刘　璐, 刘　萱, 王　华,等. 水环境因子对磺胺类抗性基因 *Sul1* 含量的影响[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(3):515-519.
LIU Lu, LIU Xuan, WANG Hua, et al. Influence of water quality on sulfonamide resistance gene *Sul1*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(3): 515-519.

水环境因子对磺胺类抗性基因 *Sul1* 含量的影响

刘　璐[1], 刘　萱[2], 王　华[1,3*], 赵慧敏[2], 于春艳[4], 冷金慧[1], 耿　聪[1], 李章良[3]

(1.大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁 大连 116023; 2.大连理工大学环境学院, 辽宁 大连 116024; 3.莆田学院环境与生物工程学院, 福建省新型污染物生态毒理效应与控制重点实验室, 生态环境及其信息图谱福建省高等学校重点实验室, 福建 莆田 351100; 4.国家海洋环境监测中心, 辽宁 大连 116023)

摘　要:为探索水环境因子对磺胺类抗性基因传播机制的影响,以磺胺类抗性基因 *Sul1* 为目的基因,采用绝对定量 PCR 技术,考察了 pH、盐度、腐植酸、总氨氮和活性磷酸盐对 *Sul1* 含量的影响。研究结果表明,*Sul1* 含量在 pH 6~8 时最高,而在酸性(pH 3~5)或碱性(pH 9~10)条件下均显著降低,表现出明显的抑制作用($P<0.05$)。*Sul1* 含量随着盐度或腐植酸浓度升高而降低,呈显著的抑制作用($P<0.05$);总氨氮或活性磷酸盐对 *Sul1* 含量的影响表现为高浓度抑制、低浓度促进作用。当总氨氮或活性磷酸盐的浓度低于 0.05 mg·L^{-1} 时,*Sul1* 含量显著增加($P<0.05$);而当浓度升高到 1 mg·L^{-1},*Sul1* 的含量显著降低($P<0.05$)。上述结果表明,水环境因子会影响磺胺类抗性基因 *Sul1* 的存在及分布。

关键词:磺胺类抗性基因;水环境因子;影响
中图分类号:X52　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1672-2043(2018)03-0515-05　　doi:10.11654/jaes.2017-1236

Influence of water quality on sulfonamide resistance gene *Sul1*

LIU Lu[1], LIU Xuan[2], WANG Hua[1,3*], ZHAO Hui-min[2], YU Chun-yan[4], LENG Jin-hui[1], GENG Cong[1], LI Zhang-liang[3]

(1.College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China; 2.School of Environment, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China; 3.Fujian Provincial Key Laboratory of Ecology-toxicological Effects & Control for Emerging Contaminants, Key Laboratory of Ecological Environment and Information Atlas, Fujian Provincial University, College of Environmental and Biological Engineering, Putian University, Putian 351100, China; 4.National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023, China)

Abstract: In order to explore the influence of water quality on the mechanism of sulfonamide resistance gene transfer, the influence of pH, salinity, humic acid, total ammonia nitrogen, and phosphate on the content of sulfonamide resistance gene *Sul1* was investigated using the absolute quantitative PCR method. It showed that, at neutral pH(6~8), the content of *Sul1* was higher than that at pH 3~5 and pH 9~10, indicating a significant inhibitory effect($P<0.05$). Meanwhile, the *Sul1* content decreased significantly($P<0.05$) with the increase in the concentration of salinity or humic acid. For total ammonia nitrogen or phosphate, the inhibition of the *Sul1* content was achieved at a high concentration, while promoting effects were observed at a low concentration. When the concentration of total ammonia nitrogen or phosphate was lower than 0.05 mg·L^{-1}, the *Sul1* content increased significantly($P<0.05$), while it decreased significantly($P<0.05$) when the concentration of total ammonia nitrogen or phosphate increased to 1 mg·L^{-1}. Therefore, water quality might play an important role in the occurrence and distribution of sulfonamide resistance gene *Sul1*.

