

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
49(3): 405-409; 4 March 2009  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

## 布鲁氏菌 BP26 基因标记疫苗株的构建及鉴别 PCR 方法的建立

汪舟佳<sup>1#</sup>, 甄清<sup>2#</sup>, 乔凤<sup>2#</sup>, 王玉飞<sup>1</sup>, 杜昕颖<sup>1</sup>, 钟志军<sup>1</sup>, 赵瑾<sup>1</sup>, 于雅琴<sup>2</sup>, 黄留玉<sup>1</sup>,  
孙岩松<sup>1\*</sup>, 陈泽良<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 军事医学科学院疾病预防控制中心 北京 100071)

(<sup>2</sup> 吉林大学公共卫生学院 教育部重点实验室 长春 130021)

**摘要**【目的】由于现有的减毒活疫苗仍存在较强的毒力,因抗原与毒株的差异不大而很难区分疫苗免疫和自然感染等缺点,限制了现有布鲁氏菌减毒活疫苗的广泛应用。本文拟对布鲁氏菌的减毒活疫苗株 M5 进行遗传改造,克服这些缺点。【方法】本研究利用同源重组的方法,用卡那抗性基因替换了布鲁氏菌减毒疫苗株 M5 的 BP26 基因,得到了新的标记疫苗株 M5ΔBP26。分别用标记疫苗株和野生株侵染巨噬细胞和感染小鼠,比较分析标记株在细胞内和小鼠体内的存活能力。根据种特异性保守基因 dnaK 和缺失的 BP26 基因设计引物,建立双重 PCR,用于区分标记株与野生株。【结果】成功构建了 BP26 基因标记疫苗株,细胞实验和动物实验结果表明,标记株仍能在胞内和小鼠内存活,具备作为减毒活疫苗的特性。小鼠实验结果显示,感染后两周野生株的细菌数为  $10^{2.9}$ ,而突变株为  $10^{1.1}$  ( $P < 0.01$ ),至第 3 周野生株的细菌数为  $10^{2.2}$ ,而突变株未能检出,表明与原疫苗株相比,标记株的感染力进一步减弱。根据 DNA 序列的差异,建立了能够区分标记疫苗株与野生株的双重 PCR 方法,标记株因只能扩增出一条带而能与野生株和毒株相区分,从而可以区分自然感染和疫苗免疫。【结论】基因标记疫苗株的构建及鉴别 PCR 方法的建立,为布鲁氏菌疫苗的进一步研发奠定了基础。

**关键词:** 布鲁氏菌, 26 kDa 外膜蛋白, 标记疫苗株

**中图分类号:** R37      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209(2009)03-0405-05

布鲁氏菌引起的布鲁氏菌病是典型的人兽共患传染病,给我国畜牧业生产造成巨大的经济损失,也严重威胁人民的健康生活,是一个重要的公共卫生问题。近年来,人间布鲁氏菌病的发病数一直呈上升趋势,已超过历史最高水平。人布鲁氏菌病主要来源于动物布鲁氏菌病,因此,尽管没有完整的监测体系,但可以预测动物间的布病发病率也很高。准确的诊断,对于及时发现疫情,彻底清除传染源,切

断传播途径,开展布鲁氏菌病的治疗工作,具有十分重要的意义<sup>[1]</sup>。针对布鲁氏菌病的诊断以及布鲁氏菌的检测的研究一直在进行,也取得了一些重要进展,这些方法在布鲁氏菌病的诊断和监测中发挥了重要作用<sup>[2-4]</sup>。布鲁氏菌病是一种慢性传染性疾病,预防该病的发生是控制该病的重要措施。布鲁氏菌病的预防主要是通过接种疫苗来实现,现有的疫苗主要是减毒活疫苗,如 M5、S2 和 A19 等。这些疫苗具有较好的免疫保护效果,在预防和控制布鲁

