

噬菌体肽库中筛选 NMDA 受体抗原表位*

康晓楠¹⁾ 孙长凯¹⁾** 范明²⁾** 薛沿宁²⁾ 邵宁生²⁾ 赵杰¹⁾ 韩大跃³⁾ 施广霞⁴⁾

(¹⁾大连医科大学脑疾病研究所, 大连 116027; (²⁾军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850;

(³⁾解放军第 210 医院, 大连 116021; (⁴⁾大连医科大学病理生理学教研室, 大连 116027)

摘要 为了获得人 N-甲基-D-天冬氨酸受体 (NR) 主亚基 (NR1) M3-M4 环 B 细胞表位, 以人 NR1 分子 M3-M4 环单克隆抗体 MAB363 淘筛噬菌体展示随机 12 肽库, 对筛选克隆进行特异性 ELISA 检测和竞争结合实验分析. 从 30 个克隆中得到一个阳性克隆序列“VHTNPSTWQPIL”(克隆 1), 原核表达的 NR1 M3-M4 环可以与克隆 1 竞争结合 MAB363. 固相合成 5 个表位探针短肽, 发现其中只有 R (22) LRNPSKD 可以与 M3-M4 环竞争结合抗体, 将 NPS 三个氨基酸残基逐一敲除, 缺失 N 或 NP 的合成肽和 M3-M4 环竞争抗体的能力减弱, 缺失 NPS 的合成肽完全没有竞争能力, 证明 MAB363 的表位为 NPS, S 可能是关键性残基. 上述结论为免疫干预防治兴奋性脑损害策略的实施提供了一个重要线索和依据.

关键词 噬菌体展示, B 细胞表位, NMDA 受体

学科分类号 Q517

N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体 (NR) 过度激活与许多重大神经、精神疾患密切相关, 已有的 NMDA 受体拮抗剂或阻滞剂由于药用“空间窗”过大和“时间窗”过小至今尚未在临床取得成功^[1]. 通过对若干脑疾患高危人群予以人 NR 主亚基 (NR1) 分子免疫接种, 诱导产生特异性体液免疫, 干预 NR 功能, 有可能产生抗兴奋性神经保护效应^[2,3]. 但是, 以全长自身分子为免疫原, 对机体具有潜在的自身细胞毒危害^[3]. 构建表位疫苗的策略可以解决完整疫苗分子引起的不良反应, 同时为了打破自身耐受, 必须寻找到具有自身免疫原性的表位.

1994 年, Morrison 等用原核表达的大鼠 NR1 M3-M4 环 GST 融合蛋白免疫小鼠, 经传统杂交瘤技术得到单克隆抗体 MAB363 (其识别表位位于 NR1a 分子 660~811 氨基酸内)^[4], 由于小鼠、大鼠和人 NR1 的 M3-M4 环氨基酸序列完全一致, 所以可以认为小鼠对相当于自身分子的 M3-M4 环产生了抗体应答, 这一事实提示 MAB363 识别的表位具有自身免疫原性.

本研究利用噬菌体肽库展示技术获得了 MAB363 表位相关克隆, 并采用表位合成肽、竞争抑制试验等技术进行综合分析, 确定了人 NR1 分子 M3-M4 环一个 B 细胞表位, 为表位疫苗免疫干预防治兴奋性脑损害策略的实施提供了一个重要线索和依据.

1 材料与方法

1.1 材料

噬菌体表面衣壳蛋白 III 展示的随机 12 肽库 (12-mer Ph. D. random peptide library, 4×10^{12} pfu/ml) 试剂盒、受体菌 *E. coli* ER2537、DNA 全自动测序引物 (—96g III sequencing primer): CCCTCATAGTTAGCGTAACG 均购自美国 NEW ENGLAND BIOLAB 公司. MAB363 为抗 NMDAR1 单克隆抗体 (Chemicon 公司, 美国), HRP-抗 M13 噬菌体 PⅧ多克隆抗体兔血清、蛋白胨和酵母提取物均为 Pharmacia 公司 (英国) 产品. 其余试剂为国产分析纯. DNA 自动测序仪为 PE 公司 (美国) 产品, 酶标仪为 Bio-Rad 公司 (美国) 产品.

