

耐热古菌芝田硫化叶菌海藻糖生成相关酶的基因克隆、表达和序列分析*

吴 襟** 于炜婷 王 辉 刘 莉 王绍校 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 从耐热古菌海藻糖芝田硫化叶菌 B12 中分别克隆出海藻糖生成相关酶——麦芽寡糖基海藻糖合酶的基因 *treY* 和麦芽寡糖基海藻糖基水解酶的基因 *treZ*, 测定了其核苷酸序列并进行了表达. 其中 *treY* 编码的蛋白质有 728 个氨基酸、分子质量为 86 ku; *treZ* 编码的蛋白质有 559 个氨基酸、分子质量为 65 ku. 它们与已报道的其他微生物的两个海藻糖生成相关酶的基因进行同源性比较, *treY* 和 *treZ* 的同源性分别为 93% 和 76% (硫矿硫化叶菌 P2)、97% 和 95% (硫矿硫化叶菌 KM1)、63% 和 66% (嗜酸热硫化叶菌 ATCC33909)、48% 和 50% (节杆菌 Q36)、48% 和 52% (根瘤菌 M11)、50% 和 52% (短杆菌). 通过 PHYLIP 软件进行这些基因序列的分类聚类计算, 获得这几种微生物间两个酶类的蛋白质系统进化树; 经过氨基酸序列比较分析还发现, 所有的海藻糖生成相关酶都含有糖苷酶家族 13 中几个高度保守的 α -淀粉酶催化活性区, 推测这些海藻糖生成相关酶都可能有着共同的进化来源.

关键词 芝田硫化叶菌, 海藻糖, 酶, 基因克隆, 序列分析

学科分类号 Q78

海藻糖 (trehalose) 是两个葡萄糖残基经 α -1,1 糖苷键连接而成的非还原二糖, 广泛存在于酵母、蘑菇和昆虫体中. 海藻糖对生物体和生物大分子有非特异性的保护功能, 能使生物在许多不利环境 (如高温、脱水、冷冻、高渗透压等) 下, 维持细胞膜和蛋白质的稳定, 故具有应用于食品、化妆品、生物制品和医药工业的巨大潜力^[1]. 近年来, 酶法合成海藻糖以其低成本、高产率的优点, 成为当今生物界关注的热点. 研究表明, 极端嗜热古菌硫化叶菌 (*Sulfolobales*) 含有将淀粉转化为海藻糖的两个相关的酶: 麦芽寡糖基海藻糖合酶 (maltooligosyl trehalose synthase, MTSase) 和麦芽寡糖基海藻糖海藻糖基水解酶 (maltooligosyl trehalose trehalohydrolase, MTHase). 其中 MTSase 通过分子内转糖基作用将淀粉糖链还原末端的 α -1, 4 糖苷键转化为 α -1, 1 糖苷键, MTHase 再进一步水解与 α -1, 1 糖苷键相邻的 α -1, 4 糖苷键生成海藻糖和比初始糖链少两个葡萄糖残基的麦芽寡糖^[2].

本文首次报道了极端嗜热古菌芝田硫化叶菌 (*Sulfolobus shibatae*) B12 编码 MTSase 和 MTHase 的核苷酸序列及其氨基酸序列. 并将它们与其他微生物来源的 MTSase 和 MTHase 核苷酸及氨基酸序列进行同源性比较分析, 从分子水平上进一步深入研究了海藻糖生成相关酶基因的进化机制, 为酶法合成海藻糖提供了一些分子理论基础.

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

供体菌 B12 染色体 DNA 由中国科学院微生物研究所黄力教授惠赠; 受体菌大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 、BL21 (DE3) 和质粒 pET-3a、pBV220 皆为本实验室保存; pSK-T 载体由中国科学院微生物研究所陈晓英女士提供.

1.2 酶和试剂

限制性内切酶、T4DNA 连接酶、TaqDNA 聚合酶、Deep vent DNA 聚合酶等工具酶及核酸、蛋白质分子质量标准等分别购自华美公司、上海生工公司、Promega 公司、Biolab 公司和 Sigma 公司等. 测定 MTSase 用的底物麦芽五糖为日本林原生物化学研究所 Kazuhiko 先生赠送. 提纯试剂盒 Wizard PCR Preps DNA Purification System 购于 Promega 公司. LB 培养基用于细菌的培养, 按文献 [3] 配制.

