

猪传染性胸膜肺炎放线杆菌毒素 *apxII* 基因无药物抗性 标记突变株 HBC^-/GFP^+ 的构建及其生物学特性研究

贝为成 何启盖 方六荣 肖少波 刘丽娜 洪文洲 刘正飞 陈焕春*

(华中农业大学动物医学院动物病毒室, 武汉 430070)

摘 要 通过使用枯草芽胞杆菌一个蔗糖敏感 *sacB* 基因发展了一种依靠蔗糖的负向筛选系统, 这种方法允许没有标记突变的基因进入胸膜肺炎放线杆菌染色体。首先, 构建了猪传染性胸膜肺炎放线杆菌毒素 *apxII* 基因 GFP 插入失活型的重组质粒 pOSAKCG, 其中一个表达盒含有氨基青霉素基因和以外膜蛋白 *omlA* 作为启动子表达 *sacB* 基因。重组质粒 pOSAKCG 通过电穿孔转化, 它的突变 *apxIIICA* 基因与野生型亲本菌株胸膜肺炎放线杆菌 HB03 染色体上野生型 *apxIIICA* 基因发生同源交换, 两步法筛选获得了 *apxII* 基因突变株 HBC^-/GFP^+ , PCR 和 Southern blot 对突变株进行初步鉴定, 进一步对突变株的一些生物学特性, 包括它的溶血活性、免疫原性、生长特性及其对小鼠的安全性进行了研究。结果表明, 无药物抗性标记突变株的构建是成功的。该突变株的构建为进一步研究突变株作为载体和疫苗奠定了坚实的基础。

关键词 胸膜肺炎放线杆菌, 毒素 *apxII* 基因, 负向选择, 突变株 HBC^-/GFP^+

中图分类号 Q754 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)05-0719-06

猪传染性胸膜肺炎是由胸膜肺炎放线杆菌 (*Acinobacillus pleuropneumoniae*, APP) 引起的一种严重危害养猪业的呼吸道疾病, 该病以胸膜肺炎和出血性坏死肺炎为特性, 具有高发病率和死亡率, 特别是在青年猪中在我国广泛流行, 危害严重, 给养猪业造成了巨大的经济损失^[1,2]。

近几年来, 该菌易产生耐药性, 导致常用的药物对本病已无明显的疗效, 而且目前许多国家对抗生素在动物饲料中应用的限制也越来越严格。因此, 应用安全、高效疫苗对动物进行免疫是预防和控制此病的重要手段。目前针对本病的商业化疫苗主要是灭活疫苗, 虽然它有一定效果, 但由于该病原菌血清型多种, 各血清型之间又没有很好的交叉保护, 而灭活疫苗成分单一, 只对部分血清型有效, 这就给养猪业控制该传染病造成了极大的困难。

毒素是 APP 的一个重要的致病因子, 而 *ApxII* 除血清型 10 外, 其余血清型都能分泌此毒素^[3]。毒素 *apxIIICA* 基因整个操纵子由激活基因 C 和结构毒素基因 A 编码, 当激活基因 C 失活后, 该病原菌毒力明显降低, 但其 A 基因未受影响, 因此仍具有很

好的免疫保护力^[4,5]。到目前为止, 通过插入或缺失毒素基因构建不含任何抗生素标记的猪传染性胸膜肺炎放线杆菌突变株在国内仍未见有报道。

鉴于此, 为了更好地控制该病, 适应目前商品化疫苗的需求及其以后对该病原菌的进一步深入研究, 本文以自行分离的 APP 血清 7 型为亲本菌株, 重组转移质粒电转化后通过两步法筛选, 构建了无抗生素标记的猪传染性胸膜肺炎放线杆菌毒素 *apxII* 基因突变株。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 α 本室保存, APP 血清 7 型菌株为本室自行分离鉴定保存 (命名 HB03), pBluescripts II sk(+) 质粒均为本室保存, PMD18-T 质粒购自 TaKaRa 公司。

