

华细辛 AFLP 反应体系的建立和优化

耿盼盼^{1,2}, 杨冬之^{2*}, 王勇波¹, 刘 忠^{1*}

(1. 上海交通大学药学院, 上海 200240; 2. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001)

摘要:目的 建立优化的华细辛 *Asarum sieboldii* AFLP 反应体系, 为华细辛遗传多样性的研究提供技术支持。方法 以华细辛叶片为材料, 对基因组 DNA 提取、酶切连接、PCR 扩增等操作过程中各关键因素进行分析, 筛选最适条件, 建立完善的 AFLP 反应体系。结果 建立了优化的华细辛 AFLP 分析体系: 在基因组 DNA 提取时, 提取液中添加巯基乙醇、样品温浴时间为 30 min; *TruI* 和 *Pst* 的酶切时间分别为 3 h; 在扩增反应中, Mg^{2+} 终浓度为 1.5 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶用量为 0.2 μ L。结论 本反应体系可获得良好的 AFLP 分析结果, 可用于华细辛遗传多样性研究。

关键词: 华细辛; AFLP 反应体系; 分子标记

中图分类号: R282.21 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)04-0625-05

Establishment and optimization of AFLP reaction system in *Asarum sieboldii*

GENG Pan-pan^{1,2}, YANG Dong-zhi², WANG Yong-bo¹, LIU Zhong²

(1. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 2. Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract : Objective To establish and optimize AFLP reaction system used in providing necessary technique basis for genetic diversity analysis in *Asarum sieboldii*. **Methods** Leaves of *A. sieboldii* were used as experimental materials to analyze various essential elements of the whole process, such as quality of extracted DNA, time of restriction digest and ligation, concentration of Mg^{2+} , primers and *Taq* DNA polymerase during PCR amplification *etc.*, so that the most optimal AFLP reaction system could be built up. **Results** The optimal AFLP reaction system of *A. sieboldii* has been constructed: in the genomic DNA extraction, mercaptoethanol being utilized and samples being incubated about 30 min at 65 °C; the genomic DNA being digested by *TruI* and *Pst* for 3 h respectively; in PCR amplification, the final concentration of Mg^{2+} being 1.5 mmol/L and the volume of *Taq* DNA polymerase being 0.2 μ L. **Conclusion** The present reaction system for *A. sieboldii* is able to gain the favorable results of AFLP analysis and can be used in the genetic diversity research of the species.

Key words: *Asarum sieboldii* Miq.; AFLP reaction system; molecular marker

细辛始载于《神农本草经》, 正品细辛的基源有 3 个, 分别为华细辛 *Asarum sieboldii* Miq.、汉城细辛 *A. sieboldii* Miq. f. *seoulense* (Nakai) C. Y. Cheng et C. S. Yang 和北细辛 *A. heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim. Kitag.), 其中, 华细辛以秦岭-大巴山为中心, 广泛分布于黄河和长江两水系的中下游流域, 包括甘肃南部、陕西南部、四川北部、重庆北部、河南西部、湖北西部、湖南西北部、江西西北部、安徽西部和南部、浙江西北部等地区。历代本草均记载产于现今陕西华山及其周围地区的华细辛质优效佳, 是细辛的传

统道地药材。自 20 世纪 90 年代以来, 由于临床和医药工业需求量增大, 细辛药材的市场价格逐年上扬, 从而引起过度采挖, 导致华细辛野生资源急剧减少, 现已被列为国家三级保护植物^[1]。然而, 迄今为止, 有关华细辛遗传背景的研究十分缺乏, 仅有零星报道^[2,3]。因此, 非常有必要对华细辛的遗传分化和种群遗传结构进行深入系统的研究, 为华细辛资源的合理开发、可持续利用和保护策略的制定提供理论依据。

扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphis, AFLP) 技术由 Vos 等^[4]发

* 收稿日期: 2008-06-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30772725)

