

黄曲条跳甲线粒体源硫辛酸蛋白连接酶的
序 列 分 析 及 表 达

贺华良[†], 宾淑英[†], 廖泓之, 吴仲真, 林进添

(仲恺农业工程学院 农学院, 外来有害生物预警与控制研究所, 广东 广州 510225)

摘要:采用转录组测序和荧光定量 PCR 等方法, 分析了蔬菜害虫黄曲条跳甲 *lpl* 基因(*Pslpl* 基因)的 cDNA 序列及基因表达情况. 结果表明, *Pslpl* 基因 cDNA 的开放阅读框为 1 182 bp, 编码 393 个氨基酸, N 端含有 13 个氨基酸的线粒体信号肽. *Pslpl* 基因在黄曲条跳甲雌、雄成虫的不同组织器官中都有表达, 头部和中肠相对较高. 雌、雄成虫之间对比分析发现, 雄虫各组织器官 *Pslpl* 基因表达量均比雌虫对应组织器官中的表达量低, 但在生殖系统中相反. *Pslpl* 基因 cDNA 的鉴定和表达分析为研究黄曲条跳甲硫辛酸蛋白连接酶的功能及蛋白硫辛酸修饰奠定了前期基础.

关键词:黄曲条跳甲; 线粒体; 硫辛酸蛋白连接酶; 荧光定量 PCR
中图分类号: Q966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2012)03-0351-05

Sequencing and Expression Profile of the Gene Encoding Lipoate Protein
Ligase in *Phyllotreta striolata*

HE Hua-liang[†], BIN Shu-ying[†], LIAO Hong-zhi, WU Zhong-zhen, LIN Jin-tian
(Institute for Management of Invasive Alien Species, College of Agriculture,
Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: Specific primers were designed to amplify the *lpl* gene of *Phyllotreta striolata* (*Pslpl* gene) by RT-PCR. The cDNA of *Pslpl* gene was 1 182 bp containing one open reading frame (ORF) encoded 393 amino acids which includes a signal peptide with 13 amino acid residues followed by a putative mature peptide of 380 amino acid residues. The results of the real-time PCR data showed that the *Pslpl* gene expressed in several tissues of adult beetle, and it was upregulated especially in the head and the midgut. The expression profile was also different between the female and male adults. The expression was higher in male's reproductive system than that in female's. However, the expression was higher in other tissues of female. The cDNA of *Pslpl* gene and its expression profile are the basic knowledge for the further study on lipoate protein ligase and the protein lipoylation of this important pest beetle.

Key words: *Phyllotreta striolata*; mitochondrion; lipoyl protein ligase; real-time PCR

硫辛酸(Lipoic acid, LA)亦称 α -硫辛酸, 为含硫八碳脂酸, 在 6, 8 位上有二硫键相连(C6 和 C8 上的氢原子被二硫键取代), 是一种类维生素物质. LA 是三羧酸循环的 2 个重要酶系——丙酮酸脱氢酶复合物和 α -酮戊二酸脱氢酶复合物的辅基, 在能量代谢中发挥重要作用^[1]. 动植物组织中 LA 通常与蛋白质分子以酰胺键形式共价结合^[2], 主要是由硫辛酸蛋白连接酶(Lipoate protein ligase, LPL)介导催化以共价键的方式将 LA 连接到一类含有硫辛酸结合结构域的蛋白分子上, 即硫辛酸修饰(Lipoylation)^[3].

收稿日期: 2011-12-25
作者简介: 贺华良(1977—), 男, 讲师, 博士; 宾淑英(1964—), 女, 副教授; [†] 对本文贡献相同; 通信作者: 林进添(1963—), 男, 教授, 博士, E-mail: linjtian@163.com
基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(31101500); 仲恺农业工程学院校级科研基金(G3100005)

在原核生物中也发现了 LPL 的同系物. 李斯特菌中 LPL 的同系物已被证实为毒力因子, 它的缺失会使得细菌不能从宿主摄取硫辛酸, 从而影响细菌的生长和毒力^[4]. 肺炎链球菌的 LPL 的同系物对其粘附宿主细胞有抑制作用^[5]. 对猪胰岛素的研究发现, 其 LPL 同系物介导的蛋白硫辛酸修饰提高了胰岛素与受体的结合能力^[6]. 硫辛酸与杀虫剂的作用发挥也有密切联系, 如砷化物杀虫剂亚砷酸和 2 个脱氢酶系的一个辅基——硫辛酸的 2 个—SH 相结合, 从而中断三羧酸循环^[7]. 目前, 对于部分被硫辛酸修饰的蛋白分子是否可被砷化物杀虫剂优先识别还不清楚. 因此, 研究 LPL 的基因表达及其功能, 对于蛋白分子硫辛酸修饰以及砷化物杀虫剂对该类蛋白的结合力研究具有一定参考意义.

