

题将结合 matK 基因作进一步研究。再次是测序与克隆技术问题,国内普遍采用的是 PCR 产物直接测序,由于 PCR 产物浓度低,易受污染,给测序反应和读序工作造成了一定困难。本课题将经 PCR 获得的目的基因用大肠杆菌克隆后分离、净化,得到的目的基因不仅浓度高,而且污染少,测序、读序效果好,成功率显著提高,为目前日本、欧美等国家普遍采用的方法^[19],值得推广。

References:

- [1] Grogory M P, Douglas E S, Pamela S S. Higher level relationships of *Apiales* (*Apiaceae* and *Araliaceae*) based on phylogenetic analysis of *rbcL* sequences [J]. *Am J Bot*, 1996, 83(4): 99-515.
- [2] Gregory M P, Douglas E S, Pamela S S. Clarification of the relationship between *Apiaceae* and *Araliaceae* based on matK and *rbcL* sequence data [J]. *Am J Bot*, 1997, 84(4): 565-580.
- [3] Stephen R D, Deborah K D. A molecular phylogeny of *Apiaceae* subfamily *Apioidae*: evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences [J]. *Am J Bot*, 1996, 83(2): 234-251.
- [4] Stephen R D, Seemanti R, Deborah S K D, et al. Molecular systematics of *Apiaceae* subfamily *Apioidae* phylogenetic analysis of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer and plastid *rpoCl* intron sequences [J]. *Am J Bot*, 1998, 85(4): 563-591.
- [5] Gregory M P, Stephen R D. Major lineages within *Apiaceae* subfamily *Apioidae*: A comparison of chloroplast restriction site and DNA sequence data [J]. *Am J Bot*, 1999, 86(7): 1014-1026.
- [6] Stephen R D, Deborah S K D, Mark F W. A phylogeny of the flowering plant family *Apiaceae* based on chloroplast DNA *rp116* and *rpoCl* intron sequences: Towards a supra-generic classification of subfamily *Apioidae* [J]. *Am J Bot*, 2000, 87(2): 273-292.
- [7] Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J M, et al. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny [J]. *Ann Mo Bot Gard*, 1995, 82: 247-277.
- [8] Doyle J L, Doyle J A. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.
- [9] White T J, Bruns T, Lee S, et al. *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics* [M]. California: Academic Press, 1990.
- [10] Sanger F, Nicklen S, Coulson S R. DNA Sequencing with chain-termination inhibitors [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1977, 74: 5463-5467.
- [11] The Japanese Biochemical Society (JBS); *Practical Biochemistry Experimentation* [M]. Taikyo: Chemical Commission of Taikyo, 1995.
- [12] Dowine S R, Olystead R G, Zurawaski G, et al. Six, independent losses of the cpDNA *rplz* intron in dicotyledons [J]. *Mol Phylog Impl Evol*, 1991, 45(5): 1245.
- [13] Hirasaka J, Shimada H, Minoru N, et al. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome; inter-molecular recombination between distinct rRNA genes accounts for a major plasmid DNA inversion during the evolution of the cereals [J]. *Mol Gen Genet*, 1989, 217: 185-194.
- [14] Editorial Board of China Herbal, State Administration of Traditional Chinese Medicine. *China Herbal* (中华本草) [M]. Shanghai: Scientific and Technical Publishers, 1999.
- [15] Liu Y P, Cao H, Han G R, et al. MatK and ITS nucleotide sequencing of crude drug *Chuanxiong* and phylogenetic relationship between their species from China and Japan [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37(1): 63-68.
- [16] Zhu H F, Yang J B, Zhang C Q, et al. Systematic position of *Primula secundiflora* (*Primulaceae*) inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequence data [J]. *Acta Phytotaxon Sin* (植物分类学报), 2002, 40(2): 133-138.
- [17] Gao L M, Yang J B, Zhang C Q, et al. Phylogenetic relationship of subgenus *Tsutsusi* (*Rhododendron*) based on ITS sequences [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2002, 24(3): 313-320.
- [18] Johnson L A, Soltis D E. Phylogenetic inference in *Saxifragaceae sensu stricto* and *Gilia* (*Polemoniaceae*) using matK sequences [J]. *Ann Mo Bot Gard*, 1995, 82: 149-175.
- [19] Petersen G, Seberg O, Larsen S. The phylogenetic and taxonomic position of *Lilaeopsis* (*Aiaceae*), with notes on the applicability of ITS sequence data for phylogenetic reconstruction [J]. *Aust Syst Bot*, 2002, 15: 181-191.

