

转 pMThGH 基因红鲤 F₄ 代鱼体内转植基因存在的分子多态性

曾志强 朱作言*

(中国科学院水生生物研究所, 淡水生态及生物技术国家重点实验室, 武汉 430072. * 联系人, Email: zyzzhu@ihb.ac.cn)

摘要 从一尾转 pMThGH 基因红鲤 F₄ 代仔鱼基因组内回收并克隆了 50 个转植基因(transgene), 对其中 33 个进行了分析. 根据双酶切结果, 可将这些回收基因分为 4 种类型. 用 5 种内切酶构建了这 4 种类型回收基因的限制性内切酶图谱, 第 1 种类型(6 个, 占 18%)与建立原代转基因鱼所用的外源基因相同, 而其他 3 种类型回收基因的分子量大小、酶切位点的种类、数量、位置都迥异于转移前的结构, 意味着大多数转植基因顺序发生了缺失和重排. Southern 杂交进一步证明了这一结果. 对回收基因侧翼进行顺序分析, 鉴别了两个相关的整合位点, 即鲤鱼 *b-actin* 基因的启动子或 5' UTR 位点, 以及与小鼠 *RTK* mRNA 同源的鲤鱼基因顺序位点.

关键词 转基因鱼 转植基因 分子多态性 整合位点

自 Palmiter^[1]用显微注射法将大鼠 GH 基因转移到小鼠受精卵, 获得了体重比对照小鼠大 1 倍的转基因小鼠后, 转基因动物研究围绕动物定向育种、开发生物反应器和建立疾病的动物模型等蓬勃开展起来. 然而, 人们对外源基因整合和在世代间传递的机制还缺乏足够的了解, 尚不能实现外源基因在原代转基因动物体内的定点整合与受控表达. 外源基因整合机制的研究一直为转基因研究者所关注. 通过 Southern 杂交^[2]、构建和筛选转基因个体的基因文库^[3,4]、染色体原位杂交^[5,6]、对后代个体携带外源基因拷贝数和表达水平的检测^[7]等方法, 已经获得了一些有关整合机制的部分信息. 这些资料可以概括为以下几个要点: (1) 外源基因大多以头尾相接的串连体(concatemer)形式整合, (2) 除少数同源重组的整合外, 尚未发现整合位点的数量与分布存在规律性, (3) 转植基因在一级结构上可能发生缺失、重排或被受体基因组顺序所间断. 但更多的问题有待深入研究, 如在分子水平上揭示整合事件的发生是否存在规律性, 有效整合位点的顺序特征, 转植基因在世代传递过程中的行为等.

鱼类基因转移研究的一个直接目的是定向育种, 同时也为研究转植基因整合和遗传行为提供了一个极好的模型. 在已有的转基因鱼模型研究中, 证实了转植基因与受体鱼基因组的整合, 并可遗传给子代^[8]. 本实验室最近的研究表明, 外源基因的整合最早发生在囊胚期^[9]. 首批转 pMThGH 基因红鲤^[8]已通过自交繁殖了第四代仔鱼(F₄), 转植基因经过多个世代传递后, 在受体动物基因组内是否稳定存在, 顺序结构是否有变化, 还未见深入研究和相关报道. 本文从 F₄ 代转 pMThGH 红鲤基因组内回收并克隆了转植基因, 对这一问题进行了分析和探讨.

1 材料与方 法

(i) 实验鱼. 将小鼠重金属螯合蛋白基因 *MT* 启动子与人生长激素结构基因 *hGH* 的融合基因 *MThGH* 插入 pBR322 的 *EcoR* I 位点, 构建了重组质粒 pMThGH(图 1). 经 *Bam*H I 线性化后, 用显微注射法制备转基因红鲤^[8]. 经尾鳍 DNA 点杂交或 PCR 鉴定为阳性者进行自然交配, 直到获得第四代仔鱼(F₄). 17 尾 2 月龄 F₄ 代仔鱼平均体重为 7.59 g, 对其中一尾个体最大者(26.35 g)进行研究.

