

反硝化反应器喹啉降解相关基因多样性与定量分析

夏溪^{1,2}, 张晓君^{1*}, 冯虎元², 赵立平¹

(¹ 上海交通大学生命科学技术学院, 教育部微生物代谢重点实验室, 上海 200240)

(² 兰州大学生命科学学院, 兰州 730000)

摘要:【目的】本文旨在探讨喹啉驯化的反硝化反应器微生物群落中苯甲酰辅酶 A 还原酶基因 (*bcrA*) 和 8-羟基-2(1H)喹啉酮基因的加氧酶组分 (*oxoO*) 基因的多样性与分布。【方法】根据 GenBank 数据库 *oxoO* 基因序列的保守区设计了 *oxoO* 基因专一性引物。扩增采用机械击打与酚-氯仿抽提相结合的方法从反应器生物膜样品中提取微生物总 DNA, 对 *oxoO* 基因和 *bcrA* 基因进行基因扩增, 并构建 *oxoO* 和 *bcrA* 基因克隆文库。采用荧光实时定量 PCR 方法对反应器微生物群落中 *bcrA* 和 *oxoO* 基因进行定量分析。【结果】定量分析结果表明, 在反应器运行过程中, *bcrA* 基因数量逐渐增多, 而 *oxoO* 基因数量逐渐减少。克隆文库基因序列的系统发育分析表明, *bcrA* 基因克隆文库中部分序列与 *Thauera* 等菌株的 *bcrA* 基因的相似性为 97% 以上, 其余序列与已知 *bcrA* 基因序列的相似性为 74% - 86%; *oxoO* 基因克隆文库中部分序列与恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 的 *oxoO* 基因相似性为 99%, 而其余序列和已知的 *oxoO* 基因的序列相似性较低。【结论】喹啉驯化的反硝化反应器系统中, *bcrA* 和 *oxoO* 基因的多样性较丰富, 且具有一些新的未知的类型。 *bcrA* 和 *oxoO* 基因的数量随反应器的运行状况而发生变化, 显示出其与反应器中微生物种群构成及功能之间的密切关系。这两个基因可以作为一种潜在的生物分子标记, 用于监测含喹啉废水反硝化反应器的运行状态。

关键词: 喹啉; *bcrA* 基因; *oxoO* 基因; 定量分析; 多样性分析

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 12-1613-06

喹啉是含氮杂环芳香化合物的典型代表, 用途极其广泛, 其水溶性较强, 是多种医药、农产品、染料等生产中的重要原料和溶剂, 已成为环境中普遍存在的污染物^[1], 而喹啉及其衍生物对生物体具有致癌、致畸和致突变性^[2-5]。

喹啉可以在好氧和厌氧条件下被微生物降解。国内外学者已经分离、驯化和筛选出了一些可降解喹啉及其衍生物的微生物菌株, 其中以假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) 最多^[6]。不同的微生物降解喹啉具有不同的代谢途径, 目前已知的喹啉好氧降解代谢途径有 4 种^[7-8], 分别为 5, 6-二羟基-2(1H)喹啉酮代谢途径、7, 8-二羟基-2(1H)喹啉酮代谢途

径、邻氨基苯甲酸代谢途径^[9-10]和 8-羟基香豆素代谢途径^[11-13]。已有报道称后者是多数好氧降解喹啉的细菌, 如红球菌属 (*Rhodococcus* sp.) 和 *Pseudomonas* sp. 的主要代谢途径^[14], 其中 8-羟基-2(1H)喹啉酮是此代谢途径中的关键代谢中间产物^[15], *oxoO* 基因是编码 8-羟基-2(1H)喹啉酮基因的加氧酶组分^[16]。厌氧条件下喹啉的降解途径还未见报道。而在厌氧条件下降解芳香族化合物的途径中, *bcrA* (苯甲酰辅酶 A 还原酶基因) 催化苯甲酰辅酶 A 的脱环反应, 这是很多芳香族化合物在厌氧条件下被微生物降解的最关键步骤^[17]。据推测, 喹啉的厌氧降解可能也经此步骤。