黄曲条跳甲 *Phyllotreta striolata* (Fabricius) 隶属鞘翅目叶甲科害虫, 可为害多种植物, 尤其喜食十字花科植物, 已成为十字花科蔬菜生产中最难控制的世界性害虫之一^[8-9]. 本研究团队尝试从蛋白硫辛酸修饰的角度, 在分子水平研究影响黄曲条跳甲生物学特性的作用因子. 本文首先关注介导蛋白硫辛酸修饰的 LPL 相应基因的 cDNA 序列及表达情况, 为今后研究蛋白硫辛酸修饰, 以及硫辛酸修饰与砷化物杀虫剂或其他新型农药作用发挥之间的关系提供宝贵的信息资源.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫饲养及取样 黄曲条跳甲交配期雌、雄成虫由仲恺农业工程学院昆虫学实验室提供. 成虫采用芥菜 *Brassica juncea* 菜叶喂食饲养, 光照培养箱的温度为 28 ℃、湿度为 75%、光照度为 4 000 lx, 光暗比 14 h 光: 10 h 暗. 黄曲条跳甲的组织取样过程如下: 将 3~5 头黄曲条跳甲装入离心管中, 在冰上放置 5 min; 在解剖镜载物台的载玻片上滴 1 滴冰上预冷的磷酸盐缓冲液 (0.01 mol/L, pH 8.0), 将休克的黄曲条跳甲置于液滴中; 在黄曲条跳甲即将苏醒时快速解剖, 分别收集触角、头 (去除触角)、中肠、精巢、卵巢、前足、中足、后足等组织样品, 雌虫和雄虫的组织样本分开. 样品收集时先在 1.5 mL 离心管中放入磷酸盐缓冲液, 待解剖收集满 10 头时, 4 000 r/min 离心 2 min, 除去各组织样本中的磷酸盐缓冲液, 置液氮中速冻后保存于 -80 ℃ 冰箱中, 备用; 各组织器官 RNA 总量的提取需要解剖 80 头以上的雌虫或雄虫.

1.1.2 分子生物学试剂 RNeasy® Plus Mini Kit 购

置 Qiagen 公司; Taq DNA 聚合酶, PrimeScript® RT reagent Kit, DNA Fragment Purification Kit, MineBest Plasmid Purification Kit, pMD® 18-T, SYBR® Premix Ex Taq™, 500 bp DNA Ladder Marker, DL2 000 DNA Marker, 均购自 TaKaRa 公司.

1.2 黄曲条跳甲 RNA 的提取和反转录

按照 RNA 抽提试剂盒 (Qiagen 公司) 使用说明提取黄曲条跳甲不同组织的总 RNA. 经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测后, 按照 PrimeScript® RT reagent Kit 反转录系统说明书以随机引物进行反转录获得 cDNA, 以此作为 PCR 和荧光定量 PCR 模板.

1.3 引物设计与合成

根据黄曲条跳甲转录组测序获得的黄曲条跳甲 lpl 基因 (Pslpl 基因) 序列 (JQ278008), 设计和筛选符合要求的特异性引物 Pslpl-F、Pslpl-R 用于后续的实时荧光定量 PCR 反应. 同时本研究以黄曲条跳甲的 actin 基因作为内参基因 (引物为 Ps-actin-F 和 Ps-actin-R). 荧光定量所用引物序列如下, Pslpl-F: TGAAAGCCGTAGGATGGGAATA; Pslpl-R: CTGG-GAACCAATCGTCTGTAGG; PCR 产物长度为 123 bp. 内参 actin 基因的 PCR 扩增引物如下, Ps-actin-F: TA-AACCCGACGAAAGCAATGT; Ps-actin-R: CGATTC-CGAGAAAAGAACAGG; PCR 产物长度为 220 bp.

