

橡胶草实时荧光定量PCR内参基因评价

覃碧¹, 潘敏², 余海洋², 杨玉双¹, 甘霖¹, 刘实忠^{1*}

¹中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南儋州571737; ²海南大学环境与植物保护学院, 海口570228

摘要: 橡胶草(*Taraxacum kok-saghyz*)是一种重要的产胶作物。为了筛选出橡胶草稳定可靠的内参基因用于实时荧光定量PCR (qRT-PCR)分析, 本研究从已公布的橡胶草转录组数据中选取18S rRNA、EIF4 α 、tubulin、 β -actin、GAPDH和40S ribosomal protein (40SRP)作为候选基因, 通过qRT-PCR检测, 并利用geNorm、NormFinder、BestKeeper等软件对这6个候选内参基因在不同橡胶草种质、不同组织以及机械伤害和乙烯利处理后不同时间下的表达稳定性进行分析, 结果发现6个候选内参基因的表达稳定性各异, GAPDH和 β -actin基因是不同种质及其不同组织以及不同处理中表达最稳定的内参基因。本研究结果为橡胶草基因表达分析提供了稳定可靠的内参基因。

关键词: 橡胶草; 内参基因; 实时荧光定量PCR

橡胶草(*Taraxacum kok-saghyz*)又名俄罗斯蒲公英(Russian dandelion), 为菊科(Asteraceae)蒲公英属多年生草本植物, 原产于哈萨克斯坦、欧洲和中国新疆等地。橡胶草根部分含有优质天然橡胶, 与传统产胶植物巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)相比, 橡胶草具有适应性强、生长收获期短、适合机械化种植和采收、抗逆能力强等诸多优点, 而且所产天然橡胶质量和性能与巴西橡胶树相当。因此, 橡胶草成为近年来产胶植物研究的热点。

实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)技术是基因表达模式分析的重要技术, 但目标基因的表达量需要与内参基因进行校正和标准化, 因此, 选用表达稳定的基因作为内参基因对准确分析实验结果非常关键。理想的内参基因应在所有的细胞中或各种生理状态下均能稳定地表达(Bustin 2002)。18S rRNA、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)、tubulin、 β -actin、polyubiquitin (UBQ)和elongation factor-1 α (EF-1 α)是植物和动物中qRT-PCR分析最常用的内参基因(Andersen等2004; Brunner等2004; Bustin 2002; Dheda等2004; Goidin等2001; Kim等2003; Radonic等2004)。这些内参基因比较可靠, 但并不是在所有物种及其生理活动中都能稳定表达, 因此, 需要在不同的物种、特定生理活动、发育时期或器官中筛选可靠的一个或多个内参基因, 对qRT-PCR结果进行校正和标准化。研究者们开发了NormFinder、geNorm、BestKeeper等软件对内参基因的表达稳定性进行分析与评价(Andersen等2004; Pfaffl等2004; Vandesompele等2002), 筛选出了对不同物种和在不同生理状态下稳定可靠的内

参基因, 但目前尚未有关于橡胶草内参基因筛选的报道。本研究选取橡胶草的18S rRNA、EIF4 α 、tubulin、 β -actin、GAPDH和40S ribosomal protein (40SRP)作为候选内参基因, 设计特异性引物, 以不同橡胶草种质、不同组织以及机械伤害和乙烯利处理后不同时间的样品为材料, 通过qRT-PCR检测, 并利用geNorm、NormFinder和BestKeeper软件对这6个候选内参基因的表达稳定性进行分析和评价, 筛选获得适合橡胶草不同种质、不同组织以及不同处理条件下表达稳定的内参基因, 为研究橡胶草基因表达分析提供参考。

材料与方法

1 材料

实验所用橡胶草(*Taraxacum kok-saghyz* Rodin)材料为俄罗斯引进的种质C1以及美国农业部引进的种质W635181和W635178。在盛花期同时采集C1和W635181的根、叶和花不同组织, W635178组培苗经机械伤害(0、0.5、2和10 h)和2.5% (V/V) 乙烯利处理(0、2、10和24 h)后不同时间分别取其叶片, 所取材料置于液氮中快速冷冻, 于-80°C冰箱中保存备用。

