

人源 microRNA 分子表达库的构建*

崔 军^{1,2)**} 付汉江^{1)**} 冯军军¹⁾ 朱 捷¹⁾
铁 轶¹⁾ 邢瑞云¹⁾ 汪成富²⁾ 郑晓飞^{1)***}

(¹⁾军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850;

²⁾苏州大学生命科学学院, 苏州 215123)

摘要 microRNA (miRNA) 是一类长度为 22 nt 左右的单链非编码小 RNA 分子, 通过与靶 mRNA 分子结合而沉默其表达. 目前, 虽然在多种生物中发现了大量的 miRNA, 但对它们的功能还知之甚少. 为了深入研究 miRNA 的功能, 构建了一个包括 170 多种人源 miRNA 表达载体的 miRNA 分子表达库, 并对部分表达载体采用 RNA 印迹及双荧光素酶分析技术进行验证. 实验证明: 这些 miRNA 表达载体在 HEK-293 细胞内可以高水平表达 miRNA 前体和成熟的 miRNA, 并且能抑制含有相应靶位点的报告基因的表达. 这些结果表明: 该 miRNA 表达库可以表达功能 miRNA, 并可用于 miRNA 功能的筛选和研究.

关键词 miRNA, 表达库, 功能筛选

学科分类号 Q75

研究表明, 细胞内不仅含有 mRNA, 还含有大量的非编码 RNA, 它们虽然不编码蛋白质, 但广泛参与基因的表达调控. 近年来所发现的 miRNA (microRNA) 就是其中一种有着重要功能的非编码 RNA. miRNA 有典型的发夹结构前体, 它的加工成熟过程分为两步: 细胞先生成 pri-miRNA, pri-miRNA 在核内被 Drosha 酶加工成具有发夹结构的前体^[1], 即 pre-miRNA. pre-miRNA 转运到细胞质^[2]后在 Dicer 酶的作用下被加工为 20~25 nt 成熟的 miRNA^[3].

到目前为止, 在人类细胞中已发现了数百种 miRNA 基因^[4], 随着 miRNA 预测及克隆技术的发展, 相信 miRNA 的数量会进一步增加. miRNA 通过调控基因的表达在生命过程中起着非常重要的作用, 广泛参与机体生长、发育、疾病发生等各种生命过程. miRNA 与细胞癌变的关系也极为密切, 现已发现 miRNA 与肺癌、结直肠肿瘤、伯基特淋巴瘤和慢性淋巴细胞白血病等多种肿瘤疾病有关^[5]. Lu 等^[6]证明, miRNA 的表达模式可以用于癌症的诊断, 根据 miRNA 的表达特征可以划分人类癌症以及区分正常细胞和癌细胞, 甚至能够鉴别出那些从外形上无法确定的癌细胞. 但是, 相对于人类细胞的数百条 miRNA 基因, 只有极少数的功能得到

了明确的揭示, 而其他更多 miRNA 的功能尚有待深入研究. 与 mRNA 类似, 抑制及过表达 miRNA 也是研究其功能的两种重要手段. 随着 miRNA 数量的不断增加, 建立 miRNA 表达库, 进行大规模的 miRNA 功能筛选, 成为 miRNA 功能研究的一个重要手段. 本研究构建了大规模的 miRNA 表达载体库, 并进行了表达检测及功能验证, 为通过大规模功能筛选以获得具有明确功能的 miRNA 基因奠定基础.

1 材 料

1.1 细菌, 细胞和质粒

JM109 细菌菌株, HepG2 细胞和 HEK-293 细胞, 质粒载体 pcDNA3.0 (Invitrogen 公司). 荧光素酶报告基因表达载体 pGL3-Control (Promega 公司) 均由军事医学科学院放射与辐射医学研究所保存.

1.2 试剂

限制性内切酶 *Xho* I、*Hind* III、*Bam*H I 和 *Xba* I 购自 NEB 公司; T4 DNA 连接酶购自大连宝

*国家重点基础研究发展计划资助项目(973)(2002CB513103)和国家自然科学基金资助项目(30470899, 30500299).

共同第一作者. * 通讯联系人.

