

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
53(10):1111–1116; 4 October 2013
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

沙门氏菌硫修饰基因 *dptC* 的克隆表达与分离纯化

安贤惠^{1,2}, 周秀芬², 汪志军², 邓子新^{2*}, 梁晶丹^{2*}

¹淮海工学院, 江苏省海洋生物技术重点实验室, 连云港 222005

²上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

摘要:【目的】细菌 DNA 磷硫酰化修饰是指 DNA 骨架非磷氧桥上的一个氧被硫取代, 该修饰增加了机体的抗氧化作用, 其发生受被称为 *dnd* 的基因簇控制。沙门氏菌 (*Salmonella enterica* serovar Cerro 87) 是具有磷硫酰化修饰现象的细菌之一, 其 *dnd* 基因簇被命名为 *dptBCDE*。本研究旨在克隆其中的 *dptC* 基因, 优化 *dptC* 表达条件, 为进一步研究 DptC 在 DNA 磷硫酰化修饰过程中的酶学功能奠定基础。【方法】以沙门氏菌总 DNA 为模板, 设计特异引物、PCR 扩增获得 *dptC* 基因片段, 连接于表达载体 pGEX-6P-1 的 *Sma*I 和 *Xho*I 位点之间, 构建融合表达载体 pJTU3622; 将 pJTU3622 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli* DH10B), 经氨苄霉素抗性初选及序列测定, 获得阳性克隆; 提取阳性中 pJTU3622 再转化大肠杆菌表达宿主 [*E. coli* BL21 (DE3) pLysS], 获得工程菌株 Anxh103; 优化表达条件, 诱导表达 *dptC* 基因; 采用 GST-Trap 柱和 Äkta FPLC 纯化系统分离纯化 DptC 蛋白。【结果】获得沙门氏菌 *dptC* 基因表达载体 pJTU3622 和工程菌株 Anxh103; 确定 *dptC* 最佳诱导表达条件为: 诱导温度 18℃, 诱导时间 8–18 h, IPTG 诱导浓度 0.6 mmol/L, LB 培养基中添加 50 μmol/L Fe²⁺。【结论】成功克隆了沙门氏菌 *dptC* 基因, 实现了沙门氏菌 *dptC* 基因的高通量表达; 表达载体中引入 TEV 酶切位点, 使得很容易切除 GST 标签, 为进一步研究 DptC 的酶学功能奠定了基础; 沙门氏菌 DptC 发酵体系中添加 50 μmol/L Fe²⁺ 可以提高 DptC 产量, 纯化的 DptC 显示浅棕色, 推测与变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 中的同源蛋白蛋白 DndC 一样, 也是一种含 4Fe–4S 的铁硫蛋白。

关键词: DNA 磷硫酰化修饰, *Salmonella enterica*, *dpt* 基因簇, 基因克隆与表达, 蛋白质的分离纯化

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 10-1111-06

众所周知, 生物体 DNA 是由 4 种不同的核苷酸结构单位随机连接而成的聚合物, 包括 2-脱氧核糖、磷酸基团和含氮碱基 3 种化学成分^[1–2], 部分生物体内存在少量发生化学修饰的 DNA, 如 5-甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶和 6-甲基氨基嘌呤等^[3], 无论是正常 DNA 或是修饰 DNA, 所涉及的化学元素只有

碳、氢、氧、氮和磷五种。然而近年来研究发现, 变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*)、阿维链霉菌 (*Streptomyces Avermitilis*)、沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) 等细菌^[4–6], 其 DNA 中存在第 6 种元素—硫。这一发现源于变铅青链霉菌总 DNA 在电泳过程中出现被降解的现象 (DNA degradation), 前人将

基金项目: 国家自然科学基金 (30870038, 30970624)

* 通信作者。梁晶丹, Tel: +86-21-62932943, Fax: +86-21-62932418, E-mail: jqliang@sjtu.edu.cn; 邓子新, Tel: +86-21-62933404, Fax: +86-21-62932418, E-mail: zxdeng@sjtu.edu.cn