2 方法

2.1 总RNA提取和cDNA合成

橡胶草不同组织的总RNA采用天根生化科技

收稿 2016-04-22 修定 2016-07-04

资助 中国热带农业科学院橡胶研究所基本科研业务费专项(1630022015005)、山东玲珑轮胎有限责任公司横向课题(H2012177)和国家自然科学基金(31300503)。

* 通讯作者(E-mail: sz_liu@126.com)。

(北京)有限公司的RNAprep Pure Plant Kit多糖多酚植物总RNA提取试剂盒进行提取,对提取的总RNA进行琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度检测, RNA质量要求 $A_{260}/A_{280}=1.8\sim 2.0$ 、 $A_{260}/A_{230}=2.0\sim 2.2$,并测定RNA浓度。经检测,完整性好且纯度高的总RNA用于cDNA第一链合成,具体步骤参照Fermentas公司的RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒说明书进行,合成的cDNA保存于 -20°C 。

2.2 内参基因的筛选与引物设计

从已公布的橡胶草转录组数据中选取 *18S rRNA*、*EIF4 α* 、*tubulin*、 *β -actin*、*GAPDH*、*40SRP*共6个内参基因进行鉴定。根据qRT-PCR引物的设计原则,利用Primer Premier 6.0软件设计引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

2.3 RT-PCR与qRT-PCR扩增

RT-PCR反应体系(20 μL)含: 10 μL *Premix Taq* (*Ex Taq*™ Version 2.0 plus dye, TaKaRa), 1 μL cDNA (大约30 ng)作为模板,上、下游引物(20

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各1 μL , 7 μL ddH₂O。RT-PCR反应程序: 94°C 预变性3 min; 94°C 变性30 s, 60°C 退火30 s, 72°C 延伸30 s, 35个循环; 72°C 延伸10 min。扩增产物经2.0% (*m/V*)琼脂糖凝胶电泳检测。

按照说明书在冰上配制20 μL qRT-PCR反应体系: 10 μL *SYBR Premix Ex Taq*™ (TaKaRa), 上、下游引物(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各1 μL , 7 μL ddH₂O, 1 μL cDNA(大约30 ng); 每个样品设置3个重复,以不加模板作为阴性对照。qRT-PCR所用仪器为CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)。qRT-PCR反应程序为: 95°C 预变性3 min; 95°C 变性10 s, 60°C 退火20 s, 72°C 延伸30 s, 45个循环。延伸阶段收集信号,于 $60\sim 95^{\circ}\text{C}$ 采集熔解曲线荧光信号。

2.4 内参基因表达稳定性分析与评价

利用NormFinder、geNorm和BestKeeper对各内参基因的稳定性进行分析与评价,筛选出最优的内参基因(表1)。

表1 内参基因信息及其用于qRT-PCR分析的引物序列

Table 1 Reference genes and primer sequences used for qRT-PCR analysis

基因名称	GenBank登记号	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	片段长度/bp
<i>18S rRNA</i>	GO660839	GGTTTACTCGTCCCTTTTGT	CCTATGATGTATCCCATGCT	141
<i>EIF4α</i>	GO661881	TCTCACGAGGTTTCAAAGAC	GAGGGTAAGTTCGTCTCTTTTC	167
<i>tubulin</i>	GO662104	GGAAATATGTCGGTAACAGC	GTACGTAGACTGTCCATAGTACCAG	133
<i>β-actin</i>	DY824357	GGAAGGATCTTATGGGAAC	CAGACACTATACTTCTCTCAGG	151
<i>GAPDH</i>	DY821911	AGTTGGTTTCGTGGTATGAC	ACATGTCAGTGAACAGGTAGAC	154
<i>40SRP</i>	GO670291	CACTCAAAGTTGTTAGAGTCC	AACTCTAAGTACGGACAGGAG	155

实验结果

1 内参基因引物扩增特性分析

本研究根据橡胶草已有的转录组数据库及基因表达分析常用的内参基因选取了6个候选的内参基因进行分析,以叶片cDNA为模板,通过RT-PCR均能扩增出预期的目标片段,片段清晰,特异性好,没有引物二聚体(图1),可用于qRT-PCR分析。