基金项目: 国家自然科学基金(30600024), 国家“863 计划”(2007AA02Z412)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-66948434; E-mail: zeliangchen@yahoo.com(陈泽良), sunys1964@hotmail.com(孙岩松)

作者简介: # 对本文有同等贡献。汪舟佳(1981-),女,浙江诸暨人,硕士,现主要从事预防医学研究, E-mail: grace-zhuji@163.com; 甄清(1965-),女,黑龙江人,副教授,现主要从事病原菌致病机制研究, E-mail: zq415@sina.com; 乔凤(1979-),女,黑龙江佳木斯人,博士研究生,现主要从事预防医学研究, E-mail: phoenixqiao@foxmail.com

收稿日期: 2008-08-02; 修回日期: 2008-12-15

氏菌病的蔓延和扩散中起到了重要作用。但是,这些疫苗还存在一个很大的缺点,即仍存在一定的毒力,可能导致免疫后发病,并且,由于疫苗株与野生毒株的抗原性相近,很难与自然感染的相区分<sup>[5-6]</sup>。针对减毒活疫苗的这些缺点,本研究拟在减毒活疫苗株的基础上,对菌株进行改造,敲除布鲁氏菌的重要诊断抗原 bp26 基因,使疫苗株的毒力进一步降低,然后根据两者序列的差异,建立鉴别 PCR 的方法,以区分疫苗免疫和自然感染。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒载体:**羊布鲁氏菌(*Brucella melitensis*, M5)购自中国药品生物制品检定所,为布鲁氏菌的减毒活疫苗株。大肠杆菌(*Escherichia coli*, DH5 $\alpha$ )为本室保存,pUC19-K 质粒为本室构建<sup>[7]</sup>。

**1.1.2 引物:**设计扩增 N 端同源臂的上下游引物 BP26-N-F 和 BP26-N-R,上下游引物的 5' 端分别添加 *Sac* I 和 *Xho* I,扩增 C 端同源臂的引物 BP26-C-F 和 BP26-C-R,上下游引物的 5' 端分别添加 *Mlu* I 和 *Sal* I,设计位于同源臂外侧的鉴定引物 BP26-I-F 和 BP26-I-R,位于抗性基因内部的鉴定引物为 Kana-I-F 和 Kana-I-R。针对 BP26 基因的鉴别 PCR 引物 BP26-F 和 BP26-R,针对 DnaK 基因的引物 DnaK-F 和 DnaK-R。设计的引物由北京奥科生物技术公司合成。本研究所用的引物及其序列见表 1。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Primers used in this study

Primer	Sequence(5'→3')
BP26-N-F	ATGCGAGCTCCGAGAACAGGCAGCACTC
BP26-N-R	ATCGCTCGAGGACGAGCATGATTCTGGA
BP26-C-F	ATCGACCGTAGCCGACCCGACAATTC
BP26-C-R	ATGCGTCCGACTGCCGTCATCATCATCG
BP26-I-F	TACTTGTCTGAAGGTGGTGC
BP26-I-R	TATTGATGCCGCTGTCT
Kana-I-F	ATCAGGACATAGCGTTGGC
Kana-I-R	GGCAAGAAAGCCATCCAGT
BP26-F	ATGCTCTGTCGGCGCTTTCAGCCTGCCCGCTTTCGCACAG
BP26-R	CAATGCCATTGGCCACTGCGCGCTTTCGCGCCTCGTTGAT
DnaK-F	TGGTCTGAGGTGCACGGCAAGAAATATTCTCCGTCGCAGAT
DnaK-R	CCAAGTCTATAGACAGCGATGCTCTTGCCTTCGCTCTTG

**1.1.3 主要试剂:**PCR 产物回收试剂盒、DNA 胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒均购自 Promega 公司,各种限制性内切酶购自 TaKaRa 公司,T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司,其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 标记盒的构建

