

我国 17 株绵羊肺炎支原体分子分型及其菌体蛋白免疫印迹

许健^{1,2#}, 储岳峰^{1#}, 高鹏程¹, 赵萍¹, 贺英¹, 剡根强², 逯忠新^{1*}

¹中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 农业部草食动物疫病重点开放实验室, 农业部兽医公共卫生重点开放实验室, 甘肃省生物检测工程技术研究中心, 兰州 730046

²石河子大学动物科技学院, 石河子 832000

摘要:【目的】分别从基因和蛋白水平研究我国部分地区绵羊肺炎支原体 (*Mycoplasma ovipneumoniae*) 分离株的分子特征, 并了解其免疫原性蛋白的差异。【方法】对分离自 8 个地区的 17 株绵羊肺炎支原体进行扩增片段长度多态性 (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) 和十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) 分析, 采用 NTsys-2.10e 软件对 AFLP 和 SDS-PAGE 结果进行聚类, 并用绵羊肺炎支原体模式株 Y98 高免血清对部分分离株进行免疫印迹分析。【结果】当相似系数分别为 0.78 和 0.85 时, 绵羊肺炎支原体分离株可根据 8 个来源地区分成 8 个 AFLP 群和 8 个 SDS-PAGE 群; 用 8 株分离株进行免疫印迹共出现 6 条蛋白条带, 分子质量分别为 105 kDa、83 kDa、65 kDa、42 kDa、40 kDa 或 26 kDa, 其中 83 kDa 和 40 kDa 蛋白为 8 个菌株保守的免疫原性蛋白。【结论】我国部分地区绵羊肺炎支原体分离株之间存在遗传差异, 不同分离株的主要免疫原性蛋白也存在一定差异, 但 83 kDa 和 40 kDa 蛋白为其保守的免疫原性蛋白。本研究首次对我国部分地区绵羊肺炎支原体分离株进行了分子分型与免疫印迹分析, 结果将为绵羊肺炎支原体病的新型诊断技术开发和疫苗研制奠定理论基础。

关键词: 绵羊肺炎支原体, AFLP, SDS-PAGE, 免疫印迹

中图分类号: S852 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011)10-1421-06

绵羊肺炎支原体 (*Mycoplasma ovipneumoniae*, 缩写为 Movi) 是引起绵羊和山羊间质性肺炎 (非典型性肺炎) 的病原体, 病羊以慢性非进行性肺炎 (Chronic Non-progressive Pneumonia, CNP) 为特征, 主要表现咳嗽、气喘、流鼻涕、消瘦、贫血和生长发育迟缓等症状。1963 年 Mackay 等首次从苏格兰发病绵羊肺组织中分离出该病原^[1], 1972 年由 Carmichael 正式命名为 Movi^[2]。此后, 新西兰、匈牙

利、冰岛、英国、澳大利亚、西班牙、土耳其、非洲及西亚的许多国家都相继报道有由 Movi 所引起绵羊和山羊疾病发生^[3-8]。我国 1978 年在四川省从新西兰引进的边区莱斯特种羊的后代羔羊中首先发现 Movi^[9], 随后流行于宁夏、新疆、河北、山西、甘肃、云南等地绵羊、山羊群中^[10-18]。

免疫预防是动物传染病防治的重要手段之一。自被发现以来, 国内外学者对 Movi 及其所引

基金项目: 甘肃省科技支撑计划项目 (1011NKCA054); 甘肃省农业生物技术专项 (GNSW-2010-09); 国家科技基础性工作专项 (2008FY210200); 国家现代肉羊产业技术体系 (CARS-39)

* 通信作者。Tel: +86-931-8342676; Fax: +86-931-8340977; Email: luzhongxin@hotmail.com

作者简介: # 并列第一作者。许健 (1986 -), 男, 甘肃武威人, 硕士研究生, 主要从事畜禽疾病防控技术基础研究, E-mail: xujian19861222@126.com; 储岳峰 (1978 -), 男, 安徽岳西人, 博士, 主要从事动物传染病防控技术基础研究, E-mail: chuyuefeng@hotmail.com