进而以橡胶草材料C1和W635181的不同组织cDNA为模板进行qRT-PCR分析,结果如图2和表2所示,6个内参基因的溶解曲线为明显的单一峰,溶解温度(T_m)均在 $80\sim 90^{\circ}\text{C}$ 之间。将6个内参基因引物经RT-PCR扩增的产物回收纯化后,用于标准曲线扩增,结果显示,6个内参基因引物的扩增效率在

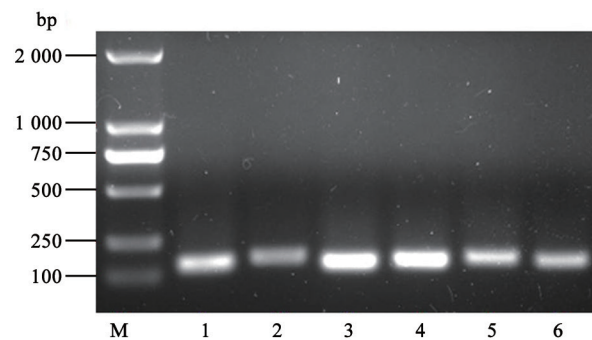


图1 橡胶草6个内参基因的RT-PCR扩增结果

Fig.1 RT-PCR amplification of six reference genes of *T. kok-saghyz*

M: DL2000 DNA marker; 1: *18S rRNA*; 2: *EIF4 α* ; 3: *tubulin*; 4: *β -actin*; 5: *40SRP*; 6: *GAPDH*。