以基因组 DNA 为模板,用 BP26-N-F 和 BP26-N-

R 引物扩增 N 端同源臂,用 BP26-C-F 和 BP26-C-R 引物扩增 C 端同源臂。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离,切胶回收 PCR 产物。N 端片段用 *Sac* I 和 *Xho* I 酶切后与 pUC19K 线性质粒连接,转化 DH5 $\alpha$  涂卡那抗性平板,抗性克隆用 N 端同源臂的扩增引物进行鉴定,PCR 阳性的克隆提取质粒,进行酶切鉴定,鉴定正确的重组质粒命名为 pUC19K-N。C 端同源臂 PCR 产物用 *Mlu* I 和 *Sal* I 酶切后与 pUC19K-N 线性质粒连接,然后按照克隆 N 端同源臂的方法进行克隆和重组子的鉴定,得到含有标记盒的载体 pUC19K-NC。

### 1.3 标记菌株的构建

将含有标记盒的质粒 pUC19K-NC 转入布鲁氏菌感受态细胞中,电转化产物经复苏后全部涂布卡那抗性 TSA 平板,37 $^{\circ}$ C 培养 3~5 d,筛选到抗性克隆。用标记株的鉴定引物 BP26-I-F + Kana-I-R 进行抗性克隆的鉴定,同时以野生株作为对照,只有标记株能够扩增出特异的目的带。对鉴定引物扩增的产物进行测序,确保序列的正确性。

### 1.4 细胞侵袭实验

J774A.1 细胞在 36 cm<sup>2</sup> 的空斑瓶内培养 16 h 形成单层细胞,用布鲁氏菌以 200:1 的比例侵染巨噬细胞 J774.A。感染的空斑瓶在室温下 200  $\times$  g 离心 5 min,然后在 5% CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$ C 环境中孵育 60 min。用 PBS 洗涤细胞去除未感染的胞外细菌,并且在含有 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素和链霉素的培养基中再孵育 60 min 以杀死胞外菌,PBS 漂洗以后将抗生素的浓度降为 25  $\mu$ g/mL。于孵育后不同时间点去除空斑瓶中的培养基,然后直接在培养瓶中加入 0.1% 的 Triton X-100,裂解细胞释放出胞内的细菌,涂板计数。每个时间点 3 个复孔。重复实验 3 次,计算平均值。

### 1.5 小鼠感染实验

选 6~8 周龄的雌性 Balb/c 小鼠,随机分组,每个时间点每组 8 只。用腹腔注射的方式每只注射 200  $\mu$ L 浓度为 5  $\times$  10<sup>7</sup> CFU/mL 布鲁氏菌,在感染后第 1、2、3 周,处死小鼠,无菌条件下取小鼠的脾脏,称重后放入 1 mL 生理盐水中匀浆,取 100  $\mu$ L 涂板计数。重复实验 2 次,计算平均值。

### 1.6 鉴别 PCR 方法

根据标记菌株中 BP26 基因缺失的序列,设计一对引物,BP26-F 和 BP26-R,预期扩增大小为 480 bp。利用这对引物进行扩增,标记菌株扩增为阴性。根据在各个种的布鲁氏菌中保守的 dnaK 基因,设计一对引物 DnaK-F 和 DnaK-R,扩增大小为 260 bp,利用

这对引物进行扩增,标记菌株和其它布鲁氏菌菌株扩增均为阳性。由4条引物组成双重PCR,按如下反应体系和条件进行扩增:采用50  $\mu$ L反应体系,反应条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,54 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,30个循环,72 $^{\circ}$ C 7 min。1%琼脂糖凝胶电泳分析PCR扩增产物。

## 2 结果

### 2.1 含标记盒的 pUC19K-NC 质粒的构建

以布鲁氏菌的基因组DNA为模板,分别扩增540 bp和450 bp的N端和C端同源臂。然后分别将N端同源臂和C端同源臂克隆到pUC19K中卡那抗性基因的N端和C端,得到了含有突变盒的重组载体pUC19K-NC。酶切鉴定和DNA测序结果表明,所构建的重组质粒中插入的序列是完全正确的(结果略)。

