

研究论文

粘虫 β -actin 基因 cDNA 的克隆、 序列分析及表达量检测*

李柯^{1,2**} 阴环² 奚耕思¹ 廉振民^{1,3***}

(1. 陕西师范大学 生命科学学院 西安 710062; 2. 山西师范大学 生命科学学院 临汾 041004;

3. 延安大学 生命科学学院 延安 716000)

Molecular cloning, sequence analysis and expression detection of β -actin gene in the oriental armyworm, *Mythimna separata*. LI Ke^{1,2**}, YIN Huan², XI Geng-Si¹, LIAN Zhen-Min^{1,3***} (1. College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 2. College of Life Sciences, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China; 3. College of Life Sciences, Yanan University, Yanan 716000, China)

Abstract β -actin, a member of the actin family, is often used as an internal standard in quantitative gene analysis. In this study, a full-length cDNA of the β -actin gene from *Mythimna separata* (Walker) was cloned using RT-PCR and the RACE technique. The results show that this cDNA is 1 472 base pairs (bp) long and contains a 5'-untranslated region (5'-UTR) of 68 bp and a 3'-untranslated region (3'-UTR) of 273 bp. The open reading frame (ORF) of 1 131 bp encodes a 376 amino acid protein with a predicted molecular weight of 41.7497 ku and PI value of 5.29. This predicted protein contains 6 functional sites, shares the typical actin family signature and 97.9%~99.7% identity with actin from other animals. Quantitative assays indicate that there was no significant difference ($P>0.05$) between 6 different tissues, suggesting that β -actin is a reliable internal control in *M. separata*. The cloned cDNA has been submitted to GenBank (Accession number: GQ856238).

Key words *Mythimna separata*, β -actin gene, cloning

摘 要 β -actin 基因作为 actin 家族的一员,在基因定量实验中常用作内参基因。本实验运用 RT-PCR 和 RACE 技术,以粘虫 *Mythimna separata* (Walker) cDNA 为模板,对 β -actin 基因进行克隆获得全长 cDNA 序列,并利用生物信息学方法,对 β -actin 基因全长 cDNA 序列及推测得到的 β -actin 蛋白序列进行分析。结果表明,获得的粘虫核 β -actin 基因 cDNA 序列长度为 1 472 bp,其中包括 68 bp 的 5'非编码区、273 bp 的 3'非编码区和 1 131 bp 的开放阅读框,编码一个 376 个氨基酸蛋白,具有 actin 蛋白家族典型特征。推测得到的粘虫 β -actin 蛋白理论分子量为 41.7497 ku,等电点为 5.29,富含 6 种类型的特定功能位点。该蛋白序列与其他动物 β -actin 蛋白序列具有 97.9%~99.7% 高度同源性。 β -actin 表达量检测结果显示 β -actin 在 6 种不同组织间表达无显著差异 ($P>0.05$),表明 β -actin 可作为研究粘虫不同基因表达水平高低的可靠内参基因。该基因的 cDNA 序列已经递交 GenBank 并获得登录号为 GQ856238。

关键词 粘虫 β -actin 基因,克隆

粘虫 *Mythimna separata* (Walker) 是我国粮食作物的重要害虫,具有远距离迁飞特性,每年可南北往返迁飞数次,给粮食生产造成了严重的损失和威胁^[1,2]。目前,国内外对昆虫迁飞

* 资助项目:陕西省教育厅科研计划项目(D6JK156)。

**E-mail: like3515@126.com

***通讯作者, E-mail: zhenminlian@126.com

收稿日期:2010-04-01,修回日期:2010-05-23

行为发生与调控的研究主要集中在生态环境、生理因素、行为学以及种群遗传学方面的调控机制,而对分子调控机制研究十分缺乏。随着现代分子生物学技术的发展,从分子层次揭示其迁飞机制具有重要意义。肌动蛋白(actin) 是一类在生物分子进化中高度保守的蛋白质,通常被分成肌肉型和胞质型两种类型^[3]。胞质型 β -actin 基因能在细胞中持续衡量的表达,因而在基因表达定量实验中常被用作内参基因^[4,5]。尽管肌动蛋白相关的分子生物学研究报道很多,但粘虫 β -actin 的基因序列至今未见报道。本文克隆获得粘虫的 β -actin 基因全长 cDNA 序列,并利用生物信息学方法对其进行分析,旨在为粘虫分子生物学的进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