1.2 工具酶和试剂

NAD(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸), 购自中国上海化学试剂公司; Taq DNA 聚合酶, CIAP, T4 DNA 连接酶, T4 DNA 聚合酶, 各种所需限制性内切酶, DNA

收稿日期: 2004-02-23, 修回日期: 2004-05-21。

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30200011) 和湖北省科技攻关项目 (No. 2001AA201B02) 基金资助。

* 通讯作者。 Tel: 86-27-87282608; Fax: 86-27-87282608; E-mail: hzavet@public.wh.hb.cn

快速回收试剂盒等均购自宝生物工程公司(大连);地高辛标记试剂盒购自 Boehringer Mannheim GmbH Mannheim, Germany。

1.3 培养基和培养条件

APP 生长液体培养基为 Tryptic Soy Broth(TSB), 固体培养基 Tryptic Soy Agar(TSA), 培养基加入 10% 鸡血清和 0.5% NAD, APP 在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中生长良好。

用于大肠杆菌培养的 LB(Luria-Bertani)培养基参照文献[6]。根据实验要求, 在培养基中加入 100 μg/mL 氨苄青霉素, 置入 37℃ 培养。

1.4 APP 基因组 DNA 的提取

将 APP 单菌落接种固体培养基, 置入 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 10~12h 后可长出单菌落, 挑取单个菌落在液体培养基中培养, 37℃ 摇床培养 9~10h 后收获菌体, 按文献[7]方法提取基因组 DNA。

1.5 DNA 重组技术

酶切、回收、连接、转化及质粒的提取、感受态细胞的制备均按常规方法操作^[8]。

1.6 *apxIIICA* 基因的扩增及所用引物

根据文献[5]所报道的核苷酸序列, 设计一对能扩增完整 *apxIIICA* 基因的引物(P1, P2)。引物序列如下: P1: 5'-CGCACCATGGTCGGGC-3'; P2: 5'-CTAACAGCTGATGCA-3'。

引物(P3, P4)用于 *apxIIC* 基因的扩增。P3: AATGATTTTAACGTATTGG; P4: ATGACAAAGTGATT-TTGAC。

引物(P5, P6)用于 GFP 基因的扩增。P5: AGTCTAGACATGGGTAAAGGAGAAG; P6: AGTCTAGATCCGGACTTGTATAG

1.7 重组质粒 pOSAKCG 构建与鉴定

在本室自行构建的质粒 pSKC 基础上, 用 *Xba* I 酶切 pSKC, 然后把它与用 *Xba* I 酶切消化的绿色荧光蛋白(GFP)基因连接得到质粒 pSKCGFP。Not I 和 *Pst* I 双酶切质粒 pSKCGFP, 然后与 Not I 和 *Pst* I 已消化的表达盒 omlA-sacB-Amp^r 连接, 最后得到了重组质粒 pOSAKCG。

1.8 重组质粒 pOSAKCG 的转化和突变株的筛选、鉴定

采用高效电穿孔方法将重组质粒 pOSAKCG 引入到 HB03 亲本菌株中。首先在氨苄青霉素平板上筛选抗性菌落, 抗性单菌落在 TSB(含 NAD 和血清)培养增殖抗性菌落后, 在 5% 蔗糖平板上筛选耐蔗糖菌落, 命名为 HBC⁻/GFP⁺。

提取突变株 HBC⁻/GFP⁺ 基因组 DNA, 用引物 P3, P4 PCR 扩增 *apxIIC* 基因, 看是否能扩增出大小为 1.20kb *apxIIC* 特异性 DNA 片段。如果扩增结果与预期相符, 那么可初步鉴定筛选的突变株是正确的, Southern blot 对突变株进一步鉴定。

1.9 突变株一些生物学特性研究

1.9.1 突变株免疫学活性分析: 以突变株培养后上清液和离心后的菌体为样品进行 SDS-PAGE(聚丙烯酰胺凝胶电泳), 0.5% 牛血清白蛋白(BSA)封闭 30min 后加入一抗 1h, 兔抗猪 IgG-HRP, 37℃ 1h 经 TBS 洗后 DAB 显色。

