

文章编号: 1007-4627(2013)02-0195-06

$^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照对阿维链霉菌代谢效应研究

王曙阳¹, 薄永恒², 王丽华³, 陈积红¹, 李文建¹, 梁剑平¹, 刘敬¹

(1. 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2. 甘肃农业大学, 甘肃 兰州 730070;

3. 西北民族大学, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照诱变高产阿维链霉菌株 ZJAV-Y1-203 和原始菌株 ZJAV-A-1 的摇瓶发酵 pH 值、菌体浓度、碳源和氮源代谢进行了测定, 研究了 $^{12}\text{C}^{6+}$ 辐照对阿维链霉菌的代谢效应。在发酵前期 (48 h), 原始菌株发酵液 pH 值低于突变菌株; 在发酵 96~196 h, 诱变高产菌株 ZJAV-Y1-203 繁殖快, 生长旺盛, N 的利用率高; 菌体浓度大于原始菌株的浓度, 且发酵液的 pH 稳定, 菌体处于代谢相对更稳定期; 在发酵 144~240 h, 诱变高产菌株 ZJAV-Y1-203 对糖源消耗低于原始菌株 ZJAV-A-1。这些结果表明, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照对阿维链霉菌代谢影响有利于阿维菌素合成。

关键词: pH; 菌体浓度; 糖含量; 氮含量; 代谢效应

中图分类号: R146 **文献标志码:** A **DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.30.02.195

1 引言

阿维菌素 (*avermectins*, 简称 AVM) 是由阿维链霉菌 (*Streptomyces avermitilis*) 产生的一类十六元大环内酯类抗生素, 共由 8 个组分组成, 分别被命名为 A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a 及 B2b, 该组化合物被统称为阿维菌素^[1], 其组分作用效果以 B1 组分最佳, 杀虫活性最高, 而毒性最小。阿维菌素具有广泛的抗寄生虫活性, 且抗寄生虫机制独特, 是迄今已发现有效的杀昆虫剂、杀螨虫剂和杀寄生虫剂之一^[2]。

20 世纪 80 年代, 完成了阿维菌素的工业化生产, 并在阿维菌素的各个方面 (如分子结构、生物合成、结构修饰、生物活性以及生产水平提高等) 都展开了深入的研究, 形成了一个重要的抗生素研究领域^[3-4]。阿维菌素主要存在于菌丝体中, 很多因素影响其生物合成, 如碳源、氮源、菌体浓度、通气量、温度和 pH 值等。本文对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照诱变高产阿维链霉菌株 ZJAV-Y1-203 和原始菌株 ZJAV-A-1 的摇瓶发酵 pH 值、菌体浓度、碳源和氮源代谢进行测定, 并

研究 $^{12}\text{C}^{6+}$ 辐照对阿维链霉菌的代谢效应, 以期掌握 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照诱变高产菌株代谢规律, 为进一步提高产量, 并建立重离子诱变高产菌株发酵工艺路线打下基础。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

(1) 菌株

阿维链霉菌 (*Streptomyces avermitilis*) 原始菌株 ZJAV-A-1, 摇瓶发酵单位 3 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 重离子诱变高产阿维链霉菌株 ZJAV-Y1-203, 摇瓶发酵单位 4 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子能量 80 MeV/u, 剂量率 10 Gy/min, 辐照剂量 30, 40, 50, 60 和 70 Gy, 贯穿照射阿维链霉菌单孢子悬液。平板、斜面培养, 摇瓶发酵, 以发酵液中 B1a 组分含量进行诱变高产分菌株筛选 (中国科学院近代物理研究所生物物理室微生物实验室辐照选育)。

(2) 仪器与设备

收稿日期: 2012-07-12; 修改日期: 2012-09-05

基金项目: 中国科学院西部之光人才培养计划项目(O906050XB0); 兰州市科技计划项目(2009-2-13); 甘肃省自然科学基金资助项目(O99RJYA013)

作者简介: 王曙阳(1974-), 女, 甘肃正宁人, 副研究员, 从事辐射生物学相关研究; E-mail: wangsy@impcas.ac.cn.

