

GST-HAI-1 融合蛋白的表达及抗人 HAI-1 单克隆抗体的制备

程海霞* * 曹 江* 沈建根 郑 树

(浙江大学医学院附属第二医院 杭州 310009)

摘 要 制备抗人肝细胞生长因子激活物抑制因子(HAI-1)单克隆抗体,为对 HAI-1 进行进一步的研究打下基础。将人 HAI-1 cDNA 分段克隆,构建 GST-HAI-1 融合蛋白原核表达载体,转化大肠杆菌后加 IPTG 诱导融合蛋白表达,经制备型 SDS-PAGE 法分离表达的 GST-HAI-1 融合蛋白,通过割胶、电洗脱回收融合蛋白,并以此为抗原免疫 BALB/c 小鼠,应用细胞融合技术制备产生抗人 HAI-1 单克隆抗体的杂交瘤,以 ELISA、Western blot 和免疫组织化学染色进行鉴定。最终获得抗人 HAI-1 单克隆抗体杂交瘤细胞株 ZMC6,产生的单克隆抗体可特异性地与表达的 GST-HAI-1 融合蛋白反应,并可识别大肠组织中的膜型及脱落型 HAI-1 蛋白。该单克隆抗体的制备成功,为深入研究 HAI-1 的功能提供了有力工具。

关键词 肝细胞生长因子激活物抑制因子(HAI-1),融合蛋白,单克隆抗体

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-306X(2004)04-0496-05

许多种类的生长因子都与细胞的增殖、分化、运动等生物学行为密切相关,其中肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)在正常组织的损伤后修复、细胞的运动以及肿瘤的形成、浸润和转移、分化及肿瘤血管形成中发挥重要的作用,一直是人们研究的热点^[1-5]。机体内肝细胞生长因子激活因子(hepatocyte growth factor activator, HGFA)可激活 HGF/SF 前体,使之从单链前体变为双链活性形式,是调节细胞外 HGF/SF 活性的关键步骤^[6,7]。新近发现的肝细胞生长因子激活物抑制因子 1(hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1, HAI-1)为 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制因子,可特异性地结合、抑制 HGFA,从而参与 HGF 的活性调节^[8,9]。

HAI-1 基因定位于人染色体 15q15,包括 11 个外显子,其 cDNA 编码区为 1539bp,翻译产物由 513 氨基酸残基组成,如图 1 所示,N 端 35 个氨基酸残基为信号肽(signal peptide, SP),另外还有两个被一个低密度脂蛋白受体样结构(LDLR)分开的 Kunitz 功能域(Kunitz domain, KD),可定位于细胞膜上,也可以被水解后从膜上脱落^[8,10,11]。

关于 HAI-1 生物学功能已有了一些报道,最近的研究结果表明 HAI-1 有可能参与肿瘤转移过程^[12,13],但这一假设目前仍缺乏有力的实验证据,更多的研究工作还有待人们去开展。许多蛋白质功能方面的研究均需要特异性抗体作为工具,因此为了能够深入研究 HAI-1 的功能,我们采用了在大肠杆菌中表达 GST-HAI-1 融合蛋白的手段获得了抗原,并在此基础上运用杂交瘤技术成功地制备了高效价、高特异性的抗人 HAI-1 单克隆抗体。

1 材料和方法

1.1 材料

各种限制酶(Invitrogen 公司),T4-DNA 连接酶(Promega 公司),带人 HAI-1 全长 cDNA 的质粒 pUC19-HAI-1(由日本东京科技大学 Naomi Kitamura 教授惠赠),大肠杆菌菌株 P2392(Stratagene 公司),pGEX-5X-1、pGEX-5X-2 载体(Pharmacia 公司),SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞(浙江大学免疫研究所提供),BALB/c 小鼠(上海 BK 实验动物中心),RPMI-1640、PEG400(日本制药株式会社),小牛血清(杭州四季

