

研究报告

脊尾白虾肠道微生物菌群结构

沈辉^{1,2} 万夕和^{1*} 何培民² 黎慧¹ 乔毅² 蒋葛²

(1. 江苏省海洋水产研究所 江苏 南通 226007)

(2. 上海海洋大学 水产与生命学院 上海 201306)

摘要:【目的】研究海水池塘养殖条件下的脊尾白虾肠道微生物菌群组成及多样性。【方法】采用 PCR-RFLP 技术,以直接提取的脊尾白虾肠道细菌总 DNA 为模板进行 16S rRNA 基因扩增,产物与 T 载体连接建立质粒文库,从 RFLP 建立的文库中筛选出不同细菌来源的克隆子,将测定的差异克隆子 16S rRNA 片段序列与 GenBank 数据库进行比对。【结果】从脊尾白虾肠道的菌群文库中共获得 114 个克隆子, *Hae* III 和 *Msp* I 双酶切得到 11 种差异克隆子;对差异克隆子测序后,其中 8 个差异序列与已知细菌具有较高的同源性,分别是假单胞菌属(*Pseudomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、冰冻小杆菌属(*Frigoribacterium*)、褐杆菌属(*Phaeobacter*)、弧菌属(*Vibrio*)、赤杆菌属(*Erythrobacter*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)和其他未培养细菌。【结论】初步揭示了脊尾白虾肠道微生物菌群结构的组成,为开发脊尾白虾专用微生态制剂提供基础资料。

关键词: 脊尾白虾, 肠道, 微生物菌群

Bacterial community structure in the intestine of *Exopalaemon carinicauda* Holehuis

SHEN Hui^{1,2} WAN Xi-He^{1*} HE Pei-Min² LI Hui¹ QIAO Yi² JIANG Ge²

(1. Jiangsu Institute of Marine Fisheries, Nantong, Jiangsu 226007, China)

(2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: [Objective] To study bacterial communities and diversity in shrimp (*Exopalaemon carinicauda* Holehuis) intestine. [Methods] 16S rRNA gene was amplified and a library was constructed by genomic DNA that was extracted from the bacteria in shrimp intestine. [Results] Different RFLP patterns of the clones were obtained from analysis with *Hae* III and *Msp* I. By comparing the obtained sequence with the published sequence in the GenBank database, 114 clones were obtained in the 16S rRNA clone library, and 11 different RFLP patterns of the clone were affirmed by *Hae* III and *Msp* I. There were 8 clone sequences in high identity with known bacteria sequence, respectively belonging to *Pseudomonas* (17.5%), *Enterobacter* (21.1%), *Frigoribacterium* (8.8%), *Phaeobacter* (5.3%), *Vibrio* (10.5%), *Erythrobacter* (9.6%), *Aeromona* (4.4%), and *Staphylococcus*

基金项目: 国家科技支撑计划课题(No. 2012BAC07B03); 江苏省农业科技自主创新资金项目(No. CX(13)2040); 江苏省水产三项工程项目(No. PJ2014-51); 南通市科技项目(No. HL2014014)

*通讯作者: ✉: wxh0718@163.com

收稿日期: 2014-11-28; 接受日期: 2015-03-04; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-06-26

(2.6%). In addition, uncultured bacteria accounted for 19.3%. **[Conclusion]** This study discovered the bacterial communities in the intestine of *Exopalaemon carinicauda* Holehuis, and the results would enhance our understanding about the bacterial community composition in *Exopalaemon carinicauda* Holehuis intestine and provide valuable data for the development of disease prevention mechanisms for shrimp cultivation.

Keywords: *Exopalaemon carinicauda* Holehuis, Intestine, Microbial community

脊尾白虾又称小白虾,是中国特有的经济虾类之一^[1]。由于味道鲜美、养殖效益较高,近年来脊尾白虾养殖规模迅速扩大。随着养殖密度及规模的增大,脊尾白虾的病害问题也日益增多^[2-4]。微生态制剂进行虾类疾病的防控研究受到广泛关注。微生态制剂的施用可以改善养殖生态环境,抑制病原微生物,提高水生经济动物的免疫力,从而减少养殖过程中疾病的发生^[5-6]。微生态制剂的研究与开发是基于动物肠道土著细菌群落结构的背景资料。

