

·实验研究·

[文章编号] 1007-3949(2004)12-03-0296-05

细菌内同源重组构建和制备含过氧化氢酶基因的重组腺病毒

孙跃玲¹, 涂远超³, 王家宁², 黄永章², 黄从新⁴

(邵阳医学院 1. 附属太和医院心血管内科, 2. 附属人民医院临床医学研究所, 湖北省十堰市 442000;

3. 湖北省新华医院, 湖北省武汉市 430015; 4. 武汉大学人民医院, 湖北省武汉市 430060)

[关键词] 生物工程; 构建和制备含过氧化氢酶基因的重组腺病毒; 同源重组; 细菌; 过氧化氢酶; 基因; 质粒

[摘要] 利用细菌内同源重组法构建制备含过氧化氢酶基因的重组腺病毒。先自过氧化氢酶质粒载体 pZeoSV2-Cat 中酶切出过氧化氢酶 cDNA, 亚克隆至腺病毒穿梭质粒 pShuttle-CMV 中, 形成转移质粒 pShuttle-CMV-Cat, 再转化含 pAdEasy-1 的超感受态大肠杆菌 BJ5183, 采用细菌内同源重组法构建重组腺病毒质粒 pAdEasy-1-Cat; 用 Pac I 酶切线性化 pAdEasy-1-Cat, 转染 Ad-293 细胞, 包装成重组腺病毒颗粒; 用氯化铯超速梯度离心纯化获取高滴度的重组腺病毒 AdCat。结果发现, 线性化的 pShuttle-CMV-Cat 转化含 pAdEasy-1 的超感受态大肠杆菌 BJ5183, 24 h 后获得了 30% 阳性重组质粒克隆, 经酶切鉴定说明 pAdEasy-1-Cat 构建成功。重组质粒经 Ad-293 细胞包装后产生的重组腺病毒经聚合酶链反应检测表明含有目的基因。氯化铯纯化获取的重组腺病毒滴度为 4.12×10^{15} OPU/L。说明应用细菌内同源重组能快速构建含过氧化氢酶基因的重组腺病毒载体 pAdEasy-1-Cat, 可高效制备均一的高滴度重组腺病毒。

[中图分类号] Q78

[文献标识码] A

Preparation of Catalase-Contained Recombinant Adenovirus by the Homologous Recombination in Bacteria

SUN Yue-Ling¹, TU Yuan-Chao³, WANG Jia-Ning², HUANG Yong-Zhang², and HUANG Cong-Xin⁴

(1. Department of Cardiology, Taihe Hospital; 2. Institute of Clinical Medicine, Renmin Hospital, Yunyang Medical College, Shiyan, Hubei Province 442000; 3. Hubei Province Xinhua Hospital, Wuhan 430015; 4. Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

[KEY WORDS] Homologous Recombination; Recombinant Adenovirus; Catalase; Gene; Bacterium

[ABSTRACT] **Aim** To prepare catalase-contained recombinant adenovirus. **Methods** Catalase gene was digested from plasmid of pZeoSV2-Cat, subcloned into plasmid of pBluescript II sk(+) and formed plasmid of pBluescript II sk(+)-Cat.

Then Catalase gene was digested from plasmid of pBluescript II sk(+)-Cat, subcloned into shuttle plasmid of pShuttle-CMV and formed transfer plasmid of pShuttle-CMV-Cat. Adenovirus genomic plasmid of pAdEasy-1 was transformed into BJ5183 bacteria and prepared ultracompetent BJ5183 containing pAdEasy-1. pShuttle-CMV-Cat was linearized with Pme I and transformed into ultracompetent BJ5183 containing pAdEasy-1. The identified recombinant adenovirus plasmid of pAdEasy-1-Cat was linearized with Pac I and transfected into Ad-293 cells to package recombinant adenovirus particles. The target gene was detected by PCR.

Results The linearized pShuttle-CMV-Cat was transformed into ultracompetent BJ5183 containing pAdEasy-1. There were 30% positive recombinant plasmid. After pAdEasy-1-Cat was transfected into Ad-293 cells, recombinant adenovirus particles were produced and further amplified. PCR test indicated that the recombinant adenovirus AdCat contained Catalase gene. The titer of the purified AdCat was 4.12×10^{15} OPU/L.