粘虫由西北农林科技大学无公害农药研究中心提供。培养的室内温度为(23 ± 1)℃,光周期为 L:D = 14:10,相对湿度为 70 % ~ 80 %。幼虫用小麦苗进行饲养。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成 任意选取 6 龄粘虫幼虫 8 头,取其头部立即放入含有液氮的研钵中,充分研磨后,加入总 RNA 提取试剂 RNAiso Plus (购自 TaKaRa 公司),然后按照 RNAiso Plus 使用说明书中的方法进行总 RNA 的提取。获得总 RNA 后,立即使用 TaKaRa 公司扩增 cDNA 3'末端全长试剂盒(3'-Full RACE Core Set)和 5'末端全长的试剂盒(5'-Full RACE Core Set)在 10 μ L 体系中反转录合成含 3'末端全长第一链 cDNA 和 5'末端全长第一链 cDNA。

1.2.2 引物设计、PCR 扩增及产物的克隆与测序 通过 GenBank 数据库获得包括家蚕 *Bombyx mori* (登录号:BAE96011)、小菜蛾 *Plutella xylostella* (登录号:CAD33827)、茶足柄瘤蚜茧蜂 *Lysiphlebus testaceipes* (登录号:AAY63977)、沙蝇 *Lutzomyia longipalpis* (登录

号:ABV60323)、苜蓿黄蝶 *Colias eurytheme* (登录号:BAE96011) 等物种的 β -actin 氨基酸序列,根据这些序列的保守区域设计 6 条简并引物(表 1)。粘虫 β -actin 基因全长 cDNA 序列扩增策略如图 1。

表 1 粘虫 β -actin 基因 cDNA 克隆及检测表达量引物序列

目的片段	引物名称	引物序列(5'-3')
核心片段	S1	CAAGGAGTAATGGTNGGNATG
	A1	TAGGTCCGCAYTCRTCTAYTC
5'-RACE	5A1	AGTCAGCAGGACGGGRTGYTC
	5A2	GCAGCTCGTTRTARAAGGTRTG
3'-RACE	3S1	TGTGCGGAGGAACNACNATGTA
	3S2	ACAAC TCCATCATGAARTGYGA
表达量检测	ActinS	ATGTGCGACGACGATGTTG
	ActinA	CTCGTTGTAGAAGGTGTGG

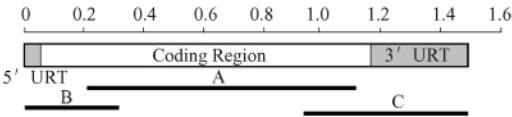


图 1 粘虫 β -actin 基因克隆策略

引物 S1 与 A1 以 3'末端全长第一链 cDNA 为模板扩增 β -actin 基因的核心序列获得片段 A。扩增反应条件为:94℃ 预变性 3 min,然后 94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 50 s,72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72℃ 再延伸 10 min。5'末端全长序列和 3'末端全长序列均采用巢式 PCR 扩增技术。引物 5A1 和 5A2 用于 5'末端全长序列扩增。引物 5A1 和 5'-RACE outer 以 5'末端全长 cDNA 的第一链为模板进行第一轮扩增,将稀释 1 000 倍的第一轮产物作为模板,用引物 5A2 和 5'-RACE inner 进行第二轮扩增获得片段 B。引物 3S1 和 3S2 用于 3'末端全长序列扩增,引物 3S1 和 3'-RACE outer 以 3'末端全长 cDNA 的第一链为模板进行第一轮扩增,将稀释 1 000 倍的第一轮产物做为模板,用引物 3S2 和 3'-RACE inner 进行第二轮扩增获得片段 C。上述两片段第一轮扩增反应条件为:94℃ 预变性 3 min,然后 94℃ 变性 30 s,50℃ 退火 50 s,72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72℃ 再延伸 10 min。然后引物 A2 和 A3 以第

一轮扩增产物作为模板进行巢式 PCR。第二轮巢式 PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 3 min; 然后 94℃ 30 s, 56℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72℃ 再延伸 10 min。PCR 产物经确认后用 2 % 的琼脂糖凝胶电泳分离纯化, 然后连接到 pMD-19T 载体, 转化感受态细胞 *E. coli* DH5 α , PCR 检测阳性克隆后送上海生工生物技术有限公司测序。