1.9.2 突变株溶血活性分析: 挑取突变菌株和亲本菌 APP-1 和 APP-7 型, 分别接种于含有绵羊血的血琼脂平皿, 37℃ 培养过夜, 观察它们的溶血情况。

1.9.3 突变株的遗传稳定性: 将突变株在固体培养基连续传代 10 次, 用 PCR 鉴定, 看每一代的突变株是否都能扩增出 0.72kb 的 GFP 基因特异性片段。若能, 表明突变株是能够稳定遗传的。

1.9.4 突变株生长特性分析: 分别挑取突变菌株和亲本菌单菌落, 接种入 TSB 中培养, 每间隔 1h 取样, 以分光光度计 OD₆₀₀ 读取值, 通过每一个相同时间段 OD₆₀₀ 值大小来比较它们的生长快慢。

1.10 突变株对小鼠安全性试验

分 6 组, 每组 3 只 Bab/c 小鼠, 其中 3 组用于注射亲本菌 7 型, 浓度依次为 2 × 10⁷ CFU/mouse, 1 × 10⁸ CFU/mouse, 2 × 10⁸ CFU/mouse; 另 3 组注射突变株, 浓度依次为 2 × 10⁸ CFU/mouse, 1 × 10⁹ CFU/mouse, 2 × 10⁹ CFU/mouse。通过每一组小鼠死亡情况及肺病变情况, 我们可了解突变株与亲本菌相比毒力是否明显降低。

2 结果

2.1 突变株 HBC⁻/GFP⁺ 构建整个技术路线

构建突变株 HBC⁻/GFP⁺ 的技术路线如图 1 所示。

2.2 *apxIIICA* 基因 PCR 扩增结果

PCR 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 可见一条大小约为 3.4kb 的特异性 DNA 带,

用 *Hind* III 酶切后可见一条 1.4kb 和一条 2.1kb 的带, 与预期结果相符。

2.3 重组质粒 pOSAKCG 构建与酶切鉴定

Not I 和 *Pst* I 双酶切重组质粒 pOSAKCG, 得到两条片段, 一条约 2.8kb, 另一条为 6.9kb(图 2), 结果与预期相符。

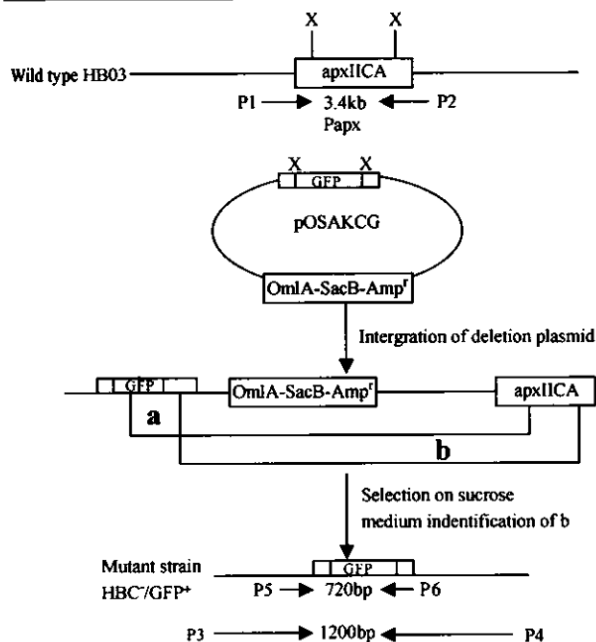


图1 突变株构建技术路线

Fig.1 Schematic representation of the construction of the *A. pleuropneumoniae* mutant HBC⁻/GFP⁺

Restriction sites used for mutagenesis of *apxIIICA* is shown. Oligonucleotides used as primers for amplification are indicated with small arrows, as well as the size of the resulting amplification products. "a" and "b" represent homologous recombination events that may occur upon selection on sucrose media, with the subsequent loss of the region between the recombination sites. X: *Xba* I

