

铜绿假单胞菌色素代谢相关基因的研究

徐海津 单志英 林伟利 高才昌 乔明强*

(南开大学生命科学学院 天津 300071)

摘 要 首次应用 Mu 转座重组技术研究铜绿假单胞菌色素合成与调控的机制。通过一系列的表型筛选,得到 8 株色素合成能力改变的突变子。经基因克隆、核苷酸测序研究,证明转座子分别插入到 *hmgA*、*ptsP*、*sucC*、*phzS*、*phzF1* 五个基因中。*hmgA* 基因转座失活导致酪氨酸分解代谢中间产物尿黑酸的积累,后四种情况转座突变显著地影响了铜绿假单胞菌最重要的色素-绿脓素(pyocyanin)的合成,其中 *PhzS* 和 *phzF1* 是绿脓素合成过程中的结构基因,*ptsP* 基因是 1 个磷酸转移酶系统的重要组成部分,*sucC* 基因的产物是三羧酸循环中的琥珀酰辅酶 A 合成酶,对后两个基因在色素合成的调控方面可能起到重要作用的报道尚属首例。

关键词 铜绿假单胞菌 绿脓素 Mu 转座重组技术

中图分类号:Q75 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)01-0014-05

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)俗名绿脓杆菌,是一种条件致病菌。由于菌群失调引起的绿脓杆菌的感染,已成为临床上较顽固的疾病。

绿脓杆菌能产生包括绿脓素在内的多种色素^[1]。绿脓素是一种蓝绿色的吩嗪类化合物,为 *P. aeruginosa* 所特有,也是重要的毒力因子,与感染性和致病性密切相关。绿脓杆菌感染动物和人类的组织后,分泌绿脓素诱导嗜中性粒细胞凋亡,破坏由其介导的免疫防御机能^[2]。绿脓素通过灭活 α_1 蛋白酶抑制因子影响肺丝氨酸蛋白酶活性,与肺囊性纤维化疾病密切相关^[3]。绿脓素和另一种绿脓杆菌吩嗪类代谢物 1-羟基吩嗪还会抑制呼吸道上皮细胞的纤毛运动能力,利于绿脓杆菌在呼吸道内形成生物被膜^[4]。绿脓杆菌合成的色素除了拥有感染性和致病性以外,绿脓素等色素还具有抑制真菌^[5]和革兰氏阴性细菌^[6]生长的作用。

P. aeruginosa 色素合成与调控机制十分复杂,多个基因,操纵子和调控系统参与其中。以绿脓素为例,细胞密度、营养条件、培养方式、抗生素的使用等等都会影响其合成;同时,自然界中存在许多色素表达量差异巨大的菌株,这种菌株之间的差异蕴藏着众多未知的调控机制。另外,由于 *P. aeruginosa* 包括色素在内的多种毒力因子经常受相同的调控系统影响,因此深入研究色素代谢的未知环节,发掘潜在的调控方式,对于寻找药物作用的新靶点,解决由

P. aeruginosa 引起的难治性感染,具有极其重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 菌株 PA2002068 是从一个支气管扩张患者送检的痰标本中分离所得,经美国全自动微生物分析仪 VITEK-IMS60 鉴定为 *P. aeruginosa*,对卡那霉素敏感(MIC = 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 为本实验室保存菌种。

1.1.2 人工 Mu 转座子、MuA 转座酶:均为芬兰赫尔辛基大学 Savilahti 博士惠赠。

1.1.3 引物:转座子 DNA 检测引物 mu1:5'-GCC GCTGATCATCTAGAGA-3', mu2:5'-TCCCACCAGCTT ATATACCT-3';测序引物为 primer1:5'-GCAACTGT CCATACTCTGA-3', primer2:5'-CGCTGGGTTTATCGT CGA-3(引物合成及测序反应委托上海生工公司完成)。K50 测序引物 K50primer:5'-ACATTTCCGAGT CCCTCACC-3(引物合成及测序反应委托博亚公司完成)。

1.1.4 试剂:限制性内切酶、氨苄青霉素、卡那霉素、dNTP 购自华美生物制品公司;胰蛋白胨(Tryptone)、酵母粉(Yeast extract)为英国 Oxoid 公司产品;小肠碱性磷酸酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶,分子量标准 DL2000 和 DL15000 为 TaKaRa 公

