

番茄斑萎病毒运动蛋白 NSm 在植物细胞和昆虫细胞内的定位

尚卫娜¹, 孟春梅², 郑宽瑜³, 丁铭³, 张仲凯^{3*}, 洪健^{1,2*}, 周雪平¹

浙江大学,¹ 生物技术研究所,² 农生环测试中心, 杭州 310058

³ 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 昆明 650223

摘要: 【目的】研究番茄斑萎病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) 运动蛋白 NSm 的细胞定位。【方法】将 NSm 基因融合 GFP 后构建到植物二元表达载体 pCHF₃ 中, 农杆菌介导浸润本氏烟叶片, 同时将融合 GFP 的 NSm 基因利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达体系转染昆虫 Tn 细胞。在激光共聚焦显微镜下观察 NSm-GFP 在烟草表皮细胞和昆虫 Tn 细胞中的定位情况。【结果】观察发现与单独表达 GFP 在细胞壁周围和细胞核处均匀分布不同, NSm-GFP 融合蛋白会在植物细胞内扩散, 能够在细胞壁边缘定位, 并且在胞间连丝处呈不连续的绿色荧光小点, 偶尔成对出现在相邻的两个细胞之间; NSm 蛋白在昆虫 Tn 细胞表面产生数量众多的管状结构并向外延伸。【结论】研究结果表明 NSm 能够特异性定位在植物细胞的胞间连丝处, 并能在昆虫 Tn 细胞内表达, 在细胞表面产生运动蛋白小管。

关键词: 番茄斑萎病毒, NSm, 细胞定位, 胞间运动, Tn 细胞

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 08-0962-07

番茄斑萎病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) 是番茄斑萎病毒属 (*Tospovirus*) 的代表种, 该属病毒为布尼亚病毒科 (*Bunyaviridae*) 中唯一一类感染植物的病毒, 国际病毒分类委员会 (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 第八次报告公布了番茄斑萎病毒属的 8 个确定种和 6 个暂定种。随着研究的深入, 该属的新种也不断被发现, 并表现出了新的致病特征。目前该属的确定种和暂定种已达 20 个之多^[1]。TSWV 寄主范围非常广泛, 能够侵染 15 个科 1090 种单子叶植物, 69 个科双子叶植物和一个科的蕨类植物^[2], 在世界范围内均有分布, 对许多重要经济作物产生相当严重的危害。在

我国云南、广西、贵州及四川等省区, 陆续发现了番茄环纹斑点病毒 (*Tomato zonate spot virus*, TZSV), 凤仙花坏死斑病毒 (*Impatiens necrotic spot virus*, INSV), 花生黄斑病毒 (*Groundnut yellow spot virus*, GYSV) 以及侵染蝴蝶兰的一种 *Tospovirus* 成员^[3-5]。

与其它布尼亚病毒科感染人和动物的病毒类似, TSWV 为一类具有囊膜包裹的三基因组 RNA 病毒, 基因组从大到小分别为 RNA-L、RNA-M 和 RNA-S, 每个 RNA 片段末端约 65 个核苷酸系列互补, 形成一个锅柄状结构^[6]。其中, 由 RNA-M 正义链编码的非结构蛋白 NSm 是唯一一种该科其它动物病毒所不能编码的蛋白, 被认为是 *Tospovirus* 适应植物

基金项目: 国家“973 项目”前期研究专项 (2010CB134501)

* 通信作者。洪健, Tel: +86-571-86971179, Fax: 86-571-86971628, E-mail: jhong@zju.edu.cn; 张仲凯, Tel: +86-871-5183204, Fax: +86-871-5160084, E-mail: zhongkai99@sina.com