1.3 方法

1.3.1 引物设计

参照已发表的硫矿硫化叶菌 (*S. solfataricus*) KM1^[4] 和嗜酸热硫化叶菌 (*S. acidocaldarius*)

* 北京市自然科学基金课题 (5982010) 和国家高技术“863”计划资助项目 (2001AA214141).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62652018, E-mail: wujinw5@sina.com.cn

收稿日期: 2003-03-10, 接受日期: 2003-03-25

ATCC33909^[5] 麦芽寡糖基海藻糖合酶的基因序列, 分别选择若干保守区序列设计引物, 用 Oligo 5.0 评价引物效率, 并最终选择在 KM1 基因1 184 ~ 1 202和 2 127 ~2 145 碱基处为最佳引物位置.

简并引物设计如下: 上游为 5' GTAGATGGGACTACTGG [A, T, G, C] T 3', 下游为 5' CAAACTTCAGTTCC [T, C] TG [A, G] T 3'. 以 B12 的染色体 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增得到 1.05 kb 的特异 DNA 片段. 将 PCR 扩增产物用试剂盒纯化后直接进行测序, 测序结果和硫磺硫化叶菌 KM1 的基因序列进行同源比较分析, 发现两基因同源性高达 97%. 根据此结果, 直接参照 KM1 MTSase 和 MTHase 结构基因 5'端上游和 3'端下游已知序列分别设计 PCR 引物, 并用 PRIMER 4 软件进行优化.

B12 *treY* 基因引物: 上游为 5' TAAGCAATAGGATAAGGCTTA 3', 下游为 5' GATCTGCGTAATACATTTCTG 3'.

B12 *treZ* 基因引物: 上游为 5' TAAAGAGAAGGATAAATAGAG 3', 下游为 5' AGAGTAGTTCAAGAATAAATC 3'.

1.3.2 PCR 方法: 以 B12 的染色体 DNA 为模板, 用高保真的 Deep vent DNA 聚合酶进行 PCR 扩增. *treZ* 的 PCR 扩增条件为 94℃变性 1 min, 48℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min, 30 个循环. *treY* 的 PCR 扩增条件为 94℃变性 1 min, 46℃退火 1 min, 71℃

延伸 2 min, 30 个循环.

1.3.3 克隆及序列测定: 将两个 PCR 扩增的产物用试剂盒纯化后, 分别与质粒载体 pSK-T 连接, 转化大肠杆菌 DH5α, 蓝白斑法筛选出含有插入片段的阳性克隆. 将含有插入 *treY* 编码区序列的阳性克隆 pKTGT1 (DH5α)、pKTGT2 (DH5α) 和 *treZ* 编码区序列的阳性克隆 pKTBY1 (DH5α)、pKTBY2 (DH5α) 分别用步移法依次测序, 测序结果的拼接由 DNASIS 2.5 软件辅助对比分析整理.

1.3.4 酶活力测定方法: MTSase 酶活力测定方法如下. 反应液含 1% 麦芽五糖, 50 mmol/L 醋酸缓冲液, pH 为 5.5, 反应温度 60℃. 一个酶活力单位为每分钟转变 1 微摩尔麦芽五糖为麦芽三糖基海藻糖的量. MTHase 酶活测定采用 Fuwa^[6] 的实验室微量比色法测定. 一个酶活力单位定义为 60℃下 1 min 液化 0.1 mg 可溶性淀粉所需的酶量.

1.3.5 序列分析和同源性比较: 采用 DNASIS 2.5、DNATool 5.1 和 Antheprot 4.5 软件分析; 基因的分类聚类计算由 PHYLIP 软件完成.

2 结 果

2.1 *treY* 和 *treZ* 基因编码区核苷酸序列及初步分析

B12 的 *treY* 和 *treZ* 基因序列在 GenBank 的登记号分别为 AF201336 和 AF201335. 用生物学软件 DNATool 5.1 对这两个基因编码区序列进行分析, 可以得到表 1 的分析结果.

Table 1 Basic sequence analysis of B12 *treY* and *treZ*

Gene	Sequence length	Amino acid length	(G + C) /%	Predicted molecular mass	Predicted pI
<i>treY</i>	2 187 bp	728	34.40	86 ku	5.90
<i>treZ</i>	1 680 bp	559	35.67	64 ku	5.22

2.2 重组质粒 pET-MTS 和 pBV-MTH 的构建和表达

根据 *treY* 和 *treZ* 基因测序结果, 设计合成如下引物.