Tel: 010-66932210, E-mail: zhengxf@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2006-09-14, 接受日期: 2006-10-20

生物公司; Proybest Taq 酶购自大连宝生物公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京天根生物公司; 质粒提取试剂盒购自 Promega 公司; DMEM 培养基, 新生牛血清、Trizol 试剂和脂质体 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司; 杂交液 ULTRAhyb Oligo 购自 Ambion 公司.

2 方 法

2.1 miRNA 表达载体的构建

2.1.1 目的片段的扩增. 依据 Sanger miRBase 数据库收录的 miRNA 数据, 根据 pri-miRNA 序列设计引物, 在 pre-miRNA 两侧各保留约 100 bp 序列, 依据不同 miRNA 基因序列, 扩增产物的总长度约为 250~350 bp. 在上游引物 5' 端依据 miRNA 序列不同, 设计酶切位点 *Hind*Ⅲ或 *Bam*H I, 在下游引物 5' 端依据 miRNA 序列不同, 设计酶切位点 *Xho* I 或 *Xba* I. 引物由上海英俊生物技术公司合成. 用 PCR 的方法分别从 HepG2 细胞基因组上扩增含有不同 miRNA 基因的目的片段. PCR 反应体系为: 5' 引物 0.5 μ l (0.2 g/L), 3' 引物 0.5 μ l (0.2 g/L), 模板 1 μ l (0.5 g/L), 2.5 mmol/L dNTP 混合物 2 μ l, 10 $\times$ PCR 扩增缓冲液 2 μ l, Proybest DNA 聚合酶 1 U, 无菌水补至 20 μ l. PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min. 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 按琼脂糖凝胶回收试剂盒说明书回收目的片段.

2.1.2 表达载体的连接、测序及序列分析. 分别将回收不同 miRNA 基因的 PCR 产物和质粒载体 pcDNA3.0, 用相应限制性核酸内切酶进行双酶切, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收酶切后的目的片段和载体大片段. 分别于 16 $^{\circ}$ C 连接目的片段和载体, 转化 JM109 感受态细胞, 用菌落 PCR 方法鉴定. 阳性克隆送上海英俊生物技术公司测序. 测序的结果和 miRNA 的前体序列用 BioEdit4.0 软件及 Blast 程序进行序列比对分析. 构建成功的质粒载体命名为 pmiR-X, miR-X 代表对应的 miRNA 名称.

2.2 RNA 印迹检测 miRNA 表达载体在细胞中 miRNA 的表达

2.2.1 细胞培养和转染. HEK-293 细胞用含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液于 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 培养. 参照脂质体 Lipofectamine™ 2000 说明书转染 miRNA 表达载体.

2.2.2 RNA 提取、电泳及转膜. 收集培养的细胞,

用 Trizol 提取总 RNA. 取 20 μ g 总 RNA 进行 12% 尿素变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 120 V 约 1.5 h. 电泳结束后 EB 染色 10 min, 凝胶成像系统中照相. 于半干电转仪上以 100 mA 转移 2 h, 紫外交联仪上用紫外线交联 125 mJ, 最后于 80 $^{\circ}$ C 干烤 1 h^[7].

2.2.3 探针标记、杂交及显影. 在杂交瓶中加入 5 ml 完全溶解 ULTRAhyb Oligo 杂交液, 将干燥的膜放入杂交瓶中, 于 37 $^{\circ}$ C 预杂交 2 h. 探针标记: miRNA 反向互补寡核苷酸探针 1 μ l (20 pmol), 3 μ l 10 $\times$ T4 多聚核苷酸激酶反应缓冲液, 3 μ l (30 U) T4 多聚核苷酸激酶, 15 μ l (5.55 $\times$ 10³ kBq) [γ -³²P]ATP, 加无菌水至 30 μ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h^[7]. 乙酸铵沉淀法纯化探针, 将纯化后的探针溶在 100 μ l 无菌水中, 加到杂交瓶中, 杂交过夜, 洗膜, 放射自显影. 以 miR-16、miR-24 和 miR-125a 为例, 探针序列分别为: miR-16, 5'GCCAATATTTACGT-GCTGCTA, miR-24, 5' TGTTTCCTGCTGAACT-GAGCCA, miR-125a, 5' ACAGGTTAAAGGGTC-TCAGGGA.