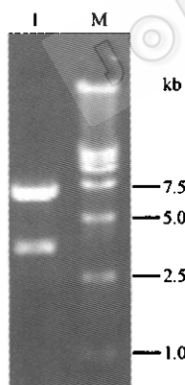


图2 重组质粒 pOSAKCG 的酶切鉴定

Fig.2 The restrict enzyme analysis of recombinant plasmid pOSAKCG

1: pOSAKCG/Not I + Pst I; M: DL15 000 DNA marker

2.4 突变株的筛选与鉴定

重组质粒 pOSAKCG 通过电穿孔方法引入到 HB03 亲本菌株中,两步法筛选得到突变菌株。生长在氨苄青霉素平板上菌落是染色体含有野生型 *apxIIICA* 基因和 GFP 插入的 *apxIIICA*-GFP 基因的单重组菌落,该菌落经增殖后,生长在 5% 蔗糖平板上

的菌落为双重重组菌落,此突变株命名为 HBC⁻/GFP⁺。

提取其基因组 DNA 作为 PCR 扩增 *apxIIIC* 基因的模板,得到一条大小约 1.20kb 特异性 DNA 片段,而以亲本菌基因组 DNA 为模板扩增 *apxIIIC* 基因,只能得到一条大小约 0.5kb 的 DNA 片段。以上 PCR 检测结果(图 3)与期望的一致。表明筛选的突变株初步证实是正确的。

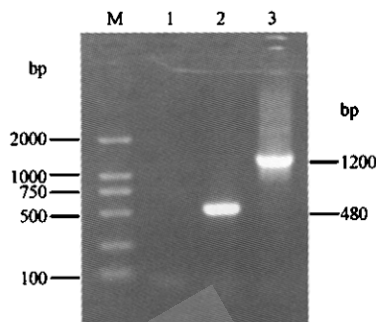


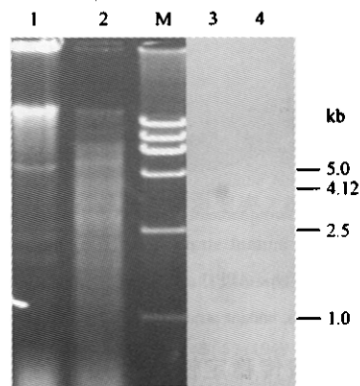
图3 引物 P3 和 P4 扩增野生型 HB 和突变株基因组

Fig.3 Amplification of wild-type HB and mutant strain HBC⁻/GFP⁺ genomic regions with primers of P3 and P4

M: DL2 000 DNA marker;

1: H₂O control; 2: wild type; 3: mutant strain

PCR 扩增的 0.72kb GFP 基因通过地高辛标记后作为探针,把它与 *Pst* I 酶切的突变株基因组 DNA 和亲本菌基因组 DNA 进行杂交分析, Southern blot 结果(图 4)显示:与突变株基因组 DNA(1)杂交,可见一条大小约 4.1kb 特异性带(3),而与亲本菌基因组 DNA(2)杂交没有带(4),表明 *apxIIICA* 基因内已经获得了预期的特异性位点突变,进一步证实我们所构建的突变株 HBC⁻/GFP⁺ 是成功的。

图4 HBC⁻/GFP⁺ 突变株的 Southern blot 分析Fig.4 Southern blot assay of the mutant strain with HBC⁻/GFP⁺

1: mutant strain; 2: parent strain; M: DL15 000 DNA marker

2.5 Western blot 分析

按方法 1.9.1 进行的 Western blot, 结果(图 5)表明:猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 *apxIIc* 失活后仍能分泌大小约 110kD 具有良好免疫原性的毒素蛋白 ApxIIA。

2.6 突变株溶血活性分析

挑取突变株和亲本菌 APP-1 和 APP-7 型单菌落, 分别接种于含有绵羊血的血琼脂平皿, 在 5% CO₂ 培养箱 37℃ 培养过夜, 它们的溶血情况(图 6): 血清 1 型(A)溶血性最强, 7 型(B)次之, 而突变株(C)完全失去了溶血活性。

