作用. 在拟南芥中 DDB1 不单单指一个特定蛋白质, 而分为 DDB1a 和 DDB1b 这 2 个高度同源的蛋白质在起作用, DDB1a 和 DDB1b 功能上有着差异但是都可以参与构成 E3 泛素连接酶^[8,9]. 为了可靠地检验 *AtDWD* 与 DDB1 的相互作用, 本文中运用酵母双杂交实验从体外条件和烟草双荧光实验从体内条件检验 *AtDWD* 与 DDB1a 的相互作用以及 *AtDWD* 与 DDB1b 的相互作用. 之前有文献报道酵母双杂交实验中 *AtDWD* 与 DDB1a 显示出相互作用^[8], 但是此文中使用的酵母双杂交系统与本实验室使用的有差别, 而在本实验室的酵母双杂交实验中 *AtDWD* 与 DDB1a 在较低选择压下显示出相互作用(图 2A), 而在较高选择压下显示不出相互作用, 但是 *AtDWD* 与 DDB1b 在较高选择压下显示出明显的相互作用(图 2B). 而 BIFC 实验结果也反映了这一点: 共转 *AtDWD* 与 DDB1b 的烟草叶片显

现出明显的荧光, 而共转 *AtDWD* 与 DDB1a 的烟草叶片中的荧光相对而言非常不明显. 实验结果表明, *AtDWD* 与 DDB1a 有较弱的相互作用, 而 *AtDWD* 与 DDB1b 有较强的相互作用. *AtDWD* 与 DDB1 具有相互作用得到了验证.

上文中提到过已知 DDB1a 和 DDB1b 功能相互冗余但是也有差别. DDB1a 和 DDB1b 功能差异也许与 *AtDWD* 有关.

在其他文献中 *AtDWD* 被作为核孔蛋白质复合体的一员被研究, 发现 HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 1 (HOS1) 是与 *AtDWD* 免疫共沉淀的蛋白质之一^[14]. 而 HOS1 则是调控植物冷应激的重要基因, 植物受到冷胁迫的时候, C-Repeat Binding Factor (CBF) 转录因子通过直接结合顺式作用元件 C-repeat (CRT)/dehydration-responsive (DRE) 来诱导下游诸多应对冷胁迫的基因表达. ICE1 转录因子(inducer of cbf expression 1) 则通过结合在

CBF3 基因的启动子上诱导 CBF3 表达. HOS1 通过泛素途径诱导 ICE1 降解,起到了植物应对冷胁迫的负调控因子的作用.^[11,15,16]不过 *hos1* 突变体在受冷冻胁迫的研究下,存活率要低于野生型拟南芥,尽管在低于零度摄氏度的条件下,CBF 下游基因依然高度表达.^[7]而本文也发现 *AtDWD* 过表达株系经历冷冻测试后存活率降低,*HOS1* 在 *AtDWD* 过表达植株中被更多的降解可能是造成这种表型的原因.

未来要确证 *AtDWD* 是否为 CUL4 型 E3 连接酶的底物识别蛋白,还有许多工作要做.例如检测 *AtDWD* 突变体中相关基因的表达情况;构建 CUL4 型 E3 连接酶体外泛素化体系,检验其体外泛素化能力等等^[17].

参考文献:

- [1] Hochstrasser M. Ubiquitin-dependent protein degradation [J]. *Annu Rev Genet*, 1996, 30: 405.
- [2] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system [J]. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 425.
- [3] Hu J, Chen M. Targeted ubiquitination of CDT1 by the DDB1 - CUL4A - ROC1 ligase in response to DNA damage [J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6: 1003.
- [4] Schwechheimer C, Calderon V. Cullin-containing E3 ubiquitin ligases in plant development [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7: 677.
- [5] Petroski M, Deshaies R. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6: 9.
- [6] He Y, McCall J, Chen M, *et al.* DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to CUL4-ROC1 ubiquitin ligases [J]. *Genes Dev*, 2006, 20: 2949.
- [7] Ishitani M, Xiong L M. HOS1, a Genetic Locus Involved in Cold-Responsive Gene Expression in Arabidopsis [J]. *Plant Cell*, 1998, 10: 1151.
- [8] Khateeb A, Wang M, Schroeder F. DDB2, DDB1A and DET1 exhibit complex genetic interactions during Arabidopsis development [J]. *Genetics*, 2007, 176: 231.
- [9] Singh K, Roy S. DNA repair and recombination in higher plants: insights from comparative genomics of Arabidopsis and rice [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 443.
- [10] Lee JH, Terzaghi W, Gusmaroli G, *et al.* Characterization of Arabidopsis and rice DWD proteins and their roles as substrate receptors for CUL4-RING E3 ubiquitin ligases [J]. *Plant Cell*, 2008, 20 (1):152.
- [11] Dong CH, Agarwal M, Zhang Y, *et al.* The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 8281.
- [12] 李德款,张亮,彭梅芳, *et al.* ABA 受体 RCAR1/PYL9 相互作用蛋白质的筛选及初步研究 [J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2011, 48(2): 486.
- [13] Ohad N, Yalovsky S. Utilizing bimolecular fluorescence complementation (BiFC) to assay protein-protein interaction in plants [J]. *Methods in molecular biology*, 2010, 655: 347.
- [14] Tamura K, Fukao Y, Iwamoto M, *et al.* Identification and characterization of nuclear pore complex components in Arabidopsis thaliana [J]. *Plant Cell*, 2010, 22:4084.
- [15] Novillo F. Genetic analysis reveals a complex regulatory network modulating CBF gene expression and Arabidopsis response to abiotic stress [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63: 293.
- [16] Chinnusamy V. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis [J]. *Genes Dev*, 2003, 17: 1043.
- [17] 李岷,唐晓凤,刘永胜. 番茄 MSI2-like 基因的克隆及功能初探 [J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2015, 52(4): 871.