

# 基因编辑方法研究进展

## ——以大肠杆菌基因敲除方法为例

薛 藩, 韦慧仙, 胡珈玮, 王进军

(扬州大学环境科学与工程学院, 江苏 扬州 225127)

[摘要] 大肠杆菌是分子生物学的重要研究对象, 是生产氨基酸、有机酸和重组蛋白等物质的主要微生物。在分子生物实验中, 常常不需要完整的大肠杆菌基因序列, 这时如何截取所需要的基因序列就成了值得研究的问题。Red 同源重组是大肠杆菌基因敲除的传统方法, 主要利用自身的 RecA 同源重组系统编码中 RecA 和 RecBCD 蛋白, 介导 DNA 进行同源重组。几经技术革新, 但该系统仍然存在很多不足。基因组编辑三大技术是 TALEN、ZFN 和 CRISPR/Cas, 其中的 CRISPR/Cas 技术更是当今世界上最具发展前景的革命性基因修饰技术。

[关键词] 大肠杆菌, 基因修饰, Red 同源重组, CRISPR/Cas 技术

[中图分类号] Q348 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2018)03-0102-07

## Progress in Gene Editing Methods

### —Taking the *E. coli* Gene Knockout Method as an Example

Xue Fan, Wei Huixian, Hu Jiawei, Wang Jinjun

(College of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

**Abstract:** *Escherichia coli* is an important research object of molecular biology, it is the main microbe who can produce amino acids, organic acids and recombinant proteins and other substances. In molecular biology experiments, we do not need a complete sequence of *Escherichia coli* gene, then how to intercept the gene sequence become worthy of study. Red homologous recombination is the traditional method of gene knockout of *Escherichia coli*. The RecA and RecBCD proteins are mainly encoded by RecA homologous recombination system, which mediates DNA for homologous recombination. After several technological innovation, there are still many deficiencies. Genomics editing includes the three major technologies, TALEN, ZFN and CRISPR/Cas. One of the CRISPR/Cas technology is the world's most promising revolutionary genetic modification technology.

**Key words:** *Escherichia coli*, gene modification, red homologous recombination, CRISPR/Cas technology

基因工程自诞生的短短几十年间, 便深刻地改变了传统的生产方式和产业结构。并且迅速地向很多领域进行扩散和渗透, 提高和推动整个社会生产力的快速发展。展望未来, 基因工程的前景将更加辉煌。

大肠杆菌是分子生物学的重要研究对象, 是生产氨基酸、有机酸和重组蛋白等物质的主要微生物。并且是人和许多动物肠道中最主要且数量最多的一种细菌。它周身鞭毛, 能运动, 无芽孢。大肠杆菌培养简单且繁殖迅速, 易于基因敲除并且遗传稳定。大肠杆菌的基因已全部测序, 共有 4 405 个阅读框架<sup>[1]</sup>。但在分子生物实验中, 常常不需要完整的大肠杆菌基因序列, 这时如何截取所需要的基因序列就成了值得研究的问题。

基因敲除技术分为完全基因敲除和条件型基因敲除。完全基因敲除是指通过同源重组法完全消除细胞或者动物个体中的靶基因活性。条件型基因敲除是指通过定位重组系统实现特定时间和空间的基因敲

收稿日期: 2017-10-24.

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金(20151098)、扬州市基础 Research 计划(自然科学基金)-面上项目(YZ2015098)、扬州大学高层次人才科研启动基金、扬州大学大学生科技创新基金。

通讯联系人: 王进军, 副教授, 研究方向: 环境微生物学. E-mail: wangjinjun@yzu.edu.cn

除<sup>[2]</sup>. 随着技术的发展和革新,基因敲除技术已从最初的完全敲除发展到条件型敲除阶段,并正朝着特定组织基因敲除、特定时间基因敲除的可调控敲除方向发展<sup>[3]</sup>.

