

2 型猪链球菌中国强毒株 05ZYH33 *ofs* N 片段 基因敲除株的构建

史沛举^{1,2}, 郝喜娜^{1,2}, 葛俊超^{1,2}, 王长军², 王 晶², 潘秀珍^{1,2}, 唐家琪²

(1 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

(2 南京军区军事医学研究所, 江苏 南京 210002)

[摘要] 通过生物信息学分析 2 型猪链球菌 (*Streptococcus suis* serotype 2 *S. suis* 2) 中国强毒株 05ZYH33 的基因组, 预测并发现猪链球菌血清浑浊因子 (Opacity factor of *S. suis* OFS) 的编码基因 *ofs* 为了构建 *ofs* N-末端片段 *ofs*³⁷⁻⁶⁸³ 的基因敲除株, 首先构建中间为壮观霉素抗性基因, 两侧为 *ofs*³⁷⁻⁶⁸³ 上、下游同源序列的基因敲除质粒, 并对该质粒进行 PCR 和酶切鉴定. 根据同源重组的原理, 通过电转化方法筛选得到 *ofs*³⁷⁻⁶⁸³ 基因敲除株. PCR 测序和 RT-PCR 分析结果均显示 *ofs*³⁷⁻⁶⁸³ 已完全被壮观霉素抗性基因替代, 证实 *ofs*³⁷⁻⁶⁸³ 基因敲除株构建成功. 该敲除株的获得为进一步研究 *ofs* 在猪链球菌 2 型致病机制中的作用奠定基础.

[关键词] 2 型猪链球菌, *ofs*, 基因敲除株

[中图分类号] R378.1+2 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2009)02-0087-06

Deletion of the N-terminal Fragment of *ofs* Gene in *Streptococcus Suis* Serotype 2 Chinese Highly Virulent Strain 05ZYH33

Shi Peijun^{1,2}, Hao Xina^{1,2}, Ge Junchao^{1,2}, Wang Changjun,
Wang Jing², Pan Xiuzhen^{1,2}, Tang Jiaqi²

(1. School of Life Sciences Nanjing Normal University, Nanjing 210046 China)

(2. Institute of Military Medical Sciences Nanjing Command Nanjing 210002, China)

Abstract The gene of Opacity factor of *S. suis* (*ofs*) was predicted in the genome of *Streptococcus suis* serotype 2 (*S. suis* 2) Chinese highly virulent strain 05ZYH33 and its protein structure was characterized with Bioinformatics tools. To delete the N-terminal fragment of *ofs* in 05ZYH33, recombinant gene knock-out plasmid with a *Sp^c* cassette flanked with homologous arms was constructed. The plasmid was confirmed by PCR and restriction enzyme digestion. According to the principle of homologous recombination, the isogenic *ofs*³⁷⁻⁶⁸³ deficient mutant was screened through electroporation transformation. PCR amplification, sequencing of its product and RT-PCR analysis confirmed that the target gene was replaced by *Sp^c* cassette. This mutated 05ZYH33 provided a potent tool for assessing the role of *ofs* in the *S. suis* 2 infection.

Key words *streptococcus suis* serotype 2 *ofs* gene knock-out mutant

2 型猪链球菌 (*Streptococcus suis* serotype 2 *S. suis* 2) 是一种重要的人兽共患病病原体. *S. suis* 2 不仅可感染猪导致关节炎、脑膜炎、败血症等甚至急性死亡, 还可通过伤口等传播途径感染人使人患脑膜炎、败血病等疾病, 对养猪业及相关从业人员均造成严重威胁^[1,2]. 1998 年和 2005 年我国江苏省和四川省分别暴发了大规模 *S. suis* 2 感染猪和人的公共卫生事件^[3], 引起了国内外研究者的高度重视^[4]. 为了更好地对 *S. suis* 2 的致病性进行研究, 本课题组前期工作已完成了对 1998 年江苏流行的强毒株 98HAH12、2005 年四川流行的强毒株 05ZYH33 的全基因组测序, 对基因组进行了注释^[5]并开展了新的毒力相关因子的研究工作^[6,7]. 2006 年 Baums 等^[8]报道了 *S. suis* 2 的一种新的毒力因子——猪链球菌血清浑浊因子 (Opacity