收稿日期: 2011-04-28; 修回日期: 2011-06-20

起的疾病都做了相当多的研究,但国外 Movi 疫苗研究却进展缓慢,这可能与 Movi 不同菌株间具有较大的遗传异质性 (heterogeneity) 有很大关系,这种异质性可导致菌株间免疫原性出现差异^[4-8]。与国外研究不同的是,国内学者在本病常规诊断技术和疫苗研究中取得了一定进展,如陈廷和等 (1990) 和逯忠新等 (1993) 先后建立了检测 Movi 抗体的微量间接血球凝集试验^[14-15],谢琴等 (1995) 筛选出了 6 株单克隆抗体并建立了检测 Movi 抗体的间接酶联免疫吸附试验^[16]。邓光明等 (1991)、李新萍等 (2007) 分别用甘肃、新疆分离的 Movi 菌株制备灭活疫苗免疫本地山羊或绵羊,均可获得良好的保护效果^[17-18]。但根据国外有关 Movi 菌株具有遗传差异的研究结果,上述用本地分离单一菌株制备的疫苗,能否对不同地区发生的绵羊肺炎支原体病具有广谱的免疫预防作用存在疑问,而这也被近年来越来越多的病例和 Movi 分离报道所证实^[11-13]。本实验对分离自 8 个地区的 17 株 Movi 进行扩增片段长度多态性 (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) 和十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium

Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) 分析,并用 Movi 模式株 Y98 高免血清对不同地区分离的菌株进行免疫印迹分析,以期了解我国部分地区 Movi 分离株的分子特征和免疫原性差异,为绵羊肺炎支原体病诊断技术开发和广谱疫苗研制奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及培养基: Movi 模式株 Y98 冻干保存菌种,由英国国家菌种保藏中心 (NCTC) 馈赠。17 株国内 Movi 分离株 (表 1),均经培养特性观察、与 Y98 免疫血清进行生长抑制试验^[19] 和特异性 PCR 方法^[20] 鉴定为 Movi,本实验室冻干保存。培养基为改良 KM₂ 培养基,配方为:1% MEM (500 mL/L), 1.7% 水解乳蛋白 Hanks 液 (300 mL/L), 灭活马血清 (200 mL/L), 25% 酵母浸出液 (20 mL/L), 5% 醋酸铊 (4 mL/L), 青霉素 (200 IU/mL), 葡萄糖 (4 g/L), 丙酮酸钠 (2 g/L), 0.4% 酚红 (4 mL/L), pH 7.4-7.6 4℃ 保存备用。

表 1 用于本试验的 Movi 菌株及其分子分型结果

Table 1 Sources and the molecular types of *M. ovipneumoniae* strains used in this study

Strain	Region of isolation	Year of isolation	Host	Group	
				AFLP (coefficient = 0.78)	SDS-PAGE (coefficient = 0.85)
4-3F1	Huachi Gansu (甘肃华池)	1991	Goat	A	I
K16	Huachi Gansu (甘肃华池)	1991	Goat		
IB4-3	Huachi Gansu (甘肃华池)	1991	Goat		
IK3-4	Huachi Gansu (甘肃华池)	1991	Goat		
IK4-3	Huachi Gansu (甘肃华池)	1991	Goat		
MOGH3-3	Huachi Gansu (甘肃华池)	1990	Goat		
FL3	Wulan Qinghai (青海乌兰)	2009	Sheep	B	II
FL4	Wulan Qinghai (青海乌兰)	2009	Sheep		
JL2B	Changchun Jilin (吉林长春)	2010	Goat	C	III
CQ5	Qijiang Chongqing (重庆綦江)	2009	Sheep	D	IV
SB589	Aksu Xinjiang (新疆阿克苏)	2009	Sheep	E	V
SB0050	Aksu Xinjiang (新疆阿克苏)	2009	Sheep		
TX	Tongxin Ningxia (宁夏同心)	2008	Sheep		
YC	Yinchuan Ningxia (宁夏银川)	2008	Sheep	F	VI
NXMO	Yinchuan Ningxia (宁夏银川)	1997	Sheep		
Y116-4	Xianning Hubei (湖北咸宁)	2009	Goat	G	VII
16859	Guiyang Guizhou (贵州贵阳)	2009	Goat	H	VIII
Y98	United Kingdom (英国)	1964	Sheep	I	IX