1.2 方法

1.2.1 噬菌体展示 12 肽库的筛选

a. 生物淘筛

方法同试剂盒说明书. 主要步骤如下.

酸洗脱法: NR1 单抗 MAB363 100 mg/L 包被 96 孔酶联板, 100 μ l/孔, 4℃过夜, 1% BSA 封

* 国家自然科学基金资助项目 (30070267), 中国博士后科学基金 (2001), 辽宁省重点科技攻关课题项目 (2001226005).

** 通讯联系人.

Tel: 0411-4721396, E-mail: cksun110@mail.dlptt.ln.cn

收稿日期: 2002-12-25, 接受日期: 2003-02-27

闭, 室温 1 h, 洗板后, 取噬菌体原库 10 μ l 用 190 μ l 0.1% TBST 稀释, 以 100 μ l/孔投入包被孔, 37 $^{\circ}$ C 室温轻摇孵育 1 h, 0.1% TBST 洗 10 次 (第 1、2 轮) 或 20 次 (第 3、4 轮), 每孔加入 100 μ l 酸洗脱液, 室温洗脱 9 min, 移出洗脱液至微量离心管, 以 15 μ l pH 9.1 的 1 mol/L Tris-HCl 中和, 取 2 μ l 测定滴度, 计算投入/产出比; 80 μ l 用于扩增, 扩增的噬菌体测滴度用于下一轮筛选 (投入量为 10^{11} pfu). 共进行 4 轮筛选, 从第 3 轮起包被量为 5 μ g/孔.

靶洗脱法: 洗脱时, 每孔加入 TBS 稀释的 100 mg/L 单抗 100 μ l, 室温洗脱 1 h, 移出洗脱液至微量离心管, 不需中和, 其他步骤同上.

b. 特异性噬菌体的扩增和纯化

过夜菌按 1 : 100 接种于 20 ml 低盐 LB 培养基, 加入待扩增的噬菌体, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 4.5 h. 按试剂盒说明纯化噬菌体.

c. 噬菌体滴度的测定

用低盐 LB 培养基将噬菌体按 10 倍比稀释成不同梯度, 取 10 μ l 不同梯度的噬菌体稀释液分别与 190 μ l 对数生长期的 2537 菌液加入 3 ml 融化的顶层琼脂 (45 $^{\circ}$ C 水浴) 中, 涡旋混匀, 立即在 37 $^{\circ}$ C 预热的 LB/IPTG/X-gal 平板上铺板, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜, 计算其克隆数及噬菌体滴度 (TU, 用 pfu/ml 表示). 在每轮筛选中都要测定投入/产出比.

d. 筛选克隆的扩增、纯化及单链 DNA 的提取、测序和序列分析

从第 2、3 轮随机挑取共 30 个克隆扩增、纯化并测滴度 (方法同上). 按试剂盒说明提取各克隆单链 DNA, 经琼脂糖电泳鉴定 DNA 纯度, 用 M13 反向-96 位远端引物在 DNA 自动测序仪上测序.

e. 结合克隆的间接 ELISA 鉴定

以 5 mg/L MAB363 100 μ l/孔包被, 1% BSA 封闭非特异性位点, 加入 2×10^9 pfu 纯化的各噬菌体克隆, 室温结合 1 h, 加入抗 M13 噬菌体 P μ Ⅷ多抗兔血清 (1 : 2 000) 室温 1 h, HPR-羊抗兔 IgG 抗体 (1 : 20 000) 结合, TMB 系统显色, 酶标仪上测吸光度值 A_{450} .

f. 阳性克隆与抗原的相似性分析

大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 原核表达抗原人 NR1 M3-M4 环 (序列见图 1, 下文称重组肽), 层析纯度 100%^[5], 蛋白质印迹和 ELISA 鉴定 MAB363

与重组肽反应阳性, 可以用作抗原竞争结合试验.

