

## 乳酸乳球菌中冷休克蛋白基因的高效表达及其抗冻保护作用

张英华<sup>1,2</sup>, 雷雨婷<sup>1</sup>, 霍贵成<sup>1</sup>

(东北农业大学,<sup>1</sup> 乳品科学教育部重点实验室,<sup>2</sup> 食品学院, 哈尔滨 150030)

**摘要:**【目的】微生物在适应外界环境急剧降温的条件下都会发生应激反应,产生一系列蛋白质被称为冷休克蛋白。冷休克蛋白对乳酸菌适应低温环境和增强抗冻能力方面发挥着重要作用。本文目的是为了研究乳酸乳球菌中冷休克蛋白 CspC、CspD 的作用。【方法】将冷休克蛋白 CspC、CspD 基因分别重组到质粒 pNZ8148,转化乳酸乳球菌 NZ9000 后,加入 Nisin 诱导,对表达产物进行 SDS-PAGE 电泳分析,比较重组菌与空白菌在 30℃ 条件下菌体生长差异及反复冻融活菌数的差异。【结果】得出 CspC、CspD 的相对分子量分别为 7.0、6.2 kDa。【结论】CspC 使菌体更加迅速的恢复了生长;冷休克蛋白 CspD 增强了菌体的抗冻存活率(增加了 30~40 倍)。

**关键词:** 乳酸乳球菌;冷休克蛋白;CspC、CspD 基因克隆、表达;抗冻保护作用

**中图分类号:** Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 09-1203-05

几乎所有单细胞生物在外界环境急剧降温的条件下都会发生应激反应,产生一系列蛋白质被称为冷应激蛋白(CIPs),其中包括一些小分子量的(大约 7 kDa)的酸性蛋白质叫做冷休克蛋白(CSPs),这是一种主要的应激蛋白,这些蛋白对细胞在低温时恢复生长和发挥细胞各种功能是非常重要的。

目前,对大肠杆菌低温适应性的研究的比较深入,发现了 14 种低温诱导蛋白,其中 CspA<sub>EC</sub> 为主要的冷诱导蛋白,低温条件下大量表达,它一般绑定 ssRNA 或 ssDNA,作为 RNA 分子伴侣(RNA chaperone)与细胞中的 mRNA 结合,稳定 mRNA 促进翻译<sup>[1]</sup>。对乳酸菌冷诱导蛋白的作用及低温调节机制的研究相对较少,但由于冷诱导蛋白对菌体抗冻特性的影响,乳酸菌中 CSPs 的研究越来越受到关注。

人类对乳酸菌的利用已有悠久的历史,传统上利用自然环境中的“天然乳酸菌”发酵食品,随着 Orla-Jensen 对酸奶细菌学的研究及对菌种改进,开始了传统发酵的应用<sup>[2]</sup>。乳酸菌在食品工业中扮演者重要角色,参与许多个发酵过程,对其发酵后冷却及冷

冻保藏过程中的存活率的研究至关重要。目前,国内有很多机构和学者是从研究保护剂等外部条件的保护作用的角度出发,而对乳酸菌自身抵抗环境变化的保护机制研究较少。现代微生物学、遗传学等学科研究为发酵剂工业发展提供了广阔空间,在工业化生产过程中,乳酸菌要经受一系列的环境压力,诸如极端温度、pH、渗透压、氧、和饥饿等,已经报道了几种压力胁迫作用下菌体的适应性及相关基因的研究<sup>[3~5]</sup>。但对于低温胁迫下,乳酸乳球菌的基因调节作用研究较少,而这种基因调节作用对于发酵剂的冷冻保藏及低温发酵都具有重要意义。在了解乳酸菌冷冻适应性后,将有助于提高乳酸菌在低温下的生长及生存能力,也利于通过遗传工程法构建新的食品级发酵剂。

为了提高乳酸菌在低温下的生长及生存能力,我们可以以低温对基因表达的影响及低温条件下的生理变化机制等方面作为突破口。本研究主要从冷休克蛋白这一角度着手。通过 NICE 系统超量表达 CspC、CspD 基因,从而研究冷休克蛋白的表达与冷冻存活