作者简介: 耿盼盼 (1983—), 女, 河南省郑州市人, 郑州大学生物工程系硕士, 主要从事植物资源学研究。

* 通讯作者 杨冬之 E-mail: ydongzhi@sohu.com

刘 忠 Tel: (021) 34206098 E-mail: liuzhong@sjtu.edu.cn

明,是建立在对 DNA 限制性酶切片段进行选择扩增基础上的分子标记技术。在设计原理上,该技术结合了 RFLP 和 RAPD 各自的优点,既有 RFLP 的准确性,又有 RAPD 的易操作性。同时,一次 AFLP 反应的产物在变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中可检测到的条带数目在 50~150,其检测效率之高是其他分子标记方法无可比拟的,因此,该技术一经发明,便迅速成为了遗传多样性、种质鉴定、目的基因定位等研究中广泛运用的分析技术。

本研究在 Vos 等 AFLP 分析技术的基础上,通过优化反应条件,建立了适合华细辛 AFLP 分析的反应体系,并在此基础上,开展了对华细辛遗传多样性的研究,分析了不同产地华细辛的遗传差异,为华细辛药材品质评价、质量控制、优良遗传资源的利用积累了基本资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料:实验材料为硅胶干燥保存的华细辛花期叶片,样品来源见表 1。每个种群的采样量为 20~30 个个体。

表 1 华细辛实验材料

Table 1 Materials used in study

采集地点	采集号	采集地点	采集号
江西庐山	2004-021	安徽黄山 3	2004-039
浙江天目山 1	2004-028	重庆城口 1	2004-049
浙江天目山 2	2004-029	重庆城口 2	2004-053
安徽黄山 1	2004-037	陕西华山	2004-056
安徽黄山 2	2004-038		

主要试剂:限制性内切酶 *TruI* 和 *Pst*, *Taq* DNA 聚合酶 (MBI Fermentas 公司), T_4 连接酶 (Takara 公司),引物由上海英骏公司合成,接头由 Takara 公司合成。

主要仪器设备:Eppendorf Centrifuge 5415D 离心机,Eppendorf Mastercycler PCR 仪,Eppendorf BioPhotometer 紫外/可见分光光度计,LKB 垂直电泳槽,北京六一 DYY-10C 高压电泳仪,天能科技紫外成像系统。

1.2 基因组 DNA 的提取:每个种群抽取 20 个个体,每个个体称取 20 mg 干燥叶片混合成基因池,以 Bekesiova 等的 CTAB 法^[5]为基础,进行基因组 DNA 的提取。根据实验材料,提取过程中,对 Bekesiova 等的提取方法进行适当调整:添加了抗氧化剂巯基乙醇;将 65℃ 水浴时间控制在半小时以内。具体操作步骤如下:在 2 mL 离心管中依次加入 300 μ L 提取缓冲液 [0.35 mol/L Sorbitol, 0.1 mol/L Tris HCl (pH 7.5), 0.5 mmol/L ED-

TA], 300 μ L 提取缓冲液 [0.2 mol/L Tris HCl (pH 7.5), 0.5 mmol/L EDTA (pH 7.5), 2 mol/L NaCl, 2% CTAB] 和 30 μ L 巯基乙醇,置于 65℃ 水浴中预热。从混合好的基因池中取出 30 mg 放入已灭菌的研钵中,加入液氮后将其研磨成粉末并迅速转入已预热的 2 mL 离心管中。加 120 μ L 十二烷基肌氨酸钠,将离心管用力振荡数次。65℃ 温浴 30 min 后室温静置 10 min。加 700 μ L 苯酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1),混匀,12 000 r/min 离心 10 min,取上清。加入 700 μ L 氯仿-异戊醇 (24:1),混匀,12 000 r/min 离心 10 min,取上清。加入 800 μ L -20℃ 预冷的异丙醇,经缓慢颠倒混匀,4 过夜后 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清。用 70% 乙醇洗沉淀 2 次,在超净工作台上室温晾干,加 100 μ L 灭菌双蒸水溶解 DNA。提取所得 DNA 的浓度与质量用紫外分光光度法和 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.3 AFLP 反应体系的建立和优化:华细辛 AFLP 反应体系的建立参照 Vos 等^[4]的方法,并对各关键因素进行优化处理。

1.3.1 酶切与连接:本研究选用了具高频切点的 *TruI* (*Mse* 的同裂酶)和低频切点的 *Pst* 作为限制性内切酶组合对样品的基因组 DNA 进行酶切消化。参照 Fermentas 公司内切酶产品说明,*TruI* 在 65℃、*Pst* 在 37℃ 分步酶切。为了确定酶切最适时间,将酶切时间均设定为 2、3、4 h 3 个梯度 (表 2)。基因组 DNA 酶切消化后,于 80℃ 灭活酶活性 20 min 以终止反应。双酶切结果用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

