

## 血清 7 型胸膜肺炎放线杆菌 *apx II C<sup>-</sup> / apx I A<sup>+</sup>* 基因缺失 重组菌株的构建与鉴定

刘金林<sup>1</sup>, 贝为成<sup>1, 2\*</sup>, 林荔雯<sup>1</sup>, 徐引弟<sup>1</sup>, 陈焕春<sup>1, 2</sup>

(<sup>1</sup>华中农业大学动物医学院 <sup>2</sup>农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

**摘 要** 通过接合转移和 SacB 负向筛选方法, 成功构建了一株 *apx II C* 缺失的血清 7 型胸膜肺炎放线杆菌重组菌株。首先构建重组转移质粒 pEHA1。将 pEHA1 转化供体菌大肠杆菌(*E. coli*  $\beta$ 2155), 并将其与野生型 APP 血清 7 型亲本菌混合培养约 5h, 然后涂到含氯霉素抗性的培养基培养, 挑取阳性克隆, 接种到无抗性液体培养基, 培养后涂于含有蔗糖的的固体培养基, 培养一定时间后挑取蔗糖抗性的克隆, 即可得到目的突变株。通过 PCR、遗传稳定性、外毒素分泌、重组位点序列分析证明重组菌构建成功。通过对重组菌生物学特性进行初步研究, 表明突变株生长能力未受影响, 对小鼠毒力显著降低。该突变株构建体系的建立为猪传染性胸膜肺炎减毒活疫苗的开发及对胸膜肺炎放线杆菌新基因的功能研究奠定了良好基础。

**关键词**: 胸膜肺炎放线杆菌; 接合转移; 负向筛选; 重组菌株; 构建; 鉴定

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)06-0973-05

胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus Pleuropneumoniae*, APP) 为革兰氏阴性杆菌, 目前该菌共有 15 个血清型<sup>[1]</sup>, 除血清 13 和 14 型菌生长为不依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NAD) 的生物 II 型外, 其余 13 种血清型菌均为生长依赖 NAD 的生物 I 型, 并都与猪致病相关。APP 可引起猪传染性胸膜肺炎 (Porcine Contagious Pleuropneumonia, PCP), 在世界各国均有发生, 给全球养猪业带来巨大经济损失<sup>[2]</sup>。

APP 致病因子众多, 分泌性毒素是一种主要毒力因子, 同时也是一种重要的免疫原性蛋白, 属于 RTX 毒素家族 (Repeat in Toxin), 胸膜肺炎放线杆菌共产生 4 种不同的 Apx 毒素, 即 Apx I、Apx II、Apx III 和 Apx IV<sup>[3, 4]</sup>。如果要产生和分泌具有生物活性的 Apx 毒素, 需要相邻的按一定顺序排列的 4 个基因 CABD 组成的操纵子调控, 其中 A 基因编码毒素结构蛋白, C 基因编码毒素激活蛋白, 负责对毒素进行酰基化激活, B 基因和 D 基因的翻译后蛋白产物形成跨膜通道, 负责毒素由细胞内到细胞外的分泌<sup>[5]</sup>。有研究表明缺失了 C 基因的菌株仍能分泌结构蛋白 A, 且具有良好的免疫原性<sup>[6]</sup>。

