

# 拟南芥 LFR 原核重组蛋白纯化和多克隆抗体制备\*

高宁 王志娟 曾博 崔素娟\*\*

(河北师范大学生命科学院分子细胞生物学实验室, 石家庄 050016)

**摘要** 拟南芥中有一类含 ARM 结构域的蛋白质, 研究表明它们中的一些在植物的生长发育和激素应答等方面发挥着重要的作用. 在拟南芥突变体筛选中, 获得了一个推测编码蛋白含 ARM 重复序列的新基因突变体 *lfr* (leaf and flower related mutant), 它在叶子和花的发育过程中表现出较明显的表型. 为进一步研究该基因编码蛋白的生物学功能及其分子作用机制, 构建了 pGEX-2TGST: LFR 融合蛋白重组表达载体, 将重组质粒转化到工程菌中诱导表达菌体蛋白, 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 结果表明, 融合重组蛋白成功获得了高效表达, 分子质量在 77 ku 左右. 重组蛋白经谷胱甘肽 S-转移酶(GST) 标签蛋白亲和层析法纯化, SDS-PAGE 制备胶割胶富集, 电洗脱法纯化后得到纯度较高的抗原. 经对新西兰兔进行 5 次免疫, 获得了多克隆抗血清. 采用免疫吸附方法对抗血清进行了纯化, 结果得到只识别 LFR 重组蛋白的抗血清. 进一步提取拟南芥野生型及突变体的核蛋白, 经蛋白质印迹检测, 结果显示, 在分子质量 50 ku 左右处出现特异的蛋白质条带, 证明所制备的抗血清可以与拟南芥 LFR 蛋白特异性结合.

**关键词** 拟南芥, LFR 重组蛋白, 原核表达, 多克隆抗体

**学科分类号** Q78

ARM 重复序列是一类重要的介导蛋白质-蛋白质相互作用的结构域, 由 42 个氨基酸构成高度保守的  $\alpha$  右手超螺旋, 普遍存在于真核细胞中, 参与了信号转导, 胞质内调节, 核转运, 转录调节和泛素化等重要的生理过程<sup>[1]</sup>. 第一个被发现的具有 ARM 重复结构域的蛋白质是果蝇  $\beta$ -catenin 蛋白, 随后在植物中也发现了大量含有此结构域的功能蛋白, 如芸苔属植物中的 ARC1, 土豆中的 PHOR1, 烟草中的 *Nt*PUB4, 水稻中的 SPL11 等, 它们在植物花粉自交不亲和, 对光和赤霉素的应答和调控细胞凋亡与防御反应中发挥着重要功能<sup>[2-5]</sup>.

推测拟南芥中含有 108 个具有 ARM 结构域的蛋白质, 已有研究表明它们中的一些在拟南芥的生长发育和激素应答方面发挥着重要的调节作用<sup>[1,6-8]</sup>, 但仍有很多这类蛋白质的功能还未知. 我们通过正向遗传学方法获得了一个推测含 ARM 结构域的新基因的点突变体, 它在叶子和花的发育过程中表现出严重的表型, 将其命名为 *lfr* (Wang Zhijuan 等, 待发表).

本研究在利用基因工程手段获得了 LFR 基因基础上, 将该基因连接到表达载体上, 转入工程菌

中诱导表达, 利用纯化的重组蛋白制备了可以识别拟南芥 LFR 蛋白的多克隆抗体, 这为从分子水平上研究该基因功能奠定了基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂.** *Bam*H I 和 *Eco*R I 限制性内切酶购自 Takara 公司; T4DNA 连接酶购自 Takara 公司; 胶回收试剂盒购自上海生工生物技术公司; DNA 分子质量标准购自天根公司; Glutathione Sepharose FF4B 购自 GE 公司; 弗式佐剂购自 Sigma 公司; 碱性磷酸酶(AP)标记的山羊抗兔抗体为北京中杉公司产品; GST 抗体购自 Amersham 公司; 低分子质量蛋白标准购自 Fermentas 公司.