酶切产物中加入接头和 T_4 连接酶,连接反应在 16℃ 过夜的条件下进行 (表 2)。

1.3.2 预扩增:先将连接产物于 70℃ 灭活 10 min,再用带一个选择性碱基的预扩增引物以连接产物为模板进行 PCR 扩增。扩增程序为:94℃、30 s,56℃、30 s,72℃、1 min,30 个循环。PCR 反应受 Mg^{2+} 、dNTPs、引物、模板等的浓度以及循环数等多种因素影响,因此针对不同的材料应予以调整,以建立最优的反应条件。本实验中,考察了 Mg^{2+} 终浓度和引物用量对 PCR 反应的影响。 Mg^{2+} 终浓度设定为 1.0、1.5、2.0 mmol/L 3 个梯度,引物用量设定为 1.0 μ L 和 1.5 μ L 两个梯度。各反应体系标记为 a~f (表 3)。预扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,其余的稀释 40 倍后于 4℃ 保存,作为下一步选择性扩增的模板。

表 2 酶切和连接反应体系

Table 2 Reaction systems of restriction digest and ligation

<i>TruI</i> 酶切		<i>Pst</i> 酶切		连接	
成分	体积/μL	成分	体积/μL	成分	体积/μL
10 ×buffer	1.0	10 ×buffer	2.0	10 ×buffer	2.5
<i>TruI</i> (10 U/μL)	0.5	<i>Pst</i> (10 U/μL)	0.5	T ₄ 连接酶	1.0
DNA 500 ng	x	DNA	5.0	<i>TruI</i> Adaptor (50 pmol)	0.5
ddH ₂ O	8.5 - x	ddH ₂ O	12.5	<i>Pst</i> Adaptor (5 pmol)	0.5
				酶切产物	12.5
				ddH ₂ O	8.0
总体积为 10 μL		总体积为 20 μL		总体积为 25 μL	

x 表示含有 500 ng DNA 的样本体积是一个不确定的数,而用于补足总体积的 ddH₂O 的用量需据此进行相应调整

Because volume of each sample containing 500 ng DNA is various (expressed by x μL), volume of ddH₂O which is used as complement for reaction system should be adjusted accordingly

表 3 预扩增反应体系

Table 3 Reaction systems of pre-amplification

	体系 a/μL	体系 b/μL	体系 c/μL	体系 d/μL	体系 e/μL	体系 f/μL
连接产物	2	2	2	2	2	2
<i>TruI</i> 预扩增引物 (50 ng/μL)	1.0	1.0	1.0	1.5	1.5	1.5
<i>Pst</i> 预扩增引物 (50 ng/μL)	1.0	1.0	1.0	1.5	1.5	1.5
dNTPs (2.0 mmol/L)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Mg ²⁺ (25 mmol/L)	1.0	1.5	2.0	1.0	1.5	2.0
10 ×buffer	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
<i>Taq</i> 聚合酶 (5 U/μL)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

补足 ddH₂O 到总体积为 25 μL

25 μL should be used as complement for total volume of ddH₂O

1.3.3 选择性扩增:在进行选择性扩增时,考察了 Mg²⁺ 终浓度和 *Taq* DNA 聚合酶用量对扩增反应的影响。将 Mg²⁺ 终浓度设为 1.5 和 2.0 mmol/L 两个梯度、*Taq* DNA 聚合酶用量设为 0.1 和 0.2 μL 两个梯度进行反应(表 4)。PCR 反应的循环参数为:第 1 环节,先以 94 °C、30 s,65 °C、30 s,72 °C、1 min 进行一个循环,此后 13 个循环,每个循环的复性温度下降 0.7 °C;第 2 环节,94 °C、30 s,56 °C、30 s,72 °C、1 min,运行 23 个循环。反应结束后,扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行预检测,余皆置于 4 °C 保存。