收稿日期 2004-12-26,修回日期 2004-03-22。

基金项目 国家自然科学基金(No.30271450)浙江省自然科学基金(No.300466)教育部回国人员启动基金、教育部高校骨干教师基金。

* 通讯作者。Tel:86-571-87784527; Fax:86-571-87214404; E-mail:caoj@zju.edu.cn

* * 现工作单位:上海市第一人民医院。

青生物工程材料研究所), GST(Sigma 公司), HRP-羊抗鼠 IgG(北京中山生物技术有限公司), 化学发光检测试剂盒 ECL(Pharmacia 公司), 免疫组化染色超敏试剂盒 UltraSensitive™ S-P Kit(福州迈新生物技术开发公司)。

1.2 方法

1.2.1 HAI-1 分段融合蛋白表达质粒的构建 :人的 HAI-1 全长 cDNA 编码蛋白的主要功能域及部分酶切位点示意图见图 1。在预实验中, 我们曾将人 HAI-1 全长 cDNA 用于 GST 融合蛋白表达载体的构建(开放阅读框完全吻合), 但在诱导后未获得融合蛋白的表达, 因此我们设计将 HAI-1 全长 cDNA 分成前后重叠的两个片段(覆盖 HAI-1 全长)用于构建融合蛋白表达载体(开放阅读框吻合), 将 pUC19-HAI-1 和 pGEX-5X-2 均以 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切, 酶切产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 分别切取 1.7kb 的 HAI-1 cDNA 片段和 4.9kb 的载体条带, 按照说明以 QIAquick Gel Extraction Kit 回收, 以 T4 DNA 连接酶将载体和片段于 16℃ 连接过夜。另将 pUC19-HAI-1 和 pGEX-5X-1 也均以 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切, 同法进行电泳分离、割胶回收 1.4kb 的 HAI-1 cDNA 片段和 4.9kb 的载体条带并进行连接。将连接产物转化 *E. coli* P2392 感受态菌, 在含氨苄青霉素(50μg/mL)的 LB 平板上筛选阳性克隆, 少量提取质粒, 双酶切、琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.2 GST-HAI-1 融合蛋白的诱导表达 :分别挑取 pGEX-5X-2-HAI-1 和 pGEX-5X-1-HAI-1 转化克隆于液体 LB 培养基(含氨苄青霉素 50μg/mL)中, 37℃ 振荡培养过夜, 次日取出, 按 1:50 比例, 将培养产物转接到 7mL 新鲜的液体 LB 培养基(含氨苄青霉素 50μg/mL)二管中, 37℃、300r/min 摇床培养 2h, 一管取出作为阴性对照, 另一管加终浓度为 1mmol/L 的 IPTG 诱导表达, 再经 37℃ 振荡培养 2h, 4℃ 5000g 离心 10min 收集细菌, 重悬于 PBS 中, 10% SDS-PAGE 检测融合蛋白的表达。另经制备型 SDS-PAGE、割胶、电洗脱回收融合蛋白, PBS 中透析 24h, 冷冻干燥后 -20℃ 保存备用。

1.2.3 HAI-1 单克隆抗体的制备 :将上述回收的两种 GST-HAI-1 融合蛋白混合后作为抗原, 首次免疫将 GST-HAI-1 融合蛋白以福氏完全佐剂乳化, 第二、三次以福氏不完全佐剂乳化, 每鼠 0.2mL(含 GST-HAI-1 融合蛋白 50μg), 背部皮内多点注射, 每周 1 次, 共 3 次, 一月后再加强免疫 1 次。取免疫后小鼠脾细胞 10^8 个与 10^7 个 SP2/0 骨髓瘤细胞混合, 逐滴