采用竞争性 ELISA 法: MAB363 以 5 mg/L 包被 ELISA 板, 1% BSA 封闭, 相同数量的阳性噬菌体克隆分别与不同浓度原核表达肽室温孵育 1 h 后加样, 其他方法同 e. 竞争抑制率按下式计算:

抑制率 = (1 - 掺入竞争抑制物的 A_{450} / 未掺入竞争抑制物的 A_{450}) $\times 100\%$

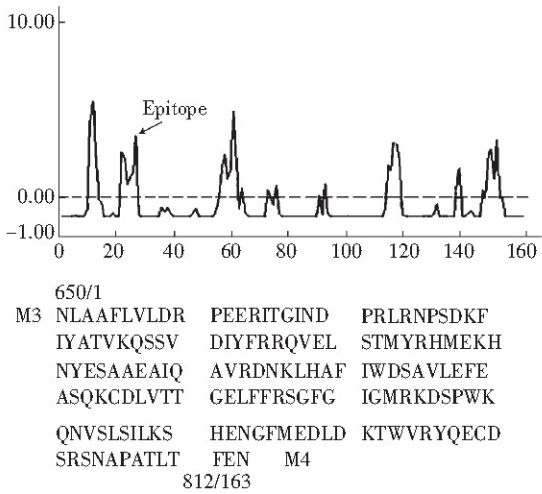


Fig. 1 Linear B cell epitopes (top) and amino acid sequence of the M3-M4 loop in human NR1a protein (bottom)

The epitopes are predicted with multi-parameters of Hopp-Woods hydrophilicity, Janin surface accessibility, Karplus-Schulz flexibility and Welling antigenicity. Arrow points the B epitope of MAB363.

1.2.2 固相合成肽: 由美国 Genemed Synthesis 公司合成. 根据生物信息学对人 NR1 分子 M3-M4 环免疫原性预测结果^[2], 固相合成表位肽 1~5, 为合成方便将表位延长几个氨基酸残基. 同时合成表位肽 1 的 3 种缺失体 7、8、9 和克隆 1 噬菌体展示合成肽, HPLC 纯化后纯度均在 95% 以上 (图 2).

1	Peptide 1	R(22)LRNPSPDKFIY
2	Peptide 2	S(107)GFGIGMRKDSPWKQ
3	Peptide 3	L(2)AAFLVLDRPEERIT
4	Peptide 4	D(150)SRSNAPAT
5	Peptide 5	L(50)STMYRHMKEKHNYES
6	Displayed peptide	VHTNPSTWQPI
7	N deletion	RLRPSPDKFIY
8	NP deletion	RLRSPDKFIY
9	NPS deletion	RLRDKFIY

Fig. 2 Amino acid sequences of synthesized peptides

1.2.3 表位鉴定: 采用竞争性 ELISA 法. 重组肽以 1 μ g/孔包被过夜, 封闭后每孔分别加入 1 mol/ml 的合成肽 1~5、展示肽、缺失肽 7、8 各 50 μ l, 室温孵育 5 min, 再加入 1 : 500 稀释的 MAB363 50 μ l, 二抗为 HRP-羊抗小鼠 IgG 抗体, TMB 系统显色. 无竞争孔不加合成肽, 阴性对照以无关蛋白质为竞争物. 竞争抑制率计算同上.

2 结 果

2.1 MAB363 表位肽的筛选和序列测定

2.1.1 特异性结合噬菌体的富集结果: 每 1 轮筛选中, 洗脱液的噬菌体产量与投入的噬菌体总量之比值, 反映了特异性结合噬菌体的富集程度. 从

表 1 和表 2 可见, 随着筛选轮次的增高, 每一轮的相对产率 (产出/投入) 也在增高, 说明每一轮筛选后与 MAB363 单抗特异性结合噬菌体得到富集, 靶洗脱比酸洗脱富集得更快.