B12 MTSase 基因引物: 上游为 5' AGACATATGATAATAGGCACATATAGGCT 3', 下游为 5' TGAGGATCCACTCCCTTTTTTTCAGT 3'. 上游引物 5'端含 *Nde* I 位点, 下游引物 5'端含 *Bam*H I 位点.

B12 MTHase 基因引物: 上游为 5' AAA-GAATTCATGACGTTTGCTTATAAAAT 3', 下游为 5' CTCGGATCCTAAAGTTTATATAAAGCAAAT 3'. 上游引物的 5'端含 *Eco*R I 位点, 下游引物的 5'端含 *Bam*H I 位点.

以 B12 的染色体 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增. MTSase 基因的 PCR 扩增条件: 94℃预变性 1 min, 94℃变性 1 min, 48℃退火 1 min, 71℃延伸 2 min, 30 个循环, 71℃后保温 10 min, 电泳检测扩增产物约 2.2 kb. MTHase 基因的 PCR 扩增条件: 94℃变性 50 s, 53℃退火 50 s, 72℃延伸 100 s, 30 个循环, 电泳检测扩增产物约 1.7 kb. 两个扩增产物大小与预期结果相符. 将以上两片段纯化、酶切, 分别与载体 pET-3a、pBV220 相连后, 各自转入受体菌大肠杆菌 BL21 和 DH5α 中, 用酶切检测的方法筛选出含重组质粒的菌株 BL21 (pET-MTS) 和 DH5α (pBV-MTH), 进行培养诱导

后,收集菌体超声破碎,离心获得上清,并以含空质粒的菌株裂解液为相应空白对照,测得 MTSase 和 MTHase 的酶活分别为 19.8 U/g 和 13.4 U/g.

2.3 *treY* 和 *treZ* 的同源性比较

硫矿硫化叶菌 P2^[7]和 KM1^[4]、嗜酸热硫化叶菌 ATCC33909^[5]、节杆菌 (*Arthrobacter* sp.) Q36^[8]、根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) M-11^[9]、短杆菌 (*Brevibacterium* sp.) 的 MTSase 和 MTHase 基因序列已发表,用生物学软件 DNASIS 2.5 将这些序列

与 B12 的 *treY* 和 *treZ* 基因序列分别进行比较,发现它们的同源性分别为 93% 和 76%、97% 和 95%、63% 和 66%、48% 和 50%、48% 和 52%、50% 和 52%. 表明各种微生物的 MTSase 和 MTHase 基因有很高的保守性.

通过 PHYLIP 软件,对以上这些微生物的 MTSase 和 MTHase 编码基因序列分别进行分类聚类计算,获得这几种微生物间两个酶类的蛋白质系统进化树 (图 1).

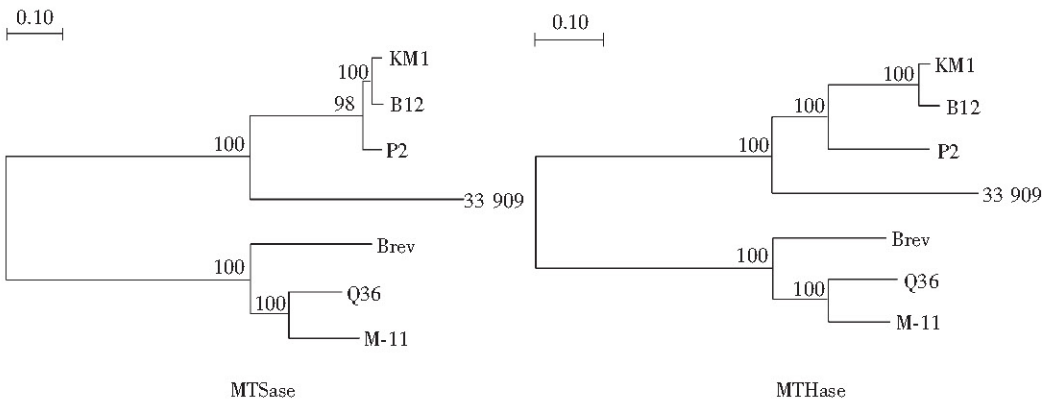


Fig. 1 Phylogenetic trees of MTSase and MTHase

B12: *Sulfolobus shibatae* B12; KM1: *Sulfolobus solfataricus* KM1; P2: *Sulfolobus solfataricus* P2; 33909: *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC33909; Q36: *Arthrobacter* sp. Q36; M-11: *Rhizobium* sp. M-11; Brev: *Brevibacterium* sp.