1.1.2 主要试剂和仪器: Ex Taq 酶购自大连宝生物工程公司;限制性内切酶 *Mfe*I、*Bgl*II 及 NEBuffer 4

缓冲液均购自美国 New England Biolab 公司;125 bp DNA Ladder Marker 购自西安舟鼎国生物技术有限责

任公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;Movi 模式株 Y98 高免血清为本实验室制备^[21];辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗兔 IgG 购自美国 ANATA 公司;NC 膜为 Pall-Gelman 公司产品;4 × 蛋白质上样缓冲液、4-氯-1-萘酚 (4-Chloro-1-Naphthol, 4-CN)、牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 均购自上海索莱宝生物科技有限公司;预染蛋白分子质量标准 (Prestained Protein MW Marker), 购自 Fermentas UAB 公司;Bradford 蛋白定量试剂盒购自上海 BestBio 公司;其他试剂均为国产分析纯。H-2050R 台式高速冷冻离心机为湘仪离心机仪器有限公司产品;MyCycler PCR 扩增仪、Mini-protean Tetra Cell 小型垂直电泳槽、Criterion 170-4070 转印仪、GelDoc™ XR 凝胶成像系统均为美国伯乐 (Bio-Rad) 公司产品。

1.2 Movi 的培养及菌体的收集

将 -72℃ 冻存的 Movi 菌种分别移入 5 mL 改良 KM₂ 培养基中复苏,复苏后按体积比 1:20 扩大传代约 3-5 代,当 Movi 菌液浓度达到每毫升 10⁸ 颜色变化单位 (Color change unit, ccu) 时,取 30 mL 以 23120 × g 离心 15 min,收集 Movi 菌体并用 pH 7.2 的 PBS 离心洗涤 3 次,置 -20℃ 保存。

1.3 基因组 DNA 的提取

按试剂盒说明书提取 Movi 菌株的基因组 DNA, -20℃ 保存备用。

1.4 AFLP 分析

参考文献 [22] 进行,最后取 5 μL 扩增产物于 2.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

1.5 SDS-PAGE 分析

将各株 Movi 菌体进行适量稀释后,用 Bradford 方法对菌体蛋白浓度进行定量。按照文献 [23] 进行 SDS-PAGE 分析。

1.6 聚类分析及系统进化树的建立

将 AFLP 及 SDS-PAGE 电泳图谱用 NTsys-2.10e 软件^[24] 进行聚类分析,绘制系统进化树。

1.7 免疫印迹分析

根据 SDS-PAGE 分析结果,在 8 个菌株来源地区各选 1 株进行免疫印迹。免疫印迹参考文献 [23] 进行,其中将 Y98 高免血清用 TBS 缓冲液 1:200 稀释,HRP 标记的羊抗兔 IgG 用 TBS 缓冲液 1:5000 稀释。

2 结果

2.1 AFLP 和 SDS-PAGE

对 17 株 Movi 分离株基因组 DNA 进行 AFLP 分析,结果当相似系数为 0.78 时,分离于甘肃、新疆、宁夏、青海、重庆、贵州、湖北和吉林 8 个地区的菌株可根据来源地区分成 A、B、C、D、E、F、G、H 共 8 个不同的 AFLP 群 (图 1-A、表 1)。对分离株菌体蛋白

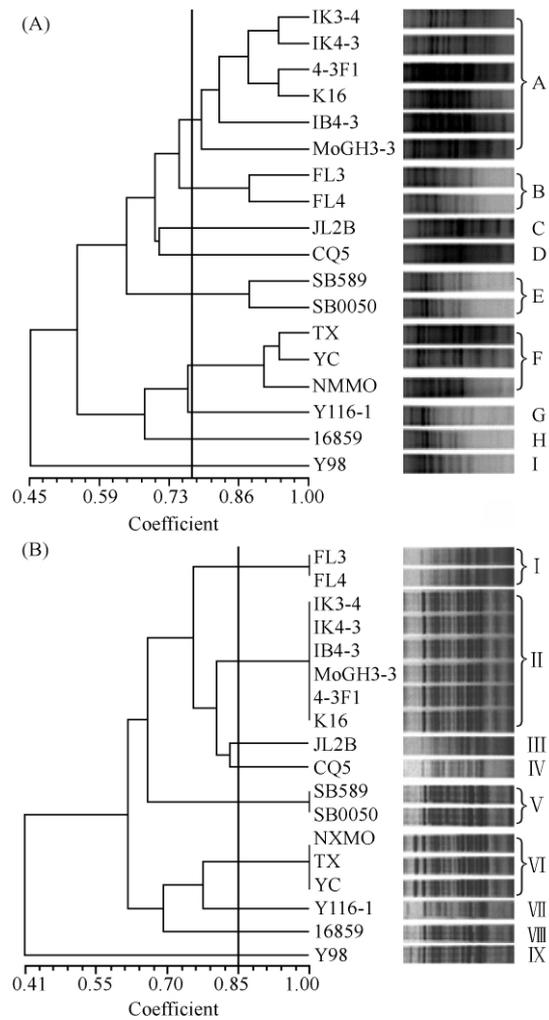


图 1 Movi 菌株 AFLP (A) 及 SDS-PAGE (B) 分析结果
 Fig. 1 AFLP (A) and SDS-PAGE (B) analysis of *M. ovipneumoniae* strains. A: The vertical line represents the referential coefficient value of 0.78, 17 strains of *M. ovipneumoniae* were divided into 8 AFLP groups at this coefficient level; B: The vertical lines represent the referential coefficient values of 0.85, 17 strains of *M. ovipneumoniae* were also divided into 8 SDS-PAGE groups at this coefficient level.