作者简介: 安贤惠 (1965–), 女, 甘肃人, 教授, 研究方向为细菌 DNA 磷硫酰化修饰和海洋活性物质。E-mail: anxh2006@yahoo.com.cn

收稿日期: 2013-02-19; **修回日期:** 2013-05-01

此定义为 Dnd 表型^[7]。深入研究表明,这一现象为该 DNA 骨架上非磷氧桥上的一个氧被硫取代所致^[8],现已将这一生理特性命名为 DNA 的磷硫酰化修饰(DNA phosphorothioation,简称 DNA PT)或 DNA 硫修饰(DNA sulfur modification)。该修饰在细菌中广泛存在,发生硫修饰的 DNA 与宿主专一性限制修饰系统相关^[9]、可被 IV 型限制性内切酶 *ScoMcrA* 切割^[10],此外硫修饰的 DNA 是机体的一种抗氧化机制^[11]。研究表明,Dnd 表型受约 6 kb、被命名为 *dnd* 的基因簇控制^[4,7,12-13]。对于 *dnd* 簇的酶学功能研究,目前比较清楚的只有 DndA,即 DndA 具有脱硫酶活性^[4,14],功能与大肠杆菌中的 *IscS* 类似,且已证实大肠杆菌的 *IscS* 在沙门氏菌的硫修饰过程中行使 DndA 的功能^[15];其它基因的功能均在探索中,尚需更多的实验证据来证明。

沙门氏菌(*S. entericaserovar* Cerro 87)是具有硫修饰 DNA 的细菌之一,目前对其各基因的功能研究尚无报道。本研究拟克隆沙门氏菌 *dnd* 基因簇中的 *dptC*(DNA phosphorothioation)基因,使其高通量表达,为进一步研究 *DptC* 的酶学功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:沙门氏菌(*Salmonella entericaserovar* Cerro 87)、大肠杆菌(*Escherichia coli*DH10B)、大肠杆菌[*Escherichia coli*BL21(DE3) pLysS],由上海交通大学微生物代谢国家重点实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:KOD 高保真 DNA 聚合酶及其相关试剂均为 TOYOBY 产品,*SmaI* 和 *XhoI* 为 Fermentas 产品,酶连试剂盒为 TaKaRa 产品,引物由上海生工生物工程有限公司合成,测序由上海鼎安生物科技公司完成。

1.2 沙门氏菌 *dptC* 基因的克隆及融合表达载体的构建

1.2.1 目的基因沙门氏菌 *dptC* 基因的制备和回收:以沙门氏菌(*S. entericaserovar* Cerro 87)总 DNA 为模板。5'-TGATTACGATATCCCAACGACCGAAAA CCTGTATTTTCAGGGA(下划线为 TEV 即 *Tobacco etch virus* N1a proteinase 酶切位点)和 CCGCTCG AGTGAATACCAAGTTG(下划线为 *XhoI* 酶切位点)为特异性引物、用 KOD 酶进行 PCR 扩增。PCR 反

应体系(100 μ L):超纯水 70 μ L,10 \times buffer 10 μ L,25 μ mol/L dNTP 10 μ L,25 mmol/L $MgSO_4$ 4 μ L, KOD 酶 2 μ L,模板 DNA 2 μ L,特异性引物各 25 nmol/L 1 μ L;反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,68 $^{\circ}$ C,70 s,循环 30 次;68 $^{\circ}$ C 5 min。用 TIANgel Midi Purification Kit 回收扩增产物。

1.2.2 融合表达载体的构建:用 *SmaI* 单酶切表达载体 pGEX-6P-1,酶切体系(100 μ L):80 μ L pGEX-6P-1 载体质粒,10 μ L Tango buffer,1 μ L *SmaI*,30 $^{\circ}$ C 水浴 2 h;再加 10 μ L Tango buffer,1 μ L *XhoI*,37 $^{\circ}$ C 水浴 2 h;琼脂糖凝胶回收约 5 kb 的片段。

