

一株高效抗砷喜温硫杆菌工程菌的构建

赵 清 刘相梅* 詹 杨 林建群 颜望明

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘 要 利用 DNA 体外重组技术,将大肠杆菌质粒载体 pUM3 上的抗砷基因簇片段亚克隆到含有强启动子(*lac* 启动子)并具有广泛寄主范围特性的 IncQ 族质粒 pMMB24 上,删除调节基因片段,构建了含有强启动子、可在 *tra* 基因诱导下转移的组成型表达的抗砷质粒 pSDRA4。通过接合转移的方式将其导入专性自养极端嗜酸性喜温硫杆菌 *Acidithiobacillus caldus* 中,构建了冶金工程菌 *Acidithiobacillus caldus* (pSDRA4),接合转移频率为 $(1.444 \pm 0.797) \times 10^{-4}$ 。表明在大肠杆菌和喜温硫杆菌之间成功地建立了一个遗传转移系统。经检测,重组质粒在喜温硫杆菌中具有较好的稳定性,在无选择压力条件下传代 50 次基本保持稳定(重组质粒保留 76% 以上)。经抗砷性能检测,与野生菌相比,构建的喜温硫杆菌工程菌抗砷能力明显提高,从 10mmol/L 提高到 45mmol/L。

关键词 抗砷基因 喜温硫杆菌 接合转移 极端嗜酸性自养细菌

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)05-0675-05

细菌氧化法是用细菌来促进硫化矿氧化的湿法冶金过程,同化学冶金相比较,有对环境污染小、耗能低、浸矿成本低等优势,尤其对处理低品位矿石,具有很大的潜力。现在国内的富矿越来越少,开采贫矿的任务显得日益重要,但是传统焙烧以及化学方法都具有对环境污染大、设备要求高、提取率低和生产成本高的缺点,因此细菌氧化法越来越广泛地应用到实际生产中,目前世界上已经有 10 余家大规模金矿厂利用细菌氧化法进行金精矿脱砷。

能够进行生物浸矿的微生物主要是一些在酸性环境中生长的铁或硫氧化细菌^[1~4]。近年来对连续反应浸矿系统微生物种群研究的结果显示,一些最适生长温度为 40~50℃ 的中度嗜热细菌,如喜温硫杆菌、氧化亚铁钩端螺旋菌等是浸矿细菌中的优势菌群,在浸矿过程中具有重要作用^[4]。通过研究喜温硫杆菌和铁氧化细菌混合培养对浸矿的影响,发现喜温硫杆菌能够显著提高这些铁氧化细菌的浸矿效率,进一步解释和确认了喜温硫杆菌在生物浸矿中的作用^[5]。在处理含砷难冶黄铁矿时由于贫矿含砷高,抑制了浸矿细菌生长,因此迫使人们用遗传学的方法改造浸矿菌株,构建具有较高抗砷能力的工

程菌株,以适应实际生产的需要。喜温硫杆菌自从 1994 年首次报道以来^[6],国外的大量工作集中在它的生理学和浸矿中的作用方面,未见有对其遗传改造方面的报道,国内关于喜温硫杆菌的研究开展比较晚,尚处于起步阶段^[1,5]。

本实验室从云南腾冲分离到一株中度嗜热嗜酸硫氧化杆菌 MTH-04,通过对其进行生理生化特性研究和 16S rDNA 序列分析确定与喜温硫杆菌为同一类群^[7]。在此基础上本试验以 MTH-04 为研究对象,采用接合转移的方式在大肠杆菌和喜温硫杆菌之间建立了一个遗传转移系统,并将构建的含有强启动子的抗砷质粒导入其中,获得了高效表达,成功构建了可用于工业大生产的抗砷冶金工程菌。本研究工作为遗传改造极端嗜酸性喜温硫杆菌提供了试验依据,为以后喜温硫杆菌其他性能的改造奠定了基础,也为生物冶金提供了生产菌株,具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 本试验所用菌株和质粒见表 1。

基金项目 国家 973 计划(2004CB619202),山东省优秀中青年科学家科研奖励基金计划(2004BS08006,03BS142)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-531-88565610; E-mail liuxiangmei@sdu.edu.cn