进行 SDS-PAGE 分析,当相似系数为 0.85 时,8 个地区的分离菌株也被分成 I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII 共 8 个 SDS-PAGE 群(图 1-B、表 1)。这两种方法分型的结果具有一一对应的关系(表 1),同一地区分离的菌株被分类于同一个 AFLP 群或 SDS-PAGE 群。其中, I 群(青海)、II 群(甘肃)、V 群(新疆)和 VI 群(宁夏)群内菌株之间的 SDS-PAGE 蛋白模式具有 100% 的相似性。

2.2 免疫印迹

对 8 株分离自 8 个地区的 Movi 菌株进行免疫印迹分析(图 2)。吉林分离株 JL2B、青海分离株 FL3 在 83、40 kDa 处出现了条带,宁夏分离株 NXMo、新疆分离株 SB589 在 105、83、65、42、40 kDa 处出现了条带,甘肃分离株 MoGH3-3 在 105、83、65、40、26 kDa 处出现了条带,重庆分离株 CQ5 在 83、65、40 kDa 处出现了条带,贵州分离株 16859 在 83、65、42、40、26 kDa 处出现了条带,湖北分离株 Y116-1 在 83、65、42、40 kDa 处出现了条带。其中 8 株分离株在 83、40 kDa 处均出现了条带。

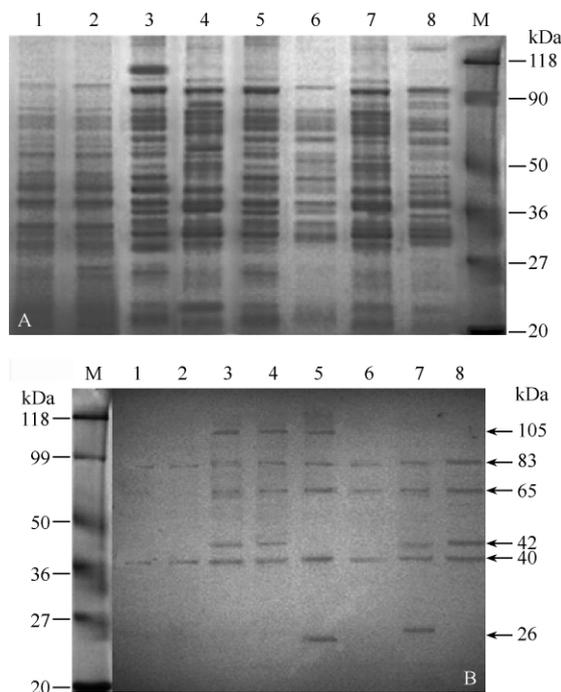


图 2 八株 Movi 的 SDS-PAGE(A)和免疫印迹分析(B)

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of 8 strains of *M. ovipneumoniae* (A) and immunoblotting analysis using the antiserum against the strain Y98 (B). M: Prestained Protein MW Marker; 1: JL2B; 2: FL3; 3: NXMo; 4: SB589; 5: MoGH3-3; 6: CQ5; 7: 16859; 8: Y116-1.

3 讨论

我国自 1978 年首次发现 Movi 以来,尽管对 Movi 常规诊断技术和疫苗等研究取得了一定进展^[15-18],但有关 Movi 的基础研究相对较少。本实验采取 AFLP 和 SDS-PAGE 方法对分离自我国 8 个省区的 17 株 Movi 菌株进行分析,结果表明这些菌株之间存在遗传多样性,与国外有关报道的结果一致^[4-8]。本实验还发现,来自相同地区的菌株具有一定的遗传相似性,如当相似系数分别为 0.78 和 0.85 时,Movi 菌株可根据 8 个来源地区分成 8 个 AFLP 群和 8 个 SDS-PAGE 群。但我国不同省区之间活羊或羊肉等产品流通频繁,这种流行菌株分子特征与地域来源之间的相关性,是不是我国 Movi 流行的普遍规律,由于受实验菌株数量的限制,目前不能肯定。