目前, 猪传染性胸膜肺炎在我国乃至全球广泛

流行, 给养猪业造成了巨大的经济损失。抗生素在预防和控制细菌性传染病曾起到很大作用, 但随着耐药菌株的频繁出现以及国家对抗生素使用的严格限制, 疫苗在控制猪传染性胸膜肺炎将成为主要的手段。目前所使用的疫苗主要是全细菌灭活疫苗或亚单位疫苗。由于 APP 血清型多, 各血清型分泌的毒素差异很大, 导致各血清型之间交叉保护率较低, 大大增加了防治该病的难度<sup>[7]</sup>。近年来, 减毒活疫苗的研究, 为该病的防治带来希望<sup>[8-10]</sup>。可以预见, 应用新型安全、高效的基因缺失疫苗将成为控制猪传染性胸膜肺炎的一种趋势。由于血清 7 型胸膜肺炎放线杆菌不分泌毒素 Apx I 仅分泌毒素 Apx II, 而毒素 Apx I 和毒素 Apx II 既是 APP 两个主要的毒力因子, 同时又是作为 APP 两个关键的免疫保护性蛋白, 具有“双重作用”。因此, 本研究以我国流行的 APP 血清型 7 型菌株为出发菌株, 通过插入 APP 血清 1 型 (APP-1) *apx I A* 基因来缺失 APP 血清 7 型 (APP-7) *apx II C* 基因, 构建能同时分泌无毒力的毒素 Apx I 和毒素 Apx II 的重组胸膜肺炎放线杆菌突变菌株, 旨在获得一株 APP 弱毒活疫苗菌株。同时, 优化该突变株构建体系, 为研制更合理新型安全、高效的 APP 基因工程疫苗以及为胸膜肺炎放线

基金项目: 国家自然科学基金 (30600025, 30530590), 国家支撑计划项目 (2006BAD06A04), 国家“863 计划” (2006AA10A206)

\* 通讯作者。Tel: 86-27-87288629; Fax: 86-27-87281795; E-mail: bweic@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 刘金林 (1982 - ), 男, 博士研究生, 主要从事动物病原菌分子生物学与基因工程疫苗研究。E-mail: liujinlin2009@126.com

其他作者: 梅岭<sup>1</sup>

收稿日期: 2007-03-15; 接受日期: 2007-04-19; 修回日期: 2007-07-03

杆菌新基因功能研究奠定坚实的理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自湖北省疾病预防控制中心。

**1.1.2 主要试剂**: 二氨基庚二酸 (Diaminopimelic acid, DAP)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NAD<sup>+</sup>) 购自美国 Sigma 公司。各种限制性内切酶、ExTaq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker 酶、pMD-18T 载体购自大连宝生物

工程 (大连) 有限公司。DNA 凝胶回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司, 胰蛋白大豆琼脂 (Tryptic Soy Agar, TSA)、胰蛋白大豆肉汤 (Tryptic Soy Broth, TSB) 购自美国 Difco 公司。

**1.1.3 菌株和质粒**: 胸膜炎肺炎放线杆菌血清 7 型 (APP-7) 由本研究室自行分离、鉴定并保存。大肠杆菌 (*Escherichia Coli*)  $\beta$ 2155 以及自杀性质粒 pEMOC2 由德国汉诺威兽医大学 GERALD-F. GERLACH 教授惠赠。

**1.1.4 引物**: 引物设计见表 1。

表 1 实验中所用引物及说明

Table 1 The primer sets for PCR in this study

Gene	Primer	Sequence (5'→3')	Length/bp	Remark
<i>cat</i> II	Pcm1	TTTCTGCAGCGGTTATCCGGTGGTTTTCTCG	1694	<i>Pst</i> I
	Pcm2	GGGGTGCAGCTAAATATACCCCGCTTTGAC		<i>Sal</i> I
<i>apx</i> II XCA	P1	GGGGTGCAGCTACGGATTACGCCGTTTATTG	2449	<i>Sal</i> I
	P2	TTTGGCGCCGACGTTGAGACAAACCTGAAGC		<i>Not</i> I
<i>apx</i> I A	P3	GGGACTAGTCATGGCTAACTCTCAGCTC	3066	<i>Spe</i> I
	P4	GGCTCTAGAGCTGCTTGTGCTAAAGAATAACTC		<i>Xba</i> I
<i>apx</i> II XC	P5	ATCGTCTTCTTGCCGAC	1287	
	P6	CTGCCCTGCTTGCTTAC		
<i>apx</i> II CA	P7	GTGCATTTACCGTGATCACG	1378	
	P8	GCTAGTGCAACTGTAGATGCG		
<i>apx</i> I AN	P9	ATGGCTAACTCTCAGCTCG	826	Reference <sup>[17]</sup>
	P10	CGCTTACCGATATTGCCTA		