(ii) *Bam*H I 酶切及转植基因富集区的确定. 从鱼肝脏提取基因组 DNA. 10 μg DNA 用

*Bam*H I 完全酶切, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离酶切片段. 真空转膜, 用 α -³²P-dCTP 标记的 pMThGH 探针进行 Southern 杂交^[10](随机引物标记试剂盒为 Promega 公司产品, α -³²P-dCTP 购自北京亚辉生物工程公司). 根据杂交信号所在位置, 确定以串连体形式整合的转植基因经 *Bam*H I 酶切后单拷贝分子的大小.

(iii) 转植基因 pMThGH 的回收. 部分酶切: 本研究目的之一是获得转植基因侧翼的受体基因组 DNA 顺序, 即整合位点顺序. 用 *Bam*H I 部分酶切, 有可能回收得到转植基因原来的 *Bam*H I 线性末端位点两侧的受体基因组 DNA 片段. 取 40 μ g 实验鱼基因组 DNA, 用 *Bam*H I 不完全消化, 即在反应进行至第 2, 5, 10, 15, 30 分时, 依次从反应体系中取出 1/5 反应液, 加入终浓度为 0.05 mol/L 的 EDTA, 以终止反应. 酶切片段的回收: 酶切样品电泳分离、Southern 杂交, 杂交信号出现在 7.5~8 kb 的位置(资料未显示). 考虑到部分转植基因经多个世代传递后可能发生了顺序的增减, 用低熔点胶回收和纯化 5~10 kb 区域的 DNA 酶切片段, 溶于 100 μ L TE(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH = 8.0), 浓度 40 μ g/mL. 回收 DNA 片段环化: 参照 Collins 等人^[11]的方法加以改进. 200 μ L 反应体系中, 回收 DNA 酶切片段终浓度 2 μ g/mL, T₄ DNA 连接酶 1 U, 16 $^{\circ}$ C 连接 8 h. 酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀, 溶于 10 μ L TE(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH = 8.0). 转化: 取 10 μ L 自身环化的 DNA, 转化 100 μ L DH5 α 感受态细胞, 涂于含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上. 同时进行 pMThGH 质粒转化作为阳性对照.

(iv) 回收基因的分类. 从平板上挑单菌落至 3 mL 含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡过夜. 碱裂解法小量制备质粒 DNA^[10], 溶于 50 μ L TER(TE pH = 8.0, 含 RNA 酶 20 μ g/mL). 回收质粒和对照 pMThGH 的质粒 DNA 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 根据电泳图对回收质粒进行分类.

(V) 酶切图谱的构建. 每种类型回收基因各随机选取一个进行酶切图谱构建: 质粒 DNA 用单酶切位点的 *Bam*H I 和 *Hind* III 分别线性化后, 各分成 3 等份, 再用 *Eco*R I, *Bgl* II 或 *Kpn* I 进行第 2 次酶切. 用 UVP GDS8000 凝胶成像系统显示并判读酶切片段的分子量. 根据各酶切片段的大小构建上述内切酶的酶切图谱.

(vi) 转植基因 *MThGH* 片段的 PCR 和 Southern 检测. *MThGH* 的 PCR: 正向引物 P1 和反向引物 P2 分别位于 *MT* 启动子和结构基因 *hGH* 上, 两者在 *MThGH* 上的距离为 450 bp(见图 1). 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后, 真空转膜, 以 DIG 标记的 *MThGH* 片段为探针进行 Southern 杂交验证(DIG DNA 标记和检测试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司). *MThGH* 的 Southern 检测: 每种类型回收基因各挑取一个, 质粒 DNA 用 *Bam*H I 线性化, 以 DIG 标记的 *MThGH* 片段为探针进行 Southern 杂交, 方法同上.

