

产生志贺样毒素的噬菌体 Φ 297 整合酶基因(*int*)的克隆和序列分析

翟 静¹ 张凤珍¹ 蒋汉明¹ 曹奇志^{2*}

(1 泰山医学院生物化学教研室 泰安 271000 2 滨州医学院免疫与微生物学教研室 滨州 256603)

摘要 目的:克隆并分析细菌性噬菌体 Φ 297 的整合酶基因(*int*)。方法:采用加接头的基因 DNA 片断为模板进行步移 PCR,根据溶源性噬菌体 Φ 297 的染色体 DNA 上类似于噬菌体 933W 的整合酶基因的一个 40 个核苷酸设计引物,进行扩增、克隆、亚克隆、测序和序列分析。结果:得到了噬菌体 Φ 297 编码的整合酶基因(*int*)的完整序列,它的长度是 1287bp,编码了 428 个氨基酸的 Int 蛋白质。将它们的序列与 λ 噬菌体的整合酶家族其它成员进行了比较,发现噬菌体 Φ 297 的整合酶基因(*int*)与噬菌体 VT1-Sakai 的整合酶基因有 79% 的同源性,噬菌体 Φ 297 的 Int 蛋白与噬菌体 VT1-Sakai 的 Int 蛋白在氨基酸序列上有 82% 的同源性。N-末端的氨基酸区域是完全保守的,而中心区和 C-末端则显示出较大差异。结论:噬菌体 Φ 297 与 λ 噬菌体的 *int* 基因来源于同一基因库,噬菌体 Φ 297 可能属于 λ 噬菌体家族。

关键词 噬菌体 Φ 297 埃希氏大肠杆菌 O157 志贺样毒素 特殊位点重组 整合酶基因(*int*)

肠道出血性埃希氏大肠杆菌(Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)是导致出血性腹泻和腹部绞痛的主要原因,严重时还可导致溶血性尿毒症(hemolytic uramic syndrome, HUS)等并发症^[1]。其致病机理是产生一种或多种志贺样毒素(Shiga toxin, Stx)。这些毒素是由 λ 家族的溶源性细菌噬菌体编码的^[2,3],这些噬菌体在整合酶的作用下通过特殊位点的重组整合到埃希氏菌属大肠杆菌(*E. coli*)染色体 DNA 的不同位置, λ 噬菌体的整合酶(integrase, Int)有同源的基因序列和类似的作用机制^[4,5]。

EHEC O157: H7 菌株 EH297 已经从比利时临床病人中分离出来,并发现它产生的 Stx₂ 是由溶源性噬菌体 Φ 297 编码的。到目前为止,还没有发现关于噬菌体 Φ 297 的研究报道。

噬菌体的存在方式有两种,即溶源和溶菌。这两种形式的转换是通过整合和切除两个不同的过程来完成的。整合过程是由噬菌体编码的整合酶和宿主编码的整合宿主因子(integration host factor,

IHF)共同完成的。 λ 噬菌体以一个特殊位点重组方式通过整合插入埃希氏菌属大肠杆菌(*E. coli*)染色体的不同位置。

λ 噬菌体与大肠杆菌(*E. coli*)染色体的重组位点叫附着位点(attachment sites, *att*)。在细菌染色体上的附着位点叫 *attB*,是由 *BOB'* 组成的;在噬菌体上的重组位点叫 *attP*,是由 *POP'* 组成的;序列 *O* 是 *attB* 和 *attP* 所共有的,叫中心序列,重组即在此序列进行。与 *B*、*B'* 和 *P*、*P'* 侧面相邻的区域叫臂(arms)。噬菌体与细菌的重组产物溶源性噬菌体有两个新的边界位点,分别叫做 *attL* 和 *attR*^[6]。

整合酶的 N-末端在特殊位点重组过程中识别 *attP* 的臂片段,而 C-末端则能特异地识别 *attB* 和 *attP* 的中心序列,并发挥催化作用^[5-7]。因此, λ 噬菌体家族不同整合酶的 C-末端具有不同的氨基酸序列和不同的蛋白质结构;但是 λ 噬菌体家族的每一个整合酶都具有保守的 R-H(Y)-R-Y 模序并形成催化位点^[8]。