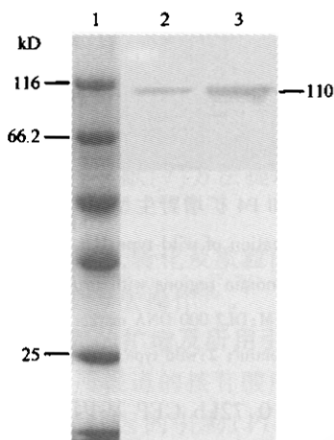


图 5 表达的 ApxIIA Western blot 分析

Fig.5 Western blot analysis of ApxIIA expression

1: standard protein marker; 2: culture supernatant of mutant strain; 3: the lysate of mutant strain

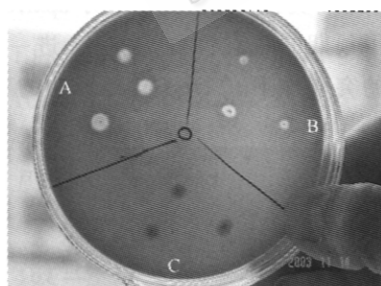


图 6 突变株溶血活性测定

Fig.6 the mutant strain hemolytic activity test

A: wild type APP-1; B: wild type APP-7;
C: mutant strain HBC⁻ GFP⁺

2.7 突变株的遗传稳定性

将突变株在固体培养基连续传代 10 次以后, 用 PCR 鉴定, 结果(图 7)均能扩出 0.72kb 的 GFP 基因, 说明突变株是能够稳定遗传的。

2.8 突变株生长特性试验

分别挑取重组菌和亲本菌单菌落, 接种入 TSB 中培养, 每间隔 1h 取样, 读取 OD₆₀₀ 值, 通过每一个

相同时间段 OD₆₀₀ 值大小比较它们的生长快慢。结果见图 8, 从图 8 可明显看出突变菌株生长比野生型菌株快。

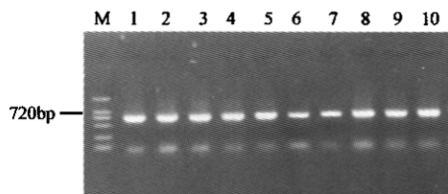


图 7 GFP 基因的 PCR 扩增结果

Fig.7 The PCR amplified results of GFP gene

M: DL2000 DNA molecular marker;

1: positive control; 2~10: the PCR results of GFP gene in 10 different generations mutant strain

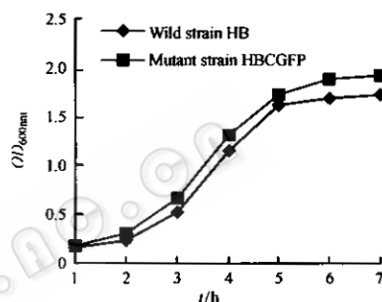


图 8 突变株和亲本菌生长曲线

Fig.8 Growth curves of *A. pleuropneumoniae* strains HB,

the mutant strain HBC⁻ GFP⁺

Increased growth rate and decreased lag phase of HBC⁻ GFP⁺ mutant strain can clearly be seen

2.9 突变株对动物(小鼠)的安全性试验

从表我们可以看出, 亲本菌 3 个浓度注射小鼠后, 最低浓度(2×10^7 CFU/mL)可使一只小鼠死亡, 最高浓度(2×10^8 CFU/mL)可使小鼠全部死亡。而突变株注射的小鼠, 最低浓度(2×10^8 CFU/mL)到最高浓度(2×10^9 CFU/mL)却没有一只小鼠死亡; 表明我们构建的突变株 HBC⁻/GFP⁺ 与亲本菌相比对小鼠是安全的。

表 1 接种细菌后小白鼠死亡情况

Table 1 The mortality of mice infected with bacterial strains

Strain tested	Received CFU	No. dead/ No. tested	No. lesions/ No. tested	Attenuation factor ^a
Parent strain (serotype 7)	2×10^8	3/3	3/3	1
	1×10^8	3/3	3/3	
	2×10^7	3/3	3/3	
Mutant strain HBC ⁻ GFP ⁺	2×10^9	0/3	1/3	100
	1×10^9	0/3	0/3	
	2×10^8	0/3	0/3	

^a: The figure determined for attenuation reflects the increased ability of mutant.