Conclusion The homologous recombination in bacteria is a convenient and high efficient method to prepare AdCat. This affords a good gene transfer vector for the gene therapy in restenosis.

随着分子生物学技术的成熟和对疾病分子基因水平的研究, 基因治疗是治疗许多疾病的趋势。选择高效的载体介导其体内外转移变得更加重要。腺病毒是目前人类疾病基因治疗研究中使用较多的载体之一^[1-4]。但传统的重组腺病毒载体所用的

细胞内同源重组的制备方法操作繁琐、费时, 且成功率低。再狭窄是影响经皮腔内冠状动脉成形术 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 远期疗效的主要障碍。活性氧在 PTCA 术后再狭窄的发生发展中起了重要作用。活性氧 (主要是 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot -}$) 已被证明可以增加血管平滑肌细胞增殖^[5-6]。而过氧化氢酶 (catalase) 是 H_2O_2 清除剂。腺病毒载体介导的过氧化氢酶基因转染能增强过氧化氢酶的表达, 阻止血管平滑肌细胞增殖, 促进血管平滑肌细胞凋亡^[8]。可能对再狭窄的防治有积极作用。我们

[收稿日期] 2003-10-15 [修回日期] 2004-04-02

[基金项目] 湖北省科技攻关项目 (2001AA307B07) 资助

[作者简介] 孙跃玲, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为介入心脏病学。涂远超, 硕士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为介入心脏病学。王家宁, 博士, 副主任医师, 本文通讯作者, 研究方向为心血管疾病的分子生物学。黄从新, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为介入心脏病学。

利用细菌内同源重组快速高效构建了携带过氧化氢酶基因(catalase gene)的重组腺病毒载体,为用过氧化氢酶基因进行再狭窄的防治打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

各种限制内切酶 Not I、Hind III、Kpn I、Pme I 和 Pac I、T4 DNA 连接酶及牛小肠碱性磷酸酶为新英格兰 BioLabs 公司产品。Taq 酶购自 Promega 公司。细菌同源重组系统,包括腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1、穿梭质粒 pShuttle-CMV、质粒 pBluescript II sk(+),大肠杆菌 BJ5183、XL-10 Gold 菌,以及 Ad-293 细胞购自 Stratagene 公司。脂质体 polyfect 购自德国 QIAGEN 公司。扩增目的基因 Catalase 的引物为:上游引物 5'-TTAATCCATTCCGATCTGACC-3'(长 881~900 bp),下游引物 5'-GGCGGTGACTGTCAGGATAG-3'(长 1 071~1 090 bp),由北京赛百盛生物公司合成。携带外源基因 catalase 的质粒载体 pZeoSV2-Cat 由美国西奈山医学院药理及生物化学系白景香博士惠赠,大肠杆菌 DH5 α 为邵阳医学院临床医学研究所保存。

1.2 重组腺病毒制备构建流程

重组腺病毒制备构建流程见图 1。

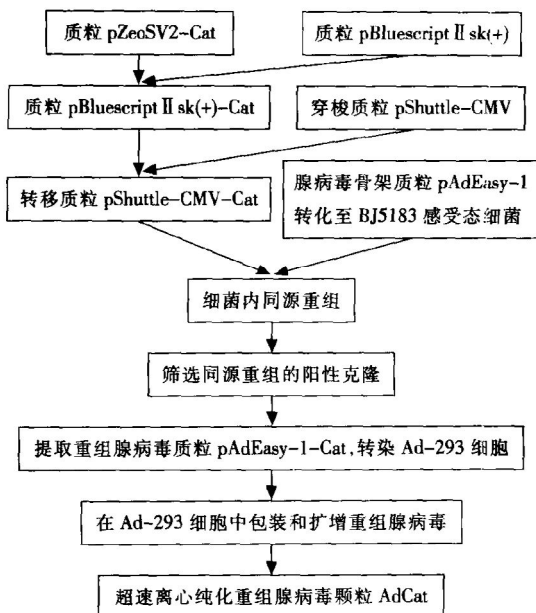


图 1. 重组腺病毒制备构建流程

1.3 过氧化氢酶基因亚克隆至腺病毒穿梭质粒

1.3.1 过氧化氢酶基因亚克隆至质粒 pBluescript II sk(+)

