

分离、纯化及鉴定肝细胞和免疫细胞分泌的 HMGB1

萧梅芳¹, 戴霞红¹, 周蓉蓉¹, 刘建平², 章保新¹, 赵树山¹, 范学工¹

(中南大学 1. 湘雅医院传染科, 长沙 410008; 2. 现代分析测试中心, 长沙 410078)

[摘要] 目的:分离纯化肝细胞 HepG2 与免疫细胞 U937 分泌的高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1), 并加以鉴定。方法:体外培养人肝细胞 HepG2 与免疫细胞 U937, 采用 400 ng/mL 的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激 20 h 后收集细胞培养液上清。采用超滤浓缩, 阳离子交换层析, 阴离子交换层析, Sephadex G75 凝胶过滤层析结合免疫沉淀的方法, 进行分离纯化; 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)及 Western 印迹进行蛋白分子质量及性质鉴定。结果:2 株细胞分离纯化得到的蛋白经 SDS-PAGE 鉴定其纯度达 90% 以上, 分子质量约为 26 kD, Western 印迹鉴定为 HMGB1。结论:该纯化方法可获得纯度较高的 HMGB1。

[关键词] 高迁移率族蛋白 1; 分离纯化; HepG2 细胞; U937 细胞

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2011.11.006

Purification and identification of HMGB1 secreted by liver cells and immune cells

XIAO Meifang¹, DAI Xiahong¹, ZHOU Rongrong¹, LIU Jianping²,
ZHANG Baoxin¹, ZHAO Shushan¹, FAN Xuegong¹

(1. Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008;

2. Modern Analysis and Testing Center, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: **Objective** To purify and identify HMGB1 secreted by liver cells HepG2 and immune cells U937. **Methods** We cultured the liver cell lines HepG2 and immune cell lines U937, and stimulated them with HMGB1 (400 ng/mL) for 20 h. Then the supernatant was collected. Ultrafiltration centrifugation, CM-Sepharose cation, DEAE-Sepharose anion exchange chromatography, Sephadex G75-gel filtration chromatography, and immunoprecipitation were used for purification. The molecular weight and identity of HMGB1 was confirmed by SDS-PAGE and Western blot. **Results** A sharp stained protein band with a molecular weight of about 26 kD was obtained by SDS-PAGE analysis and shown to be HMGB1 confirmed by Western blot. **Conclusion** High purified HMGB1 can be separated from these two cell lines.

Key words: HMGB1; separation and purification; HepG2 cells; U937 cells

收稿日期 (Date of reception) 2011-03-04

作者简介 (Biography) 萧梅芳, 博士研究生, 医师, 主要从事病理性肝炎感染与免疫方面的研究。

通信作者 (Corresponding author) 范学工, E-mail: xgf@hotmai.com

基金项目 (Foundation items) 国家自然科学基金 (30972621); 湖南省自然科学基金 (11JJ4074); 湖南省科技厅计划项目 (2011TT2060); 中南大学大学生创新实验计划 (YD10145); 中南大学湘雅医学院优秀博士生选题计划。 This work was supported by the Natural Science Foundation of China (30972621), the Natural Science Foundation of Hunan Province, P. R. China (11JJ4074), the Office of Hunan Science and Technology (2011TT2060), and the grant from the Central South University (YD10145).

高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1) 于 20 世纪 70 年代在小牛胸腺中被发现, 是一类在真核细胞中含量丰富的非组蛋白核蛋白, 作为核 DNA 结合蛋白, HMGB1 能维持核小体结构, 调节基因转录, 对 DNA 的复制、转录、重组和修复具有重要作用^[1]。近年研究^[2]表明: 细胞核内 HMGB1 转移到胞外后, 演变成一种炎症介质, 在脓毒症等全身炎症性疾病中发挥重要作用。既往研究^[3-6]发现 HMGB1 可由激活的免疫细胞主动分泌, 或是坏死和受损细胞被动释放至细胞外。本课题组已证明肝细胞在一定的刺激条件下能主动分泌 HMGB1^[7-8], 本研究旨在通过超滤、层析、免疫沉淀相结合的方法纯化分离并鉴定肝细胞和免疫细胞分泌的 HMGB1, 为进一步研究 2 种不同细胞分泌的 HMGB1 在结构及功能方面的异同奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝细胞株 (HepG2) 由本实验室保存, 人免疫细胞株 U937 购自中国科学院细胞库。DMEM 培养基, RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司; 新生牛血清购自杭州四季青生物制品公司; 丙烯酰胺购置美国 Bebcos 公司。CM-Sepharose, DEAE-Sepharose 和 Sephadex-G75 为美国 Amersham 公司产品。免疫沉淀试剂盒 (Seize™ Primary) 购自美国 Pierce 公司。Western 印迹用 HMGB1 单克隆抗体, SDS, 分子质量标准蛋白购自美国 Sigma 公司。10 kD 超滤管购自美国 Milipore 公司。其他试剂均为国产分析纯。