Table 2 Screening of phage display peptide library with MAB363 (Elute with target)

Round of panning	Input phages	Elute phages	Relative yield
1st	4×10 ¹⁰	3.52×10 ⁵	8.8×10 ⁻⁵
2nd	1.5×10 ¹²	9.88×10 ⁷	6.59×10 ⁻⁵
3rd	1.2×10 ¹²	1.51×10 ⁹	1.26×10 ⁻³
4th	1.2×10 ¹¹	1.37×10 ¹⁰	1.14×10 ⁻¹

Table 1 Screening of phage display peptide library with MAB363 (Elute with acid)

Round of panning	Input phages	Elute phages	Relative yield
1st	4×10 ¹⁰	1.83×10 ⁵	4.58×10 ⁻⁶
2nd	1.3×10 ¹²	3.86×10 ⁷	2.97×10 ⁻⁵
3rd	1.7×10 ¹²	9.24×10 ⁸	5.44×10 ⁻⁴
4th	5×10 ¹¹	6.21×10 ⁹	1.24×10 ⁻²

2.1.2 结合噬菌体克隆的序列测定及分析结果: 从第 3 轮和第 4 轮随机挑取共 30 个克隆, 按试剂盒说明提取单链 DNA, 经琼脂糖电泳鉴定 DNA 纯度, 进行 DNA 序列测定, 根据核苷酸序列得到相应的氨基酸序列 (表 3). 两轮中共出现 7 种序列, 分别命名为克隆 1~7, 其中 VHTNPSTWQPIL (克隆 1) 出现频率最高 (23/30), 可能是优势克隆或特异性克隆.

Table 3 Amino acid sequence of the peptides in the screened clones

Round of panning	Elution with acid	Elution with target
3rd	VHTNPSTWQPIL (clone 1) ×2 ¹⁾	VHTNPSTWQPIL (clone 1) ×6
	IGSTQMLLQHVR (clone 2) ×1	NNSPPLYWMHLK (clone 6) ×1
	YNTSLIQLRTL (clone 3) ×1	ALPPSMWAQTSG (clone 7) ×1
	YLDTRYQTPTML (clone 4) ×1	
	TSKTIPIETPM ²⁾ (clone 5) ×1	
4th	VHTNPSTWQPIL (clone 1) ×5	VHTNPSTWQPIL (clone 1) ×10
	YLDTRYQTPTML (clone 4) ×1	

¹⁾ times, ²⁾ 11-mer peptide.

2.2 筛选克隆的 ELISA 鉴定

为鉴定以上 7 种序列的特异性, 分别在不包被孔、包被 MAB363 孔、包被无关单抗 (Desmin) 孔中加入等量的克隆 1~7, 使其结合, 并以无关噬菌体作为阴性对照, 每个样品设 3 个平行. 结果显示只有克隆 1、3、4 能够与 MAB363 特异性结合, 其他克隆不与 MAB363 特异性结合, 说明第 3 轮筛选仍存在非特异性克隆, 而第 4 轮都是阳性克隆, 反映随着产出率的增加, 阳性克隆的确得到富

集 (图 3).

2.3 重组肽竞争噬菌体与抗体的结合

为进一步核实所筛选克隆 1、3、4 的特异性, 以 MAB363 包被 ELISA 板, 分别以不同浓度的重组肽作为竞争物, 进行 ELISA 竞争抑制实验, 发现重组肽可以抑制克隆 1 与 MAB363 的结合, 且抑制率与重组肽的浓度正相关, 但是不能抑制克隆 3 和克隆 4 与 MAB363 的结合, 说明克隆 1 与重组肽识别单抗的同一结合位点, 二者之间存在抗原相

似性; 克隆 3 和克隆 4 尽管也特异性结合 MAB363, 但位点可能与上述不同, 因而不形成竞争 (图 4).