<http://www.npr.ac.cn>

高效液相色谱仪(美国瓦里安公司, 型号 Prostar 210); 液相质谱联用仪(安捷伦公司, 型号 1100 LC-MSD Trap); 分光光度计(上海美谱达仪器, 型号 UV-1100 型); 旋转摇床机(上海世平实验设备有限公司, 型号 SPH2311D); 酸度测试仪(上海增骏实业有限公司, 型号 PB-10); 兰州重离子研究装置(HIRFL)垂直辐照生物终端; $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束。

(3) 培养基和条件

1) 分离和斜面培养

可溶性淀粉、氯化钠、硫酸铵、硫酸镁、碳酸钙、磷酸氢二钾和琼脂, 蒸馏水配制, pH 值取自然值。沙土管菌种、分离纯化后的菌种或斜面保藏菌种接种于上述培养基, 培养基配比参照文献[4]报道的比例, 在 $(28 \pm 0.6)^\circ\text{C}$ 和 40% 左右湿度条件下培养 6 d。

2) 种子培养

淀粉、糊精、豆饼粉、花生饼粉、酵母粉、氯化钴、豆油和酵母膏。自来水配制, pH 值调至 7.3 ± 0.5 (培养基配比参照文献[4]报道的比例)。将成熟斜面上的孢子用无菌接种铲挖块接种于种子培养摇瓶中, 种子摇瓶装量为 40/250 mL。温度为 $(28 \pm 0.6)^\circ\text{C}$, 转速为 220~240 r/min, 旋转式摇床上培养 28 h。

3) 发酵培养

淀粉、黄豆饼粉、花生饼粉、酵母粉、磷酸氢二钾和氯化钴等, 自来水配制, pH 值调至 7.5 ± 0.5 , 培养基配比参照文献[4]报道的比例, 接种量为 4%, 装量为 40/250 mL, 温度为 $(28 \pm 0.6)^\circ\text{C}$, 转速为 242 ~ 252 r/min, 旋转式摇床上培养 9 d。

(4) 试剂

1) 3, 5-二硝基水杨酸试剂(DNS试剂)

取结晶苯酚 3.45 g 溶于 7.75 mL 氢氧化钠溶液中, 并用水稀释至 34.5 mL, 在此溶液中加入 3.45 g 亚硫酸氢钠, 所得溶液为甲液; 称取酒石酸钾钠 127.5 g 置 150 mL 10% 氢氧化钠溶液中, 再加入 1% 3, 5-二硝基水杨酸溶液 440 mL, 所得溶液为乙液; 将甲、乙两溶液混合即得黄色试剂, 贮于棕色瓶中, 在室温放置 7~10 d 后使用。

2) 碱性过硫酸钾溶液

称取 20 g 过硫酸钾(分析纯)和 7.5 g 氢氧化钠(分析纯), 溶于一次蒸馏水中, 稀释至 500 mL。过硫酸钾的溶解方式应采用自然室温溶解。过硫酸钾溶液配制好后存放在聚乙烯瓶内, 可贮存 7 d。

3) 硝酸钾标准贮备液

称取 0.7218 g 经 $105 \sim 110^\circ\text{C}$ 烘干 4 h 的优级纯硝酸钾溶于一次蒸馏水中, 移至 1000 mL 容量瓶中定容。此溶液每 mL 含 100 μg 硝酸盐氮。加入 2 mL 三氯甲烷为保护剂, 可稳定 180 d。

4) 硝酸钾标准使用液

将贮备液用一次蒸馏水稀释 10 倍而得。此溶液每 mL 含 10 μg 硝酸盐氮。

5) 碘-碘化钾溶液

准确称取 5 和 10 g 碘化钾溶于 100 mL 蒸馏水中混匀。

6) 相关试剂

1.0 mg/mL 葡萄糖标准溶液。0.5% 酚酞, 6 mol/L 的盐酸溶液; 10% 氢氧化钠溶液, 6 mol/L 氢氧化钠溶液。

2.2 方法

(1) 培养方法^[5-7]