### 1.2 重组转移质粒的构建

质粒 pEHA1 构建过程如图 1 所示。用 mini-Tn5 中 *cat* II 的基因置换 pEMOC2 中 *Pst* I / *Sal* I 片段构建质粒 pBMC1, 以消除 *Spe* I 位点。再将 *apx* II XCA 基因插入到 pBMC1 的 *Sal* I / *Not* I 位点, 形成含有两段同源臂的质粒 pBH1, 利用 pBH1 的 *apx* II XCA 基因中 *Spe* I / *Xba* I 位点, 将 *apx* I A 的完整编码区以正确的读框插入到 pBH1 中, 组成中间载体 pBHA1, 最后将 pBHA1 上含有同源臂和外源基因的片段通过 *Sal* I / *Not* I 连入 pEMOC2 中, 形成重组转移质粒 pEHA1。

### 1.3 重组转移质粒转化大肠杆菌 $\beta$ 2155

按常规 CaCl<sub>2</sub> 转化方法制备大肠杆菌  $\beta$ 2155 感受态细胞, 热激法转化均按常规方法<sup>[11]</sup>进行。以 PCR 及 DAP 依赖性表型鉴定获取的阳性克隆。

### 1.4 突变株筛选

将 1.3 中获得的阳性克隆与亲本菌 APP-7 以 1:3 的比例混合培养 5h, 用 TSB 洗涤两次后均匀涂于含 NAD、小牛血清和氯霉素的 TSA 平皿培养 24h, 挑取单交换克隆子, 并用引物 P5、P6 或 P7、P8 进行

PCR 检测, 扩增结果阳性的克隆即可判断为单交换子。将单交换子接种不含氯霉素抗性的 TSB 培养基, 培养 8h 后, 连续 10 倍稀释, 涂布含蔗糖的 TSA 平皿, 挑取蔗糖抗性的克隆, 分别用 P5、P6 和 P7、P8 两对引物验证重组子。两组引物扩增均为阳性, 即可判定为目的突变株。

### 1.5 突变株的分析检测

**1.5.1 突变株遗传稳定性分析** 将获得的突变株在 TSA 培养基上连续传代 20 代, 每隔两代取样一次, 最后以引物 P5、P6、P7、P8 和 P9、P10 验证样品是否阳性。

**1.5.2 突变株毒素 Apx II A 分泌和检测** 按文献 [12] 描述方法提取亲本菌和突变菌株天然毒素, 以本实验室制备的抗 Apx I A、Apx II A 的单克隆抗体为一抗, 按文献描述方法<sup>[13]</sup>进行 Western blot 检测。

**1.5.3 突变株重组位点序列分析** 将引物 P5、P6、P7、P8 从突变株中克隆到的片段连接到 pMD-18T, 送大连宝生物工程 (大连) 有限公司测序 (双脱氧末端终止法)。

**1.5.4 突变株增殖能力分析** 将过夜培养的亲本菌

和突变株分别以 1:1000 比例接种到 100mL TSB 培养基 (含 NAD 和 10% 小牛血清), 接种后每隔 1h 取样, 共取 10 次, 测定每小时的活菌数, 比较两株菌增长能力。

1.5.5 突变株对小鼠毒力试验 将过夜培养的亲本

菌和突变株分别以 1:1000 比例接种到 20mL TSB 培养基, 培养至 *OD*<sub>600</sub> 约 0.8, 连续 2 倍稀释, 每个稀释度腹腔注射 (i.p) 8 只小鼠, 每只 200 μL, 连续观察 5d, 记录小鼠存活情况。

