

渗漏型 UGA 终止密码在植物病毒相关基因组中的作用

魏军亚¹ 杨 恭 邱并生* 张继澍**

(中国科学院微生物研究所分子病毒与生物工程开放实验室 北京 100080)

摘 要 弱毒疫苗 ToMV-K 的复制酶基因在 2670-2672 核苷酸处发生 UGA 突变,研究表明该突变是导致病毒弱化的主要原因。通过 ToMV-K 复制酶的突变区与其它具有 UGA 渗漏终止密码的植物 ssRNA 病毒基因组通读结构区的分析和比较,发现 ToMV-K 和其它植物病毒的 UGA 渗漏与通读相关基因的共同特征:CGG 基元,通读区的 α -螺旋结构和一些疏水氨基酸残基使 UGA 的通读成为可能。这些渗漏与通读的特征可能才是 ToMV-K 致弱的根本原因。可以根据这一模式,探讨对其它植物 ssRNA 的病毒如 PVX、PVY、CMV 等的基因组改造和致弱研究。

关键词 ToMV-K 通读 植物病毒

中图分类号 S432.4⁺1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)03-0259-05

植物病毒是农作物的主要病害之一,许多重要病毒,如水稻矮缩病毒(RDV),马铃薯 X 病毒(PVX),马铃薯 Y 病毒(PVY),马铃薯卷叶病毒(PLRV),烟草花叶病毒(TMV),黄瓜花叶病毒(CMV)和芜菁花叶病毒(TuMV)等病毒已遍及我国主要产区,对水稻、小麦、玉米、油菜、马铃薯、大豆和其它蔬菜等作物造成不同程度的危害,因此,病毒病对农业生产构成了严重威胁。

番茄花叶病毒弱毒疫苗 ToMV-K 是将番茄花叶病毒强株(L-TMV)用亚硝酸处理后,分离筛选而得到的对 TMV(包括番茄花叶病毒)感染有明显保护作用的弱毒株,具有稳定的生物学特性和遗传性。我们对 ToMV-K 致弱的分子机理进行了研究^[1-4],通过反转录、PCR、克隆、体外转录和对烟草感染而获得了 ToMV-K 侵染性 cDNA 克隆,测定和分析了其基因组核苷酸全序列,与番茄花叶病毒强株相比复制酶和运动蛋白分别发生了乳石(UGA)和赭石(UAA)突变,在普通株 TMV-Cv 和弱毒株 ToMV-K 之间用基因交换方法构建了 ToMV-K 的重组病毒,体外转录和侵染性分析表明 ToMV-K 突变的复制酶和运动蛋白对该病毒的致弱分别起主要和次要作用;用点突变的方法研究了普通株的 3 个突变体对烟草的侵染

性,结果表明复制酶和运动蛋白的乳石突变和赭石突变协同致弱 TMV-Cv 对烟草的侵染症状。ToMV-K 的这种突变方式是目前在植物病毒弱毒株系中发现的特有现象。这种致弱的突变方式可用于与 ToMV-K 有相似基因组形式的其他植物病毒,特别是 ssRNA 病毒。这里我们对已知具有乳石(UGA)渗漏终止密码子通读的植物 ssRNA 病毒基因组进行了结构和功能上的比较分析,并对分析的结果做一报道。

1 材料和方法

1.1 材料

从 GenBank database 中找出具有 UGA 渗漏终止密码子的植物 ssRNA 病毒基因组序列,如表 1 所示。

1.2 方法

利用 DNA Star 软件中的 EditSeq、Protean、MegAlign 等程序进行(1)植物病毒 ssRNA 基因组核苷酸组成和结构基元的比较分析。(2)植物病毒 ssRNA 基因组蛋白质一级结构和二级结构分析比较。(3)其它无 UGA 渗漏终止密码子但为 ssRNA 的植物病毒(如 CMV、PVY 等)的相关基因组的结构与功能分析。