λ 噬菌体含有相同的基因图谱^[9],功能相同的基因位于噬菌体染色体的相似位置。我们假设噬菌体 Φ 297 也是一种 λ 噬菌体,并与其它 λ 噬菌体含有相似的基因结构。据此,我们分析了本实验

收稿日期:2004-07-26 修回日期:2004-08-27

* 通讯作者,电子信箱:qizhicao@hotmail.com

室已经测序的噬菌体 φ 297 的一个 40 个核苷酸序列,这段序列与噬菌体 933W 的 *int* 基因有 36 个碱基相同,我们根据这一序列设计了引物 297P1 并用 Siebert PCR 方法^[10]在未克隆的 DNA 分子上步移扩增与之相邻的未知序列,又经过克隆、亚克隆和测序等手段确定了噬菌体 φ 297 的整合酶基因(*int*)。

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 菌株 EHEC O157:H7 菌株 EH297 分离自比利时布鲁塞尔自由大学附属医院的临床样本, *E. coli* K514 (φ 297)、K514 和 *E. coli* DH5 为比利时布鲁塞尔自由大学病毒遗传室保留的菌种(由 Henri De Greve 教授惠赠)。

1.1.2 引物 使用的 PCR 引物

297P1 5' GGAAGATTACTGTTTATAGGAAAGAT 3'

297P2 5' CGGCGTGTGTTTCCGTTAGA 3'

297P3 5' CTGACCTCCCTTAATC 3'

Oli112 5' GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGC 3'

Oli113 5' AATAGGGCTCGAGCGGC 3'

1.1.3 试剂 The Sureclone Ligation Kit 购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司。DNA Blunting 和 Ligation Kit 购自 Fermentas life science 公司。QIAprep Spin Miniprep Kit 购自 Qiagen life science 公司。

1.2 方 法

1.2.1 寻找目的基因 提取 K514(φ 297) 菌株染色体 DNA。分别用限制性内切酶 *Dra* I, *Ssp* I, *Eco*R V 和 *Hpa* I 消化染色体 DNA,再将一个特殊接头连接到 DNA 片段末端^[10],用少量已加接头的 DNA 作为 PCR 模板,用接头引物 Oli112(API) 和右边界引物 297P1 进行 PCR,扩增可能含有右边界的 DNA 片段。

接头的一端是平端,以便可以与限制性内切酶产生的任何 DNA 片段的任何一端相连。接头的碱基序列如下:

Adaptor 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCG-AGCCGCCGCGGGCAGGT-3' H₂N-CCCGTCCA-5'

1.2.2 PCR 产物的克隆、转化、筛选 用 Sureclone ligation kit 将 PCR 产物克隆到 pUC18 或 pUC19。CaCl₂方法转化质粒至 *E. coli* K514 或 DH5 α ,再通过 X-gal 筛选阳性细菌克隆,用 QIAprep Spin

Miniprep Kit 分离质粒 DNA,用限制性核酸内切酶消化分析阳性克隆的质粒 DNA,再通过 PCR 验证阳性克隆。

1.2.3 DNA 测序和序列分析 用自动测序仪测序。利用 GENBANK 的 blastn 程序和 Sequence Analysis Software Package 软件对核苷酸序列进行同源性分析。

2 结果与分析

2.1 寻找 *int* 基因

用限制性内切酶 *Ssp* I 处理的 *E. coli* K514 (φ 297) 菌株染色体 DNA,以其为模板采用 Oli112 和 297P1 引物扩增得到 2kb 的 PCR 片段(图 1)。将 PCR 产物克隆 *E. coli* K514 细胞。在含有羧苄青霉素的 LB 琼脂培养基筛选,用引物 Oli112 和 297P1 通过 PCR 扩增了 30 个阳性克隆,用 QIAprep Spin Miniprep Kit 纯化出了含有插入的 2kb 的 5 个克隆的质粒 DNA,将其中一个命名为 pEHEC348。

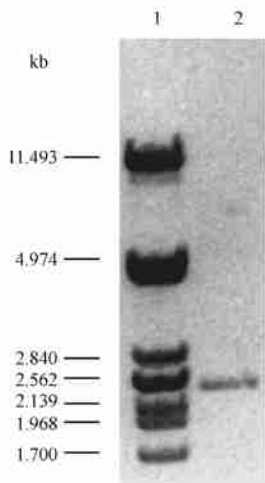


图 1 用 Oli112 和 297P1 作为引物获得的 PCR 产物的琼脂糖电泳图

Fig. 1 The PCR product of *Ssp* I - digested K514 total DNA with primers Oli112 and 297P1