基金项目 国家自然科学基金(30270075)

* 通讯作者。Tel 86-22-23503340; E-mail: mingqiangjiao@yahoo.com.cn

作者简介 徐海津(1971-)男,天津市人,博士研究生。研究方向为分子微生物学, E-mail: xuhaijin@eyou.com

其他作者:夏惠明,徐姝娟,张秀明,白艳玲

收稿日期 2004-06-23,修回日期 2004-11-20

公司产品;假单胞菌分离琼脂(PIA-*Pseudomonas* Isolation Agar)为美国 Difco 公司产品;其它试剂均为国产分析纯。

1.1.5 仪器: Micro pulser 电转化仪为 Bio-Rad 公司产品。HITACHI 20PR-52D 高速冷冻离心机为日立公司产品。752 分光光度计由上海分析仪器厂生产。PCR 仪 PTC-200 peliter thermal cycler 为基因公司产品。

1.2 Mu 转座复合物的制备及检测

操作均参照文献 [7] 进行。

1.3 感受态细胞的制备及电转化

操作均参照文献 [8] 进行。

1.4 色素变化突变株的初筛

将转座重组到的转化子在含有 K_m ($50\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 平板上进行划线培养,每板上 12~16 个,18h 后观察菌膜的颜色,与野生型 PA2002068 比较,挑出潜在的色素突变株。

1.5 表型确认

将潜在的突变株单独在 PIA [$45\text{g}/\text{L}$ *Pseudomonas* Isolation Agar 2% (V/V) 甘油,沸水中加热搅拌 1min 使粉末溶解,高压灭菌]平板上划线培养 18h,比较与野生型的颜色差异(PIA 培养基有利于绿脓素合成);同时将这些突变株分别接种于 L-Broth 液体培养基 ($10\text{g}/\text{L}$ 胰蛋白胨, $5\text{g}/\text{L}$ 酵母粉, $5\text{g}/\text{L}$ NaCl) 中, 37°C 200r/min 震荡培养 18h 后加入等体积的氯仿抽提(这时绿脓素溶于氯仿层,呈现蓝色)观察上下两相的颜色。

1.6 绿脓素合成曲线的测定

参照 Essar 的方法^[9],进行了改进:取单菌落接种于 5 mL L-Broth,过夜培养,次日按 1:100 接种至 200 mL L-broth 培养基中,200 r/min, 37°C 震荡培养,每 2.5h 取出 10 mL,10000 r/min 离心 5min,上清分别用等体积氯仿和 1.5 mL 的 0.2mol/L 的盐酸抽提,测上层水相 OD_{520} 吸光度。

1.7 基因克隆、PCR 检测及测序

用限制性内切酶 *Bam* H I 或 *Kpn* I (在转座子 DNA 上没有切点)酶切质粒 pUC19 及色素突变株基因组 DNA, pUC19 的酶切产物用小肠碱性磷酸酶去磷酸化,在 T4 DNA 连接酶作用下,将酶切后的突变子基因组 DNA 与载体质粒 pUC19 进行连接。取 $2\mu\text{L}$ 连接产物电转化入 *E. coli* DH5 α 中。用双抗培养基 ($30\mu\text{g}/\text{mL}$ Km, $100\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp) 筛选重组子。将重组子提取质粒进行酶切和电泳检测,同时用转座子 DNA 检测引物 mu1 和 mu2 鉴定重组子,采用该对

引物会扩增出 Mu 转座子 DNA 上 709bp 的一段序列。经过鉴定的重组子以转座子两端的反向序列做引物,测定转座子插入位点侧翼的核苷酸序列。测序引物为 primer1 和 primer2。

2 结果

2.1 Mu 转座复合物电转化条件的优化

通过实验摸索,确定在铜绿假单胞菌中, Mu 转座复合物的最佳电转化条件是在细胞生长的对数中期 (OD_{540} 为 0.6 左右)时,制备感受态细胞,电脉冲场强为 $13\text{KV}/\text{cm}^{[8]}$ 。