迄今为止,关于脊尾白虾肠道微生物菌群结构的研究还未见报道。传统的微生物培养技术无法获得细菌群落结构的全部信息^[7],为更加全面地了解脊尾白虾肠道的菌群结构,本文通过建立 16S rRNA 基因克隆文库,利用 PCR-RFLP 技术对脊尾白虾的肠道微生物菌群组成进行研究,以期对脊尾白虾的病害防治及微生态制剂的研究开发提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

20 尾脊尾白虾样品(3-4 g/尾)于 2013 年 9 月取自江苏省启东黄海滩涂开发有限公司,冷藏带回实验室。70%酒精擦拭样品体表,用灭菌后的镊子和剪刀取出脊尾白虾的肠道,接种针取出肠道内容物,并用灭菌生理盐水简单冲洗肠道表面,随后将肠道置于无菌管中-80 °C 保存备用。

1.2 样品总 DNA 提取

取 5 条解冻的肠道样品混合,4 °C、10 000×g 离心 10 min,弃上清^[8]。称取 100 mg 样品置于灭菌后的 EP 管研杵搅匀,应用天根海洋动物组织 DNA 提取试剂盒(DP324)进行基因组总 DNA 的提取,获得的 DNA 通过琼脂糖凝胶电泳(1.0%)检测后-20 °C 保存。

1.3 细菌 16S rRNA 基因 PCR 扩增

以提取的基因组 DNA 作为模板进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增,引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'),由大连宝生物公司合成。PCR 反应体系为(25 μL): 10×PCR 缓冲液(Mg²⁺ plus) 2.5 μL, dNTPs mixture (各 2.5 mmol/L) 2 μL, 引物 (10 mmol/L)各 1 μL,模板 DNA 1 μL,rTaq 酶(5 U/μL) 0.20 μL,灭菌双蒸水补足至 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳后,切下目的条带,用胶回收试剂盒进行回收纯化。

1.4 PCR 产物的克隆文库构建及 RFLP

将回收的 PCR 产物按照大连宝生物公司 PMD19-T 载体试剂盒(D102A)说明进行克隆。平板上所有阳性克隆提取质粒后用引物 RV-M/M13-47 进行 PCR 扩增。扩增后的产物稀释 1 000 倍后作为模板进行巢式 PCR (通用引物 27F 和 1492R),扩增产物约为 1 500 bp。将巢式 PCR 的产物用 *Msp* I 和 *Hae* III 限制性内切酶 37 °C 消化 3 h,消化产物以 3%琼脂糖凝胶电泳检测,分析克隆子 RFLP 图谱。

1.5 DNA 序列测序及分析

挑选筛选出的差异克隆子送至上海生工生物工程技术有限公司进行测序,所获序列通过 NCBI 进行比对找出相关同源序列,取 GenBank 中与比对序列具有 90%以上同源性的前 3 条序列,用软件 MEGA 5.1 的邻近相接法(Neighbor-Joining method)构建系统树,自举值(Bootstrap)设定为 1 000。以 Coverage (C)评估所构建文库的库容,所获得的信息可以体现脊尾白虾肠道微生物的多样

性。计算公式如下:

$$C=[1-(n_1/N)]\times 100\%$$

式中 N 为所分析的文库库容,即分析的克隆数;
 n_1 为克隆文库中不重复序列的克隆数。

2 结果与分析

2.1 酶切结果统计及分析

对脊尾白虾肠道总DNA的16S rRNA基因PCR扩增产物克隆后获得128个阳性克隆,所有阳性克隆菌落进行质粒提取,用M13-47和RV-M引物PCR扩增,电泳后扩增产物约为1.7 kb,共获得阳性克

隆为114个,阳性率为81.3%。利用两种限制性内切酶 *Msp* I 和 *Hae* III 酶切,3%琼脂糖电泳后进行图谱分析(图1)。结果表明,脊尾白虾肠道中共存在11种细菌RFLP谱型。以Coverage (C)计算,所构建的16S rRNA克隆文库覆盖率达到90.4%,表明该文库可较完整地反映脊尾白虾肠道环境的细菌多样性状况。