作者简介: 尚卫娜 (1987-), 女, 河南郑州人, 硕士研究生, 从事分子植物病毒学研究。E-mail: shang86na@163.com

收稿日期: 2012-03-14; 修回日期: 2012-04-20

的结果^[7]。Kormelink 等(1994)首次提取和纯化了 NSm,利用免疫标记等方法证明了 NSm 参与了病毒的胞间运动 (cell-to-cell movement)^[8]。Storms 等(1995)将 NSm 表达于黄花烟原生质体和 Tn 细胞,免疫荧光标记证明了 NSm 能在原生质体和昆虫细胞表面形成管状结构^[9], Lewandowski 和 Adkins (2005)利用运动缺陷型的烟草花叶病毒 (TMV) 载体重组 NSm,能够互补运动缺陷的 TMV 在细胞间运动并进行长距离运输,而且在原生质体中也发现有管状结构的形成^[10]。这些都与豇豆花叶病毒 (CPMV) 运动蛋白 (MP) 的功能相类似^[11],表明 NSm 蛋白具有植物病毒运动蛋白的典型特征,因此被公认为该属病毒的运动蛋白。虽然 TSWV 的 NSm 与 CPMV 的运动蛋白在产生管状结构方面具有相似性,一些文献推测 TSWV 也属于 CPMV 一类的管状结构胞间运动模式,但是 TSWV 病毒颗粒很大,直径大约有 80nm ~ 110nm,外面有一层囊膜包裹,核衣壳直径也有 60nm,而豇豆花叶病毒的直径才 28nm ~ 30nm,且无包膜。迄今为止,尚未有 TSWV 以完整病毒粒子或者核衣壳形式穿越胞间连丝管道的直接证据,因此像 TSWV 这样的大颗粒病毒有可能存在着新的胞间运动机制。

为了解 NSm 在植物活体细胞内的定位及其功能,探讨 TSWV 的胞间运动机理,我们构建了 NSm 与绿色荧光蛋白 (GFP) 的融合基因 NSm-GFP 并在本氏烟叶片中进行表达;同时利用昆虫杆状病毒表达体系构建了 GFP-NSm,转染粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 细胞,得到了 NSm 在 Tn 细胞内的表达,为下一步研究 TSWV 及相关病毒的胞间运动过程奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

农杆菌 C58C1 菌株为本实验室保存,含 GFP 的双元表达载体 pCHF₃ 为本实验室构建保存。含 GFP 的 pFastBacTM 1 shuttle vector、昆虫 Tn 细胞和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH10Bac 由浙江大学昆虫研究所张传溪教授提供。ExTaq DNA 聚合酶、PMD-18-T Vector system、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒、PCR 产物回收试剂购自 Axygen 公司,Lipofectin 和胎牛血清

为 Invitrogen 公司产品。

1.2 NSm 在本氏烟表皮细胞的瞬时表达

从感病叶片中提取植物总 RNA,利用反转录方法 (RT) 获得 TSWV 的 cDNA,用分别含有 BamH I 和 Kpn I 酶切位点的双向特异性引物 PCR 扩增 M RNA 链的 NSm 基因片段,将该目的基因片段连接在 PMD-18-T Vector 上,转化、涂布于含 100mg/mL 的氨苄霉素的麦康凯平板上,PCR 筛选阳性克隆,提取 PMD18-T-NSm 质粒。BamH I 和 Kpn I 双酶切该质粒,同时用 BamH I 和 Kpn I 双酶切 pCHF₃-GFP 载体。从琼脂糖凝胶中回收纯化酶切后的 NSm 目的基因片段,然后经连接、转化、筛选鉴定出改造后的质粒 pCHF₃-NSm-GFP。在 pCHF₃-NSm-GFP 重组载体中,CaMV35S 启动子和 NOS 终止子之间为带有 GFP 的融合基因片段,GFP 与目的片段的 C-端连接。

制备农杆菌感受态细胞,在感受态细胞中加入重组质粒,通过电击法将含有目的片段的 pCHF₃ 重组载体导入 C58C1 菌株,加入 YEP 恢复培养基,轻轻混匀,28℃ 放置 1 h,随后 28℃ 轻摇培养 2 h。10000 × g 离心 2 min,弃去上清液,重悬菌体后涂布于含 50 mg/mL 利福平和 50 mg/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基上,28℃ 倒置培养 2 d。PCR 筛选阳性菌落,接种到液体 YEP 培养基中,28℃,230 r/min 培养,菌液用于保存和 MMA 缓冲液处理 3 h 以上浸润本氏烟。