蛋白电泳仪、转膜系统及凝胶成像及分析系统均为美国 Bio-Rad 公司产品, 蛋白质层析系统为德国 LKB 产品。pHS-2C 型精密 pH 计为上海雷磁仪器厂产品; DZ-2 型自动电位滴定仪为上海第二仪器厂产品; 垂直凝胶电泳系统及恒流泵为 Pharmacia fine chemicals 产品; 日立 100-400 型紫外分光光度仪和高速冷冻离心机 (HIMAC CR21G) 为日本日立公司产品

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

本实验使用含 15% FBS 的 DMEM 培养基或 RPMI-1640 培养基在 37 °C, 5% CO₂ 的条件下培养。使用 0.25% 胰蛋白酶进行消化法传代, 大量培养后备用。细胞贴壁 24 h 后换无血清培养基, 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激 20 h 后, 收集细胞上清, 10 kD 超滤管超滤除盐浓缩后, -80 °C 保存。

1.2.2 分离纯化

1.2.2.1 阳离子交换层析纯化

超滤浓缩后的目的蛋白通过离子交换柱进行洗脱, 方法参照文献^[9]。选用 CM-Sepharose Fast Flow 填料, 按说明在 pH8.4 的条件下装柱。离子柱用 0.1 mol/L NaOH 溶液浸泡过夜除去热原, 首先用蒸馏水洗至中性, 然后再用 pH8.4 缓冲液平衡后, 获柱高 12 cm, 柱体积为 55.65 cm³。以平衡缓冲液冲洗至基线后, 先用缓冲液调节经超滤浓缩后的滤液 pH 值至 8.4 后上样, 每次加样体积为 400 μL, 蛋白总量为 5~6 mg。上样后, 分别用洗脱液进行逐步洗脱 (洗脱液分别为 pH8.4 缓冲液, 2.0 mol/L NaCl, 蒸馏水)。洗脱速度约 10 滴/min, 紫外线检测仪在 254 nm 处进行检测, 分别收集各洗脱峰进行鉴定。

1.2.2.2 阴离子交换层析

经阳离子交换层析后得到含有目的蛋白的样品, 浓缩后进行阴离子交换柱层析, 选用 DEAE-Sepharose Fast Flow 填料, 按说明在 pH8.4 的条件下装柱。离子柱用 0.1 mol/L NaOH 溶液浸泡过夜除去热原, 首先用蒸馏水洗至中性, 然后再用 pH8.4 缓冲液平衡后, 获柱高 30 cm, 柱体积为 33.32 cm³。洗脱液分别为 pH8.4 缓冲液, pH4.0 缓冲液, 2.0 mol/L NaCl, 蒸馏水。其余具体实验操作步骤同 1.2.2.1。

1.2.2.3 Sephadex G-75 凝胶过滤层析

经阴离子交换层析后得到的含有目的蛋白的样品, 超滤浓缩后进行 Sephadex G-75 凝胶过滤 (柱高 30 cm, 体积 16.86 cm³)。洗脱液分别为 pH8.4 的缓冲液, 2.0 mol/L NaCl, 蒸馏水。其余具体实验操作步骤同 1.2.2.1。