基金项目:东北农业大学科学研究基金;乳品科学教育部重点实验室主任基金(KLDS 2006\_03B)

作者简介:张英华(1974-),女,黑龙江哈尔滨人,副教授,博士,研究方向为食品科学与工程。Tel: +86-451-55190479; Fax: +86-451-55190577; E-mail: yhzhang2000@126.com

收稿日期:2008-04-02; 修回日期:2008-05-21

率之间的关系。为利用乳酸菌自身的抗冻机制来加以遗传改造,提高乳酸菌冻藏存活率以及工业应用提供一定的理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:**乳酸乳球菌乳酸亚种(*L.lactis* subsp. *Lactis*) klds4.0310 来自乳品科学教育部重点实验室乳品工业微生物菌种保藏中心(KLDS-DICC);乳酸乳球菌 NZ9000 由本实验室保存;*E.coli* 感受态细胞 DH5 $\alpha$  购自 TaKaRa 公司。

**1.1.2 培养基和主要试剂:**GM17 培养基用于乳酸菌液体或固体培养;SGM17MC 培养基(即 GM17 含 0.5 mol/L 蔗糖,20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>)用于电击后乳酸菌细胞的复苏;G/L-SGM17MB(0.5 mol/L 蔗糖,2.5%甘氨酸,0.5%葡萄糖或乳糖及 M17 肉汤培养基)用于乳酸乳球菌感受态细胞制备。pNZ8148 质粒购自 NIZO 研究所;pMD19-T simple vector 购自 TaKaRa 公司。工具酶和试剂盒:*Taq* 酶、内切酶 *Nco*、*Hind* 及胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒均购自 TaKaRa 公司;T4 DNA Ligase 购自 NEB;DNTPs、DNA marker 购自 TaKaRa 公司;Nisin 购自美国 Sigma 公司。

**1.1.3 引物:**用于扩增 CspD 基因的引物,P1:5'-GCTGCCATGGCAAATGGAACAGTAAAATGG-3(*Nco*),P2:5'-CACGAAGCTTTTTCTCTTGCTGGCTAAGT-3(*Hind*)。用于扩增 CspC 基因的引物,P3:5'-CCC-CATGGAATAAACTATCCCATTGTAC-3(*Nco*),P4:5'-GCCTTCAAGCAAGTCGCAAT-3。以上引物均由上海生工合成。

### 1.2 CspC、CspD 基因的克隆

以乳酸乳球菌乳酸亚种 KLDS4.0310 染色体 DNA 为模板(做空白对照),分别以 P1、P2 和 P3、P4 为引物扩增 CspC、CspD 基因。将回收的 PCR 产物与 pMD19-T Simple Vector 载体连接。PCR 及酶切鉴定为阳性的克隆菌株送到上海生共测序,测序正确的重组质粒命名为 T/CspC、T/CspD。分别用 *Nco*、*Hind* 双酶切 T/CspC、T/CspD。回收目的片段 CspC、CspD。

### 1.3 重组表达质粒 PNZ8148/CspC、CspD 的构建

用限制性核酸内切酶 *Nco* 和 *Hind* 双酶切原核表达载体 pNZ8148。回收 3.3 kb 载体片段。回收的

目的片段 CspC、CspD 分别与上述 3.3 kb 载体片段通过 T4DNA 连接酶进行连接,连接产物直接用于转化。

### 1.4 电转空转化乳酸乳球菌

按照文献制备感受态 *L.lactis* NZ9000<sup>[6]</sup>。用 Bio-Rad 公司的 Gene Pulser 电击转化仪进行电击确良(25  $\mu$ F 12.5 KV/cm,200 $\Omega$ ),恢复培养基用 SGM17MC,在含氯霉素的 GM17 固体培养基平板上,30 保温 24~72 h。挑取转化子提质粒电泳,疑似质粒进一步作酶切鉴定。