挑取丰满灰色孢子, 转接到种子培养基中, 在 28.5°C 和 220 r/min 的摇床上培养 26 h 后, 按 4% 的接种量接种入 250 mL 摇瓶中, 在 28°C 下培养。

(2) 发酵液中 pH 值的测定

分别取培养 0, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 和 240 h 发酵液测其 pH 值, 每组设 3 个平行对照。

(3) 菌丝体浓度测定

取培养 0, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 和 240 h 发酵液 1 mL, 置离心管中, 3500 r/min 离心 15 min, 弃上清。在烘箱中干燥, 每 0.5 h 测重一次, 直到恒重, 测定菌体浓度。每一组设 3 个平行对照。

(4) 发酵液中氨基氮的测定^[8]

1) 标准曲线的绘制

分别汲取 0, 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.50, 3.50, 4.00 mL 硝酸钾标准使用溶液于 15 mL 比色管中, 用一次蒸馏水稀释至 10 mL 标线; 加入 5 mL 碱性过硫酸钾溶液, 塞紧磨口塞, 用纱布或纱绳裹紧管塞, 以防迸溅; 将比色管置于灭菌器中, 在 122°C 下加热消解 45 min, 使比色管在过热水蒸气中加热 30 min; 等压力指针归零, 打开放气阀排气, 然后取出比色管并冷却至室温, 并加入 (1+9) 盐酸 1 mL, 用一次蒸馏水

稀释至 25 mL 标线; 在紫外分光光度计上, 以一次蒸馏水作参比, 用 10 mm 石英比色皿在 275 nm 波长处测定吸光度, 然后用校正的吸光度绘制标准曲线。

2) 样品中 N 的测定

1 mL 发酵液含 N 量为 32 μg 。取 1, 1.5 和 2 mL 发酵液(使总 N 含量为 20~80 μg)。按标准曲线绘制步骤操作, 按预先绘制的标准曲线查出相应的总 N 量, 再用 $TN(\text{mg/L}) = (m/V) \times 10^{-3}$ 公式计算总 N 含量, 其中: m 为由校准曲线查得的含 N 量(μg); V 为发酵液

体积(mL)。

(5) 发酵液中糖的测定^[9]

1) 葡萄糖标准曲线的制定

取无水葡萄糖置于 100 °C 烘箱内干燥至恒重, 准确称取 100 mg 葡萄糖于 100 mL 容量瓶中配成 1 mg/mL 葡萄糖标准溶液, 然后按表 1 要求加入试剂混匀, 沸水浴 5 min, 冷却至室温, 用蒸馏水定容至 25 mL 摇匀, 520 nm 波长测吸光度。按所得结果做标准曲线。

表 1 葡萄糖标准曲线样品制备步骤

管号	葡萄糖标准溶液/mL	蒸馏水/mL	溶液糖含量/%	DNS 试剂/mL
0	1	2.0	0	1.5
1	0.2	1.8	0.01	1.5
2	0.4	1.6	0.02	1.5
3	0.6	1.4	0.03	1.5
4	0.8	1.2	0.04	1.5
5	1.0	1.0	0.05	1.5
6	1.2	0.8	0.06	1.5
7	1.4	0.6	0.07	1.5
8	1.6	0.4	0.08	1.5

2) 阿维菌素发酵液中总糖的水解

取发酵上清液 0.25 mL 置于 50 mL 容量瓶中, 加 6 mol/L 的盐酸溶液 5 mL, 蒸馏水 10 mL, 沸水浴 15 min。水解完毕, 冷却至室温, 后加酚酞指示剂 1 滴, 以 6 mol/L 氢氧化钠溶液中和至微红色, 并定容至 50 mL。

3) 阿维菌素发酵液中总糖的测定

取总糖水解液 2 mL 于 25 mL 容量瓶中, 加入 DNS 试剂 1.5 mL 沸水浴 5 min, 冷水冷却后定容, 以空白作对照测定 520 nm 波长下的吸光度。根据预先绘制的葡萄糖标准曲线计算葡萄糖质量浓度。