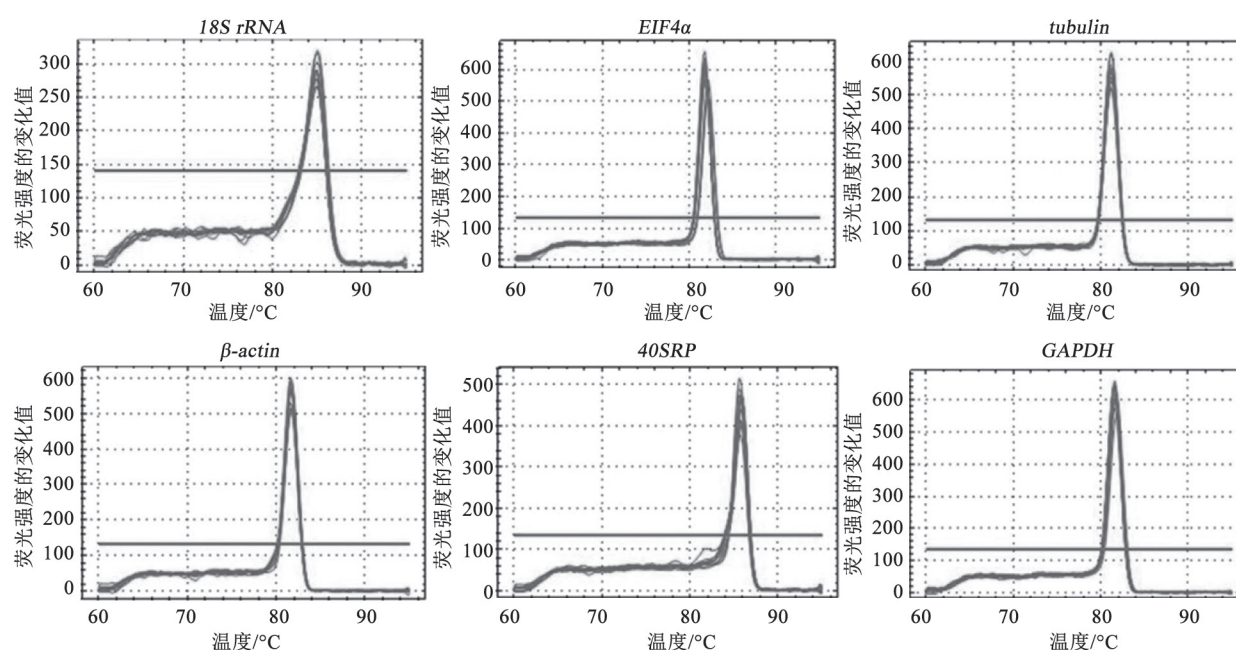


图2 橡胶草6个内参基因的qRT-PCR熔解曲线

Fig.2 qRT-PCR melting curves of six reference genes of *T. kok-saghyz*

表2 6个内参基因引物扩增特性分析

Table 2 Amplification specificity of primers designed by six reference genes

基因名称	斜率	决定系数	扩增效率/%	熔解温度/°C
<i>18S rRNA</i>	3.444	0.999	95.2	84.8
<i>EIF4a</i>	0.958	0.999	109.3	82.0
<i>tubulin</i>	0.924	0.996	110.7	81.4
<i>40SRP</i>	2.912	0.993	120.5	85.6
<i>β-actin</i>	0.871	0.978	130.2	81.6
<i>GAPDH</i>	2.507	0.994	150.5	81.8

95.2%~150.5%之间,斜率为0.871~3.444,决定系数(R^2)为0.978~0.999。以上结果表明,根据这6个内参基因序列设计的qRT-PCR引物特异性好,扩增效率高,可用于基因的表达稳定性分析。

6个内参基因在不同种质以及不同组织中的 C_q 值(即扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时所经过的扩增循环数)均有一定的变化,变化趋势也各有不同,其中以*18S rRNA*的 C_q 值最低,说明其表达丰度最高;*40SRP*和*tubulin*的 C_q 值较高,表达水平较低;*EIF4a*、*β-actin*和*GAPDH*的表达水平居中(图3)。

2 不同内参基因的稳定性分析与评价

2.1 NormFinder软件分析结果

以C1和W635181的不同组织,以及W635178组

育苗经机械伤害和2.5%乙烯利处理后不同时间的叶片样品的cDNA为模板进行qRT-PCR分析,利用NormFinder软件分析橡胶草6个内参基因在不同材料、不同组织以及不同处理条件下的表达稳定性,稳定值越小基因表达越稳定。结果如图4所示,*18S rRNA*、*EIF4a*、*tubulin*、*β-actin*、*40SRP*和*GAPDH*表达稳定值分别为0.119、0.068、0.087、0.039、0.068和0.021,表明*GAPDH*基因稳定性最高,而*18S rRNA*的稳定性最差。对于两个内参基因联合分析而言,*β-actin*与*GAPDH*联合的稳定性最高(稳定值为0.029)。

2.2 geNorm软件分析结果

geNorm分析内参基因稳定性的依据是公式 $Q = E^{C_{q(\min)} - C_{q(\text{sample})}}$,其中扩增效率 E 默认为2, $C_{q(\min)}$ 为所有样品中最低的 C_q 值, $C_{q(\text{sample})}$ 为每个样品的 C_q 值,通过计算内参基因表达稳定性的 Q 值进而分析内参基因在不同样品中的表达稳定性(Vandesompele等2002)。 Q 值越小,稳定性越好;反之,稳定性越差。以橡胶草不同种质、不同组织以及不同处理后的叶片为材料进行qRT-PCR扩增,候选内参基因的表达稳定性从高到低依次为*GAPDH*>*β-actin*>*18S rRNA*>*EIF4a*>*40SRP*>*tubulin*(图5)。由此可知*GAPDH*和*β-actin*表达稳定性最好,而*tubulin*相对最不稳定,与NormFinder软件的分析结果类似。