Lane 1: molecular weight marker (λ DNA digested with *Pst*I); lane 2: PCR product (2kb) from *Ssp*I-digested DNA of K514(φ 297) with primer Oli112 and 297P1

2.2 PCR 产物的测序

对 pEHEC348 质粒进行测序,用反向测序引物从 pEHEC348 质粒的获得了 832 个核苷酸序列,用正向引物获得了 878 个核苷酸序列。

将正向引物获得的 pEHEC348 的 878bp 序列与

核苷酸数据库进行比较, 显示出从 231 到 441、702 到 848、464 到 516 与 *E. coli* O157: H7 Sakai 株的 55201 到 55411, 55671 到 55817 和 55434 到 55486 (AE000400)^[11] 相似性为 81%, 82% 和 90%, 位于 54606 到 55892 (AE000400) 序列相当于原噬菌体 VT1-Sakai 整合酶基因 *int* 的位置。但与 VT1-Sakai 整合酶基因比较, 显示克隆的噬菌体 φ 297 的 *int* 基因不完整。

2.3 噬菌体 φ 297 的 *int* 基因的克隆

为了得到全部的噬菌体 φ 297 的 *int* 基因序列, 我们根据与 pEHEC348 的起始部位相邻的序列设计了引物 297P3 和 297P2。以 Oli113 和 297P3 为引物, 以 Oli113 和 297P2 为巢式引物, 用加上接头的 *Ssp*I 消化的 K514 (φ 297) 的染色体 DNA 作为模板, 通过巢式 PCR 可得到 1kb 的片段(图 2)。然后将此片段克隆到 pUC19 的 *Sma*I 位点, 再转染到 *E. coli* DH5 α 中, 得到含有 1kb 插入片段的质粒 4 个克隆, 指定其中的一个作为 pEHEC368, 并对它进行测序。

2.4 噬菌体 φ 297 的 *int* 基因的分析

将 pEHEC368 的插入序列与核苷酸数据库比较发现了含有 *int* 基因开始的片段, 综合 pEHEC368、pEHEC348 的序列, 可得到一个 2320bp 的序列(AJ431361), 用 blastx 程序对此序列与 NCBI 的不含多余氨基酸的序列数据进行同源性分析, 显

示出含有噬菌体 φ 297 的 *int* 基因(start at position 594, stop at 1881) (AJ431361), 其长度是 1287 个核苷酸, 编码了 428 个氨基酸的 Int 蛋白质(图 3)。

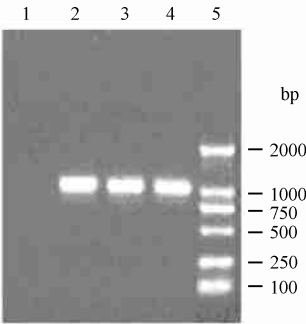


图 2 用 Oli113 和 297P2 作为引物获得的 PCR 产物的琼脂糖电泳图

Fig. 2 PCR product of *Ssp*I digested DNA of K514 (φ 297) with primer Oli113 and 297P2

Lane 1: PCR product of water as template; lane 2, 3 and 4: PCR products(1kb) of *Ssp*I digested DNA of K514 (φ 297) with primer Oli113 and 297P2; lane 5: molecular weight marker(DL-2000)

3 讨 论

整合酶在特异性重组中发挥着重要的作用, 研究整合酶的基因结构对研究病毒的进化、病毒的致病方式及防治某些病毒感染提供理论基础。目前已经发现细菌性噬菌体、逆转录病毒(如禽白血病病毒、人和动物的免疫缺陷病毒、牛泡沫病毒