缓慢加入 50% PEG4000, 静置 30s, 加入无血清培养液终止融合, 离心弃上清, 重悬于 10mL HAT 中, 接种于 96 孔板培养, 经 HAT 选择性培养液筛选融合的杂交瘤细胞, 用 ELISA 方法以 P2392 细菌蛋白、GST 蛋白和 GST-HAI-1 融合蛋白筛选, 选择抗 HAI-1 阳性而抗 GST 和 P2392 细胞蛋白均阴性的杂交瘤细胞经克隆化培养并建株。BALB/C 小鼠在腹腔注射石蜡油后, 每只小鼠接种 5×10^5 阳性杂交瘤细胞, 获得含 HAI-1 单克隆抗体的小鼠腹水, 间接 ELISA 法检测腹水单抗效价。

1.2.4 免疫印迹(Western blot) :将上述大肠杆菌诱导表达的 GST-HAI-1 融合蛋白样品以及人正常大肠组织、肠癌组织蛋白样品(组织在液氮中研碎, 以适量 PBS 混匀, 加入等体积的 $2 \times$ 蛋白提取液(30mmol/L NaCl, 20mmol/L Tris-HCl, pH7.2, 10mmol/L EDTA, 2%(V/V) Triton X-100, 10%(V/V) glycerol, 4%(W/V) SDS, 震荡、沸水煮交替共 10min, 14000r/min 离心 30min, 取上清)分别进行 10% SDS-PAGE, 并在 250mA 下转移 2h 至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭后应用上述制备的 HAI-1 单克隆抗体为一抗(1:500), HRP-羊抗鼠 IgG 为二抗(1:1000)进行常规反应, 最后用 ECL 试剂盒按照说明显带、曝光。

1.2.5 免疫组织化学染色 :取人正常大肠组织石蜡切片, 60℃ 烘箱过夜, 再经常规脱蜡、梯度水化后, 使用超敏 S-P 试剂盒, 按试剂盒说明利用上述单克隆抗体进行免疫组织化学染色, 苏木素复染, 干燥后中性树胶封固, 镜下观察。

2 结果和讨论

2.1 GST-HAI-1 融合蛋白原核表达载体的构建

1.7kb 的 HAI-1 cDNA 片段(*EcoR* I / *Bam*H I) 和 1.4kb 的 HAI-1 cDNA(*EcoR* I / *Xho* I) 分别插入 pGEX-5X-2 和 pGEX-5X-1 的相应位点后(开放阅读框完全吻合)的酶切鉴定结果见图 2, 表明载体构建正确。

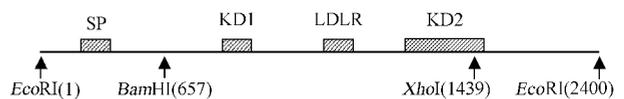


图 1 HAI-1 全长 cDNA 编码的主要功能域及部分酶切位点示意图

Fig.1 Functional domains and some restrictive sites on full length cDNA of HAI-1

SP : signal peptide ; KD1 , KD2 : Kunitz domains ;

LDLR : low density lipoprotein receptor-like domain

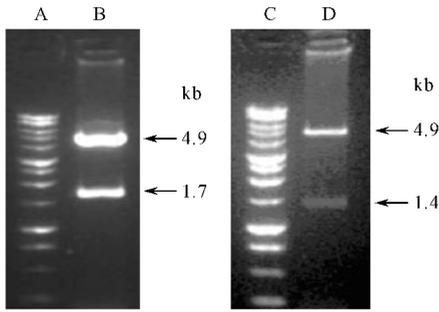


图 2 pGEX-5X-2-HAI-1 和 pGEX-5X-1-HAI-1 表达质粒的酶切鉴定

Fig.2 Restriction endonuclease digestion of pGEX-5X-2-HAI-1 and pGEX-5X-1-HAI-1

A, C: 1kb DNA ladder; B: pGEX-5X-2-HAI-1 digested with *EcoRI* and *BamHI*; D: pGEX-5X-1-HAI-1 digested with *EcoRI* and *XhoI*