2.4 MTSase 和 MTHase 的氨基酸序列比较和分析

通过 Antheprot 4.5 软件对目前已报道的不同微生物所产生的 MTSase 和 MTHase 进行氨基酸序

列比较分析后发现, MTSase 和 MTHase 中都存在着糖苷酶第 13 家族中 4 个特有的高度保守的 α -淀粉酶催化活性区, 比较结果见表 2.

Table 2 Alignments of the reserved sequence regions in glycosyl hydrolases family 13

Reserved sequence regions	1	2	3	4
MTSase (B12)	85DIVPNH	237GLRIDHIDG	269EKIL	455TLSTHD
MTSase (P2)	85DIVPNH	227GLRIDHIDG	269EKIL	455TLSTHD
MTSase (KM1)	85DIVPNH	227GLRIDHIDG	269EKIL	455TLSTHD
MTSase (33909)	85DIVPNH	224GYRIDHIDG	255EKIL	438ATSTHD
MTSase (Q36)	87DIVPNH	233GLRIDHPDG	264EKIL	478TLSTHD
MTSase (M11)	87DIVPNH	232GLRIDHPDG	264EKIL	478TLSTHD
MTSase (Brev)	87DIVTNH	232GFRVDHPDG	264EKIL	479TLSTHD
α -amylase (<i>A. ory.</i>)	117DVVANH	202GLRIDTVKH	230EVL D	292FVENHD
Pullulanase (<i>K. aero.</i>)	600DVVYNH	671GFRFDLMGY	704EGWD	827YVSKHD
MTHase (B12)	187DVVYNH	249GFR L DAVHS	284ESDL	373YIQNHD
MTHase (P2)	190DVVYNH	250GFR L DAVHA	286ESDL	375YIQNHD
MTHase (KM1)	188DVVYNH	249GFR L DAVHA	284ESDL	373YIQNHD
MTHase (33909)	188DVVYNH	249GLR L DAVHA	284ESDL	371FIQNHD
MTHase (Q36)	202DVVYNH	263GLR L DAVHA	303ESDL	395CSQNHD
MTHase (M11)	200DVVYNH	261GLR L DAVHA	302ESDL	393CSQNHD
MTHase (Brev)	193DVVYNH	249GVGFDAVHA	295ESDF	386CNQNHD

B12: *Sulfolobus shibatae* B12; KM1: *Sulfolobus solfataricus* KM1; P2: *Sulfolobus solfataricus* P2; 33909: *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC33909; Q36: *Arthrobacter* sp. Q36; M-11: *Rhizobium* sp. M-11; Brev: *Brevibacterium* sp.; *A. ory.*: *Aspergillus oryzae*; *k. aero.*: *Klebsiella aerogenes*^[4]. The conserved amino acid residues are shown as shaded boxes.

2.5 MTSase 和 MTHase 的纯化和酶学性质比较

将以上表达的重组 MTSase 和 MTHase 进行了分离纯化和酶学性质的研究^[10]. 实验结果表明:嗜酸耐热古菌芝田硫化叶菌 B12 的重组 MTSase 和

MTHase 均有很好的热稳定性, 与该菌的原始生长条件相一致. 表 3 显示了它们与其他微生物所产生的 MTSase 和 MTHase 之间的性质比较和差异.

Table 3 Comparison of enzymatic properties of MTSase and MTHase from different sources

		Optimum Tm/°C	Optimum pH	K _m / (mmol • L ⁻¹)	Minimum reaction substrate ³⁾
<i>Sulfolobus shibatae</i> B12 ^[10]	MTSase	70	4.5	5.5 ¹⁾	maltotetraose
	MTHase	70	4.5	6.0 ²⁾	
<i>Sulfolobus solfataricus</i> KM1 ^[1,2]	MTSase	75	5.5	5.0 ¹⁾	maltotriose
	MTHase	75	5.5	5.8 ²⁾	
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> ATCC33909 ^[5]	MTSase	75	5.0	7.1 ¹⁾	maltotriose
	MTHase	75	5.5	2.7 ²⁾	
<i>Arthrobacter</i> sp. Q36 ^[8]	MTSase	40	7.0	8.7 ¹⁾	maltotriose
	MTHase	45	6.5	4.6 ²⁾	

1) maltopentaose, 2) maltotriosyltrehalose, 3) produce trehalose.