φ 297	MSNASYPTGVENHGGSLRIWFHYNGKRVRENLGVPDTAKNRKIAGELRTSVCFAIRMGSF	60
VT1-Sakai	-----	60
φ 297	DYAAQFPNSPNLKHFGLGKREITVKALSEKWLDLKKIETGSNAFSRYQSVVRNMLPRIGE	120
VT1-Sakai	-----CA--LN-----IK---ML--	120
φ 297	KRLASSVTKEDLLFIRKDLLTGYHNLSNGKTTPIKGRSVVTVNYMTTIAGMFQFAADNG	180
VT1-Sakai	-K-V--I-----V-R-----QK-----SS-----T---	
φ 297	YIVSNPFGNLTPLKRSRTEPDPLTRDEFIRFIDACHHQTKNLWSLAVYTGIRHGHGELISL	240
VT1-Sakai	-TS-----A--K-KV-----E-R-----I-----R--V-	
φ 297	AWEDIDLKAKTMTIRRYNTKLGEFTLPKTEAGTDRVIHLVQPAVDALKSQAEMTRLGPQY	300
VT1-Sakai	-----R-I-----P---D---G-T-----I-----M--K-H	
φ 297	QIDVKLREFGRTARHECTFVFNPQLVKKCQVGHYKADSIKDSWASALRRAGLRHRKAY	360
VT1-Sakai	SVE--Q--Y---V-K----S--VT-QQ-LS-P---V---E--T-I-K-----SY	
φ 297	QSRHTYACWALSAGANPSFIANQMGHAYAQMVFNVYGAWMKDNNIGQIELLNKQLTESVP	420
VT1-Sakai	-R-----S-A-----S---TN-----Y-----HE-----R-S---	
φ 297	YMPHRARL	428
VT1-Sakai	C---KKAG	

图3 噬菌体 φ 297 和 VT1-Sakai 的 Int 蛋白的氨基酸序列比较

Fig. 3 Alignment of the Int proteins of phage φ 297 and VT1-Sakai

The R-H (Y)-R-Y motif is framed. Identical amino acids are indicated by dashes

Simian foamy virus) 的基因组中均存在整合酶基因,而在疱疹病毒和嗜肝病毒的基因组中尚未发现整合酶基因的存在。整合酶及其基因结构的研究已成为分子病毒学和抗病毒药物学的研究热点。

不同病毒整合酶的基因的结构不完全相同,将噬菌体 φ 297 的 *int* 基因(1287bp)与噬菌体 VT1-Sakai 的 *int* 基因的核苷酸序列进行比较显示高度一致(79%)。这两种整合酶的氨基酸序列是非常相似的(82%)。氨基端的 99 个氨基酸残基是完全相同的,而从 295 到 347 个氨基酸残基是高度变化的,同样 C 末端也显示出明显的差异,但两个整合酶的 RH(Y) R-Y 模序存在于相同的位置(图 3)。由于 λ 噬菌体的整合酶蛋白分为三个区域, N 末端区识别 *attP* 的 *arms* 序列,中间区特异地识别 *attB* 和 *attP* 的中心序列,而整合酶蛋白的 C 末端区则劈开并连接 DNA^[11],所以 Int 蛋白 C 末端的这部分变化可以解释不同的噬菌体整合酶在特异性重组中识别不同的 *attB* 的中心序列,从而使噬菌体整合到 *E. coli* 的不同基因。噬菌体 VT1-Sakai 整合到 *E. coli* K12 的 *yehV* 基因 (map position 47.7min)^[12],而噬菌体 φ 297 则整合到 *E. coli* K12 的 *yecE* 基因(map position 39min)(本实验室的另一项研究结果,待发表)。

原噬菌体 VT1-Sakai 的基因序列和构造与细菌性噬菌体 933W^[13]、细菌性噬菌体 H-19B^[14] 及 λ 噬菌体^[9] 有很多相似之处,原噬菌体 VT1-Sakai 的许多开放性阅读框架(ORF)与存在于上述三种噬菌体的 ORF 相似,且一些主要的蛋白质的 ORF 是同源的^[15]。

噬菌体 VT1-Sakai 有 2 个独立的基因,它们编码了 H0001 和 H0002 两种蛋白质^[15],噬菌体 VT1-Sakai 的 H0001 与 *E. coli* K12 的一个 SOS 基因的产物 DinI 相似(在 83 个氨基酸的区域中有 43.3% 相同),它抑制 RecA 蛋白的辅助蛋白酶活性^[16];噬菌体 VT1-Sakai 的 H0002 的氨基端一半与 *E. coli* K12 的 YkgJ 相似(在 31 个氨基酸区域中有 67.7% 的相同)。将噬菌体 φ 297 的 *attL* 序列与噬菌体 VT1-Sakai 进行比较,发现噬菌体 φ 297 也含有这两种基因(而这两种 ORF 在其它细菌性噬菌体中均没有发现),它们与 H0001 和 H0002 的基因有 97% 的相似性。因为 H0001 和 H0002 在 *E. coli* 基因组中有