收稿日期 2000-11-10,修回日期 2001-02-12。

基金项目 国家自然科学基金(39770034)资助。

* 通讯作者。Tel 86-10-62554398;Fax 86-10-62554247;E-mail zqiubs@sun.im.ac.cn

** 西北农林科技大学基础科学系 陕西杨凌 712100。

表 1 具有 UGA 渗漏终止密码子的植物 ssRNA 病毒

Table 1 All ssRNA plant viruses with the leaky UGA stop codon

GenBank No.	Virus and component	Genes
AJ012005	CWMV RNA1	<i>Furovirus</i>
AJ012006	CWMV RNA2	<i>Furovirus</i>
AJ132576	EWMV RNA1	<i>Furovirus</i>
AJ132577	EWMV RNA2	<i>Furovirus</i>
L07937	SBWMV RNA1	<i>Furovirus</i>
L07938	SBWMV RNA2	<i>Furovirus</i>
AJ132578	OCSV RNA1	<i>Furovirus</i>
AJ132579	OCSV RNA2	<i>Furovirus</i>
D00155	TRV RNA1	<i>Tobrovirus</i>
D86636	BBNV RNA1	<i>Furovirus</i>
L04573	PEMV-1 RNA	<i>Enamovirus</i>
L23972	PRV RNA1	<i>Tobrovirus</i>
X14006	PEBV RNA1	<i>Tobrovirus</i>
X14736	MCMV RNA	<i>Machlomovirus</i>
X78602	PCV RNA1	<i>Furovirus</i>
X99149	IPCV RNA	<i>Furovirus</i>
AF155507	ToMV-K RNA	<i>Tobamovirus</i>

CWMV :Chinese wheat mosaic virus ;EWMV :European wheat mosaic virus ;OCSV :oat golden stripe virus ;TRV :tobacco rattle virus ;BBNV :broad bean necrosis virus ;PEMV :pea enation mosaic virus ;ToMV-K :attenuated tomato mosaic virus ;PRV :pepper ringspot virus ;SBWMV :soil-borne wheat mosaic virus ;PEBV :pea early browning virus ;MCMV :maize chlorotic mottle virus ;PCV :peanut clump virus ;IPCV :Indian peanut clump virus .

2 结果与分析

2.1 具有 UGA(opal) 渗漏终止密码子植物病毒 ss-RNA 基因组组成及其编码蛋白的功能

17 种具有 UGA(opal) 渗漏终止密码子的植物病毒中 ,EWMV、OCSV、CWMV、PCV、IPCV、BBNV 均属于真菌传杆状病毒。其中 ,EWMV、OCSV、CWMV、SBWMV 这 4 种病毒具有相似的基因组结构 :RNA1 有 3 个主要的 ORFs ,ORF1 编码 150kD 的蛋白 ,这个终止密码子可通读产生 209kD 的蛋白 ,共同行使病毒的复制功能。ORF3 编码运动蛋白。RNA2 也有 3 个主要的 ORFs ,ORF1 编码 19kD 的病毒外壳蛋白 (CP) ,UGA 终止密码子可通读产生 84kD 的蛋白 ,ORF3 为一富含 Cys 的较小的蛋白。PCV RNA1 的 5' 端 ORF 编码 131kD 多肽 ,参与病毒的复制。它的 UGA 终止密码子可通读产生一个 191kD 的多肽。ORF3 为 15kD 富含 Cys 的较小的蛋白^[5]。IPCV RNA1 的 3 个 ORF 分别编码 130、60 和 14kD 的多肽。BBNV RNA 的 ORF1 编码 150kD 多肽 ,ORF2 编码 209kD 的多肽^[6]。

TRV、PRV、PEBV 属于烟草脆裂病毒属。其中

TRV RNA1 的 ORF1 为 134kD ,UGA 终止密码子可通读产生 194kD 蛋白 ,与病毒复制有关^[7]。ORF3 为 29kD 多肽。ORF4 为 16kD 蛋白。PRV RNA1 的基因组与 TRV 较为相似。PEBV RNA1 的 4 个 ORF 分别编码 141、201、30、12kD 蛋白^[8]。

MCMV 属于玉米褪绿斑驳病毒属 ,它的 4 个 ORF 分别编码 31.6、50.9、25.1kD 的蛋白。其中 9kD 蛋白的 UGA 终止密码子可部分通读产生 32.7kD 的蛋白^[9]。PEMV 属于耳秃花叶病毒属 ,ORF1 编码 34kD 蛋白 ,ORF2 编码 84kD 蛋白 ,与病毒翻译产物的转录后过程有关。ORF3 编码 67kD 蛋白 ,ORF4 编码病毒 CP。