**1.1.2 载体与菌株.** pGEX-2T 表达载体, Rosetta 工程菌均由本室保存.

\* 国家重大科学研究计划项目(2006CB910600), 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-06-0256).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 0311-86269144, E-mail: cuisujuan@263.net

收稿日期: 2008-01-16, 接受日期: 2008-03-13

**1.1.3 实验动物.** 成年雄性新西兰兔 2.5 kg, 购自河北医科大学动物实验中心.

## 1.2 方法

**1.2.1 重组质粒构建与鉴定.** 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切已克隆载体 pGEM-T-*LFR*, 回收插入的 *LFR* 片段, 连接至经同样酶切的 pGEX-2T 表达载体, 构建重组表达质粒 pGEX-2T*GST*:*LFR*, 转化至 Rosetta 工程菌. 提取质粒酶切, 对插入片段大小进行琼脂糖电泳鉴定.

**1.2.2 重组蛋白在大肠杆菌中的诱导表达.** 鉴定好的单克隆接种于 5 ml LB 液体培养基(50 mg/L 的 Amp), 180 r/min, 37°C 培养过夜, 再按 1:50 的比例转接于含 100 ml LB 液体培养基(50 mg/L 的 Amp) 的三角瓶中, 37°C 摇床培养至吸光度在 0.6~0.8 之间, 加异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度 1 mmol/L, 37°C 诱导表达, 分别于 1 h, 3 h, 5 h 收集菌体.

**1.2.3 重组蛋白表达检测和溶解性检测.** 诱导菌液及未诱导菌液 2 ml, 12 000 r/min 离心, 弃上清, 向沉淀中加入 100  $\mu$ l 上样缓冲液(2 $\times$ ), 混匀, 金属浴加热 10 min, 12% SDS-PAGE 分离胶电泳检测. 离心收集 100 ml 诱导后 3 h 菌体, 用 PBS (0.14 mmol/L NaCl, 0.002 7 mmol/L KCl, 0.01 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.001 8 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.3) 重悬菌体, 于冰水上以超声波(300 W, 10 s 超声, 10 s 间歇)裂解菌体, 于 4°C, 25 000 g, 10 min 离心, 分别取上清和沉淀加入 50  $\mu$ l 上样缓冲液(2 $\times$ ), 混匀, 金属浴加热 10 min, 12% 分离胶电泳检测.

**1.2.4 GST 亲和层析分离与电洗脱法纯化表达蛋白.** 将诱导后 3 h 菌体裂解液离心后, 上清用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤, 上样(流速 0.2 ml/min), PBS 淋洗 10 个柱体积(流速 1 ml/min), 洗脱液(10 mmol 还原型谷胱甘肽, 50 mmol Tris)洗脱(流速 1 ml/min), 收集洗脱峰, 用 SDS-PAGE 检测融合蛋白的纯度. 将数次收集的洗脱峰蛋白用 12% SDS-PAGE 进行分离, 将电泳后的凝胶用蒸馏水淋洗干净, 再浸泡在预冷的 0.25 mol/L KCl 中染色, 2~5 min 后即可显色, 显色后从凝胶上切下目的带, -20°C 保存. 收集一定量后, 将蛋白质条带切碎置于透析装置中加入适量电泳缓冲液, 电泳槽中恒压 80 V 电泳, 3.5 h, 换不含 SDS 的电极缓冲液, 恒压 80 V 电泳, 0.5 h, 收集洗脱蛋白存放于 -20°C. 用 12% SDS-PAGE 检测其分离产物纯度.

**1.2.5 兔抗血清制备.** 将纯化好的表达蛋白与弗氏完全佐剂混合乳化, 使目的蛋白浓度为 1 g/L, 作为免疫原, 按每只兔每次 1 ml 剂量, 背部脊柱两侧 6 点以及腹股沟注射, 共 8 点, 首次免疫皮内注射, 以后皮下注射, 每次间隔 14 天, 每次剂量与第一次相同, 与弗氏不完全佐剂混合乳化, 共加强免疫 5 次. 第 3 次免疫后进行试血, 于第 5 次免疫后第 8 天颈动脉插管收集全血, 分离血清, 补体灭活, 加入叠氮钠分装, -80°C 冷冻保存.