3 讨 论

日本林原生化研究所在 1995 年研究发现, 通过节杆菌 (*Arthrobacter* sp.) Q36 中 MTSase 和 MTHase 的协同作用, 可以直接水解淀粉转化合成海藻糖^[8]. 此后寻找稳定性好、转化效率高的新 MTSase 和 MTHase 一直成为酶法生产海藻糖研究领域的重点. 硫化叶菌是一类嗜热嗜酸的古细菌, 一般生长在 pH 1~4, 温度为 70℃~90℃ 的热泉中, 产生的酶常具有很好的稳定性. 1996 年, Masaru 等率先从硫矿硫化叶菌 KM1 和嗜酸热硫化叶菌 ATCC33909 中发现了 MTSase 和 MTHase 的活性, 并完成了两酶的基因全序列测定; 而随后在芝田硫化叶菌 B12 及其他一些硫化叶菌中也发现了 MTSase 和 MTHase 活性的存在. 表 3 的结果显示这些酶除了都有很好的耐热性外 (最适反应温度在 70℃ 以上), 还有着非常接近的分子质量 (MTSase 在 85 ku 左右, MTHase 在 64 ku 左右) 和相似的底物催化性质, 基因序列也有较高的同源性, 酶的活性催化中心有着很高的保守同源性. 这些都表明该海藻糖生物合成途径是硫化叶菌中非常普遍、较为重要的代谢途径. 据推测, 这可能与逆境状态下海藻糖对生物体的特别保护作用有密切关系.

由图 1 和基因序列同源性比较结果可以看出, 较之嗜酸热硫化叶菌, 芝田硫化叶菌的 MTSase 和 MTHase 基因序列与硫矿硫化叶菌有着更近的种系

发生关系, 这结果与文献报道的这几种菌 DNA 杂交实验结果有相似之处^[5]. 而另一方面, 与来源于细菌的海藻糖生成相关酶相比, 几个硫化叶菌来源的 MTSase 和 MTHase 基因序列间则有着更高的同源性, 表明这些微生物的 MTSase 和 MTHase 序列差异和其物种进化基本一致, 也为古菌和其他微生物间存在的彼此各自独立的进化关系提供了新的证据.

根据氨基酸序列同源性和结构的相似性划分, 糖苷水解酶被分为 60 多个家族. 其中糖苷酶第 13 家族 (也称 α-淀粉酶家族) 中包括 α-淀粉酶、普鲁葡聚糖酶、环糊精葡聚糖转移酶、淀粉脱枝酶等若干能作用于淀粉的糖苷水解酶类^[11]. 表 2 的氨基酸序列比较结果表明, 所有的 MTSase 和 MTHase 都具有糖苷酶第 13 家族中几个高度保守的 α-淀粉酶催化活性区. 已知这些保守区域不仅与 α-淀粉酶的催化活性有关, 如第 2、4 保守区域中 Asp 残基、第 3 保守区域中 Glu 残基, 都是酸碱催化机制中糖苷水解过程时起作用的关键氨基酸残基, 而且也与 α-淀粉酶家族共有的 (β/α)₈ 桶状三级结构的形成密切相关^[12]. 这不仅表明 MTSase 和 MTHase 应属于糖苷酶第 13 家族, 而且这些氨基酸序列保守区很可能也是 MTSase 和 MTHase 进行相关催化的关键活性区. 此外酶学性质研究^[10] 显示, 除了测定出 B12 的 MTSase 分子内转糖基活性和 MTHase 的海藻糖苷水解活性外, 它们都还有微弱

的 α -淀粉酶水解活性。推测 *treY* 和 *treZ* 可能来源于共同的原始 α -淀粉酶基因, 并随着 MTSase 和 MTHase 各自功能的逐步分化而逐渐演变而来。