收稿日期: 2008-11-02

基金项目: 国家自然科学基金 (30730081, 30600533, 30670105)、江苏省自然科学基金 (BK 2007013, BK2008066)、南京军区医学科技创新课题 (07Z045)、南京军区卫生专业人才培养“122”工程项目.

通讯联系人: 潘秀珍, 博士, 研究员, 研究方向: 自然疫源性疾病病原等. E-mail: panxiuzhen_2004@163.com

factor of *S. suis* of *s*). 为了研究中国强毒株 05ZYH33 中是否也存在 *ofs* 编码基因, 我们通过生物信息学分析 05ZYH33 全基因组序列, 发现在基因组中存在 *ofs* 编码基因. 本研究以 05ZYH33 为对象, 通过同源重组方法获得了 *ofs* 的 N-末端功能区域 *ofs*³⁷⁻⁶⁸³ 的基因敲除株 (命名为 Δofs^{37-683}), 为进一步研究 *ofs* 在 *S. suis* 2 致病机制中的作用奠定了基础.

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒及引物

本实验所用的菌株、质粒及引物见表 1. 引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成.

表 1 实验所用的菌株、质粒及引物

Table 1 Bacterial strains, plasmids and primers used in this study

菌株、质粒及引物	表型及相关特征	来源
菌株	05ZYH33	血清型 2 型, 强毒株, <i>ofs</i> ⁺
	Δofs^{37-683}	血清型 2 型, <i>Spc</i> ^r , <i>ofs</i> ³⁷⁻⁶⁸³⁻
	mutant1	血清型 2 型, <i>Spc</i> ^r , <i>Amp</i> ^r , <i>ofs</i> ³⁷⁻⁶⁸³⁺
质粒	<i>E. coli</i> DH5 α	<i>deoR</i> , <i>recA</i> , <i>endA</i> , <i>hslR</i> , <i>supE</i> , <i>thi</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA</i>
	pMD-18T	T 载体, <i>lacZ</i> , <i>Amp</i> ^r
	pUC18	<i>E. coli</i> 克隆载体, <i>lacZ</i> , <i>Amp</i> ^r
	pSET2	<i>E. coli-S. suis</i> 穿梭质粒, <i>Sp</i> ^r
	pUC18-LSR	<i>ofs</i> ³⁷⁻⁶⁸³ 基因敲除质粒, <i>Amp</i> ^r , <i>Spc</i> ^r
	L1	GAATTGAGCCTAGTATAGATTGACA (下划线为引入的 <i>EcoR</i> I 酶切位点)
	L2	GGATCCAAAGAGACTGGAAAACC (下划线为引入的 <i>BamH</i> I 酶切位点)
	R1	CTGCAGAGGCGAGAAAAATAGAAAG (下划线为引入的 <i>Pst</i> I 酶切位点)
	R2	AAGCTTTATCTGTGCATGATAGTGG (下划线为引入的 <i>Hind</i> III 酶切位点)
引物	<i>Spc</i> 1	GGATCGGTTCTGCTGAATACATGTTATA (下划线为引入的 <i>BamH</i> I 酶切位点)
	<i>Spc</i> 2	CTGCAAGTTTCTTAAAACTGTAT (下划线为引入的 <i>Pst</i> I 酶切位点)
	N1	TTCAAGCGAATCTACTAGCTC
	N2	GACACGGTTGAGAGCTTTTCAAC
	OUT1	CTAGTCATGACCAACCGTGAAAAAC
	OUT2	GTAAGCAAAATGCAAGCCATC
	For	CCTGAGGCATTAACGAATGAAA
	Rev	TCATTTAGGTAACTCTGGTTG