携带外源基因 catalase 的质粒载体

pZeoSV2-Cat 经 Hind III 和 Not I 双酶切出含 1 464 bp 目的基因 catalase 的片段,质粒 pBluescript II sk(+) 经 Hind III 和 Not I 双酶切出 2 950 bp 的大片段。1.2% 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收目的片段,将 catalase 基因定向克隆入质粒 pBluescript II sk(+) 中,形成质粒 pBluescript II sk(+)-Cat。经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳酶切鉴定。

1.3.2 将过氧化氢酶基因亚克隆至腺病毒穿梭质粒

pBluescript II sk(+)-Cat 质粒经 Kpn I 和 Not I 双酶切出含 1 464 bp 目的基因 catalase 的片段。腺病毒穿梭质粒 pShuttle-CMV 经 Kpn I 和 Not I 双酶切出 7 487 bp 目的片段。1.2% 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收目的片段,将 catalase 基因定向克隆入腺病毒穿梭质粒 pShuttle-CMV 中,形成 pShuttle-CMV-Cat。经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳酶切鉴定。

1.4 细菌内同源重组产生重组腺病毒质粒

1.4.1 含 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态菌制备

按 Sambrook 等^[9]方法制备高效感受态 BJ5183 菌,取 1 μ L pAdEasy-1 转化至新鲜制备的 BJ5183 感受态菌中,在 Amp+ LB 平板上 37℃ 倒置培养 24 h。挑选 LB 平板上的菌落,用碱裂解法小量制备质粒 pAdEasy-1。用限制性内切酶 Pac I 酶切,经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。大量培养含 pAdEasy-1 的 BJ5183 菌 3 h,制备高效含 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态菌。

1.4.2 大肠杆菌 XL-10- Gold 感受态菌制备

按分子克隆方法制备高效大肠杆菌 XL-10- Gold 感受态菌。

1.4.3 细菌内同源重组产生重组腺病毒质粒

取 pShuttle-CMV-Cat 用 Pme I 线性化后,用碱性磷酸酶去磷酸化,1.2% 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收目的片段,取线性化 pShuttle-CMV-Cat 转化至新鲜制备的含 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态细菌中。在 Kan+ LB 平板上 37℃ 倒置培养 24 h,筛选同源重组的阳性克隆。含重组质粒的 BJ5183 菌可在 Kan+ LB 平板上生长形成克隆。挑选转化的 Kan+ LB 平板上的 3 个最小菌落,碱裂解法小量抽提质粒。限制性内切酶 Pac I 酶切后进行酶切鉴定。重组腺病毒质粒命名为 pAdEasy-1-Cat。将小量抽提重组腺病毒质粒 pAdEasy-1-Cat 转化入 XL-10- Gold 感受态菌中,在 Kan+ 含 NZY+ 的培养基平板上 37℃ 倒置培养 24 h。挑选平板上的菌落,小量培养重组腺病毒质粒 pAdEasy-1-Cat。大量培养重组腺病毒质粒 pAdEasy-1-Cat。用限制性内切酶 Pac I 酶切,经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。大量提取重组腺病毒质粒 pAd

Easy-1-Cat。

1.5 对重组腺病毒质粒 pAdEasy-1-Cat 的 PCR 鉴定

以重组腺病毒质粒 pAdEasy-1-Cat DNA 为模板,以扩增目的基因 catalase 的引物进行 PCR 反应。PCR 反应参数为:95℃预变性 5 min 后,94℃变性 20 s→56℃退火 30 s→72℃延伸 30 s,共 30 个循环,72℃ 10 min。