变菌株繁殖速度快, 在此阶段原始菌株比突变高产菌株生长旺盛; 在发酵 96 h 时, 原始菌株与诱变高产菌株

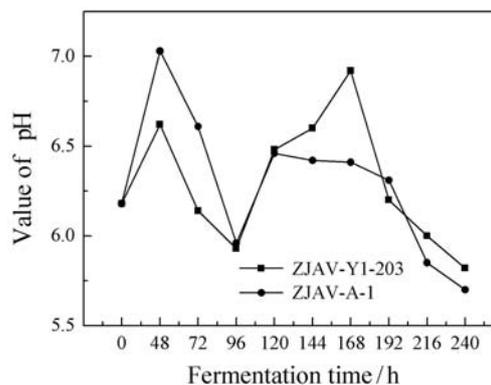


图 1 发酵液中 pH 值随发酵时间变化

株发酵液 pH 数值差异没有统计学意义 (5.96 vs 5.93 $P > 0.05$)。发酵 96~216 h(产抗的关键阶段), 突变高产菌株的 pH 稳定在 6.5 左右, 原始菌株发酵液 pH 值在 168 h 后升高到 6.92, 达到一个峰值后再下降, 说明诱变高产菌株在产生阿维菌素期比原始菌株菌体浓度稳定, 代谢也处于相对稳定期。

3.2 发酵液中菌体浓度测定结果

诱变高产阿维链霉菌株 ZJAV-Y1-203 与原始

3 结果

3.1 发酵液中 pH 值测定结果

诱变高产阿维链霉菌株 ZJAV-Y1-203 与原始菌株 ZJAV-A-1 在发酵 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 和 240 h 发酵液 pH 值的检测结果见图 1。在发酵 0~96 h 原始菌株发酵液 pH 值低于突变菌株, 菌体生长繁殖快, 呼吸产生的 CO_2 使发酵液中 pH 值下降, 由发酵前 96 h pH 值的变化, 提示原始菌株比突

菌株 ZJAV-A-1 在发酵 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 和 240 h 菌体浓度测定结果见图 2。在发酵 0~96 h, 诱变高产菌株的菌体浓度低于原始菌株, 前期发酵液菌体浓度较高, 会使发酵液黏稠, 菌丝结球小而多, 降低溶氧水平, 并对最终的摇瓶效价产生影响; 在发酵 144~216 h, 诱变高产菌株的菌体浓度高于原始菌株, 可生成较多代谢产物——阿维菌素, 与发酵液 pH 值随时间变化反应的菌体生长趋势一致。随着菌体的自溶, 突变菌株与原始菌株的菌浓最终达到一个较低的水平。

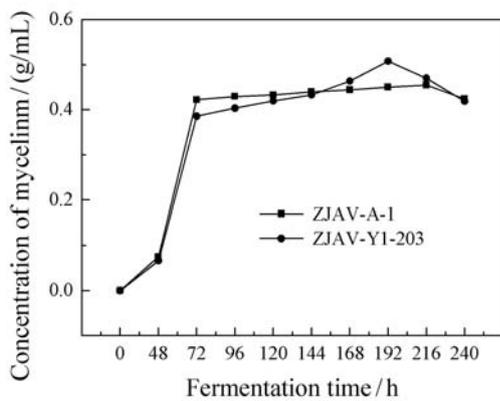


图 2 发酵液中菌体浓度随发酵时间变化

3.3 发酵液中氨基氮的测定

(1) 标准曲线

根据 2.2 节中 (4) 标准曲线制备步骤, 在 275 nm 测定各样品管的 OD 值, 结果见图 3, 线性回归方程 $y = 0.0573X + 0.034$, $R^2 = 0.9763$ 。