用 *XhoI* 单酶切目的基因片段,酶切体系(100 μ L):89 μ L 目的基因片段,10 μ L R buffer,1 μ L *XhoI*,37 $^{\circ}$ C 水浴 2 h,酶切产物用乙醇沉淀回收。

连接目的基因与表达载体,反应体系 10 μ L:5 μ L Solution I,4 μ L 目的基因片段,1 μ L 表达载体,Eppendorf 公司的 ThermoStat plus 16 $^{\circ}$ C,反应 4 h。

酶连产物转化 *E. coli*DH10B,按文献[22]中钙转化法操作,经氨苄霉素抗性初选的阳性克隆,进一步测序确认,无误后提取质粒,以同样方法转化大肠杆菌表达宿主 *E. coli*BL21(DE3) pLysS,得工程菌株 Anxh103,即 *E. coli*BL(DE3) pLysS/pJTU3622,工程菌的培养基中均含 100 μ g/mL 氨苄青霉素和 25 μ g/mL 氯霉素。

1.3 沙门氏菌 *dptC* 基因的诱导表达及条件优化

第一次优化。挑取 Anxh103 单菌落,接种 LB 液体,37 $^{\circ}$ C、220 r/min 过夜培养,次日按 1% 接种量转接至 100 mL LB 液体培养基,37 $^{\circ}$ C 培养约 2 h 至 $OD_{600} = 0.6$ 时添加 0.2 mmol/L IPTG 进行诱导表达,诱导温度设置 20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C 和 30 $^{\circ}$ C 3 个水平,诱导 4 h 后开始取样,每隔 2 h 取样 1 次,即 4、6、8 和 10 h,每次取样 1.5 mL;样品暂时保存在 4 $^{\circ}$ C 冰箱,待取样结束后一并处理检测。第二次优化。在第一次优化基础上,温度设定 18 $^{\circ}$ C,取样时间改为 8 h 和 18 h,同时引入培养基中添加 50 mmol/L Fe^{2+} 这一因素。接种及取样同第一次。第 3 次优化。根据前两次的结果,优化 IPTG 浓度,设定 0.2、0.4、0.6 和 0.8 mmol/L 4 个水平。接种及取样同第一次。

1.4 样品处理及 SDS-PAGE 电泳检测

取上述样品 1.5 mL,在室温、12000 \times g 离心 3 min,沉淀用缓冲液 A 0.5 mL(50 mmol/L Tris-HCl

pH8.0,300 mmol/L NaCl) 重悬, 超声波破碎3 min (工作5 s, 间歇25 s或观察至均匀透明), 破碎液记为 T; 破碎液经 12000 × g 离心 10 min, 上清液记为 S; 沉淀用等体积缓冲液 A 重悬, 记为 P; 每个样品取 40 μL, 加10 μL 5 × 蛋白质电泳上样缓冲液, 95℃ 加热20 min, 12000 × g 离心3 min, 上清用于蛋白电泳, 上样体积6 μL。

SDS-PAGE 电泳按参考文献[16]操作。

1.5 沙门氏菌 DptC 的分离纯化

在最优诱导表达条件下发酵 Anxh103 工程菌 3 L, 4℃、8000 × g 离心8 min收集菌体, -20℃ 保存备用。

称取上述菌体1.0 g, 加10 mL缓冲液 A 重悬, 4℃下超声破碎30 min(工作5 s, 间歇25 s或观察至均匀透明), 4℃、12000 × g 离心30 min, 上清重复离心3次以上至无任何沉淀, 上 GST-Trap 柱前用孔径 45 μm 针头式微型过滤器再次过滤。