相同地区分离的 Movi 菌株 SDS-PAGE 蛋白模式之间具有 100% 的相似性(图 1B),因此从每个地区(群)分离株中选择了 1 株,用 Movi 模式株 Y98 免疫血清进行免疫印迹分析。结果表明这些分离株之间主要免疫原性蛋白也存在着差异,但 83 kDa 和 40 kDa 蛋白是 8 株 Movi 分离株保守的免疫原性蛋白,这为我国绵羊肺炎支原体病分子诊断技术和广谱疫苗研究提供了可能的靶标。

参考文献

- [1] Mackay MK, Nisbet DK, Foggie A. Isolation of pleuropneumonia-like organisms (*Genus Mycoplasma*) from case of sheep pulmonary adenomatosis (S. P. A). *Veterinary Research*, 1963, 75(21): 550-551.
- [2] Carmichael LE, George TD, Sullivan ND. Isolation, Propagation for proliferative interstitial pneumonia. *Cornell Veterinary Medicine*, 1972, 62(4): 654-679.
- [3] Livingston CW. Isolation of *Mycoplasma ovipneumoniae* from goats. *Veterinary Research*, 1979, 40(3): 407-408.
- [4] Ionas G, Norman NG, Clarke JK, Marshall RB. A study of the heterogeneity of isolates of *Mycoplasma ovipneumoniae* from sheep in New Zealand. *Veterinary Microbiology*, 1991, (3-4): 339-347.
- [5] Ionas G, Clarke JK, Marshall RB. The isolation of multiple strains of *Mycoplasma ovipneumoniae* from

- individual pneumonic sheep lungs. *Veterinary Microbiology*, 1991, 29: 349-360.
- [6] Parham K, Churchward CP, McAuliff L, Nicholas RAJ, Ayling RD. A high level of strain variation within the *Mycoplasma ovipneumoniae* population of the UK has implications for disease diagnosis and management. *Veterinary Microbiology*, 2006, 118: 83-90.
- [7] Maria EH, Daniel GM, Ricardo FR. Sheep flock infections with *Mycoplasma ovipneumoniae* involve multiple strains. *Small Ruminant Research*, 2007, 73: 287-290.
- [8] Thirkell D, Spooner RK, Jones GE, Russell WC. Polypeptide and antigenic variability among strains of *Mycoplasma ovipneumoniae* demonstrated by SDS-PAGE and immunoblotting. *Veterinary Microbiology*, 1990, 21 (3): 241-254.
- [9] 胡景韶, 蒋学良, 胡诚隆, 张道永. 一种由支原体感染的绵羊增生性间质性肺炎的研究. 中国兽医杂志 (*Chinese Journal of Veterinary Medicine*), 1982, 5: 2-6.
- [10] 谢守栋, 陈竹兰, 郑忠发, 孙元德, 赵玉琪, 张国才, 阎振庆. 绵羊肺炎霉形体病的病原分离、人工感染及药物抑制试验. 中国预防兽医学报 (*Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*), 1985, 25: 5-6.
- [11] 刘少华, 徐天菊, 吕增顺, 廖红芬, 万稳定. 云南省曲靖市羊肺炎支原体病的调查. 中国人兽共患病志 (*Chinese Journal of Zoonoses*) 2000, 20 (5): 108-109.
- [12] 丁卫华, 黄蓓. 绵羊支原体肺炎的诊治. 中国兽医杂志 (*Chinese Journal of Veterinary Medicine*) 2002, 38 (7): 21-32.
- [13] 王华, 杨发龙, 王永, 汤承. 山羊支原体性肺炎流行病学调查. 中国畜牧兽医 (*China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*) 2011, (1): 210-214.
- [14] 陈延和, 陈竹兰, 郑忠发, 孙元德, 余桂芳. 微量间接红细胞凝集试验在绵羊肺炎霉形体病诊断上的应用. 宁夏农林科技 (*Ningxia Journal of Agriculture and Forestry Science and Technology*) 1990, 5: 31-34.
- [15] 逯忠新, 邓光明, 梁桂香, 戈银生, 殷相平, 包慧芳. 羊肺炎霉形体病调查. 中国兽医科技 (*Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*), 1993, 23 (9): 15-16.
- [16] 谢琴, 王东, 何从利, 陈祝三, 余桂芳. 抗绵羊肺炎支原体单克隆抗体在诊断上的应用. 中国预防兽医学报 (*Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*), 1996, 20 (5): 24-26.
- [17] 邓光明, 梁桂香, 李志杰, 方畴鑫, 王庆粉, 赵文学, 王永宁, 陈满功, 孙善财. 类山羊传染性胸膜肺炎诊断和防治的研究_免疫试验. 中国兽医科技 (*Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*), 1991, 21 (4): 6-9.
- [18] 李新萍, 陶岳, 林为民, 张孝恩, 叶丹. 绵羊支原体肺炎灭活疫苗的研制及其免疫效果的初步观察. 现代畜牧兽医 (*Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*) 2007, 8: 47-48.
- [19] Clyde WA. *Mycoplasma* species identification based upon growth inhibition by specific antisera. *The Journal of Immunology*, 1964, 92: 958-965.
- [20] McAuliffe L, Hatchell FM, Ayling RD, King AI, Nicholas RA. Detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* in Pasteurella-vaccinated sheep flocks with respiratory disease in England. *Veterinary Research*, 2003, 153 (22): 687-688.
- [21] 逯忠新, 邓光明, 包慧芳, 梁桂香. SDS-PAGE 和免疫印迹技术对绵羊肺炎霉形体和丝状霉形体山羊亚种膜蛋白的分析. 中国兽医科技 (*Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*), 1997, 27 (3): 26-27.
- [22] Kokotovic B, Friis NF, Jensen JS, Ahrens P. Amplified-Fragment Length Polymorphism Fingerprinting of *Mycoplasma* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37 (10): 3300-3307.
- [23] Lin YC, Miles RJ, Nicholas RAJ, Kelly DP, Wood AP. Isolation and immunological detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* in sheep with atypical pneumonia, and lack of a role for *Mycoplasma arginini*. *Research in Veterinary Science*, 2008, 84: 367-373.
- [24] 孟珍贵, 杨永平. 几种民族医药的亲缘关系初探兼论数值分析软件 NTSYS 的使用. 中国民族民间医药 (*Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy*) 2007, 89 (6): 347-348.