2.2 GST-HAI-1 融合蛋白的诱导表达

带有上述融合蛋白表达载体的细菌以 IPTG 诱导 GST-HAI-1 融合蛋白表达,以未转化菌和带空载体细菌作对照,进行 10% SDS-PAGE 检测融合蛋白的表达情况。结果带有融合蛋白表达载体的细菌分别在约 65kD 处(图 3)和约 72kD 处(图 4)可见诱导后表达的蛋白条带,而带空载体的细菌亦在诱导后于约 26kD 处有相应的 GST 蛋白表达。这表明 GST-HAI-1 融合蛋白表达是成功的。

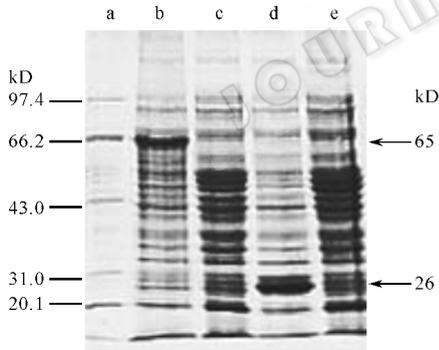


图 3 GST-HAI-1 融合蛋白诱导表达(10% SDS-PAGE)

Fig.3 Induced expression of GST-HAI-1 fusion protein(10% SDS-PAGE)

a: low molecular weight protein standard; b: pGEX-5X-2-HAI-1 transformed *E. coli* 2392, induced with IPTG for 2h; c: pGEX-5X-2-HAI-1 transformed *E. coli* 2392, non-induced; d: pGEX-5X-2 transformed *E. coli* 2392; induced with IPTG for 2h; e: pGEX-5X-2 transformed *E. coli* 2392 non-induced

2.3 HAI-1 单克隆抗体的制备及 Western blot 鉴定

以回收的两种 GST-HAI-1 融合蛋白混合后免疫 BALB/c 小鼠,经细胞融合、筛选及克隆化培养,获得可产生特异性抗人 HAI-1 抗体的杂交瘤细胞一株,命名为 ZMC6。经腹腔接种小鼠后产生腹水,ELISA

间接法测得腹水效价为 1:262,144。以此 HAI-1 抗体进行 Western blot 检测,结果表明在带有 GST-HAI-1 融合蛋白表达载体的细菌经诱导后分别在约 65kD 和约 72kD 处有阳性条带,与预期完全一致,且无明显杂带(图 5)。在正常大肠及大肠癌组织中,出现两条阳性条带,分别对应于膜型(约 60kD)和脱落型(约 50kD)HAI-1 蛋白,亦无明显杂带(图 6)。

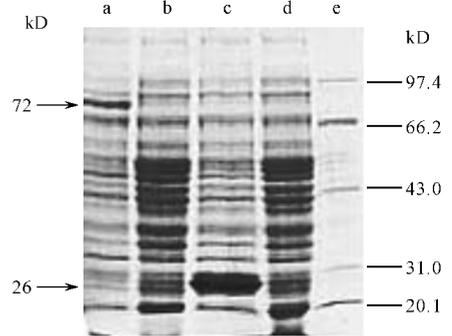


图 4 GST-HAI-1 融合蛋白诱导表达(10% SDS-PAGE)

Fig.4 Induced expression of GST-HAI-1 fusion protein(10% SDS-PAGE)

a: pGEX-5X-1-HAI-1 transformed *E. coli* 2392, induced with IPTG for 2h; b: pGEX-5X-1-HAI-1 transformed *E. coli* 2392, non-induced; c: pGEX-5X-1 transformed *E. coli* 2392, induced with IPTG for 2h; d: pGEX-5X-1 transformed *E. coli* 2392, non-induced; e: low molecular weight protein standard

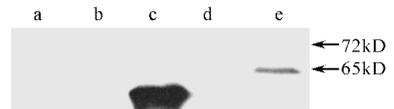


图 5 大肠杆菌表达蛋白中 HAI-1 检测(Western blot)