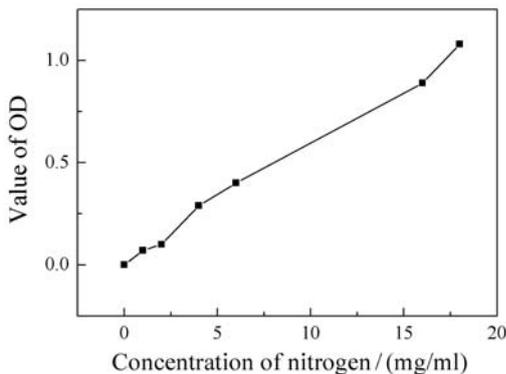


图 3 发酵液中氮含量标准曲线

(2) 发酵液中氨基氮的测定结果

诱变高产阿维链霉菌株 ZJAV-Y1-203 与原始菌株 ZJAV-A-1 在发酵 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 和 240 h 发酵液中氨基氮的测定结果见图 4。

在发酵 0~96 h, 诱变高产阿维链霉菌株 ZJAV-Y1-203 与原始菌株 ZJAV-A-1 在 N 利用变化没有差异; 在发酵 96~196 h, ZJAV-Y1-203 菌株在此阶段菌体繁殖快, 生长旺盛, N 的利用率高, 使发酵液中氨基氮的含量低于 ZJAV-A-1; 发酵 192~240 h, 随着发酵时间延长, 菌体浓度增加, 菌体生长速度减慢, 菌体自溶增强, ZJAV-Y1-203 发酵液中菌体浓度大于 ZJAV-A-1, 自溶的菌体数量大于 ZJAV-A-1, 使 ZJAV-Y1-203 发酵液中氨基氮的含量高于 ZJAV-A-1 菌株。阿维菌素增长速度最快阶段(发酵 96~192 h), ZJAV-Y1-203 发酵液中氨基氮的浓度低于 ZJAV-A-1, 发酵液中的 $[NH_4^+]$ 对阿维菌素的合成有抑制作用, $[NH_4^+]$ 减少可以减弱对阿维菌素合成的抑制作用。

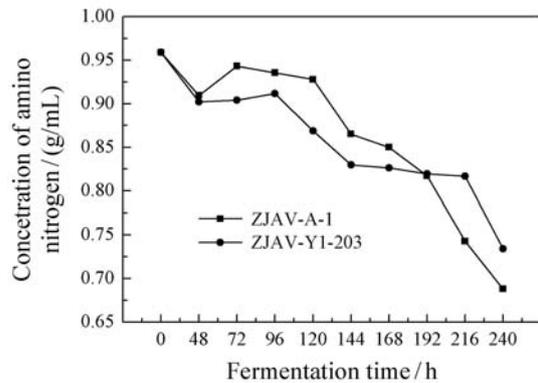


图 4 发酵液中氨基氮的浓度随发酵时间变化

3.4 发酵液中总糖的测定

(1) 标准曲线

根据 2.2 节中 (5) 标准曲线制备步骤, 在 520 nm 测定各样品管的 OD 值, 结果见图 5, 其线性回归方程

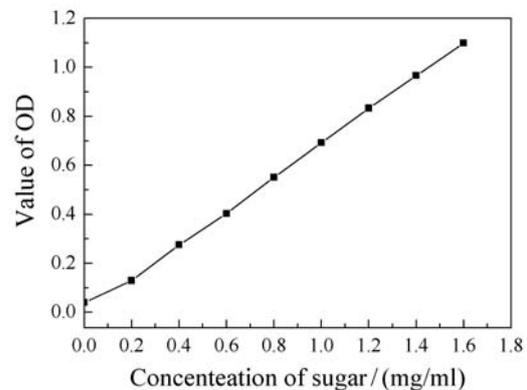


图 5 发酵液中糖含量标准曲线

为 $y = 0.6793X + 0.0108$, $R^2 = 0.9986$ 。

(2) 发酵液中总糖的测定结果

诱变高产阿维链霉菌株 ZJAV-Y1-203 与原始菌株 ZJAV-A-1 在发酵 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 和 240 h 发酵液中总糖的测定, 结果见图 6。