### 2.2 标记株的构建与验证

将含标记盒的载体pUC19K-NC转化到布鲁氏菌M5的感受态细胞中。用BP26-I-F + Kana-I-R组合对抗性克隆进行PCR鉴定。结果显示,挑取的克隆用鉴定引物可扩增出预期大小的产物,而野生株扩增为阴性,初步表明标记株构建是正确的(图1)。对鉴定引物扩增产物进行序列测定,结果与预期的完全一致(结果略),表明标记株的序列是正确的,抗性基因正确替换了目标基因。将标记株命名为M5 $\Delta$ BP26。

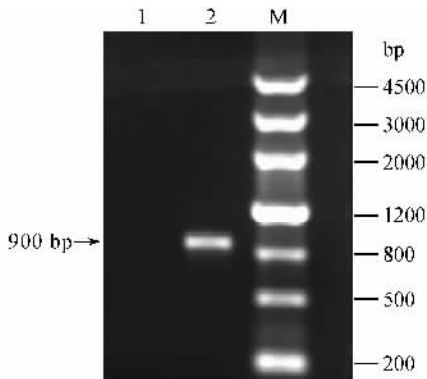


图1 标记株 M5 $\Delta$ BP26 的 PCR 鉴定结果

Fig. 1 PCR verification of M5 $\Delta$ BP26. 1. M5; 2. M5 $\Delta$ BP26; M. Marker III.

### 2.3 标记株的胞内生存能力

用野生株和标记株分别侵染巨噬细胞 J774A.1,在感染后的0、4、8、12、24和48 h裂解细胞释放出胞内的细菌,系列稀释后涂板计数。重复实验3次,计算平均值。胞内细菌计数结果显示,标记株在胞内仍能够生存。与野生株相比,标记株在胞内的生

存能力略有下降(图2)。

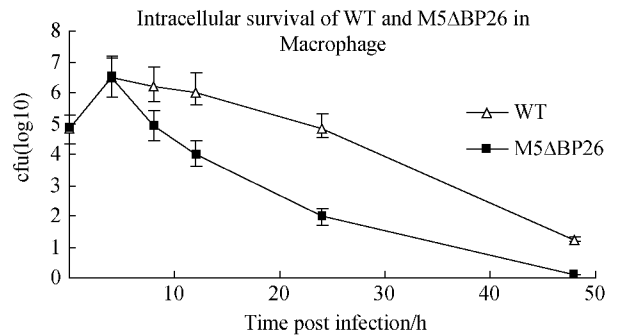


图2 标记株与野生株在胞内的存活能力

Fig. 2 Intracellular survival of wild type strain and M5 $\Delta$ BP26.

### 2.4 标记株在小鼠脾脏内的存活能力

野生株和标记株在TSB中培养至对数中期,然后按每只 $1 \times 10^7$ 的量腹腔内接种小鼠。于感染后的第1、2和3周取出小鼠的脾脏,脾脏匀浆后涂板计数。计数结果显示,野生株和标记株接种量是基本一致的,但在感染后的不同时间点,脾脏中标记株的数量少于野生株。与原疫苗株相比,标记株的感染力进一步减弱,感染后两周野生株的细菌数为 $10^{2.9}$ ,而突变株为 $10^{1.1}$  ( $P < 0.01$ ),至第3周野生株的细菌数为 $10^{2.2}$ ,而突变株未能检出(图3)。

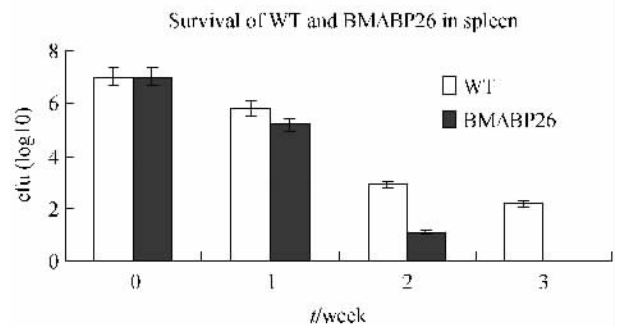


图3 标记株和野生株在小鼠脾脏内的存活

Fig. 3 Survival of wild type strain and M5 $\Delta$ BP26 in spleen.