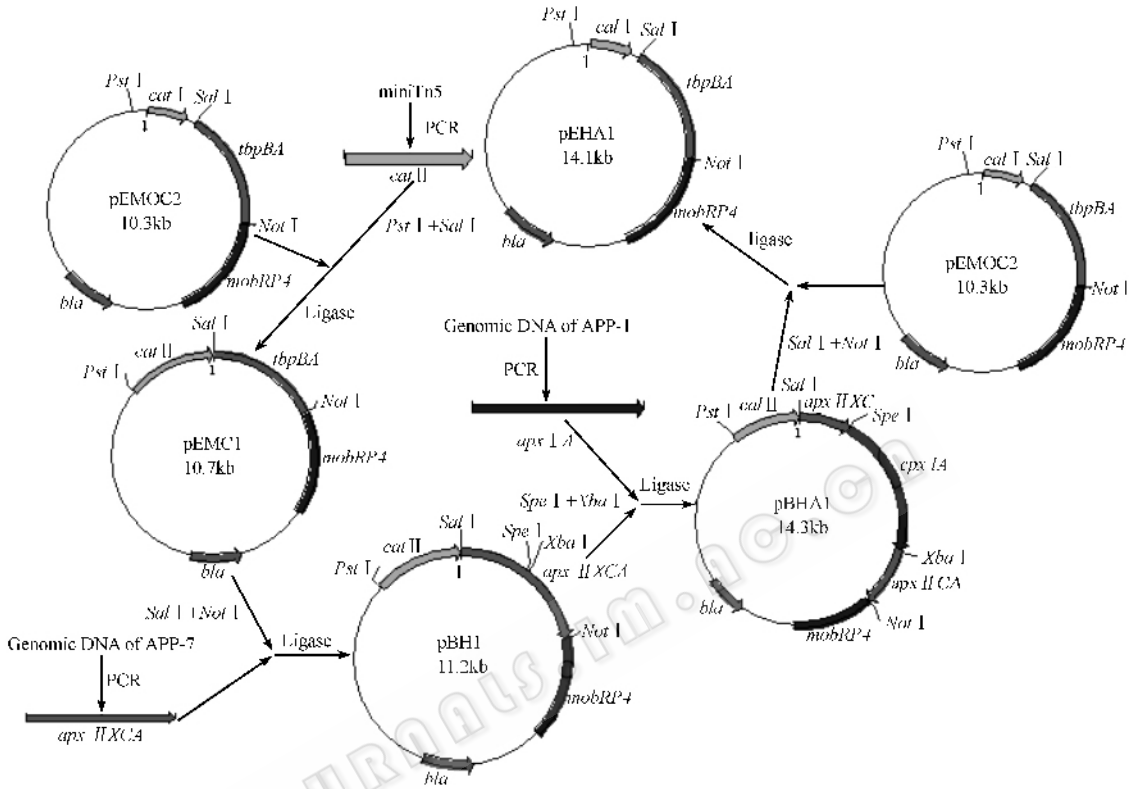


图 1 重组转移质粒 pEHA1 构建流程图示

Fig.1 Process of constructing transconjugation plasmid pEHA1

2 结果

2.1 重组转移质粒的构建

通过 PCR 从 APP 基因组中克隆到约 2500bp 的 *apx II XCA* 基因和约 3100bp 的 *apx I A* 基因, 大小与预期相符合。用 *Sal I / Not I* 双酶切从 pBH1 中可以得到约 2.5kb 的 *apx II XCA*, 从 pEHA1 可酶切得到 *apx II XCA-apx I A* 约 5.6kb, 说明重组转移质粒构建正确。

2.2 突变株的筛选

将引物 P5、P6 和 P7、P8 扩增阳性的而对蔗糖不敏感的克隆用引物 P9、P10 加以验证, 结果均与预期相符。将突变株连续传代 20 次, 用 P5/P6, P7/P8, P9/P10 三对引物扩增均为阳性, 说明该突变株遗传稳定。提取分泌性外毒素, 用抗 *Apx I A*、*Apx II A* 单克隆抗体进行 Western blot 检测时, 结果 *Apx II A* 为阳性 (见图 2), 而 *Apx I A* 为阴性 (结果未显示), 由