基金项目: 国家自然科学基金 (20677041); 国家“863 计划”重点项目 (2007AA021301); 上海市重点学科建设项目资助 (B203)

* 通信作者。Tel: +86-21-34204878; E-mail: xjzhangsjtu@gmail.com

作者简介: 夏溪 (1984 -), 女, 江苏人, 硕士研究生, 从事微生物分子生态学研究。E-mail: nikoxia620@163.com

收稿日期: 2010-05-05; **修回日期:** 2010-06-25

为此,我们建立了一个实验室规模连续流反硝化喹啉降解生物反应器,经过约 10 个月以上的运行,喹啉去除率保持在 80% 以上。本研究对该反硝化生物反应器内 *oxoO* 和 *bcrA* 基因进行了定量检测和多样性分析,了解了这两个与喹啉降解相关基因的数量分布与多样性,为深入了解反应器的喹啉降解微生物群落的生态学奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 反应装置及样品采集:种子污泥采集于上海某焦化废水处理厂的 A₂ 池,构建的生物反应器水容积为 2 L,内置固定于塑料圆片的纤维醛化纤维软性填料。实验采用人工配水,以喹啉为唯一碳源,浓度为 100 mg/L,合成废水中含 0.24 g/L NaNO₃ 和 0.14 g/L K₂HPO₄。采用连续流方式运行,反应器运行条件为 HRT = 24 h、T = 25℃、进水 pH = 7.0。

反应器运行 190 - 600 天期间,反应器具具有较高喹啉去除能力。期间间隔一定时间,从反应器上中下各部以无菌镊子刮取附着在填料表面的生物膜样品,并等量混合后备用。

1.1.2 主要试剂和仪器:PCR 反应体系所需试剂购自 Promega 公司;Taq 酶 (TaKaRa);DNA 割胶回收试剂盒购自 Geneaid 公司;pGEM T-easy 载体和连接试剂盒购自 Promega 公司。冷冻离心机 (SIGMA);冷冻干燥仪 (美国,SAVANT);核酸电泳仪 (BIORAD);GDS 凝胶成像系统 (英国,UVI BTS-20);PCR 仪 (Bio-Rad Tetrad 2);Real-time PCR 仪 (MJ research opticon2)。

1.1.3 引物:*bcrA* 基因的扩增采用引物 *bcrA*-1F 和 *bcrA*-2R^[17],*oxoO* 基因的引物 *oxoO*-f 和 *oxoO*-r 以来自 GenBank 的 *oxoO* 基因序列的保守区域设计,引物序列见表 1。引物由 Primer 3 软件设计,由生工(上海)有限公司合成。

表 1 *bcrA* 和 *oxoO* 基因引物序列

Table 1 The primer sequence of *bcrA* and *oxoO* genes

| Primer | Sequence(5' → 3') | Size/bp | Source reference |
|-----------------|----------------------------------|---------|------------------|
| <i>bcrA</i> -1F | GTGGMACCGGCTACGGCCG | 480 | [17] |
| <i>bcrA</i> -2R | TTCTKVGCIACICDCCGG | | |
| <i>oxoO</i> -f | TGCGGCCTGGGG(G/T)TTCATCA | 555 | This study |
| <i>oxoO</i> -r | GTG(C/G)GCGTTGTC(A/G)AAGCCGTTCTC | | |