1.2 主要试剂和仪器

Ex Taq DNA 聚合酶、DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、质粒 DNA 抽提试剂盒、RT-PCR 试剂盒均为 TaKaRa 公司产品; 胶回收试剂盒、RNA 提取试剂盒均为 Promega 公司产品; Todd-Hewitt Broth (THB) 培养基购于 Difco 公司; Gene Pulser X cellTM 型电穿孔仪为 BD-RAD 公司产品; Ultrospec2000 型紫外分光光度计为 Pharmacia 公司产品.

1.3 ofs 基因的生物信息学分析

用 BLAST 和 ClustalW 程序筛选 05ZYH33 全基因组序列中可能存在的 *ofs* 编码基因. 将 *ofs* 序列与化脓性链球菌血清浑浊因子 (Serum opacity factor, SOF) 和停乳链球菌纤连蛋白结合蛋白 A (Fibronectin binding protein A, FnBA) 的序列进行比对, 并用 SignalP 3.0 Server、EMBOSSwin 等软件分析其结构特点.

1.4 基因敲除质粒的构建

以 05ZYH33 基因组 DNA 为模板, 分别用引物 L1/L2、R1/R2 进行 PCR 扩增 *ofs*³⁷⁻⁶⁸³ 的上、下游片段 L 和 R; 同时以 pSET2 质粒为模板, 用引物 *Spc*1/*Spc*2 进行 PCR 扩增壮观霉素抗性基因 (*Spc*^r cassette). 将这 3 个片段分别装入 T 载体后, 根据引入的相应酶切位点, 通过酶切和连接反应, 将它们依次连接到 pUC18 载体的 *EcoR* I、*BamH* I、*Pst* I 和 *Hind* III 4 个多克隆位点上, 形成一个 *Sp*^r 基因两侧具有与 *ofs*³⁷⁻⁶⁸³ 上下游同源序列的基因敲除质粒 pUC18-LSR 如图 1 所示.

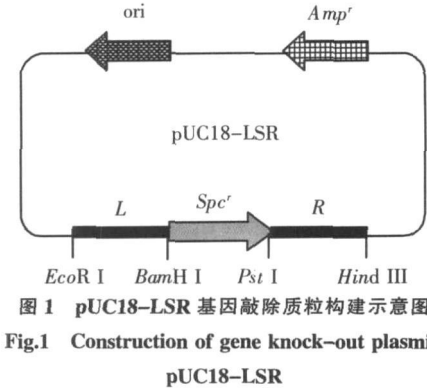


图 1 pUC18-LSR 基因敲除质粒构建示意图

Fig.1 Construction of gene knock-out plasmid pUC18-LSR

1.5 基因敲除株的筛选

参照 Sm ith 等^[9]的方法制备 05ZYH 33感受态细菌. 在 21.5 kV /cm、200 Ω 和 25 μF 电转参数下, 取基因敲除质粒 pUC18-LSR 5 μL 电转化感受态细菌, 电转结束后将菌液涂布于 THB 平板 (含 100 μg/mL 壮观霉素), 37℃ 培养 48 h 后, 挑取所有的单菌落进行增菌培养并取菌液 2 μL 作模板, 用引物 IN1/IN2 (位于 *ofs*³⁷⁻⁶⁸³ 内部, 产物大小 966 bp) 进行 PCR 初步筛选. 如果 *ofs*³⁷⁻⁶⁸³ 被敲除, PCR 扩增应呈阴性结果, 否则说明 *ofs*³⁷⁻⁶⁸³ 未被敲掉.