ToMV-K 属于烟草花叶病毒属 ,它的 4 个功能性 ORF 分别编码 98.5/126/183kD 的复制酶 ,27kD 的运动蛋白和 17.6kD 的病毒 CP。98.5kD 蛋白的 UGA 终止密码子可部分通读产生 126kD 的蛋白 ,行使病毒的复制功能。

SBWMV OCSV EWMV CWMV:

RNA1 M 150K H * RT 209K MP

SBWMV OCSV EWMV CWMV:

RNA2 19K * RT 84K C-R

PCV RNA1 M 131K H * RT 191K C-R

BBNV RNA1 M 150K H * RT 209K

PEMV RNA1 H 130K RdRp CP * RT

TRV RNA1 M 134K H * RT 194K MP

MCMV 31.6K 111K 9K * RT 32.7K CP

PEBV RNA M 141K H * RT 201K 30K 12K

ToMV-K RNA M 98.5K H * RT 126K 183K 27K 17.6K

图 1 具 UGA 渗漏终止密码子植物病毒 ssRNA 基因组结构

Fig.1 Genomic structures of ssRNA plant viruses with leaky UGA

M, methyltransferase ;H, NTP-helicase ;RT, read-through protein ;C-R, Cys rich protein ;MP, movement protein ; CP, coat protein ;* ,leaky UGA location

对 17 种具有 UGA 渗漏终止密码子植物病毒 ssRNA 基因组全序列分析表明 :在植物病毒复制酶蛋白的 N 端有一甲基转移酶基元 ,具戴帽酶活性^[10]。C 末端有一 NTP 解旋酶基元 [GXXGXGKX/T] ,与病毒 RNA 复制和翻译过程中双链的解开有关^[11]。在复制酶通读区 C 端有一 'GDD' 共同序列 ,它是所有 ss-RNA 病毒 RdRp 基元特有序列^[12]。这说明所编码的蛋白质与植物 RNA 病毒的非结构蛋白具有极大的

同源性(如 RNA 复制酶的 'GDD' 共同序列及 RNA 解螺旋酶的 NTP-结合模式 'GXXGXGKX/T')^[13]。

从 ToMV-K98.5/126 kD 复制酶的 UGA 渗漏终止密码子与其它 16 种植物病毒 ssRNA 基因组 UGA 渗漏终止密码子上下文(表 2)可以看出,在植物病毒 ssRNA 基因组 UGA(opal 终止密码子后大部分有一 CGG 基元,推测可能与 UGA 渗漏终止密码子的通读有关。

2.2 ToMV-K 与其它具有 UGA 渗漏终止密码子植物病毒 ssRNA 的 UGA 密码子周围氨基酸序列的比较分析

在植物病毒中大多数渗漏终止密码子为 UAG (amber),如烟草花叶病毒复制酶 126kD 编码基因的翻译终止子 UAG,早已被证实可通读为酪氨酸 (Tyr)。有实验证明^[14]在正常烟草组织细胞浆及叶绿体中发现一定数量的无义抑制 tRNA^{Tyr},通过反密码子 CΨA 识别终止密码子 UAG 及其 C 末端的基本

序列 CAAUUA 而获得通读,产生 183kD 的一个较大的蛋白。植物病毒 ssRNA 中具有 UGA 渗漏终止密码子抑制现象也较多,通常通读产生编码复制酶蛋白,我们在对 17 种植物病毒 RNA 基因组的分析中发现,UGA 终止密码子的抑制现象不仅存在于植物病毒复制酶基因中,而且在植物病毒的外壳蛋白基因中也存在这种现象。在这 17 种植物病毒中,有 5 个植物病毒 RNA 的 UGA 终止密码子通读产生 CP 蛋白。MCMV 的 P9 蛋白由内部 AUG 起始密码子起始翻译,这几乎在所有单组分植物 RNA 病毒中都是极为少见的。Karin^[15]曾证明带有反密码子的 C_mCA 或 GCA 的无义抑制 tRNA^{Trp} 或 tRNA^{Cys} 可以通读 UGA 为色氨酸 (Trp) 或半胱氨酸 (Cys),从 ToMV-K 与其它具有 UGA 渗漏终止密码子植物 ssRNA 病毒的通读区上下文(表 2)分析可见,其通读的氨基酸序列结构为 [EXXX * RXXS],其中 UGA 终止密码子的 5' 端多以碱性氨基酸为主,如 K S 等。