1.3 生物信息学分析

采用软件 ProtParam (<http://www.expasy.org>) 分析蛋白质分子量和等电点。采用 Proscan 软件 (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>) 对蛋白质功能位点进行分析。采用 SOPMA 软件 (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>) 分析蛋白质的二级结构。运用 TMpred 软件 (<http://www.ch.embnet.org/>) 分析蛋白质跨膜区。采用 MegAlign 软件进行蛋白质同源性分析。

1.4 β -actin 基因在粘虫不同组织中表达的检测

分别提取粘虫 6 种组织(6 龄幼虫头部、成虫头部、精巢、卵巢、脂肪体、中肠)的总 RNA,

取 2 μ g 总 RNA 反转录成 cDNA 模板, 再根据 β -actin 基因 cDNA 序列设计引物 ActinS 和 ActinF, 用于基因表达定量研究。扩增条件: 94℃ 预变性 3 min; 然后 94℃, 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环; 最后 72℃ 再延伸 5 min。PCR 产物在 1.2 % 的琼脂糖凝胶上进行电泳, 凝胶成像系统采集图片, 运用 Quantity One 软件对电泳条带进行定量, 利用 SPSS 11.0 软件将获得的数据进行分析并作图。

2 结果与分析

2.1 粘虫 β -actin 基因 PCR 扩增产物的检测

经过 PCR 扩增, 电泳结果显示, β -actin 基因核心序列 PCR 扩增产物大小约为 1 000 bp, 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增的产物大小约为 400 bp 和 500 bp (图 2)。将 PCR 产物克隆到载体中进行测序。根据测序结果可知, 该基因核心序列 PCR 扩增产物长为 972 bp, 5' 和 3' 末端全长序列扩增的产物长分别是 340 bp 和 495 bp。

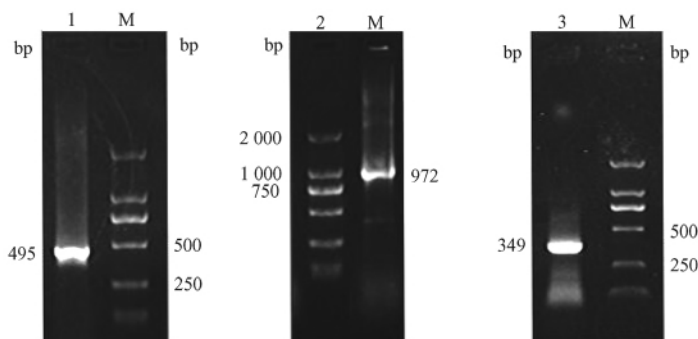


图 2 粘虫 β -actin 基因的 PCR 扩增产物

M. DNA marker DL2000; 1. 3'-RACE 巢式 PCR 产物; 2. 核心序列 PCR 产物; 3. 5'-RACE 巢式 PCR 产物

2.2 全长 cDNA 序列的获得及开放阅读框识别

将经过扩增、测序得到的 β -actin 基因的核心序列、5' 末端全长序列以及 3' 末端全长序列通过 ContigExpress[®] 软件 (<http://www.invitrogen.com>) 拼接得到粘虫 β -actin 基因全长 cDNA 序列为 1 472 bp。采用 NCBI 上的在线工具 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>) 进行开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 识别, 结果如图 3。起始密码子 ATG 位于第 69 ~ 71 位核苷酸, 终止密码子 TAA 位于第 1 197 ~ 1 199 位核苷酸, 开放阅读框全长为 1 131 bp, 编码一个 376 氨基酸残基的蛋白质。5' 非翻译区 (5'-untranslated region, 5'-UTR) 的长度为 68 bp, 3' 非翻译区 (3'-untranslated region, 3'-UTR) 的长度为 273