## 1 大肠杆菌敲除方法及原理

### 1.1 大肠杆菌传统敲除方法

基因敲除技术是建立在基因同源重组技术和胚胎干细胞技术基础上的一种新分子生物学技术. 基于DNA重组原理,大致可分为同源重组、位点专一性重组和转座重组3种<sup>[4]</sup>. 其中,同源重组技术是利用2个DNA分子之间精确地相互交换片段达到序列敲除的目的,比其他的重组方式更适合大肠杆菌的基因敲除.

Red同源重组是大肠杆菌基因敲除的传统方法,主要利用自身的RecA同源重组系统编码中RecA和RecBCD蛋白,介导DNA进行同源重组<sup>[5]</sup>. 该系统主要由两个途径组成,分别是RecA-RecBCD和RecA-RecFOR途径. 其中,第一条途径主要是修复双链DNA,第二条途径是修复单链DNA缺口. RecBCD蛋白结合在双链DNA末端,解旋降解DNA到chi位点(5'GCTG GTGG 3'),并在位点上产生单链DNA加载RecA,快速识别基因组DNA中的同源序列,并在多个蛋白和酶的协同作用下,最终实现同源重组. RecFOR则可以取代单链结合蛋白在缺口处连接单链DNA,启动同源重组<sup>[6-9]</sup>. 所以,RecA蛋白是整个系统的核心,是大肠杆菌同源重组的必需蛋白. 但是该系统存在明显的不足,比如操作步骤、重组率很低等问题严重,并且需要较长的靶基因同源臂,因此难以获得所需的重组子,大大地限制了敲除的效率,并影响了该技术的发展.

1998年,Zhang等<sup>[10]</sup>发现大肠埃希菌存在的RedE/RecT系统自身就具有重组功能,并且简单且高效. 2000年<sup>[9]</sup>又发现λ噬菌体的Exo和Beta蛋白具有相同的功能,利用较小的同源臂就可对大肠埃希菌进行精确的改造. 后被称为ET重组,它大大改善了传统方法中的不足,降低了重组中所需的同源臂并且提高了重组率,因此在大肠杆菌的基因修饰中被广泛应用.

### 1.2 两步同源重组法

2000年,Datsenko等<sup>[11]</sup>提出了报道最多且应用最广的两步同源重组法,并在大肠杆菌K-12中成功进行了基因敲除. 在该方法中,pKD46作为同源重组质粒,具有苯抗性的低拷贝温敏型. 可将噬菌体中exo、bet、gam基因整合在阿拉伯糖启动子控制下. 打靶DNA的模板是分别带有氯霉素和卡那霉素抗性基因的pKD3和pKD4两种质粒,并附有FRT位点(翻转酶结合点)<sup>[12]</sup>. 具体过程如图1所示.

第一步,在Red同源重组介导下,将一段两端含有FRT位点的抗性基因敲入基因组靶位置;第二步,在辅助质粒表达的FLP重组酶介导下剔除抗性基因. 方法所需要的打靶同源臂只有36 bp~50 bp,可直接设计在引物上,不需要DNA酶切连接,大大提高了敲除效率<sup>[13]</sup>.

相较于传统方法,两步同源重组方法操作更加简单易实行,并且打靶率高,实验周期短,是目前大肠杆菌基因敲除中最为常见的方法. 但该方法同样也存在着不足,其对DNA片段的浓度要求较高,达不到要求的菌株会失败. 尤其是要将外源DNA电转为宿主细胞的一些菌株,由于吸收效率低,常常会导致进入细胞中的DNA量达不到进行同源重组的最低标准,造成基因敲除失败. 并且,电转时会造成大量细胞的死亡,剩余的细胞达不到浓度要求,最终导致一些菌株也无法利用两步同源重组方法进行基因敲除<sup>[14]</sup>.