2.2 差异克隆子的序列比对及群落组成分析

通过酶切分析,发现共有11种代表克隆子类型,测序后将代表克隆子的序列上传至GenBank

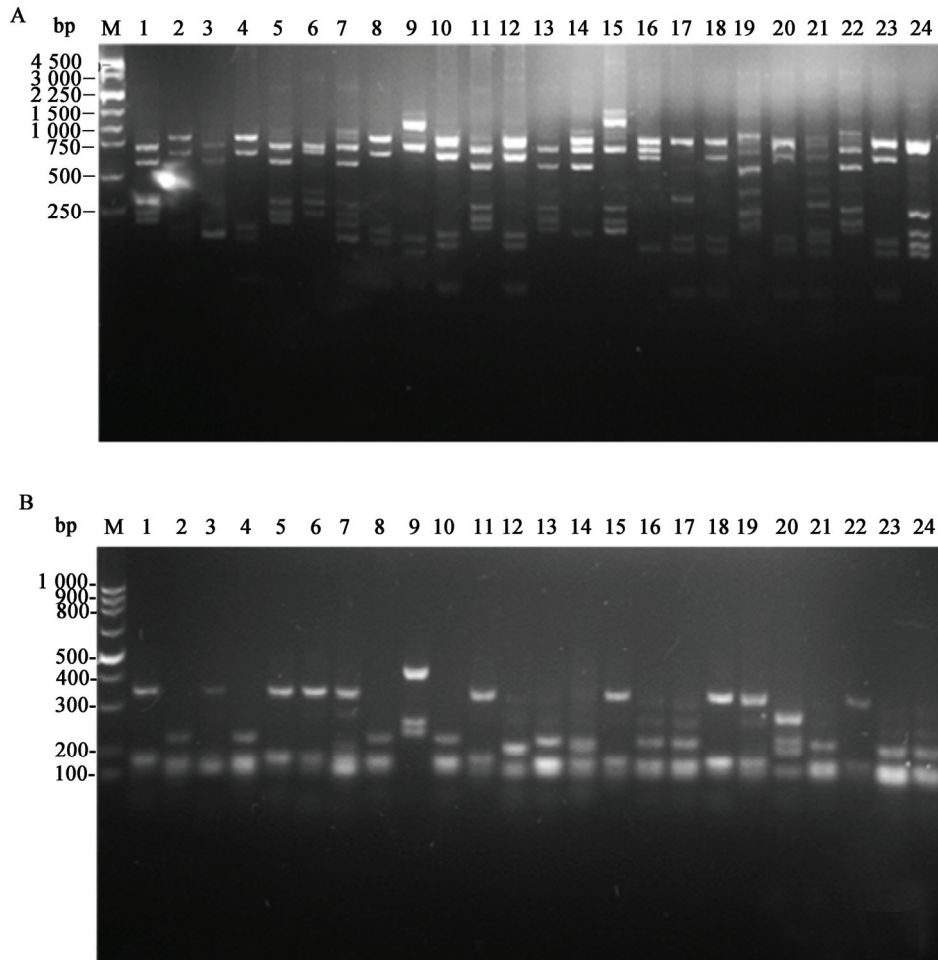


图1 脊尾白虾肠道文库阳性克隆PCR产物RFLP电泳图谱

Figure 1 Agrose gel electrophoresis restriction fragment patterns of PCR products of positive clones

Note: A: *Msp* I; B: *Hae* III; M: 100 bp DNA ladder (TaKaRa).

(表 1), 获得登录号为 KM403082–KM403092。同源比对发现, 脊尾白虾肠道细菌优势菌为变形杆菌, 其中 α -变形杆菌纲 4 条, γ -变形杆菌纲占 5 条, 其他 2 条为厚壁菌。11 个序列中有 8 个与已知细菌具有同源性, 分别是假单胞菌属(*Pseudomonas*)占 17.5%、肠杆菌属(*Enterobacter*)占 21.1%、冰冻小杆菌属(*Frigoribacterium*)占 8.8%、褐杆菌属(*Phaeobacter*)占 5.3%、弧菌属(*Vibrio*)占 10.5%、赤杆菌属(*Erythrobacter*)占 9.6%、气单胞菌属(*Aeromonas*)占 4.4%、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)占 2.6%, 未培养细菌占 19.3%。