1.2 样品 DNA 提取

采用机械击打与酚-氯仿抽提相结合的方法,从生物膜样品中提取微生物总 DNA,具体方法见文献 [18]。

1.3 *bcrA* 和 *oxoO* 基因扩增

25 μL 的扩增反应体系:1 × Buffer, 0.2 mmol/L dNTP, 2 mmol/L MgCl₂ 和 0.75 U Taq 酶。*bcrA* 基因的反应条件:94℃ 10 min;94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 4 个循环;94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 1 min, 4 个循环;94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 2 min, 31 个循环;72℃ 延伸 10 min;*oxoO* 基因的反应条件:94℃ 5 min;94℃ 1 min, 63℃ 1 min, 72℃ 1 min, 26 个循环;72℃ 延伸 7 min。1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,GDS8000 凝胶成像系统 (Ultra-Violet Product Ltd) 照像、记录分析结果。

1.4 *bcrA* 和 *oxoO* 基因定量分析

bcrA 和 *oxoO* 基因扩增引物序列见 1.1.3。25 μL 反应体系:1.5 U Taq 酶, 12.5 μL 2 × SYBR green I mix (Shanghai Biocolour BioScience & Technology Company), 引物均为 25 pmol, DNA 模板量 10 ng。每个样品 3 次重复。Real-time qPCR 采

用 DNA Engine Opticon 2 system (MJ Research) 进行扩增和检测。以 0.5℃/s 的梯度由 60℃ 到 95℃ 测定荧光信号,并获得溶解曲线。

bcrA 基因 Real-time qPCR 扩增程序:94℃ 10 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 1 min,89℃ 10 s, 4 个循环;94℃ 1 min,50℃ 1 min,72℃ 2 min,89℃ 10 s,31 个循环。

oxoO 基因 Real-time qPCR 扩增程序:94℃ 5 min;94℃ 1 min,63℃ 1 min,72℃ 1 min,87℃ 10 s,40 个循环。

1.5 *bcrA* 和 *oxoO* 基因克隆文库构建以及多样性分析

bcrA 基因以及 *oxoO* 基因 PCR 扩增同 1.3 节。PCR 扩增产物分别经 Geneaid 纯化试剂盒纯化后,用 T4 DNA 连接酶连接至 pGEM T-easy 克隆载体 (Promega),通过化学转化法转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α 感受态细胞中,筛选阳性克隆。阳性克隆分别用 T7 引物进行测序(上海生工)。所得序列以相似性 97% 为标准,划分为临时分类操作单元 (OTU, provisional operational taxonomic units),Coverage C 按公式 $C = 1 - n_1/N$ 计

算^[19]。

这些序列经 NCBI 数据库 Blast 寻找最相似序列,以 Clustal X 和 MEGA4.0 对两个文库的序列构建系统进化树。

2 结果

2.1 反应器运行状况

通过测定反应器出入水 OD_{313} 的值反映喹啉的降解效率,反应器在运行第 190 天至第 600 天的期间,喹啉的降解效率较高,平均达到 80% 的去除率,其中在 190 和 300 天时的去除率分别为 52% 和 64%,之后的各时间点的去除率在 79% - 93% 之间,如图 1 所示。

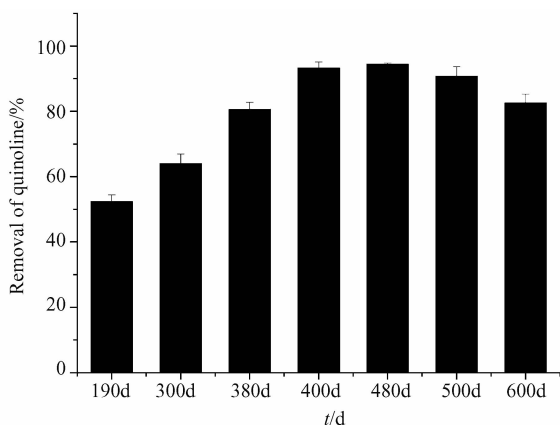


图 1 反应器运行期间喹啉的降解效率

Fig.1 Quinoline removal efficiency in bioreactor.