1.4 普通 PCR 扩增及荧光定量 PCR

在离心管中加入以黄曲条跳甲成虫总 RNA 逆转录合成的 cDNA (约 1 μg/μL) 为模板 1 μL, 再加入 10 × Ex Taq DNA 聚合酶反应缓冲液 2 μL (含 Mg²⁺)、正向和反向引物各 1 μL (10 mol/L), 2.5 mmol/L dNTP 1.5 μL, Ex Taq DNA 聚合酶 0.2 μL (5 U/μL), 加水至 20 μL, 混匀离心后放入 PCR 仪扩增. PCR 反应程序为: 94 ℃ 变性 3 min; 接着进行 35 个循环, 循环条件为 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s; 循环完毕后, 72 ℃ 保温 10 min. 扩增产物用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收目的片段. 回收产物纯化后连接到 pMD-18 载体, 进一步转化到感受态大肠杆菌 DH5α 中, 经蓝白斑和氨苄筛选, 重组质粒经扩大培养, 提取质粒 DNA 用于检测及后续的荧光定量 PCR. 测序工作由广州英骏生物技术有限公司完成.

荧光定量 PCR 采用 SYBR Green 染料法, 在 LightCycler 480 荧光 PCR 仪上进行扩增和数据分析. 根据 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒的说明书, 按 20 μL 的总反应体系 (SYBR® Premix Ex Taq™ 2 × Buffer 10 μL, 上游引物 0.8 μL, 下游引物 0.8 μL, 双蒸

水 7.4 μL , cDNA 模板 1 μL), 采用二步法进行, 程序具体的参数设置如下: 预变性, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 扩增, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 40 个循环; 融解度分析, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 15 s; 冷却, 40 $^{\circ}\text{C}$ 1 s. 试验样本的反应结束后, 结合下文的标准曲线进行基因表达的绝对定量分析.

1.5 标准曲线的建立及定量分析

分别以 actin 基因经测序验证的阳性重组质粒 pMD-Ps-jhip-1 为模板, 经 10 倍系列稀释成 7 个质量浓度梯度 (5.0、5.0 $\times 10^{-1}$ 、5.0 $\times 10^{-2}$ 、5.0 $\times 10^{-3}$ 、5.0 $\times 10^{-4}$ 、5.0 $\times 10^{-5}$ 和 5.0 $\times 10^{-6}$ ng/ μL) 以优化的反应条件进行 Real-time PCR, 重复 3 次, 以达到荧光的阈值 (Ct 值) 为横坐标, 以稀释倍数的对数为纵坐标建立标准曲线. 分析 3 个标准曲线内部的标准差, 检验试验的可重复性. 分别根据标准曲线计算出每次试验样本中目标基因的绝对定量. 黄曲条跳甲各部位基因相对表达量 = Pslpl 基因的绝对定量/Ps-actin 基因的绝对定量.

1.6 序列分析及系统发育分析

序列和数据搜索使用 NCBI 上的 Blast 在线程序; 蛋白质序列分析采用 ExPASy 在线 ScanProsite 程序; 蛋白质相对分子质量和等电点分析采用 <http://www.expasy.org/tools/pi-tool.html> 在线工具; 分泌蛋白信号肽序列预测采用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> 在线程序进行; 线粒体定位分析采用 MitoProt v1.101 在线软件 (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>); 跨膜结构预测采用 TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 在线程序进行.

从 NCBI 上下载 Pslpl 基因的同源基因蛋白产物的氨基酸序列, 使用 Clustalx1.8 软件对这些序列进行比对, 输出后缀为 *.phy 格式的文件, 采用分子进化遗传分析软件 PHYLIP3.68 进行遗传距离分析.

2 结果与分析

2.1 基因序列分析

应用高通量测序平台 Illumina's Solexa Genome Analyzer II 对交配期的黄曲条跳甲雌、雄成虫混合样本进行转录组测序, 采用 Soap denovo 软件将每一个读取序列片段 (Read) 聚类拼接成单独基因 (Unigene), 再结合生物信息学软件进行靶标序列 cDNA 全长的判定^[10]. 本文成功克隆鉴定到含完整开放阅读框的 Pslpl 基因的 cDNA (Genbank 登录号: JQ278008), cDNA 序列总长度为 1 641 bp, 开放阅读框为 1 182 bp, 编码 393 个氨基酸. ExPASy 在线预测其蛋白质相对分子质量为 44 650.92, 其蛋白序列的

理论等电点为 7.62. TMHMM 2.0 在线预测也没有发现跨膜结构域; SignalP 4.0 在线软件分析没有发现典型的分泌蛋白信号肽区段. 但根据 MitoProt v1.101 分析表明, 该蛋白分子的前 13 个氨基酸为线粒体信号肽 (Mitochondrial targeting sequences, MTS), 定位于线粒体的概率为 99.21%.