1.6 基因敲除株的鉴定

1.6.1 PCR 和测序鉴定

根据王花茹等^[10]的方法分别以 05ZYH 33 和敲除株的基因组为模板进行多重 PCR 扩增, 鉴定 2 型猪链球菌菌株. 分别于 *ofs*³⁷⁻⁶⁸³ 上、下游片段 L 和 R 的两侧再设计一对引物 OUT1/OUT2, 引物的位置如图 2 所示. 分别用引物 IN1/IN2, Spe1/Spe2, OUT1/Spe2, Spe1/OUT2 对野生株和敲除株进行 PCR 扩增. 用引物 OUT1/OUT2 对敲除株进行 PCR 扩增, 并将 OUT1/OUT2 的扩增产物送金思特公司测序.

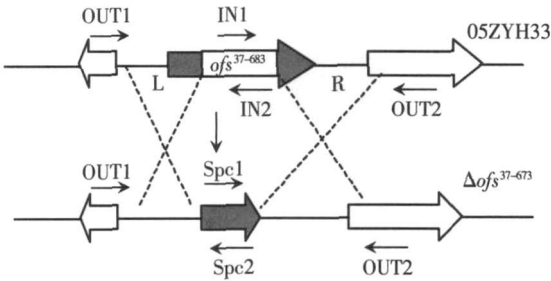


图 2 引物设计示意图
Fig.2 Primer design

1.6.2 RT-PCR 鉴定

为了进一步验证敲除株的正确性, 提取野生株和敲除株的总 RNA, 进行 RT-PCR 鉴定. 根据试剂盒的操作说明分别提取 05ZYH 33 和 Δ*ofs*³⁷⁻⁶⁸³ 的总 RNA 并进行反转录. 在 *ofs*³⁷⁻⁶⁸³ 的上、下游设计引物 For/Rev, 以 For/Rev 分别对所提取的总 RNA 及经 RNA 反转录得到的 cDNA 进行 PCR 扩增.

2 结果

2.1 ofs 基因的生物信息学分析

用 BLAST 和 ClustalW 程序筛选 05ZYH 33 全基因组序列, 发现 05SSU 1663 为 *ofs* 的同源序列. *ofs* 的结构具有以下特点: N-末端有信号肽序列并且有一段与 SOF 同源的区域; C-末端有重复序列和 LPXTG 锚定位点 (图 3A). 利用 SignalP 3.0 对 *ofs* 的信号肽序列进行预测, 提示切割位点在 N-末端的 33 和 34 两