系统进化分析结果表明, 克隆子归属于两个细菌门类: 变形细菌门(*Proteobacteria*, 即 γ -变形细菌纲和 α -变形细菌纲)和厚壁细菌门(图 2)。 γ -变形细菌纲为优势类群, 包含 5 个差异序列, 系统发育分析归为 4 个属, 分别为假单胞菌属、肠杆菌属、弧菌属和气单胞菌属。 α -变形杆菌纲中, SH-45 和 SH-84 都属于未培养的细菌序列, 两者的克隆子数量占 α -变形杆菌纲的 60%, 表明 α -变形杆菌纲中大多为未培养菌株。厚壁细菌门包含 2 个差异序列,

系统发育归为 2 个属, 属于冰冻小杆菌属及葡萄球菌属。

3 结论

目前, 对南美白对虾肠道微生物群落结构组成的报道较多。研究者们利用不同的分子生物学方法对南美白对虾的肠道微生物组成进行研究分析, 得出的研究结论也较为一致。研究表明, 南美白对虾肠道微生物群落的主要优势菌为变形细菌门和厚壁细菌门, 包括假单胞菌属、肠杆菌属和弧菌属等^[8-10]。据研究报道, 在养殖池塘环境中最主要的细菌类群一般为 α -变形杆菌和 γ -变形杆菌(*Gamma-proteobacteria*), 其中水生动物肠道优势微生物群落为 γ -变形杆菌^[11-12]。由此表明, 水生动物的肠道微生物群落结构常随着水体环境中的微生物群落结构而变化, 虾类肠道的微生物菌群结构很大程度上受到养殖环境微生物的影响^[13-14]。罗鹏等^[9]在对凡纳滨对虾咸淡水养殖系统内的细菌群落组成研究中, 分析认为虾肠道内的细菌群落遵循从水体到虾肠道内的演替规律。同样, 王春忠等^[15]研究了长毛虾养殖环境中的水体、底泥的微生物群

表 1 脊尾白虾肠道细菌 16S rRNA 基因 BLAST 同源性比对结果

Table 1 BLAST result of bacteria 16S rRNA gene PCR-RFLP sequence from *Exopalaemon carinicauda* Holeyuis

差异代表序列 Representative sequence	克隆子 Clone	最相似序列 Closest relative sequence	相似性 Identity (%)	克隆数 Clones	类群 Phylum
1	SH-01	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (KJ806426.1)	99	20	γ
2	SH-21	<i>Enterobacter</i> sp. (JX941543.1)	99	24	γ
3	SH-45	Uncultured <i>Enterobacter</i> sp. (JF703615.1)	99	4	γ
4	SH-49	Uncultured bacterium clone (JF747814.1)	90	7	α
5	SH-56	<i>Frigoribacterium</i> sp. (EU584512.1)	99	10	F
6	SH-66	<i>Phaeobacter daeponensis</i> (NR044026.1)	99	6	α
7	SH-72	<i>Vibrio harveyi</i> (FJ154796.1)	100	12	γ
8	SH-84	Uncultured alpha proteobacterium (AB491819.1)	96	11	α
9	SH-95	<i>Erythrobacter</i> sp. (DQ480144.1)	99	12	α
10	SH-107	<i>Aeromonas hydrophila</i> (JX978427.1)	99	5	γ
11	SH-112	<i>Staphylococcus hominis</i> (HG941662.1)	99	3	F