**1.2.6 兔抗血清纯化.** 制备抗体吸附用的大肠杆菌全菌蛋白: 诱导含有 pGEX-2T*GST* 表达载体的工程菌 3 h, 于 4°C 以 5 000 r/min 离心 10 min, 回收菌体后用 PBS 重悬浮菌体, 溶菌裂菌, 超声裂菌. 加入丙酮, 室温静置 30 min 沉淀蛋白, 4°C, 4 000 r/min 离心 20 min, 回收蛋白质沉淀后加入 100 mmol/L NaCl 重悬蛋白质沉淀, 丙酮重复沉淀蛋白质 1 次, 4°C, 4 000 r/min 离心 20 min, 回收蛋白质沉淀 37°C 约 24~48 h 直至蛋白质干燥. 将蛋白质研磨成粉状, 10 ml PBS 洗 2 次, 回收蛋白质沉淀, 加入 PBS 混悬蛋白质沉淀使每毫升混悬液含有 0.1 g 蛋白质, 分装并储存于 -20°C. 抗血清的纯化: 将 1 ml 的多克隆抗血清与等体积的上述蛋白质混悬液混合, 室温振荡 3 h 后, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, -80°C 保存备用.

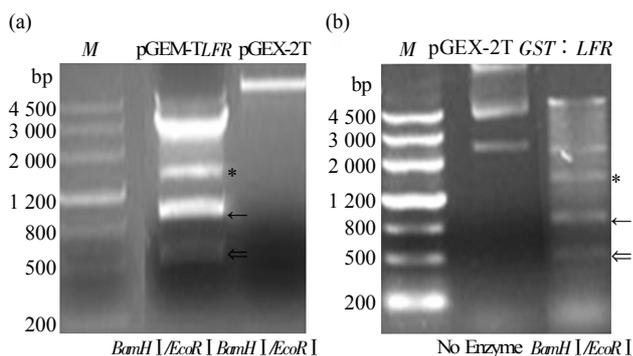
**1.2.7 拟南芥核蛋白提取.** 选取拟南芥 col 野生型 9 天小苗 2 g, 加入 4 ml 提取缓冲液(0.3 mol/L 蔗糖, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L NaCl, 15 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L 巯基乙醇, pH7.4)匀浆破碎细胞, 经三层滤膜过滤后弃去沉渣, 将上清液 350 g, 4°C, 8 min 离心, 弃去上清, 沉淀用含 1% TritonX-100 的提取缓冲液重悬, 350 g, 4°C, 8 min 离心, 弃去上清, 沉淀再用提取缓冲液重悬, 350 g, 4°C, 8 min 离心收集, 加入 100  $\mu$ l 上样缓冲液(2 $\times$ ), 混匀, 金属浴加热 10 min, -20°C 保存.

**1.2.8 蛋白质印迹检测.** 将 pGEX-2T-*GST*:*LFR* Rosetta 表达菌, pGEX-2T*GST* Rosetta 表达菌及拟南芥 col 野生型 9 天小苗核蛋白经上样处理后进行 SDS-PAGE, 通过半干电转仪转至 PVDF 膜上 (22 V, 45 min), 利用上述制备的免疫血清为一抗 (1:500), 用碱性磷酸酶标记(AP)的羊抗兔二抗 (1:500), 进行蛋白质印迹检测.