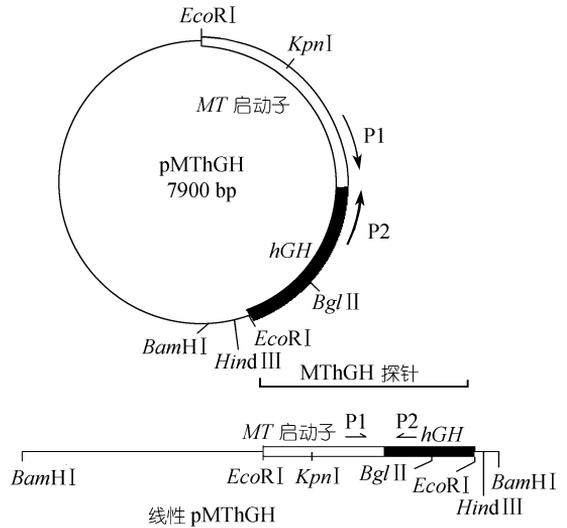


图 1 转植基因 pMThGH 的结构、线性化形式及引物和探针的位置示意图

(vii) 侧翼顺序的亚克隆和顺序测定. 为证实回收基因侧翼携有宿主基因组 DNA 顺序, 对 Type II 和 Type III 的侧翼各一个片段进行了顺序分析. 亚克隆: 5 号回收质粒(Type II)用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后, 回收其 5' 端的约 1 kb 的片段, 定向插入 pUC18 的相应位点之间, 酶切法鉴定重组子, 命名为 B5(B→H). 类似地, 6 号回收质粒(Type III)用 *Bam*H I 单酶切后, 将其 3' 端的约 0.5 kb 片段插入 pUC18 的 *Bam*H I 位点, 重组子命名为 B6(B→B'). 序列测定: 用质粒小量制备试剂盒(Pharmacia Biotech 公司产品)直接从 3 mL 过夜培养物中提取测序模板. 双脱氧链终止法测序, 测序引物为 M13 正向或反向通用测序引物. ABI 310 测序仪和配套测序反应试剂盒均为 PE Applied Biosystems 公司产品. 顺序同源性比较: 通过互联网(<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>), 检索 GenBank, EMBL 和 DDBJ 核酸顺序数据库, 比较顺序的同源性.

2 结果

2.1 转植基因的回收结果

从基因组 DNA 中进行了两次转植基因回收, 获得了 50 个抗氨基青霉素的克隆. 随机挑选 33 个并制备其质粒 DNA. 根据质粒 DNA 的 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切结果, 可将 33 个回收基因分为 4 种类型(图 2).

Type I: 2, 15, 16, 19, 21, 26 号, 与对照质粒相同, 共 6 个, 占 18%.

Type II: 1, 3~5, 8, 10, 12~14, 17, 18, 20, 23~25, 27, 28, 30~33 号. 该组回收基因最多, 共 21 个, 占 63.6%.

Type III: 6, 7 号.

Type IV: 9, 11, 22, 29 号.

2.2 回收基因的酶切图谱

分别挑取 2, 5, 6, 9 号回收质粒作为上述 4 种类型回收基因的代表, 与对照质粒一起进行单酶切和双酶切, 构建了回收基因 5 种内切酶的酶切图谱. Type I 的酶切图谱与对照相同, 其余 3 种都与 pMThGH 有差异, 且互不相同(图 3).