1.2.2.4 免疫沉淀

严格按照免疫沉淀试剂盒说明书进行操作, 所有操作均在室温下进行。所有的离心操作均为 3 000~5 000 r/min。其主要操作步骤如下: (1) 单克隆抗体与凝胶偶联。将 400 μL 轻轻搅拌混匀的偶联凝胶加入过滤柱, 置离心管中离心; 0.4 mL 偶联缓冲液洗凝胶柱 2 次; 以偶联缓冲液稀释单克隆抗体至 1 μg/μL 后加入凝胶柱; 置通风柜中, 加入还原剂 1 μL/100 μL, 孵育过夜, 此过程中需不断轻轻翻转混合; 离心后将过滤柱置于新离心管中, 加入 0.4 mL 偶联缓冲液, 轻轻翻转 10 次后离心; 加入 0.4 mL 抑制缓冲液, 翻转 10 次并离心; 向凝胶中加入 0.4 mL 抑制缓冲液, 置通风柜中, 加入还原剂 4 μL, 孵育 30 min, 此过程中不断轻轻翻转混合; 离心后用 0.4 mL 洗液洗凝胶 6 次, 0.4 mL 结合缓冲液

洗凝胶3次。2) 抗原的免疫沉淀。将过滤柱置于新离心管中,向已结合抗体的凝胶中加入粗提抗原样品,4℃过夜(此过程中不断轻轻翻转混合)后离心。将过滤柱置于新离心管中,用0.4 mL免疫沉淀缓冲液洗3次。3) 目标抗原的洗脱。向凝胶·抗原抗体复合物中加入200 μL洗脱缓冲液,轻叩混匀后离心。所获样品经过真空干燥适当浓缩后,紫外分光光度计测定蛋白浓度后,-20℃保存备用。

1.2.3 纯度及分子质量鉴定

采用不连续垂直平板电泳系统,对纯化后的目的蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)纯度分析,参照文献[10]进行两层不连续电泳,分离胶和浓缩胶浓度分别为12%和5%,采用Tris缓冲体系。将蛋白混合液和上样缓冲液混合后煮沸2~5 min,每孔上样20 μL(约含蛋白20 μg),浓缩胶保持80 mA,分离胶控制在120 mA,电泳2 h,考马斯亮蓝R-250染色,以标准蛋白做对照,凝胶成像分析系统分析蛋白条带。

1.2.4 蛋白浓度测定

按Bradford法进行^[11]。即用0.5% NaCl为缓冲液,考马斯亮蓝为染料,牛血清白蛋白为标准,取5

支试管,蛋白浓度按顺序梯度增加,595 nm处测定吸光度值,空白管调零,绘制标准曲线,查取蛋白浓度。

1.2.5 蛋白质性质鉴定

根据电泳结果,取含HMGB1的样品,用于Western印迹。行常规12%的SDS-PAGE后,转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉包被2 h,人抗HMGB1单克隆抗体(1:2 000)为一抗,辣根过氧化物(HRP)标记的兔抗鼠抗体(1:500)为二抗,ECL显色,观察并记录结果。

2 结 果

2.1 分离纯化

2.1.1 阳离子柱交换层析

当用pH8.4缓冲液进行洗脱时,目的蛋白带负电荷,从阳离子交换柱洗脱下来,经在线紫外检测仪254 nm处进行检测,从左到右洗脱峰主要有3个,分别收集这3个组分,经Western印迹鉴定,目的蛋白存在于pH8.4缓冲液冲洗的第3个峰,第1和第2个峰中不含有目的蛋白,洗脱图谱见图1。

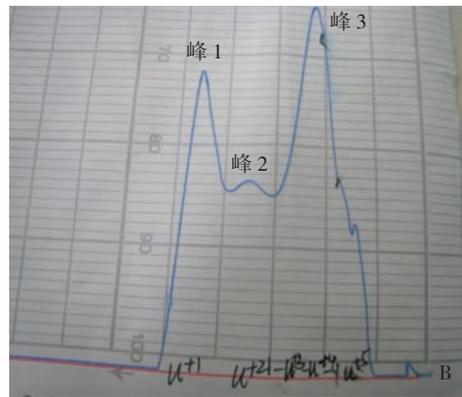
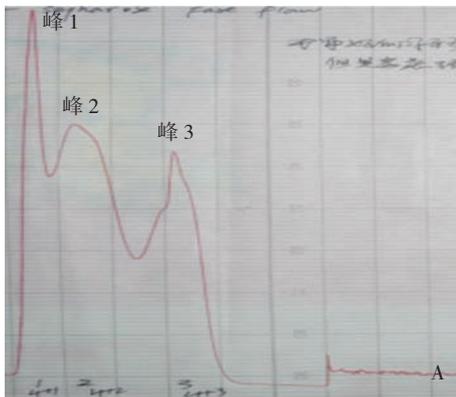


图1 CM柱洗脱图谱。A:HepG2细胞;B:U937细胞。

Fig. 1 CM column elution profile. A:HepG2; B:U937.