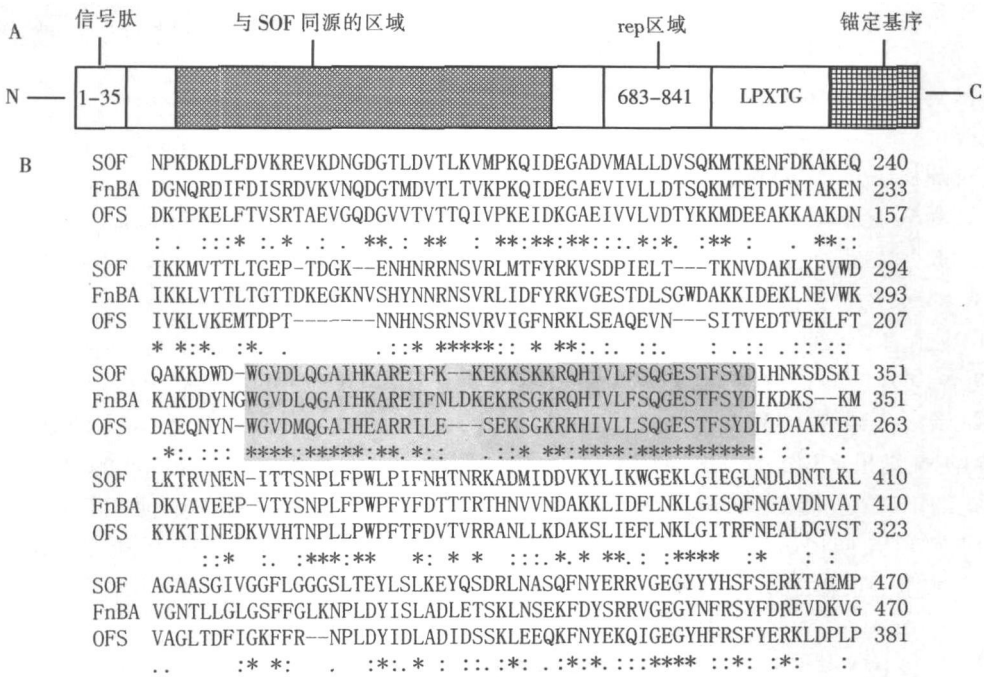


图 3 OFS 结构分析及序列比对

Fig.3 Structure analysis and sequence alignment of OFS

个氨基酸之间. ofs^{37-683} 与 SOF 和 FnBA 的 N-末端区域有较高的同源性. 用 Clustal W 对它们的序列进行比对, 比对结果提示, $ofs(97-683)$ 与 SOF(181-802)的同源性达 34%; 与 FnBA(174-789)的同源性达 40%. ofs SOF 和 FnBA N-末端部分序列的比对结果见图 3B, 阴影部分为同源性较高的区域.

2. 2 ofs^{37-683} 基因敲除质粒的构建

以 05ZYH33 基因组 DNA 为模板, 用引物 L1/L2 R1/R2 成功扩增出 ofs^{37-683} 的上游片段 L(1006 bp) 和下游片段 R(994 bp), 同时用引物 Spc1/Spc2 从 pSET2 质粒中扩增出 Spc^r 基因(1130 bp). 对构建好的重组质粒进行 PCR 及双酶切验证, 结果见图 4 对重组质粒进行测序, 结果均显示 3 个片段连接次序正确, 重组质粒构建成功.

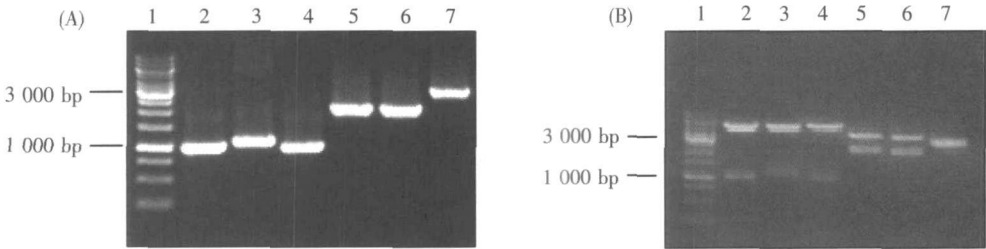


图 4 重组质粒 pUC18-LSR 的 PCR 和酶切验证
Fig.4 PCR and enzyme digestion identification of plasmid pUC18-LSR

(A) Gel electrophoresis of PCR product 1: 1 kb DNA ladder marker; 2: PCR products with L1/L2; 3: PCR products with Spc1/Spc2; 4: PCR products with R1/R2; 5: PCR products with L1/Spc2; 6: PCR products with Spc1/R2; 7: PCR products with L1/R2
(B) Restriction analysis of plasmid pUC18-LSR 1: 1 kb DNA ladder marker; 2: pUC18-LSR digested by *EcoRI* and *BamHI*; 3: pUC18-LSR digested by *BamHI* and *PstI*; 4: pUC18-LSR digested by *PstI* and *HindIII*; 5: pUC18-LSR digested by *EcoRI* and *PstI*; 6: pUC18-LSR digested by *BamHI* and *HindIII*; 7: pUC18-LSR digested by *EcoRI* and *HindIII*.

2. 3 ofs^{37-683} 基因敲除株的筛选

将构建好的基因敲除质粒电转化 *S. suis* 05ZYH33 感受态细菌, 涂壮观霉素抗性 THB 平板, 挑取单菌落进行 PCR 筛选. 多次电转化并挑取所有的单菌落进行 PCR 筛选. 菌液 PCR 共筛选 253 个单菌落, 其中 252 为单向插入突变菌株, 在一组菌液 PCR 中, 发现一株扩增结果为阴性(图 5 泳道 3), 挑出该泳道对应的菌株, 重命名为 Δofs^{37-683} , 作进一步验证.