作者简介 赵 清(1979-),女,山东龙口人,硕士研究生,主要从事微生物分子生物学的研究。E-mail zhongchong-zq@163.com

其他作者 边 疆,刘 缨

收稿日期 2005-01-26,修回日期 2005-06-09

表 1 菌株和质粒

Strains or plasmids	Phenotype and genotype	Source or reference
Strains		
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>recA1 ,supE44 ,endA1 ,hsdR17 ,gyrA96 ,relA1 ,thi △(lac-proAB) , F[traD36 proAB⁺ lac P⁺ lacZ△ M15]</i>	This lab
<i>E. coli</i> SM10	<i>Thr ,leu ,hsd ,recA ,Km^r ,RP4-2-Tc :Mu ,integrated</i>	[8]
<i>E. coli</i> C600	<i>supE44 ,hsdR ,thi-1 ,thr-1 ,leuB6 ,lacY1 ,tonA21</i>	[9]
<i>A. caldus</i> MTH-04	Wild type	[7]
Plasmids		
pUM3	Ap ^r ,As ^r	[10]
RP4	Ap ^r ,Tc ^r ,Km ^r ,IncP , tra ⁺	[11]
pMMB24	Ap ^r ,RSF1010 ,mob ⁺ , <i>lacI</i> ⁰ / P <i>tac</i>	[12]
pSDRA3	Ap ^r ,As ^r ,IncQ ,mob ⁺ , <i>lacI</i> ⁰ / P <i>tac</i>	This study
pSDRA4	Ap ^r ,As ^r ,IncQ ,mob ⁺ ,P <i>tac</i>	This study

1.1.2 试剂和仪器 :T4 DNA 连接酶(Promega 公司);*Hind*Ⅲ、*Sal*Ⅰ和 *Eco*RⅠ(TaKaRa 公司);Agarose Gel DNA Extraction Kit(Promega 公司)。利用尤尼柯 WFZ UV-2000 型紫外可见分光光度计测定大肠杆菌菌液吸光度 ;利用 SPECTRA MAX190 型微板光谱仪测定喜温硫杆菌菌液吸光度。

1.1.3 培养基和培养条件 :大肠杆菌采用 LB 培养基 37℃培养 ,喜温硫杆菌液体培养采用元素硫(S⁰)为能源的 Starky 无机盐培养基^[13] ,pH2.5 ~ 3.0 40℃培养 ,固体培养采用 Starky-Na₂S₂O₃ 培养基^[13] , pH4.8 ~ 5.0 40℃培养 ;大肠杆菌和喜温硫杆菌的接合培养基 :在 Starky-Na₂S₂O₃ 固体培养基中加入 0.05%的酵母粉^[13] ,pH4.8 ~ 5.0 37℃培养。

1.2 DNA 操作技术

质粒 DNA 的提取、酶切、连接、转化等技术均参照文献 9 的方法。

1.3 大肠杆菌和喜温硫杆菌的接合转移

将重组质粒转化大肠杆菌 SM10 作为接合的供体菌 ,LB 液体培养基培养 14 ~ 16h ,按 4% ~ 5% 的接种量转接 LB 液体培养基 ,继续培养至对数期中后期 ,喜温硫杆菌受体菌在 Starky-S⁰ 液体培养基中 ,40℃静止培养至稳定期。供体菌和受体菌分别离心取菌体 ,用无机盐溶液洗涤 ,采用滤膜接合法^[14] ,37℃培养 2 ~ 3d。用适量无机盐水洗下菌体细胞 ,涂布含有 5mmol/L 亚砷酸钠的 Starky-Na₂S₂O₃ 固体培养基平板 ,不含亚砷酸钠的培养基作对照 40℃培养 7 ~ 10d。接合转移频率以每个受体菌所产生的接合转移子的数量表示^[14]。

1.4 抗砷质粒的抗砷能力测定

将大肠杆菌(*E. coli*)JM109(pMMB24) JM109 (pSDRA4)培养过夜 ,以 1% 的转接量转接含有不同

浓度亚砷酸钠的 LB 液体培养基 ,37℃培养 24h ,600nm 波长下测定不同培养时间的菌液的 OD 值 ,进行抗砷能力比较。

将野生型 *A. caldus* MTH-04 以及构建的工程菌 *A. caldus* MTH-04(pSDRA4)分别培养至稳定期 ,以 5% 的转接量转接含有不同浓度亚砷酸钠的 Starky-S⁰ 液体培养基 ,40℃静止培养 ,在不同的时间取菌液 ,低速离心去除硫粉 ,600nm 波长下测定菌液的 OD 值 ,进行抗砷能力比较。