Fig.5 Western blot analysis of HAI-1 in *E. coli* expressed proteins

a: *E. coli* P2392; b: pGEX-5X-2 transformed *E. coli* P2392; c: pGEX-5X-2-HAI-1 transformed *E. coli* P2392; induced with IPTG for 2h; d: pGEX-5X-1 transformed *E. coli* P2392; e: pGEX-5X-1-HAI-1 transformed *E. coli* P2392 induced with IPTG for 2h

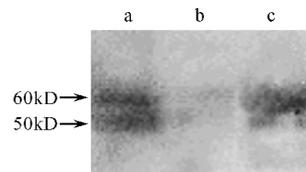


图 6 正常大肠和大肠癌组织中 HAI-1 检测(Western blot)

Fig.6 Western blot analysis of HAI-1 expression in normal and cancerous tissues

a: one normal colorectal tissue; b, c: two different colorectal cancer tissues

2.4 HAI-1 McAb 的免疫组化鉴定

我们利用上述制备的抗人 HAI-1 单克隆抗体,

对人正常大肠组织进行免疫组织化学染色。结果显示(图7),大肠粘膜表面的上皮细胞的基底、侧面的细胞膜上有强阳性信号,这与 HAI-1 的组织细胞定位特性完全相符^[14]。

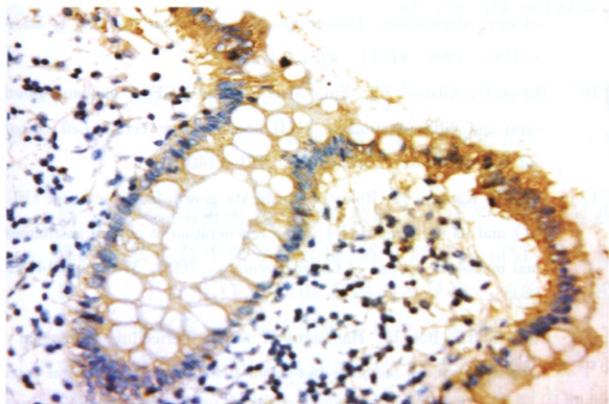


图7 人正常大肠粘膜的 HAI-1 免疫组织化学染色(棕色示阳性染色)

Fig.7 Immunohistochemical staining of HAI-1 in human normal mucosa (brown color shows positive staining)

随着人类基因组计划的快速进展,人们对基因的研究重点已从基因本身的结构分析逐渐转向基因产物蛋白质的研究。HGF/SF 是一种血源性的生长因子,通过其细胞膜表面受体、原癌基因 c-met 产物 c-MET 蛋白发挥重要的作用^[15,16]。作为一种新近发现的 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制因子,HAI-1 可以通过特异性地抑制 HGFA 来调节 HGF 的活性,从而可能参与正常细胞的分化、组织的损伤后修复以及肿瘤细胞的生长、侵袭和转移等过程^[13,17-20],因此全面透彻地研究 HAI-1 对了解肿瘤的发生和发展有重要意义。

特异性抗体则是进行蛋白质功能研究必不可少的一个工具。要制备特异性抗体,必须要有高纯度的抗原。我们选择了采用基因工程手段,在大肠杆菌中表达 GST-HAI-1 融合蛋白的方式来获得 HAI-1 抗原。在预实验中,我们试图在大肠杆菌中表达包括全长 HAI-1 的融合蛋白,但未获成功。考虑到全长 HAI-1 蛋白分子量较大,可能是表达失败的原因,我们在本研究中将 HAI-1 序列分成前后两段(覆盖从 N 端到 C 端的全长 HAI-1),分别克隆后得以成功表达。这两种融合蛋白分别分离纯化后混合起来即可作为 HAI-1 抗原免疫动物。