将本实验室构建的只含 GFP 的 pCHF₃ 载体电击导入农杆菌 C58C1,按照上述方法获得阳性菌株,浸润本氏烟作为对照。

1.3 NSm 在昆虫 Tn 细胞内的表达

利用引物 NSm-BamH I-F 和 NSm-Sal I-R 从 PMD-18-T Vector 扩增 NSm 片段,PCR 产物用 BamH I 和 Sal I 限制性内切酶酶切,插入含 GFP 的 pFastBacTM 1 shuttle vector 的 BamH I/Sal I 位点,GFP 连接在目的片段的 N-端。提取该重组质粒 DNA,与只含 GFP 的对照质粒分别转化大肠杆菌 DH10Bac,在 IPTG (40 μg/mL)、X-gal (100 μg/mL)、卡那霉素 (50 μg/mL)、庆大霉素 (7 μg/mL)、四环素 (10 μg/mL) 的 LB 平板上进行筛选。选出的重组杆状病毒 DNA,利用引物 NSm-BamH I-F、NSm-Sal I-R 和 PUC/M13 进行 PCR 鉴定,然后同对照质粒一起用 Lipofectin 转染昆虫 Tn 细胞^[12-13]。

1.4 激光共聚焦显微镜观察

用德国 Leica TCS SP5 倒置型激光共聚焦显微镜 (Confocal laser scanning microscope, CLSM) 对浸润 48 h、58 h 的本氏烟叶片和转染后 27°C 培养 3 d 的重组杆状病毒 DNA 侵染的 Tn 细胞进行观察, 对选定位点用 488 nm 激发光激发, 500 ~ 530 nm 吸收光条件下进行检测。

2 结果

2.1 重组质粒构建的鉴定结果

2.1.1 pCHF₃-NSm-GFP 的构建: 将连接产物 pCHF₃-NSm-GFP 转化农杆菌 C58C1, 在利福平和卡那霉素的 LB 固体培养基中筛选阳性克隆, 提取质粒 DNA 并进行酶切和 PCR 鉴定。结果证明重组质粒的构建是正确的, 经上海英潍捷基生物公司测序鉴定外源插入片段的方向和序列均正确。

2.1.2 Bacmid-NSm 的构建: 在 IPTG (40 μg/mL)、X-gal (100 μg/mL)、卡那霉素 (50 μg/mL)、庆大霉素 (7 μg/mL)、四环素 (10 μg/mL) 的 LB 平板上筛选的白斑菌落, 提取病毒 DNA, 利用引物 NSm-BamH I-F、NSm-Sal I-R 扩增出 900 bp 左右的条带, 符合目的条带的大小。未发生重组的 Bacmid, 以 PUC/M13 引物扩增得到的片段大小为 300 bp; 重组后的 Bacmid, 经相应的 PCR 扩增得到的片段大小为转座子内侧片段 2300 bp 加上 GFP 及克隆片段的大小之和, 故本研究最终所得到的重组病毒经 PUC/M13 引物扩增后片段大小为总长约 4000 bp 左右 (图 1), 与预期的基因片段大小一致, 证明已获得重组病毒 pFastBac-NSm。