2.2 色素变化菌株的检出

从 463 株 Mu 转座复合物转化 PA2002068 得到的转化子中,共筛选出 8 株颜色明显变化的突变子,按照颜色的不同有 4 种主要突变表型。野生型产生少量绿脓素,绿脓素溶于氯仿,呈现蓝色;突变株 A20 与 G44 产生水溶性红色素,无绿脓素;F83 与 K145 产生水溶性褐色色素和少量绿脓素;B84 产生大量绿脓素;C124, I136 和 K50 绿脓素合成减少。结果见图版 II - A 和图版 II - B。

2.3 绿脓素合成曲线

绿脓素在酸性溶液中会变成粉到深红色,按材料与方法 1.6 两步抽提后测得的 OD_{520} 值乘以 $12.8\text{mg}/\text{mL}$ 约等于绿脓素的浓度。结果发现,与野生型相比,突变子 B84 绿脓素的合成大幅增加, I136 减少了一半, A20 不合成绿脓素,而 K50 比较特殊,在早期不合成绿脓素,24h 左右开始大量合成绿脓素(图版 II - C)。

2.4 Mu 转座子插入位置两侧序列的克隆

酶切分析表明,所有的双抗重组子中,质粒由约 2.7kb 的 pUC19 载体和一至数条,不同大小的外源片段组成。

由于重组子克隆的片段带有 Mu 转座子 DNA,可以用转座子 DNA 检测引物 mu1 和 mu2 鉴定重组子,该对引物扩增的目的片段长 709bp。结果 8 个重组子均扩增出 700bp 左右右片段,而阴性对照宿主菌 DH5 α pUC19 转化子没有扩出带。

2.5 Mu 转座子插入位点侧翼的核苷酸序列分析

对 8 个色素突变子的转座子插入位点两侧的基因组序列进行测序研究,每个突变子做了两个测序反应。每个反应测出约 600bp 的核苷酸序列。测序结果在铜绿假单胞菌的基因组数据库 (www.pseudomonas.com) 或 GenBank 的 BLAST 中进行序列比对,结果表明,所测序的 PA68 的序列与

P. aeruginosa 标准株 PAO1 基因组的相应序列一致性(identities)达 97% ~ 99%。

由于 Mu 转座酶切割靶 DNA 时,切割点在双链

DNA 分子上彼此相差 5 个核苷酸,这样就导致了转座子两侧 5 个核苷酸的重复,即靶位点的复制,成为 Mu 转座子插入位点的标记(表 1)。

表 1 转座子整合位置及靶位点的复制

Table 1 Transposon integration sites and target site duplications

Mutant	Sequence ^a	Transposon orientation ^b	Genetic location ^c		
			Gene	Coordinates	Section
A20 : :Mu	cgcgacggacACGGC (Km-Mu)ACGGCaagccccagg	+	<i>phzS</i>	7332 – 7336	399
G44 : :Mu	aatacgaagaACGGC (Km-Mu)ACGGCggcggccgac	-	<i>phzS</i>	7939 – 7943	399
I136 : :Mu	ggcctccagCTGGG (Km-Mu)CTGGGcctgaaggcc	+	<i>sucC</i>	693 – 697	148
C124 : :Mu	cgtagacacc CCCGA (Km-Mu)CCCGAagaggccgca	+	<i>sucC</i>	276 – 280	148
F83 : :Mu	cggccttgcGCCGG (Km-Mu)GCCGGcgcggtggc	-	<i>hmgA</i>	5983 – 5987	188
K145 : :Mu	gcagtccagCGGGT (Km-Mu)CGGGTccagcgcag	-	<i>hmgA</i>	6052 – 6056	188
B84 : :Mu	atgcccccaTCGGC (Km-Mu)TCGGCcatgatggtcg	-	<i>ptsP</i>	9868 – 9872	32
K50 : :Mu	agagcgcgcCGCGC (Km-Mu)CGCGCtgcgcgct	+	<i>phzF1</i>	5631 – 5635	399

^a(Km-Mu)means mini-Mu transposon with kanamycin resistance gene. Target site duplications are in boldface capital letters.

^bCompared to the genomic sequences shown, the transcription from the transposon proceeds from left to right(+)or from right to left(-).

^cGenetic locations were determined by comparison to the PAO1 complete genome.