Keywords: sulfonamide resistance gene; water quality; influence

收稿日期:2017-09-11　　**录用日期**:2017-11-15

作者简介:刘　璐(1993—),女,辽宁大连人,硕士研究生,从事生态毒理学研究。E-mail:liulu933@163.com
刘萱与刘璐同等贡献
* **通信作者**:王　华　E-mail:wanghua@dlou.edu.cn

基金项目:国家重点基础研究发展计划(2013CB430403);辽宁省教育厅科学研究项目(L201603);福建省新型污染物生态毒理效应与控制重点实验室开放课题(PY16005);生态环境及其信息图谱福建省高等学校重点实验室开放课题(ST17001)
Project supported: The National Basic Research Program of China(2013CB430403); The Scientific Research Project of Liaoning Provincial Department of Education(L201603); The Open Foundation of Fujian Provincial Key Laboratory of Ecology-toxicological Effects & Control for Emerging Contaminants(PY16005); The Open Foundation of Key Laboratory of Ecological Environment and Information Atlas Fujian Provincial University (ST17001)

磺胺类抗生素是一类具有广谱抗菌活性的人畜共用抗菌剂，被广泛用于医疗、畜牧和水产养殖等领域[1]。动物对磺胺类抗生素的排泄率为 67%~90%[2]，大量的磺胺类抗生素最终会进入地表水环境中[3]。水环境中的抗生素增加了水中微生物存活的选择性压力，使可携带抗生素抗性基因（Antibiotic resistant genes，ARGs）的耐药微生物成为水环境中的优势种。因而，磺胺类抗生素引发的磺胺类抗性基因污染受到人们的关注。目前，磺胺类抗性基因（*Sul1*、*Sul2* 和 *Sul3*）已在河流、河口及水产养殖区附近等水环境中检出[4-8]。其中，*Sul1* 是在水环境中含量较高、分布相对广泛的磺胺类抗性基因[9-10]。

天然水环境的水质状况可能会影响抗生素抗性基因的水平转移，进而影响抗生素抗性基因的扩散。Bergeron 等[11]对美国路易斯安那州东南部湿地中 ARGs 的分布特征进行研究发现，盐度对 ARGs 含量具有显著影响。张俊等[12]研究结果表明，pH 变化对四环素 ARGs 的含量具有显著影响。另外，水中营养元素水平可能对 ARGs 的分布和传播有直接或间接的影响[13-14]。本研究选取 *Sul1* 为目的基因，采用绝对定量 PCR 技术，考察了 5 种水环境因子（pH、盐度、腐植酸、总氨氮和活性磷酸盐）对 *Sul1* 含量的影响，以期为水环境中磺胺类抗生素抗性基因的生态环境风险评估提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 *Sul1* 型模拟实验菌的构建

从水环境样品中提取基因组 DNA，扩增出长度为 476 bp 的 *Sul1* 基因，经 1.5% 1×TAE 琼脂糖凝胶电泳鉴定后纯化后，连接至 pMD18-T 克隆载体[宝日医生物技术（北京）有限公司]，转入 *E. coli* DH5α 感受态细胞中，再通过蓝白斑筛选挑取含目的基因的阳性菌落，37 ℃恒温振荡培养过夜。采用质粒提取试剂盒[宝日医生物技术（北京）有限公司]在所得菌液中提取包含 *Sul1* 基因的 pMD18-T/*Sul1* 质粒，所得菌液命名为 *Sul1* 型模拟实验菌，将质粒送于生工生物工程（上海）股份有限公司测序。