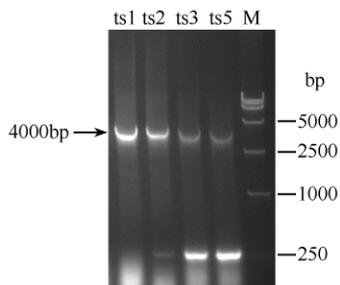


图 1 PUC/M13 引物鉴定 Bacmid-NSm

Fig. 1 PCR assay of Bacmid-NSm with four replications

2.2 NSm 在本氏烟表皮细胞内的定位

为了观察 NSm 在植物活体细胞内的定位, 将 GFP 作为荧光标记追踪 NSm, 在激光共聚焦显微镜下观察荧光分布。所观察的是农杆菌浸润 48 h 和 58 h 后的活体本氏烟叶片, 能详细显示出 NSm 在细胞内的定位情况。在浸润后 48 h 用激光共聚焦显微镜观察结果显示: NSm-GFP 融合蛋白在叶片细胞内得以表达, 绿色荧光主要分布在细胞周边及细胞核, 会在植物细胞内扩散, 可以定位到细胞壁, 一些不连续的绿色荧光小点分布在细胞壁上, 偶尔成对出现在相邻的两个细胞之间 (图 2-A、B)。文献报道该不连续的点状结构位于胞间连丝上^[14-15], 是植物病毒运动蛋白的特征。通过不同层次的扫描发现, 相邻细胞的细胞壁出现明暗不均的绿色荧光, 说明单独的 NSm 蛋白能够在细胞间运动, 而且 NSm-GFP 在胞间连丝处定位的荧光信号较强, 在细胞壁和细胞核处的荧光信号较弱。浸润 58 h 后定位结果表明, 即使细胞周围及细胞核处定位的荧光强度减弱, 胞间连丝处的 GFP 荧光仍然存在 (图 2-C)。

与 NSm-GFP 相比, 单独的 GFP 也会在植物细胞内扩散, 主要集中于细胞壁和细胞核。细胞壁处的 GFP 荧光分布均匀, 没有特异性的荧光小点出现。通过逐层扫描叠加发现细胞质内有绿色网络状结构, 连接细胞核与细胞壁, 荧光信号分布都较均匀 (图 2-D), 说明 NSm-GFP 在细胞中的定位不是由 GFP 所决定的。

2.3 NSm 在昆虫 Tn 细胞内的表达

体外培养的昆虫 Tn 细胞大多呈梭形 (图 3-F), 感染重组病毒后 48 h 用激光共聚焦显微镜观察显示: 含有目的基因的 Tn 细胞大多数变为圆形, 细胞表达 GFP-NSm 蛋白 (图 3-A、B), 并在 Tn 细胞内形成一些丝状结构, 在细胞表面长出许多长短不一的管状结构 (图 3-C、D), 一些细胞表面的管状结构显得相当密集, 并且在管状结构的顶端具有较强的荧光信号 (图 3-C), 表明该部位聚集了较多的 GFP-NSm 融合蛋白。只含 GFP 的对照质粒感染细胞结果显示, 细胞在 48 h 后同样变为圆球状, 但是荧光信号在细胞内分布均匀, 核质信号稍有差异, 细胞表面也未见明显的管状结构出现 (图 3-E)。