1.5 质粒稳定性测定

在含有 5mmol/L 亚砷酸钠的 Starky-Na₂S₂O₃ 固体平板上挑取一个接合转移子 *A. caldus* MTH-04 (pSDRA4)菌落 ,接种到不含亚砷酸钠的 Starky-S⁰ 液体培养基中 40℃静止培养 7d ,然后按照 1% 的比例转接 ,继续培养 7d ,如此连续转接 5 次(约 50 代) ,稀释后涂布不含亚砷酸钠的 Starky-Na₂S₂O₃ 固体平板 40℃培养 7 ~ 10d。菌落长出后 ,用无菌牙签在 5mmol/L 亚砷酸钠的 Starky-Na₂S₂O₃ 固体平板上点种 100 个菌落 ,计算抗性菌落与敏感菌落的比例 ,测出质粒在喜温硫杆菌中的稳定性^[15]。

2 结果

2.1 重组质粒 pSDRA4 的构建和重组菌的鉴定

用限制性内切酶 *Hind*Ⅲ酶切质粒 pUM3 ,得到 4.3kb 的载体片段和抗砷基因簇片段 ,再用 *Sal*Ⅰ酶切载体片段 ,电泳回收 4.3kb 的抗砷基因片段 ,与用 *Hind*Ⅲ酶切的质粒 pMMB24 用 T4 DNA 连接酶连接 ,通过筛选正确的插入方向 ,获得重组质粒 pSDRA3。进一步用 *Eco*RⅠ进行酶切 ,删除 1.4kb 的调节基因 *lacI*⁰ 构建了重组质粒 pSDRA4(图略)。

将重组质粒 pSDRA4 转化大肠杆菌 JM109 ,在含

有 Amp(80μg/mL)的 LB 平板上筛选转化子 ,提取质粒进行酶切分析(图 1)。质粒 pMMB24 经 *Eco*R I 酶切后 ,得到 1.4kb 的调节基因片段(*lacI^o*)和 11.3kb 的大片段 ;构建的重组抗砷质粒 pSDRA4 经 *Hind* III 酶切后 ,一条带与 4.3kb 的抗砷基因簇片段相同 ,另外一条则与质粒 pMMB24 经 *Eco*R I 酶切后的大片段大小相同。综上所述 ,重组质粒 pSDRA4 保留了 pMMB24 的 Amp 抗性、*tac* 强启动子、*mob* 基因及复制原点并含有抗砷结构基因簇 ,是理想的抗砷载体。

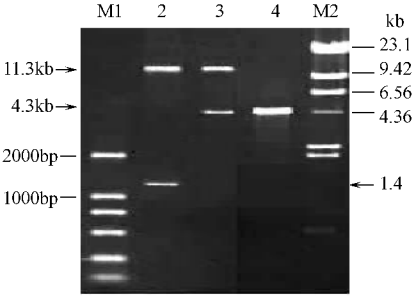


图 1 质粒 pSDRA4 酶切电泳图谱

Fig. 1 Enzymatic electrophoretogram of arsenic resistance plasmid pSDRA4

M1. DL2000 DNA marker ; 2. pMMB24/*Eco*R I ; 3. pSDRA4/*Hind* III ; 4. pUM3/*Hind* III ; M2. λDNA/*Hind* III marker .

2.2 重组质粒 pSDRA4 上的抗砷基因簇在大肠杆菌中的表达

分别检测了含有质粒 pMMB24 和 pSDRA4 的 *E. coli* JM109 在不同浓度亚砷酸钠的 LB 液体培养基中的生长情况。由图 2 可以看出含有载体质粒 pMMB 24 的大肠杆菌 JM109 对照菌在 5mmol/L NaAsO₂ 条件下生长即受到抑制。而含有重组质粒 pSDRA4 的大肠杆菌 JM109 在 20mmol/L NaAsO₂ 条件下还能较好地生长 ,其抗砷能力远远高出对照菌 ,说明重组质粒上的抗砷基因簇在大肠杆菌中获得表达 ,因此 ,抗砷质粒 pSDRA4 的构建是成功的。

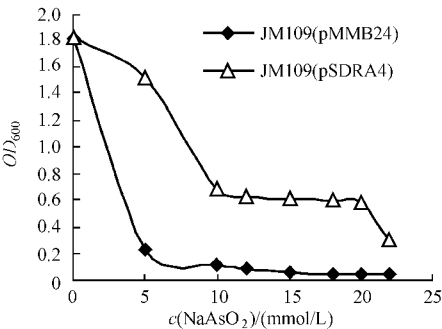


图 2 不同亚砷酸钠浓度下各菌株的最大生长量曲线

Fig.2 The maximal growth curve of *E. coli* harboring different plasmids in different concentrations of NaAsO₂