1.2 *Sul1* 荧光定量 PCR 方法的建立及标准曲线的绘制

经 Nanodrop 核酸定量仪测定质粒的浓度及纯度，将标准质粒用超纯水稀释成 10^{10}~10^{2} copies·μL^{-1} 的 9 个浓度，选取 10^{7}、10^{6}、10^{5}、10^{4}、10^{3} 和 10^{2} 这 6 个浓度作为模板，以 0.3 μmol·L^{-1} 的 *Sul1*F 和 *Sul1*R 为特异引物，并加入 10 μL 的 SYBR Premix Dimer Eraser（2×）、0.4 μL 的 ROX Reference Dye Ⅱ（50×）和 6.4 μL 的无菌水，反应体系 20 μL。荧光定量 PCR 反应条件：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 30 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，进行 35 个循环；72 ℃延伸 7 min。每个反应进行 3 次重复，并设置空白对照。以 SYBR-Green I 荧光染料法，应用 Step-one 定量 PCR 仪（ABI，美国）绘制 *Sul1* 的标准曲线。绘制出的 *Sul1* 标准曲线为 $Y=-3.50\lg X+39.03$，熔解曲线具有特异性，决定系数 R^2 为 0.984，相对效率达 96%。荧光定量 PCR 中所用试剂均购于宝日医生物技术（北京）有限公司。

1.3 环境因子对 *Sul1* 含量的影响

在 100 mL 锥形瓶中加入 10 mL LB 肉汤培养基，加入 0.01 mL *Sul1* 型模拟实验菌，*Sul1* 的初始浓度为 1.10×10^{5} copies·mL^{-1}。所有实验均设置 3 组平行，同时设置空白对照。pH 对 *Sul1* 含量的影响试验：通过 150 g·L^{-1} NaOH 或（1+5）HCl 溶液调节 LB 肉汤培养基 pH 的初始值分别为 3、4、5、6、7、8、9、10 和 11；盐度对 *Sul1* 含量的影响试验：通过 NaCl 溶液（200 g·L^{-1}）将空白培养基盐度 20 逐渐增加至 25、30、35、40 和 45；设置 LB 肉汤培养基的总氨氮（NH_3-N）、活性磷酸盐（PO_4-P）、腐植酸（HA）的初始浓度分别为 0、0.05、0.1、0.2、0.5、1 mg·L^{-1}。所有实验组均经 37 ℃恒温振荡培养 24 h 后，取 1.5 mL 菌液，采用 MiniBEST Bacteria Genomic DNA 试剂盒 [宝日医生物技术（北京）有限公司]提取各实验组的菌液基因组 DNA，经过 1.5%的 1×TAE 琼脂糖凝胶电泳（220 V，15 min，美国伯乐公司），纯度的测定采用微量核酸定量仪（赛默飞科技有限公司，美国）。*Sul1* 含量的单因素方差分析（One-way ANOVA）应用 SPSS 17.0 软件计算，其中 $P<0.05$ 为差异显著，$P<0.01$ 为差异极显著；并使用 Origin 8.60 进行绘图。

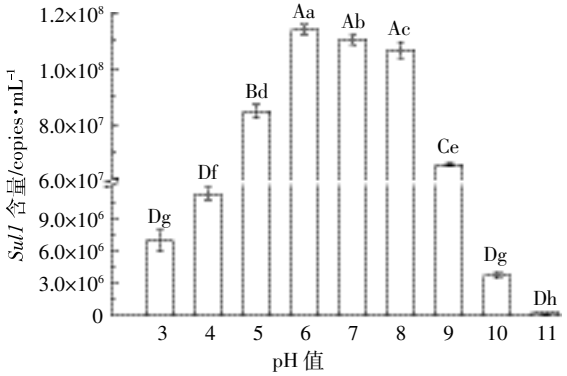
2 结果与讨论

2.1 pH 和盐度对磺胺类抗性基因 *Sul1* 含量的影响

图 1 为 pH 初始值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0 时对 *Sul1* 含量的影响。当 *Sul1* 的初始浓度为 1.10×10^{5} copies·mL^{-1}、pH 值为 3~11时，*Sul1* 基因含量的变化范围为 4.66×10^{4}~1.14×10^{8} copies·mL^{-1}。当 pH 值为 11 时，*Sul1* 的平均含量仅为 4.66×10^{4} copies·mL^{-1}；而 pH 值为 6 时，*Sul1* 的平均含量达到 1.14×10^{8} copies·mL^{-1}，其含量极显著高于酸性（pH 3~5）和碱性（pH 9~11）条件（$P<0.01$）。由此可见，中性 pH 适于抗性大肠杆菌的生长，间接促进了 *Sul1*