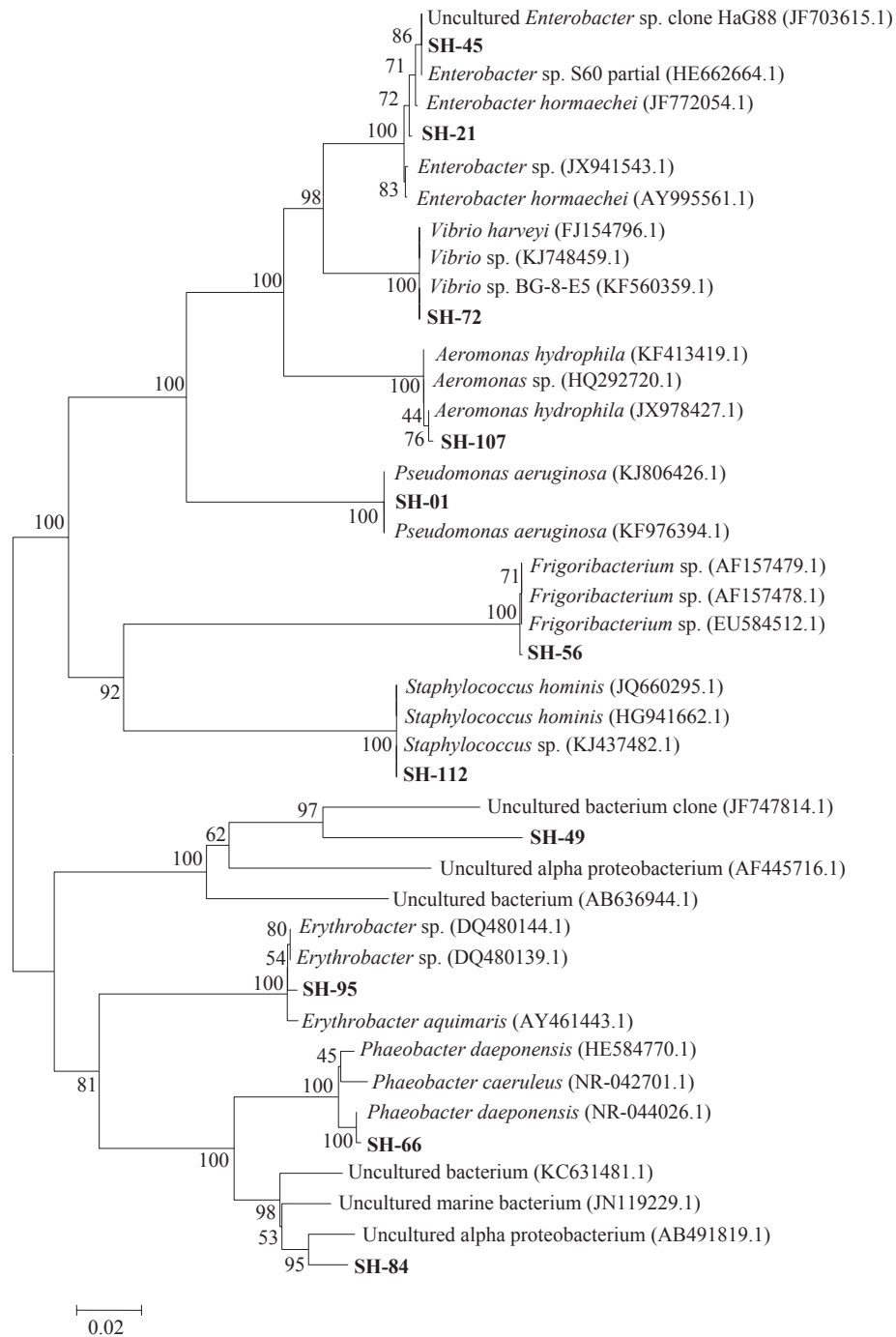


图 2 脊尾白虾肠道细菌系统发育树

Figure 2 Unrooted tree based on 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic position of bacteria from *Exopalaemon carinicauda* Holehuis

注: 分离的菌株号用加粗表示, 采用 ClustalW 两两比对, 用 MEGA 5.0 软件按照邻接法聚类(选择 Bootstrap 检验值 $\geq 50\%$, 1 000 次重复)进行系统发育树的构建。

Note: The number of bacteria strains isolated in this study are indicated in bold. Multiple Sequence alignment was performed using ClusterW. Phylogenetic tree was constructed with MEGA version 5.0 using a Neighbor-Joining algorithm, plus the Jukes-Cantor distance estimation method with bootstrap analyses for 1 000 replicates was performed.

落结构与虾肠道微生物群落结构的相关性后,发现肠道内的优势菌(厚壁细菌、梭杆菌和 γ -变形杆菌)主要从养殖池塘的水体中演替过来。在本研究中,脊尾白虾肠道细菌的优势细菌也属于 γ -变形杆菌纲的假单胞菌属和肠杆菌属,表明脊尾白虾的养殖环境对其肠道微生物群落组成影响较大,也验证了微生物从水体到虾肠道的演替规律。