2.2 Pslpl 基因蛋白序列与同源基因蛋白序列相似性及进化分析

黄曲条跳甲 lpl 基因 (Pslpl 基因) 的推测蛋白产物 (Ps_LPL) 与其他 5 种不同昆虫 (分别属于鞘翅目、鳞翅目、膜翅目、双翅目和同翅目) 的 LPL 蛋白序列的相似性分析见表 1. 从表 1 可以看出, Pslpl 基因蛋白产物与同属鞘翅目的赤拟谷盗的 LPL 蛋白的相似性最高, 达 67%; 而与同翅目昆虫蚜虫的相似性偏低, 相同的氨基酸数目也少得多. 上述 6 种昆虫 LPL 序列中相同氨基酸的具体分布位置见图 1.

表 1 黄曲条跳甲与其他 5 种昆虫 LPL 同源蛋白的相似性分析¹⁾

Tab.1 Similarity analysis between Ps_LPL and other homologous proteins from 5 different insects

物种	蛋白序列号	蛋白序列长度 (氨基酸数)	相同氨基酸数	相似度/%	比阈值 (Ct 值)
赤拟谷盗	XP_975811.1	389	263(393)	67	0.0
帝王斑蝶	EHJ73856.1	363	202(366)	55	6.0 $\times 10^{-151}$
蜜蜂	XP_624104.3	400	193(356)	54	6.0 $\times 10^{-138}$
黑腹果蝇	NP_611097.2	396	169(335)	50	9.0 $\times 10^{-121}$
豌豆蚜	XP_001950984.2	295	144(266)	54	8.5 $\times 10^{-95}$

1) 序列比对分析采用 BLAST/blastp suite-2 sequences 软件, 黄曲条跳甲 LPL 蛋白的长度为 393 个氨基酸; 括号内为比对区间氨基酸数目.

另外, 在其他昆虫、细菌及脊椎动物等物种中也可找到 Pslpl 基因的同源基因. 从图 2 中可以看出, 细菌类、脊椎动物的 LPL 都各自聚类为一支; 黄曲条跳甲的 LPL (图 2 中 I₁) 明显与其他昆虫的同源基因蛋白产物聚为一大支. 图 2 中涉及的无脊椎动物主要涉及昆虫纲的几个目, 包括: 膜翅目的丽蝇蛹集金小蜂、美洲本土熊蜂、欧洲熊蜂、蜜蜂、印度跳蚁、切叶蚁和佛罗里达弓背蚁; 双翅目的致倦库蚊、埃及伊蚊、冈比亚按蚊和黑腹果蝇; 鞘翅目的赤拟谷盗; 鳞翅目的帝王斑蝶; 同翅目的豌豆蚜. 相对来说, 在膜翅目昆虫和双翅目昆虫中已报道的 lpl 基因的同源基因较多, 而在鞘翅目中目前只在赤拟谷盗中报道了 lpl 同源基因. 因此, 黄曲条跳甲中 lpl 基因的鉴定, 为研究昆虫的蛋白分子硫辛酸修饰提供了更有利和丰富的信息资源.