的含量增加，而酸性和碱性 pH 条件对 *Sul1* 的含量均呈现显著的抑制作用。

pH 是重要的水质指标，其过高或过低，都会直接影响水环境中抗性细菌菌落数量，进而影响到 ARGs 的存在和传播。本实验结果显示 pH 值为 6 时，*Sul1* 的平均含量达到 1.14×10^8 copies·mL^{-1}，显著高于其他 pH 条件（$P<0.01$），表明 ARGs 在环境中增殖和传播的最适 pH 值在 6 左右。



不同小写字母表示存在显著性差异（$P<0.05$），不同大写字母表示存在极显著性差异（$P<0.01$）。下同

Means with different lowercase letters indicate significant differences at $P<0.05$ level; Means with different capital letters indicate extremely significant differences at $P<0.01$ level. The same below

图 1　pH 对磺胺类抗性基因 *Sul1* 含量的影响

Figure 1　Impact of pH on the content of sulfonamide resistance gene *Sul1*

图 2 为盐度对磺胺类抗性基因 *Sul1* 含量的影响，结果表明盐度对 *Sul1* 的含量有着极显著的影响（$P<0.01$）。盐度从 20 上升到 45，*Sul1* 含量的变化范围从 1.04×10^8 copies·mL^{-1} 下降到 8.34×10^5 copies·mL^{-1}，这意味着盐度增加对 *Sul1* 的含量有明显的抑制作用。这可能是在高盐度条件下，细菌为了保持自身

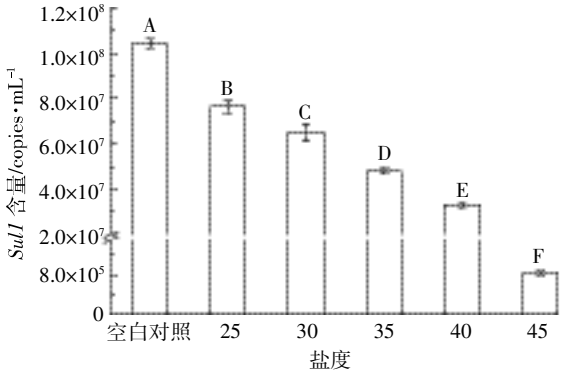


图 2　盐度对磺胺类抗性基因 *Sul1* 含量的影响

Figure 2　Impact of salinity on the content of sulfonamide resistance gene *Sul1*

生命活动，避免盐度对其内部的生物化学反应造成干扰，细菌细胞膜阻止了绝大部分的外界物质进入，进而影响了 *Sul1* 的含量。

盐度是影响细菌与外部环境发生物质与能量交换的一个重要因素，其高低决定了细菌渗透压的变化，从而直接影响细菌的活性。本研究中盐度从 20 提高到 45，*Sul1* 的含量显著下降了近 3 个数量级。Bergeron 等[11]对美国路易斯安那州东南部湿地中 ARGs 的分布特征进行研究，结果显示盐度为 6 的采样点区域的 ARGs 分布和含量显著高于盐度为 12 的采样点区域，这个结果与本实验一致，证实了水环境中盐度可能对 ARGs 的分布和传播造成影响。

2.2　腐植酸对磺胺类抗性基因 *Sul1* 含量的影响

图 3 为不同浓度的 HA 对 *Sul1* 含量的影响。当无 HA 时，24 h 后，*Sul1* 含量上升到 1.04×10^8 copies·mL^{-1}。HA 浓度为 0.05 mg·L^{-1} 时，*Sul1* 含量下降至 1.00×10^8 copies·mL^{-1}，差异不显著（$P=0.130$）。而当 HA 浓度高于 0.05 mg·L^{-1} 时，随其浓度的升高，*Sul1* 含量极显著降低（$P<0.01$），表明高浓度的 HA（大于 0.05 mg·L^{-1}）对 *Sul1* 含量呈现显著的抑制作用（$P<0.01$），这可能是由于 HA 附着在 *E.coli–sul1* 细胞膜表面，影响了细胞从培养基中吸收必要的营养物质，间接影响了 *Sul1* 的增殖和传播。