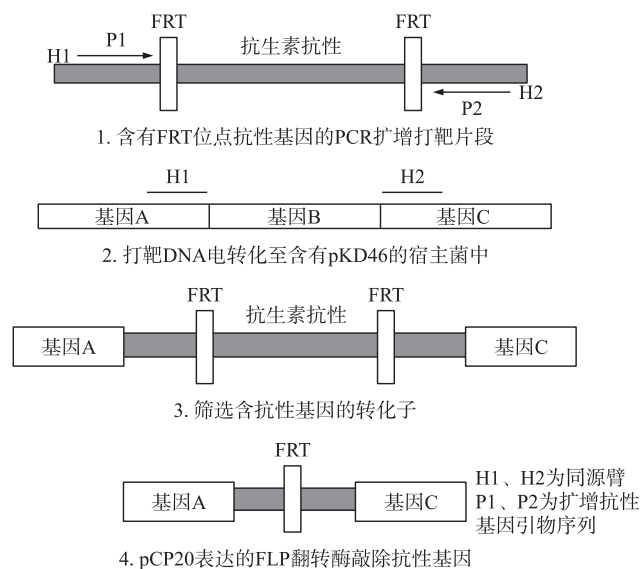


图1 两步同源重组法基因敲除步骤

Fig. 1 Procedure of two-step homologous recombination gene knockout

### 1.3 大肠杆菌敲除方法进展

Herring 等<sup>[14-15]</sup>在2003年首次提出 Genegorging 方法. 也就是双质粒基因敲除法的一种. 双质粒基因敲除法包含一个辅助质粒和一个供体质粒. 辅助质粒含有重组酶和归巢内切酶基因, 供体质粒提供打靶 DNA. 在诱导剂的作用下, 将两种质粒共同转化入宿主细胞, 归巢内切酶切割供体质粒产生打靶 DNA, 重组酶促进同源基因序列完成重组. Genegorging 法不同于两步同源重组法, 它的打靶片段直接在宿主细胞内产生, 不需要外源转化. 质粒在宿主体内大量的复制, 通过归巢内切酶的切割, 导致每个细胞都能产生打靶 DNA, 提高了可能发生同源重组的细胞的基数, 从而可以对这些大肠杆菌进行基因敲除, 解决了传统方法的不足.

在 genegorging 法的基础上, 有人提出了 genedoctoring 法. 它不仅继承了 genegorging 法打靶效率高的优点, 而且增加了筛选条件, 可以在完成基因敲除的同时消除同源重组辅助质粒, 提高筛选率. 所以, genedoctoring 法已成功应用了各类大肠杆菌的基因敲除, 包括了一些运用两步同源重组法很难敲除的致病菌.

然而, 不论是什么方法利用 Red 重组系统敲除目标基因, 都会有外援片的残留. 这些外援片段将会影响到基因重组后续的操作. 所以, 自从 Red 重组系统的诞生开始, 就有人对系统进行改进, 逐步形成了无痕敲除技术, 很好地解决了传统的 Red 重组系统外援片残留的问题.

Yu 在2008<sup>[15]</sup>年首次提出单质粒敲除法, 便是无痕敲除技术的一种. 它的特点在于只需要单个质粒 pREDI 就可成功进行基因组上的突变, 完成一次敲除只需要 2d, 而且突变菌株染色体上不残留余序列, 重组效率高. 它相比于之前的方法有了更大的进步, 适合于一系列的基因修饰工作, 例如在大肠杆菌中基因的点突变、基因定点插入等.

## 2 基因编辑三大技术

想要获得特定的基因一般都使用基因编辑技术进行基因敲除. 世界上较为常用的 3 种基因编辑的技术分别是 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas 技术.

转录激活样效应因子核酸酶(TALEN)技术与锌指核酸酶(ZFN)技术组成了一大类强有力的基因组编辑工具, 这一大类技术的发展重新划定了生物学的边界. TALEN 和 ZFN 都是由两部分组成, 一个可编码的序列特异性 DNA 结合模块与一个非特异性的 DNA 切割结构域. 通过诱导 DNA 双链断裂来刺激容易出错的非同源末端连接或在特定基因所在的位置进行的同源定向修复. 成簇规律间隔短回文重复(CRISPR)技术是最新出现的一种基因组编辑工具, 经过不断改进后, 更被认为能够在活细胞中最有效、最便捷地编辑任何基因.