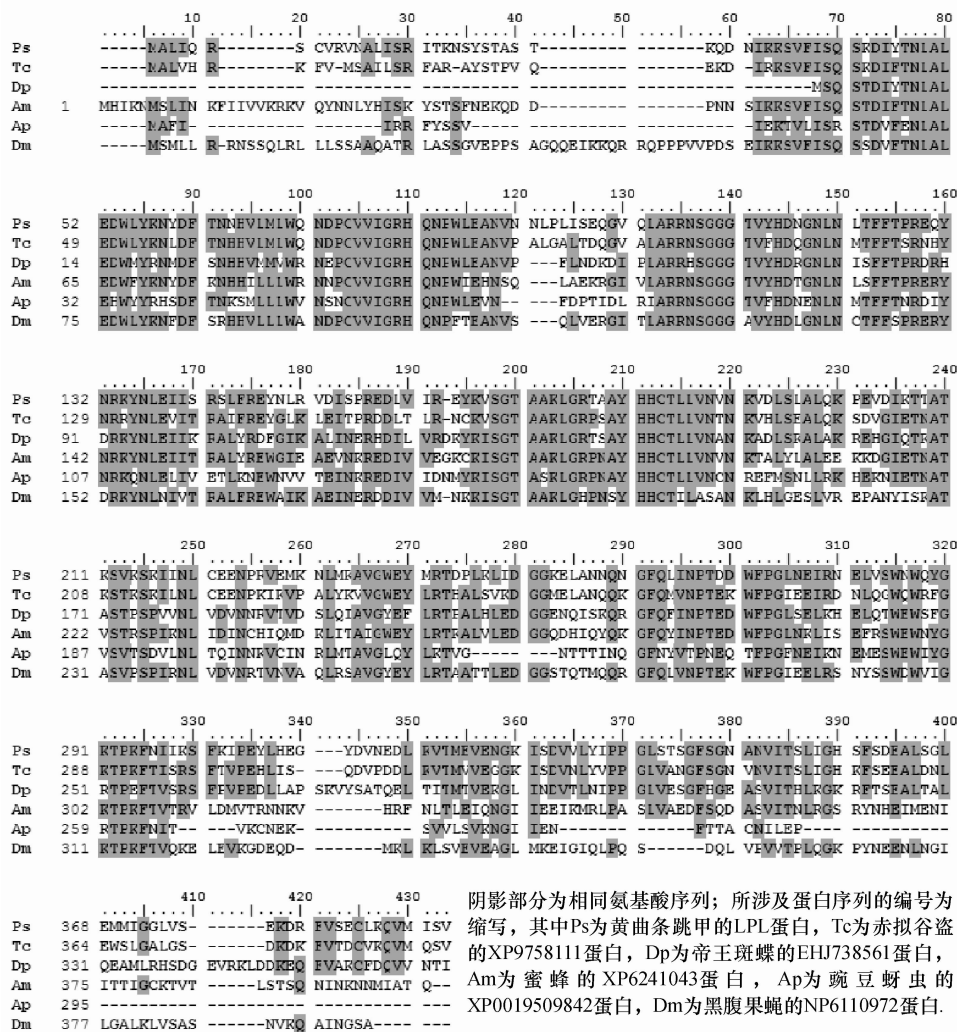


图 1 6 种昆虫 LPL 序列之间相同氨基酸的具体分布位置

Fig. 1 Location of identify amino acids of LPL between six different insects

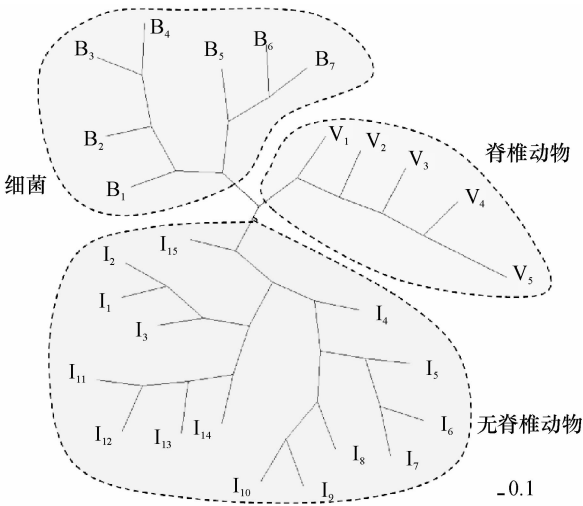


图 2 来源于不同物种的与黄曲条跳甲 lpl 基因的同源基因蛋白产物的系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic tree based on protein sequence of homologous LPL from different species

2.3 Pslpl 基因表达分析

参考贺华良等^[10]前期的黄曲条跳甲转录组的结果,Pslpl 基因 cDNA 的计算表达量为 6.47 拷贝数.