1.6 重组腺病毒载体在 Ad-293 细胞的包装、病毒纯化和滴度测定

用 10% FCS 的 DMEM 培养基培养 Ad-293 细胞,当细胞生长达到 70%~80% 汇合时进行传代(1:10)。取部分大量提取重组腺病毒质粒 pAd Easy-1-Cat,用 Pac I 酶切使之线性化,暴露反转录末端重复序列。随后取 4 μg Pac I 线性化的 pAd Easy-1-Cat 质粒,在脂质体 polyfect 介导下转染 Ad-293 细胞。在 Ad-293 细胞出现典型细胞病变效应后收集细胞。在 37℃/-80℃反复冻融 3 次,7.5 kr/min 离心 5 min,收集含重组腺病毒的上清。取含重组腺病毒的上清再次感染 Ad-293 细胞以扩增重组病毒。离心收集病毒上清。在 12 mL 离心管内分别加入 1.35 kg/L CsCl、1.25 kg/L CsCl、病毒上清,在超速冷冻离心机上 4℃ 35 kr/min 离心 2 h。经两次 CsCl 法纯化,将超速离心所得重组腺病毒装入透析袋,置于装有 600 mL 透析液(10 mmol/L pH 8.0 Tris, 1 mmol/L MgCl₂, 10% Glycerol)的烧杯中,4℃搅拌透析 24 h;换新透析液,重复 1 次,即可除去 CsCl,获得高滴度纯化的重组腺病毒颗粒。倍比稀释病毒上清,用紫外分光光度计测 260 nm 处吸光值来测病毒滴度。病毒滴度 OPU(Optical Partical Units)/L = A₂₆₀ × 1.1 × 10¹⁵ × 病毒上清稀释倍数^[10]。重组腺病毒颗粒命名为 AdCat。

1.7 对重组腺病毒 AdCat 的鉴定

提取重组腺病毒 AdCat DNA 为模板,以扩增目的基因 Catalase 的引物进行 PCR 反应。PCR 反应参数为:95℃变性 2 min 后,94℃变性 15 s→55℃退火 15 s→72℃延伸 90 s,共 30 个循环。

2 结果

2.1 质粒 pBluescript II sk(+) -Cat 构建及鉴定

目的基因 catalase 自载体 pZeoSV2-Cat 切下后亚克隆至 pBluescript II sk(+) 中,形成 pBluescript II sk(+) -Cat。经 Hind III 和 Not I 双酶切鉴定,可见有相同大小的约 1 464 bp 的插入片段(图 2, Figure 2)。

2.2 穿梭载体 pShuttle-CMV-Cat 构建及鉴定

目的基因 catalase 自载体 pBluescript II sk(+) -Cat 切下后亚克隆至 pShuttle-CMV 中,形成 pShuttle-CMV-Cat。经 Kpn I 和 Not I 双酶切鉴定,可见有相同大小的约 1 500 bp 的插入片段(图 2, Figure 2)。

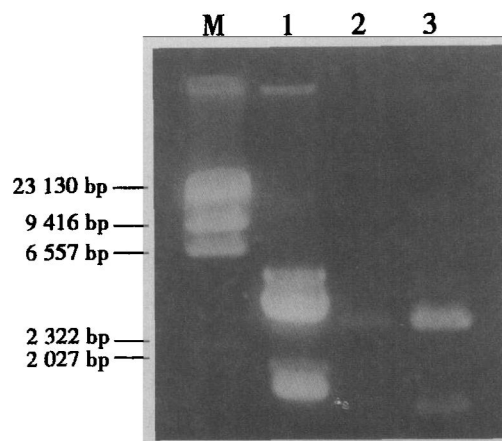


图 2. 质粒 pBluescript II sk(+) -Cat 的酶切鉴定图 M 为参照标记,1 为 pZeoSV2-Cat (Hind III + Not I) (3 568 bp 和 1 464 bp), 2 为 pBluescript II sk(+) (Hind III + Not I) (2 951 bp 和 49 bp), 3 为 pBluescript II sk(+) -Cat (Hind III + Not I) (2 951 bp 和 1 464 bp)。