Molecular typing and immunoblotting of 17 *Mycoplasma ovipneumoniae* isolates from China

Jian Xu^{1 2#}, Yuefeng Chu^{1#}, Pengcheng Gao¹, Ping Zhao¹, Ying He¹,
Genqiang Yan², Zhongxin Lu^{1*}

¹ State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Key Laboratory of Epizootic Diseases of Grazing Animals of Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Veterinary Public Health of Ministry of Agriculture, Engineering Research Center of Biological Detection of Gansu Province, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China

² College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, China

Abstract: [Objective] To study the heterogeneity and immunogenic variability among *Mycoplasma ovipneumoniae* (*M. ovipneumoniae*) isolates from different regions of China. [Methods] The heterogeneity of 17 strains of *M. ovipneumoniae* isolated from 8 regions of China was studied by the amplified fragment length polymorphism (AFLP) and sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The software NTsys-2.10e was used to analyze the profiles obtained from the AFLP and SDS-PAGE. The proteins reacted with the antiserum against *M. ovipneumoniae* type strain Y98 were then detected by Western-blot. [Results] Seventeen strains of *M. ovipneumoniae* were divided into 8 AFLP groups based on the source regions when the coefficient was 0.78. They were also divided into 8 SDS-PAGE groups based on the source regions when the coefficient was 0.85. A total of 6 immunogenic proteins were detected within 8 strains of *M. ovipneumoniae*, and their molecular weights were 105 kDa, 83 kDa, 65 kDa, 42 kDa, 40 kDa or 26 kDa, respectively. Interestingly, the 83 kDa and 40 kDa proteins were conserved in all the 8 isolates. [Conclusion] *M. ovipneumoniae* isolates from some regions of China were genetically different, but the 83 kDa and 40 kDa antigenic proteins were conserved among the tested isolates. This study can provide some insights for the diagnosis and vaccine development of the disease caused by *M. ovipneumoniae*.

Keywords: *Mycoplasma ovipneumoniae*, AFLP, SDS-PAGE, immunoblotting

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Technology Research and Development Program of Gansu Province (1011NKCA054), by the Gansu Province Agricultural Biotechnology Research and Application Development Project (GNSW-2010-09), by the National Scientific-Basic Special Fund (2008FY210200) and by the China Agriculture Research System (CARS-39)

* Corresponding author. Tel: +86-931-8342676; Fax: +86-931-8340977; Email: luzhongxin@hotmail.com

#These authors contributed equally to this work.

Received: 28 April 2011 /Revised: 20 June 2011