## 2 结 果

### 2.1 重组 GST : LFR 融合蛋白表达载体的构建与鉴定

在已克隆的 pGEM-T *LFR* 基础上, 构建拟南芥 *LFR* 基因原核表达载体 pGEX-2T *GST : LFR*. *Bam*H I, *Eco*R I 双酶切 pGEM-T *LFR* 重组载体得到 1 380 bp 的 *LFR* 基因, 同时用相同的双酶切 pGEX-2T 载体得到高分子线性片段(图 1a). 将 1 380 bp 的 *LFR* 基因与双切后的 pGEX-2T 线性片段的连接产物, 转化 Rosetta 筛选出阳性克隆, 提取质粒进行双酶切鉴定(图 1b). 由于 *LFR* 基因内部含有 *Bam*H I 酶切位点, 因此用 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切可得到完整的 *LFR* 基因 1 380 bp 和其部分酶切片段 500 bp 和 880 bp. 进一步测序表明得到的重组质粒 pGEX-2T *GST : LFR* 中 *LFR* 序列及融合阅读框正确.



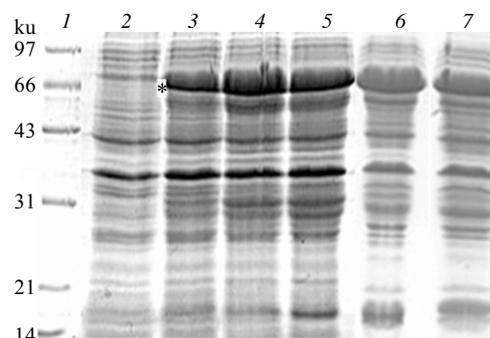
**Fig. 1 Construction and identification of pGEX-2T *GST : LFR* by enzyme digest**

Restrictive enzyme digestion products of plasmids were separated by 1% agarose stained with Goldview nucleic acid stain. *M*: DNA molecular mass marker; \*, ← and ⇐ showed 1 380 bp, 880 bp and 500 bp *LFR* fragment partly digested by *Bam*H I and *Eco*R I.

### 2.2 重组 GST : LFR 融合蛋白在大肠杆菌中的表达

将鉴定正确带有 pGEX-2T-*GST : LFR* 载体的 Rosetta 菌株, 接种到 LB 培养基中, 培养至  $A_{600}$  为 0.6~0.8 生长期时, 加诱导剂 IPTG, 分别于 1 h、3 h、5 h 后取样, 12% 不连续 SDS-PAGE 检测与诱导前菌体全蛋白相比, 诱导 1 h 后, 即在约 77 ku 处有目的蛋白条带的出现, 随着诱导时间的延长, 该蛋白质条带的量有所增加, 3 h 时较 5 h 时还要多些. 取 3 h 诱导菌体超声破碎后离心, 收集上清, 12% SDS-PAGE 检测, 表明该重组表达蛋白以可溶性形式表达(图 2), 离心收集的菌体沉淀

蛋白中经检测也含有重组蛋白, 可能是因为沉淀中有未破碎的菌体和以包涵体形式表达的重组蛋白.

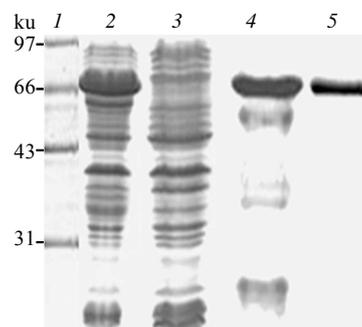


**Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant proteins expression in Rosetta bacteria**

1: Standard protein marker; 2: About 30  $\mu$ g total bacteria proteins before added IPTG; 3, 4, and 5: About 30  $\mu$ g total bacteria proteins at 1 h, 3 h, and 5 h after added IPTG; 6: About 30  $\mu$ g supernatant proteins of 3 h induced bacteria lysate. 7: 30  $\mu$ g deposition proteins of 3 h induced bacteria lysate. Star (\*) showed recombinant *GST : LFR* protein.