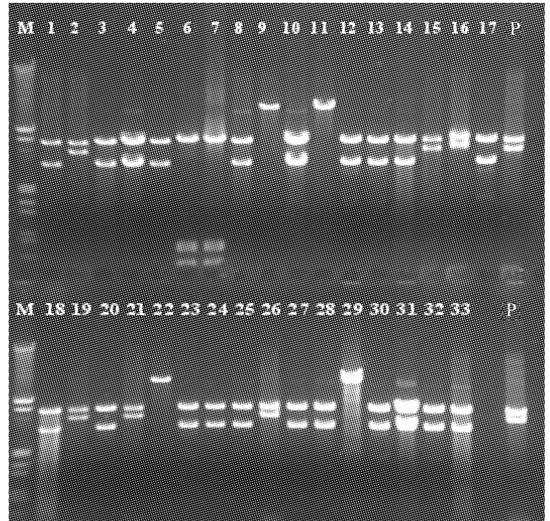


图 2 回收克隆的质粒 DNA 经 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切的电泳图

M—— λ DNA/*Hind* III + *Eco* R I, 1~33——回收克隆的质粒 DNA, P——对照质粒 pMThGH

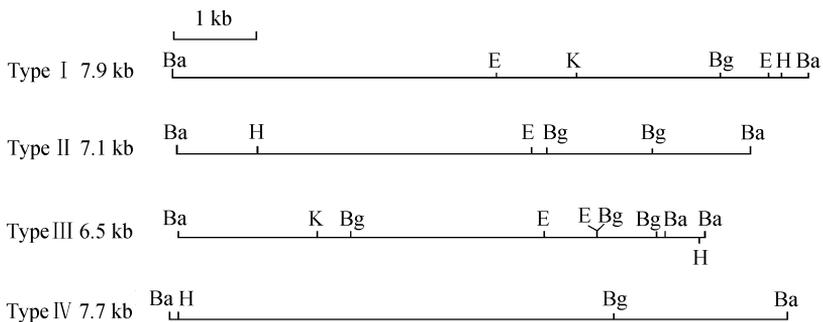


图 3 回收基因的酶切图谱类型

Type I 为正常型, Type II~IV 为变异型, Ba 示 *Bam*H I, E 示 *Eco*R I, H 示 *Hind* III, Bg 示 *Bgl* II, K 示 *Kpn*

2.3 转植基因 *MThGH* 片段的 PCR 和 Southern 检测结果

除 Type I 类型回收基因外, 其他 3 种类型回收基因都没有出现预期的 450 bp 扩增片段. Southern 杂交证实, Type I 的 450 bp 扩增片段确实来自目标区(图 4). 所有类型都与 *MThGH* 探针有杂交反应, 表明 *MThGH* 并未完全缺失(图 5). PCR-Southern 结果说明, 大多数转植基因的一级结构发生了变化, 至少在 *MThGH* 片段内如此, 但保留了 pBR322 扩增和氨苄青霉素筛选所需的基本结构.

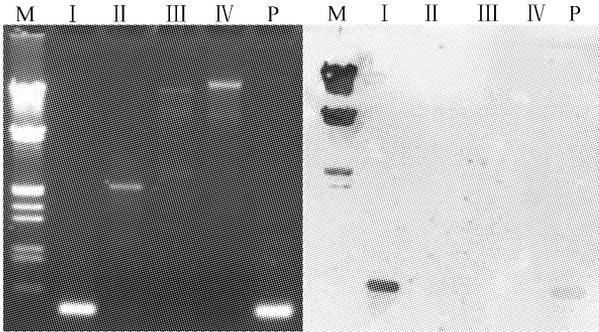


图 4 回收基因 *MThGH* 的 PCR-Southern 检测
探针为 DIG 标记的 *MThGH* 和 λ DNA, M—— λ DNA/*EcoR* I + *Hind* III,
I——正常型, II~IV——变异型, P——p*MThGH*

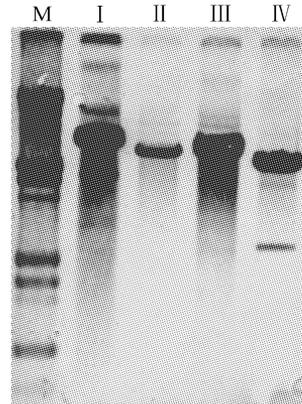


图 5 回收基因 *MThGH* 的 Southern 检测
说明同图 4

2.4 回收基因两个侧翼片段的顺序

用 M13 反向引物测定的 B5(B→H)顺序, 对应于 Type II 从 *Bam*H I 末端到 *Hind* III 方向的顺序. 输入可读顺序 470 bp, 检索结果表明, 其中的 438 bp 与鱼类 *GFP* 表达载体 FRMwg(顺序注册号: gb|AF1709151)上的鲤鱼 *b-actin* 基因启动子或 5' 非编码区(5' UTR)的同源性为 98%(见图 6).