此可见 *apx I A* 基因的插入并没有影响 *Apx II A* 的分泌及免疫学活性, 但是突变株不能分泌 *Apx I A*。

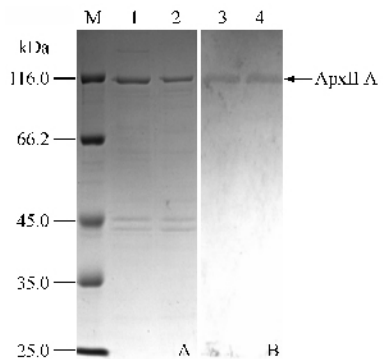


图 2 分泌性外毒素 *Apx II A* SDS-PAGE 和 Western blot 分析

Fig.2 SDS-PAGE and western blot analysis of the exotoxin *Apx II A*. A: SDS-PAGE analysis of the supernatant samples; B: Western blot analysis of the supernatant samples. M: Protein marker with low molecular weight; 1 and 3: *A. pleuropneumoniae* parent strain; 2 and 4: *A. pleuropneumoniae* mutant strain.

对 *apx I A* 插入位点序列分析,发现在 *apx I A* 的 ATG 前为 ACTAGTC (*Spe I*),在 *apx I A* 最后一个密码子序列为 GCTCTAGA (*Xba I*),而且 *apx I A* 基因序列中也没有移码情况(结果未显示)。突变株的生长能力也没有发生明显变化,培养 8h 后活菌数接近  $7.0 \times 10^9$  CFU/mL,如图 3 所示。

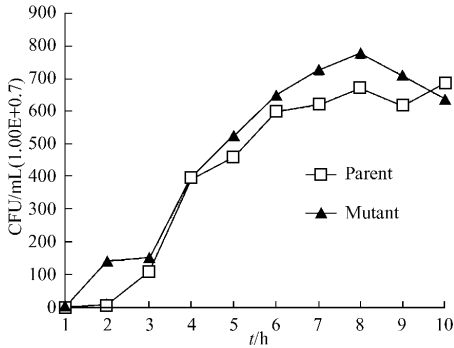


图 3 突变株和亲本株生长曲线

Fig.3 Growth curves of *A. pleuropneumoniae* parent strain and mutant.

### 2.3 突变株对小鼠毒力试验

将不同浓度的亲本菌和突变株接种小鼠,从小鼠存活情况看,突变株毒力已明显下降,结果见表 2。

表 2 突变株与亲本菌对小鼠毒力

Table 2 Virulence of the mutant and parent on mice

Strains	NO. of mice survived after challenge with the given dose (cfu)				
	$5.0 \times 10^7$	$2.5 \times 10^7$	$1.2 \times 10^7$	$6 \times 10^6$	$3 \times 10^6$
Mutant	4	8	8	8	8
Parent	0	0	0	5	8

## 3 讨论

对于猪传染性胸膜肺炎的免疫防制,目前主要依赖菌苗和亚单位疫苗,这样虽然能对同源血清型攻击提供良好的保护,但是,由于 APP 血清型众多,所有血清型均能引起猪发病,所以仅能提供对同源血清型保护的疫苗已不能满足当前防制该传染病需要。人们从临床检测中发现自然感染并康复猪能抵抗多种其他血清型菌株的再次攻击<sup>[14]</sup>,表明活疫苗免疫可提供对异源血清型的交叉保护,因此,减毒活疫苗的研制已成为研究胸膜肺炎放线杆菌疫苗研究的热点。减毒活疫苗除了毒力降低外,还需要具备 3 个最基本条件,即不能回复突变,不能将主要免疫原性基因缺失后致使免疫原性降低,不能将重要代谢基因缺失致使生长缓慢<sup>[15]</sup>。本研究构建的突变株是将分泌性外毒素 *apx II* 基因的激活调节基因 *apx II C* 缺失,而不影响结构基因 *apx II A* 的表达,突变株增殖能力分析表明其生长能力并未下降,小