2.3 抗砷质粒 pSDRA4 从大肠杆菌到喜温硫杆菌的接合转移

以 pMMB24 为载体构建的重组质粒 pSDRA4 具有广泛寄主范围 ,为非转移性质粒 ,但含有 *mob* 位点 ,可以在 *E. coli* SM10 染色体上的 *tra* 基因的诱导下进行接合转移。将 pSDRA4 转化 *E. coli* SM10 作为供体菌 ,野生型喜温硫杆菌 MTH-04 作为受体菌 ,进行滤膜接合 ,在 5mmol/L 亚砷酸钠的 Starky-Na₂S₂O₃ 固体平板上筛选出接合转移子 *A. caldus* MTH-04 (pSDRA4) ,接合转移频率是(1.444 ± 0.797) × 10⁻⁴。这是外源基因导入专性自养极端嗜酸性喜温硫杆菌中的首次报道。

2.4 抗砷质粒 pSDRA4 从喜温硫杆菌到大肠杆菌的反向接合转移

为了证明重组质粒确实已从 *E. coli* SM10 中导入了喜温硫杆菌 MTH-04 中 ,对接合转移子 *A. caldus* MTH-04 (pSDRA4)进行了反向接合转移验证。由于喜温硫杆菌的染色体上没有 *tra* 基因 ,所以借助大肠杆菌自身转移性质粒 RP₄ 上的 *tra* 基因的推动作用 ,以 *E. coli* C600 (RP₄)作为辅助菌 ,*A. caldus* MTH-04 (pSDRA4)作为供体菌 ,*E. coli* C600 作为受体菌 ,3 种菌一起进行滤膜接合 ,37℃ 培养 24h ,用含有 5mmol/L 亚砷酸钠的 LB 平板进行筛选 ,挑选出反向接合转移子 *E. coli* C600 (pSDRA4) ,并提取质粒验证。从反向接合转移子 *E. coli* C600 (pSDRA4)中提取的质粒与从正向接合的供体菌 *E. coli* SM10 (pSDRA4)中提取的质粒相同 ,从而证明重组质粒 pSDRA4 确实已导入喜温硫杆菌 MTH-04 中。

2.5 重组质粒 pSDRA4 上的抗砷基因簇在喜温硫杆菌中的表达

分别检测了野生型 *A. caldus* MTH-04 对照菌及构建的工程菌 *A. caldus* MTH-04 (pSDRA4)在不同浓度亚砷酸钠的 Starky-S⁰ 液体培养基中的生长情况。由图 3 可以看出野生型对照菌 *A. caldus* MTH-04 在含低浓度亚砷酸钠(≤10mmol/L)的 Starky-S⁰ 液体培养基中也能生长 ,但是随着亚砷酸钠浓度的升高 ,野生型对照菌 *A. caldus* MTH-04 的生长延迟期明显增长 ,当亚砷酸钠浓度升至 15mmol/L 时 ,对照菌的生长即受到完全抑制。构建的工程菌在亚砷酸钠浓度较低时(≤25mmol/L) ,生长的延迟期并不明显 ,随着亚砷酸钠浓度的继续增大 ,工程菌的生长虽然受到部分抑制 ,但在亚砷酸钠浓度高达 45mmol/L 时仍能生长。以上结果说明抗砷基因在喜温硫杆菌中获得高效表达。

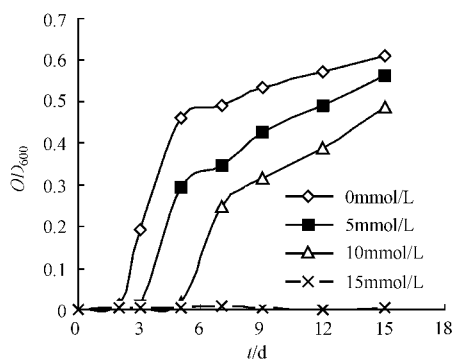


图3 *A. caldus* MTH-04 在不同浓度 NaAsO_2 下的生长曲线

Fig.3 Growth curve of wild type *A. caldus* MTH-04 in different concentrations of NaAsO_2