脊尾白虾在自然条件下是多种病原的宿主^[2-4],在不同的环境理化条件下,多种病原因子如弧菌与病毒的共同作用毒力加倍下会引起对虾的大批量死亡^[16-17]。在本研究中,脊尾白虾的肠道内具有一定数量的条件性致病细菌,如哈维氏弧菌和嗜水气单胞菌,表明肠道内存在细菌毒力叠加的可能性,具有一定的发病风险。然而,在脊尾白虾的肠道中同时发现了一定比例的褐杆菌属细菌,该细菌分布在海水和海洋环境中,是一类革兰氏阴性的卵杆形菌,能产生具有细菌抗性的化合物^[18]和扩散性的褐色色素^[19]。董秀娟等^[20]对一株海洋细菌 *Phaeobacter* DL2 的抑菌作用进行了研究,发现该菌株具有广泛的抑菌谱,且对致病性弧菌表现出较强的抑菌作用。初步推论,该细菌的寄生(10.5%)可使脊尾白虾肠道内具有较高的抑菌活性。因此,在随后的研究中,可以采用可培养方法对脊尾白虾肠道内的海洋细菌进行分离筛选,进一步对该菌株的生理特征和抑菌活性研究,可为脊尾白虾肠道细菌结构的调整及微生态制剂的研究提供基础资料。另外,本研究在脊尾白虾肠道中还发现了一定数量的绿脓杆菌和葡萄球菌,这两种细菌广泛存在于水、土壤、空气以及动物肠道中,对人、哺乳动物及禽类具有较强的毒力,是典型的条件致病性细菌^[21]。由此提示,脊尾白虾的养殖环境可能受到了一定程度的人为因素影响,人们应注意生食脊尾白虾的安全性。

众多研究表明,在海洋环境中,目前已培养的细菌只占不到总细菌数的 1%,在海洋环境中还存在许多未被培养过的新细菌物种。利用传统技术对

微生物菌群培养时,不可避免地会造成菌株的富集或衰减,研究结果不能真实反映原微生物菌群的结构^[22]。国内外学者利用 PCR-16S rRNA 为基础的方法对不同水生动物的肠道微生物多样性进行了研究,从分子角度更全面地了解了肠道微生物菌群的结构组成及影响因素^[8-12]。本文通过 RFLP 技术对脊尾白虾的肠道微生物菌群结构进行了研究,结果发现了环境中常见的假单胞菌属、弧菌属和气单胞菌属细菌,以及动物肠道中的肠杆菌属和葡萄球菌属细菌,还发现了环境中较难分离培养的冰冻小杆菌属、褐杆菌属和赤杆菌属细菌,另外未能培养细菌占 19.3%,表明分子生物学方法更能全面地反映复杂环境中微生物菌群结构的多样性,可以用来进行复杂环境中微生物菌群结构的研究。

参 考 文 献

- [1] Li MY. An approach to the reproduction and growth of shrimp *Exopalaemon carinicauda* cultured in earthen ponds with reference to its maximum sustaining yield on catch rotation[J]. Journal of Fisheries of China, 1994, 18(2): 85-92 (in Chinese)
李明云. 池养脊尾白虾的繁殖、生长及其最大持续轮捕量的初步探讨[J]. 水产学报, 1994, 18(2): 85-92
- [2] Shen H, Wan XH, Wang LB, et al. Study on experimental infection of *Exopalaemon carinicauda* Holehuis with white spot syndrome virus[J]. Marine Sciences, 2013, 37(5): 55-60 (in Chinese)
沈辉, 万夕和, 王李宝, 等. 白斑综合征病毒对脊尾白虾的致病性研究[J]. 海洋科学, 2013, 37(5): 55-60
- [3] Zhang WW, Wang GS, Shi H, et al. Preliminary study on one pathogenic bacterium—*Vibrio harveyi* associated with red body disease in cultured *Exopalaemon carinicauda*[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition), 2014, 33(1): 65-71 (in Chinese)
张文文, 王庚申, 施慧, 等. 一种引起脊尾白虾红体病原菌的初步研究[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2014, 33(1): 65-71
- [4] Xu WJ, Xie JJ, Shi H, et al. Infection of *Hematodinium* sp. in farmed ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*[J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2010, 41(3): 396-402 (in Chinese)
许文军, 谢建军, 施慧, 等. 池塘养殖脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)感染血卵涡鞭虫的研究[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(3): 396-402
- [5] Devaraja TN, Yusoff FM, Shariff M. Changes in bacterial populations and shrimp production in ponds treated with commercial microbial products[J]. Aquaculture, 2002, 206(3): 245-256
- [6] Verscuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64(4): 655-661
- [7] Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere[J]. Science, 1997, 276: 734-740