2.3 荧光素酶报告基因方法验证 miRNA 表达载体的表达及抑制报告基因表达的功能

2.3.1 荧光素酶报告载体构建. 参照文献[8]. 首先在 pGL3-Control 载体 *Xba* I 位点处插入 *Nde* I 酶切位点, 改构后的载体命名为 pGL3M. 分别合成所验证的 miRNA 的基因序列, 合成 DNA 片段的 2 条单链, 经退火后人工构建获得两端带有限制性酶切位点的 miRNA 的 DNA 片段. 以 miR-16 和 miR-483 为例, 合成的单链寡核苷酸序列两端分别添加 *Xba* I 及 *Nde* I 酶切位点. miR-16, (1) 5' CTA GAA GCT CGC CAA TAT TTA CGT GCT GCT ACA, (2) 5' TAT GTA GCA GCA CGT AAA TAT TGG CGA GCT T; miR-483, (1) 5' CTA GAA GCT AGA AGA CGG GAG GAG AGG AGT GAC A, (2) 5' TAT GTC ACT CCT CTC CTC CCG TCT TCT AGC TT, 2 条链退火后反向插入到 pGL3M 载体上. 这样构建的报告基因载体分别含有 miR-16 及 miR-483 的作用位点. 构建成功的质粒分别命名为 pGL3M-16 和 pGL3M-483.

2.3.2 miRNA 表达载体功能验证. 参照文献[8]. 用含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液将 HepG2 细胞培养于 24 孔板中, 当细胞 80% 融合时, 按脂质体 Lipofectamine™ 2000 转染说明书的方法转染, 质粒用量: miRNA 表达载体 (pmiR-16, pmiR-483) 或 pcDNA3.0 质粒 300 ng, 荧光素酶报告基因载体

(pGL3M-16, pGL3M-483) 100 ng, 内参质粒 PRL-CMV 2 ng. 转染 48 h 后按照双荧光素酶报告基因分析系统操作手册检测荧光素酶活性.

3 结 果

3.1 miRNA 表达载体的构建

根据前述方法扩增 miRNA 基因序列, 部分扩增结果见图 1, 在 250~350 bp 左右有一条清晰的特异条带, 表明扩增得到所需的片段.

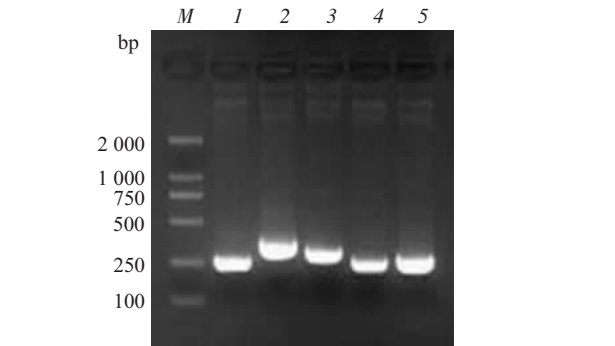


Fig. 1 Amplification of pri-miRNA
M: DL2000 DNA marker; 1: miR-16; 2: miR-99a; 3: miR-125a; 4: miR-222; 5: miR-325.

图 2 为 miRNA 表达载体构建示意图. 扩增产物及表达载体 pcDNA3.0 经双酶切后连接, 菌落 PCR 的阳性克隆再进行酶切鉴定, 部分酶切结果如图 3 所示. 从图 3 中可以看到, 空载体 pcDNA3.0 只有一条带, 而重组质粒经双酶切, 产生了 2 条清晰的条带, 其中一条在 250~350 bp 的位置, 这表明目的片段插入到表达载体 pcDNA3.0 中, 测序正确后可用于下一步实验. 经测序验证, 已构建成功 179 个 miRNA 表达载体 (表 1).