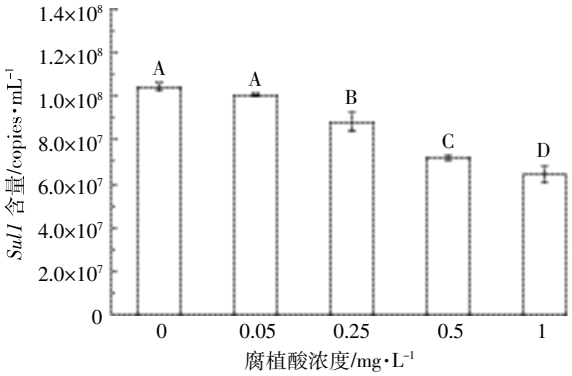


图 3　腐植酸（HA）对磺胺类抗性基因 *Sul1* 含量的影响

Figure 3　Impact of humic acid (HA) on the content of sulfonamide resistance gene *Sul1*

HA 是天然水环境中广泛存在的重要吸光物质，是水体中色度构成和溶解性有机质（Dissolved organic matter，DOM）的主要成分[15]。HA 含有大量的环状（苯环、稠苯环等）结构和多种官能团（羧基、酚羟基、酮基、胺基等），易与水环境中的抗生素或金属离子形成络合物或螯合物[16]。近年来，Chen 等[17]研究表明，水溶液中 DOM 的存在，使四环素与其形成络合物，降低

了四环素对 *E. coli* 的生物有效性，进而减弱了 ARGs 的筛选压力。本研究结果进一步证实，即使抗生素不存在时，高浓度的 HA 可能直接影响磺胺类抗性基因 *Sul1* 在水环境中的传播。

2.3 总氨氮和活性磷酸盐对磺胺类抗性基因 *Sul1* 含量的影响

图 4 为 NH_3–N 对磺胺类抗性基因 *Sul1* 含量的影响。由图 4 可见，低浓度的 NH_3–N 对 *Sul1* 的含量呈促进作用，而高浓度呈抑制作用。当无 NH_3–N 存在时，培养 24 h 后，*Sul1* 基因含量达到 7.30×10^7 copies·mL^{-1}；随着 NH_3–N 浓度提高到 0.05 mg·L^{-1}，*Sul1* 含量增长到 9.97×10^7 copies·mL^{-1}；NH_3–N 浓度为 0.05~0.2 mg·L^{-1} 时，对 *Sul1* 含量表现出促进作用（$P<0.05$）；NH_3–N 浓度为 0.5 mg·L^{-1} 时，对 *Sul1* 含量具有抑制作用；当NH_3–N 浓度提高到 1 mg·L^{-1}，*Sul1* 含量降低到 5.87×10^7 copies·mL^{-1}。可见 NH_3–N 浓度高于 0.5 mg·L^{-1} 时，对 *Sul1* 含量具有显著的抑制作用（$P<0.05$）。

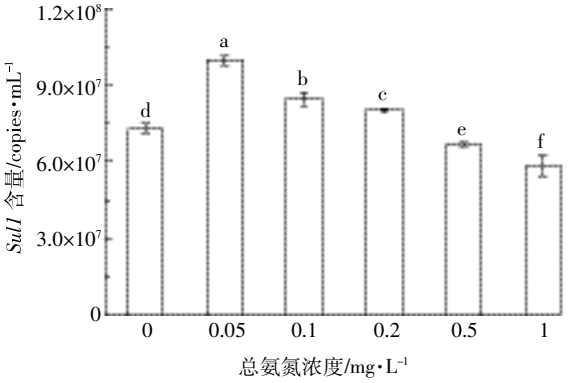


图 4 总氨氮（NH_3–N）对磺胺类抗性基因 *Sul1* 含量的影响

Figure 4 Impact of ammonia nitrogen (NH_3–N) on the content of sulfonamide resistance gene *Sul1*