对构建的工程菌 *A. caldus* MTH-04 (pSDRA4) 在不同浓度亚砷酸钠的 Starky-S⁰ 液体培养基中的最大生长量与野生菌进行了比较(图4)。由图可见,野生型对照 *A. caldus* MTH-04 在 NaAsO_2 浓度为 15mmol/L 时就不再生长,而工程菌在 NaAsO_2 浓度为 45mmol/L 时还有较大的生长量,与野生型相比,构建的冶金工程菌的抗砷性能提高了 2 倍以上。

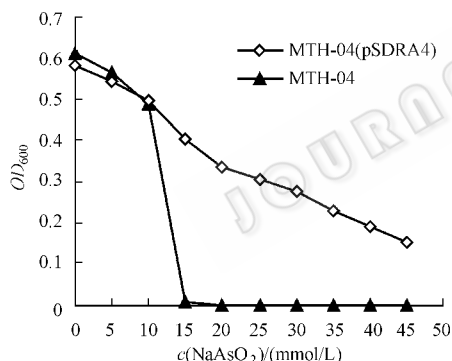


图4 不同浓度亚砷酸钠下菌株的最大生长量曲线

Fig.4 The maximal growth curve of *A. caldus* strains in different concentrations of NaAsO_2

2.6 质粒的稳定性

构建的基因工程菌 *A. caldus* MTH-04 (pSDRA4) 在不含有亚砷酸钠的液体培养基中连续传代约 50 代后,仍然有 76% 的菌体细胞保持亚砷酸钠抗性。表明重组质粒 pSDRA4 在 *A. caldus* 菌株中具有较好的稳定性。

3 讨论

喜温硫杆菌(*Acidithiobacillus caldus*)是 1994 年命名的新菌种(命名时为 *Thiobacillus caldus*)。近年来发现它在细菌浸矿中具有十分重要的作用。但是在

实际应用过程中,由于该菌生长缓慢、细胞得率低以及对重金属如砷、汞、银等缺乏抗性等特点,不仅限制了其应用范围,也给实验室的研究工作带来许多不便。因此要想充分发挥其生物冶金的功能,对喜温硫杆菌进行遗传改造势在必行。喜温硫杆菌是专性自养极端嗜酸性硫氧化细菌,该属菌中未发现有噬菌体存在。转导行不通,而转化的方法对该属中的嗜酸菌都未见报道,这样建立一种有效的遗传改造方法便转向了接合转移。由于喜温硫杆菌与大肠杆菌的生活条件存在巨大差异,所以在两者之间建立接合转移系统也十分困难,至今国内外未见有外源基因导入喜温硫杆菌中的研究报道。

本试验使用的含有抗砷结构基因簇的大肠杆菌质粒 pUM3 不能用于接合转移。大肠杆菌 IncQ 族质粒 pMMB24 具有广泛寄主范围,含有 *tac* 强启动子,带有 *mob* 位点,可被带有 *tra* 基因的 IncP 族自身转移性质粒(如 RP4)或者染色体上带有 *tra* 基因的菌株(如 *E. coli* SM10)带动转移。因此,把大肠杆菌质粒 pUM3 上含有抗砷基因簇的片段亚克隆到质粒 pMMB24 的 *tac* 启动子的下游,构建了重组质粒 pSDRA3。由于 *tac* 强启动子的上游存在调节基因,抗砷基因需要在 IPTG 的诱导下才能得到高效表达,这在实际生产中不可行,因此进一步删除调节基因,获得了既能进行接合转移又具有强启动子的组成型表达的抗砷质粒 pSDRA4。大肠杆菌抗砷质粒 pSDRA4 向极端嗜酸性喜温硫杆菌的成功转移表明在大肠杆菌和喜温硫杆菌之间已建立了一个遗传转移系统,而重组质粒上的抗砷基因簇在喜温硫杆菌中的高效表达表明大肠杆菌的 *tac* 启动子也被喜温硫杆菌的 RNA 聚合酶识别和结合,表现强启动功能。由此可知,虽然异养的大肠杆菌和专性自养的极端嗜酸性喜温硫杆菌在生理特性上存在着巨大的差异,但是在基因表达机制方面至少在转录水平上是相似的。

本试验首次成功建立了大肠杆菌与喜温硫杆菌的遗传转移系统,不仅为用遗传工程手段改造浸矿中使用的工业菌株提供了实验依据和方法,为以后喜温硫杆菌其他性能的改造奠定了基础,而且对研究自养细菌和异养细菌之间的基因结构、表达机制方面的异同都有重要意义。构建的具有高效抗砷能力的工程菌也为生物冶金提供了生产菌株。