### 1.5 重组质粒的诱导表达及 SDS-PAGE

将阳性质粒转化菌落接种于含有氯霉素(4 ng/mL)GM17 的液体培养基内,30 培养 2~3 h 后(*OD*=0.3)加入 Nisin(浓度分别为 0、0.2、0.5 ng/L)诱导,继续培养 5~6 h,收集菌体,加溶菌酶并用超声波细胞破壁仪破壁后,离心收集上清液。样品进行 SDS-PAGE 电泳。

### 1.6 CspC、CspD 功能的研究

表达菌 NZ9000/PNZ8148/CspC、NZ9000/PNZ8148/CspD 及对照菌 NZ9000/PNZ814830 培养 2.5 h(*OD*=0.35)时,加入 0、0.2、0.5 ng/mL 的 Nisin。绘制 10 h 内的生长曲线。

3 菌株按 4%接种量接种,30 培养 2.5 h(*OD*=0.35)时,加入 0、0.5 ng/mL 的 Nisin,再培养 8~10 h(*OD*=0.8),4000 r/min 离心 20 min,重悬于同体积新鲜的 M17 培养基中,计数。对所有样品进行 4 次冻融刺激,方法是经过计数后的样品 1 mL 分装,放入-20 冰箱中急剧降温,冷冻 24 h,然后 4 min、30 缓冻。分别计数,计算其存活率。

## 2 结果和分析

### 2.1 冷应激蛋白基因 CspC、CspD 的 PCR 扩增,重组质粒 T/CspC、T/CspD 的鉴定

PCR 扩增 CspC、CspD 基因,PCR 产物在 1.0%的琼脂糖凝胶上电泳,EB 染色后紫外灯下观察,有与目的基因大小相符的条带,大小分别为 500、300 bp 左右。

为了鉴定重组质粒,我们将其双酶切后进行电泳,出现与期望大小一致的条带。说明外源序列 CspC、CspD 插入 pMD19-T simple vector。将含有 CspC、CspD 重组质粒的菌体送至上海生工测序。测序结果表明克隆到 T 载体上的 CspC、CspD 基因序列与 GenBank 中检索到的乳酸乳球菌冷应激蛋白基因

序列一致性分别为 94%、99%。

## 2.2 重组表达质粒 pNZ8148/CspC、CspD 的鉴定

质粒 pNZ8148/CspC、CspD 经酶切后插入片段与目的基因大小相符, 由此, 可以初步断定目的基因已经成功的连接到载体上。

重组质粒 pNZ8148/CspD 扩增出 300 bp 片段, 大小相符, 但对对照有较弱条带, 可能为非特异性条带, 或质粒 pNZ8148 含有 CspD 基因序列。重组质粒 pNZ8148/CspC 的 PCR 产物为 500 bp, 序列结果与 CspC 序列同源为 100%, 而对对照没有特异性条带经酶切及 PCR 鉴定, 确定 CspD、CspC 基因已经成功连接到载体 pNZ8148 上。

## 2.3 重组质粒表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

pNZ8148/CspC、pNZ8148/CspD、pNZ8148 转化乳酸乳球菌, 其阳性菌经 Nisin 诱导表达, SDS-PAGE 电泳分析, 诱导重组菌 pNZ8148/CspC 比对照菌明显地多出一条相对分子质量约为 7 kDa 的特异的表达蛋白条带, 与预期大小一致。诱导重组菌 pNZ8148/CspD 与对照组相比有 6.2 kDa 蛋白高效表达, 对照组也有 6.2 kDa 蛋白条带, 但表达量明显低于重组菌, 可能是质粒 pNZ8148 的 CspD 基因表达, 也可能是其他 6.2 kDa 蛋白, 但表达量远远小于重组菌, 不会影响下一步其作用的研究。