This figure is calculated as the lowest number of CFU given of parent strain (HB03) and showing lesions.

3 讨论

毒素 ApxII 是 APP 的一个重要毒力因子, APP 血清型多种, 除 10 型外其余血清型都能分泌此毒素。此毒素基因 *apxII* 由激活基因 C 和免疫原性基因 A 编码。当 C 基因失活后, 毒素毒力明显降低, 而其免疫原性并未受到影响^[5]。突变株 HBC⁻/GFP⁺ 对动物(小鼠)的安全性试验结果证实了这一点。

目前, 国外许多专家使用化学诱导、转座或靶突变的方法获得了一些 APP 突变株, 如溶血素突变、荚膜突变、尿酶突变等^[8-12]。但是, 这些方法存在随机性且需要明显的表型特征去进行筛选, 更重要的是构建的突变株中都含有抗生素标记, 完全不符合以后突变株用于疫苗研究的要求。利用枯草芽杆菌 *sacB* 作为负向筛选标记, 通过两步法对突变株进行筛选的方法用于革兰氏阴性细菌突变株构建目前有许多成功的报道^[13-15], 但此方法尚未见用于 APP 的毒素 *apxII* 基因突变株构建。本研究选择血清 7 型为亲本菌, 利用胸膜肺炎放线杆菌外膜蛋白 *omlA* 基因一部分作为启动子, 经两次同源重组后获得了一株突变株 HBC⁻/GFP⁺, PCR 和 Southern blot 结果证实突变株的构建是成功的。说明此方法也可用于 APP 突变株的构建。然而, 从氨苄青霉素平板上筛选 200 个抗性克隆子才得到一个在 5% 蔗糖平板上耐蔗糖的突变株, 重组率非常低。本人认为这可能与 *sacB* 基因在 APP 中表达有关。一方面可能是 *omlA* 基因作为启动子不够强; 另一方面可能与表达盒插入的方向有关。这有待以后进一步研究。

本研究通过对突变株进行溶血性试验、生长特性试验、突变株对动物(小鼠)的安全性试验及 Western blot 分析, 证实了我们构建的基因工程突变菌株是成功的。另外本研究是通过 GFP 取代了 *apxIIC* 一部分而使其失活, GFP 能在突变株中稳定存在, 那么突变株可作为载体表达一些呼吸道疾病病原如 PRRSV、巴氏杆菌等一些免疫原性基因, 该突变株的构建为研制抗猪呼吸道疾病的双价或多价基因工程疫苗打下基础, 从而为养猪业提供强有力的免疫预防手段。

REFERENCES(参考文献)

[1] Pohl S, Berstchinger HV, Frederiksen W et al. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Pasteurella haemolytica*-like organisms causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* com. nov) on the basis of

phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. *Int J Syst Bacteriol*, 1983, **33**, 510 - 514