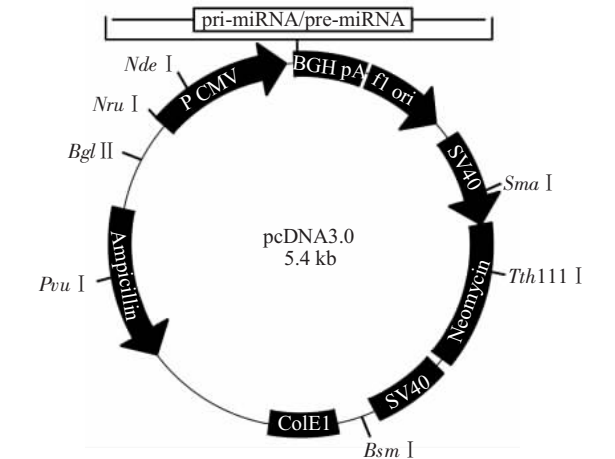


Fig. 2 Schematic representation of miRNA expression vectors

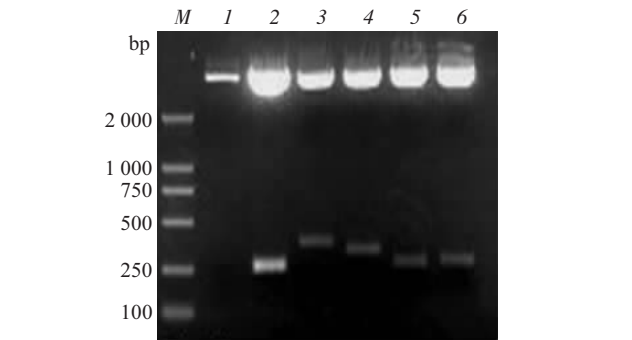


Fig. 3 Restriction endonuclease analysis of miRNA expression vector
M: DL2000 DNA marker; 1: pcDNA3; 2: pmiR-16; 3: pmiR-99a; 4: pmiR-125a; 5: pmiR-222; 6: pmiR-325.

3.2 miRNA 表达载体在细胞中的表达

3.2.1 RNA 印迹验证. 分别在 HEK-293 细胞中转染 pcDNA3.0、pmiR-16、pmiR-24 及 pmiR-125a, 转染 48 h 后提取总 RNA, 按照前述的方法进行 RNA 印迹检测. 由图 4a 可知, HEK-293 细胞中有内源 miR-16 表达, 但转染 pmiR-16 以后, 成熟的 miR-16 及其前体的表达量都有明显的升高, 这表明转入的外源质粒载体 pmiR-16 可以在 HEK-293 细胞中表达 miR-16 分子. 由图 4b 及图 4c 可知, 只有在分别转染了 pmiR-24 及 pmiR-125a 的细胞中才可以检测到它们的表达, 而在对照细胞中检测不到它们的表达. 这些结果表明, 所构建的 miRNA 表达载体确实可以在细胞内有效地表达 miRNA 分子.

3.2.2 荧光素酶报告基因方法验证.

HepG2 细胞中转染 miRNA 表达载体、荧光素酶报告基因载体及内参质粒, 转染 48 h 后检测荧光素酶活性并计算相对荧光素酶活性, 3 次独立重复实验结果见图 5. 由图 5a 可知, 转染 pGL3M-16 的荧光素酶活性比 pGL3M 低一半以上, 这是因为 HEK 293 细胞有内源 miR-16 的表达(图 4a), 它可以抑制 pGL3M-16 的表达, 而 pGL3M 不包含 miR-16 的作用位点, 因此不受 miR-16 的抑制. 而同时转染 pGL3M-16 及 pmiR-16 时, 荧光素酶的活性进一步降低, 只有不到 30%. 这是因为 pcDNA-16 表达 miR-16, 进一步增加了细胞内 miR-16 的水平, 从而增强了对荧光素酶表达的抑制. 而在图 5b 中, 由于细胞内源 miR-483 表达水平很低甚至不表达, 因此只有转染 pmiR-483 时才可以抑制 pGL3M-483 荧光素酶的表达. 这些结果表明, 所转染的 miRNA 表达质粒可以在细胞内表达

成熟的 miRNA, 并且能对其靶位点起到的抑制作用.

上述实验结果表明, 采用扩增 pri-miRNA DNA 片段和 pcDNA3 载体构建人源 miRNA 质粒

表达载体, 在真核细胞中可以有效表达 miRNA 分子, 并发挥抑制基因表达作用. miRNA 表达库的构建策略是成功的.