表 4 选择性扩增反应体系

Table 4 Reaction systems of selective amplification

	体系 a/μL	体系 b/μL	体系 c/μL	体系 d/μL
预扩增产物	2	2	2	2
<i>TruI</i> 选择性预扩增引物 (50 ng/μL)	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Pst</i> 选择性预扩增引物 (50 ng/μL)	1.0	1.0	1.0	1.0
dNTPs (2.0 mmol/L)	2.0	2.0	2.0	2.0
Mg ²⁺ (25 mmol/L)	1.5	2.0	1.5	2.0
10 ×buffer	2.0	2.0	2.0	2.0
<i>Taq</i> 聚合酶 (5 U/μL)	0.2	0.2	0.1	0.1

补足 ddH₂O 到总体积为 20 μL

20 μL should be used as complement for total volume of ddH₂O

1.4 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳:依次量取 6% 聚丙烯酰胺 60 mL、10% 过硫酸胺 300 μL、TEMED

30 μL,于烧杯中快速混匀(注意不产生气泡)后,注入已安置妥当的玻璃板之间,插好梳子,胶充分凝结后待用。40 W 恒功率预电泳 0.5 h。在选择性扩增产物中加入等体积 loading buffer (98% 甲酰胺,10 mmol/L EDTA,0.125% 溴酚蓝,0.125% 二甲苯氰),95 °C 变性 5 min,取出后立即置于冰浴中以防复性。60 W 恒功率电泳约 2.5 h。

1.5 银染检测:电泳后的银染检测程序参照 Bas-sam 等^[6]方法。将有凝胶的短玻璃板放在 2 L 10% 冰醋酸中,轻摇约 30 min,至二甲苯氰颜色褪去。用超纯水冲洗 3 次,每次 2 min。放入 2 L 银染液中轻摇,注意避光,以免硝酸银见光分解。染色 30~40 min。用超纯水迅速冲洗玻璃板,然后放入 2 L 预冷的显色液中,轻摇大约 5 min,条带即显现。在背景尚未变深时用 10% 冰醋酸终止显色,漂洗,室温干燥。用数码相机拍摄银染结果,统计条带并分析数据。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的提取:应用 Bekesiova CTAB 法提取的华细辛基因组 DNA,质量基本符合 AFLP 分析的要求,然而得率尚不十分理想(图 1)。分析其原因,可能与华细辛植株中酚类物质较多有关,因为酚类氧化后与 DNA 共价结合并引起 DNA 降

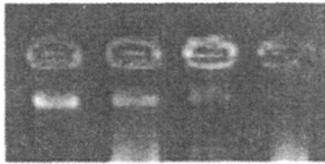


图 1 Bekesiova CTAB 法提取的华细辛基因组 DNA

Fig. 1 Genomic DNA of *A. sieboldii* extracted with Bekesiova CTAB method

解。此外,还有研究者认为,酚类以及多糖、色素等会影响 DNA 聚合酶的活性,干扰引物与模板的结合,导致扩增失败。所以,针对材料本身特点,实验中对 Bekesiova CTAB 法作了适当的改进,抽提时使用了巯基乙醇,其—SH 可打断多酚氧化酶的二硫键而使之失活,从而有效地防止酚类被氧化^[7]。对 65 温浴时间也有所控制。经实验,65 温浴时间在 30 min 左右比较合适,时间过短不能充分释放 DNA,时间过长则会降解 DNA,减少得率。

用优化后的 Bekesiova CTAB 法提取的基因组 DNA 在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳能呈现清晰、无弥散的整齐条带。同时,经紫外分光光度计检测,吸光度比值在 1.7~1.9,表明基因组 DNA 完整性较好,纯度高,适于 AFLP 分析(图 2)。

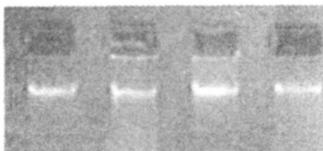


图 2 优化的 Bekesiova CTAB 法提取的华细辛基因组 DNA

Fig. 2 Genomic DNA of *A. sieboldii* extracted with modified Bekesiova CTAB method