在分离纯化 GST 融合蛋白的方式选择上,首选的是谷胱甘肽-Sepharose 4B 亲和层析,但应用这个方法的前提是融合蛋白必须是可溶的。我们表达的两种 GST-HAI-1 融合蛋白均为不可溶性(结果未列

出),因此我们采取了另一种简单的制备型 SDS-PAGE 电泳分离、电洗脱回收的方法。由此得到的纯化蛋白实际上是变性蛋白,但用作抗原来免疫动物则是完全可行的。

本研究的结果表明,我们制备的 HAI-1 单克隆抗体特异性良好,既可用于检测变性的 HAI-1 蛋白(Western blot),也可用于检测天然的 HAI-1 蛋白(免疫组织化学染色)。这也说明了该单抗所针对的抗原决定簇可能暴露于天然 HAI-1 蛋白的外部而非隐藏于其内部。由于原核表达的两种融合蛋白均可被该抗体识别,而这两种融合蛋白的共有部分为从 KD1 到 KD2 的区域,所以抗原决定簇应该位于 KD1 到 KD2 这一区域。本研究的结果不仅为今后进一步研究 HAI-1 在各种人组织中的表达以及 HAI-1 的其它生物学功能(如采用免疫共沉淀技术检测与 HAI-1 相互作用的蛋白质等)提供了一个强有力的工具,也为全面阐明 HAI-1 在正常及肿瘤的发生和发展中可能发挥的作用及机制打下了基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Miyazawa K, Shimomura T, Naka D *et al.* Proteolytic activation of hepatocyte growth factor in response to tissue injury. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, **269**(12): 8966 - 8970
- [2] Bellusci S, Moens G, Gaudino G *et al.* Creation of a hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine loop in carcinoma cells induces invasive properties associated with increased tumorigenicity. *Oncogene*, 1994, **9**:1091 - 1099
- [3] Nakamura T, Matsumoto K, Kiritoshi A *et al.* Induction of hepatocyte growth factor in fibroblasts by tumor-derived factors affects invasive growth of tumor cells: *in vitro* analysis of tumor-stromal interactions. *Cancer Research*, 1997, **57**(15): 3305 - 3313
- [4] Lamszus K, Jin L, Fuchs A *et al.* Scatter factor stimulates tumor growth and tumor angiogenesis in human breast cancers in the mammary fat pads of nude mice. *Laboratory Investigation*, 1997, **76**(3): 339 - 353
- [5] Kataoka H, Hamasuna R, Itoh H *et al.* Activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in colorectal carcinoma. *Cancer Research*, 2000, **60**(21): 6148 - 6159
- [6] Miyazawa K, Shimomura T, Kitamura A *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, **268**(14): 10024 - 10028
- [7] Miyazawa K, Shimomura T, Kitamura N. Activation of hepatocyte growth factor in the injured tissues is mediated by hepatocyte growth factor activator. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, **271**(7): 3615 - 3618
- [8] Shimomura T, Denda K, Kitamura A *et al.* Hepatocyte growth factor activator inhibitor, a novel Kunitz-type serine protease inhibitor.

- Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**(10): 6370 – 6376
- [9] Kataoka H, Shimomura T, Kawaguchi T *et al.* Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 is a specific cell surface binding protein of hepatocyte growth factor activator (HGFA) and regulates HGFA activity in the pericellular microenvironment. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**(51): 40453 – 40462
- [10] Itoh H, Yamauchi M, Kataoka H *et al.* Genomic structure and chromosomal localization of the human hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 and 2 genes. *European Journal of Biochemistry*, 2000, **267**(11): 3351 – 3359
- [11] Denda K, Shimomura T, Kawaguchi T *et al.* Functional characterization of Kunitz domains in hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, **277**(16): 14053 – 14059
- [12] Oberst MD, Johnson MD, Dickson RB *et al.* Expression of the serine protease matriptase and its inhibitor HAI – 1 in epithelial ovarian cancer: correlation with clinical outcome and tumor clinicopathological parameters. *Clin Cancer Research*, 2002, **8**(4): 1101 – 1107
- [13] Kataoka H, Miyata S, Uchinokura S *et al.* Roles of hepatocyte growth factor (HGF) activator and HGF activator inhibitor in the pericellular activation of HGF/scatter factor. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2003, **22**(2~3): 223 – 236
- [14] Kataoka H, Suganuma T, Shimomura T *et al.* Distribution of hepatocyte growth factor activator inhibitor type I (HAI-1) in human tissues. Cellular surface localization of HAI-1 in simple columnar epithelium and its modulated expression in injured and regenerative tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1999, **47**(5): 673 – 682
- [15] Rong S, Segal S, Anver M *et al.* Invasiveness and metastasis of NIH3T3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1994, **91**(11): 4731 – 4735
- [16] Ronen D, Altstock RT, Firon M *et al.* Met-HGF/SF mediates growth arrest and differentiation in T47D breast cancer cells. *Cell Growth and Differentiation*, 1999, **10**(2): 131 – 140
- [17] Itoh H, Kataoka H. Roles of hepatocyte growth factor activator (HGFA) and its inhibitor HAI-1 in the regeneration of injured gastrointestinal mucosa. *Journal of Gastroenterology*, 2002, **37**(Suppl. 14): 15 – 21
- [18] Kataoka H, Itoh H, Hamasuna R *et al.* Pericellular activation of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) in colorectal carcinomas: roles of HGF activator (HGFA) and HGFA inhibitor type 1 (HAI-1). *Human Cell*, 2001, **14**(1): 83 – 93
- [19] Parr C, Jiang WG. Expression of hepatocyte growth factor/scatter factor, its activator, inhibitors and the c-Met receptor in human cancer cells. *International Journal of Oncology*, 2001, **19**(4): 857 – 863
- [20] Nagata K, Hirono S, Ido A *et al.* Expression of hepatocyte growth factor activator and hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 in human hepatocellular carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, **289**(1): 205 – 211

Expression of GST-HAI-1 Fusion Protein and Development of Monoclonal Antibody Against Human Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor 1

CHEN Hai-Xia* * CAO Jiang* SHEN Jian-Gen ZHENG Shu

(2nd Affiliated Hospital, Zhejiang University College of Medicine, Hangzhou 310009, China)

Abstract The aim of this study is to develop monoclonal antibody against human hepatocyte growth factor activator inhibitor 1 (HAI-1) for future study of HAI-1. The cDNA fragments of human hepatocyte growth factor activator inhibitor 1 (HAI-1) were subcloned to construct GST-HAI-1 fusion protein expression vectors. The vectors were transformed into *E. coli* and fusion protein expression was induced by IPTG. The GST-HAI-1 fusion proteins were separated on preparative SDS-PAGE and recovered by electroelution, and used to immunize BALB/c mice. Hybridomas producing monoclonal antibodies against human HAI-1 were prepared by cell fusion technique and characterized by ELISA, Western Blot and immunohistochemical staining. One hybridoma cell line, ZMC6, was obtained, which produces specific antibody against the expressed GST-HAI-1 fusion protein. The monoclonal antibody recognizes both the membrane-type and secretory-type HAI-1 proteins of colorectal tissue. The successful development of anti-HAI-1 antibody provides a powerful tool for further investigation on HAI-1's function.

Key words hepatocyte growth factor activator inhibitor 1 (HAI-1), fusion protein, monoclonal antibody

Received: 12-26-2003

This work was supported by grants from National Natural Science Foundation (No. 30271450), Zhejiang Natural Science Foundation (No. 300466) and State Ministry of Education.

* Corresponding author. Tel: 86-571-87784527; Fax: 86-571-87214404; E-mail: caoj@zju.edu.cn

* * Current address: First People's Hospital, Shanghai

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>