基因枪介导灯盏花遗传转化及几个影响因素的研究

邱璐^{1,2}, 王波^{1*}, 罗春梅³, 曹光宇², 范战民², 龔礼嘉²

(1. 楚雄师范学院, 云南 楚雄 675000; 2. 北京大学生命科学院 蛋白质工程及基因工程国家重点实验室, 北京 100871; 3. 楚雄农业学校, 云南 楚雄 675000)

摘要:目的 获得具有较强抗虫抗真菌的转基因灯盏花植株。方法 通过 PCR 聚合酶链式反应得到目的基因 RBB12-3, 通过中间载体 PBS 及植物载体 YY46, 得到带有目的基因的质粒, 用基因枪轰击法进行遗传转化。对基因枪轰击受体、轰击压力、抗生素大霉素(Gent.)的敏感性进行对照实验。结果 用灯盏花的真叶作为基因枪轰击

收稿日期: 2005-09-25

作者简介: 邱璐(1965—), 女, 四川人, 硕士, 副教授, 主要从事植物转基因及植物组织培养研究。

* 通讯作者 王波(1961—), 男, 本科, 副教授, 主要从事分析化学及化工研究。

受体效果最好,其次为Ⅱ型愈伤组织,灯盏花的根、茎,Ⅰ型愈伤组织作为基因枪轰击受体效果较差; 8.96×10^6 Pa 的轰击压力诱导灯盏花的真叶形成转基因不定芽效果最好,Ⅱ型愈伤组织效果次于真叶;使用 $50 \mu\text{g/mL}$ Gent. 作选择压力筛选 Gent. 标记的阳性转基因灯盏花植株效果最好。结论 用基因枪轰击法将水稻 RBBI2-3 基因转移到灯盏花中具有较好效果,成功获得转基因灯盏花植株。

关键词:灯盏花;基因枪;遗传转化;轰击受体;轰击压力;庆大霉素(Gent.)

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)07-1076-05

Genetic transformation of *Erigeron breviscapus* induced by particle gun with a few affecting factors

QIU Lu^{1,2}, WANG Bo¹, LUO Chun-mei³, CAO Guang-yu², FAN Zhan-min², QU Li-jia²

(1. Chuxiong Normal University, Chuxiong 675000, China; 2. National Laboratory of Protein Engineering and

Plant Genetic Engineering, College of Life Science, Peking University, Beijing 100871, China;

3. Chuxiong Agricultural School, Chuxiong 675000, China)

Abstract: **Objective** To get genetic transformed *Erigeron breviscapus* plantlet with the antiinsect and antifungi effects. **Methods** The plasmid with gene RBBI2-3 was produced by PCR, middle carrier PBS and plant carrier YY46. By using the particle gun to bombard *E. breviscapus*, genetic transformation was realized. It was done with the control experiment on bombarded materials, bombarding pressures, and Gent. sensitivity. **Results** The result of genetic transformation by using true leaves as bombarded material was the best; Ⅱ-type callus were the next in order; the roots, stems, and Ⅰ-type callus were the last in the result. The bombarding pressure of 8.96×10^6 Pa was the best to induce true leaves forming adventitious bud. The result of using the pressure of 7.58×10^6 Pa and 8.96×10^6 Pa to bombard Ⅱ-type callus did not show any difference and was next to true leaves. The best result is using $50 \mu\text{g/mL}$ Gent to choose the *E. breviscapus* of genetic transformation. **Conclusion** The paddy RBBI2-3 transformed into the genetic transformation on *E. breviscapus* by particle gun bombarding is the best. The genetic transformed *E. breviscapus* plantlet has been obtained.

Key words: *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz.; particle gun; genetic transformation; bombarded materials; bombarding pressure; Gentamicin (Gent.)