bp。5' 非翻译区 (5'-untranslated region, 5'-UTR) 的长度为 68 bp, 3' 非翻译区 (3'-untranslated region, 3'-UTR) 的长度为 273

```

1  GAAAACTCGCAGTCTCGCTGCCGTAGAGTCAACATCCACCGCGTCCCAAACCAACACAAACGCCAAAATGTGCGAC
1                                     M C D
78  GACGATGTTGCTGCGCTTGTAGTCGACAATGGCTCCGGCATGTGCAAAGCCGGTTTCGCCGCGACGACGCGCCCCGC
4  D D V A A L V V D N G S G M C K A G F A G D D A P R

156  GCCGTCTTCCCGTCCATCGTTGGTCGCCACGTCACCAGGTTGTGATGGTTGGTATGGGTCAGAAGGACTCCTACGTA
30  A V F P S I V G R P R H Q G V M V G M G Q K D S {Y V
234  GCGGATGAGGCCAGAGCAAGAGAGGTATCCTCACGCTCAAGTACCCCATCGAGCACGGCATCGTCACCAACTGGGAC
56  G D E A Q [S K R] G} I L [T L K] Y P I E H G I V T N W D
                                     □□□□□
312  GATATGGAGAAGATCTGGCACCACACCTTCTACAACGAGCTGCGTGTGGCGCCCGAGGAGCACCCCGTGTCTGCTCAGC
82  D M E K I W H H T F Y N E L R V A P E E H P V {L L T
390  GAGGCCCCCTCAACCCCAAGGCCAACAGAGAGAAGATGACACAGATCATGTTGAGACCTTCAACACACCCGCCATG
108  E A P L N P K A N R} E K M T Q I M F E T F N T P A M
468  TACGTCGCCATCCAGGCCGTGCTCTCGCTGTACGCGTCCGGTGTACCACCGGTATCGTGTGACTCCGGCGACGGT
134  Y V A I Q A V L S L Y A [S G R] T T G I V L D S G D G
546  GTCGTCGACACGGTGCCCTCTACGAGGGTTACGCGCTGCCGACGCCATCCTGCTGTGACTGTGGCCGCGCGAC
160  V S H T V P I Y E G Y A L P H A I L R D L A G R D
624  CTCACAGACTACTGTAGATCCTCACCAGCGCGGTTACTCGTTCGCCGCCACGGCCGAGCGTGAGATCGTGCGC
186  L T D Y L M K I L [T E R] G Y S F A A T A E R E I V R
702  GACATCAAGGAGAAGCTCTGCTACGTCGCTCTCGACTTCGAGCAGGAGATGCCACCGCGCTCCAGCAGCTCCCTC
212  D I K E K L C Y V A L D F E Q E M A T A A S S S S L
                                     □□□□□
780  GAGAAGTCTACGAACTTCCCGACGGTCAAGTCATCACCATCGGAAACGAACGATTCCGTTGCCCTGAGGCTCTCTTC
238  E K S Y E L P D G Q V I T I G N E R F R C P E A L F
□
858  CAGCCCTCATTCTGGGTATGGAAGCTTGTGGAATCCACGAGACCACCTACAACCTGATCATGAAGTGTGACGTCGAC
264  Q P S F L G M E A C G I H E T T Y N S I M K C D V D
936  ATCCGTAAGGACTTGTACGCCAACACAGTTTCTGTCCGAGGTACCACCATGTACCCGGGCATCGCCGACCGTATGCA
290  I R K D L Y A N T V L S G G T T M Y P G I A D R M Q
1014  AAGGAGATCACAGCACTGGCCCGTCCACAATGAAGATCAAGATCATCGCGCCCCAGAGAGGAAGTACTCAGTATGG
316  K E I T A L A P S [T M K] I K I I A P P E R K Y S V W
1092  ATCGGTGGATCGATCCTCGCTCCCTCTCGACCTTCCAGCAGATGTGGATCTCAAAACAGGAATACGATGAATCGGGA
342  I G G S I L A S L S T F Q Q M {W I S K Q E Y D E} C G
                                     □□□□□
1170  CCTTCCATCGTCACAGGAAGTGCTTCTAAGCGACAAGTAAGACTATTCTTAATTTATGATGCCCTACACCAGGCCCC