Äkta FPLC 纯化系统: 5 倍体积缓冲液 A 平衡 GST-Trap 柱后上样, 再 5 倍体积缓冲液 A 平衡洗掉柱中非特异性结合的杂蛋白, 再用 10 倍体积缓冲液 A 洗脱, 同时使用缓冲液 B (50 mmol/L Tris pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L glutathione) 从 0 上升到 100% 对蛋白进行梯度洗脱, 收集洗脱峰, SDS-PAGE 检测。

1.6 数据处理电泳照片均系 Bio-red 凝胶成像仪拍摄, 蛋白质含量用 Quantity one 软件分析。

2 结果

2.1 目的基因沙门氏菌 *dptC* 的制备及融合表达载体的构建

按方法 1.2 操作, 制备目的基因沙门氏菌 *dptC* 和表达载体 pGEX-6P-1, 结果如图 1-A。融合载体的构建过程如图 1-B。将 pJTU3622 转化 *E. coli* (DE3) pLysS, 得工程菌株 Anxh103。

2.2 沙门氏菌 *dptC* 的诱导表达及条件优化

由 2.1 获得工程菌株 Anxh103, 按方法 2.2 操作, 首先对发酵温度进行了优化, 结果见图 2-A, 可见 20℃ - 30℃ 条件下, 均可诱导表达沙门氏菌 *dptC* (含 GST 标签和 TEV 酶切位点时理论分子量为 87.6 kDa), 如图中箭头所示, 但几乎都是不可溶的;

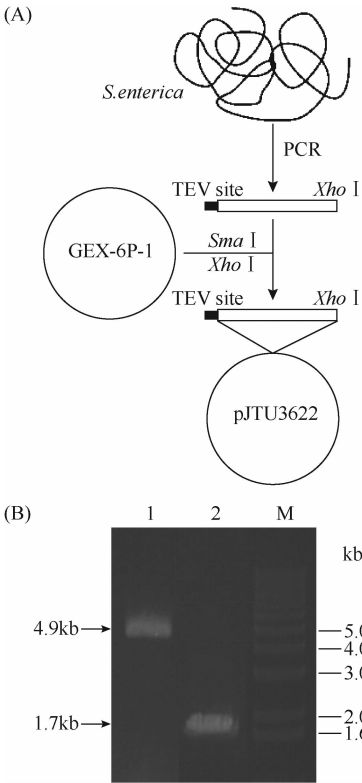


图 1. *S. enterica dptC* 的制备及融合载体的构建

Figure 1. Preparation of *S. enterica dptC* and its fusion plasmid construction. A: Construction of pJTU3622 with *S. enterica dptC*; B: Preparation of *S. enterica dptC* fragment. Lane 1, pGEX-6P-1; lane 2, *dptC* fragment; M, marker 1 kb.

于是降低温度, 再次优化, 并添加 Fe^{2+} , 结果如图 2-C, 可见 18℃ 诱导 8 - 18 h 均可获得较高产量的目标产物, 且在培养基中添加 50 μmol/L Fe^{2+} 时有助于增加沙门氏菌 DptC 蛋白的可溶性; 最后再对 IPTG (异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷, Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside) 浓度进行优化, 结果如图 2-B, 可见当 IPTG 浓度为 0.6 mmol/L 时沙门氏菌 *dptC* 可获得最大量的表达。

2.3 沙门氏菌 DptC 的分离纯化

按 2.2 得到的最优诱导表达条件, 37℃ 培养 Anxh103 工程菌 3 L, 当 $OD_{600} = 0.6$ 时, 添加 0.6 mmol/L IPTG 诱导, 在 18℃ 诱导培养 8 h 后收集菌体备用。按方法 1.5 操作, 分离纯化沙门氏菌 DptC, 结果显示 (图 3), 沙门氏菌 DptC 经 GST-Trap 柱一次分离纯化, 经 Quantity one 4.4.0 软件分析, 纯度达到 80% 以上。肉眼观察, 可见产物显示为浅棕色。