Table 1 The list of miRNA expression vectors

Number	miRNA	Number	miRNA	Number	miRNA	Number	miRNA
1	miR-1	46	miR-107	91	miR-198	136	miR-369
2	miR-7	47	miR-122a	92	miR-199a	137	miR-370
3	miR-9	48	miR-125a	93	miR-199b	138	miR-371
4	miR-10a	49	miR-125b	94	miR-200c	139	miR-372
5	miR-10b	50	miR-127	95	miR-204	140	miR-373
6	miR-15a	51	miR-128b	96	miR-205	141	miR-374
7	miR-15b	52	miR-130a	97	miR-206	142	miR-375
8	miR-16	53	miR-133b	98	miR-208	143	miR-376a
9	miR-17	54	miR-1234	99	miR-211	144	miR-376b
10	miR-18a	55	miR-135a	100	miR-213	145	miR-377
11	miR-18b	56	miR-135b	101	miR-214	146	miR-378
12	miR-19a	57	miR-136	102	miR-215	147	miR-379
13	miR-19b	58	miR-137	103	miR-216	148	miR-380
14	miR-20a	59	miR-138	104	miR-217	149	miR-381
15	miR-20b	60	miR-140	105	miR-218	150	miR-382
16	miR-21	61	miR-141	106	miR-219	151	miR-383
17	miR-22	62	miR-142	107	miR-220	152	miR-384
18	miR-23a	63	miR-143	108	miR-221	153	miR-410
19	miR-23b	64	miR-144	109	miR-222	154	miR-422
20	miR-24	65	miR-145	110	miR-223	155	miR-423
21	miR-25	66	miR-146a	111	miR-224	156	miR-424
22	miR-26a	67	miR-147	112	miR-296	157	miR-425
23	miR-26b	68	miR-148b	113	miR-299	158	miR-431
24	miR-27b	69	miR-150	114	miR-301	159	miR-433
25	miR-28	70	miR-151	115	miR-302a	160	miR-448
26	miR-29a	71	miR-152	116	miR-302b	161	miR-449
27	miR-29b	72	miR-153	117	miR-323	162	miR-450
28	miR-29c	73	miR-154	118	miR-324	163	miR-451
29	miR-30a	74	miR-155	119	miR-325	164	miR-452
30	miR-31	75	miR-181a	120	miR-326	165	miR-453
31	miR-32	76	miR-181b	121	miR-328	166	miR-455
32	miR-33	77	miR-181c	122	miR-329	167	miR-483
33	miR-34a	78	miR-181d	123	miR-335	168	miR-485
34	miR-34c	79	miR-182	124	miR-337	169	miR-488
35	miR-92	80	miR-184	125	miR-339	170	miR-489
36	miR-93	81	miR-185	126	miR-340	171	miR-491
37	miR-95	82	miR-186	127	miR-342	172	miR-492
38	miR-96	83	miR-187	128	miR-345	173	miR-493
39	miR-98	84	miR-188	129	miR-346	174	miR-494
40	miR-99a	85	miR-190	130	miR-361	175	miR-495
41	miR-100	86	miR-191	131	miR-362	176	miR-496
42	miR-101	87	miR-193a	132	miR-363	177	miR-497
43	miR-103	88	miR-195	133	miR-365	178	miR-498
44	miR-106a	89	miR-196a	134	miR-367	179	miR-499
45	miR-106b	90	miR-197	135	miR-368		

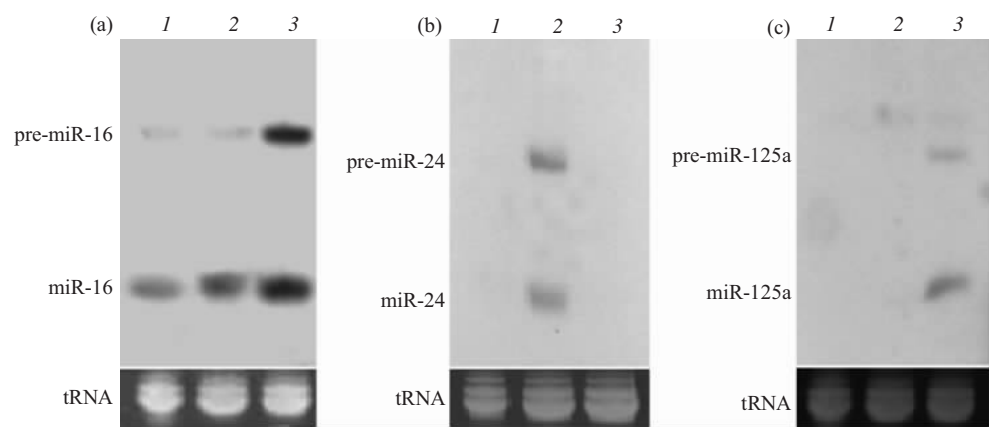


Fig. 4 Expression of miRNAs investigated by Northern blot

(a) 1: non-transfected; 2: pcDNA3.0; 3: pmiR -16. (b) 1: pcDNA3.0; 2: pmiR -24; 3: pmiR -125a. (c) 1: pcDNA3.0; 2: pmiR -24; 3: pmiR -125a.