		<i>Bam</i> H I							
B5(B→H) (正链)	1	<u>GGATCC</u> CTAA	GCGATTTTCA	TCAAATCGC	TGTTTTTTGT	TTGCGAAGTT	CAATACGTTG		
FRMwg (负链)	954	CCTAA	GCGATTTTCA	TCAAATCGC	TGTTTTTTGT	TTGCGAAGTT	CAATACGTTG		
B5(B→H)	61	TTTTCCGTAT	TTGCGTATTT	TGTTGTGATA	ACGCCAATAA	GGCTCTTTTC	AGCCTTTCAA		
FRMwg	899	TTTTCCGTAT	TTGCGTATTT	TGTTGTGATA	ACGCCAATAA	GGCTCTTTTC	AGCCTTTCAA		
B5(B→H)	121	AGAGCCTGTG	CAAAGTGCTA	GTATTGGTCA	TAGTGATGGA	CACCTCCTTG	ATCCTGTGCT		
FRMwg	839	AGAGCCTGTG	CAAAGTGCTA	GTATTGGTCA	TAGTGATGGA	CACCTCCTTG	ATCCTGTGCT		
B5(B→H)	181	GTGTTTACAA	TCTAACACAA	CAGCAGCAGC	AGCTCTGTAG	GTCATTTACC	TCTATTGTGA		
FRMwg	779	GTGTTTACAA	TCTAACACAA	CAGCAGCAGC	AGCTCTGTAG	GTCATTTACC	TCTATTGTGA		
B5(B→H)	141	TTCACAATAA	TGGCATAATA	CTGCTCTGTG	GTTATCTACC	AAGTTACCAA	GTACAATAGG		*
FRMwg	719	TTCACAATAA	TGGCATAATA	CTGCTCTGTG	GTTATCTACC	AAG-TACCAA	GTACAATAGG		*
B5(B→H)	301	GGTATTTTTC	ATTGGAATG	AGGATTAGTG	ACATGATTGT	ATACTTAAGG	AGCAACTAGC		
FRMwg	660	GGTATTTTTC	ATT-GAAATG	AGGATTACTG	ACATGATTGT	ATACTTAAGG	AGCAACTAGC		*
B5(B→H)	361	TGGTCTGAGT	TCAGTAGGTG	ATGTTGTGAG	AGAAAGTGTA	GTGAAACTTG	TTAATGAATC		
FRMwg	601	TGGTCTGAGT	TCAGTAGGTG	ATGTTGTGAG	AGAAAGTGTA	GTGAAACTTG	-TAATGAATC		
B5(B→H)	421	AG-CTTGCAAT	CCTTGTAAAT	GTTAAGCTGA	TTACAATAA	AATCACCAGG	AGTGATATTA		
FRMwg	542	AGCTTGCAAT	CC-TGTAAT	GT 521					

图 6 Type II 侧翼 B5 片段的顺序及同源性比较结果
下划线示酶切位点, *示差异碱基或缺口

用 M13 正向引物对 B6(B→B') 测序, 测出了 Type III 的末端 BamH I 至内侧另一 BamH I 位点间片段的全长, 方向可从片段内 Hind III 位点的位置判断. 输入全长 509 bp, 检索结果显示, 与小鼠的受体酪氨酸激酶基因(RTK)的 mRNA(序列注册号: dbj|D13738.1)的同源性最高, 其中的 288 bp 同源性达 99%, 非同源部分可能是内含子(图 7).