2.2 反应器运行期间 *bcrA* 基因和 *oxoO* 基因的定量分析

在反应器运行期间,每微升微生物总 DNA 样品(约 20 ng)中 *bcrA* 和 *oxoO* 基因的数量变化如图 2 所示。在反应器运行第 190 天时,*bcrA* 基因含量较少(5.6×10^7 拷贝),*oxoO* 基因含量较多(4.5×10^8 拷贝),当反应器运行到 300 d 时,*bcrA* 基因增多,达到 10^9 拷贝。反应器运行过程中,除 600 d 时数量达到 2.6×10^9 外,*bcrA* 基因的数量基本保持稳定。而 *oxoO* 基因逐渐减少,由最初的 4.5×10^8 降低到 9.3×10^7 拷贝。除 190 d 外,实验室反应器中 *bcrA* 基因的数量高于 *oxoO* 基因约一个数量级。反应器在 300 d 之前的运行中 *oxoO* 基因对反应器中喹啉的降解可能发挥着主要作用,而之后 *bcrA* 基因数量大增,可能 *bcrA* 参与的厌氧降解途径逐渐成为主要的代谢途径。对反应器中的 DO 进行了测定,发现 180 d(6 个月)、362 d(12 个月)和 545 d(18 个月)的 DO 值分别为 0.25 mg/L、0.08 mg/L、0.08 mg/L。

前期 DO 值较高。这可能与两类酶(分别代表好氧和厌氧代谢途径)的数量和比率的变化,及后期降解效率的下降相关。

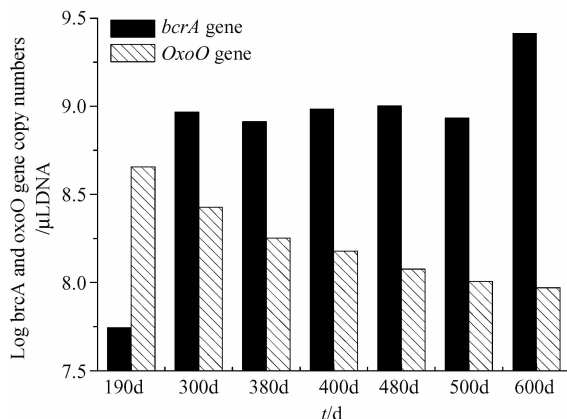


图 2 反应器运行过程中 *bcrA* 和 *oxoO* 基因拷贝数变化

Fig.2 The copy numbers of *bcrA* and *oxoO* gene in bioreactor.

2.3 反应器中 *bcrA* 和 *oxoO* 基因的多样性

根据 *bcrA* 和 *oxoO* 基因定量的结果,我们选择反应器运行第 480 天的群落 DNA 作为克隆文库分析的样品,通过构建克隆文库分析了这两个基因的多样性。从 *bcrA* 和 *oxoO* 基因克隆文库中分别随机选取 23 和 31 个克隆进行了测序,根据序列相似性 97% 划分 OTU 后计算的 *bcrA* 和 *oxoO* 基因克隆文库的覆盖率(Coverage)分别为 91.3% 和 100%,表明两个克隆文库库容已经足够高,能够较全面反映样品中两个基因的多样性。从 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库选取本研究所测得的序列的相似序列,构建了系统发育进化树,如图 3 和图 4。

23 个 *bcrA* 基因的序列分为 5 个 OTU,有 3 个 OTU(9 个序列)与 *Thauera* 的 *bcrA* 基因的相似性为 93% - 99%,其余 1 个 OTU(7 个序列)和未培养菌 W17-24、W17-05、W17-02 的 *bcrA* 基因的相似性为 86% 左右,还有 1 个 OTU(7 个序列)和这些未培养菌的相似性只有 74% 左右,(图 3)。未培养菌 W17-24、W17-05、W17-02 均分离自富含苯系物的地下水样品^[17]。