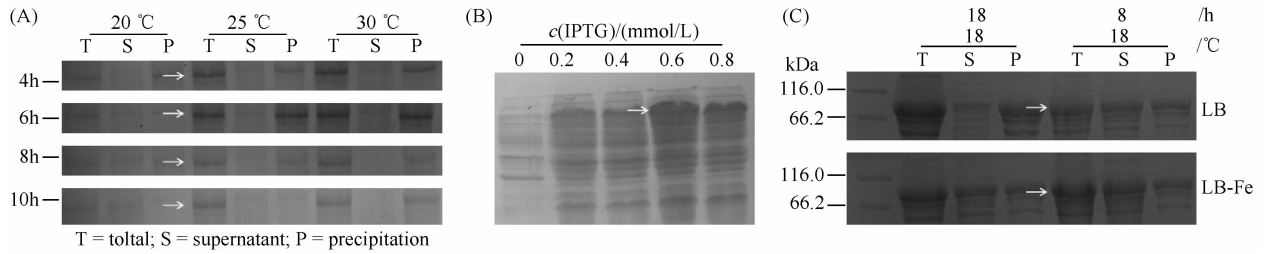


图 2. *S. enterica*DptC 诱导表达条件的优化

Figure 2. Optimizing conditions of inducing and expression of *S. enterica*dptC. A: Expression of *S. enterica* dptC at different temperature; B: Optimizing temperature for *S. enterica* dptC with or without Fe²⁺ ; C: Optimizing IPTG content for *S. enterica* dptC expression.

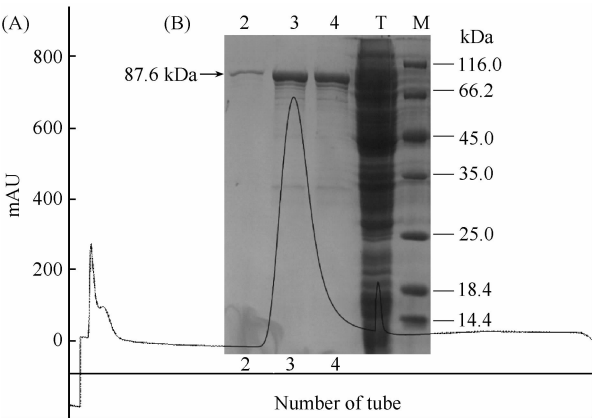


图 3. *S. enterica*DptC 的分离纯化

Figure 3. Separation and purification of *S. enterica*DptC. A: Elution profiles of DptC by FPLC; B: SDS-PAGE for DptC. T, total DptC before purification; M: protein marker; lane 2, 3 and 4 are tuber number in both A and B.

3 讨论

DptC 是沙门氏菌 DNA 磷硫酰化修饰形成过程中的重要蛋白之一,其缺失突变会导致 DNA 磷硫酰化现象的丧失^[17]。本研究构建了沙门氏菌 *dptC* 与 GST 标签的融合表达载体,获得了可高通量表达 *dptC* 的工程菌株 Anxh103,且在 18℃ 诱导 8 h 就可获得可溶性比例很高的 DptC;本研究应用了 GST 标签,该标签的特异性使得该蛋白分离纯化步骤简化,一次 anti-GST 柱可使纯度达到 80% 以上,因此纯化工作简单方便;同时本研究在表达载体构建中设计了 TEV 酶切位点,可以很方便的切去 GST 标签,为进一步研究其酶学功能奠定了基础。

实验结果显示,培养基中需添加 50 μmol/L Fe²⁺,可以提高 DptC 产量。究其原因,沙门氏菌

DptC 定点突变研究及生物信息学分析均表明^[18],沙门氏菌 DptC 与变铅青链霉菌 DndC 一样,也是一种含 4Fe-4S 簇的铁硫蛋白,其合成过程需要铁的参与。由此推断,尽管添加或不添加 Fe²⁺ 均能合成 DptC,但其产量和生物活性尚待进一步阐明。