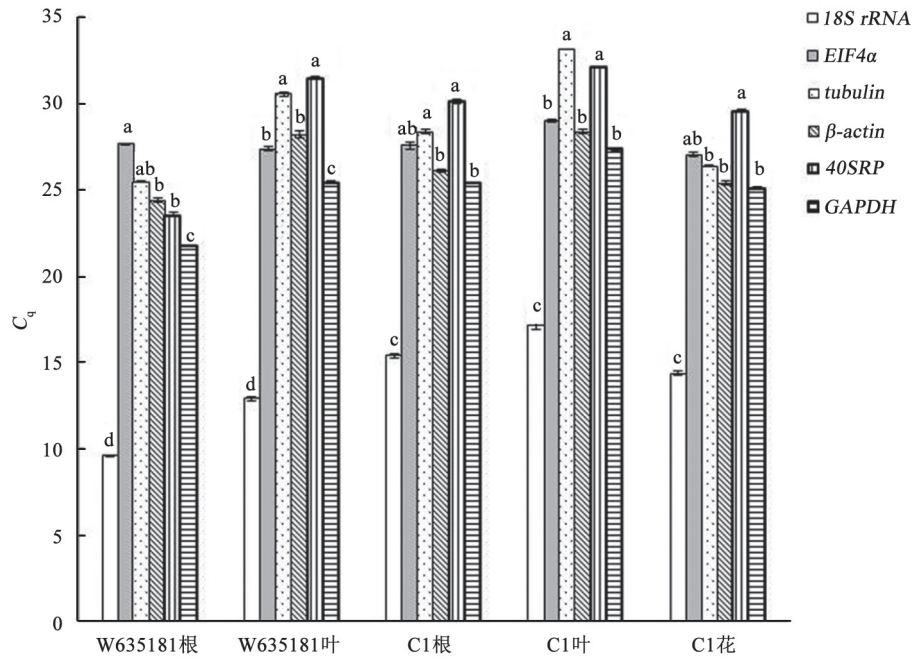


图3 6个内参基因在不同橡胶草种质及其不同组织中的 C_q 值

Fig.3 The C_q values of six reference genes in different *T. kok-saghyz* accessions and different tissues samples
同一材料的各柱形上用不同小写字母标识表示差异显著($P < 0.05$)。

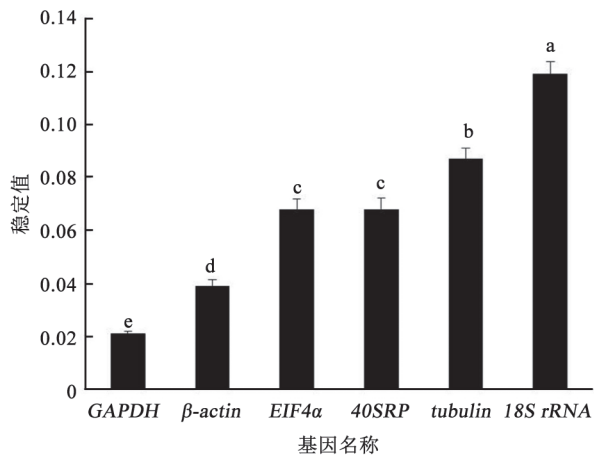


图4 NormFinder软件对6个内参基因表达稳定性的分析结果
Fig.4 Expression stability of six reference genes analyzed by NormFinder software

各柱形上用不同小写字母标识表示差异显著($P < 0.05$), 下同。

2.3 BestKeeper软件分析结果

BestKeeper软件主要通过比较 C_q 值的标准偏差(standard deviation, SD)和变异系数(coefficient of variation, CV)来判断各基因的稳定性, SD值和CV值越小, 稳定性越好; 反之稳定性越差。采用Best-

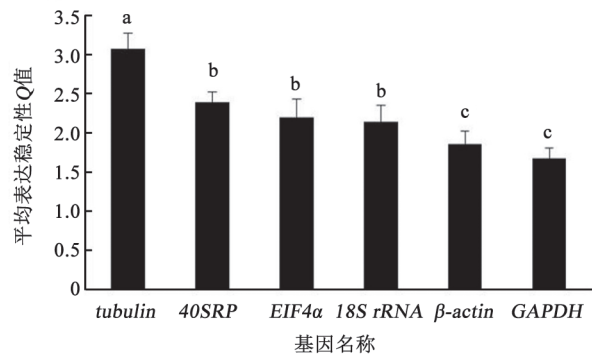


图5 geNorm软件对6个内参基因表达稳定性的分析结果
Fig.5 Expression stability values of six reference genes analyzed by geNorm software

Keeper软件对橡胶草6个候选内参基因的表达稳定性进行分析的结果显示, β -actin基因的SD和CV最小, 稳定性最好; 其次是GAPDH基因; 18S rRNA和40SRP基因SD和CV最大, 稳定性最差(表3)。综合NormFinder、geNorm和BestKeeper软件的分析结果, 可以发现 β -actin和GAPDH基因是稳定性最好的内参基因, 可用于橡胶草不同种质、不同组织以及不同处理条件下的qRT-PCR分析。

表3 BestKeeper软件对6个候选内参基因表达稳定性
的分析结果

Table 3 Expression stability of six reference genes
analyzed by BestKeeper software