鼠毒力试验证明突变株毒力明显降低,所以,本实验构建的突变株是成功的,基本具备了作为弱毒疫苗菌株的条件。

在本次突变株构建过程中,使用了自杀性重组质粒 pEMOC2,它能在大肠杆菌中保持较高的拷贝数(pUC ori),但是进入到 APP 后,失去复制能力,只有通过同源臂整合到基因组中,其抗性基因才能得以表达,该质粒上带有可用于负向筛选的标记 *sacB* 基因,在 APP 外膜蛋白基因 *omlA* 启动子的驱动下表达蔗糖果聚糖酶,蔗糖果聚糖酶通过分解蔗糖而对细菌产生毒性作用。当培养基中含有蔗糖时,则会对相应菌株产生毒性作用,从而达到剔除单交换子的目的。

在 APP 的四种 RTX 毒素中,*Apx I* 具有很强的溶血活性和强细胞毒性,因此含有 *apx I* 的血清型也都具有较高的毒力。本实验室贝为成等以我国流行的血清 7 型 APP HB04 为亲本菌,构建了一株不含抗性标记基因的弱毒疫苗菌株<sup>[16]</sup>,它对同源血清型攻击能提供完全保护,但是对于含有毒素 *apx I* 的强毒菌株的攻击只能提供部分保护。鉴于此,为改造获得一株能提供更好交叉免疫保护水平的弱毒疫苗菌株,本研究克隆了完整的 *apx I A* 的编码区,将其整合到 *apx II A* 的激活基因 *apx II C* 中,使其丧失激活能力,从而得到表达 *Apx I A* 的弱毒菌株。尽管 PCR 等鉴定发现,*apx I A* 基因已经成功插入到 *apx II C* 位点相应,而且通过对重组菌株上清 Western blot 分析发现,*Apx II A* 的表达没受到影响,但是 *Apx I A* 蛋白却没有表达。推测其原因可能是在 *apx I A* 整合到 *apx II C* 中后,其两端仍有部分 *apx II C* 基因,它们影响了 *Apx I A* 的活性以及分泌特性,或 *apx II C* 基因启动子太弱不能启动 *Apx I A* 蛋白表达。目前,本实验室正试图用 *apx I A* 基因完全取代 *apx II C* 或在 *apx I A* 前添加强启动子,以增强 *apx I A* 和 *apx II A* 的表达而不受 *apx II C* 的影响。

总之,通过 PCR、序列分析、稳定性分析以及小鼠毒力试验,表明成功构建了一株胸膜肺炎放线杆菌弱毒菌株,并为将突变菌株改造成多价疫苗载体进行了初步探索,为以后研究 PCP 疫苗及 APP 新基因功能研究奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] Blackall PJ, Klaasen HL, van Den BH, et al. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet Microbiol* 2002; 84(1-2): 177-182.
- © 中国科技期刊网 2007 年第 6 期 (http://journals.im.ac.cn)