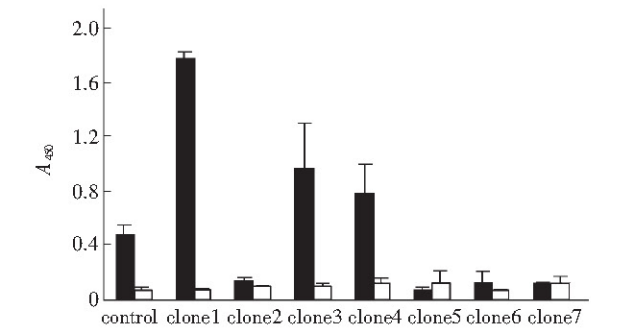


Fig. 3 Binding of screened phages with MAB363 and Desmin determined by ELISA
 A_{450} : $\bar{x} + s$. ■: MAB363; □: desmin.

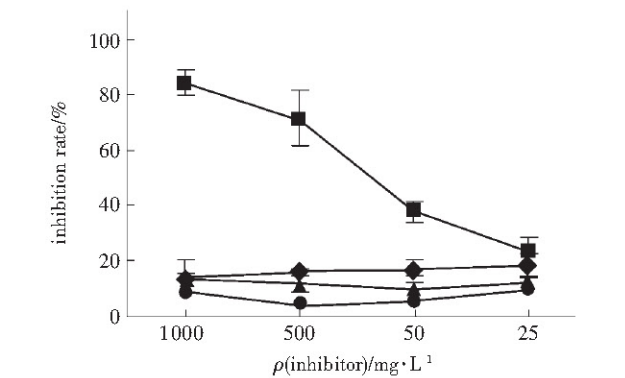


Fig. 4 Competitive inhibition of the binding of positive phage with recombined peptides
■: clone 1; ◆: clone 3; ▲: clone 4; ●: negative control.

2.4 表位鉴定结果

为了进一步确定表位的位置, 综合肽库筛选与生物信息学的结果, 选择 5 个可能的表位进行多肽合成, 并以表位合成肽竞争重组肽与单抗 MAB363 的结合, 只有合成肽 1R (22) LRNPSDKF 有竞争作用, 合成肽 2~5 无竞争作用, 说明 MAB363 识别的表位位于 R (22) LRNPSDKF. 相同摩尔数的情况下 R (22) LRNPSDKF 的抑制率为 79.16%, 展示合成肽 (peptide 6) 的抑制率为 21.63% (图 5). 合成的克隆 1 展示肽 (peptide 6) 尽管不具有天然展示肽的构象, 仍然可以竞争克隆 1 与 MAB363 的结合, 提示该序列与抗体的结合是以氨基酸一级结构为基础, 重组肽的蛋白质印迹结果[6]

也支持 MAB363 识别的是线性表位这一论点.

将 NPS 三个氨基酸残基逐一敲除, 缺失 N 或 NP 的合成肽和 M3-M4 环竞争抗体的能力减弱, 缺失 NPS 的合成肽完全没有竞争能力, 证明 MAB363 的表位为 NPS, S 是关键性残基.

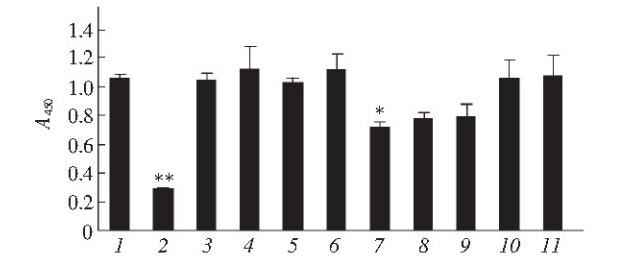


Fig. 5 Competitive inhibition of the binding of M3-M4 recombined peptide with the synthesized peptides and displayed peptide
** $P < 0.01$; * $P < 0.05$. 1: no competitor; 2: peptide 1; 3: peptide 2; 4: peptide 3; 5: peptide 4; 6: peptide 5; 7: displayed peptide; 8: N deletion; 9: NP deletion; 10: NPS deletion; 11: negative control.