### 2.5 标记疫苗株与野生株的鉴别 PCR

为鉴别野生株和标记株,根据被缺失的BP26的序列,在被缺失的区域内设计了一对引物BP26-F和BP26-R。用这对引物扩增,野生株能扩增出来,而标记株因该基因被缺失而不能被扩增。此外,针对布鲁氏菌的保守基因dnaK再设计了一对引物DnaK-F和DnaK-R,这对引物是野生株和标记株都能扩增出来的。利用这两对引物组成双重PCR,结果显示,野生株能够扩增出预期大小的两条带,而标记株只能扩增出一条带(图4)。

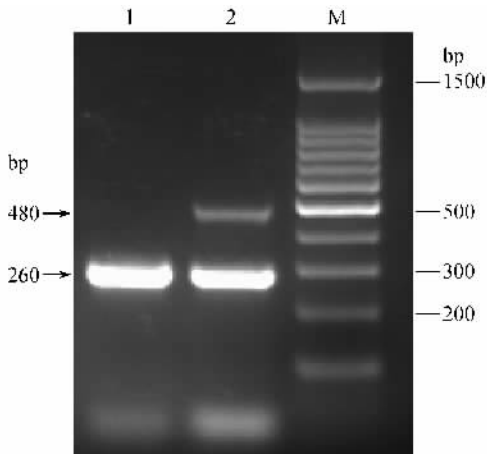


图4 双重 PCR 鉴别野生株和标记疫苗株

Fig.4 Duplex PCR for discriminating wild type strain and M5ΔBP26.

1. wild type strain ; 2. M5ΔBP26 ; M. 100bp DNA ladder.

### 3 讨论

布鲁氏菌是布鲁氏菌病的病原体,是一种胞内寄生菌。因为在胞内有极强的生存能力,使得布鲁氏菌引起的感染一旦发生,很难彻底治愈。因此,布鲁氏菌病应该重在预防,而事实也确是如此。布鲁氏菌病的预防主要是通过接种减毒活疫苗来实现的。事实证明,布鲁氏菌的减毒活疫苗是到目前为止最为有效的疫苗形式,其它疫苗方式都不能提供很好的保护效果<sup>[8-9]</sup>。但是,现有的这些减毒活疫苗仍存在的问题,包括还存在较大的毒力、会引起免疫后发病、无法在监测中区分是疫苗免疫还是自然感染等等。因此,本研究针对这些问题,对减毒活疫苗株进行基因标记改造,克服其中的一些问题。

本研究中,我们首先对布鲁氏菌减毒活疫苗株进行了缺失标记,并比较分析了其在细胞内的生存能力。从标记疫苗株和野生株感染小鼠巨噬细胞的实验结果可以看出,在刚开始的4 h内,标记株和野生株的胞内菌数呈上升趋势,4 h以后,标记疫苗株与野生株的胞内菌数均开始下降,有相同的变化趋势,但是,与野生株相比,标记疫苗株的胞内细菌数下降速度更快。这表明,我们构建的标记疫苗株仍能够在巨噬细胞内生存,但是,与野生株相比,在胞内的生存能力降低,与我们预期的结果是一致的。从小鼠体内的存活可以看出,标记疫苗株与野生株感染1周后,小鼠脾脏中的细菌数下降,而标记株下降更快,到第3周时,野生株的细菌数下降到了一个较低的水平,而标记株则消失。这说明,与野生株相比,标记株在体内的生存能力降低。