31 个 *oxoO* 基因的序列分为 5 个 OTU,除了有 1 个 OTU(5 个序列)和来自 *Pseudomonas putida* 的 *oxoO* 基因序列具有 99% 的相似性,其余 4 个 OTU 和已知的 *oxoO* 基因的序列相似性较低,这些序列分别通过 NCBI 的 BlastX 进行蛋白质序列的比对,发现与 8-羟基-2(1H)喹啉酮加氧酶序列的覆盖度为 92% - 99%、相似度为 79% - 84%。

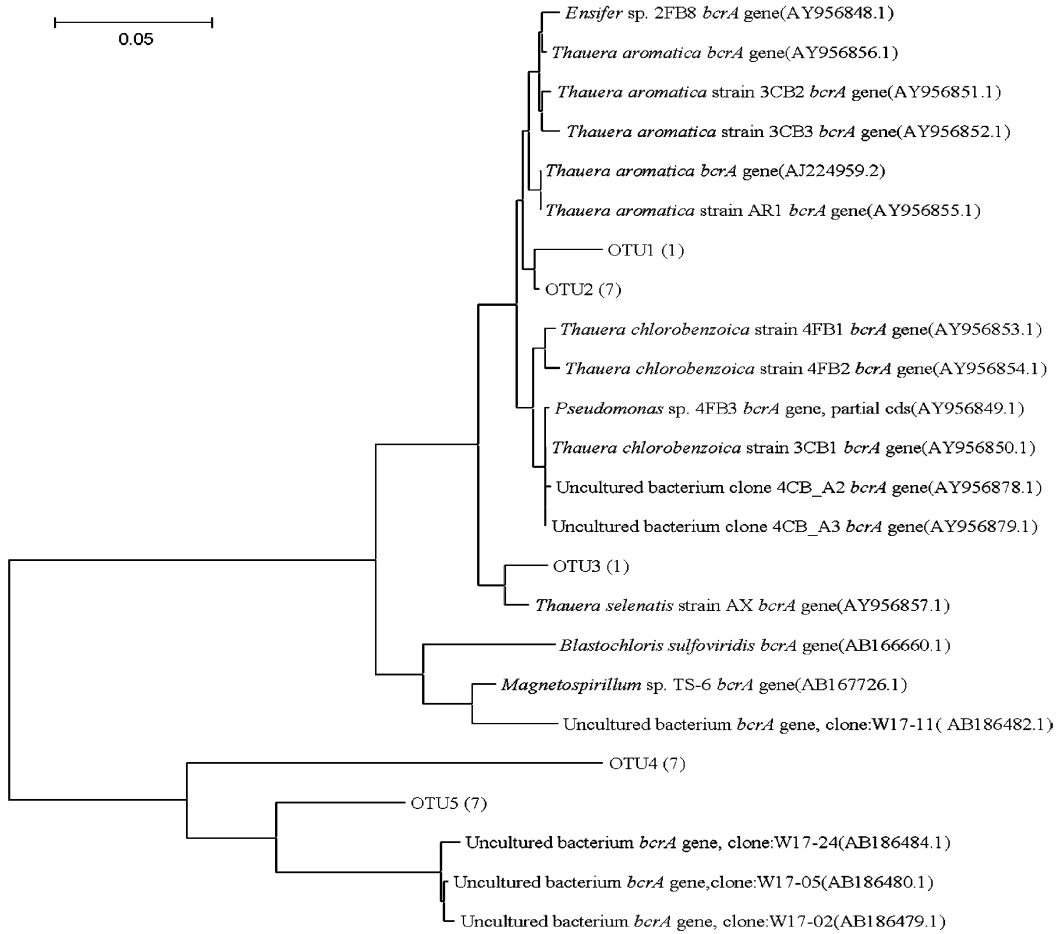


图3 反应器样品 *bcrA* 基因系统发育树

Fig.3 Neighbor-Joining tree shows the phylogenetic relationships among *bcrA* gene sequences of bacteria in bioreactor and their closely related sequences from GenBank. Scale bar indicates evolutionary distance.