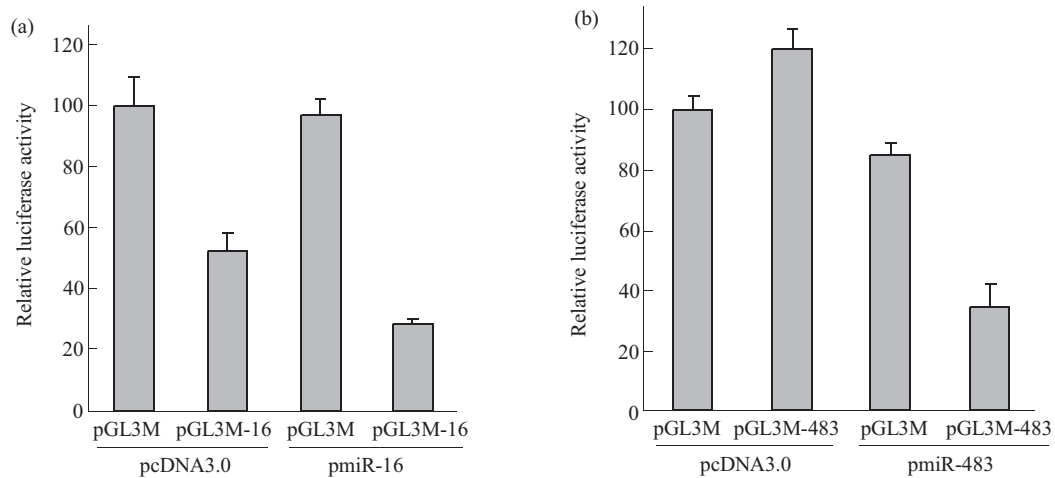


Fig. 5 Inhibition of luciferase activity by expression of miRNAs

The indicated vectors were transfected in HepG2 cell lines. The relative firefly luciferase levels are shown. SD are from three independent experiments.

4 讨 论

随着分子生物学技术及生物信息学手段的不断发展, 目前, 在人类细胞中已经发现了数百种 miRNA 基因, 但其中还只有少数 miRNA 的功能得到了研究, 而绝大部分的功能尚有待揭示. 面对如此众多的 miRNA, 如何获得 miRNA 的功能却是一个难题. 这一问题提示, 有必要建立一个大规模的 miRNA 功能筛选平台以进行系统的 miRNA 功能研究. 与 mRNA 类似, 研究 miRNA 的功能也可以通过抑制及过表达这两种手段来进行, 因此可以通过建立一个大规模的 miRNA 表达库来进行功能 miRNA 筛选. Voorhoeve 等^[9]建立了一个逆转录病毒的 miRNA 表达库, 他们利用这一系统发现

miR-372 及 miR-373 在睾丸生殖细胞肿瘤中起肿瘤基因的作用. 这一研究表明, miRNA 表达库对 miRNA 的功能研究不仅是必要的而且是可行的. 实现 miRNA 在细胞内的表达有两种策略, 第一种策略是直接向细胞内转染合成的 miRNA 分子, 这种方法作用迅速, 但不能长时间起作用, 而且费用较高. 第二种策略是通过表达载体在细胞内表达 miRNA, 如采用 miRNA 结构设计, 基于 RNA 聚合酶 II 启动子的 siRNA/miRNA 表达载体^[10], 这一载体可以利用同一个表达框表达不同的 miRNA, 但这样表达出来的 miRNA 有些可能与细胞内源的不完全一致. 因此我们采取了另一种方案, 即从基因组中 PCR 扩增 pri-miRNA 片段, 将其构建到 CMV 启动子从而表达出 miRNA. 从基因组扩