### 2.3 GST : LFR 重组蛋白的分离纯化

诱导 3 h 的菌体蛋白经 GST 标签亲和层析分离后, 得到一个单一峰, 将该峰收集液经 12% SDS-PAGE 分离, 此峰中含有大量的 77 ku 目标蛋白和少量小分子质量的杂蛋白或降解产物的小分子片段, 为得到较纯的 77 ku 重组融合蛋白, 将收集到的洗脱峰蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离, 切取 77 ku 蛋白质条带, 电洗脱纯化, 进一步 SDS-PAGE 电泳检测证实得到了较纯的 77 ku 目的条带, 且纯度大于 95%(图 3). 所制得的抗原可以用于免疫动物制备抗血清.

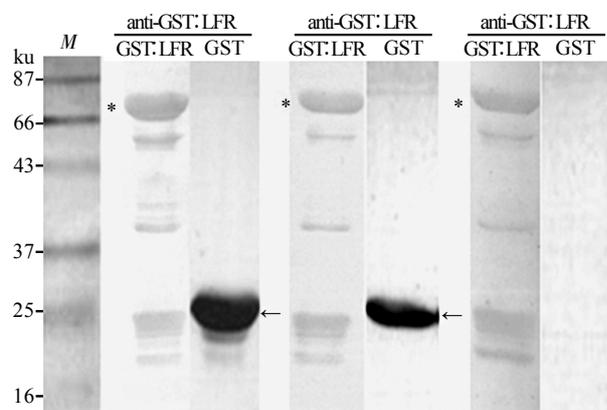


**Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified *GST : LFR* recombinant protein**

1: Standard protein marker; 2, 3: About 30  $\mu$ g protein before or after incubation with Glutathione Sepharose FF4B; 4: About 15  $\mu$ g eluted proteins from GST-tag affinity chromatography; 5: About 5  $\mu$ g protein *GST : LFR* recombinant protein further purified by electroelution.

### 2.4 抗血清的纯化及特异性检测

经 5 次免疫后获得了兔抗血清，为检测抗血清识别抗原的特异性，进行了蛋白质印迹分析(图 4)。所制备的抗血清 anti-GST:LFR 既可以识别工程菌的重组 GST:LFR 融合蛋白，同时也可以识别 GST 标签蛋白。商品化抗 GST 抗体识别条带与我们所制备的抗血清识别条带一致。为了去除识别 GST 标签及菌体蛋白的非特异性抗体，采用丙酮沉淀法制备了含有 GST 的菌体蛋白，免疫沉淀方式对所制备的抗血清进行了纯化。经蛋白质免疫印迹检测，表明纯化后的 anti-LFR 抗血清只识别重组 LFR 蛋白，不再识别 GST 标签。这说明我们得到了特异性识别重组 LFR 的抗血清 anti-LFR。

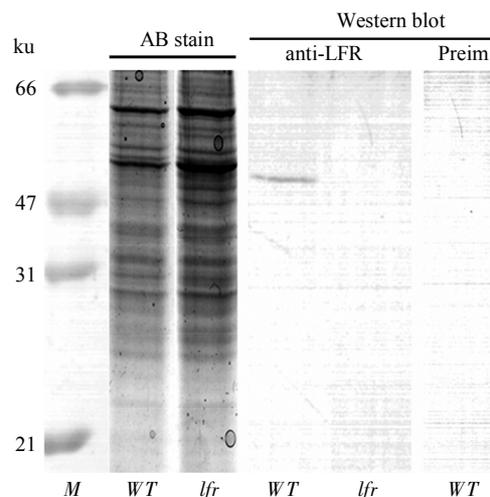


**Fig. 4 Western blot analysis of purified anti-LFR antiserum**

About 30  $\mu$ g total bacteria proteins with recombinant GST:LFR or GST were separated by 12% SDS-PAGE, transferred onto PVDF membrane, blotted individually with rabbit unpurified anti-GST:LFR serum (1:500 dilution), anti-GST serum bought from Amersham (1:500 dilution), or purified anti-LFR serum (1:500 dilution). M: Standard protein marker. Star (\*) showed recombinant GST:LFR protein band; Arrow (←) showed GST tag protein band.