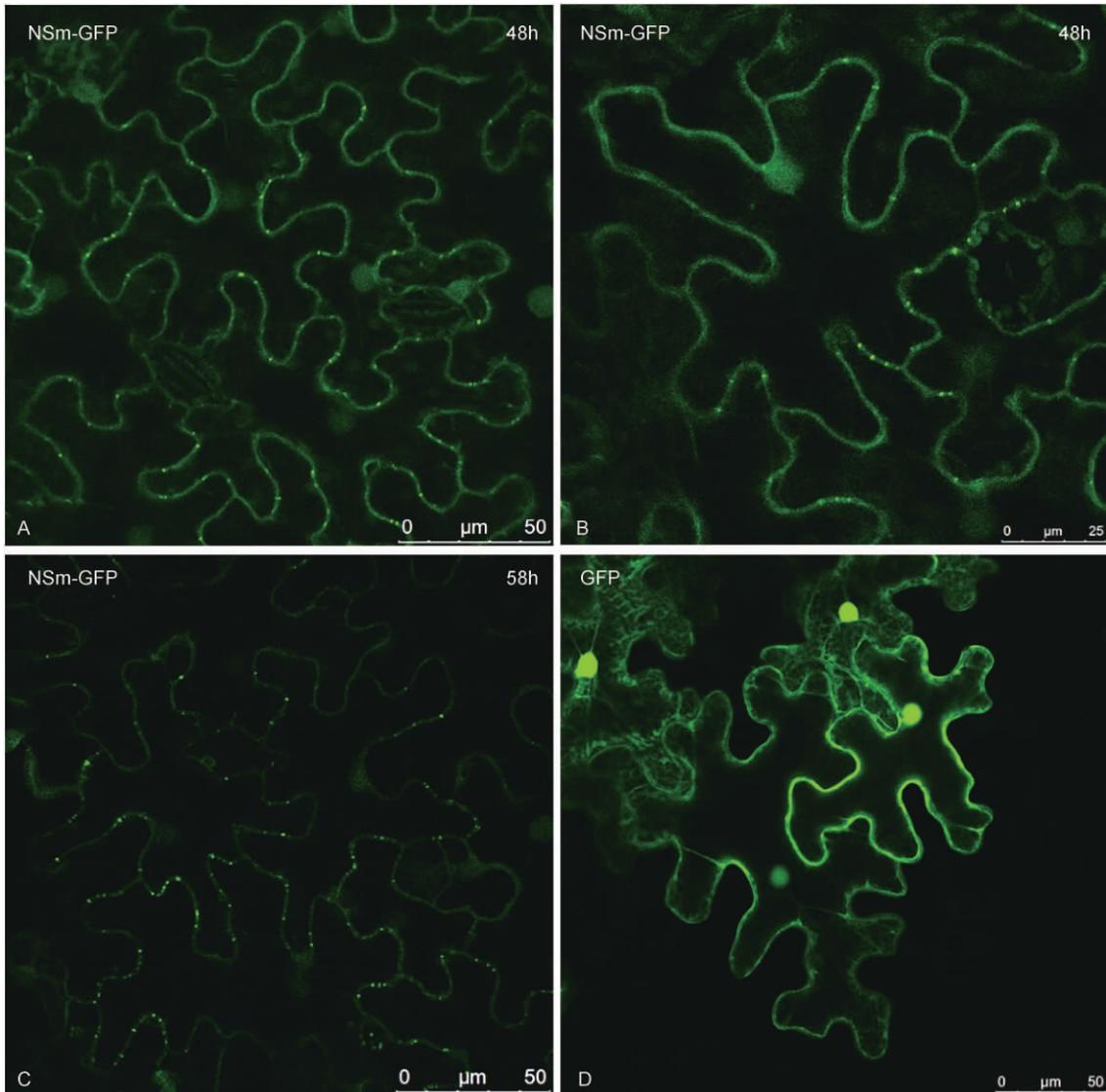


图2 NSm 在本氏烟叶片表皮细胞的定位

Fig.2 Subcellular localization of NSm in epidermal cells of *N. benthamiana* leaves. A-B: Localization of pCHF₃-NSm-GFP expressed in the leaf cells 48 hrs post-agroinfiltration; C: Localization of pCHF₃-NSm-GFP expressed in the leaf cells 58 hrs post-agroinfiltration; D: Localization of free GFP.

3 讨论

Tospoviruses 近年来在农业生产上危害加剧, 中国也陆续有许多新种或新分离物报道。这类病毒由蓟马传播至寄主植物局部部位后, 必须经由胞间运动和长距离转运扩散到整株导致系统发病, 但多年来其体内运输的机制一直是个未解之题。本研究通过农杆菌介导的植物双元表达体系研究了 TSWV 运动蛋白 NSm 在本氏烟叶片表皮细胞的定位情况,

同时利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统转染昆虫 Tn 细胞, 所得结果与国外报道相一致, 进一步证实了 NSm 的胞间连丝定位以及在昆虫细胞表面形成管状结构的特性。曾经有文章指出, 利用 TMV 运动缺陷型载体重组水稻齿叶矮缩病毒 (*Rice ragged stunt virus*, RRSV) 的非结构蛋白, 识别出了该病毒的运动蛋白, 说明利用表达载体进行蛋白定位研究是验证不同病毒运动蛋白的有效方法^[16]。同国内外有关报道不同的是, 我们利用 GFP 分子标记直接定位 NSm, 较早期报道采用免疫荧光标记定位 NSm