灯盏花又名灯盏细辛,为菊科飞蓬属植物短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz., 主要分布于我国云南、广西、四川、贵州、西藏等地。其性寒,味微苦、甘温辛,具有散热解表、活血化瘀、通经活络、舒经治瘫、祛风除湿、抗炎止痛等功效,在临床上对心、脑血管疾病具有特殊疗效,已收入《中国药典》。目前,灯盏花已投入大规模的人工栽培,但种子采收困难,数量少,发芽率低,价位高;植株抗性差,易感病感虫,死亡率高;生物产量低;有效成分的量低,严重制约了灯盏花的发展。该项研究的目的在于有效提高灯盏花的抗病抗虫性,从而有效提高灯盏花的生物产量,有效控制灯盏花人工栽培中农药的使用,有效进行无公害生产,保护野生灯盏花,促进灯盏花的可持续发展。该项研究通过对水稻蛋白酶抑制基因 RBBI2-3 的克隆,通过基因枪轰击法实现对灯盏花的遗传转化。

1 材料与方法

1.1 材料:灯盏花取自云南省楚雄州星升药业有限公司。水稻基因片段 33HZ、大肠杆菌 DH52 及相关转化载体 PBS、YY46 来自北京大学生命科学院蛋白质工程及基因工程国家重点实验室。

1.2 水稻 RBBI2-3 基因的克隆:水稻蛋白酶抑制基因 RBBI2-3 的基因序列及功能均已研究清楚,它具有 558 bp,能有效地抗虫抗真菌,尤其对苗期抗真菌有较好效果^[1]。通过软件设计引物,以带水稻 RBBI2-3 基因的片段 33HZ 为模板,进行 PCR 聚合酶链式反应,通过琼脂糖电泳凝胶检测并回收目的基因 RBBI2-3。

1.3 通过中间载体构建 RBBI2-3 PBS 质粒:用 *Bam*H I、*Sal* I 分别对中间载体 PBS 及目的基因 RBBI2-3 进行酶切,使用连接酶 *Taligase* 进行连接,用连接产物转化大肠杆菌 DH52,筛选阳性克隆。将阳性克隆的大肠杆菌进行扩大培养,用试剂盒提取质粒,得到 RBBI2-3 PBS 质粒,通过琼脂糖电泳凝

胶检测该质粒。

1.4 通过植物载体 YY46 构建质粒 RBBI2-3 YY46: 用 *Bam*H I、*Sal* I 分别对质粒 RBBI2-3 PBS、植物载体 YY46 进行酶切, 使用连接酶 *Tali*-gase 进行连接, 用连接产物转化大肠杆菌 DH52, 筛选阳性克隆。将阳性克隆的大肠杆菌进行扩大培养, 用试剂盒提取质粒, 得到质粒 RBBI2-3 YY46, 通过琼脂糖电泳凝胶检测该质粒。

1.5 基因枪轰击受体对照: 将灯盏花的种子用 0.2% HgCl_2 消毒 5 min, 无菌水冲洗 10 次, 接种在 MS0 培养基上萌发生根, 形成组培苗^[2]。取 30 d 组培苗的真叶、根、茎、I 型愈伤组织(使用 MS+BA 0.5 mg/L+NAA 2.0 mg/L 暗培养 30 d)、II 型愈伤组织(使用 MS+BA 0.5 mg/L+NAA 2.0 mg/L 光培养 2 周)^[2]作为基因枪轰击对象进行对照。轰击前一天, 将轰击材料转移到渗透培养基 MS+甘露醇 73 g/L 上处理 16 h^[3], 材料尽可能摆放紧密, 但不要太厚。

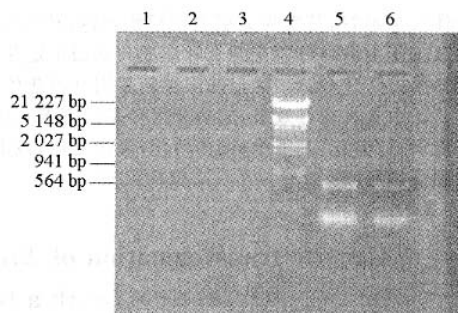
1.6 基因枪轰击压力对照: 使用 Bio-Rad 公司生产的 PDS1000/He 高压氦基因枪轰击进行转基因。无菌状态下制备金粉悬液 60 mg/mL, 轰击前取金粉悬液 50 μL , 加 2.5 mol/L CaCl_2 50 μL , 0.1 mol/L 亚精铵 20 μL , 5 μL 的质粒 DNA, 充分悬浮振荡, 离心弃上清液, 加无水乙醇洗 2~3 次。加 80 μL 无水乙醇, 充分悬浮振荡, 每打一次基因枪取 10~12 μL 悬液。设置轰击压力 7.58×10^6 、 8.96×10^6 Pa 进行对照^[3~5]。打完基因枪后 4~5 h 将被轰击的材料转移到 MS+BA 0.5 mg/L+IAA 0.5 mg/L 的过渡培养基中过渡 3 d^[1], 并进行暗培养, 然后转入选择培养基暗培养 4 d, 再进行光照诱导不定芽形成。