Figure 2. Electrophoresis of plasmid pBluescript II sk(+) -Cat

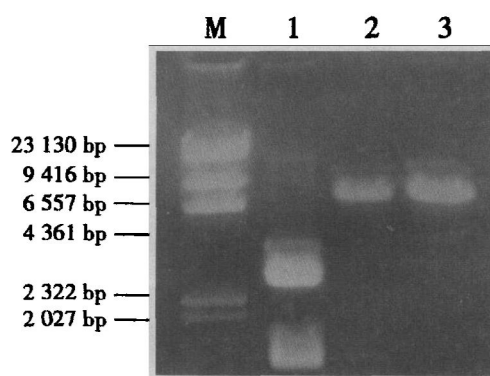


图 3. 穿梭载体 pShuttle-CMV-Cat 的酶切鉴定图 M 为参照标记,1 为 pBluescript II sk(+) -Cat (Kpn I + Not I) (2 915 bp 和 1 500 bp), 2 为 pShuttle-CMV-Cat (Kpn I + Not I) (7 483 bp 和 1 500 bp), 3 为 pShuttle-CMV (Kpn I + Not I) (7 483 bp 和 17 bp)。

Figure 3. Electrophoresis of transfer plasmid pShuttle-CMV-Cat

2.3 重组腺病毒质粒 pAdEasy-1-Cat 构建及鉴定

Pme I 线性化的 pShuttle-CMV-Cat 与超螺旋的 pAdEasy-1 在 BJ5183 菌中发生同源重组质粒可在含卡那霉素的培养基中生长,用 Pac I 酶切重组质粒,经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,可见一 32 735 bp 的大片段和一 4.5 kb 的特征性条带(图 4, Figure 4)。表明重组腺病毒质粒 pAdEasy-1-Cat 构建成功。同

源重组阳性率约为 30%。

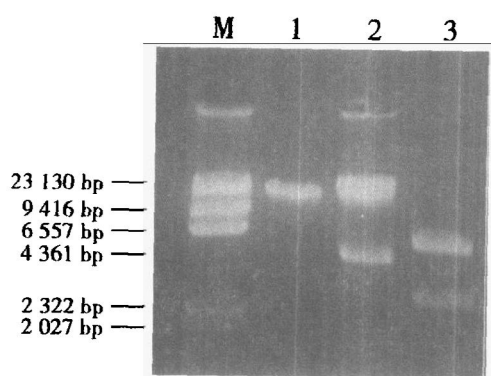


图 4. 重组腺病毒质粒 pAdEasy-1-Cat 的酶切鉴定图 M 为参照标记,1 为 pAdEasy-1 (Pac I) (33.5 kb),2 为 pAdEasy-1-Cat (Pac I) (32.735 和 4.5 kb),3 为 pShuttle-CMV-Cat (Pac I) (5 998 和 2 985 bp)。

Figure 4. Electrophoresis of recombinant adenovirus plasmid pAdEasy-1-Cat

2.4 重组腺病毒质粒 pAdEasy-1-Cat 的 PCR 鉴定

以重组腺病毒质粒 pAdEasy-1-Cat DNA 为模板,以扩增目的基因 catalase 的引物进行 PCR 反应。经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,可见扩增出 209 bp 的条带,表明重组腺病毒质粒 pAdEasy-1-Cat 携带有所克隆入的 catalase 基因(图 5, Figure 5)。

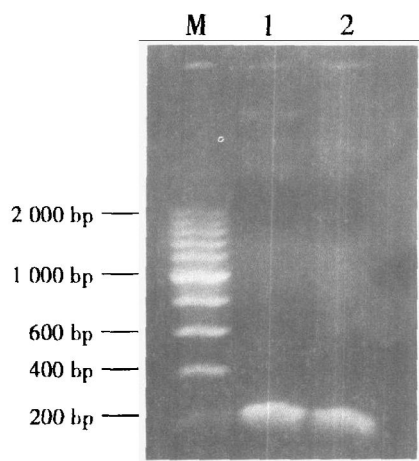


图 5. 重组腺病毒质粒 pAdEasy-1-Cat 的 PCR 鉴定图 M 为参照标记,1 为 pAdEasy-1-Cat 的 PCR 产物 (209 bp),2 为 pBluescript II sk (+)-Cat 的 PCR 产物 (209 bp)

Figure 5. Identification of recombinant adenovirus plasmid pAdEasy-1-Cat with PCR