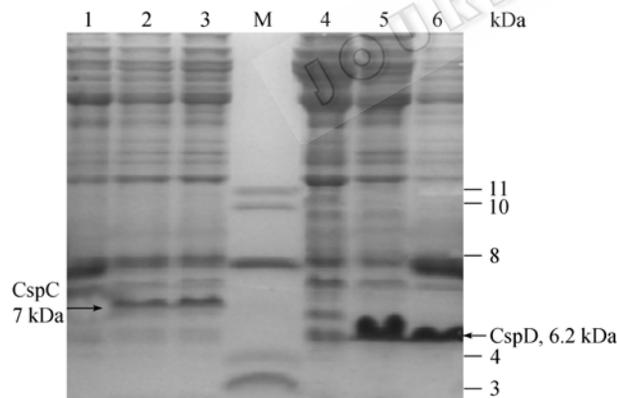


图 1 重组质粒 pNZ8148/CspC、pNZ8148/CspD 在乳酸乳球菌中表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE Analysis of the NZ9000 containing the Overproduction of CspD/CspC. 1. pNZ8148/CspC(0 ng); 2. pNZ8148/CspC(0.2 ng); 3. pNZ8148/CspC(0.5 ng); M. super low molecular weight Marker; 4. pNZ8148/CspD(0 ng); 5. pNZ8148/CspD(0.5 ng); 6. pNZ8148/CspD(0.2 ng).

## 2.4 冷应激蛋白 CspC、CspD 功能的研究

2.4.1 CspC、CspD 的超量表达对菌体生长恢复的影响: 含质粒 pNZ8148、pNZ8148/CspC、pNZ8148/CspD 的乳酸乳球菌于 30 °C 培养箱中恒温培养 2.5 h

( $OD_{600}=0.35$ ) 时, 加入 0、0.2、0.5 ng/mL 的 Nisin。分别于 0、2、4、6、8、10 h 取样, 测定菌液的光密度值 ( $OD_{600}$ )。以培养时间为横坐标, 以光密度 ( $OD_{600}$ ) 为纵坐标, 绘制生长曲线。由图 2 可以看出加入 Nisin 抑制了含 pNZ8148 的菌株生长, 而对含 pNZ8148/CspC 菌株基本没有影响, 这说明 CspC 的超量表达抵消了 Nisin 的抑制作用, 使细胞更加迅速的恢复了生长; 而 CspD 的超量表达对菌体生长影响较小 (图 3)。

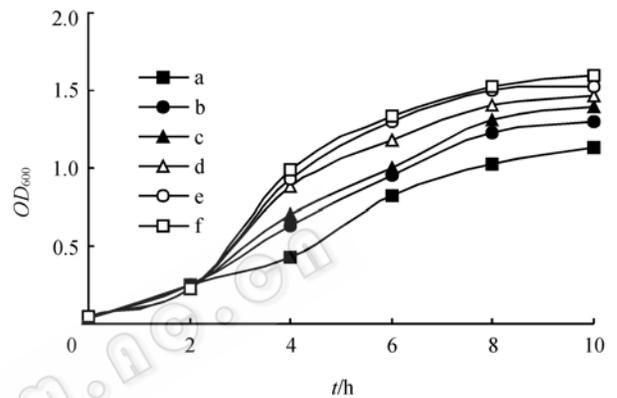


图 2 CspC 的超量表达对菌体生长的影响

Fig. 2 Effect of CspC overproduction on *L.lactis* growth. a. pNZ8148(0.5 ng); b. pNZ8148(0.2 ng); c. pNZ8148(0 ng); d. pNZ8148-CspC(0 ng); e. pNZ8148-CspC(0.2 ng); f. pNZ8148-CspC(0.5 ng).