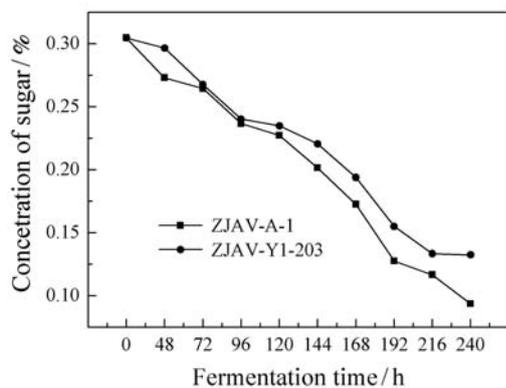


图 6 发酵液中总糖的浓度随发酵时间变化

从图 6 可以看出, 在发酵起始总糖含量迅速下降, ZJAV-A-1 发酵液中糖含量下降速度比 ZJAV-Y1-203 的快, 到第 4 天时下降速度逐渐减慢, 同文献 [10] 报道变化趋势一致。在发酵 72~120 h, 诱变高产菌株 ZJAV-Y1-203 与原始菌株 ZJAV-A-1 在糖的利用方面变化没有差异 (见表 2), 在发酵 144~240 h, 诱变高产

表 2 发酵液中总糖含量测定结果*

发酵时间/h	ZJAV-A-1	ZJAV-Y1-203
0	0.30±0.03	0.30±0.03
48	0.27±0.18	0.29±0.01
72	0.25±0.041	0.26±0.18
96	0.23±0.02	0.24±0.04
120	0.22±0.16	0.23±0.03
144	0.20±0.01	0.22±0.02*
168	0.17±0.09	0.19±0.01*
192	0.12±0.00	0.15±0.00*
216	0.11±0.12	0.13±0.01*
240	0.09±0.01	0.13±0.01**

* 与原始菌株 ZJAV-A-1 相比, * $P < 0.05$ 有差异, ** $P < 0.01$ 有显著差异。

菌株 ZJAV-Y1-203 对糖源消耗低于原始菌株 ZJAV-A-1, 减弱了诱变高产菌株发酵后期含糖量降低对阿维菌素合成抑制作用。这表明发酵前期菌体初级代谢会影响到后期的次级代谢, ZJAV-A-1 初级代谢过强导致前期总糖消耗速率过快, 后期可利用的糖浓度降低^[11]。

4 结论

在发酵前期 (48 h), 原始菌株 ZJAV-A-1 对糖消耗速度快于诱变高产菌株 ZJAV-Y1-203, 导致培养液中酸性物质的积累 (如乙酸、A-酮戊二酸), 原始菌株发酵液 pH 值低于突变菌株。在发酵 96~196 h, ZJAV-Y1-203 菌株在此阶段菌体繁殖快, 生长旺盛, 氮的利用率高于 ZJAV-A-1, 发酵液中氨基氮的浓度低于 ZJAV-A-1, 可以减少 $[\text{NH}_4^+]$ 对阿维菌素的合成的抑制作用; 诱变高产菌株的菌体浓度大于原始菌株, 突变高产菌株发酵液的 pH 稳定, ZJAV-Y1-203 菌体处于代谢相对更稳定期, 从而相对延长阿维菌素合成期, 提高发酵单位; 在发酵 144~240 h, 诱变高产菌株 ZJAV-Y1-203 对糖源消耗低于原始菌株 ZJAV-A-1, 减弱诱变高产菌株发酵后期因含糖量降低对阿维菌素合成的抑制作用。阿维链霉菌诱变高产菌株代谢变化有利于阿维菌素合成。

参考文献(References):