- [ 2 ] Fenwick B ,Henry S. Porcine pleuropneumonia. *J Am Vet Med Assoc* ,1994 **204**( 9 ):1334 - 1340.
- [ 3 ] Bossé J T ,Janson H ,Sheehan B J , *et al.* *Actinobacillus pleuropneumoniae* : pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect* 2002 **4**( 2 ): 225 - 235.
- [ 4 ] Schaller A ,Kuhn R ,Kuhnert P , *et al.* Characterization of *apx I VA* , a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* ,1999 **145**( 8 ): 2105 - 2116.
- [ 5 ] Frey J. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol* ,1995 **3**( 7 ): 257 - 261.
- [ 6 ] 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 *ApX II* operon. *Infect Immun* ,1999 **67**( 4 ): 1962 - 1966.
- [ 7 ] Higgins T ,Lariviere S ,Mittal KR , *et al.* Evaluation of a killed vaccine against porcine pleuropneumonia due to *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can Vet J* ,1985 **26**( 2 ): 86 - 89.
- [ 8 ] Fuller TE ,Thacker BJ ,Duran CO , *et al.* A genetically-defined riboflavin auxotroph of *Actinobacillus pleuropneumoniae* as a live attenuated vaccine. *Vaccine* 2000 **18**( 25 ): 2867 - 2877.
- [ 9 ] 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**( 5 ): 1682 - 1686.
- [ 10 ] Rosendal S ,MacInnes JI. Characterization of an attenuated strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Am J Vet Res* ,1990 **51**( 5 ): 711 - 717.
- [ 11 ] Sambrook J ,Fritsch EF ,Maniatis T. Molecular cloning :A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> ed. New York :Cold Spring Harbor Laboratory ,1989 : 1 - 33 ,
- [ 12 ] Nielsen R ,van den Bosch JF ,Plambeck T , *et al.* Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay ( ELISA ) for detection of antibodies to the *ApX* toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* 2000 **71**( 1 - 2 ): 81 - 87.
- [ 13 ] Huang HL ,Zhou R ,Fan HY , *et al.* Generation of monoclonal antibodies and epitope mapping of *ApX I VA* of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Mol Immunol* 2006 **43**( 13 ): 2130 - 2134.
- [ 14 ] Nielsen R. *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes—cross protection experiments. *Nord Vet Med* ,1984 **36**( 7 - 8 ): 221 - 234.
- [ 15 ] Fuller TE ,Thacker BJ ,Mulks MH. A riboflavin auxotroph of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is attenuated in swine. *Infect Immun* ,1996 **64**( 11 ): 4659 - 4664.
- [ 16 ] Bei W ,He Q ,Yan L , *et al.* Construction and characterisation of a live , attenuated *apx II CA* inactivation mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lacking a drug resistance marker. *FEMS Microbiol Lett* 2005 **243**( 1 ): 21 - 27.
- [ 17 ] 陈凡 ,陈美玲 ,陈焕春 ,等. 胸膜肺炎放线杆菌基因分型方法的建立及其临床应用. 微生物学报 2005 **44**( 5 ): 679 - 682.

## Construction and characteristics of a recombinant strain *apx II C<sup>-</sup>/apx I A<sup>+</sup>* of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7

LIU Jin-lin<sup>1</sup> ,BEI Wei-cheng<sup>1,2\*</sup> ,LIN Li-wen<sup>1</sup> ,XU Yin-di<sup>1</sup> ,CHEN Huan-chun<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> College of Veterinary Medicine <sup>2</sup> State Key Laboratory of Agricultural Microbiology ,Huazhong Agricultural University ,Wuhan 430070 ,China )

**Abstract** :An *Actinobacillus pleuropneumoniae apx II C* mutant was constructed by transconjugation and counterselection method. Briefly a transconjugation plasmid pEHA1 was constructed ,and transformed into donor strain *Escherichia coli*  $\beta$ 2155. After mixed the donor cells with *A. pleuropneumoniae* acceptor cells ,the mixture was cultivated for about 5 hours and plated on solid medium containing chloramycetin. Then the Cm<sup>R</sup> positive clones were picked and inoculated into liquid medium in the absence of any antibiotic. Cultures were pelleted ,plated on sucrose plates and incubated overnight. Finally ,Sucrose-resistant colonies ( Suc<sup>R</sup> ) were selected and considered as mutant. The mutant was verified by PCR , heredity stability ,exotoxin secretion and sequence analysis ,suggested that the construction of the mutant was successful. The biological characteristics of this mutant strain was further investigated. Compared with parental strain ,the results indicated that the mutant hold the same growth rate in *in vitro* and reduced virulence on mice. Altogether ,this mutation system will facilitate development of live attenuated vaccines and research on functions of novel genes of *A. pleuropneumoniae*.

**Keywords** : *Actinobacillus pleuropneumoniae* ; transconjugation ; counterselection ; construction ; characteristics

Foundation item : National Natural Science Foundation of China ( 30530590 ,30600025 ) ; National Key Technology R&D Program ( 2006BAD06A04 ) ; National Programs for High Technology Research and Development of China ( 2006AA10A206 )

\* Corresponding author. Tel : 86-27-87288629 ; Fax : 86-27-87281795 ; E-mail : beiw@ mail . hzau . edu . cn

Other author. MEI Ling<sup>1</sup>

Received : 15 March 2007 / Accepted : 19 April 2007 / Revised : 3 July 2007 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>