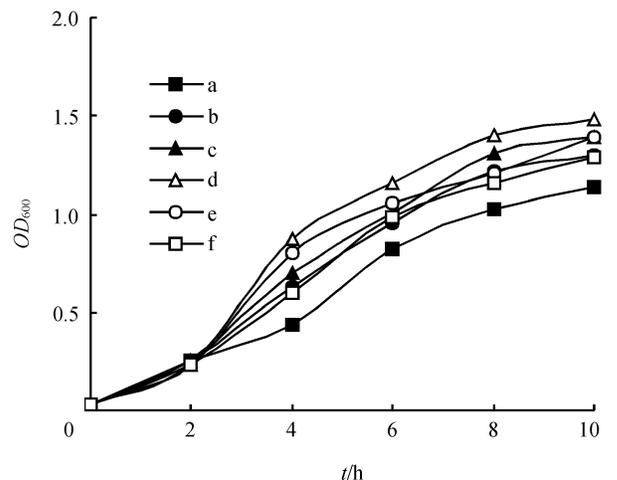


图 3 CspD 的超量表达对菌体生长的影响

Fig. 3 Effect of CspD overproduction on *L.lactis* growth. a. pNZ8148(0.5 ng); b. pNZ8148(0.2 ng); c. pNZ8148(0 ng); d. pNZ8148-CspD(0 ng); e. pNZ8148-CspD(0.2 ng); f. pNZ8148-CspD(0.5 ng)

2.4.2 CspC、CspD 的超量表达对菌体抗冻特性的影响: 乳酸乳球菌 pNZ8148、pNZ8148/CspC、pNZ8148/

CspD 在  $OD$  值达到 0.35 时, 加入 0、0.5 ng/mL 的 Nisin。再培养 8~10 h ( $OD=0.8$ ), 计数。然后, 对所有样品进行 4 次冻融刺激, 计算其存活率。结果如图 4 所示, 经过 Nisin 诱导的乳酸乳球菌 pNZ8148/CspD 经过 4 个连续的反复冻融试验后, 存活率为 0.955, 是未加 Nisin 诱导的对照菌株的 30~40 倍, 这说明 CspD 的超量表达增加了菌体的抗冻存活率; 而乳酸乳球菌 pNZ8148/CspC 经过 Nisin 诱导与未加 Nisin 诱导的对照菌株差别不显著; 空白对照组乳酸乳球菌 pNZ8148, 加入 Nisin 后, 存活率略微降低, 可能由于菌体抗冻性减弱。

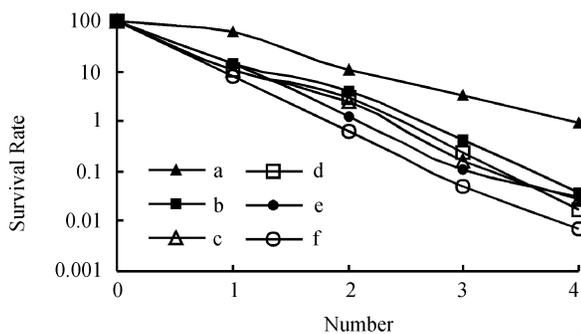


图 4 CSPs 的超量表达对菌体抗冻特性的影响

Fig. 4 Effect of CSPs overproduction on the anti-freezing property of *L.lactis*. a. pNZ8148/CspD(0.5 ng); b. pNZ8148/CspC(0.5 ng); c. pNZ8148/CspD(0 ng); d. pNZ8148/CspC(0 ng); e. pNZ8148(0 ng); f. pNZ8148(0.5 ng).

### 3 讨论

冷刺激会对乳酸菌造成损伤, 但低温预处理却可以使菌体获得抗冻特性。Sanders 试验证明, 乳酸乳球菌在 8 °C 冷处理 48 h 的细胞存活率是 95%, 比没有冷处理的高了 20%<sup>[7]</sup>。Jeroen 也证明了提前 20 h 预处理 4 h 可以使嗜热链球菌 CNRZ302 存活率提高 1000 倍, 并推测冻干菌株从冷处理过程获得的保护主要来自于冷应激蛋白<sup>[8]</sup>。为了研究乳酸乳球菌中冷应激蛋白 CspC、CspD 的作用, 本实验利用 NICE 系统 (Nisin-Controlled Expression system) 超量表达冷应激蛋白 CspC、CspD, 从而研究冷应激蛋白对菌体的抗冻保护作用及菌体生长的影响。