3 讨 论

NMDA 受体为膜结合性配体门控离子通道, 一旦激活, 除了可允许一价阳离子 Na^+ 、 K^+ 进出外, 还对二价的 Ca^{2+} 有持续较高的通透性, 受体过渡或持久激活, 使神经元间隙 K^+ 浓度过高, 突触后神经元内 Na^+ 、 Ca^{2+} 超载, 引起一系列理化变化, 导致神经元功能紊乱或损伤[7]. 尽管 NR 拮抗剂已经达到数十种, 但均由于严重的毒副作用和有限的临床效果未能进入临床使用, NR 拮抗剂的研究一时陷入瓶颈. During 等[2]采用 NR1 免疫干预的方法来调控受体的激活状态是一种全新的尝试. 但是, 以全长 NR 分子为免疫原, 对机体具有潜在的自身细胞毒危害[3]. 我们认为, 在全面了解靶分子抗原性的基础上, 构建多价表位疫苗可以解决完整疫苗分子引起的不良反应. 本研究就是在以上目的指导下, 利用噬菌体肽库展示技术获得 MAB363 表位相关克隆, 并采用表位合成肽、竞争抑制试验等技术进行综合分析, 确定了人 NR1 分子 M3-M4 环一个 B 细胞表位, 为表位疫苗免疫干预防治兴奋毒性脑损害策略的实施提供了一个重要线索和依据.

分析抗原表位可采用多种方法, 如合成重叠肽

作图分析、计算机表位预测以及噬菌体表面展示技术等。噬菌体表面展示技术是最为方便而有效的蛋白质抗原表位分析方法^[8]。该技术自 20 世纪 90 年代问世以来,已被广泛应用在分子识别相关领域,从而给抗原表位分析、细胞因子受体拮抗剂研制等方面提供了全新思路与先进手段^[9]。

本文选用 NR1a 单克隆抗体 MAB363 作为淘洗靶标,对噬菌体展示线性 12 肽库进行连续 4 轮生物淘洗,通过酸洗脱和靶洗脱共得到 7 种不同序列,间接 ELISA 结合实验证明克隆 1、3、4 与 MAB363 的结合与恒定区和封闭剂无关,是特异性阳性克隆。我们用原核表达的人 NMDA 受体 M3-M4 环重组肽竞争阳性克隆与 MAB363 结合,结果发现,重组肽可以抑制克隆 1 与 MAB363 结合,且抑制率与重组肽浓度正相关,但是不能抑制克隆 3 和克隆 4 与 MAB363 结合。以上说明克隆 1 与重组肽识别单抗的同一结合位点,二者之间存在抗原相似性;克隆 3 和克隆 4 尽管也特异性结合 MAB363,但位点与上述不同,因而不构成竞争。

将噬菌体克隆 1 展示肽与 M3M4 氨基酸序列比对后发现,二者存在一致序列:NPS。生物信息学根据氨基酸亲水性、表面可及性、电荷以及蛋白质二级结构预测 RLRN(74)PS 是 NR1 M3-M4 环中 B 细胞表位之一,这与 VHTNPSTWQPIL 存在一定相似性,所以 MAB363 识别的表位可能就位于 RLRN(74)PS 或者就是 NPS。克隆 1 NPS 两翼的亲水性氨基酸残基 H、T、Q 可能使此 12 肽与 MAB363 的结合力更强,从而被特异性筛选出来。固相合成的表位肽中 R (22) LRNPSDKDF 能竞争重组肽与单抗 MAB363 的结合。将 NPS 三个氨基酸残基逐一敲除,缺失 N 或 NP 的合成肽和 M3-M4 环竞争抗体的能力减弱,缺失 NPS 的合成肽完全没有竞争能力,证明 MAB363 的表位为 NPS, S 是关键性残基。

通过以上研究我们获得了 NR1 分子 M3M4 环上一个 B 细胞表位,而且由于 MAB363 是一种自身抗体,所以其识别表位可能具有自身免疫原性,这为下一步构建表位合成疫苗,诱导产生 NR1 自身抗体和干预 NMDA 受体功能防治兴奋毒性脑损害的研究,提供了一个重要线索和依据,有关工作正在深入进行中。