- [2] Brian J Sheehan, Paul R Langford, Andrew N Rycroft et al. [Cu, Zn]-superoxide dismutase mutants of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* are unattenuated in infections of the natural host. *Infect Immun*, 2000, **8**: 4778 - 4781
- [3] Leiner G, Franz KS, Gerlach GF. A novel enzyme-linked immunosorbent assay using the recombinant *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxII antigen for diagnosis of pleuropneumonia in pig herds. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1999, **6**: 630 - 632
- [4] Frey J, Beck M, Nicolet J. RTX-toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Freer J, Aitken R, Alouf E et al. *Bacterial Protein*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany. 1994, pp. 322 - 332
- [5] Prideaux CT, Lenghaus C, Krywult J et al. Vaccination and protection of pigs against pleuropneumonia with a vaccine strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* produced by site-specific mutagenesis of the ApxII operon. *Infect Immun*, 1999, **67**: 1962 - 1966
- [6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, pp. 3326 - 3336
- [7] Christopher TPrideaux, Lesley Pierce, Jolanta Krywult et al. Protection of mice against challenge with homologous and heterologous serovars of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, after live vaccination. *Current Microbiology*, 1998, **37**: 324 - 332
- [8] Taseon RI, Rodriguez-Ferri EF, Gutierrez-Martin CB et al. Transposon mutagenesis in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with a Tn10 derivative. *J Bacteriol*, 1993, **175**: 5717 - 5722
- [9] Ward CK, Lawrence ML, Veit HP et al. Cloning and mutagenesis of a serotype-specific DNA region involved in encapsulation and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5: concomitant expression of serotype 5a and 1 capsular polysaccharides in recombinant A. *pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect Immun*, 1998, **66**: 3326 - 3336
- [10] Inzana TJ, Todd J, Veit HP. Safety, stability and efficacy of noncapsulated mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* for use in live vaccines. *Infect Immun*, 1993, **61**: 1682 - 1686
- [11] Ward CK, Inzana TJ. Identification and characterization of a DNA region involved in the export of capsular polysaccharide by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a. *Infect Immun*, 1997, **65**: 2491 - 2496
- [12] Inzana TJ, Todd JMa, Veit H. Characterisation of a nonhemolytic mutant of a *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5: role of 110 kD hemolysin in virulence and immunoprotection. *Microb Pathog*, 1991, **10**: 281 - 296
- [13] Copass M, Grandi G, Rappuoli R. Introduction of unmarked mutations in the *Helicobacter pylori vacA* gene with a sucrose sensitivity marker. *Infect Immun*, 1997, **65**(5): 1949 - 1952
- [14] Samuel SWU, Dale Kaiser. Markerless deletions of pil genes in *Myxococcus xanthus* generated by counterselection with the *Bacillus subtilis sacB* gene. *J Bacteriol*, 1996, **178** (19): 5817 - 5821
- [15] Vladomir Pelicic, Jean-Marc Reyrat, Brigitte Cicquel. Generation of unmarked directed mutations in mycobacteria using sucrose counterselectable suicide vectors. *Molecular Microbiology*, 1996, **20** (5): 919 - 925

Research on Construction and Biological Characteristics of *Actinobacillus pleuropneumoniae* *apxIIC* Mutant Strain Lacking Drug Resistance Marker

BEI Wei-Cheng HE Qi-Gai FANG Liu-Rong XIAO Shao-Bo LIU Li-Na HONG Wen-Zhou
LIU Zheng-Fei CHEN Huan-Chun*

(Laboratory of Animal Virology, College of Animal Medicine, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

Abstract Using the *sacB* gene of *Bacillus subtilis*, we developed a sucrose-based counterselection system that allows introduction of unmarked mutation into APP chromosome. Recombinant plasmid pOSAKCG was constructed by inserting GFP gene. There are a cassette containing the Ampicillin resistance determinant (Amp^r) and the *sacB* gene expressed from the APP *omlA* promoter in the recombinant plasmid. When the plasmid pOSAKCG was introduced into APP by electroporation, the APP *apxII*-deficient mutant was prepared by homologous recombination between the mutant *apxIICA* gene in the recombinant plasmid and the wild-type *apxIICA* gene in the chromosome of the parent strain HB03. The mutant strain HBC⁻/GFP⁺ was obtained by two selections and identified primarily by PCR and southern blot. Some biological activities such as the hemolytic activity, growth rate, immunital activity, the genetic stability and the safety were more investigated. The results indicated that construction of the mutant strain lacking of drug resistance is successful, which can provide a strong basis for further researching vector and genetic engineering vaccine.

Key words *Actinobacillus pleuropneumoniae*, toxin *apxIIC* gene, counterselection, mutant strain HBC⁻/GFP⁺

Received: 02-23-2004

This work was supported by Grant from Chinese National Program for Science & Technology Department (No. 30200011).

* Corresponding author. Tel: 86-27-87282608; Fax: 86-27-87282608; E-mail: hzai_et@public.wh.hb.cn