	<i>Bam</i> H I	<i>Hind</i> III
B6(B→B') (正链)	1 <u>GGATCCGATT</u> CTAGAGCGGC	CGCAAGCTTA CTAGCTTTCA ACAACTCACA ACTTTGCGAC
RTK (负链)		298 AGCTTTCA ACAACTCACA ACTTTGCGAC
B6(B→B')	61 TTCCCGCTCG CATGGTCCAC	TCGCTCTTGT TTACAAGTTG GCGGCAAGGA GAAACACCAC
RTK	270 TTCCCGCTCG CATGGTCCAC	TCGCTCTTGT TTACAAGTTG GCGGCAAGGA GAAACACCAC
B6(B→B')	121 AGAAGCAGGC GGTAAACAGTC	TCATTCTGT CTGAGCACAG GGAGGGTTAA GTTCCTTTTT
RTK	210 AGAAGCAGGC GGTAAACAGTC	TCATTCTGT CTGAGCACAG GGAGGGTTAA GTTCCTTTTT
B6(B→B')	181 CCTGTTTCTT TTGCAGATTA	GGATGGGAAA GGCTGTATCT TAAAGGCACT TGGTATCAGC
RTK	150 CCTGTTTCTT TTGCAGATTA	GGATGGGAAA GGCTGTATCT TAAAGGCACT TGGTATCAGC
		*
B6(B→B')	241 AGGGCTTGGG GCATAGCGAG	CCCTATCCAT CTGCGCCTTC ATCCAAGGCT TATCTTCTGC
RTK	90 AGGGCTTGGG GCAGAGCGAG	CCCTATCCAT CTGCGCCTTC ATCCAAGGCT TATCTTCTGC
B6(B→B')	301 TCCTGCTCCG GCTCCTGCTC	CTGCCTTAAC TGGATTGTGG GGCAGAGGGA TCTTTGTTAC
RTK	30 TCCTGCTCCG GCTCCTGCTC	11
B6(B→B')	361 AAGTAAGGTC CTGGTCAGCA	TTTTTCAGGAA CAATAGGGGT ATCCTCTCAT AGGCCAGGAA
	421 TTGAATAACA GCCCTCCACC	TATGTATGTT ATCCGATGAG GACCAGCCCT TGCAGGCTAA
	481 GCTGTTCTCT GGGGTGCATT	TGGGATCC 509
		<i>Bam</i> H I

图 7 Type III 侧翼 B6 片段的顺序及同源性比较结果

下划线示酶切位点, *示差异碱基

3 讨论

3.1 转植基因在受体鱼体内的分子多态性

转植基因的 4 种类型酶切图谱显示, 除少部分转植基因保持了建立原代转基因鱼所用的外源基因的结构外, 大部分转植基因的分子量、酶切位点种类, 数量和位置都发生了很大的变化, 这意味着外源基因在整合及 4 个世代的传递过程中, 大多数分子发生了不同形式的缺失和重排事件, 表现出丰富的多态性.

Type II 和 Type III 除发生了缺失外, 经部分测序分析证实, 插入了宿主基因组顺序. Covarrubias 等人^[3]从转基因小鼠早期死亡胚胎基因组文库中得到了 4 个携有转植基因的克隆, 对这些克隆进行杂交和酶切图谱分析, 发现这些克隆来源于 5 个串连的外源基因拷贝, 串连体至少被已知的宿主基因 DNA 间断两次, 其中两个克隆含来源不明的 DNA 顺序. 可见, 转植基因并不是在形式上简单地串连后插入宿主基因组. 整合可能包括转植基因与宿主基因组之间、转植基因拷贝之间的重组, 部分转植基因将发生缺失、重排、宿主基因组片段掺入等事件. 鉴于本文仅分析了一尾 F₄ 代转基因鱼个体, 因此 F₄ 代转基因鱼基因组内的转植基因多型性是发生在原建代, 或是发生在世代传递之中, 还是两种情况兼而有之, 同一世代个体间有何差异等等, 都有待进一步研究.

由于基因组 DNA 部分酶切片段组成复杂, 目的片段虽经富集和环化, 转化的效率仍然很低, 所回收的转植基因只可能是很少一部分, 仅限于那些大小在富集区域(5~10 kb), 并且 Amp^r 基因和复制子顺序未遭破坏的那部分转植基因. 由此推测, 转植基因在受体鱼体内存在形式的分子多态性是极其丰富的.