本研究纯化的 DptC 显示浅褐色,与 You^[14]报道的 DndC 颜色一致,这一迹象支持了沙门氏菌 DptC 为一铁硫蛋白的说法。

致谢 感谢上海交通大学微生物代谢国家重点实验室邓子新团队的所有成员,特别感谢上海交通大学的白林泉教授、林双君教授和黄婷婷博士、殷俊博士在实验中给予的大力支持与帮助。

参考文献

[1] McKee T, McKee JR. Biochemistry: An introduction. 2nd eds. New York: McGraw-Hill Companies, Inc. 2000.

[2] Brown TA. Genomes. 2nd eds. Oxford: Wiley-Liss, 2002.

[3] 郑集,陈钧辉. 普通生物化学. 第四版. 北京: 高等教育出版社, 2007.

[4] Zhou X, He X, Liang J, Li A, Xu T, Kieser T, Helmann JD, Deng Z. A novel DNA modification by sulphur. *Molecular Microbiology*, 2005, 57 (5): 1428-1438.

[5] Ou H, He X, Shao Y, Tai C, Rajakumar K, Deng Z. dnd DB: A Database Focused on Phosphorothioation of the DNA Backbone. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5132.

[6] Wang L, Chen S, Vergin KL, Giovannoni SJ, Chan SW, DeMott MS, Taghizadeh K, Cordero OX, Cutler M, Timberlake S, Alm EJ, Polz MF, Pinhassi J, Deng Z,

- Dedon PC. DNA phosphorothioation is widespread and quantized in bacterial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(7):2963-2968.
- [7] Zhou, X, Deng Z, Firmin JL, Hopwood DA, Kieser T. Site-specific degradation of *Streptomyces lividans* DNA during electrophoresis in buffers contaminated with ferrous iron. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16 (10): 4341-4352.
- [8] Wang L, Chen S, Xu T, Taghizadeh K, Wishnok JS, Zhou X, You D, Deng Z, Dedon PC. Phosphorothioation of DNA in bacteria by *dnd* genes. *Nature Chemical Biology*, 2007, 3(11):709-710.
- [9] Xu T, Yao F, Zhou X, Deng Z, You D. A novel host-specific restriction system associated with DNA backbone S-modification in *Salmonella*. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(20):7133-7141.
- [10] Liu G, Ou H, Wang T, Li L, Tan H, Zhou X, Rajakumar K, Deng Z, He X. Cleavage of phosphorothioated DNA and methylated DNA by the type IV restriction endonuclease ScoMcrA. *PLoS Genetics*, 2010, 6(12): e1001253.
- [11] Xie X, Liang J, Pu T, Xu F, Yao F, Yang Y, Zhao Yi, You D, Zhou X, Deng Z, Wang Z. Phosphorothioate DNA as an antioxidant in bacteria. *Nucleic Acids Research*, 2012: 1-10.
- [12] He X, Ou H, Yu Q, Zhou X, Wu J, Liang J, Zhang W, Rajakumar K, Deng Z. Analysis of a genomic island housing genes for DNA S-modification system in *Streptomyces lividans* 66 and its counterparts in other distantly related bacteria. *Molecular Microbiology*, 2007, 65: 1034-1048.
- [13] Zhou X, He X, Li A, Lei F, s Kieser T, Deng Z. *Streptomyces coelicolor* A3 (2) lacks a genomic island present in the chromosome of *Streptomyces lividans* 66. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(12): 7110-7118.
- [14] You D, Wang L, Yao F, Zhou X, Deng Z. A novel DNA modification by sulfur; DndA is a NifS-like cysteine desulfurase capable of assembling DndC as an iron-sulfur cluster protein in *Streptomyces lividans*. *Biochemistry*, 2007, 46: 6126-6133.
- [15] An X, Xiong W, Yang Y, Li F, Zhou X, Wang Z, Deng Z, Liang J. A novel target of IscS in *Escherichia coli*: participating in DNA phosphorothioation. *PLoS One*, 7 (12): e51265. doi:10.1371/journal.pone.0051265.
- [16] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京:科学出版社, 2000.
- [17] Xu T, Liang J, Chen S, Wang L, He X, You D, Wang Z, Li A, Xu Z, Zhou X, Deng Z. DNA phosphorothioation in *Streptomyces lividans*; mutational analysis of the *dnd* locus. *BMC Microbiology*, 2009, 9: 41.
- [18] An X, Zhou X, Wang Z, Deng Z, Liang J. Mutagenesis of cysteine residues in *dptC* from *Salmonella enteric* serovar Cerro 87 and its effects on DNA phosphorothioate modification. *Acta Microbiological Sinica*, 2013, 53(2): 204-209. (in Chinese)
- 安贤惠, 周秀芬, 汪志军, 邓子新, 梁晶丹. *Salmonella enterica* 硫修饰蛋白 DptC 半胱氨酸定点突变对 Dnd 表型的影响. *微生物学报*, 2013, 53(2): 204-209.