使用 Kimura 双参数模型构建 NJ 进化树,图中的比例尺表示每单位长度位点替换率. 图中涉及基因蛋白产物的序列号及物种如下:一、无脊椎动物(I₁: Ps_LPL, 黄曲条跳甲; I₂: XP_975811.1, 赤拟谷盗; I₃: EHJ73856.1, 帝王斑蝶; I₄: XP_001601889.1, 丽蝇蝇集金小蜂; I₅: EFN76618.1, 印度跳蚁; I₆: EG165157.1, 切叶蚁; I₇: EFN66353.1, 佛罗里达弓背蚁; I₈: XP_624104.3, 蜜蜂; I₉: XP_003394686.1, 欧洲熊蜂; I₁₀: XP_003491519.1, 美洲本土熊蜂; I₁₁: XP_001847374.1, 致倦库蚊; I₁₂: XP_001652965.1, 埃及伊蚊; I₁₃: XP_320349.4, 冈比亚按蚊; I₁₄: NP_611097.2, 黑腹果蝇; I₁₅: XP_001950984.2, 豌豆蚜). 二、脊椎动物(V₁: CAX13779.1, 斑马鱼; V₂: NP_001087342.1, 非洲爪蟾; V₃: NP_057013.1, 人; V₄: NP_001033007.2, 小鼠; V₅: NP_001101682.1, 大鼠). 三、细菌(B₁: ZP_05249623.1, 弗朗西丝氏菌 ATCC 25015 菌株; B₂: ZP_04988439.1, 弗朗西丝氏菌 GA99-3549 菌株; B₃: ZP_03246731.1, 弗朗西丝氏菌 FTG 菌株; B₄: YP_169706.1, 弗朗西丝氏菌 SCHU S4 菌株; B₅: YP_003805787.1, 嗜热菌; B₆: ZP_08460900.1, 极地适冷菌 1501 (2011) 菌株; B₇: YP_001278980.1, 极地适冷菌 PRwf-1 菌株).

结合转录组数据的整体分析结果表明,mRNA 表达量在 5.0~9.9 拷贝数的基因数量占黄曲条跳甲转录组数据总和的 29.5%. 因此,Pslpl 基因属于细胞

中常规性表达基因类群的可能性较高. 本文主要对 Pslpl 基因在不同组织中的表达量进行了分析. 由图 3 可见, Pslpl 基因的 mRNA 在黄曲条跳甲雌、雄成虫的不同组织器官中都有表达, 且表现出一定的特点: 1) 雌、雄成虫各组织器官之间表达量相比发现, 头部和中肠的表达量相对较高, 而触角、前足、中足和后足的表达量相对较低. 另外, 雄虫睾丸中 Pslpl 基因的表达量比雌虫中肠的表达量要高, 而雌虫卵巢 Pslpl 基因的表达量则低于其中肠的表达量. 2) 雌、雄成虫之间对比分析发现, 除睾丸外, 雄虫的其他组织器官 Pslpl 基因的表达量均比雌虫对应的组织器官中的表达量要低. 荧光定量 PCR 数据分析表明, 雄虫睾丸中 Pslpl 基因的表达量为雌虫卵巢中 Pslpl 表达量的 2.5 倍.

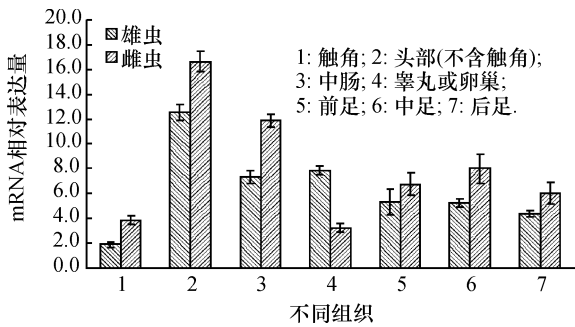


图3 黄曲条跳甲成虫不同组织中 Pslpl 基因 mRNA 的表达量
Fig.3 mRNA relative levels in different tissues of adults of *Phyllotreta striolata*

3 讨论

对于 LA, 早先主要关注其作为辅酶所发挥的作用, 到 1990 年以来, 研究人员逐步发现 LA 具有强大的抗氧化能力、螯合重金属的能力以及再生其他抗氧化剂的能力. 最近, 研究还发现 LA 能起到延缓衰老的作用^[11-12]. 动植物组织中 LA 通常与蛋白质分子共价结合, 以酰胺键的形式存在^[2]. LPL 对于 LA 在细胞中的存在状态及功能发挥可能起到了非常关键的作用. 因此, Pslpl 基因序列的鉴定及分析, 对于在分子水平研究黄曲条跳甲不同组织器官内蛋白硫辛酸修饰具有促进作用.