参 考 文 献

- [1] Hallberg K B, Dopson M, Lindstorm E B. Reduced sulfur compound oxidation by *Thiobacillus caldus*. *J Bacteriol*, 1996, **178**: 5–11.
- [2] Goebel B M, Stackebrandt E. Cultural and phylogenetical analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**: 1614–1621.
- [3] Tuovinen O H, Bhatti T M, Bigham J M, *et al.* Oxidative dissolution of arsenopyrite by mesophilic and moderately thermophilic acidophiles. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**: 3268–3274.
- [4] Rawlings D E, Tributsch H, Hansford G S. Reasons why leptospirillum-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. *Microbiology*, 1999, **145**: 5–13.
- [5] Dopson M, Lindstorm E B. Potential role of *Thiobacillus caldus* in arsenopyrite bioleaching. *Appl Environ Microbiology*, 1999, **65**: 36–40.
- [6] Hallberg K B, Lindstorm E B. Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. *Microbiology*, 1994, **140**: 3451–3456.
- [7] 刘 纓, 齐放军, 林建群, 等. 一株中度嗜热嗜酸硫氧化杆菌的分离和系统发育分析. *微生物学报*, 2004, **44**(3): 382–385.
- [8] Simon R, Prierer U, Puhier A. A broad host range mobilization system for *in vitro* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biol Technology*, 1993, **11**: 784–791.
- [9] Sambrook J, Maniatis T, Fritsch E F. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
- [10] Mobley H L, Chen C M, Silver S, *et al.* Cloning and expression of R-factor mediated arsenate resistance in *E. coli*. *Mol Gen Genet*, 1983, **191**: 421–426.
- [11] Datta N, Hedges R W, Shaw E J, *et al.* Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 1971, **108**: 1244–1249.
- [12] Bagdasarian M M, Amann E, Lurz R, *et al.* Activity of the hybrid *trp-lac (tac)* promoter of *E. coli* in *Pseudomonas putida*. *Gene*, 1983, **26**: 273–282.
- [13] Jin S M, Yan W M, Wang Z N. Transfer of IncP plasmids to extremely acidophilic *Thiobacillus thiooxidans*. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**(1): 429–430.
- [14] 金松谟, 颜望明, 王祖农. 氧化硫硫杆菌接合转移系统的建立. *生物工程学报*, 1993, **16**: 758–763.
- [15] 田克立, 林建群, 刘相梅, 等. 大肠杆菌磷酸果糖激酶基因在极端嗜酸性氧化硫硫杆菌中的表达. *山东大学学报*, 2004, **39**(2): 106–111.

Construction of an engineered *Acidithiobacillus caldus* with high-efficiency arsenic resistance

ZHAO Qing, LIU Xiang-mei*, ZHAN Yang, LIN Jian-qun, YAN Wang-ming

(State Key Lab of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: Using the recombinant technique *in vitro*, a new arsenic resistance plasmid pSDRA4 was constructed by subcloning the arsenic resistance genes from plasmid pUM3 into the wide-host-range IncQ plasmid pMMB24 with the hybrid *trp-lac (tac)* promoter, and followed by deleting the regulative gene of the promoter, the *lacI^q* gene. Then plasmid pSDRA4 was introduced from *E. coli* into extremely acidophilic obligately chemolithotrophic *Acidithiobacillus caldus* by conjugative transfer with a frequency of $(1.444 \pm 0.797) \times 10^{-4}$, and the engineered strain of *Acidithiobacillus caldus* (pSDRA4) for biomining was constructed. The successful transfer demonstrates the development of a conjugational system between strains of *E. coli* and *A. caldus*. The recombinant plasmid pSDRA4 is stable in *A. caldus*. Compared with wild type *A. caldus*, the level of the arsenic resistance of *A. caldus* (pSDRA4) is greatly raised from 10mmol/L to 45mmol/L.

Key words: Arsenic resistance gene, *Acidithiobacillus caldus*, Conjugative transfer, Extremely acidophilic chemolithotrophic bacteria

Foundation item: National Basic Research Program of China (2004CB619202); Reward Fund for Young Scientists of Shandong Province (2004BS08006, 03BS142)

* Corresponding author. Tel/Fax 86-531-88565610; E-mail: liuxiangmei@sdu.edu.cn

Other authors: BIAN Jiang, LIU Ying

Received date: 01-26-2005