在 8 个突变子中,转座子分别插入到 *hmgA*、*phzS*、*sucC*、*ptsP*、*phzF* 的基因内部(表 1)其中,有些突变发生于同一个基因的不同位置, F83 和 K145 转座失活的是 *hmgA* 基因, A20 和 G44 转座重组点位于 *phzS* 基因上,而 I136 和 C124 的是 *sucC* 基因,它们表型两两相似,突变子 B84 位于基因 *ptsP* 上, K50

的插入点在酚嗪合成操纵子的第六个基因 *phzF* 上,不过由于铜绿假单胞菌基因组含有两个同源性极高的酚嗪合成操纵子(图 1),需要再按照 *phzF* 下游的序列设计引物进一步测序到操纵子以外,通过进一步定位,发现与 K50 相关的是操纵子 *phzA1B1C1D1E1F1G1*。

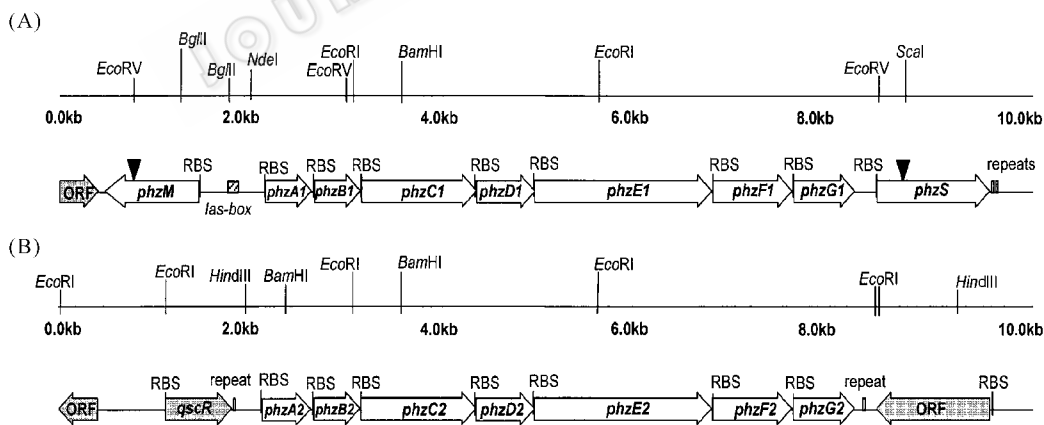


图 1 与绿脓素合成有关的结构基因

Fig. 1 Genes involved in biosynthesis of pyocyanin

A : Operon *phzA1B1C1D1E1F1G1* ; B : Operon *phzA2B2C2D2E2F2G2* ; RBS : Ribosome binding site.

3 讨论

hmgA 基因编码尿黑酸 1,2-双加氧酶(表 2),该酶参与酪氨酸的分解代谢, F83 和 K145 突变子分泌的褐色素很可能是尿黑酸在培养中积累和随后的氧

化、多聚化,最终生成一种脓-黑色素(pyo-melanin)的结果^[10]。

另外 6 个突变子绿脓素的合成均产生显著变化,涉及 4 个基因。*phzF1* 基因位于酚嗪生物合成操纵子上, *phzS* 基因位于这个操纵子的下游(图 1)。

表 2 突变基因及其所编码的蛋白质

Table 2 Genes inactivated and putative proteins

Mutant	Gene	Protein name confidence	Amino acids	Product
A20 : :Mu	<i>phzS</i>	1	402	Flavin-containing monooxygenase
G44 : :Mu	<i>phzS</i>	1	402	Flavin-containing monooxygenase
I136 : :Mu	<i>sucC</i>	2	388	Succinyl-CoA synthetase beta chain
C124 : :Mu	<i>sucC</i>	2	388	Succinyl-CoA synthetase beta chain
F83 : :Mu	<i>hmgA</i>	2	432	Homogentisate 1,2-dioxygenase
K145 : :Mu	<i>hmgA</i>	2	432	Homogentisate 1,2-dioxygenase
B84 : :Mu	<i>ptsP</i>	2	759	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase
K50 : :Mu	<i>phzF1</i>	1	278	Probable phenazine biosynthesis protein

Class 1 : Function experimentally demonstrated in *P. aeruginosa* ; Class 2 : Function of highly similar gene experimentally demonstrated in another organism (and gene context consistent in terms of pathways its involved in , if known).