2. 4 基因敲除株 Δofs^{37-683} 的鉴定

2. 4. 1 PCR 和测序鉴定

分别以 05ZYH33 和 Δofs^{37-683} 基因组为模板进行多重 PCR 扩增, 均可以同时扩增出 2 型猪链球菌的 CPS, MRP, Sly, EF 4 种毒力相关因子的基因片段. 基因片段大小依次为 557 bp, 626 bp, 744 bp, 970 bp. 结果表明两者均为 2 型猪链球菌. 在敲除株中, 分别用引物 OUT1/Spc2, Spc1/OUT2 和 Spc1/Spc2 进行 PCR, 能够扩增出预计的 2332 bp, 2250 bp 的目的片段和 Spc^r 基因; 而在 05ZYH33 中, 用以上引物进行 PCR 都得到阴性结果. 以 05ZYH33 基因组为模板, 用引物 N1/N2 能扩增出 966 bp 的目的片段, 而在敲除株中用引物 N1/IN2 进行 PCR, 结果为阴性. 结果各 PCR 产物的大小与理论值相符(图 6). 敲除株中 OUT1/OUT2 的 PCR 产物送公司测序, 结果经序列比对发现原本应是 ofs^{37-683} 基因所在的位置被 Spc^r 序列代替, 提示目的基因已被 Spc^r 基因置换, 说明已发生了等位基因置换.

2. 4. 2 敲除株 Δofs^{37-683} 的 RT-PCR 鉴定
以 ofs^{37-683} 的上下游引物 For/Rev 分别对 05ZYH33 和敲除株的总 RNA 进行扩增, 扩增结果均为阴性, 说明 RNA 没有被 DNA 污染. 以反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 在野生株 05ZYH33 中, 结果为

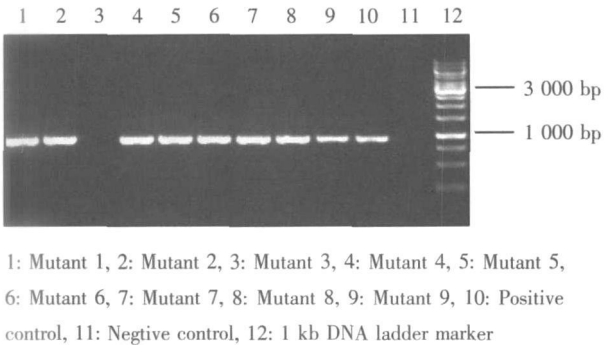
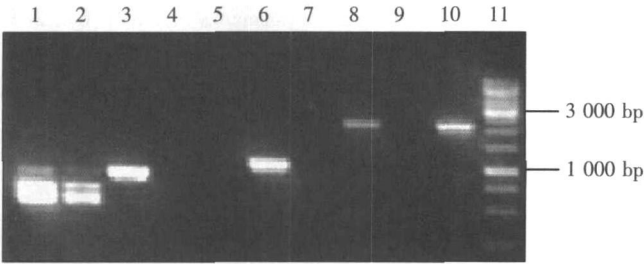


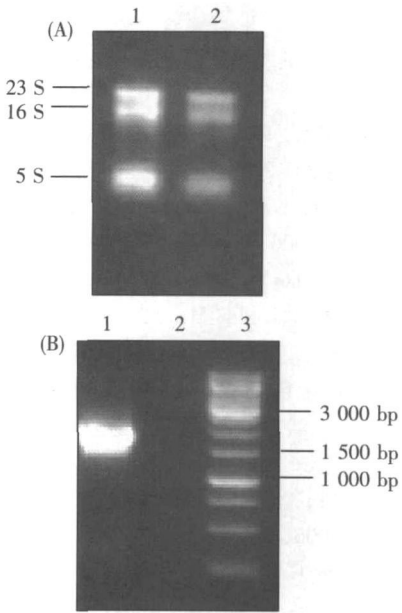
图 5 ofs^{37-683} 基因敲除株的部分 PCR 初步筛选结果
Fig.5 Preliminary PCR screening of gene knock-out mutant of ofs^{37-683}