### 2.1 三大基因编辑时间轴

从上个世纪 70 年代, 基因编辑技术就开始有了相应的技术和实例表达. 1979 年, 在酵母中进行可基因置换. 1985 年-1986 年, 用 HDR 编辑了人类基因组. 新的三大基因编辑技术最早出现的是 ZFN 技术, 随后是 TALEN 技术和最新的也是最具潜力的 CRISPR/Cas 技术. 具体的时间轴<sup>[16]</sup>如图 2 所示.

### 2.2 ZFN 技术

ZFN 技术是广泛使用最早的基因组定点修饰技术, 平台完善, 可直接利用资源丰富. ZFN(锌指核酸酶)是由人工合成的一种限制性内切酶, 由锌指 DNA 结合域与 DNA 切割域组成. 通过人工改造的 ZFN 的 DNA 结合域可以定位不同的 DNA 序列, 并由 DNA 切割域进行特异性切割, 完成基因敲除.

锌指 DNA 的结合域部一般只含有 3 个独立的锌指结构, 并且每个结构只能识别 3 个碱基. 因此, 每一个锌指 DNA 结合域一般只能识别 9 bp 长度的序列, 是该技术的一个缺陷. 后经研究表明, 可以通过增加锌指的数量来扩大识别 DNA 序列的长度, 进行序列更加复杂的基因敲除.

如图 3 所示, ZFN 技术在进行基因编辑时, 是由设计好的 ZFN 中的锌指结合模块(F1, F2, F3)附着在序列上, 然后由 DNA 的切割域进行特定位置序列的基因敲除. 原理简单, 但由于自身属性, 设计繁琐, 而且过度依赖于目标序列及其上下游序列, 无法对未知的上下游序列进行敲除. 除此以外, 限制性因素也还有高脱靶率和较大的细胞毒性. 目前科学家已经建立了 ZFN 库, 但由于其自身的设计要求, 无法达到识别任意靶 DNA 的目的, 应用仍受到了不小的限制. 因此 ZFN 技术也逐步被其他先进技术所慢慢取代.

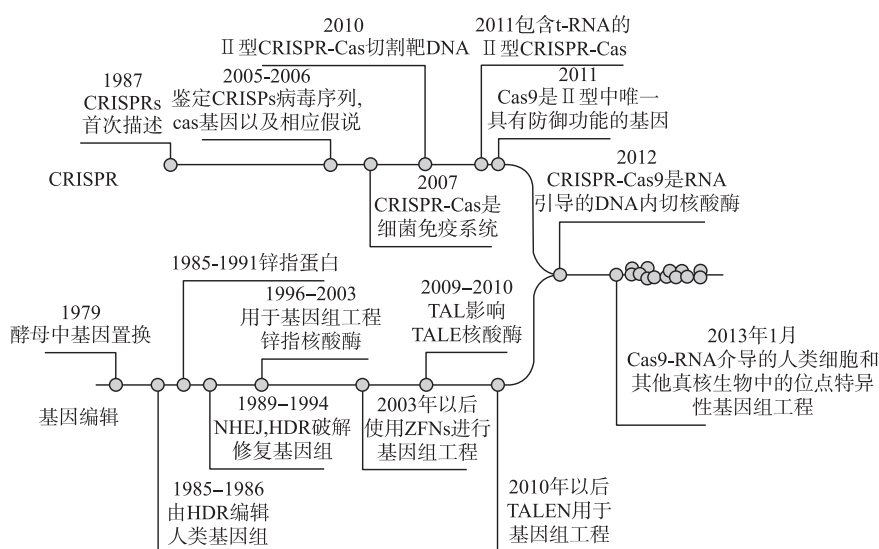


图2 三大基因编辑技术时间轴

Fig. 2 Timeline of three major gene editing technologies

不过 ZFN 技术在医学领域仍具有非常重大的价值,对于疾病的基因治疗有潜在意义,该技术可以直接修补或是删除有害基因,以达到相关治疗目的,极具应用前景. ZFN 技术同时具有极佳的特异性和效率,因此能将基因或基因组错误修改的风险降到最低,保证基因的遗传学. 从理论上,可以对任意细胞进行长时间 ZFN 操作,就可以自如地修改基因,保证细胞的状态. 使用 ZFN 技术,已经对小鼠、猪<sup>[17-20]</sup>等其他哺乳动物进行了基因敲除. 更有使用 ZFN 技术,设计出 Jurkat 和 CEM 细胞,并整合了人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)DEnv 基因组,用辅助载体转染时成功介导感染<sup>[21]</sup>.