BP26 作为布鲁氏菌的一个诊断抗原基因,已得

到了广泛应用<sup>[10]</sup>。该蛋白已被用于大肠杆菌表达,用纯化的蛋白作为包被抗原建立 ELISA 的诊断方法,有较好的特异性和敏感性<sup>[11-13]</sup>。BP26 是一个周质蛋白,根据其所在的胞内定位,该蛋白可能发挥了较为重要的作用<sup>[14]</sup>。但是,到目前为止,还未见到有关 BP26 功能的报道。本研究对 BP26 进行了缺失标记,然后比较了其缺失标记株在巨噬细胞内和小鼠体内的生存能力,结果表明缺失标记疫苗株在胞内和体内的生存能力降低,提示 BP26 在布鲁氏菌的毒力,特别是胞内生存方面,发挥了一定的作用。但是,它究竟发挥了怎样的作用,还有待进一步探讨。

在本研究中,利用同源重组的方法,我们成功构建了 BP26 的缺失标记疫苗株,细胞和小鼠实验证实,标记株的毒力有一定降低,然后,根据标记株与野生株序列的差异,建立了双重鉴别 PCR 方法。基因标记疫苗株的构建及鉴别 PCR 方法的建立,为进一步进行免疫保护性评价等奠定了基础。

### 参考文献

- [1] 王玉飞,陈泽良,乔凤,等. 布鲁氏菌自杀载体的改建及其在突变株构建中的应用. 世界华人消化杂志 (*World Chinese Journal of Digestology*), 2007, 15 :2934 - 2937.
- [2] Lopez G, Escobar GI, Ayala SM, et al. Detection of antibodies to *Brucella ovis* in sheep milk using *B. ovis* and *B. canis* antigen. *Veterinary Microbiology*, 2006, 115 :232 - 238.
- [3] Munoz PM, Marin CM, Monreal D, et al. Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2005, 12 :141 - 151.
- [4] Lopez G, Ayala SM, Escobar GI, et al. Use of *Brucella canis* antigen for detection of ovine serum antibodies against *Brucella ovis*. *Veterinary Microbiology*, 2005, 105 :181 - 187.
- [5] Bosseray N, Plommet M. *Brucella suis* S2, *brucella melitensis* Rev. 1 and *Brucella abortus* S19 living vaccines: residual virulence and immunity induced against three *Brucella* species challenge strains in mice. *Vaccine*, 1990; 8 :462 - 468.
- [6] Baldi PC, Giambartolomei GH, Goldbaum FA, et al. Humoral immune response against lipopolysaccharide and cytoplasmic proteins of *Brucella abortus* in cattle vaccinated with *B. abortus* S19 or experimentally infected with *Yersinia enterocolitica* serotype O:9. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1996, 3 :472 - 476.
- [7] 乔凤,陈泽良,王玉飞,等. pUC19K 质粒的构建及其在布鲁氏菌突变株构建中的应用. 中国生物工程杂志 (*China Biotechnology*), 2007, 27 :1 - 5.

- [ 8 ] Edmonds MD , Cloeckeaert A , Elzer PH. Brucella species lacking the major outer membrane protein Omp25 are attenuated in mice and protect against Brucella melitensis and Brucella ovis. *Veterinary Microbiology* , 2002 , 88 : 205 – 201.
- [ 9 ] Izadjoo MJ , Mense MG , Bhattacharjee AK , et al. A study on the use of male animal models for developing a live vaccine for brucellosis. *Transbound Emergency Disease* , 2008 , 55 : 145 – 151.
- [ 10 ] Debbbarh HS , Zygmunt MS , Dubray G , et al. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies to the Brucella melitensis BP26 protein to evaluate antibody responses in infected and B. melitensis Rev. 1 vaccinated sheep. *Veterinary Microbiology* , 1996 ; 53 : 325 – 337.
- [ 11 ] Yang X , Walters N , Robison A , et al. Nasal immunization with recombinant Brucella melitensis bp26 and trigger factor with cholera toxin reduces B. melitensis colonization. *Vaccine* 2007 25 : 2261 – 2268.
- [ 12 ] Campos E , Cravero SL , Delgui L , et al. Brucella abortus INTA2 , a novel strain 19( Delta )bp26 : : luc ( Delta )bmp18 double mutant lacking drug resistance markers. *Veterinary Microbiology* 2002 87 : 1 – 13.
- [ 13 ] Seco-Mediavilla P , Verger JM , Grayon M , et al. Epitope mapping of the Brucella melitensis BP26 immunogenic protein : usefulness for diagnosis of sheep brucellosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* , 2003 ; 10 : 647 – 651.
- [ 14 ] Sabio YGJV , Farber M , Carrica M , et al. Expression of Babesia bovis rhopty-associated protein 1 ( RAPI ) in Brucella abortus S19. *Microbes Infection* 2008 , 10 : 635 – 641.