阳性, 说明 *ofs*³⁷⁻⁶⁸³ 基因正常转录; 而在 Δofs^{37-683} 中为阴性, *ofs*³⁷⁻⁶⁸³ 基因不能正常转录. 从转录水平上证明了 *ofs*³⁷⁻⁶⁸³ 确实已经不存在. (图 7).



1: SS2 primer mixture PCR amplification using 05ZYH33 genomic DNA as template, 2: SS2 primer mixture PCR amplification using Δofs^{37-683} genomic DNA as template, 3: IN1/IN2 PCR amplification using 05ZYH33 genomic DNA as template, 4: IN1/IN2 PCR amplification using Δofs^{37-683} genomic DNA as template, 5: Spc1/Spc2 PCR amplification using 05ZYH33 genomic DNA as template, 6: Spc1/Spc2 PCR amplification using Δofs^{37-683} genomic DNA as template, 7: OUT1/Spc2 PCR amplification using 05ZYH33 genomic DNA as template, 8: OUT1/Spc2 PCR amplification using Δofs^{37-683} genomic DNA as template, 9: Spc1/OUT2 PCR amplification using 05ZYH33 genomic DNA as template, 10: Spc1/OUT2 PCR amplification using Δofs^{37-683} genomic DNA as template, 11: 1kb DNA ladder marker.

图 6 基因敲除株 Δofs^{37-683} 的 PCR 验证
Fig.6 PCR identification of gene knock-out mutant Δofs^{37-683}



(A) 1: RNA of 05ZYH33, 2: RNA of Δofs^{37-683} (B), 1: For/Rev PCR amplification using cDNA of 05ZYH33, 2: For/Rev PCR amplification using cDNA of Δofs^{37-683} as template, 3: 1kb DNA ladder marker.

图 7 基因 *ofs*³⁷⁻⁶⁸³ 的 RT-PCR 分析
Fig.7 RT-PCR analysis of gene *ofs*³⁷⁻⁶⁸³

3 讨论

早期研究表明, 与 *S. suis* 2致病性相关的毒力因子主要有荚膜多糖 (Capsular polysaccharide CPS)、溶菌酶释放蛋白 (Muran ilase-released protein, MRP)、胞外因子 (Extracellular factor EF)、溶血素 (Sulysin, SLY) 等^[11-12]. 目前, 荚膜多糖为唯一明确的毒力因子^[13-14]. 猪链球菌致病的具体机制仍不清楚, 一些潜在的毒力因子还在不断的被发现中.

Baums等^[8]研究证实, *ofs*是一种新的与 *S. suis* 2的致病性相关的毒力因子. 序列分析显示, *ofs*与 SOF和 FnBA 具有相似的结构. 都具有 N-末端的信号肽序列、重复序列元件和 C末端的 LPXTG 锚定位点, 且它们的 N-末端区域有较高的同源性. Timmer等^[15]研究表明, SOF的 N-末端功能区域不仅能够使哺乳动物血清变浑浊, 还能够提高细菌对细胞的侵染, 在化脓性链球菌的致病机理中具有重要作用. 本研究结果表明, *ofs* N-末端功能区域 *ofs*³⁷⁻⁶⁸³与 SOF和 FnBA 的 N-末端功能区域有较高的同源性. *ofs*³⁷⁻⁶⁸³在猪链球菌感染中是否也发挥类似的作用有待进一步研究. Baums等^[8]通过同源重组的方法构建了 *ofs*全长的敲除株, 与 *S. suis* 2野生株相比, *ofs*全长敲除株丧失了使哺乳动物血清变浑浊的功能且毒力明显减弱. Baums等^[7]还制备了 *ofs* N-末端功能区域的重组蛋白, 实验表明该蛋白能够使哺乳动物的血清变浑浊. 该蛋白使哺乳动物血清变浑浊的特性是否与其致病性直接相关, 还有待研究.