表 2 ToMV-K 与其它具有 UGA 渗漏终止密码子植物 ssRNA 病毒的通读区上下文

Table 2 The contexts of leaky UGAs in ToMV-K and other ssRNA plant viruses

GenBank No.	Virus and component	Gene	Context of the read-through region								
AJ012005	CWMV RNA1	replicase	E	F	D	K	*	R	F	G	S
			gaa	uuc	gac	aaa	UGA	cgg	uuu	ggg	ucg
AJ012006	CWMV RNA2	CP	E	G	S	S	*	R	D	G	V
			gaa	ggu	ucg	agu	UGA	cgg	gau	ggc	guc
AJ132576	EWMV RNA1	replicase	E	L	A	K	*	R	F	G	S
			gag	uug	gcg	aaa	UGA	cgg	uuu	ggg	ucg
AJ132577	EWMV RNA2	CP	E	G	T	S	*	R	D	G	V
			gaa	ggu	acc	agu	UGA	cgg	gac	ggc	guc
AJ132578	OGSV RNA1	replicase	E	N	Q	K	*	R	F	G	S
			gag	aaU	cag	aaa	UGA	cgg	uuu	ggg	ucg
AJ132579	OGSV RNA2	CP	E	G	S	A	*	R	G	G	V
			gaa	ggu	agu	gcc	UGA	cgg	ggc	ggc	guc
D00155	TRV RNA1	replicase	E	T	V	L	*	R	F	R	S
			gag	acc	guc	uua	UGA	cgg	uuu	cgg	ucu
D86636	BBNV RNA1	replicase	E	G	P	K	*	R	C	G	S
			gaa	ggu	ccu	aaa	UGA	cgg	ugu	ggg	ucg
L04573	PEMV RNA1	CP	N	A	S	L	*	G	D	D	A
			aaU	gcc	ucc	cuc	UGA	ggg	gac	gac	gcu
L07937	SBWMV RNA1	replicase	E	L	T	K	*	R	F	G	S
			gag	cuu	acu	aaa	UGA	cgg	uuu	ggg	ucg
L07938	SBWMV RNA2	CP	E	G	S	S	*	R	D	G	V
			gaa	ggu	ucg	agu	UGA	cgg	gac	ggc	ugc
L23972	PRV RNA1	replicase	D	A	A	L	*	R	C	R	S
			gau	gcu	gcc	uua	UGA	cgg	ugu	cgg	ucg
X14006	PEBV RNA1	replicase	D	A	M	K	*	R	C	R	S
			gau	gcu	auc	aaa	UGA	cgg	ugu	cgg	uca
X14736	MCMV RNA	P9	F	N	F	N	*	A	G	V	C
			uuc	aaU	uuc	aac	UGA	gcu	gga	gug	ugu
X78602	PCV RNA1	replicase	E	Q	T	K	*	R	F	G	S
			gaa	cag	acc	aaa	UGA	cgg	uuu	ggg	uca
X99149	IPCV RNA1	replicase	E	Q	T	K	*	R	F	G	S
			gag	cag	acc	aaa	UGA	cgg	uuu	ggg	ucg
AF155507	ToMV-K RNA	replicase	E	M	I	R	*	R	A	N	A
			gag	aug	auc	aga	UGA	aga	guc	aaU	gcg

2.3 具有 UGA(opal) 渗漏终止密码子植物病毒 ssRNA 基因组通读区蛋白质二级结构分析

用 DNA Star 的蛋白质分析软件对 ToMV-K 与其他具有 UGA(opal) 渗漏终止密码子植物病毒 ssRNA 基因组通读区进行蛋白质二级结构的分析(按 Garnier-Robson 法)。结果表明这 17 种植物病毒 ssRNA 基因组的通读区蛋白质的二级结构以 α -螺旋为主,其次为 β -折叠和 β -转角。UGA 终止密码子所处位置大多在 α -螺旋的疏水区域,仅 MCMV 和 PEMV 的 UGA 终止密码子处于 β -转角的疏水区域。而 MCMV 和 PEMV 的通读区蛋白二级结构中 α -螺旋很少,以 β -折叠和 β -转角为主。对所编码蛋白通读区的氨基酸残基分析表明其中的一些疏水氨基酸对于蛋白质二级结构的形成有一定的作用,它使得通读成为可能。