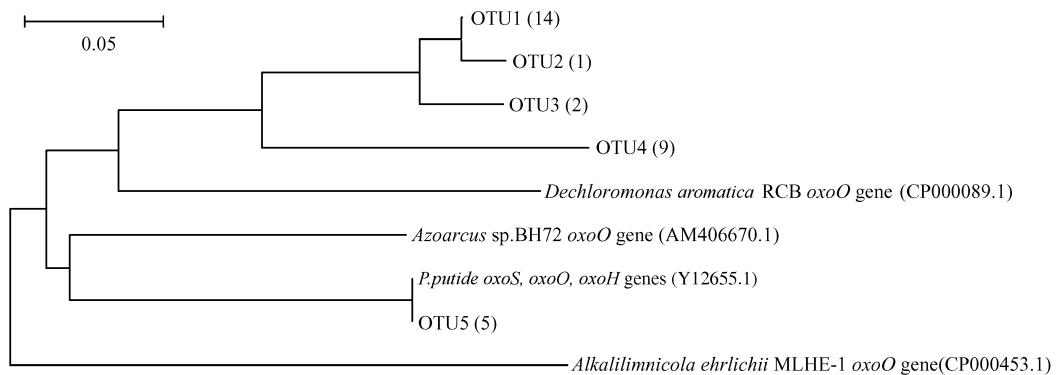


图4 反应器样品 *oxoO* 基因系统发育树

Fig.4 Neighbor-Joining tree shows the phylogenetic relationships among *oxoO* gene sequences of bacteria in bioreactor and their closely related sequences from GenBank. Scale bar indicates evolutionary distance.

3 讨论

本研究以一个实验室规模喹啉反硝化反应器为研究对象,对其中的两个功能基因 *bcrA* 和 *oxoO* 基

因做了定量和克隆文库多样性的分析,结果显示在本实验室生物反应器 20 个月的运行过程,反应器中同时存在 *bcrA* 和 *oxoO* 基因,并且它们在反应器中具有较高的多样性。*oxoO* 和 *bcrA* 基因的定量结果

说明,从 190 d 到 600 d 的运行过程中, *oxoO* 基因的数量从 4.5×10^8 降低到 9.3×10^7 拷贝,而 *bcrA* 基因数量从 5.6×10^7 增加到 2.6×10^9 拷贝。反应器运行前期由于生物量较少,对反应器进水中所含的少量氧气的消耗较慢,反应器内部溶解氧含量较之运行后期高,这可能是不同降解基因数量变化的原因。因为 *oxoO* 基因是一个在好氧条件下降解喹啉的关键基因,而 *bcrA* 基因是厌氧条件下的降解基因,当反应器在后期维持一个较好的状态时,反应器内部逐渐形成较好厌氧状态,因而带有 *oxoO* 基因的功能菌逐渐减少,带有 *bcrA* 基因的功能菌逐渐增多。由于它们数量变化与反应器的降解过程及运行状态密切相关,因此这两个基因作为一种潜在的分子标记,可用于监测含喹啉废水处理系统的状态。另外,高拷贝数的 *bcrA* 基因的存在,间接证明了以前有关 *bcrA* 参与喹啉的厌氧降解的推测。

bcrA 基因的克隆文库结果显示,23 个克隆中,除 7 个克隆的 *bcrA* 基因与使用相同引物^[16]从富含苯系物的地下水样品中扩增获得的未培养菌的 *bcrA* 基因具有较高的相似性(86%)外,还有 9 个克隆的序列和 *Thauera* 的 *bcrA* 序列具有较高的相似性(96%)。根据我们之前对喹啉降解生物反应器 16S rRNA 基因序列的研究结果^[18],*Thauera* 是反应器稳定后微生物生态系统中的优势菌群,与喹啉降解有着很重要的联系,我们的实验结果显示在 23 个克隆中与 *Thauera* 菌基因序列相似的序列占有了相当大的比例,进一步说明 *Thauera* 可能是系统中 *bcrA* 基因的主要携带者。文库中有 7 个克隆 *bcrA* 基因的核苷酸序列在 GenBank 中并没有发现具有高相似性的序列,但是他们的氨基酸序列在 GenBank 中和未培养菌的苯甲酰辅酶 A 还原酶的氨基酸序列(BAD91562.1)具有 81% 的相似性,说明生物反应器存在一些新的 *bcrA* 基因类型。