绿脓素,由色氨酸合成的重要中间产物分枝酸(chorismic acid)开始,7个基因组成的操纵子控制合成中间产物酚嗪-1-羧酸^[11],再由酚嗪-1-羧酸经过甲基化和脱羧(分别由*phzM*和*phzS*基因控制)合成^[12]。突变子A20和G44在*phzS*基因失活后失去了合成绿脓素的能力,有报道由于*phzS*基因被破坏可能积累一种红色的中间产物5-甲基酚嗪-1-羧酸甜菜碱^[12],将培养基染成醒目的红色,这与A20和G44的表型一致。合成酚嗪-1-羧酸的操纵子在绿脓杆菌基因组内有两个,分别命名为*phzA1B1C1D1E1F1G1*和*phzA2B2C2D2E2F2G2*,两个操纵子序列98%同源,表达产物功能相同,在基因组上的位置相隔很远,上下游基因和转录调控元件不同(图1)。在*phzA1B1C1D1E1F1G1*操纵子的启动子区域存在1个*las-box*,这是群体感应(Quorum sensing)系统的顺式调控元件。群体感应是一种细菌细胞与细胞间的通讯系统,即细菌通过可扩散的小分子信号分子感知细胞群体的密度,从而引起一些特定基因在细菌群体中的协调表达。在绿脓杆菌中有多个群体感应系统,其中最主要是两个级联的系统*lasR-lasI*和*rhlR-rhlI*,*lasR-lasI*系统占主导地位^[13]。基因组分析表明,*qscR*基因位于*phzA2B2C2D2E2F2G2*操纵子的上游(没有*las-box*元件),该基因产物通过抑制*lasR-lasI*系统从而负调控许多群体感应控制基因的表达^[14]。K50突变子绿脓素合成曲线显示培养22.5h之前没有绿脓素的合成,而之后开始产生较多的绿脓素,推测临界细胞密度所触发的开启绿脓素合成的*lasR-lasI*系统和*rhlR-rhlI*系统对*phzA2B2C2D2E2F2G2*操纵子影响小或没有影响,该操纵子在一般情况下相对不活跃,在特定条件下(如生长阶段是稳定期后期等)表达,

具体调控机制则有待研究。

基因*ptsP*和*sucC*与绿脓素代谢的关系没有文献报道,*sucC*产物琥珀酰辅酶A合成酶参与三羧酸循环,可能对绿脓素的合成在底物和能量方面产生影响。*ptsP*基因的产物是磷酸烯醇丙酮酸-蛋白磷酸转移酶EI^{Nr},与蛋白NPr和IIA^{Nr}组成一个烯醇式丙酮酸磷酸转移酶系统PTS^{Nr}。在细胞质中,磷酸化的EI^{Nr}将磷酸基团转移到NPr蛋白,后者再转移到IIA^{Nr}^[15],IIA^{Nr}是一种重要的转录调节因子,实验表明在恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)中至少有384种多肽的表达受IIA^{Nr}的调控^[16]。另外,King等^[17]报道在慢生大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)中EI^{Nr}与天门冬氨酸激酶共同调节寡肽的跨膜转运,可能有些被转运物质就是群体感应系统的信号分子。推测*ptsP*基因可能通过磷酸转移酶系统PTS^{Nr}或(和)群体感应系统直接或间接地调控绿脓素的代谢,由于关于*ptsP*基因对细菌基因表达调控的报道很少,还需要更多的研究来证明*ptsP*基因复杂的功能。本实验室拟通过遗传互补,基因失活,基因表达分析等技术对*ptsP*和*sucC*控制绿脓素代谢的具体机制进行深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Byng G S, Eustice D C, Jensen R A. Biosynthesis of phenazine pigments in mutant and wild-type cultures of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 1979, **138** (3): 846 - 852.
- [2] Lynne R U, Roderick A L, Geary I, et al. Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. *The Journal of Immunology*, 2002, **168**: 1861 - 1868.
- [3] Bradley E B, Railsback M A, Cox C D. The *Pseudomonas aeruginosa* secretory product pyocyanin inactivates α_1 protease inhibitor: implications for the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Infect Immune*, 1999, **67** (3): 1207 - 1212.