3.2 转植基因在 F₄ 代鱼体内的功能

PCR-Southern 分析表明, 只有 Type I 类型的回收基因 *MThGH* 扩增部分仍保持结构完整, 而其他 3 种类型回收基因经 Southern 杂交证明只有部分 *MThGH* 顺序存在. 当然, 只要有完整的转植基因存在, 只要整合在适宜的部位, 它就会表达并产生相应的生物学效应. 转基因小鼠、果蝇和鱼类的研究表明, 转植基因的表达有明显的位置效应, 却与拷贝数无关, 过多拷贝数反而抑制基因的表达^[8,12,13]. 该鱼在 2 月龄时, 体重已近群体平均体重的 3.5 倍, 说明少量完整的、整合于适当位置的转植基因已经对该尾转基因鱼产生了显著的促生长效应, 这种整合应当属于转基因鱼模型所指出的“有效整合”^[8].

3.3 转植基因回收是一种研究整合位点顺序的有效方法

转植基因的整合机制一直为转基因研究者所关注, 但这方面研究开展不多, 缺乏适当的手段是主要原因. 要获得转植基因整合位点的顺序信息, 一般先要构建转基因个体的基因组文库, 以转植基因为探针筛选含有整合位点顺序的克隆^[3,4]. 文库构建和克隆筛选是一项繁琐的工作. 对不同个体转基因的整合及遗传情况进行研究, 每个转基因个体都必须建立各自的基因组文库, 筛选文库的方法显然太繁琐和昂贵.

转植基因往往以首尾相连的串连体形式整合于受体基因组内. 用适当的内切酶能够将串连的拷贝重新释放出来, 处于串连体侧翼的转植基因末端往往“捕获”了受体基因组 DNA 顺序, 即整合位点顺序. 在大多数转基因研究中, 出于抗性筛选和保护功能区的考虑, 转植基因一般带有完整的载体顺序, 所以这种基因回收方法具有普遍适用性. 本文通过转植基因回收, 获得了两个转植基因整合位点顺序的相关片段, 证明了这种方法的可行性和有效性.

致谢 汪亚平副研究员对本实验提出了富有建设性的意见和讨论; 在实验过程中, 得到胡炜、王伟和孙永华的帮助, 在此谨致谢意. 本工作为国家自然科学基金重点资助项目(批准号: 39730290).

参 考 文 献

- 1 Palmiter R D. Dramatic growth of mice that developed from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 1982, 300: 680~683
- 2 Brinster R L, Chen H Y, Trumbauer M E. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell*, 1981, 27: 223~231
- 3 Covarrubias L, Nishida Y, Mintz B. Early postimplantation embryo lethality due to DNA rearrangements in a transgenic mouse strain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 6020~6024
- 4 Hamada T, Sasaki H, Seki R, et al. Mechanism of chromosomal integration of transgenes in microinjected mouse eggs: sequence analysis of genome-transgene and transgene-transgene junctions at two loci. *Gene*, 1993, 128: 197~202
- 5 苗聪秀, 卢光琇, 王庸晋, 等. 应用荧光原位杂交检测 EB 病毒 *BNLF-1* 基因在转基因小鼠子代染色体上的整合及其定位. *遗传学报*, 1998, 25(5): 422~426
- 6 何新, 刘桂生, 陈清轩, 等. 转基因猪外源基因染色体定位的研究. *动物学报*, 1998, 44(2): 241~243
- 7 张靖溥, 劳为德, 张旭晨, 等. 外源基因在小鼠中遗传和表达的稳定性. *遗传学报*, 1999, 26(2): 135~141
- 8 朱作言, 许克圣, 谢岳峰, 等. 转基因鱼模型的建立. *中国科学, B 辑*, 1989, (2): 147~155
- 9 赵浩斌, 陈尚萍, 孙永华, 等. 外源基因在鱼类胚胎中表达与整合的时序. *科学通报*, 1999, 44(22): 2414~2418
- 10 Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. 9.31~9.37
- 11 Collins F S, Weissman S M. Directional cloning of DNA fragments at a large distance from an initial probe: a circularization method. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 6812~6816
- 12 Palmiter R D, Brinster R L. Transgenic mice. *Cell*, 1985, 41: 343~345
- 13 Howard-Flander P, West S C, Stasiak A, et al. Role of RecA protein spiral filament in genic recombination. *Nature*, 1984, 309: 215~220

(2000-03-02 收稿, 2000-06-08 收修改稿)