同源性且位于附加位点 *attL* 的附近,这一发现暗示着这些基因可能是从 *E. coli* 上通过重组得来的。这一结果又支持了噬菌体 φ 297 与 VT1-Sakai 来源于同一基因库,同时表明可能噬菌体 φ 297 也属于 λ 噬菌体家族。

参考文献

- [1] Anon. Surveillance of enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) infections and haemolytic uremic syndrome (HUS) in Europe. Eurosurveillance, 1997, 2: 91~ 96
- [2] Agner P L, Acheson D W K, Waldor M K. Human neutrophils and their products induce Shiga toxin production by enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 2001, 69: 1934~ 1937
- [3] Kozlov Y V, Kabishev A A, Lulyanov E V, et al. The primary structure of the operons coding for *Shigella dysenteriae* toxin and temperate phage H30 Shiga like toxin. Gene, 1988, 67: 213~ 221
- [4] Nunes Duby S E, Kwon H J, Tirumalai R S, et al. Similarities and differences among 105 members of the *int* family of site specific recombinases. Nucleic Acid Research, 1998, 26: 391~ 406
- [5] Wang H, Yang C H, Lee G, et al. Integration specificities of two Lambdoid phages (21 and e14) that insert at the same *attB* Site. Bacteriol, 1997, 179: 5705~ 5711
- [6] Benjamin Lewin. Genes VII. New York: Oxford University Press Inc, 2000. 437~ 438
- [7] Kilby N J, Snaith M R, Murray J A. Site specific recombinase: tools for genome engineering. Trends Genet, 1993, 9: 413~ 421
- [8] Pagellis C A, Nunes Duby S E, de Vargas L M, et al. Suicide recombination substrates yield covalent lambda integrase DNA complexes and lead to identification of the active site tyrosine. Biol Chem, 1988, 263: 7678~ 7685
- [9] Sanger F, Coulson A R, Hong G F, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. Mol Biol, 1982, 162: 729~ 773
- [10] Siebert P D, Chenchik A, Kellogg D E, et al. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. Nucleic Acids research, 1995, 23: 1087~ 1088
- [11] Dorgal L, Sloan S, Weisberg R A. Recognition of core binding sites by bacteriophage integrase. Mol Biol, 1998, 277: 1059~ 1070
- [12] Blattner F R, Plunkett G III, Bloch C A, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science, 1997, 277: 1453~ 1474
- [13] Plunkett III G, Rose J, Durfee T J, et al. Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157: H7: Shiga toxin as a phage late gene product. Bacteriol, 1999, 181: 1767~ 1778
- [14] Neely M N, Friedman D I. Arrangement and functional identification of genes in the regulatory region of lambdoid phage H-19B, a carrier of a Shiga like toxin. Gene, 1998a, 223: 105~ 113
- [15] Yokoyama K, Makino K, Kubota Y, et al. Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 strain derived from the Sakai outbreak. Gene, 2000, 258: 127~ 139
- [16] Yasuda T, Morimatsu K, Hori T, et al. Inhibition of *Escherichia coli* RecA α -protease activities by DinI. EMBO, 1998, 17: 3207~ 3216

Cloning and Analysis of Integrase Gene (*int*) of Shiga Toxin producing Bacteriophages Φ 297

ZHAI Jing¹ ZHANG Feng-zhen¹ JIANG Har-ming¹ CAO Qi-zhi²

(1 Department of Biochemistry of Tai Shan Medical College, Taian 271000, China)

(2 Department of Microbiology and Immunology of Bin Zhou Medical College, Binzhou 256603, China)