2.2 AFLP 反应体系的建立与优化

2.2.1 酶切与连接:基因组 DNA 是否酶切消化完全是 AFLP 分析成功与否的关键之一。酶切时间不够,导致酶切不完全,扩增产物将不能反映真实酶切位点的分布情况,实验结果不稳定。酶切时间过长,会产生星活性,降低 PCR 反应的特异性。根据实验结果(图 3,其中 A、B、C 分别表示双酶切 2、3、4 h),酶切 2 h,基因组 DNA 没有被消化完全,表明酶切时间不够;酶切 4 h,几乎看不到大片段,说明酶切的时间过长;酶切 3 h,酶切产物为连续的大小不同的 DNA 片段,在凝胶上呈涂抹状,表现为合适的酶切时间。

2.2.2 预扩增:预扩增起着承上启下的作用,既反映酶切和连接效果,又直接影响下一步选择性扩增的成功。理想的预扩增产物相对分子质量应在 50~1 000 bp,扩增信号较强,各样品间相对一致。

结果显示, Mg^{2+} 终浓度为 1.5 mmol/L,引物用量为 1.5 μ L 时预扩增产物的分布范围及产量都比较合适(图 4)。

2.2.3 选择性扩增:实验结果显示(图 5),当 Mg^{2+} 终浓度为 1.5 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶用量为 0.2 μ L 时选择性扩增的效果最好,PCR 产物的分布范围以及特异性条带都比较合适。

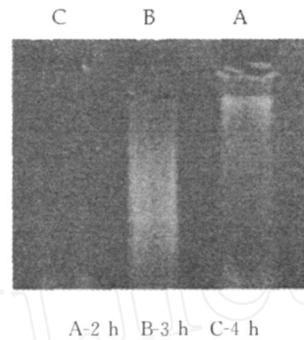


图 3 华细辛基因组 DNA 不同酶切时间电泳图

Fig. 3 Different times in restriction digest of genomic DNA of *A. sieboldii*

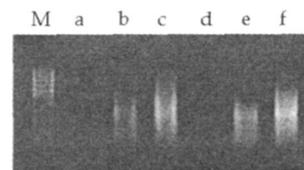


图 4 6 个不同反应体系的预扩增产物

Fig. 4 Pre-amplification products from six different reaction systems

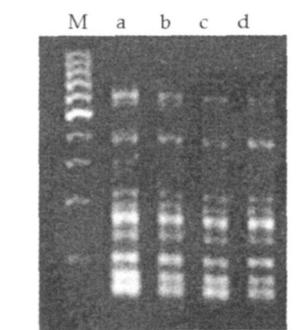


图 5 4 个不同反应体系的选择性扩增产物

Fig. 5 Selective amplification products from four different reaction systems

2.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染检测:电泳时温度不可过高,可通过使用循环水装置,将玻璃板温度控制在 40 左右。温度过高会使 DNA 带纹发虚、发散。银染液要充分摇匀后再将玻璃板放入,否

则银颗粒会潜入胶中,使背景杂乱。实验时,如果环境温度低,要适量延长染色时间,使着色充分,条带清晰。显影时要把握时间,既要使条带充分显现,又不能显色时间过长导致背景加深,影响观察。图 6 是引物对 PM65 的扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后的银染检测结果。

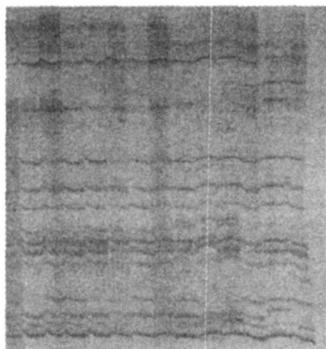


图 6 引物对 PM65 的扩增产物银染检测结果

Fig. 6 Silver staining profiling of products amplified with primers combination of PM65

3 讨论

目前对华细辛的研究多集中在本草学、驯化栽培、成分分析、药理毒理、临床应用等方面,而遗传背景的研究比较少。进行植物遗传多样性研究的分子标记方法很多,其中 AFLP 技术尤为突出。但 AFLP 操作过程繁琐,每一环节都与结果密切相关,而不同的研究材料有着不同的特性,所以在进行华细辛遗传多样性的 AFLP 标记分析时,建立最佳的反应体系是必不可少的基础性工作。