1.7 抗性植株筛选: 质粒 RBBI2-3 YY46 中带有庆大霉素抗性基因, 因此在 MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L^[1]的培养基中分别加入 0、25、50、75 $\mu\text{g/mL}$ 的庆大霉素(Gent.)进行转基因灯盏花抗性植株筛选压力进行对照。

2 结果与讨论

2.1 水稻 RBBI2-3 基因电泳检测结果: 通过 PCR 方法得到目的基因 RBBI2-3, 与 DNA 样品同步电泳的结果显示, 目的基因略小于 564 bp, 符合水稻 RBBI2-3 片段大小, 见图 1。

2.2 质粒 RBBI2-3 PBS 电泳检测结果: RBBI2-3 PBS 质粒酶切产物与目的基因 RBBI2-3 同步电泳的结果及以 RBBI2-3 PBS 质粒为模板进行 PCR 的产物电泳结果显示, RBBI2-3 与 PBS 连接成功, 见图 2。

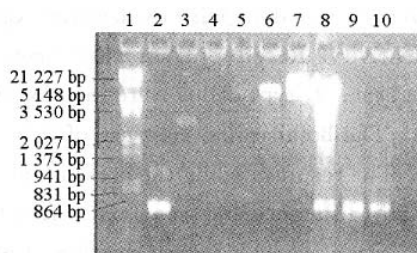


4 号加样孔为 DNA 样品, 5 号及 6 号加样孔为通过 PCR 方法得到的目的基因 RBBI2-3

No. 4 is DNA sample, No. 5 and No. 6 are aimed gene RBBI2-3 got by PCR

图 1 目的基因 RBBI2-3 与 DNA 样品同步电泳结果图

Fig. 1 Electrophorogram of RBBI2-3 and DNA mark sample in same step



1 号加样孔为样品 DNA, 2 号加样孔为目的基因, 6 号加样孔为质粒 RBBI2-3 PBS, 7 号加样孔为质粒 RBBI2-3 YY46, 8 号加样孔为质粒 RBBI2-3 YY46 的酶解产物, 9 号加样孔为以质粒 RBBI2-3 PBS 为模板进行 PCR 的产物, 10 号加样孔为以 RBBI2-3 YY46 质粒为模板进行 PCR 的产物

No. 1 is DNA sample, No. 2 is aimed gene RBBI2-3 gene, No. 6 is RBBI2-3 PBS plasmid, No. 7 is RBBI2-3 YY46 plasmid, No. 8 is production of plasmid RBBI2-3 YY46 to be cut by enzyme, No. 9 is production of PCR from plasmid RBBI2-3 PBS, No. 10 is production of PCR from plasmid RBBI2-3 YY46

图 2 质粒 RBBI2-3 PBS、RBBI2-3 YY46 与目的基因 RBBI2-3 及 DNA 样品同步电泳图

Fig. 2 Electrophorogram of RBBI2-3, RBBI2-3 PBS, RBBI2-3 YY46, and DNA mark sample in same step

2.3 质粒 RBBI2-3 YY46 电泳检测结果: RBBI2-3 YY46 质粒酶切产物与目的基因 RBBI2-3 同步电泳结果及以 RBBI2-3 YY46 质粒为模板进行 PCR 的产物电泳结果显示, RBBI2-3 与 YY46 连接成功, 见图 2。在实验过程中发现如果不使用中间载体 PBS, 直接使用 RBBI2-3 与植物载体 YY46 的酶解产物连接, 均不能成功筛选出阳性克隆。