## Construction of BP26 tagged vaccine strain and development of discriminating PCR for *Brucella* \*

Zhoujia Wang<sup>1#</sup> , Qing Zhen<sup>2#</sup> , Feng Qiao<sup>2#</sup> , Yufei Wang<sup>1</sup> , Xinying Du<sup>1</sup> , Zhijun Zhong<sup>1</sup> , Jin Zhao<sup>1</sup> , Yaqin Yu<sup>2</sup> , Liuyu Huang<sup>1</sup> , Yansong Sun<sup>1\*</sup> , Zeliang Chen<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Disease Control and Prevention , Academy of Military Medical Science , Beijing 100071 , China )

(<sup>2</sup>School of Public Health , Key Laboratory of Zoonosis , Ministry of Education , Jilin University , Changchun 130021 , China )

**Abstract :** [ **Objective** ] The wide application of live attenuated vaccine strains is limited because of drawbacks of residual virulence , similar antigenicity to virulent strain and the difficulty to differentiate vaccination and natural infection. In this study , we modified the vaccine strain to prevent the drawbacks. [ **Methods** ] By using homologous recombination , we replaced the BP26 gene with the kanamycin gene in a live attenuated vaccine strain M5. The new tagged vaccine strain , M5ΔBP26 , was generated. The wild type strain and M5ΔBP26 were used to infect macrophage and mice to compare their intracellular survival capability. According to the conservative sequence of dnaK and the deleted region of BP26 , primers were designed to develop a duplex PCR for discriminating the wild type strain and M5ΔBP26. [ **Results** ] A new tagged strain , M5ΔBP26 , was successfully constructed. The tagged strain could survive in both macrophage and mice , indicating the feasibility as live attenuated vaccine strain. Results from mice infection showed that , at 2 weeks p. i. ,  $10^{2.9}$  CFU of Brucella were isolated from M5 infected mice , whereas only  $10^{1.1}$  CFU of Brucella were isolated from M5ΔBP26 infected mice (  $P < 0.01$  ). At 3 weeks p. i. ,  $10^{2.2}$  CFU of Brucella whereas no M5ΔBP26 were isolated. These results indicated that infection capability of M5ΔBP26 was decreased. Based on the sequence differences between M5ΔBP26 and M5 , a new discriminating duplex PCR was developed. With the duplex PCR , only one product was amplified from M5ΔBP26 , by which it can be differentiated from wild type and virulent strains. [ **Conclusion** ] The construction of tagged strain and the development of discriminating PCR provide a new candidate for further vaccine development.

**Keywords :** *Brucella* ; 26 kDa outer membrane protein ; tagged vaccine strain

( 本文责编 : 王晋芳 )

Supported by the National Natural Science Foundation of China( 30600024 ) and the National Programs for High Technology Research and Development of China ( 2007AA02Z412 )

\*Corresponding author. Tel/Fax : + 86-66948434 ; zeliangchen@yahoo.com ( Zeliang Chen ) ; suns1964@hotmail.com ( Yansong Sun )

# These authors contributed equally to this work.

Received : 2 August 2008/ Revised : 15 December 2008