基因名称	C _q				
	平均值	最小值	最大值	SD	CV
<i>18S rRNA</i>	13.02	9.58	17.19	1.80 ^e	13.84 ^e
<i>EIF4α</i>	25.83	23.38	29.00	1.61 ^b	6.25 ^b
<i>tubulin</i>	30.44	25.48	34.92	2.38 ^d	7.83 ^d
<i>β-actin</i>	26.51	24.39	28.36	1.20 ^a	4.51 ^a
<i>40SRP</i>	27.38	23.54	32.08	2.25 ^d	8.22 ^d
<i>GAPDH</i>	24.05	21.42	27.35	1.30 ^a	5.39 ^a

SD和CV两列的数据各自用不同小写字母标识表示差异显著(P<0.05)。

讨 论

qRT-PCR技术是目前应用最广泛的基因表达分析技术,而选择稳定的内参基因是准确进行表达基因定量的先决条件。常用的内参基因是一些管家基因,其编码蛋白或维持细胞结构或参与细胞的基础代谢过程,如*tubulin*编码微管蛋白,*actin*编码肌动蛋白,*UBQ*编码泛素蛋白,*GAPDH*编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶。尽管这些管家基因在不同细胞中的表达相对比较稳定,但它们的转录水平并不是在所有组织、不同生理环境下都是稳定的(Czechowski等2005; Lee等2002; Suzuki等2000; Thellin等1999)。因此,为了评价不同的内参基因在不同组织和不同生理条件下的稳定性,研究者们开发了一些分析软件对内参基因的稳定性进行分析和评价,从而筛选出适合不同物种和不同条件下基因表达分析的内参基因。利用拟南芥全基因组范围的芯片数据,Czechowski等(2005)鉴定了一系列基因在不同发育阶段和不同环境条件下比传统的内参基因表达更稳定、表达丰度更低的内参基因,并通过qRT-PCR对部分新鉴定的内参基因进行了扩增验证;采用geNorm软件对新鉴定的内参基因与传统的内参基因进行比较分析和评价,发现新鉴定的内参基因表达非常稳定,表达丰度低,更适合于拟南芥的基因表达分析,尤其是低丰度基因的表达分析。Brunner等(2004)对10个内参基因在杨树不同组织中的表达稳定性进行分析

后发现,*UBQ*和*TUA*是该文中所有测试组织中表达最稳定的基因。朱友银等(2015)等从中国樱桃(*Prunus pseudocerasus*)花芽转录组数据中筛选了表达稳定的*tubulin*、*β-actin*、*GAPDH*、*EF1B*、*UBCE*、*18S rRNA*和*TIF5A*共7个管家基因在不同处理以及花芽休眠解除过程的表达稳定性进行比较分析,发现*GAPDH*在4°C和NaCl处理下最稳定,而*β-actin*和*UBCE*分别在脱落酸(abscisic acid, ABA)处理和花芽休眠解除过程中最稳定。

橡胶草是重要的产胶植物,也是近年来产胶植物研究的热点。在前人的研究中,曾采用*β-actin*、*EIF4α*和*18S rRNA*作为内参基因用于橡胶草基因表达分析(Zhang等2015; 王启超等2012; 赵丽娟等2015; Collins-Silva等2012),但并没有系统地对这些内参基因在橡胶草不同组织和不同生理条件下的表达稳定性进行比较分析,对目标基因表达定量的结果可能会存在一定偏差。因此,为了提高橡胶草基因表达定量分析的准确性,本研究从橡胶草转录组数据库中选取*18S rRNA*、*EIF4α*、*tubulin*、*β-actin*、*GAPDH*、*40SRP*共6个内参基因,分析这些内参基因在不同橡胶草种质、不同组织、乙烯利和机械伤害处理条件下的表达稳定性,结果发现*β-actin*和*GAPDH*基因是稳定性最好的内参基因,可用于橡胶草不同种质、不同组织以及不同处理条件下的qRT-PCR分析。本研究结果为研究橡胶草基因表达提供了稳定可靠的内参基因。