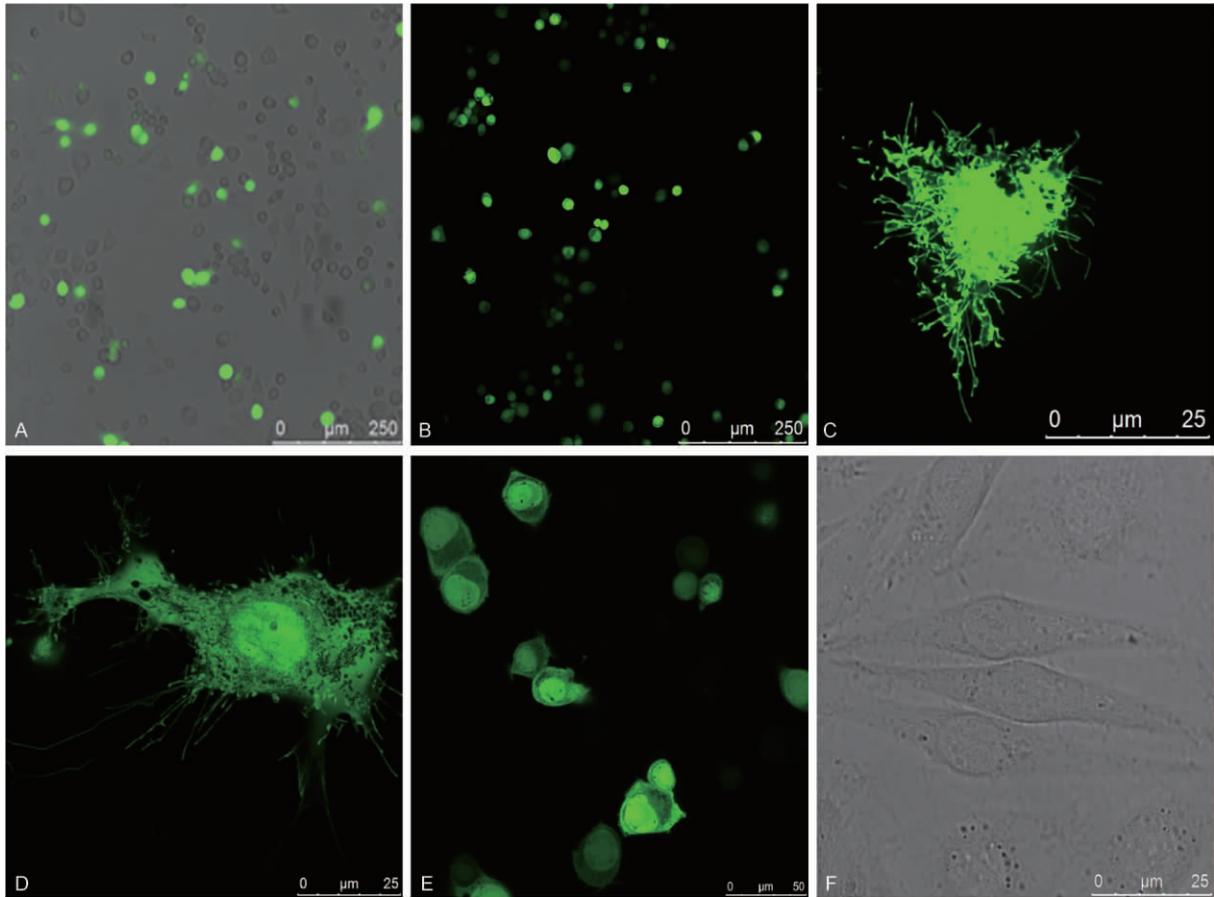


图3 NSm 在 Tn 细胞内的表达

Fig. 3 Expression of GFP-NSm fusion protein in Tn cells. A: About 25% of the inoculated cells expressed GFP-NSm at 48 hpi; B: About 70% of the inoculated cells expressed GFP-NSm at 72 hpi; C: NSm-containing tubular structures emerging from the cells surface at 48 hpi; D: Many tubules are longer at 72 hpi; E: Mock-inoculated with GFP; F: Wild-type Tn cells.