2.4 一些无 UGA 渗漏终止密码子但为 ssRNA 的植物病毒相关基因组结构和功能分析

CMV、PVY、BYDV、PLRV、TuMV 等均为常见的植物 ssRNA 病毒,它们的基因组中没有 UGA 渗漏终止密码子。其中,CMV RNA 的 1a 蛋白与病毒 RNA 的复制有关。PVY 的基因组只有一个 ORF,翻译后形成一个多聚蛋白,通过自身编码的蛋白酶加工成成熟的蛋白来行使各种功能,它的 N1b 编码复制酶基因。BYDV 基因组有六个 ORF,其中 ORF1 和 ORF2 通过移码作用编码病毒的 RdRp,参与病毒的复制。PLRV 基因组的 5 个 ORFs 中,ORF2 编码 118kD 的复制酶蛋白基因。TuMV 为单链 RNA 病毒,198kD 的蛋白行使病毒的复制功能。通过对这些植物病毒的基因组的结构和编码蛋白功能的分析表明:在病毒的复制酶基因中同样存在 RNA 解旋酶的 NTP 结合模式和 'GDD' 共同序列,这和 ToMV-K 与其它具有 UGA 渗漏终止密码子植物病毒 ssRNA 基因组的序列分析结果一致。ToMV-K 复制酶的乳石突变致弱植物对病毒的感染方式或许可以用于这些病毒的基因组的改造上。

3 讨 论

植物抗病性机制的研究一直是植物病理学和植物抗病育种中的热点问题。植物病毒弱毒疫苗在防治植物病毒病害中发挥着重要作用,能够在植物体内生存和繁殖而不危害植物的正常生长、开花和种子生产,对攻击病毒侵染植物具有防御作用,这种共生和保护宿主现象是大多数植物天然弱病毒所具有共同特征,具有普遍性^[16,17]。烟草花叶病毒弱毒疫

苗 ToMV-K 复制酶编码基因的乳石突变对 ToMV-K 的致弱起主要作用,这种突变是目前在植物病毒弱毒株系中发现的特有现象。

ToMV-K 作为一种具有稳定的生物学特性和遗传性的植物病毒弱毒株,它能够抵抗强烟草花叶病毒的侵染,而对植株本身的正常生长没有影响。由于它与其它具有 UGA(opal) 渗漏终止密码子的植物病毒 ssRNA 基因组在通读区结构与功能上所具有的一些共同特征,我们可以依据 ToMV-K 复制酶基因 UGA 无义突变致弱植物病毒的方式,探讨 PVX、PVY、CMV、BYDV、PLRV、TuMV 等基因组的改造和致弱研究,通过对 PVX、PVY、CMV、BYDV、PLRV、TuMV 等的复制酶基因组分进行定点突变,改造成弱化病毒后,用于防治相应的病毒病。这对于植物病毒病的全面防治将起着重要的意义。

REFERENCES(参考文献)

- [1] YANG G(杨恭), QIU B S(邱井生). Cloning and Infectivity Analysis of the cDNAs of tobacco mosaic virus and its attenuated virus genomes, *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2000, **16** (2): 207 ~ 210
- [2] YANG G(杨恭), LIU X G(刘相国), QIU B S(邱井生). Complete nucleotide sequences and genome structures of two Chinese tobacco mosaic virus isolates deduced from full-length infectious cDNA clones, *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2000, **16** (4): 437 ~ 443
- [3] YANG G(杨恭), LIU X G(刘相国), QIU B S(邱井生). Recombinant constructions and infectivity analysis of tobacco mosaic virus and attenuated tomato mosaic virus N14 genomes, *Chinese Science Bulletin*(科学通报), 2000, **45** (7): 735 ~ 739
- [4] YANG G(杨恭), WEI J Y(魏军亚), LIU G Q(刘广超) et al. Effect of the mutations of replicase and movement protein genes on attenuation of tobacco mosaic virus, *Chinese Science*(中国科学 X C), (In Press)
- [5] Herzog E, Guilley H, Manohar S K et al. Complete nucleotide sequence of peanut clump virus RNA1 and relationships with other fungus-transmitted rod-shaped viruses, *J Gen Virol*, 1994, **75**: 3147 ~ 3155
- [6] Lu X, Yamamoto S, Tanaka M et al. The genome organization of the broad bean necrosis virus (BBNV), *Arch Virol*, 1998, **143**: 1335 ~ 1348
- [7] Hamilton W D, Boccara M, Robinson D J et al. The complete nucleotide sequence of tobacco rattle virus RNA-1, *J Gen Virol*, 1987, **68**: 2563 ~ 2575
- [8] Macfarlane S A, Taylor S C, King D I et al. Pea early browning virus RNA1 encodes four polypeptides including a putative zinc-finger protein, *Nucleic Acids Res*, 1989, **17**: 2245 ~ 2260
- [9] Mutter R C, Scheets K, Panganiban L C. The complete nucleotide sequence of the genome of the tobacco etch virus, *Nucleic Acid Res*, 1989, **17**: 2245 ~ 2260