oxoO 基因的克隆文库结果显示,31 个克隆中除了 5 个克隆的 *oxoO* 基因核苷酸序列和 *Pseudomonas putida* 的 *oxoO* 基因的核苷酸序列具有高的相似性(99%),其余克隆的 *oxoO* 基因的核苷酸序列均没有在 GenBank 中发现具有高相似性的序列,但是他们的氨基酸序列在 GenBank 中与 2-氧喹啉-8-单加氧酶组分(*oxoO* 基因产物)的氨基酸序列具有较高的相似性,这可能与目前含有 *oxoO* 基因的细菌相关研究较少有关。本研究所发现的 *oxoO* 基因序列将扩展对 *oxoO* 基因多样性的认识,也将为从反应器中分离新的降解菌提供指导。

参考文献

- [1] 朱顺妮,刘冬启,樊丽. 喹啉降解菌 *Rhodococcus* sp. QL2 的分离鉴定及降解特性. 环境科学 (*Environmental Science*), 2008, 29 (2): 488-493.
- [2] Barrick RC, Furlong ET, Carpenter R. Hydrocarbon and azaarene markers of coal transport to aquatic sediments. *Environmental Science & Technology*, 1984, 18: 846-854.
- [3] Hirao K, Shinohara Y, Tsuda H. Carcinogenic activity of quinoline on rat liver. *Cancer Research*, 1976, 36: 329-335.
- [4] Minako N, Takio Y, Yuko S. Mutagenicities of quinoline and its derivatives. *Mutation Research*, 1977, 42: 335-342.
- [5] LaVoie EJ, Shigematsu A, Adams EA. Tumor initiating activity of quinoline and methylated quinolines on the skin of senear mice. *Cancer Letters*, 1984, 22: 269-273.
- [6] 崔明超,李丽,陈繁忠. 喹啉及其衍生物微生物降解研究进展. 上海环境科学 (*Shanghai Environmental Science*), 2003, 22(1): 52-56.
- [7] Schwarz, Lingens GF. Bacterial degradation of N-heterocyclic compounds, in *Biochemistry of microbial degradation*. London: Kluwer Academic Publisher, 1994: 486-495.
- [8] Fetzner S, Tshisuaka B, Lingens F. Bacterial degradation of quinoline and derivatives -pathways and their biocatalysts. *Angewandte Chemie International Edition*, 1998, 37: 577-597.
- [9] Hund H, Beyer A, Lingens F. Microbial metabolism of quinoline and related compounds. VI. Degradation of quinaldine by *Arthrobacter* sp. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 1990, 371(10): 1005-1008.
- [10] Bott G, Schmidt M, Rommel T. Microbial metabolism of quinoline and related compounds. V. Degradation of 1H-4-oxoquinoline by *Pseudomonas putida* 33/1. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 1990, 371(10): 999-1003.
- [11] Shukla OP. Microbial transformation of quinoline by a *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 51(6): 1332-1342.
- [12] Shukla OP. Microbiological degradation of quinoline by *Pseudomonas stutzeri*: the coumarin pathway of quinoline catabolism. *Microbios*, 1989, 59(238): 47-63.
- [13] Schwarz G, Bauder R, Speer M. Microbial metabolism of quinoline and related compounds. II. Degradation of quinoline by *Pseudomonas fluorescens* 3, *Pseudomonas putida* 86 and *Rhodococcus* spec. B1. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 1989, 370(11): 1183-1189.