2.1.2 阴离子柱交换层析

当用pH8.4缓冲液洗脱时,目的蛋白带负电荷,被挂上阴离子柱;当用pH4.0缓冲液进行洗脱时,目的蛋白带正电荷,应该从阴离子柱洗脱下来;但是由于疏水的作用,用2.0 mol/L NaCl洗脱时,目的蛋白才被冲洗下来。经紫外线检测仪在254 nm处检测,HepG2细胞共收集到2个洗脱峰,U937细胞共收集到3个洗脱峰,经Western印迹鉴定,目的

蛋白存在于2.0 mol/L NaCl冲洗的第1个峰,而大部分杂质存在与第2个峰中,洗脱图谱见图2。

2.1.3 SephadexG-75凝胶过滤层析

经过pH8.5缓冲液洗脱后收集到2个洗脱峰,经Western印迹鉴定,目的蛋白存在于pH8.5冲洗的第2个峰,而大部分杂质存在于第1个峰中。洗脱图谱见图3。

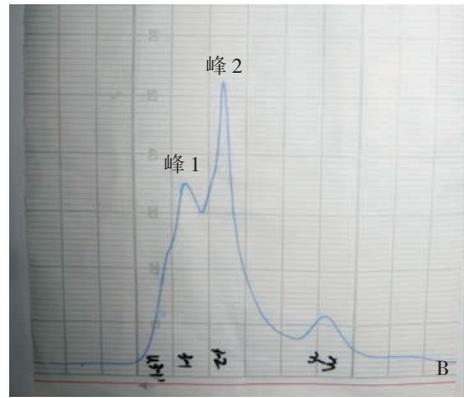
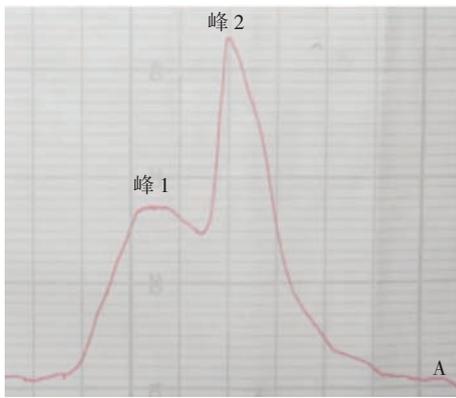


图 2 DEAE 柱洗脱图谱。A:HepG2 细胞; B:U937 细胞。

Fig. 2 DEAE column elution profile. A:HepG2; B:U937.

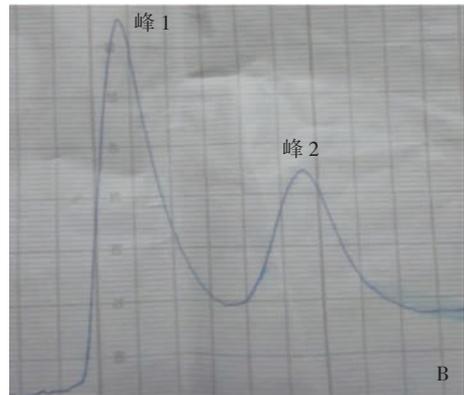
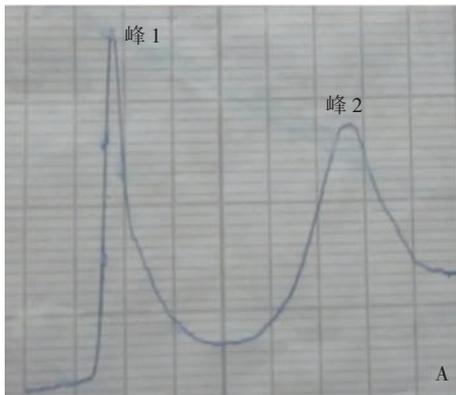


图 3 SephadexsG-75 柱洗脱图谱。A:HepG2 细胞; B:U937 细胞。

Fig. 3 SephadexsG-75 column elution profile. A:HepG2; B:U937.