### 2.3 TALEN 技术

TALEN 技术是商业化较为成功的技术,很多商业公司可以提供组装好的三联密码子 TALEN 模块,大大缩短了 TALEN 元件构建周期. 不过也因此,核心技术都掌握在商业公司的手中,实验室难以自行完成 TALEN 技术的完整操作,对其推广造成了制约,限制了 TALEN 技术的发展.

相较于有一定的细胞毒性和模块组装繁琐的 ZFN 技术,TALEN 技术有着独特的优势,它设计简单,特异性高<sup>[22]</sup>. TALEN 由 3 个部分组成,一个是可识别特定 DNA 序列的串联 TALE 重复序列的重用结构域,一个是包含核定位信号的 N 端结构域以及一个具有 FokI 核酸内切酶的 C 端结构域组成. 相较于 ZFN 的识别序列较短,TALEN 技术的识别的序列更长,天然的 TALEN 原件一般可识别 17 bp ~ 18 bp DNA 序列,人工的 TALEN 原件则可以识别更长的 DNA 序列<sup>[23]</sup>. 基因敲除过程如图 4 所示,核心是定位及 FokI 核酸内切酶的参与.

自 TALEN 技术正式发明后,全球范围内多个研究组利用体外培养细胞、酵母、拟南芥、水稻、果蝇及斑马鱼等多个动植物体系验证了 TALEN 的特异性切割活性<sup>[22-24]</sup>. 并用 TALEN 技术验证了 miR-192 及其关键靶基因(DLG5 和 ALCAM)在大肠杆菌感染中起关键作用<sup>[25]</sup>. 总的来说,TALEN 技术是一项划时代的成功的技术,同时也于 2012 年入选《科学》杂志,被评为十大科学突破.

### 2.4 CRISPR/Cas9 技术

CRISPR/Cas9 技术最早发现于细菌和古细菌中,为了应对噬菌体和质粒不断攻击而演化来的获得性免疫系统. 1987 年大阪大学的研究员在大肠杆菌 K12 的碱性磷酸酶基因附近发现了成簇的规律间隔的短

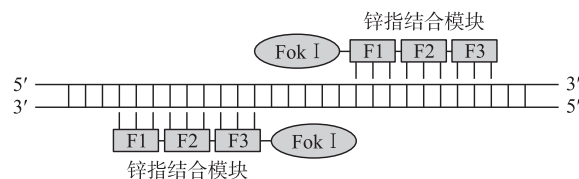


图3 ZFN 技术基因编辑图

Fig. 3 ZFN technology gene editing

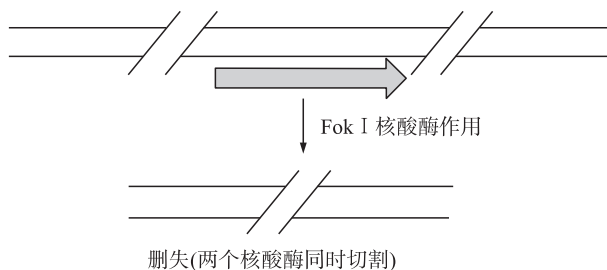


图4 TALEN 基因敲除的过程

Fig. 4 Process of TALEN gene knockout





### 3 展望

基于基因编辑技术对基因研究的重要意义,人类对其的研究依旧在不断的探索中,并且取得了不俗的成绩. ES 细胞的是传统的基因打靶技术的限制,新的技术摆脱了对它的限制,可以用于多个物种的基因编辑,更加精确且效率高.