368  P S I V H R K C F *
1248  TGAATGGCGGCTCAAATTACGCTTGTGATCTTTTATTTAAGTTCAGTATTTAAAAATAGGCTGTAAGGTATCGTAAT
1326  ATGCATATTACGTAATAATGAATCGGAACATTGTCGATTCCGTATTTTGACAAAGATTTTATTTATTTATAATGA
1404  TCGTTGCTAACCTGAACATTTT AATAAA AGATAATTTATATACCGGTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图3 粘虫 β -actin 基因全长 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)用“△”和“*”标示;加尾信号 AATAAA 用阴影部分标示;N-糖基化位点用“□”标示;依赖 cAMP- and cGMP 蛋白激酶磷酸化位点用“=”标示;蛋白激酶 C 磷酸化位点用“[]”标示;酪氨酸蛋白激酶 II 磷酸化位点用“□”标示;酪氨酸蛋白激酶磷酸化位点用“…”标示;N-豆蔻酰化位点用“-”标示;actin 蛋白家族特征位点用“{ }”标示。

bp。在 3'-UTR 中有典型的加尾信号 AATAAA, 可见 19 bp 长度的 PloyA 尾。采用 NCBI (The National Center for Biotechnology Information) 上的在线工具 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 将翻译所得的蛋白质序列进行

进行同源性搜索。结果发现,粘虫与家蚕的 β -actin 蛋白相似性高达 98%。由此可判定该序列为粘虫 *actin* 基因的全长序列,编码一个完整

的 β -actin 蛋白质序列。基因序列已提交 GenBank ,登录号为 GQ856238。用 MegAlign 软件分析其与其它物种的 β -actin 蛋白质同源性高达 97.9 % ~ 99.7 %。

2.3 蛋白质结构和功能分析

通过在线工具 ProtParam (<http://www.expasy.org>) 对由 cDNA 序列推测的 β -actin 蛋白质序列分析发现,其理论分子量为 41.7497 ku,等电点为 5.29,分子式为 $C_{1850}H_{2902}N_{492}O_{559}S_{24}$ 。Proscan 软件 (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>) 分析该蛋白显示富含 6 种类型特定功能位点,包括 1 个 N-糖基化位点(13 ~ 16:NGSG)、1 个依赖 cAMP 及 cGMP 蛋白激酶磷酸化位点(336 ~ 339:RKYS)、5 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(61 ~ 63:SKR,67 ~ 69:TLK,146 ~ 148:SGR,195 ~ 197:TER,325 ~ 327:TMK)、3 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(78 ~ 81:TNWD,235 ~ 238:SSLE,359 ~ 362:SKQE)、2 个酪氨酸激酶磷酸化位点(192 ~ 199:KILTERGY,211 ~ 219:RDIKEKLCY)、10 个 N-豆蔻酰化位点(14 ~ 19:GSGMCK,16-21:GMCKAG,43 ~ 48:GVMVGM,

49 ~ 54:GQKDSY,75 ~ 80:GIVTNW,159 ~ 164:GVSHTV,246 ~ 251:GQVITI,269 ~ 274:GMEACG,274 ~ 279:GIHETT,344 ~ 349:GSILAS)。此外,分析结果还显示 3 个 actin 蛋白家族特征位点(105 ~ 117:LLTEAPLNPKANR,54 ~ 64:YVGDEAQSQRG,357 ~ 365:WISKQEYDE)。通过 SOPMA (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin>) 软件分析蛋白质二级结构,结果表明,该蛋白二级结构中, α 螺旋占 35.90%,无规则卷曲占 35.90%,延伸链占 22.87%, β 转角占 5.32%。运用 TMpred 软件分析蛋白跨膜区,结果表明该蛋白有 2 个跨膜区,分别位于该蛋白氨基酸序列的第 131 ~ 147 位和 338 ~ 356 位。

2.4 粘虫不同组织 β -actin 表达量分析

通过引物 ActinS 和 ActinA 从定量的 cDNA 模板中扩增到约 282 bp 的片段(图 4:A)。实验分析结果表明 β -actin 在各组织中具有恒定的表达量,各组织间 mRNA 的表达无显著差异($P > 0.05$)(图 4:B)

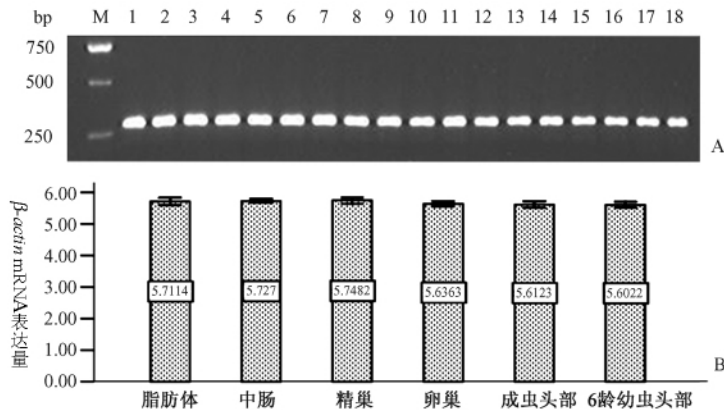


图 4 粘虫不同组织 β -actin 的表达分析

A. RT-PCR 扩增产物电泳图;B. 不同组织 β -actin 表达量分析

M:DNA Marker;1 ~ 3:脂肪体;4 ~ 6:中肠;7 ~ 9:精巢;10 ~ 12:卵巢;13 ~ 15:成虫头部;16 ~ 18:6 龄幼虫头部。

3 讨论

肌动蛋白普遍存在于真核细胞中。众多研究表明, β -actin 基因在生物进化中无论是在核