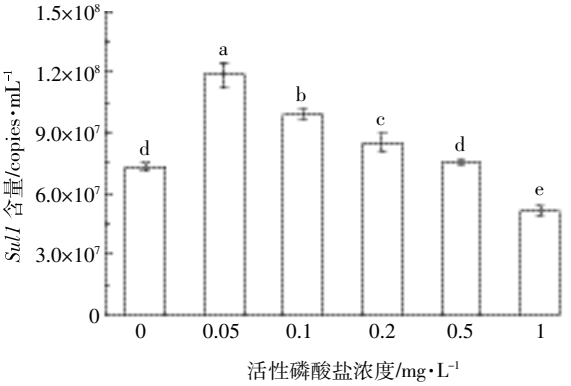


图 5 活性磷酸盐（PO_4–P）对磺胺类抗性基因 *Sul1* 含量的影响

Figure 5 Impact of available phosphate (PO_4–P) on the content of sulfonamide resistance gene *Sul1*

图 5 为 PO_4–P 对磺胺类抗性基因*Sul1* 含量的影响。图 5 表明，当无 PO_4–P 时，*Sul1* 含量为 7.30×10^7 copies·mL^{-1}。当 PO_4–P 浓度为 0.05 mg·L^{-1} 时，*Sul1* 含量达到 1.19×10^8 copies·mL^{-1}，高出对照实验组 1 个数量级，揭示低浓度的 PO_4–P 对 *Sul1* 含量呈显著的促进作用（$P<0.05$）；但当 PO_4–P 浓度为 0.5 mg·L^{-1} 时，*Sul1* 含量为 7.56×10^7 copies·mL^{-1}，与对照组相比差异不显著（$P=0.403$）；而 PO_4–P 浓度为 1 mg·L^{-1} 时，*Sul1* 含量仅为 5.15×10^7 copies·mL^{-1}，被显著抑制（$P<0.05$）。

氮和磷都是水环境中的营养元素，本研究考察了总氨氮和活性磷酸盐对 *Sul1* 含量的影响，研究结果显示低浓度的氮、磷对目的基因的含量变化呈促进作用，而高浓度则呈现显著的抑制作用。Guo 等[18]研究结果表明，与缺乏氮或磷条件相比，当氮、磷和葡萄糖同时存在时，细菌 ARGs 接合转移的转化效率提高近 2 倍，而与仅存葡萄糖相比，转化效率提高近 100 倍，实验结果进一步证明氮、磷的存在对 ARGs 在环境中的迁移和转化有显著的影响。

3 结论

水环境因子对水中磺胺类抗性基因 *Sul1* 的存在及分布可能产生极其重要的影响，pH 3~5、pH 9~10、高盐度（25~45）、高 HA 浓度和高氮磷浓度对 *Sul1* 含量均呈显著的抑制作用，低浓度氮磷对 *Sul1* 含量起促进作用。

参考文献：

[1] 汪 涛, 杨再福, 陈勇航, 等. 地表水中磺胺类抗生素的生态风险评价[J]. 生态环境学报, 2016, 25(9): 1508-1514.
WANG Tao, YANG Zai-fu, CHEN Yong-hang, et al. Ecological risk assessment for sulfonamides in surface waters[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2016, 25(9): 1508-1514.

[2] Kim Y, Jung J, Kim M, et al. Prioritizing veterinary pharmaceuticals for aquatic environment in Korea[J]. *Environmental Toxicology & Pharmacology*, 2008, 26(2): 167-176.

[3] 冀秀玲, 刘 芳, 沈群辉, 等. 养殖场废水中磺胺类和四环素抗生素及其抗性基因的定量检测[J]. 生态环境学报, 2011, 20(5): 927-933.
JI Xiu-ling, LIU Fang, SHEN Qun-hui, et al. Quantitative detection of sulfonamides and tetracycline antibiotics and resistance genes in sewage farms[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2011, 20(5): 927-933.