2.5 重组腺病毒 AdCat 的包装及滴度测定

正常生长的 Ad-293 细胞生长旺盛,胞体饱满,呈多角型,贴壁能力强(图 6, Figure 6)。用 Pac I 线

性化的 pAd Easy-1-Cat 质粒转染 Ad-293 细胞 3-10d,在倒置相差显微镜下可见受病毒感染的 Ad-293 细胞出现典型细胞病变效应,即细胞肿胀、变圆,随后聚集成葡萄状、脱落(图 7, Figure 7)。将获得高滴度纯化的重组腺病毒颗粒倍比稀释,用紫外分光光度计测 260 nm 处吸光值来测病毒滴度为 4.12×10^{15} OPU/L。

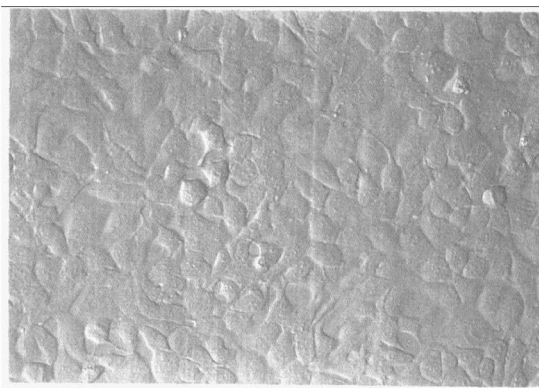


图 6. 未被感染的 Ad-293 细胞 (× 200)

Figure 6. Non-infected Ad-293 cells (× 200)

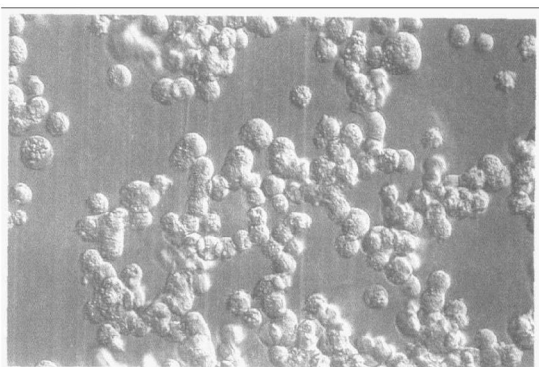


图 7. 被 AdCat 感染的 Ad-293 细胞 (× 200)

Figure 7. Ad-293 cells infected with AdCat

2.6 重组腺病毒 AdCat 的聚合酶链反应鉴定

将收集的含重组腺病毒的上清用扩增目的基因 catalase 的引物进行 PCR 反应。经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,可见扩增出 209 bp 的条带,表明重组腺病毒 AdCat 的基因组中携带 catalase 基因(图 8, Figure 8)。

3 讨论

基因治疗已经开始用于遗传病、肿瘤、心血管疾病的治疗试验,基因转移方法是基因治疗的基础和关键。腺病毒载体作为基因治疗的运载系统近年来发展较快。重组腺病毒因其具有体外转染效率高,感染细胞范围广,可感染静止期和分裂期细胞,同时

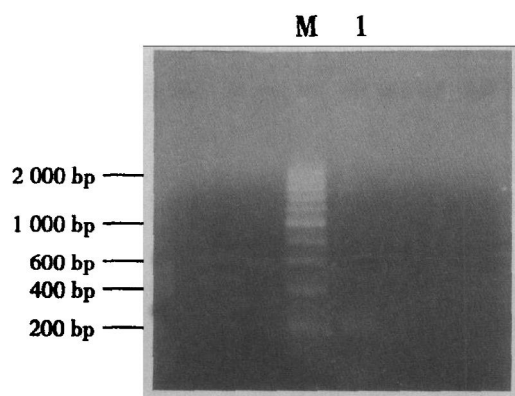


图8. 重组腺病毒 AdCat 的聚合酶链反应鉴定图 M 为参照标记, 1 为 AdCat 的 PCR 产物(209 bp)

Figure 8. Identification of recombinant adenovirus AdCat with PCR

又不整合到宿主细胞基因组中,因此常用于多种疾病的基因治疗。用于基因治疗的腺病毒一般都是缺失 E1 区和 E3 区基因的复制缺陷性 2 型或 5 型重组病毒,此复制缺陷型病毒的复制扩增需要 293 细胞。293 细胞是一种转化的人胚肾细胞系,能编码腺病毒的 E1 区。在 293 细胞中产生的重组病毒颗粒能感染许多类型的细胞,并表达所插入的外源基因,但不能在不表达 E1 区功能的细胞中复制,因此,复制缺陷型病毒能感染靶细胞,但不能在靶细胞内复制,从而避免腺病毒本身对靶细胞的损害,同时达到了基因转移的治疗目的。