参考文献

- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*, 64 (15): 5245–5250
- Brunner AM, Yakovlev IA, Strauss SH (2004). Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biol*, 4: 14
- Bustin SA (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*, 29 (1): 23–39
- Collins-Silva J, Nural AT, Skaggs A, Scott D, Hathwaik U, Woolsey R, Schegg K, McMahan C, Whalen M, Cornish K, et al (2012). Altered levels of the *Taraxacum kok-saghyz* (Russian dandelion) small rubber particle protein, TksRPP3, result in qualitative and quantitative changes in rubber metabolism. *Phytochemistry*, 79: 46–56

- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 139 (1): 5–17
- Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A (2004). Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*, 37 (1): 112–119
- Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O (2001). Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and β -actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem*, 295 (1): 17–21
- Kim BR, Nam HY, Kim SU, Kim SI, Chang YJ (2003). Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnol Lett*, 25 (21): 1869–1872
- Lee PD, Sladek R, Greenwood CMT, Hudson TJ (2002). Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome Res*, 12 (2): 292–297
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*, 26 (6): 509–515
- Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun*, 313 (4): 856–862
- Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR (2000). Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques*, 29 (2): 332–337
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol*, 75 (2–3): 291–295
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3 (7): research0034.1
- Wang QC, Liu SZ, Xiao XZ (2012). Cloning and expression analysis of *HMGR* gene from *Taraxacum kok-saghyz*. *Bull Bot Res*, 32 (1): 61–68 (in Chinese with English abstract) [王启超, 刘实忠, 校现周(2012). 橡胶草*HMGR*基因的克隆及表达分析. *植物研究*, 32 (1): 61–68]
- Zhang Y, Iaffaldano BJ, Xie W, Blakeslee JJ, Cornish K (2015). Rapid and hormone-free *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation in rubber producing dandelions *Taraxacum kok-saghyz* and *T. brevicorniculatum*. *Ind Crop Prod*, 66 (1): 110–118
- Zhao L, Yuan B, Wang X, Luo C, Yan J, Zhu J (2015). Cloning, transformation and functional analysis of rubber elongation factor *REF* gene. *Acta Agric Boreal-Occident Sin*, 24 (1): 144–150 (in Chinese with English abstract) [赵丽娟, 袁彬青, 王秀珍, 罗成华, 闫洁, 祝建波(2015). 橡胶延伸因子*REF*基因的克隆、转化及功能分析. *西北农业学报*, 24 (1): 144–150]
- Zhu YY, Wang Y, Zhang H, Shao X, Li YQ, Guo WD (2015). Selection and characterization of reliable reference genes in Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus*) using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). *J Agric Biotechnol*, 23 (5): 690–700 (in Chinese with English abstract) [朱友银, 王月, 张弘, 邵娟, 李永强, 郭卫东(2015). 中国樱桃实时定量PCR (qRT-PCR)内参基因的筛选与鉴定. *农业生物技术学报*, 23 (5): 690–700]

Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in *Taraxacum kok-saghyz* Rodin

QIN Bi¹, PAN Min², YU Hai-Yang², YANG Yu-Shuang¹, GAN Lin¹, LIU Shi-Zhong^{1*}

¹Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China; ²College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Haikou 570228, China

Abstract: *Taraxacum kok-saghyz* (TKS) is one of the most important rubber-producing crops. To screen stable and reliable reference genes for quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis in TKS, 6 housekeeping genes from the public transcriptome data of TKS, including *18S rRNA*, *EIF4 α* , *tubulin*, *β -actin*, *GAPDH*, and *40S ribosomal protein (40SRP)*, were selected as candidate reference genes for analysis in this study. The expression stabilities of the 6 genes were analyzed by geNorm, NormFinder, and BestKeeper, respectively, in different TKS accessions and tissues, and under mechanical wounding and ethephon treatments. This result indicates that the expression stability varied greatly between these genes. *GAPDH* and *β -actin* had the highest stabilities across different accessions and tissues, and under different treatments. The results in this study provide stable and reliable reference genes for gene expression analysis in TKS.

Key words: *Taraxacum kok-saghyz*; reference gene; quantitative real-time PCR

Received 2016-04-22 Accepted 2016-07-04

This work was supported by the Fundamental Research Funds for Rubber Research Institute, CATAS (Grant No. 1630022015005), Shandong Linglong Tyre Company Limited Research Funds (Grant No. H2012177), and the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31300503).

*Corresponding author (E-mail: sz_liu@126.com).