2.2 纯度鉴定

含有 LPS 刺激肝细胞 (HepG2) 和免疫细胞 (U937) 分泌的 HMGB1 的细胞上清液, 依次采用 CM 柱, DEAE 柱, G75 柱, 免疫沉淀分离纯化后的目的蛋白进行 SDS-PAGE。由图 4 可见肝细胞 (HepG2) 和免疫细胞 (U937) 分泌并纯化的蛋白在约 26 kD 处出现单一条带, 电泳扫描后计算, 纯度可达 90% 以上, 说明 2 种细胞纯化的样品均为单一组分。

2.3 蛋白质性质的鉴定

将经 CM 柱, DEAE 柱, G75 凝胶柱, 免疫沉淀序贯分离纯化后的目的蛋白, 经 SDS-PAGE 后, 将蛋白条带转移到 PVDF 膜上, 先后与 HMGB1 单抗和酶标二抗反应后, ECL 显色, 凝胶成像分析。结果显示: 在 PVDF 膜上呈现单一抗原抗体杂交带, 无非特异性条带出现, 证实该蛋白确系 HMGB1。结果见图 5。

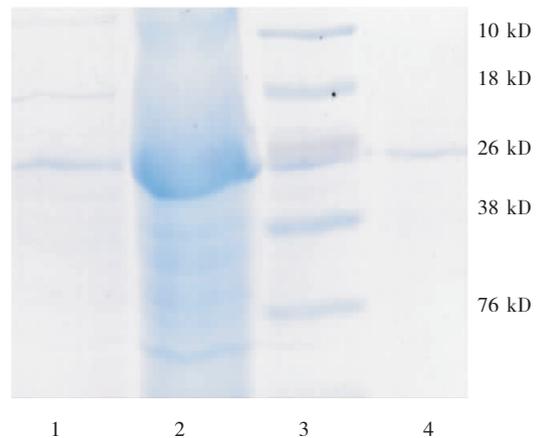


图 4 HMGB1 的 SDS-PAGE。1:U937; 2:未纯化的 HMGB1; 3:Marker; 4:HepG2。

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of HMGB1. 1:U937; 2:Un-purified HMGB1 protein; 3:Marker; 4:HepG2.

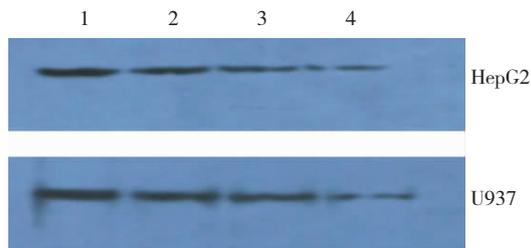


图5 Western 印迹鉴定目的蛋白 HMGB1。1:CM 柱峰 3; 2:DEAE 柱峰 1; 3:G75 凝胶柱峰 2; 4:免疫沉淀分离后蛋白。

Fig. 5 Western blot analysis of HMGB1. 1: The third peak of DEAE colume; 2: The first peak of DEAE colume; 3: The second peak of G75 gel colume; 4: The protein after immunoprecipitation.

3 讨 论

本课题组的前期研究^[7-8]结果表明肝细胞在一定的刺激条件下能主动分泌 HMGB1。肝细胞分泌的 HMGB1 与免疫细胞主动分泌的 HMGB1 有无区别,它有什么生理病理意义呢? 这成为研究者关注的焦点。因此本研究采用超滤、层析和免疫沉淀相结合的方法,纯化分离肝细胞和免疫细胞分泌的 HMGB1。