- [4] Wilson R , Pitt T , Taylor G , *et al.* Pyocyanin and 1-hydroxyphenazine produced by *Pseudomonas aeruginosa* inhibit the beating of human respiratory cilia in vitro. *J Clin Invest* , 1987 , **79** (1) : 221 – 229 .
- [5] Kerr J R , Taylor G W , Rutman A , *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *J Clin Pathol* , 1999 , **52** : 385 – 387 .
- [6] Li Z , Wang X , Guo Y , *et al.* Inhibitory action of metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* against gram-negative bacteria. *Kansenshogaku Zasshi* , 1995 , **69** (8) : 924 – 927 .
- [7] Lamberg A , Nieminen S , Qiao MQ , *et al.* Efficient insertion mutagenesis strategy for bacterial genomes involving electroporation of in vitro-assembled DNA transposition complexes of bacteriophage Mu. *Appl Environ Microbiol* , 2002 , **68** : 705 – 712 .
- [8] 单志英 , 徐海津 , 施兴启 , 等 . 铜绿假单胞菌运动相关基因的研究 . 微生物学报 , 2004 , **44** (3) : 49 – 54 .
- [9] Essar D W , Eberly L , Hadero A , *et al.* Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa* : interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol* , 1990 , **172** (2) : 884 – 900 .
- [10] Milcamps A , Buijn F J . Identification of a novel nutrient – deprivation-induced *Sinorhizobium meliloti* gene (*hmgA*) involved in the degradation of tyrosine. *Microbiology* , 1999 , **145** : 935 – 947 .
- [11] Mavrodi D V , Ksenzenko V N , Bonsall R F , *et al.* A Seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *J Bacteriol* , 1998 , **180** (9) : 2541 – 2548 .
- [12] Mavrodi D V , Bonsall R F , Delaney S M , *et al.* Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* , 2001 , **183** (21) : 6454 – 6465 .
- [13] Reimmann C , Ginet N , Michel L , *et al.* Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* , 2002 , **148** : 923 – 932 .
- [14] Chugani S A , Whiteley M , Lee K M , *et al.* QscR , a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* . *Proc Natl Acad Sci* , 2001 , **98** : 2752 – 2757 .
- [15] Reizer R R J , Paulsen I , Saier M H . Enzyme I^{Ntr} from *Escherichia coli* . A novel enzyme of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system exhibiting strict specificity for its phosphoryl acceptor , NPR. *J Biol Chem* , 1999 , **274** (37) : 26185 – 26191 .
- [16] Cases I , Lopez J A , Albar J P , *et al.* Evidence of multiple regulatory functions for the ptsN (HANtr) protein of *Pseudomonas putida* . *J Bacteriol* , 2001 , **183** (3) : 1032 – 1037 .
- [17] King N D , Brian M R O . Evidence for direct interaction between enzyme I^{Ntr} and aspartokinase to regulate bacterial oligopeptide transport. *J Biol Chem* , 2001 , **276** (24) : 21311 – 21316 .

Study on genes involved in biosynthesis and regulation of pigments in *Pseudomonas aeruginosa*

XU Hai-jin SHAN Zhi-ying LIN Wei-li GAO Cai-chang QIAO Ming-qiang*
(College of Life Sciences , Nankai University , Tianjin 300071 , China)

Abstract : Mu transposition recombination technique was firstly used as a mutagenesis tool to explore a cluster of genes involved in biosynthesis and regulation of pigments in *P. aeruginosa* . Eight pigment mutants were screened and identified. Gene cloning and sequencing of the region flanking the insertion revealed that the genes *hmgA* , *ptsP* , *sucC* , *phzS* , *phzF1* were disrupted with mini-Mu respectively. Among them , gene *hmgA* is involved in the degradation of tyrosine , others affect the metabolism of pyocyanin which is the most important pigment of *P. aeruginosa* . Both gene *phzS* and gene *phzF1* have been experimentally demonstrated to participate in pyocyanin synthesis. Gene *ptsP* belongs to a phosphotransferase system and gene *sucC* encodes succinyl-CoA synthetase beta chain. This is the first report that gene *ptsP* and *sucC* may be involved in the regulation of the biosynthesis of pyocyanin.

Key words : *P. aeruginosa* , Pyocyanin , Mu transposition technique

Foundation item : National Natural Science Foundation of China (30270075)

* Corresponding author. Tel : 86- 22-23503340 ; E-mail : mingqiangqiao@yahoo.com.cn

Other authors : XIA Hui-ming , XU Shu-wa , ZHANG Xiu-ming , BAI Yan-ling

Received date : 06-23-2004