- [14] 朱顺妮, 刘冬启, 樊丽. 两株喹啉降解菌代谢途径的分析. *中国环境科学* (*China Environmental Science*), 2008, 28(5): 456-460.
- [15] Carl B, Fetzner S. Transcriptional activation of quinoline degradation operons of *Pseudomonas putida* 86 by the AraC/XylS-type regulator OxoS and cross-regulation of the PqorM promoter by XylS. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (12): 8618-8626.
- [16] Carl B, Arnold A, Hauer B. Sequence and transcriptional analysis of a gene cluster of *Pseudomonas putida* 86 involved in quinoline degradation. *Gene*, 2004, 331: 177-188.
- [17] Hosoda A, Kasai Y, Hamamura N. Development of a PCR method for the detection and quantification of benzoyl-CoA reductase genes and its application to monitored natural attenuation. *Biodegradation*, 2005, 16 (6): 591-601.
- [18] Liu BB, Zhang F, Feng XX. *Thauera* and *Azoarcus* as functionally important genera in a denitrifying quinoline removal bioreactor as revealed by microbial community structure comparison. *FEMS Microbiol Ecology*, 2006, 55(2): 274-286.
- [19] GOOD IL. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, 1953, 40: 237-264.

Diversity and quantification analysis of functional genes in a lab scale denitrifying quinoline-degrading bioreactor

Xi Xia^{1,2}, Xiaojun Zhang^{1*}, Huyuan Feng², Liping Zhao¹

(¹ Key Laboratory of Microbial Metabolism, Ministry of Education, School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

(² School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: [**Objective**] In order to study the diversity and distribution of Benzoyl coenzyme A reductase (*bcrA*) and oxygenase components of 1H-2-oxoquinoline 8-monooxygenase (*oxoO*) gene in a lab scale denitrifying bioreactors for treating quinoline-containing wastewater. [**Methods**] Genomic microbial DNA was extracted from the biofilm samples of bioreactor. Based on the known *oxoO* genes sequences in GenBank, we designed primers for *oxoO* gene amplification. Using our designed *oxoO* gene primers and a pair of degenerate primers of *bcrA* gene obtained from literature, we amplified the DNA samples. And the amplicons were used for constructing clone libraries of *oxoO* and *bcrA* gene. We also performed quantification analysis of these two genes in bioreactor by using Real-time qPCR method. [**Results**] The quantification analysis showed gradual increase of the *bcrA* gene abundance and reduction of the *oxoO* gene abundance along with time. The clone library analysis of these two genes indicated that most clones in *bcrA* gene clone library having more than 97% sequence similarities to the known *bcrA* gene of *Thauera* bacteria and others only having 74% ~ 86% sequence similarities to *bcrA* gene sequences. Whereas, only a few clones in the *oxoO* gene clone library have 99% sequence similarities to that gene of *Pseudomonas putida*. But the sequences of most clones only distantly related with known *oxoO* genes. [**Conclusions**] This study showed a high *bcrA* and *oxoO* gene diversity, with some new gene sequences, in the lab scale denitrifying bioreactors. The abundance of *bcrA* and *oxoO* gene changed remarkably during the running of bioreactor, and closely related with the performance of bioreactor. Therefore, *bcrA* and *oxoO* genes have potential to be used as molecule markers to monitor the process of treating quinoline containing wastewater.

Keywords: quinoline; *bcrA* gene; *oxoO* gene; quantification; diversity analysis

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(20677041), by the National "863" High-tech R&D Program (2007AA021301) and by the Shanghai Leading Academic Discipline Project (B203)

* Corresponding author. Tel: +86-21-34204878; E-mail: xjzhangsjtu@gmail.com

Received: 5 May 2010/Revised: 25 June 2010