2.4 基因枪轰击受体对照实验结果: 轰击 2 周后, 受体上开始形成不定芽。表 1 统计结果表明, 用真叶作基

因枪轰击受体效果最好,筛选出 3 个转基因灯盏花不定芽;其次为Ⅱ型愈伤组织,筛选出 2 个转基因灯盏花不定芽;以灯盏花的根、茎和Ⅰ型愈伤组织作基因枪轰击受体效果较差。灯盏花真叶作基因枪轰击受体效果最好有 2 个原因:第一真叶叶面积较大,易于排列紧密,捕获微弹的能力强,微弹有效轰击效率高;第二灯盏花的真叶易于形成不定芽,尤其在 MS+BA 0.5 mg/L+IAA 0.5 mg/L 培养基上形成不定芽的能力较强^[2]。根和茎圆而细长,无论排列多紧密,总有大量缝隙存在,微弹有效轰击效率降低。Ⅰ型愈伤组织与Ⅱ型愈伤组织细胞壁薄,容易被微粒击穿,导致微弹有效轰击效率低。另外Ⅰ型愈伤组织与Ⅱ型愈伤组织对抗生素 Gent. 更敏感,对真叶最合适的抗生素筛选浓度对愈伤组织可能偏高,从而导致部分转基因细胞不能正常形成不定芽。灯盏花的Ⅱ型愈伤组织呈黄绿色,为胚性愈伤组织,具有较强的形成不定芽的能力。而灯盏花Ⅰ型愈伤组织呈现无色,为原胚性愈伤组织,不能直接形成不定芽,必须转变成Ⅱ型愈伤组织后才能形成不定芽^[6,7],因此Ⅱ型愈伤组织转基因效果比Ⅰ型愈伤组织好,见表 1 及图 3、4。

表 1 基因枪轰击受体材料对照实验结果

Table 1 Control experiment result on bombarded materials by particle gun

比较内容	筛选出的转基因灯盏花不定芽数	现象
真叶	3	不定芽为绿色
根	0	逐渐褐化死亡
茎	0	逐渐褐化死亡
Ⅰ型愈伤组织	0	逐渐褐化死亡
Ⅱ型愈伤组织	2	不定芽为绿色

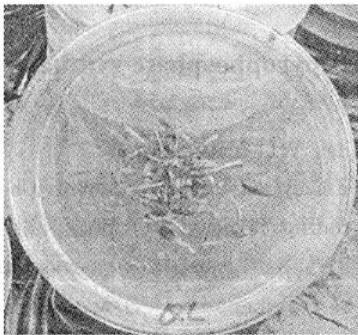


图 3 刚打完基因枪的灯盏花真叶

Fig. 3 True leaves after bombardment by particle gun

2.5 基因枪轰击压力对照实验:表 2 的统计结果显示,8.96×10⁶ Pa 的轰击压力对灯盏花真叶形成转基因不定芽效果较好。对Ⅱ型愈伤组织,效果次于真叶,且 7.58×10⁶ Pa 与 8.96×10⁶ Pa 轰击压力效果无显著差异。对根、茎、Ⅰ型愈伤组织,7.58×10⁶ Pa 与 8.96×10⁶ Pa 的效果均不满意。

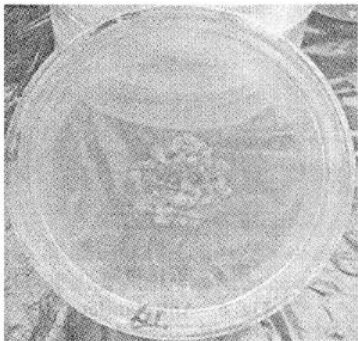


图 4 刚打完基因枪的灯盏花愈伤组织

Fig. 4 Callus after bombardment by particle gun

表 2 基因枪轰击压力对照实验结果

Table 2 Control experiment result of bombarding pressure from particle gun

比较内容	真叶	根	茎	Ⅰ型愈伤组织	Ⅱ型愈伤组织
1 100	0	0	0	0	1
1 300	3	0	0	0	1

2.6 抗性植株筛选对照实验结果:表 3 的统计结果显示,使用 50 μg/mL Gent. 作选择压力筛选 Gent. 标记的阳性转基因灯盏花植株效果最好,使用相同的培养基进行 3 次重复筛选,其结果均较稳定,不定芽形成较多绿色丛生苗。75、100 μg/mL 质量浓度过高,对细胞造成严重伤害,转基因细胞不能正常生长。将无根丛生苗移入 MS 或 1/2 MS 无激素的培养基中,生根形成完整植株。见表 3 及图 5、6。

表 3 转基因植物对 Gent. 敏感性测定结果

Table 3 Sensitivity of plant after genetic transformation on Gent.