参 考 文 献

- 1 孙长凯. 抗兴奋毒性神经损伤与抗谷氨酸信号传递障碍. 见: 贾建平编. 神经内科新进展. 北京: 人民卫生出版社, 2003. 210~218
Sun C K. Strategies against excitotoxic neuron injury and glutamate signal transmission disorder. In: Jia J P ed. Progress in Neurology. Beijing: People Health Press, 2003. 210~218
- 2 During M J, Symes C W, Lawlor P A, *et al.* An oral vaccine against NMDAR1 with efficacy in experimental stroke and epilepsy. *Science*, 2000, **287** (5457): 1453~1460
- 3 孙长凯, 赵 杰, 李武举, 等. NMDA 受体主亚基上两个受体激活相关多肽的理化特性与抗原性分析. *中华医学杂志*, 2002, **82** (1): 50~53
Sun C K, Zhao J, Li W J, *et al.* *Natl Med J China*, 2002, **82** (1): 50~53
- 4 Siegel S J, Browne N, Janssen W G, *et al.* Regional, cellular, and ultrastructural distribution of N-Methyl-D-aspartate receptor subunit 1 in monkey hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (2): 564~568
- 5 Wood M J A, Vincent A. Neuroprotective autoimmunity—a double-edged sword? *Nature Med*, 2000, **6** (4): 383~385
- 6 刘淑红, 孙长凯, 张玉梅, 等. 人 NR1 靶片段的原核表达. *军事医学科学院院刊*, 2002, **26** (3): 188~190
Liu S H, Sun C K, Zhang Y M, *et al.* *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*, 2002, **26** (3): 188~190
- 7 David R L, Rodney P G. Excitotoxicity: Perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, **300** (3): 717~723
- 8 Yip Y L, Ward R L. Epitope discovery using monoclonal antibodies and phage peptide libraries. *Comb Chem High Throughput Screen*, 1999, **2** (3): 125~138
- 9 Cesareni G, Castagnoli L, Cestra G. Phage display peptide libraries. *Comb Chem High Throughput Screen*, 1999, **2** (1): 1~17

Screening of a NMDA Receptor Epitope From Random Phage Display Peptide Library*

KANG Xiao-Nan¹⁾, SUN Chang-Kai¹⁾ **, FAN Ming²⁾ **, XUE Yan-Ning²⁾,
SHAO Ning-Sheng²⁾, ZHAO Jie¹⁾, HAN Da-Yue³⁾, SHI Guang-Xia⁴⁾

¹⁾ *Institute for Brain Disorders, Dalian Medical University, Dalian 116027, China;*

²⁾ *Institute of Basic Medical Science, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;*

³⁾ *210 Hospital of PLA, Dalian 116021, China;*

⁴⁾ *Department of Pathophysiology, Dalian Medical University, Dalian 116027, China)*

Abstract To determine the B cell epitope of a monoclonal antibody against the M3-M4 loop of NMDAR1, a random phage displayed dodecapeptide library was screened with the monoclonal antibody MAB363 against the M3-M4 loop of NMDAR1. After four rounds of biopanning, the peptide sequences of positive phage clones were determined and analyzed by DNA sequencing, ELISA and competitive inhibition assay. A positive clone was found (clone1: VHTNPSTWQPIL). The binding between clone1 and MAB363 were competitively inhibited by the recombinant M3-M4 loop expressed by *E. coli* DH5 α ; The binding between M3M4 and MAB363 could be competitively inhibited by one of solid-synthesized epitope peptides: RLRNPSKD. There were identical sequences among them: NPS. Deleted with NPS, the peptide could not inhibit the binding of MAB363 to M3-M4. These results demonstrate that NPS in M3-M4 loop is the B cell epitope recognized by MAB363, which may be important for developing a practical immunization strategy against excitotoxic brain injury.

Key words phage display, B cell epitope, NMDA receptor

* This work was supported by grants from The Natural Science Foundation of China (30070267), Science Foundation for Postdoctors of China (2001), Science and Technology Foundation of Liaoning Province (2001226005).

** Corresponding author. Tel: 86-411-4721396, E-mail: cksun110@mail.dlptt.ln.cn

Received: December 25, 2002 Accepted: February 27, 2003