- [8] Li YH, Chai PC, Hu XG, et al. Analysis of intestinal microecology of *Litopenaeus vannamei* in industrial aquaculture by RFLP and DGGE techniques[J]. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(2): 83-89 (in Chinese)
李玉宏, 柴鹏程, 胡修贵, 等. 应用 RFLP 和 DGGE 技术分析工厂化养殖凡纳滨对虾肠道微生物群落特征[J]. 渔业科学进展, 2014, 35(2): 83-89
- [9] Luo P, Hu CQ, Xie ZY, et al. PCR-DGGE analysis of bacterial community composition in brackish water *Litopenaeus vannamei* culture system[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2006, 25(2): 49-53 (in Chinese)
罗鹏, 胡超群, 谢珍玉, 等. 凡纳滨对虾咸淡水养殖系统内细菌群落组成的 PCR-DGGE 分析[J]. 热带海洋学报, 2006, 25(2): 49-53
- [10] Li K, Zheng TL, Tian Y, et al. Bacterial community structure in intestine of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(4): 649-653 (in Chinese)
李可, 郑天凌, 田蕴, 等. 南美白对虾肠道微生物群落的分子分析[J]. 微生物学报, 2007, 47(4): 649-653
- [11] Oxley AP, Shipton W, Owens L, et al. Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 93(2): 214-223
- [12] Liu H, Wang L, Liu M, et al. The intestinal microbial diversity in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) as determined by PCR-DGGE and clone library analyses[J]. Aquaculture, 2011, 317(4): 32-36
- [13] Wang F, Yang JF, Chen JG, et al. Comparison of the bacterial community structure in the crab seawater cultured and the outside environment by PCR-DGGE fingerprint technique: *Portunus trituberculatus* and *Scylla serrata*[J]. Journal of Marine Sciences, 2010, 28(4): 59-64
- [14] Han S, Liu Y, Zhou Z, et al. Analysis of bacterial diversity in the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) based on 16S rRNA gene sequences[J]. Aquaculture Research, 2010, 42(1): 47-56
- [15] Wang CZ, Lin GR, Yan T, et al. Microbial community in the shrimp (*Penaeus penicillatus*) intestine and its culture environment[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(5): 706-712 (in Chinese)
王春忠, 林国荣, 严涛, 等. 长毛对虾海水养殖环境以及虾肠道微生物群落结构研究[J]. 水产学报, 2014, 38(5): 706-712
- [16] Alapide-Tendencia EV, Dureza LA. Isolation of *Vibrio* spp. from *penaeus monodon* (fabricius) with red disease syndrome[J]. Aquaculture, 1997, 154(2): 107-114
- [17] Lee KK, Yang TI, Liu PC, et al. Dual challenges of infectious pancreatic necrosis virus and *Vibrio carchariae* in the grouper, *Epinephelus* sp.[J]. Virus Research, 1999, 63(1/2): 131-134
- [18] Martens T, Heidorn T, Pukall R, et al. Reclassification of *Roseobacter gallaeciensis* RuizPonte et al. 1998 as *Phaeobacter gallaeciensis* gen. nov., comb. nov., description of *Phaeobacter inhibens* sp. nov., reclassification of *Ruegeria algicola* (Lafay et al. 1995) Uchino et al. 1999 as *Marinovum algicola* gen. nov., comb. nov., and emended descriptions of the genera *Roseobacter*, *Ruegeria* and *Leisingera*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(Pt6): 1293-1304
- [19] Brinkhoff T, Bach G, Heidorn T, et al. Antibiotic product ion by a *Roseobacter* clade-affiliated species from the German Wadden Sea and its antagonistic effects on indigenous isolates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70: 2560-2565
- [20] Dong XJ, Li J, Zhang XH, et al. Identification and inhibitory activity to pathogenic *Vibrio* sp. of a marine bacterium *Phaeobacter* DL2[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(6): 996-1003 (in Chinese)
董秀娟, 李筠, 张晓华, 等. 海洋细菌 *Phaeobacter* DL2 的鉴定及其对致病弧菌抑制作用[J]. 中国水产科学, 2007, 14(6): 996-1003
- [21] Lu CP. Veterinary Microbiology[M]. 3rd Edition. Beijing: China Agriculture Press, 2001: 4 (in Chinese)
陆承平. 兽医微生物学[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 2001: 4
- [22] Burgmann H, Pesaro M, Widmer F. A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil[J]. Journal of Microbiological Methods, 2001, 45(1): 7-20