增全部 miRNA 基因是比较困难的, 我们采取了多种方法来提高成功率, 如设计较长引物以提高退火温度、采用热启动 PCR 等. 对于仍不能扩增的 miRNA 基因, 我们采用巢式 PCR 的方法来解决, 成功地获得了近 200 个 miRNA 的 DNA 片段.

miRNA 的作用方式主要是与靶 mRNA 分子的 3' 非编码区 (3' UTR) 结合, 从而导致靶 mRNA 的降解或抑制它的翻译. 因此, 我们在荧光素酶基因的 3' UTR 插入 miRNA 的反向互补序列, miRNA 就可以识别这一位点, 并对荧光素酶的表达起一定程度的抑制作用, 这与文献报道结果^[8]一致. 利用这一技术发现, 我们构建的 miRNA 表达载体在细胞内确实可以抑制荧光素酶的表达, 表明这些 miRNA 表达载体在细胞内可以表达功能 miRNA. 实际上, 这一方法还可以用来验证 miRNA 对其靶位点的抑制作用^[8].

同 RNAi 文库一样, miRNA 表达库可以用来进行功能 miRNA 的筛选工作. 例如可以用来筛选那些与细胞增殖或存活相关的 miRNA, 包括与 DNA 损伤、细胞分化、增长因子作用及耐药相关的 miRNA. 同样也可以用来筛选与其他性状相关的 miRNA^[9]. 总之, miRNA 表达库可以成为大规模 miRNA 功能研究的一个重要工具.

参 考 文 献

- 1 Lee Y, Ahn C, Han J, *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003, **425** (6956): 415~419
- 2 Lund E, Guttinger S, Calado A, *et al.* Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 2004, **303** (5654): 95~98
- 3 Yi R, Qin Y, Macara I G, *et al.* Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, 2003, **17** (24): 3011~3016
- 4 Lim L P, Glasner M E, Yekta S, *et al.* Vertebrate microRNA genes. *Science*, 2003, **299** (5612): 1540
- 5 Calin G A, Sevignani C, Dumitru C D, *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (9): 2999~3004
- 6 Lu J, Getz G, Miska E A, *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005, **435** (7043): 834~838
- 7 Fu H, Tie Y, Xu C, *et al.* Identification of human fetal liver miRNAs by a novel method. *FEBS letters*, 2005, **579** (17): 3849~3854
- 8 Lewis B P, Shih I H, Jones-Rhoades M W, *et al.* Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 2003, **115** (7): 787~798
- 9 Voorhoeve P M, le Sage C, Schrier M, *et al.* A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell*, 2006, **124** (6): 1169~1181
- 10 Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, *et al.* Human argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, 2004, **15** (2): 185~197

The Construction of miRNA Expression Library for Human*

CUI Jun^{1,2)**}, FU Han-Jiang^{1)**}, FENG Jun-Jun¹⁾, ZHU Jie¹⁾,
TIE Yi¹⁾, XING Rui-Yun¹⁾, WANG Cheng-Fu²⁾, ZHENG Xiao-Fei^{1)***}
(¹⁾Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China;
²⁾Life Science School, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract The microRNAs (miRNAs) are a kind of single strand small noncoding RNAs (approximately 22nt) with probable roles in the silencing gene expressions. To date, a large number of miRNAs have been identified in several organisms, but the function of the vast majority of these molecules remains to be determined. To study their functions, a library of vectors expressing miRNAs, including more than 170 kinds of human miRNAs were developed. The ability of some miRNA vectors to express miRNAs was validated with Northern blot and dual luciferase assays. The results indicated that these vectors could express pre-miRNAs and mature miRNAs in HEK-293 cells. Furthermore, they could suppress the expression of luciferase tagged with a sequence complementary to corresponding miRNAs. All these data show that these miRNA expression vectors can drive functional miRNA expression, and they can be used to screen functional miRNAs.

Key words miRNA, library, functional screen

*This work was supported by grants from The National Basic Research Program of China (2002CB513103) and The National Natural Sciences Foundation of China (30470899, 30500299).

Co-first author. *Corresponding author. Tel: 86-10-66932210, E-mail: zhengxf@nic.bmi.ac.cn

Received: September 14, 2006 Accepted: October 20, 2006