### 2.5 抗血清可识别拟南芥内源 LFR 蛋白

进一步检测所制备的 anti-LFR 抗血清是否识别拟南芥中的天然 LFR 蛋白。由于我们已经观察到 LFR 在细胞核内分布(Wang Zhijuan, 待发表)，因此富集了拟南芥野生型和 *lfr* 突变体 9 天幼苗的细胞核，制备了核蛋白样品，进行了蛋白质免疫印迹分析(图 5)。结果表明，anti-LFR 抗血清可以在野生型中特异识别一条分子质量约为 50 ku 的条带，这与分析推测拟南芥 LFR 蛋白的分子质量一致，而在 *lfr* 突变体和免疫前血清在相似的位置无识别条带。这说明我们所制备的 anti-LFR 抗血清可以特异识别植物中的天然蛋白。



**Fig. 5 Western blot analysis of LFR protein in Arabidopsis**

About 15  $\mu$ g protein nuclear proteins, extracted from *Arabidopsis* 9-day seedlings of col and *lfr*, were separated by 12% SDS-PAGE, transferred onto PVDF membrane, blotted individually with rabbit anti-LFR serum or preimmuno-serum. AB stain: amino-black stain; M: Standard protein marker; WT: *Arabidopsis* col-0 nuclear proteins. *lfr*: *lfr* nuclear proteins.

## 3 讨 论

利用基因工程获得融合蛋白是目前分子生物学常用的一种方法，本文采用了原核工程菌表达重组蛋白的方式获得目标蛋白。通过对 *LFR* 基因开放读码框的分析，发现它含有大量稀有密码子编码的氨基酸，因此本文选用了 Rosetta 表达菌株，它含有一个可兼容的氯霉素抗性质粒，可提供 AUA AGG AGA CUA CCC GGA 等 6 种 tRNA，实现在天然大肠杆菌中进行原核蛋白和真核蛋白“通用形”翻译。由于 LFR 原核表达重组蛋白存在于菌体可溶性部分(图 2)，这为进一步纯化提供了便捷。同时我们观察到重组 GST:LFR 融合蛋白在亲和层析过程中，出现降解现象(图 3)，说明该蛋白质不是十分稳定，分析原因我们认为可能是亲和层析时间较长造成的。为得到比较纯的目的蛋白我们又采用了制备胶富集目的蛋白条带，电洗脱回收方式，得到了满足抗体制备需要的高纯度抗原(图 3)，经免疫兔后得到了效价较高的抗血清(图 4)。

多克隆抗体的制备方法成熟、过程简单，因此被广泛使用，但由于其中除了含有高效价的抗目的蛋白抗体外，也有一部分抗体中其他非目的蛋白和所连标签蛋白的抗体，所以特异性往往受到影响。目前去除抗血清中交叉反应的抗体多采用特异

性选取亲和层析法, 即借助目的蛋白通过抗原抗体反应, 吸附针对目的蛋白的特异抗体, 再进行抗血清的洗脱<sup>[9]</sup>。但由于抗血清中含有大量的脂蛋白及具有较强疏水性蛋白, 所以采用亲和层析法不但会降低纯化效率还会缩短层析柱使用寿命, 另一方面在分离抗原-抗体复合物时由于使用了低 pH 缓冲液还会损伤抗体活性使抗体效价大幅度下降<sup>[10]</sup>。本文选择了非特异性取代纯化法, 即利用含有表达 GST 标签蛋白在内的菌体全蛋白, 通过抗原抗体反应去除非特异性交叉反应抗体, 在实现了去除非特异抗体的同时又没有对效价造成明显影响(图 4), 一次可纯化大量抗血清, 且过程简单、省时省力。本文制得的抗体不只是识别原核表达的重组蛋白(图 4), 而且还可以特异识别拟南芥中的天然蛋白(图 5), 说明该抗体是高效特异的。多克隆抗体的成功制备为研究拟南芥 LFR 蛋白功能奠定了基础, 也为其免疫定位和研究与其相互作用的蛋白提供了工具。