- [1] ALBERS-SCHONBERG G, ARISON B H, CHABALA J C, *et al.* Am Chem Soc, 1981, **103**(14): 4216.
- [2] ZHANG Liping, CHEN Chuan. Journal of Hebei University: Natural Science Edition, 2002, **22**(2): 189.(in Chinese)
(张利平, 陈川. 河北大学学报: 自然科学版, 2002, **22**(2): 189.)
- [3] HU Hongbo, ZHU Beilei, LI Junsuo. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2000, **31**(6): 520.(in Chinese)
(扈洪波, 朱蓓蕾, 李俊锁. 畜牧兽医学报, 2000, **31**(6): 520.)
- [4] ZHANG Yingying. Breeding of Streptomyces Avermitilis Producing Avermetin [D]. Shenyang: Shenyang pharmaceutical University, 2006.(in Chinese)
(张莹莹. 阿维菌素产生菌的菌种选育[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.)
- [5] WANG Shuyang, CHEN Jihong, LI Wenjian, *et al.* Nuclear Physics Review, 2010, **10**(1): 83.(in Chinese)
(王曙阳, 李文建, 陈积红, 等. 原子核物理评论, 2010, **27**(1): 83.)
- [6] CHEN Jihong, WANG Shuyang, LI Wenjian, *et al.* Journal of Gansu Agricultural University, 2010, **45**(3): 85.(in Chinese)
(陈积红, 王曙阳, 李文建, 等. 甘肃农业大学学报, 2010, **45**(3): 85.)
- [7] WANG Shuyang, CHEN Jihong, BO Yongheng, *et al.* Nuclear Physics Review, 2011, **28**(4): 485.(in Chinese)
(王曙阳, 陈积红, 薄永恒, 等. 原子核物理评论, 2011, **28**(4): 485.)
- [8] DING Zhibing, YU Zhanhuan, CHENG Tingting, *et al.* Water Purification Technology, 2008, **27**(1): 61.(in Chinese)

- (丁志斌, 余占环, 程婷婷, 等. 净水技术, 2008, **27**(1): 61.)
- [9] WU Faju. Mutagenesis and Screening of *Streptomyces Avermitilis* Producing Avermitilis and the Fermentation Condition Optimization[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2007.(in Chinese)
- (武发菊. 阿维菌素高产菌株的诱变选育及发酵条件优化的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2007.)
- [10] WU Faju, CHEN Jihong, LIANG Zhongjun, *et al.* Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2007(1): 36.(in Chinese)
- (武发菊, 陈继红, 梁仲军, 等. 中兽医医药杂志. 2007(1): 36.)
- [11] WU Yanbin, CHU Xiaohe, WANG Yonghong, *et al.* Journal of East China University of Science and Technology: Natural Science Edition, 2007, **33**(5): 643.(in Chinese)
- (巫延斌, 储消和, 王永红, 等. 华东理工大学学报: 自然科学版, 2007, **33**(5): 643.)

Metabolic Effect of *Streptomyces Avermitilis* Irradiated by Ion Beam of $^{12}\text{C}^{6+}$

WANG Shuyang^{1, 1)}, BO Yongheng², WANG Lihua³, CHE Jihong¹, LI Wenjian¹, LIANG Jianping¹, LIU Jing¹

(1. Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

2. Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China;

3. Northwest University For Nationalities, Lanzhou 730000, China)

Abstract: pH value, mycelium concentration, carbon source and nitrogen metabolism in flask fermentation of the mutant high-producing strain ZJAV-Y1-203 and the original strain ZJAV-A1 have been investigated, in order to show the metabolic effect of *avermitilis* irradiated by ion beam of $^{12}\text{C}^{6+}$. In early stage (48 h) of the fermentation, pH value of the original fermentation was lower than that of the mutant strains. In 96~196 h of fermentation, the nitrogen utilization in the strains ZJAV-Y1-203 was higher than that in the original strains, its reproductive was fast, and its growing was vigorous. The mycelium concentration of ZJAV-Y1-203 was greater than the original strain, and the pH value of fermentation were stable, so its metabolism was relatively more stable. In 144~240 h of fermentation, the strain ZJAV-Y1-203 on sugar consumption was less than the original strains. The effect of $^{12}\text{C}^{6+}$ ion irradiation on metabolism of *Streptomyces avermitilis* is conducive to the synthesis of avermectin.

Key words: pH value; concentration of mycelium; sugar content; nitrogen content; effect of metabolic

Received date: 12 Jul. 2012; **Revised date:** 5 Sep. 2012

Foundation item: Western Light Talents Training Program of Chinese Academy of Sciences (O906050XB0); Science and Technology Project of Lanzhou City(2009-2-13); Natural Science Foundation of Gansu Province(099RJYA013)

1) E-mail: wangsy@impcas.ac.cn

<http://www.npr.ac.cn>