参 考 文 献

- 1 Masaru K, Yutaka M, Masako K, *et al.* Purification and characterization of new trehalose-producing enzymes isolated from the hyperthermophilic archaeum *Sulfolobus solfataricus* KM1. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, **60** (3): 546~550
- 2 Masaru K, Yutaka M, Masako K, *et al.* Reaction mechanism of a new glycosyltrehalose-producing enzyme isolated from the hyperthermophilic archaeum *Sulfolobus solfataricus* KM1. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, **60** (5): 921~924
- 3 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1993. 908
Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. Beijing: Science Press, 1993. 908
- 4 Kazuo K, Masaru K, Yutaka M, *et al.* Gene cloning and expression of new trehalose-producing enzymes from the hypermophilic archaeum *Sulfolobales solfataricus* KM1. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, **60** (11): 1882~1885
- 5 Kazuo K, Masaru K, Yutaka M, *et al.* Gene analysis of trehalose-

- producing enzymes from hyperthermophilic archaea in *Sulfolobales*. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, **60** (10): 1720~1723
- 6 Fuwa H. Analytical method of amylases activity. *J Biochem*, 1954, **41**: 583~603
 - 7 She Q, Singh R K, Confalonieri F, *et al.* The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (14): 7835~7840
 - 8 Nakada T, Maruta K, Mitsuzumi H, *et al.* Purification and characterization of a novel enzyme, maltooligosyl trehalose trehalohydrolase from *Arthrobacter* sp. Q36. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995, **59** (12): 2215~2218
 - 9 Aruta K, Hattori K, Nakada T, *et al.* Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Rhizobium* sp. M-11. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, **60** (4): 717~720
 - 10 王绍校, 吴 襟, 高春霄, 等. 海藻糖微生物酶法合成机制的研究, 微生物学通报, 2003, **30** (2): 36~40
Wang S X, Wu J, Gao C X, *et al.* *Microbiology (Chinese)*, 2003, **30** (2): 36~40
 - 11 Henrissat B, Bairoch A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J*, 1996, **316** (2): 695~696
 - 12 Feese M D, Kato Y, Tamada T, *et al.* Crystal structure of glycosyltrehalose trehalohydrolase from the hyperthermophilic archaeum *Sulfolobus solfataricus*. *J Mol Biol*, 2000, **301** (2): 451~465

Cloning, Expression and Sequence Analysis of a Cluster of Genes Encoding New Trehalose-producing Enzymes From Thermophilic Archaeobacterium *Sulfolobus shibatae* B12*

WU Jin**, YU Wei-Ting, WANG Hui, LIU Li, WANG Shao-Xiao, ZHANG Shu-Zheng

(*Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*)

Abstract Two genes (*treY* and *treZ*) encoding for trehalose-producing enzymes, a maltooligosyl trehalose synthase (MTSase) and a maltooligosyl trehalose trehalohydrolase (MTHase), had been cloned, expressed and sequenced from thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus shibatae* B12. The nucleotide sequences of *treY* and *treZ* indicated proteins with lengths of 728 and 559 amino acids and molecular masses of 86 ku and 65 ku, respectively. *treY* and *treZ* genes from *S. shibatae* B12 show high sequence homologies with other microbial MTSase and MTHase genes, such as *S. solfataricus* P2 (93% and 76% identity), *S. solfataricus* KM1 (97% and 95% identity), *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909 (63% and 66% identity), *Arthrobacter* sp. Q36 (48% and 50% identity), *Rhizobium* sp. M-11 (48% and 52% identity), *Brevibacterium* sp. (50% and 52% identity). Phylogenetic trees of these enzymes genes were constructed by analysis class of their overall nucleotide sequences. The amino acid sequences of MTSase and MTHase showed identity with members of the glycosyl hydrolase family 13 (α -amylase family). Four important regions highly conserved in the glycosyl hydrolase family 13 exist in the amino acid sequences of all these trehalose-producing enzymes. It is suggested that MTSase and MTHase are members of glycosyl hydrolase family 13 and *treY* and *treZ* maybe derived from a common original α -amylase gene.

Key words *Sulfolobus shibatae*, trehalose, enzyme, gene cloning, sequence analysis

* This work was supported by grants from The Natural Science Foundation of Beijing (5982010) and State 863 High Technology R&D Project of China (2001AA214141).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62652018, E-mail: wujinw5@sina.com.cn

Received: March 10, 2003 Accepted: March 25, 2003