LA 含量最高的植物是菠菜, 其次是番茄和甘蓝. 有研究推测, 人体 LPL 同系物蛋白可能能够将外源 (例如食物) 提供的 LA 直接连接到需要硫辛酰化的蛋白质上, 从而不受体内 LA 合成途径的限制^[13]. 甘蓝、芥菜和白菜等十字花科蔬菜是黄曲条跳甲的自然寄主, 但目前寄主蔬菜的 LA 与黄曲条跳甲的蛋白硫辛酸修饰是否具有关联还不确定. 因此, Pslpl 基因的鉴定有助于研究寄主蔬菜 LA 含量变化和黄曲条跳甲蛋白硫辛酸修饰水平之间的关系.

有研究报道, 在脊椎动物体内肝脏和肾脏组织中 LA 含量最高^[2], 但没有相关研究分析与其相关的 LPL 表达是否也在肝脏和肾脏中最高. 本文对黄曲条跳甲 Pslpl 基因的表达谱研究发现, 雌虫 Pslpl 基因在头部和中肠的表达量相对较高, 而雄虫除在头部和中肠表达量较高外, 其睾丸中的表达量也较高, 初步推测与黄曲条跳甲精子发生相关的蛋白硫辛酸修饰需求相对较高. 因此, 结合 LPL 的功能, 了解黄曲条跳甲生殖系统硫辛酸修饰的变化, 深入探索对精子发生具关键作用的影响因子, 可为黄曲条跳甲综合防治新策略研发提供新的思路.

参考文献:

[1] REED L J. A trail of research from lipoic acid to alpha-ke- to acid dehydrogenase complexes[J]. J Biol Chem, 2001, 276(42):38329-38336.

[2] 黄涛, 黄开勋. α-L 硫辛酸的生物医学功能[J]. 生命的化学, 2004, 24(1):58-60.

[3] 崔高峰. 生物素/硫辛酸结合蛋白和 RNA 剪切因子 Sans-Fille 结构与功能的多维核磁共振研究[D]. 北京:北京大学. 2005.

[4] O'RIORDAN M, MOORS M A, PORTNOY D A. Listeria intracellular growth and virulence require host-derived li- poic acid [J]. Science, 2003, 302:462-464.

[5] 杨晓亮, 尹楠林, 庞丹, 等. 假想的脂蛋白连接酶对肺炎链球菌毒力的影响[J]. 微生物学报, 2010, 50(6): 774-779.

[6] 黄涛, 黄开勋. 硫辛酸修饰胰岛素与胰岛素受体的结 合能力[J]. 中国生化药物杂志, 2006, 27(2):65-68.

[7] 赵善欢. 植物化学保护[M]. 3 版. 北京:中国农业出版 社, 2000.

[8] FEENY P, PAAUKE KL, DEMONG NJ. Flea beetles and mustard oils: Host plant specificity of *Phylloterta crucife- rae* and *P. striolata* adults (Coleoptera: Chrysomelidae) [J]. Ann Entomol Soc Am, 1970, 63(3): 832-841.

[9] 张茂新, 凌冰, 梁广文. 十字花科蔬菜上黄曲条跳甲种 群动态调查与分析[J]. 植物保护, 2000, 26(4): 1-3.

[10] 贺华良, 宾淑英, 吴仲真, 等. 基于 solexa 高通量测序 的黄曲条跳甲转录组学研究 [J]. 昆虫学报, 2012, 55 (1):1-11.

[11] SMITHA R, SHENVIS V, WIDLANSKY M, et al. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress [J]. Curr Med Chem, 2004, 11: 1135-1146.

[12] 叶文锐, 仲伟鉴, 肖萍, 等. 硫辛酸延缓衰老作用的研 究进展[J]. 环境与职业医学, 2009, 26(3):308-311.

[13] JOHN W, CAMPELL J E. CRONAN J R. Bacterial fatty acid biosynthesis: Targets for antibacterial drug discovery [J]. Ann Rev Microb, 2001, 55: 305-332.