然而,任何新兴技术的出现及其应用都是有两面性的.《Nature methods》发表文章,证明体内 CRISPR-Cas9 编辑引起的脱靶效应会导致许多不可预测的基因突变. 最近,张锋在《Nature》发文,他领导的团队对 CRISPR/Cas9 进行了改造. 改造后的系统可以启动任何基因,更简便地研究不同基因的功能,可以快速地对整个基因组进行功能筛选,帮助人们鉴定特定疾病的基因. 还有基于 CRISPR 系统改进的 DNA 编辑技术 CRISPR-Cpf1、CRISPR/dCas9-AID、CRISPR-STOP 和 CRISPRainbow,以及基于 CRISPR 系统改进的 RNA 编辑技术 CRISPR/C2c2( Cas13a)<sup>[33-40]</sup>都是人类对基因编辑技术的尝试,也验证了基因编辑广阔的未来.

是否存在比 CRISPR 更加简单高效的防御系统可被研究者利用,并且作为基因编辑技术的新工具,有待全世界研究工作者共同探索和研究.

#### [参考文献]

- [1] 李晓举. 大肠杆菌单链结合蛋白 SSB 重组功能研究[D]. 郑州:河南农业大学,2013.
- [2] 朱玉贤,郑晓峰,李毅. 现代分子生物学[M]. 北京:高等教育出版社,2013.
- [3] 陶果,信吉阁,肖晶,等. 基因敲除技术最新研究进展及其应用[J]. 安徽农业科学,2013(29):11605-11608.
- [4] 胡逢雪,丁锐,崔震海,等. 大肠杆菌基因无痕敲除技术及策略[J]. 生物技术通讯,2013(4):552-557.
- [5] 吴程华,严玉霖,高洪,等. Red 同源重组技术在大肠埃希菌基因敲除中的应用[J]. 上海畜牧兽医通讯,2015(1):9-11.
- [6] KOWALCZYKOWSKI S C, DIXON D A, EGGLESTON A K, et al. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*[J]. Microbiol Rev, 1994, 58(3):401-465.
- [7] ROCHA E P, CORNET E, MICHEL B. Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems[J]. Plos Genetics, 2005, 1(2):e15.
- [8] JASIN M, SCHIMMEL P. Deletion of an essential gene in *Escherichia coli* by site-specific recombination with linear DNA fragments[J]. Journal of bacteriology, 1984, 159(2):783-786.
- [9] ZHANG Y, MUYRERS J P, TESTA G, et al. DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*[J]. Nature biotechnology, 2000, 18(12):1314.
- [10] ZHANG Y, BUCHHOLZ F, MUYRERS J P, et al. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*[J]. Nature genetics, 1998, 20(2):123.
- [11] DATSENKO K A, WANNER B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2000, 97(12):6640.
- [12] BROACH J R, HICKS J B. Replication and recombination functions associated with the yeast plasmid, 2 mu circle[J]. Cell, 1980, 21(2):501-508.
- [13] 吕沈聪,赵颖颖,钟卫鸿. Red 同源重组在大肠杆菌基因敲除中的应用[J]. 化学与生物工程, 2013, 30(6):1-6.
- [14] HERRING C D, GLASNER J D, BLATTNER F R. Gene replacement without selection: regulated suppression of amber mutations in *Escherichia coli*[J]. Gene, 2003, 311(1):153-163.
- [15] YU B J, KANG K H, LEE J H, et al. Rapid and efficient construction of markerless deletions in the *Escherichia coli* genome[J]. Nucleic acids research, 2008, 36(14):e84-e84.
- [16] DOUDNA J A, CHARPENTIER E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9[J]. Science, 2014, 346(6213):1258096.
- [17] YANG H, AHN C, SHIN E K, et al. NCKX3 was compensated by calcium transporting genes and bone resorption in a NCKX3 KO mouse model[J]. Molecular and cellular endocrinology, 2017:1-10.
- [18] MÈNORET S, TESSON L, REMY S, et al. Advances in transgenic animal models and techniques[J]. Transgenic research, 2017(4):1-6.
- [19] GIL M A, MARTINEZ C A, NOHALEZ A, et al. Developmental competence of porcine genome edited zygotes[J]. Molecular reproduction and development, 2017, 84(9):814.