纯化的蛋白必须保持免疫活性,为此,应严格控制纯化条件。蛋白在常温下极易失活,因此蛋白的超滤浓缩尽量控制在 4 ℃ 以下条件中进行。人肝细胞 HepG2 和免疫细胞 U937,用 LPS(400 ng/mL) 刺激 20 h 后收集细胞培养上清,并用 Western 印迹检测 HMGB1 的表达,然后大量培养并收集细胞上清,先用超滤管进行蛋白初分离。超滤是利用错流层析的原理,在不间断流动的状态下将溶液中的溶质按分子质量大小用滤膜分开,优点是易造成滤膜的堵塞。据报道 HMGB1 分子质量约为 30 kD^[12],笔者选择 10 kD 滤膜进行超滤。其能有效地滤过 30 kD 以下的小分子蛋白,蛋白浓缩使进一步纯化成为可能,并能完整地保留所需蛋白的活性。

蛋白质的分子质量、等电点(PI)、配体结合能力等理化性质是设计纯化方案的基本要素。根据 HMGB1 的理化性质结合有关纯化的文献^[2,12-13],笔者采用 CM-Sephrose, DEAE-Sephrose 离子交换层析及 Sephadex G75 凝胶柱层析,免疫沉淀贯序分离纯化的方案。

离子交换层析是指流动相中的离子与靠静电引力结合在固定相(离子交换剂)上的离子进行可逆性交换的过程,它可用于分离各种可解离的物质。

蛋白质是带电的大分子,不同蛋白质的等电点不同,在一定的 pH 值溶液中蛋白质所带的电荷不同,与层析柱交换介质的结合力不同,用不同离子浓度的溶液洗脱时,可实现对不同蛋白质的分离。阳离子交换剂上具有酸性基团,能和流动相中的阳离子进行交换。据报道, HMGB1 的 PI 约为 5.6, 本文选用强阳离子 CM-Sephro Fast Flow 柱在 pH 8.4 的条件下层析。目的蛋白在 pH 8.4 的条件下带负电荷,用 pH 8.4 的缓冲液洗脱时,会被洗脱下来。如洗脱图谱显示,经 pH 8.4 的缓冲液洗脱时有 3 个峰,经 Western 印迹鉴定,目的蛋白位于峰 3 中。

收集经阳离子柱洗脱获得的含有目的蛋白质的溶液,超滤浓缩,再经过 DEAE-Sephrose 离子交换层析进一步除去非目的蛋白质。用 pH 8.4 的缓冲液洗脱时,该介质呈碱性,目的蛋白带负电荷,先是挂上去。用 pH 4.0 的缓冲液洗脱时,目的蛋白带正电荷,应该被洗脱下来。洗脱图谱 2 所示,本实验中用 2.0 mol/L NaCl 洗脱时才收集到目的蛋白峰,考虑到是疏水等作用的影响。

凝胶过滤层析是以分子质量大小来分离蛋白的,可根据蛋白质分子质量的不同进一步分离杂蛋白, HMGB1 的分子质量约为 30 kD, G75 凝胶柱的分离范围为(3 ~ 80 kD),故本实验采用 Sephadex G75 凝胶柱对经阴离子柱纯化分离的含有目的蛋白的溶液进一步进行分离,用 pH 8.5 的缓冲液洗脱时共有 2 个峰,经 Western 印迹鉴定,目的蛋白位于峰 2 中。

由于抗原蛋白与其相应单克隆抗体的结合,具有高亲和力和高特异性的特点,故用免疫沉淀方法进行分离,具有可靠性高,所获抗原蛋白纯度高的优点。该方法需时较短,且不会破坏蛋白质的结构,同时经过几步纯化后目的蛋白含量低,免疫沉淀的方法非常适用于纯化和检测含量极微的蛋白质。免疫沉淀产物经 Western 印迹鉴定,有目的蛋白存在。

鉴定蛋白质最直观和简单的方法是采用 SDS-PAGE 分析分子质量。SDS-PAGE 分析结果显示:细胞上清原液中蛋白种类多,经超滤、层析及免疫沉淀的方法纯化分离后,电泳及凝胶成像分析结果显示在分子质量约 26 kD 处呈现单一条带,经扫描目的蛋白纯度达 90% 以上,表明纯化后的 HMGB1 纯度高。Western 印迹结果显示,在 PVDF 膜上呈现单一抗原抗体杂交带,无非特异性条带出现,证实该蛋白确系 HMGB1,说明纯化后的 HMGB1 的特异性较高,亦提示分泌型的 HMGB1 的分子质量与非分泌型的 HMGB1 的分子质量存在差别。