Abstract **Aim:** To clone and analyse the integrase (*int*) gene of bacteriophages Φ 297 from Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) strains, which produce Shiga toxin (Stx) encoded by the lysogenic bacteriophages. **Method:** A special adaptor is ligated to the ends of DNA fragments generated by digestion of genomic DNA with restriction enzymes that generates blunt ended fragments. Siebert PCR walking from the 40 nucleotide of prophage Φ 297, Similar to that *int* gene of phage 933W to an unknown region in genomic DNA. Cloning and subcloning of PCR products, DNA sequencing and data analysis were used in this study. **Results:** The complete sequence of the integrase gene (*int*) was obtained that encoded by the phages Φ 297. The *int* gene was 1287bp long and the product was a protein of 428 amino acids. Comparing the nucleotide sequence of the *int* gene of phage Φ 297 with the *int* gene of phage VT1-Sakai showed the highest identity (79%). The Int protein of the phages Φ 297 and VT1-Sakai are similar but not identical. The overall identity at the amino acid level is 82%. Amino acid regions of N-terminal are completely conserved, whereas a much higher divergence in the central and C-terminal region. **Conclusion:** The phage Φ 297 and VT1-Sakai have a common ancestor.

Key words Phage Φ 297 *Escherichia coli* O157 Shiga toxin Site-specific recombination Integrase gene (*int*)

科学出版社新书

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>

生物芯片分析(中译版)

(美) M. 谢纳 著, 张亮 等译, 2004 年 10 月出版, 定价: 88 元, ISBN 7-03-013661-6/Q. 1437

本书是微阵列技术的创始人 Schena (M. 谢纳) 的最新力作, 由生物芯片北京国家工程研究中心组织翻译。本书内容全面, 尤其是对概念及理论基础进行了较为透彻的阐释, 兼具理论性和实用性。涵盖范围从生物化学原理一直到方法学的讨论以及研究中所用的基因数据的分析, 内容涉及生物芯片技术相关信息、基因表达、遗传聚类以及新创建的芯片技术。本书适用于从事生物芯片研发应用以及分子生物学、生物化学、细胞生物学、免疫学、细胞生物学、生物信息学、生物技术、生物工程、蛋白质组学、基因组学等生命科学相关研究领域的教学科研人员参考, 也可用作教材。

现代食品安全检测技术

唐英章主编, 2004 年 10 月出版, 定价: 68 元, ISBN 7-03-014121-0/Q. 1458

本书主要选编目前食品安全分析中经常使用的现代分析技术和检测仪器, 从这些技术的原理、种类、发展到具体应用和展望等方面分别进行了全面分析与评价, 重点介绍了食品安全领域中有毒物质的分析方法和实践操作。本书可作为商品检验系统的培训教材、食品安全管理和检测技术人员的工具书, 也可作为大专院校、研究机构相关专业学生的教学参考书。

动物细胞培养——基本技术指南(第四版)

R. I. 弗雷谢尼著, 章静波、徐存拴等译, 2004 年 10 月出版, 定价: 88 元, ISBN 7-03-013522-9/Q. 1433

本书是一本基础技术手册, 阐述了有关动物细胞培养方面的基本原理和技术, 是迄今为止最为全面和权威的一部实验指导书。内容包括培养基、特殊技术、生物技术、DNA 转移、肿瘤培养等内容, 还有无血清培养基、规模培养、生物发酵器、分子技术、永生性和困难的克服等目前研究所需要的信息。本书还客观地指出组织培养的优越性和局限性, 以及不同类型组织培养的各自特性。本书可供生物学、医学等相关动物细胞培养实验人员参考。

磁共振成像

赵喜平著, 2004 年 12 月出版, ISBN 7-03-013302-1/Q. 1409, 定价: 170 元

本书是一部全面介绍磁共振成像系统的物理原理、工程原理、设备构成、成像技术、医学应用、生物效应、安全性和最新研究成果的学术专著。各种成像技术的临床应用贯穿于全书有关章节中。内容丰富、理论严谨、图文并茂、跟踪最新发展动态, 是从从事医学成像、医学仪器、磁共振波谱和医学信息学研究的学者以及现代化医院里各类维修人员的必读书和工具书。还可作为核磁共振、医学影像、生物医学工程及相近各专业学生的教科书或参考书。也可作为磁共振成像设备使用人员(影像医师、工程师和操作技师)上岗资格考试的教材或辅助教材。

邮购地址: 100717 北京东黄城根北街 16 号科学出版社科学分社, 联系人: 阮芯, 电话/传真: 010 64034622

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>