质量浓度/ (μg · mL ⁻¹)	非转基因植物长势	转基因植物长势
0	植株绿色,长势较好	植株绿色,长势较好
25	大多白化,20%出现非白化	大多为非白化苗
50	所有苗均出现白化,无非白化苗	出现少数非白化苗
75	所有苗均出现白化,无非白化苗	无非白化苗出现
100	所有苗均出现白化,无非白化苗	无非白化苗出现

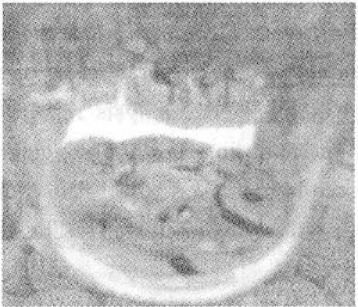


图 5 筛选抗性植株

Fig. 5 Selecting antiplasmid

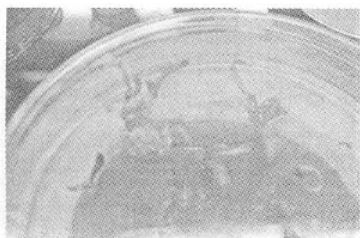


图6 抗性植株
Fig. 6 Antiplantlet

References:

- [1] Qiu L, Qu L J, Yu H, *et al.* Advances in studies on *Erigeron breviscapus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(1): 141-144.
- [2] Qiu L, Qu L J. The study of tissue culture system on *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz. in genetic trans-

- formation [J]. *J Chuzhong Norm Univ* (楚雄师范学院学报), 2004, 78(3): 91-96.
- [3] Gu H Y, Qu L J, Ming X T, *et al.* *Plant Genes and Molecular Manipulations* (植物基因与分子操作) [M]. Beijing: The Publishing Company of Peking University, 1995.
- [4] Qin X M, Ye Y, Yu L. Factors affecting microprojectile bombardment-mediated transformation of sugarcane [J]. *Guhaia* (广西植物), 2003, 23(4): 339-342.
- [5] Liu W H, Li W X, Hu S L, *et al.* Study on influencing factors of tissue culture and biolistic bombardment in wheat [J]. *Acta Bot Boreal Occident Sin* (西北植物学报), 2002, 22(3): 602-610.
- [6] Zhi P R. *Plant Tissue Culture* (植物组织培养) [M]. Guangzhou: Publishing Company of Higher Education in Guangdong, 2003.
- [7] Ma Z H, Zhang Y F, Xu C X, *et al.* Tissue culture and genetic transformation of kentucky bluegrass via microprojectile bombardment [J]. *J Fudan Univ* (复旦大学学报), 1999, 38(5): 541-544.

三七法呢基焦磷酸合酶的基因克隆及序列分析

陈 莉, 蓝秀万, 李 坤, 朱 华, 吴耀生*

(广西医科大学 生物化学与分子生物学教研室, 广西 南宁 530021)

摘要:目的 对三七法呢基焦磷酸合酶(FPS)进行基因克隆及序列分析。方法 采用cDNA末端快速扩增法,以三七根总RNA为模板扩增出三七FPS基因。结果 序列分析表明,所克隆的cDNA序列全长1 409 bp,开放阅读框共编码343个氨基酸残基,推测的氨基酸序列与积雪草、灰白银胶菊、黄花蒿的FPS的氨基酸序列同源性最高,分别达95%、87%、86%。结论 首次分离并报道了三七FPS cDNA克隆,为进一步研究三萜皂苷生物合成机制及其在提高植物药用价值方面的应用奠定基础。

关键词:三七;法呢基焦磷酸合酶;cDNA末端快速扩增法

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)07-1080-04

Genetic cloning and sequence analysis of farnesyl pyrophosphate synthase in *Panax notoginseng*

CHEN Li, LAN Xiu-wan, LI Shen, ZHU Hua, WU Yao-sheng

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: **Objective** To clone and sequence the cDNA encoding farnesyl pyrophosphate synthase (FPS) from *Panax notoginseng*. **Methods** The cDNA, encoding FPS in *P. notoginseng*, was amplified by RACE strategy with the total RNA of root as the template. The fragment of FPS was cloned and sequenced. **Results** The analysis results revealed that the full-length cDNA had 1 409 bp with an open reading frame encoding 343 amino acids of protein. The FPS sequence had 95%, 87%, and 86% amino acid sequence homology to the FPS sequence of *Centella asiatica*, *Parthenium argentatum*, and *Artemisia annua*, respectively. **Conclusion** The cDNA encoding FPS from *P. notoginseng* is cloned and reported.

收稿日期:2005-09-28

基金项目:广西科学基金(桂科基 0342003-3)

作者简介:陈 莉(1979-),女(壮族),广西柳州人,在读硕士,从事植物基因工程研究。

Tel:(0771)5358817 E-mail:flowerhua_623@163.com

* 通讯作者 吴耀生 Tel:(0771)5358817 E-mail:wuyaozheng03@sina.com