[4] 杨 颖. 北江水环境中抗生素抗性基因污染分析[D]. 广州: 中山大学, 2010.
YANG Ying. Characterizing the pollution by the representative antibiotic resistance genes (ARGs) in the Beijiang River, South China[D]. Guangzhou: SunYat-sen University, 2010.

[5] 梁惜梅, 聂湘平, 施 震. 珠江口典型水产养殖区抗生素抗性基因污

染的初步研究[J]. 环境科学, 2013, 34(10):4073-4080.
LIANG Xi-mei, NIE Xiang-ping, SHI Zhen. Preliminary studies on the occurrence of antibiotic resistance genes in typical aquaculture area of the Pearl River Estuary[J]. *Environmental Science*, 2013, 34(10):4073-4080.

[6] 张瑞泉, 应光国, 丁永祯, 等. 广东西枝江-东江流域抗生素抗性基因污染特征研究[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(12):2471-2479.
ZHANG Rui-quan, YING Guang-guo, DING Yong-zhen, et al. Pollution characteristics of antibiotic resistance genes in Xizhijiang-Dongjiang River basin, Guangdong Province, China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(12):2471-2479.

[7] 王　娜. 环境中磺胺类抗生素及其抗性基因的污染特征及风险研究[D]. 南京:南京大学, 2014.
WANG Na. Pollution characteristics and risk of sulfonamides antibiotics and their resistance genes in the environment[D]. Nanjing: Nanjing University, 2014.

[8] 李　壹, 曲凌云, 朱鹏飞, 等. 山东地区海水养殖区常见抗生素耐药菌及耐药基因分布特征[J]. 海洋环境科学, 2016, 35(1):55-62.
LI Yi, QU Ling-yun, ZHU Peng-fei, et al. Distribution characteristics of antibiotic resistance bacteria and related resistance genes in mariculture area of Shandong[J]. *Marine Environmental Science*, 2016, 35(1):55-62.

[9] Luo Y, Mao D Q, Rysz M, et al. Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(19):7220-7225.

[10] Lu Z H, Na G S, Gao H, et al. Fate of sulfonamide resistance genes in estuary environment and effect of anthropogenic activities[J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 527/528:429-438.

[11] Bergeron S, Brown R, Homer J, et al. Presence of antibiotic resistance genes in different salinity gradients of freshwater to saltwater marshes in southeast Louisiana, USA[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2016, 113:80-87.

[12] 张　俊, 罗方园, 熊浩徽, 等. 环境因素对土壤中几种典型四环素抗性基因形成的影响[J]. 环境科学, 2014, 35(11):4267-4274.
ZHANG Jun, LUO Fang-yuan, XIONG Hao-hui, et al. Effect of environmental factors on the formation of several typical tetracycline resistance genes in soil[J]. *Environmental Science*, 2014, 35(11):4267-4274.

[13] Zhao Z L, Wang J, Han Y, et al. Nutrients, heavy metals and microbial communities co-driven distribution of antibiotic resistance genes in adjacent environment of mariculture[J]. *Environmental Pollution*, 2016, 220:909-918.

[14] Zhu Y G, Zhao Y, Li B, et al. Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.270.

[15]于春艳. 腐植酸的分离及其组分对水中 2, 4-D 光降解作用[D]. 大连:大连理工大学, 2009.
YU Chun-yan. Separation of humic acids and effects of their fractions on the photodegradation of 2, 4-D in aqueous environment[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2009.

[16] 欧晓霞. 腐植酸及其不同级分和铁的络合物对阿特拉津光降解的影响[D]. 大连:大连理工大学, 2008.
OU Xiao-xia. The effects of complexes of iron with humic acids and fractions on the photodegradation of atrazine[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2008.

[17] Chen Z Y, Zhang Y J, Gao Y Z, et al. Influence of dissolved organic matter on tetracycline bioavailability to an antibiotic-resistant bacterium[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(18):10903-10910.

[18] Guo M T, Yuan Q B, Yang J. Distinguishing effects of ultraviolet exposure and chlorination on the horizontal transfer of antibiotic resistance genes in municipal wastewater[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(9):5771-5778.