获得高质量的基因组 DNA 是整个分析工作得以顺利进行的基本前提,影响植物总 DNA 提取质量的干扰因素常常是植物体内高含量的多糖类、蛋白质和酚类等物质。因此,适宜的提取方法就是能有效地去除这些干扰因素,从而获得高纯度的 DNA。有关植物基因组 DNA 的提取在一些重要的经济作物中已有许多成熟的方案,如 An Michiels 等^[8]用 CTAB 法从多乳汁的植物中获得了高质量的基因组 DNA,王文江等^[9]采用改进的 CTAB 法从柿树叶片中提取得到了纯度较高的 DNA,可用于 AFLP 分析。茅膏菜是一类可捕食昆虫的植物,其体内富含黏液,多糖类和蛋白质类的量较高。根据茅膏菜的特性,Bekesiova 建立了适宜的提取方法,获得了高质量的总 DNA^[5]。因此,Bekesiova 的 DNA 提取方法在去除多糖类和蛋白质类方面具有比较强的能力。本研究在 Bekesiova 方法的基础上,进一步考虑到华细辛酚类成分的量较高的特点,对其方法进

行了适当的修正,最终获得了满意的结果。

在 PCR 扩增反应中, Mg^{2+} 终浓度不仅影响 Taq DNA 聚合酶的活性, Mg^{2+} 还能与 dNTP、模板及引物结合,从而影响模板的解链温度、引物与模板的结合效率以及产物的特异性^[10]。所以本研究重点对 Mg^{2+} 终浓度、引物及 Taq DNA 聚合酶用量进行了梯度对照,筛选到了最佳用量配比。dNTP 是 AFLP 反应的原料,dNTP 浓度过高,导致扩增反应中模板与引物的错配,使扩增出现非特异性,浓度过低又会影响扩增效率。因此,对于 dNTP 的最适用量也是需要经过对比分析才能确定的。

扩增产物必须与完善的凝胶检测手段结合,才会产生理想的 AFLP 指纹。首先,有必要用浓度较大的(通常用 1.5%)琼脂糖凝胶电泳对选择性扩增产物进行预检测,观察扩增产物的多态性高低,验证扩增反应的成败,为下一步聚丙烯酰胺凝胶检测做准备。目前有多种方法检测 AFLP 产物的多态性,其中,AFLP 同位素或荧光标记试剂盒比较方便简单,但是试剂盒价格昂贵,并不适合于大批量样品的分析,所以在保证试验结果理想的前提下选用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结合银染检测的方法更具实用性,是一般实验室可以考虑的方案。

通过对 AFLP 分析过程各环节反应体系的优化,确定了适宜华细辛基因组 DNA 提取、酶切连接、PCR 扩增以及变性聚丙烯酰胺凝胶电泳-银染检测分析的最佳反应条件,获得了理想的指纹图谱,为研究华细辛遗传多样性及其种质资源保护等提供了良好的技术保障。

参考文献:

- [1] 刘红. 湖北恩施地区珍稀濒危药物资源简介 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2004, 67: 100-102.
- [2] 刘春生, 白根本, 阎玉凝. 基于核 DNA ITS 序列的细辛药材基源及分子鉴定研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(5): 329-332.
- [3] 顾蔚, 王喆之. 华细辛种质资源保护的研究 [J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2006, 34(1): 81-84.
- [4] Vos P, Hngera R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA finger-printing [J]. Nucl Acid Res, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [5] Bekesiova I, Nap J-P, Mlynarova L. Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia* [J]. Plant Mol Bio Rep, 1999, 17: 269-277.
- [6] Bassan B J, Caetano A G, Gresshoff P M, et al. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. Anal Biochem, 1991, 196: 80-83.
- [7] 黄文坤, 郭建英, 万方浩, 等. 紫茎泽兰 DNA 的提取及 AFLP 反应体系的建立 [J]. 武汉植物学研究, 2006, 24(6): 498-504.
- [8] Michiels A, Van den Ende W. Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants [J]. Anal Biochem, 2003, 315: 85-89.
- [9] 王文江, 张桂霞, 张志华. 适于 AFLP 分析的柿树 DNA 提取方法研究 [J]. 河北农业大学学报, 2004, 27(5): 41-45.
- [10] 万翔, 刘富中, 宋明, 等. 茄子 AFLP 技术体系的优化与建立 [J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2005, 27(2): 226-229.