更为精确和灵敏;同时,利用 pCHF₃ 载体替换运动缺失型的 TMV 载体,去除了病毒因素对 NSm 定位可能存在的影响,说明 TSWV 的 NSm 蛋白不但在病毒体系中具有运动功能,而且在纯植物体系中也可以实现细胞间的转移。NSm 在胞间连丝处具有特异性的定位表明 TSWV 在细胞间的扩散与胞间连丝直接相关。

GFP-NSm 融合蛋白能够在昆虫 Tn 细胞表面诱导产生管状结构,表明在去除植物细胞壁因素和 TSWV 其它蛋白的情况下,单独表达 NSm 蛋白仍可有效形成这些运动蛋白小管,由于昆虫细胞没有细胞壁,类似于原生质体结构,NSm 在细胞表面产生的管子较多且杂乱无章,长度远长于在胞间连丝处形成的 NSm 蛋白小管^[8]。植物表皮细胞有一层较厚的细胞壁包裹,细胞内部主要通过胞间连丝与外界进行大分子物质的流动和交换,NSm 在本氏烟

表皮细胞的定位已经表明 NSm 的定位与胞间连丝有关,因此我们认为 NSm 在细胞表面产生的管状结构应该是等同于在植物细胞内穿过胞间连丝沟通相邻两个细胞的运输通道,但是野生型病毒感染后具体通过该管状结构移动的物质尚在研究之中。TSWV 可通过蓟马传播扩散,研究其 NSm 在昆虫细胞内的表达定位情况对于研究蓟马体内 TSWV 的持久性传毒也具有一定的意义。

对于 *Tospovirus* 的不同种来说,运动蛋白 NSm 的种间同源性较低,我们发现不同种之间的 NSm 细胞表达情况存在着差异,这可能意味着该属病毒的 NSm 功能及细胞间运动的机理较为复杂。究竟 TSWV 在其生命周期中是怎样从侵染细胞到达周围健康细胞?是病毒整个颗粒通过管状结构穿过胞间连丝还是以核衣壳的形式?TSWV 在胞间运动过程中是否还有其它蛋白的参与?大颗粒病毒的胞间运

动是否存在新的机制? 这些都有待进一步的研究。

致谢 浙江大学昆虫研究所程若琳博士和张传溪教授在研究过程中提供帮助和指导, 谨表衷心感谢!

参考文献

- [1] Seepiban C, Gajanandana O, Attathom T, Attathom S. Tomato necrotic ringspot virus, a new tospovirus isolated in Thailand. *Archives of Virology*, 2011, 156 (2): 263-274.
- [2] Parrella G, Gognalons P, Gebre-Selassie K, Vovlas C, Marchoux G. An update of the host range of Tomato spotted wilt virus. *Journal of Plant Pathology*, 2003, 85 (4): 227-264.
- [3] 程晓非, 武晓云, 李凡, 李正跃, 董家红, 张仲凯. 番茄斑萎病毒属病毒的多样性. 云南农业大学学报 (*Journal of Yunnan Agricultural University*), 2007, 22 (4): 495-502.
- [4] 张仲凯, 何跃锋, 方琦, 程晓非, 董家红, 尹跃艳, 丁铭. 3种番茄斑萎病毒属病毒侵染寄主植物的细胞病理特征. 西南农业学报 (*Southwest China Journal of Agricultural Sciences*), 2010, 23 (5): 1522-1524.
- [5] 程晓非, 董家红, 方琦, 李婷婷, 丁铭, 张仲凯. 从云南蝴蝶兰上检测到番茄斑萎病毒属病毒. 植物病理学报 (*Acta Phytopathologica Sinica*), 2008, 38 (1): 31-34.
- [6] 陈坤荣, 许泽永, 晏立英, 王国平. 番茄斑萎病毒属 (Tospovirus) 病毒研究进展. 中国油料作物学报 (*Chinese Journal of Oil Crop Sciences*), 2005, 27: 91-96.
- [7] Li WM, Lewandowski DJ, Hilf ME, Adkins S. Identification of domains of the Tomato spotted wilt virus NSm protein involved in tubule formation, movement and symptomatology. *Virology*, 2009, 390 (1): 110-121.
- [8] Kormelink R, Storms M, van Lent J, Peters D, Goldbach R. Expression and subcellular location of the NSm protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology*, 1994, 200 (1): 56-65.
- [9] Storms MMH, Kormelink R, Peters D, van Lent JWM, Goldbach RW. The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology*, 1995, 214 (2): 485-493.
- [10] Lewandowska DJ, Adkins S. The tubule-forming NSm protein from Tomato spotted wilt virus complements cell-to-cell and long-distance movement of Tobacco mosaic virus hybrids. *Virology*, 2005, 342 (1): 26-37.
- [11] Pouwels J, van der Velden T, Willemse J, Borst J. W, van Lent J, Bisseling T, Wellink J. Studies on the origin and structure of tubules made by the movement protein of Cowpea mosaic virus. *Journal of General Virology*, 2004, 85: 3787-3796.
- [12] Liu CK, Ye LF, Lang GJ, Zhang CX, Hong J, Zhou XP. The VP37 protein of Broad bean wilt virus 2 induces tubule-like structures in both plant and insect cells. *Virus Research*, 2011, 155 (1): 42-47.
- [13] 刘艳荷, 陈艳霞, 章亦卿, 徐海君, 张传溪. 棉铃虫核型多角体病毒 ORF27 基因的表达和细胞内定位. 农业生物技术学报 (*Journal of Agricultural Biotechnology*), 2007, 15 (3): 503-507.
- [14] Hofmann C, Sambade A, Heinlein M. Plasmodesmata and intercellular transport of viral RNA. *Biochemical Society transactions*, 2007, 35 (1): 142-145.
- [15] Wei TY, Zhang CW, Hong J, Xiong RY, Kasschau KD, Zhou XP, Carrington JC, Wang AM. Formation of Complexes at Plasmodesmata for Potyvirus Intercellular Movement Is Mediated by the Viral Protein P3N-PIPO. *PLoS Pathogens*, 2010, 6 (6): 1-12.
- [16] Wu ZJ, Wu JG, Adkins Scott, Xie LH, Li WM. Rice ragged stunt virus segment S6-encoded nonstructural protein Pns6 complements cell-to-cell movement of Tobacco mosaic virus-based chimeric virus. *Virus Research*, 2010, 152 (1-2): 176-179.