- [20] FERNÁNDEZ A, JOSA S, MONTOLIÚ L. A history of genome editing in mammals[J]. *Mammalian genome*, 2017; 1–10.
- [21] RUAN J, JIE X, CHEN-TSAI R Y, et al. Genome editing in livestock: are we ready for a revolution in animal breeding industry? [J]. *Transgenic research*, 2017, 26(6): 1–12.
- [22] SUN L, WU S, DAI C H, et al. Insight into the molecular mechanism of miR-192 regulating *Escherichia coli* resistance in piglets[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(1): 1–13.
- [23] 沈延, 肖安, 黄鹏, 等. 类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)介导的基因组定点修饰技术[J]. *遗传*, 2013, 35(4): 395–409.
- [24] 严爱芬, 刘婉霞, 刘芳, 等. TALEN 技术研究进展[J]. *广东农业科学*, 2015, 42(23): 145–150.
- [25] KUSANO H, ONODERA H, KIHARA M, et al. A simple gateway-assisted construction system of TALEN genes for plant genome editing[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 30234.
- [26] 左其生, 李东, 张亚妮, 等. CRISPR-Cas 介导的基因编辑工具[J]. *生物技术通报*, 2014, (7): 37–43.
- [27] 王晔博. CRISPR/Cas9 靶向编辑技术的优化及其在干细胞中的应用[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- [28] MARSHALL R, MAXWELL C S, COLLINS S P, et al. Rapid and scalable characterization of CRISPR technologies using an *E. coli* cell-free transcription-translation system[J]. *Molecular cell*, 2017, 69(1): 146–157.
- [29] LIU H, SUI T, LIU D, et al. Multiple homologous genes knockout (KO) by CRISPR/Cas9 system in rabbit[J]. *Gene*, 2018, 647: 261–267.
- [30] WU M Y, SUNG L Y, LI H, et al. Combining CRISPR and CRISPRi systems for metabolic engineering of *E. coli* and 1,4-BDO biosynthesis[J]. *Acs synthetic biology*, 2017, 6(12): 2350–2361.
- [31] 李君红, 张富婷, 桑春艳, 等. CRISPR 基因编辑技术在肿瘤研究中的应用[J]. *解放军医药杂志*, 2015, 27(9): 95–99.
- [32] CHANG Y, SU T, QI Q, et al. Easy regulation of metabolic flux in *Escherichia coli* using an endogenous type I-E CRISPR-Cas system[J]. *Microbial cell factories*, 2016, 15(1): 195.
- [33] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, KONERMANN S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector[J]. *Science*, 2016, 353(6299): aaf5573.
- [34] BALBOA D, WELTNER J, EUROLA S, et al. Conditionally stabilized dCas9 activator for controlling gene expression in human cell reprogramming and differentiation[J]. *Stem cell reports*, 2015, 5(3): 448–459.
- [35] MA H, TU L C, NASERI A, et al. CRISPR-Cas9 nuclear dynamics and target recognition in living cells[J]. *Journal of cell biology*, 2016, 214(5): 529.
- [36] TUFAN T. CRISPR-STOP: Gene silencing through base editing-induced nonsense mutations[J]. *Nature methods*, 2017, 14(7): 710.
- [37] NELLES D A, FANG M Y, O'CONNELL M R, et al. Programmable RNA tracking in live cells with CRISPR/Cas9[J]. *Cell*, 2016, 165(2): 488–496.
- [38] QI L, LARSON M, GILBERT L, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1173–1183.
- [39] PEREZPINERA P, KOCAK D D, VOCKLEY C M, et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors[J]. *Nature methods*, 2013, 10(10): 973–976.
- [40] NISHIDA K, ARAZOE T, YACHIE N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems[J]. *Science*, 2016, 353(6305): aaf8729.

[责任编辑: 黄 敏]