本研究利用同源重组基因敲除方法成功构建了中国强毒株 05ZYH 33 毒力因子 *ofs* N-末端片段 *ofs*³⁷⁻⁶⁸³的基因敲除株. 为进一步研究 *ofs* N-末端功能区域在 *S. suis* 2致病机制中的作用奠定了基础. 下一步我们将通过血清浑浊实验, 小鼠致病性试验等进一步研究 *ofs*³⁷⁻⁶⁸³的功能.

[参考文献]

- [1] Staats J J, Feder I, Okwumabua O, et al. *Streptococcus suis* past and present[J]. Vet Res Commun 1997, 21(6): 381-407
- [2] Lun Z R, Wang Q P, Chen X G, et al. *Streptococcus suis* an emerging zoonotic pathogen[J]. Lancet Infect Dis 2007, 7(3): 201-209.
- [3] Tang J, Wang C, Feng Y, et al. Streptococcal Toxic Shock Syndrome Caused by *Streptococcus suis* Serotype 2[J]. PLoS Med 2006, 3(5): e151.
- [4] Sriskandan S, Slater J D. Invasive Disease and Toxic Shock due to Zoonotic *Streptococcus suis* An Emerging Infection in the East [J]. PLoS Med 2006, 3(5): e187
- [5] Chen C, Tang J, Dong W, et al. A Glimpse of Streptococcal Toxic Shock Syndrome from Comparative Genomics of *S. suis* 2 Chinese Isolates[J]. PLoS ONE, 2007, 2(3): e315.
- [6] 孙雯, 潘秀珍, 王长军, 等. 猪链球菌 2 型烯醇化酶的分子克隆与免疫学特性 [J]. 微生物学通报, 2008, 35(1): 15-19.
- [7] 赵华梅, 潘秀珍, 王长军, 等. 猪链球菌 2 型谷氨酸脱氢酶基因的克隆表达及酶活性测定 [J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(1): 22-25.
- [8] Baums C G, Kain U, Fülle M, et al. Identification of a novel virulence determinant with serum opacification activity in *Streptococcus suis* [J]. Infection and Immunity, 2006, 74(11): 6154-6162.
- [9] Smith H E, Wisselink H J, Vecht U, et al. High-efficiency transformation and gene inactivation in *Streptococcus suis* type 2 [J]. Microbiology 1995, 141(1): 181-188.
- [10] 王花茹, 王长军, 唐家琪, 等. 猪链球菌种及其主要致病血清型多重 PCR 检测方法的建立 [J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(6): 837-841.
- [11] Segura M, Gottschak M, Olivier M. Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis [J]. Infection Immunity 2004, 72(9): 5322-5330.
- [12] Staats J J, Plattner B L, Stewart G C, et al. Presence of the *Streptococcus suis* *suilysin* gene and expression of MRP and EF correlates with high virulence in *Streptococcus suis* type 2 isolates [J]. Vet Microbiol 1999, 70(3/4): 201-211.
- [13] Charland N, Harel J, Kobisch M, et al. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression [J]. Microbiology 1998, 144(2): 325-332.
- [14] Smith H E, Dammann M, van der Vekke J, et al. Stockhofe-Zurwieden N, Smith M A. Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor [J]. Infection Immunity 1999, 67(4): 1750-1756.
- [15] Timmer A M, Kristian S A, Datta V, et al. Serum opacity factor promotes group A streptococcal epithelial cell invasion and virulence [J]. Mol Microbiol 2006, 62(1): 15-25.

[责任编辑: 孙德泉]