总之,本研究采用 CM-Sephrose, DEAE-Sepha-

rose 离子交换层析,Sephadex G75 凝胶柱层析和免疫沉淀序贯分离的方法,分离纯化 LPS 刺激 HepG2 细胞和 U937 细胞分泌的 HMGB1,纯化的 HMGB1 纯度及特异性较高。其具体理化特性的研究正在进行中。

肝脏是体内最大的实体性器官,有分泌胆汁、解毒和代谢的功能。但迄今研究均未涉及肝细胞本身有分泌和释放炎症介质的功能。本研究在前期研究证实肝细胞在 LPS 刺激下主动分泌晚期炎症因子 HMGB1 的基础上,分离纯化了肝细胞和免疫细胞分泌的该蛋白,为进一步研究两者在结构和功能上的异同和进一步认识肝脏新的生理、病理功能奠定了物质基础。

参考文献:

- [1] Thomas J O, Travers A A. HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins[J]. *Tren Biochem Sci*, 2001, 3 (26): 167-174.
- [2] Wang H C, Bloom O, Zhang M H, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice[J]. *Science*, 1999, 285 (5425): 248-251.
- [3] Bianchi M E. Significant (re) location: how to use chromatin and or abundant proteins messages of life and death[J]. *Trends Cell Biol*, 2004, 14(6): 287-293.
- [4] Harris H E, Anderssen U. The nuclear protein HMGB1 as a promflammatory mediator[J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34(6): 1503-1512.
- [5] Wang H C, Yang H, Tracey K J. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis[J]. *J Intern Med*, 2004, 255(3): 320-331.
- [6] Raucci A, Palumbo R, Bianchi M E. HMGB1: A signal of necrosis[J]. *Autoimmunity*, 2007, 40(4): 285-289.
- [7] 周蓉蓉, 范学工, 刘洪波, 等. TNF- α 诱导人肝细胞系 HepG2 细胞释放 HMGB1 的研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2009, 25(2): 126-131.
ZHOU Rongrong, FAN Xuegong, LIU Hongbo, et al. Study of the extracellular release of HMGB1 in human liver cell line-HepG2 cells induced by TNF- α [J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2009, 25(2): 126-131.
- [8] 周蓉蓉, 范学工, 刘洪波, 等. 脂多糖诱导肝细胞 HepG2 释放 HMGB-1 的研究[J]. *生命科学研究*, 2008, 12(4): 359-364.
ZHOU Rongrong, FAN Xuegong, LIU Hongbo, et al. Study of the extracellular release of HMGB1 in human liver cell line-HepG2 cells induced by lipopolysaccharide[J]. *Life Science Research*, 12(4): 2008, 12(4): 359-364.
- [9] 刘彦慧, 罗春丽, 吴小候, 等. 膀胱癌 T224 细胞系中细胞角蛋白 20 的分离纯化及鉴定[J]. *第三军医大学学报*, 2005, 27(4): 302-305.
LIU Yanhui, LUO Chunli, WU Xiaohou, et al. Purification and identification of cytokeratin20 from T224 cell line of bladder cancer[J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2005, 27(4): 302-305.
- [10] 何忠效. 生物化学实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 356-360.
HE Zongxiao. *Biochemical experimental techniques*[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 356-360.
- [11] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 79-97, 42-47.
WANG Jiazheng, FAN Ming. *Protein technological manual*[M]. Beijing: Science Press, 2002: 79-97, 42-47.
- [12] Goodwill G H, Sanders C, Johns E W. A new group of chromatin-associated proteins with high content of acidic and basic amino acids[J]. *Eur J Biochem*, 1973, 38(1): 14-19.
- [13] 蔡国平, 史景熙, 李玉瑞. 巨噬细胞源成纤维细胞生长因子的分离纯化[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15(1): 83-87.
CAI Guoping, SHI Jingxi, LI Yurui. Purification and characterization of a macrophage-derived fibroblast growth factor[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 15(1): 83-87.

(本文编辑 郭征)