酸水平还是氨基酸水来都具有高度保守性^[6-9]。本研究运用 RT-PCR 和 RACE 技术,克隆获得了 1 472 bp 的粘虫 β -actin 基因全长 cDNA 序列,其中包括 68 bp 的 5'-UTR 273 bp 的 3'-URT 和 1 131 bp 的开放阅读框。基于 β -

actin 基因的 cDNA 序列推测的蛋白质序列长 376 个氨基酸。在 NCBI 中用 Blast P 搜索的结果显示,粘虫与其他动物的 actin 蛋白都属核 actin 蛋白家族。通过同源性分析发现该蛋白质与其它物种的同源性高达 97.0% ~ 99.7%。由此可见,该蛋白在进化中具有高度保守性,携带的进化信息相对有限,不适合作为系统进化分析的分子标记。

β -actin 基因不仅有着广泛的功能,如细胞的转移、分裂和原质的流动,细胞间信息的传递以及细胞的形状和连结的建立和维持等^[10,11],而且 β -actin 基因在所有的组织中的表达相对衡量、持续,在分子生物学的研究中,常被用作内参基因。本研究对粘虫 6 种不同组织 β -actin 表达水平进行了定量分析,结果发现,组织间 mRNA 的表达无显著差异,表明 β -actin 可作为粘虫不同基因表达水平高低的可靠内部参照标准,为粘虫功能基因表达的相关研究提供了基础资料。

致 谢 感谢西北农林科技大学无公害农药研究中心张兴教授对粘虫虫源的惠赠!

参 考 文 献

- 1 李光博. 粘虫的综合防治. 中国主要害虫综合防治. 中国科学院动物所主编, 北京: 科学出版社, 1979.
- 2 李光博, 王恒祥, 胡文秀. 粘虫季节性迁飞为害假说及标记回收试验. 植物保护学报, 1964, **3** (2): 101 ~ 110.
- 3 Joel V., Klaus W. The complete amino acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle, and rabbit, slow skeletal muscle. *Differentiation*, 1979, **14** (1/3): 123 ~ 133.
- 4 Noonan K. E., Beck C., Holzmayer T. A., et al. Quantitative analysis of *MDR1* (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1990, **87** (18): 7 160 ~ 7 164.
- 5 Rasmussen T. B., Uttenthal Å., de Stricker K., et al. Development of a novel quantitative real-time RT-PCR assay for the simultaneous detection of all serotypes of Foot-and-mouth disease virus. *Arch. Virol.*, 2003, **148** (10): 2 005 ~ 2 021.
- 6 Gyrberg E. A., Kindle K. L., Davidson N., et al. The actin genes of *Drosophila*: a dispersed multigene family. *Cell*, 1980, **19** (2): 356 ~ 378.
- 7 Hadden T. J., Sodja A. An oligogene family encodes actins in the housefly, *Musca domestica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, **203** (1): 523 ~ 531.
- 8 Mounier N., Gouy M., Mouchiroud D., et al. Insect muscle actins differ distinctly from invertebrate and vertebrate cytoplasmic actins. *J. Mol. Evol.*, 1992, **34** (5): 406 ~ 415.
- 9 Zafar R. S., Sodja A. Homology between actin coding and its adjacent sequences in widely divergent species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, **111** (1): 67 ~ 73.
- 10 Higgs H. N., Pollard T. D. Regulation of actin filament network through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 2001, **70**: 649 ~ 676.
- 11 Pollard T. D., Cooper J. A. Actin and actin binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and function. *Annu. Rev. Biochem.*, 1986, **55**: 987 ~ 1 035.