- 1989 ,**17** :3163 ~ 3177
- [10] Corbalenya A E ,Koonin E V ,Donchenko A P *et al.* A conserved NTP-motif putative helicases ,*Nature* ,1988 ,**333** :22
- [11] Corbalenya A E ,Koonin E V ,Donchenko A P *et al.* A novel super-family of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination .*FEBS Lett* ,1988 ,**235** :16 ~ 24
- [12] Koonin E V ,Dolja V V. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses :implications of comparative analysis of amino acid sequences ,*Crit Rev Biochem Mol Biol* ,1993 ,**28** :375 ~ 430
- [13] Strauss E G ,Rice C M ,Strauss J H. Sequence coding for the alphavirus nonstructural proteins is interrupted by an opal termination codon .*Proc Natl Acad Sci . U S A.* 1983 ,**80** :5271 ~ 5275
- [14] Zerfass K ,Beier H. Pseudouridine in the anticodon GΨA of plant cytoplasmic tRNA^{Tyr} is required for UAG and UAA suppression in the TMV-specific context .*Nucleic Acids Res* ,1992 ,**20**(22) :5911 ~ 5918
- [15] Zerfass K . ,Beier H. . The leaky UGA termination codon of tobacco rattle virus RNA is suppressed by tobacco chloroplast and cytoplasmic tRNAs^{Tyr} with CmCA ! anticodon .*The EMBOJ.* 1992 ,**11**(11) :4167 ~ 4173
- [16] QIU W K (裘维蕃) . Plant Pathology(植物病毒学) ,Beijing , Agricultural Press(农业出版社) ,1964
- [17] ZHANG X H (张秀华) ,LI G X (李国玄) ,LIANG X X (梁锡娴) , *et al.* The avirulent strain of plant virus and its application Ⅰ. The induction of avirulent strain of ToMV and some of its properties .*Acta phytopathol . Sinica*(植物病理学报) ,1980 ,**10** :109 ~ 112

Function of the Leaky UGA Codon in ssRNA Plant Virus Genomes

WEI Jun-Ya YANG Gong QIU Bing-Sheng ZHANG Ji-Shu

(Department of Molecular Virology and Biotechnology , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

Abstract The opal mutation (UGA) at nucleotide 2670 ~ 2672 in the replicase gene of the attenuated tomato mosaic virus K (ToMV-K) mainly contributes to the virus attenuation based on a series of studies on the viral attenuation mechanism. From analysis and comparison between the replicase gene mutation point of ToMV-K and the related regions of all plant viruses containing the leaky UGA , we have found that some characters , including the CCG motif α -helix structure and some specific amino acids , are presumably able to helpfully confer the readthrough mechanism. Finally , some other ssRNA plant viruses like PVX , PVY , CMV have been analyzed. We found that their genomic modifications and viral attenuations could be explored according to the mutation mode of the ToMV-K replicase .

Key words ToMV-K , read-through , plant virus

Received : November 10 , 2000

This work was supported by Grant from National Nature Funds of China (39770034)

* Corresponding author. Tel 86-10-62554398 Fax 86-10-62554247 E-mail : weijun@sun-im.ac.cn <http://journals.im.ac.cn>