Expression and subcellular location of NSm protein of *Tomato spotted wilt virus* in plant and insect cells

Weina Shang¹, Chunmei Meng², Kuanyu Zheng³, Ming Ding³, Zhongkai Zhang^{3*}, Jian Hong^{1,2*}, Xueping Zhou¹

¹ Institute of Biotechnology, ² Center of Analysis and Measurement, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

³ Institute of Biotechnology and Germplasm Resources, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China

Abstract: [Objective] Expression and subcellular location of NSm protein of *Tomato spotted wilt virus* were studied using plant and insect cells. [Methods] First, the NSm gene, located on the ambisense M RNA segment of *tomato spotted wilt virus*, was cloned into the pCHF₃ vector which includes a GFP gene. *Agrobacterium*-mediated transient expression from *N. benthamiana* leaves was used to study the location of NSm in plant cells. Second, to test whether plant-specific components were involved in tubule formation, the NSm gene was also expressed in a heterologous expression system, i. e., insect cells. *T. ni* (Tn) cells were infected with a recombinant baculovirus expressing the NSm gene. [Results] NSm-GFP fusion proteins diffused in the tobacco epidermal cells and were located at the edge of the cell walls. These proteins can also form discontinuous green fluorescent spots at the plasmodesmata, which were sometimes present in pairs between two neighboring cells. However, GFP proteins expressed alone distributed evenly around the cell wall and in the nucleus. In the entomic Tn cells, NSm proteins formed a large number of tubular structures extending from the surface. [Conclusion] These findings suggest that NSm protein target the plasmodesmata specifically in plant cells, and they also could form tubular structures on the surface when expressed in entomic Tn cells.

Keywords: TSWV, NSm, Subcellular location, Cell-to-cell movement, Tn cells

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2010CB134501)

* Corresponding authors. Jian Hong, Tel: +86-571-86971179, Fax: 86-571-86971628, E-mail: jhong@zju.edu.cn; Zhongkai zhang, Tel: +86-871-5183204, Fax: +86-871-5160084, E-mail: zhongkai99@sina.com

Received: 14 March 2012/Revised: 20 April 2012