本研究所用的 NICE 系统是目前国际上最新发展的一种高度通用、食品级的表达系统。它包括能表达 *nisR* 基因到一定水平的乳酸乳球菌 NZ9000, 含 *nisA* 启动子片段的质粒载体及 Nisin 诱导物 (作为自身结构基因转录激活的信号分子)。当带有 *nisA* 启动子及

冷应激蛋白基因的质粒 pNZ8148/CspC、CspD 导入不能产 Nisin 但含有 *nisRK* 蛋白的乳酸菌菌株 NZ9000 后, CSPs 基因以很低的水平表达, 这种表达水平检测不到。当细菌达到对数生长期时向培养基中加入 Nisin 后, 起传感蛋白作用的 *nisK* (组氨酸激酶) 识别 *nisin*, 然后 *nisK* 自我磷酸化后将磷酸基团转移给 *nisR*, *nisR* 作为一个应答调节物激活 *nisA* 启动子, 从而使下游 CSPs 基因被激活转录, 高效表达冷应激蛋白。NICE 系统具有严谨性高, 本底表达水平低, 诱导效率高, 表达产量高等优点<sup>[9,10]</sup>。通过 NICE 系统超量表达冷应激蛋白, 是研究其作用的一种有效方式。

目前对冷休克蛋白在细胞生理学中的功能研究有限, 一般认为 CSPs 参与了翻译、转录、细胞核形成过程。

研究 CspC 的作用时, 将稳定期含 pNZ8148/CspC 的菌体接种于新鲜培养基中, 细菌生长进入延滞期, 生理机能开始恢复, 这时的菌体比较敏感。超量表达 CspC 的菌株在 2~4 h 内, 生长速率明显高于超量表达 CspD 的菌株及对照菌。这说明 CspC 的超量表达使细胞更加迅速的恢复了生长, CspC 在适应新环境中扮演了重要角色。大肠杆菌 37 °C 培养, 在指数生长期 CspA mRNA 及 CspA 蛋白含量很高, 进一步研究发现在接种于新鲜培养基时, CspA/E 二倍体变异比 CspE 突变体的延滞期长<sup>[11]</sup>。可以推断 *L.lactis* 中 CspC 与 CspA<sub>EC</sub> 扮演了同样角色。

在冻融试验中, 超量表达 CspD 菌株的抗冻能力明显增加, 而超量表达 CspC 的菌株没有明显变化。在枯草杆菌中, 敲除 CspB 导致菌体对温度敏感性增加。在植物乳杆菌中 CspP 也起到了增强菌体抗冻性的作用。我们可以肯定乳酸乳球菌乳酸亚种 KLDS4.013 中抗冻蛋白 CspD 具有明显的保护作用。冷诱导蛋白作为 RNA 分子伴侣 (RNA chaperone) 与细胞中的 mRNA 结合, 稳定 mRNA 阻止其降解, 促进翻译。他们可能通过在低温条件下帮助维持细胞膜的完整, 抑制大分子的变性, 来提高乳酸菌的抗冻存活率。大肠杆菌中 CspE 在 37 °C 也存在, 主要作用是帮助 DNA 抵御冷冻伤害。

*L.lactis* 在不同环境胁迫条件下, 不同 CSPs 发挥着主要作用。在枯草杆菌中, CspB 主要作用是维持菌体生长、抵御低温及冷冻伤害并且可以提高稳定期菌体存活率。若敲出 CspB, CspC 在稳定期及低温条件下发挥着相同的作用, 而 CspD 同样可以维持菌体