重组腺病毒制备的关键环节是同源重组和重组体的筛选、鉴定。传统的重组腺病毒制备方法主要是利用细胞内质粒间同源重组腺病毒载体。是将转移质粒与腺病毒基因组质粒共转染 293 细胞,并且在这个 293 细胞内发生同源重组,才有可能形成重组体并进一步包装成重组腺病毒颗粒。两种质粒同时转染至同一细胞内机率就很低,两种质粒再发生同源重组的机率就更低。另外,293 细胞的活力也是影响同源重组的重要因素。Miyake 等^[11]采用了 COS-TPC 制备法,此方法是在腺病毒基因组 DNA 5' 末端共价结合末端蛋白复合物,通过提高转染效率来提高同源重组率,但在重组体的筛选、鉴定方面仍较繁琐。

本研究采用新方法制备重组病毒载体^[12]。与传统方法不同的是:两种质粒的转染和同源重组均在细菌内完成。所用的大肠杆菌 BJ5183 内的野生型 RecA 具很强的同源重组功能,而目前质粒转

化细菌的效率极高,且细菌繁殖快,能在短时间内大量复制。细菌内同源重组克服了细胞中质粒的共转染率低和同源重组率低的缺陷,省却细胞内同源重组法对所产生的病毒必须进行的多轮费时、费力的筛选、鉴定,因此大大缩短了重组病毒的制备过程。

在两种质粒同时转化同一细菌时,由于 pAdEasy-1 分子大(约 34 kb),多用电穿孔法进行转化,但由于电穿孔仪昂贵,我们尝试用化学转化法先将 pAdEasy-1 转化入 BJ5183 菌,制备成含有 pAdEasy-1 的感受态菌后再转化入穿梭质粒,同样成功获得了重组质粒,为细菌内同源重组的推广应用寻找到另一途径。

由此可见,本研究所采用的细菌内同源重组新方法快速、成功构建了携带 Catalase 基因的重组腺病毒载体 pAdEasy-1-Cat,并制备出高滴度重组病毒,大大缩短了实验周期,值得进一步推广应用。而且,含过氧化氢酶基因 Catalase 重组腺病毒载体的成功制备也为用 Catalase 基因进行再狭窄的防治提供了良好的基因转染载体。

【参考文献】

- [1] 唐蔚青,王抒,黎健. 野生型 p53 基因导入诱导血管平滑肌细胞凋亡. 中国动脉硬化杂志, 1997, 5 (3): 194-198
- [2] 刘启功,陆再英,周洪进,张卫东,颜进. 血管内皮生长因子预防血管成形术后再狭窄的机理. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9 (3): 209-212
- [3] 张爱宏,刘国庆. 放射性同位素标记法检测脂蛋白脂肪酶活性及其应用. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (6): 573-576
- [4] 陈仕林,黄盛东,徐志云,梅举,朱家麟,张宝仁. 人血管形成素-1 重组腺病毒高效制备. 中国病理生理杂志, 2001, 17 (12): 1 168-171
- [5] Rao GN, Berk B. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cells growth and proto-oncogene expression. Circ Res, 1992, 70: 593-599
- [6] Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADP and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. Circ Res, 1994, 74: 1 141-148
- [7] Lassègue B, Sorescu D, Szecsk K, Yin QQ, Aker M, Zhang Y, et al. Novel gp91phox homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates Angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. Circ Res, 2001, 88: 888-894
- [8] Brown MR, Miller FJ, Li WG, Ellingson AN, Mozena JD, Chatterjee P, et al. Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells. Circ Res, 1999, 85: 524-533
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 25-60
- [10] Mittereder N, March KL, Trapnell BC. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. J Virol, 1996, 70: 7 498-509
- [11] Miyake S, Makimura M, Kanegae Y, Harada S, Sato Y, Takamori K, et al. Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 1 320-324
- [12] He TC, Zhou S, Da-Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95 (5): 2 509-514

(此文编辑 胡必利)