### 参 考 文 献

- Samuel M A, Salt J N, Shiu S H, *et al.* Multifunctional arm repeat domains in plants. *Int Rev Cytol*, 2006, **253**: 1~26
- Aberle H, Bauer A, Stappert J, *et al.*  $\beta$ -catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J*, 1997, **16**(13): 3797~3804
- Amador V, Monte E, Garcia-Martinez J L, *et al.* Gibberellins signal nuclear import of PHOR1, a photoperiod-responsive protein with homology to *Drosophila armadillo*. *Cell*, 2001, **106**(3): 343~354
- Azevedo C, Santos-Rosa M J, Shirasu K. The U-box protein family in plants. *Trends Plant Sci*, 2001, **6**(8): 354~358
- Dingwall C, Laskey R A. Nuclear import: a tale of two sites. *Curr Biol*, 1998, **8**(25): R922~924
- Yasunari F, Miki F. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2005, **17**(12): 3470~3488
- Downes B P, Stupar R M, Gingerich D J, *et al.* The HECT ubiquitin-protein ligase (UPL) family in *Arabidopsis*: UPL3 has a specific role in trichome development. *Plant J*, 2003, **35**(6): 729~742
- Gu T S, Mazzurco M. Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the S-locus receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(1): 382~387
- 张晓楠, 黄 勇. 兔抗 Red 蛋白抗血清的纯化及 MC3T3 细胞中 Red 蛋白表达时相的分析. *科学技术与工程*, 2006, **6**(6): 681~685
- Zhang X N, Huang Y. *Science Technology and Engineering*, 2006, **6**(6): 681~685
- 邢小红, 吴元明, 黄 高. 兔抗人 Bit 1 抗血清的制备及其纯化. *细胞与分子免疫学杂志*, 2004, **20**(6): 764~768
- Xing X H, Wu Y M, Huang G. *J Cell Mol Immun*, 2004, **20**(6): 764~768

## Purification of *Arabidopsis* LFR Recombinant Protein in Engineering Bacteria and Preparation of Its Antibody\*

GAO Ning, WANG Zhi-Juan, ZENG Bo, CUI Su-Juan\*\*

(Institute of Molecular and Cell Biology, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China)

**Abstract** Genome of *Arabidopsis* has a kind of genes encoding proteins with ARM repeat domains and some of these proteins are known to play important roles in plant development and responses to hormone. An *Arabidopsis* mutant *lfr* with a distinct phenotype was got in leaf and flower development. The gene is predicted to encode a protein with ARM repeat domains. In order to study its function and molecular mechanism, recombination expression plasmid pGEX-2TGST:LFR was constructed and transformed into the host bacteria strain Rosetta. Then IPTG was used to induce the recombinant protein expression in engineering strain. The expression products were detected by 12% SDS-PAGE. The GST:LFR fusion protein was existed in soluble form with a relative molecular mass 77 ku, which is fit with the molecular mass supposed from gene coding frame. After purification by GST-tag affinity chromatography and electroelution, the fusion protein was used as antigen to prepare polyclonal antiserum in rabbits. After the fifth injection of antigen, the antiserum was obtained and further purified by decreased nonspecific bacteria and GST-tag antibody with method of immuno-precipitation. Western blot analysis showed that the purified antiserum, raised against the recombination LFR protein in rabbits, could react to the recombinant protein expressed in Rosetta specifically. And then the nuclear proteins of *Arabidopsis* wild type

and mutant were extracted and separated by SDS-PAGE. Western blot assays revealed that there was a protein band, with a relative molecular mass 50 ku, indicating that antiserum could react to the native protein expressed in *Arabidopsis* specifically.

**Key words** *Arabidopsis*, LFR recombinant protein, prokaryotic expression, polyclonal antibody

---

\*This work was supported by grants The National Key Scientific Program (2006CB910600) and Program of New Century Excellent Talents in University (NCET-06-0256).

\*\*Corresponding author. Tel: 86-311-86269144, E-mail: cuisujuan@263.net

Received: January 16, 2008 Accepted: March 13, 2008