37 生长<sup>[12, 13]</sup>。在 *E. coli* 中, CspA 是一种主要的冷应激蛋白, 在菌体冷适应性及生长的恢复等方面都发挥了重要作用。在敲出 CspA 的突变体中, CspB、CspG、CspI 成为主要冷应激蛋白, 提高菌体抗冻性。而 CspE 在菌体生长恢复方面发挥了重要作用<sup>[14]</sup>。我们证明了 CspC 提高了菌体冷适应性, CspD 增加了菌体冷冻存活率, *L. lactis* 中其他 CSPs 的作用有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Ermolenko DN, Makhatadze GI. Bacterial cold-shock proteins. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59: 1902–1913.
- [2] Ralph Early. 乳制品生产技术. 张国农、吕兵、卢蓉蓉译著. 北京: 中国轻工业出版社, 2002, 36–55.
- [3] Sanders JW, Leenhouts K, Haandrikman J, Venema G, Kok J. Stress response in *Lactococcus lactis*: cloning, expression analysis and mutation of the superoxide dismutase gene. *Bacterio*, 1995, 177: 5254–5260.
- [4] Van Asseldonk M, Simons A, Visser H. Cloning, nucleotide sequence and regulatory analysis of the *Lactococcus lactis* gene. *Bacteriol*, 1993, 175: 1637–1644.
- [5] Rallu F, Gruss A, Maguin E. *Lactococcus lactis* and stress. *Antonie Leeuwenhoek*, 1996, 70: 243–251.
- [6] Holo H, Nes IF. Electroporation of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55: 3119–3123.
- [7] Sanders JW, Venema G, Kok J. Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Rev*, 1999, 23: 463–501.
- [8] Jeroen AW. Cold shock proteins and low-temperature response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65: 4436–4442.
- [9] Ruyter PG. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 3662–3667.
- [10] 张晶晶, 李泰明, 谭树华. 乳酸菌食品级 nisin 控制的基因表达系统 NICE. *中国生物工程杂志(China Biotechnology)*, 2006, 26(3): 68–70.
- [11] Bae W, Phadtare S, Severinov K, Inouye M. Characterization of *Escherichia coli* cspE, whose product negatively regulates transcription of cspA, the gene for the major cold shock protein. *Mol Microbiol*, 1999, 31: 1429–1441.
- [12] Graumann P, Wendrich TM, Weber HW, et al. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperature. *Mol Microbiol*, 1997, 25: 741–756.
- [13] Graumann P, Marahiel MA. Cold shock proteins CspB and CspC are major stationary-phase-induced proteins in *B. subtilis*. *Arch Microbiol*, 1999, 171: 135–138.

## Expression of cold-shock-protein genes from *Lactococcus lactis* and analysis of the cryoprotection function

Yinghua Zhang<sup>1,2\*</sup>, Yuting Lei<sup>1</sup>, Guicheng Huo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Key Lab of Dairy Science, Ministry of Education, <sup>2</sup> College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

**Abstract:** [Objective] Bacteria are able to adapt to temperatures far below their optimum growth temperatures, and a set of proteins (cold shock proteins, CSPs) are strongly induced in response to a rapid decrease in growth temperature. We studied the key functions in cryoprotection against damage caused by freezing of these proteins. [Methods] *Nco*I-*Hind*III CspC and CspD fragments were cloned respectively between *Nco*I and *Hind*III in pNZ8148, the recombinants plasmid were subsequently transformed by electroporation into *Lactobacillus lactis* NZ9000. Overproduction of CSPs was achieved by the addition of different concentrations of nisin to cultures and was analyzed by SDS-PAGE. In order to study the cryoprotection of CspC and CspD, the growth curves including the control strain and CSP-overproducing strains were developed. The number of colony-forming units was determined just before freezing and after four consecutive freeze-thaw operations. [Results] The 7 kDa cold-shock protein CspD and 6.2 kDa cold-shock protein CspC were identified respectively. [Conclusion] The results indicate that CspC improves the recovery of cells and CspD increases the viability after freezing (30~40 folds).

**Keywords:** *Lactococcus lactis*; cold-shock proteins; cloning; expression of CspC and D; cryoprotection

Supported by the Research Fund of Northeast Agriculture University and the Fund from the Director of Key Laboratory of Dairy Science (NEAU)(KLDS 2006\_03B)

\*Corresponding author. Tel: +86-451-55190479; Fax: +86-451-55190577; E-mail: yhzhang2000@126.com

Received: 2 April 2008/ Revised: 21 May 2008