Cloning, expression and purification of *dptC*, a DNA phosphorothioate modification related gene from *Salmonella enteric* serovar Cerro 87

Xianhui An^{1,2}, Xiufen Zhou², Zhijun Wang², Zixin Deng^{2*}, Jingdan Liang^{2*}

¹ Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China

² State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [**Objective**] DNA phosphorothioate modification means substituting a non-bridging oxygen with a sulfur in DNA. The modification endows DNA with such chemical property that protects the hosting bacteria against peroxide. The modification is controlled by a *dnd* gene cluster. *Salmonella enterica* serovar Cerro 87 is one of the bacteria that harbor the DNA phosphorothioate modification. The modification is carried out by *dptB*, *C*, *D* and *E*. Our study is designed to clone and express *dptC*, to optimize the expressing condition, and then to purify the DptC. [**Methods**] *dptC* DNA fragment was amplified by KOD PCR with the special primers and *S. enterica* serovar Cerro 87 genomic DNA template. A fusion expression vector pJTU3622 was constructed by inserting the *dptC* DNA fragment into pGEX-6P-1 in *Sma*I and *Xho*I sites. The positive clone was verified by antibiotics resistance gene screening and sequenced, and then transferred into host strain *E. coli* BL21 (DE3) pLysS to produce an engineering bacterium Anxh103. After optimizing the expression condition for *dptC*, we purified DptC from Anxh103 by Äkta FPLC with a GST-Trap column. [**Results**] A fusion expression vector pJTU3622 and an engineering bacterium Anxh103 were produced. The optimizing expressing condition for *dptC* is as follows: induced at 18°C for 8–18 h; 0.6 mmol/L IPTG, LB with 50 µmol/L Fe²⁺. [**Conclusion**] The anchor redeemed for high throughput expression of *dptC*. The TEV site in pJTU3622 made the process of purifying DptC easier and simpler. This helps lay the ground work for future study on the function of DptC. Also, the light brown color of DptC and the medium with 50 µmol/L Fe²⁺ showed us DptC has the same character with DndC which belongs to an iron-sulfur protein with 4Fe–4S.

Keywords: DNA phosphorothioate modification, *Salmonella enteric*, *dpt* gene cluster, cloning and expressing of a gene, protein purifying

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Natural Science Foundation of China (30870038, 30970624)

* Corresponding authors. Jingdan Liang, Tel: +86-21-62932943, Fax: +86-21-62932418, E-mail: jdliang@sjtu.edu.cn; Zixin Deng, Tel: +86-21-62933404, Fax: +86-21-62932418, E-mail: zxdeng@sjtu.edu.cn

Received: 19 February 2013/Revised: 1 May 2013