

根癌农杆菌介导蓝猪耳转化系统的建立

李梅兰 王小菁 李洪清 *

(华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631)

摘要: 通过对影响根癌农杆菌介导蓝猪耳转化效果各种因素的研究, 建立了蓝猪耳高效稳定的遗传转化系统。研究表明, 农杆菌侵染叶片外植体效率最高; 外植体预培养不利于农杆菌的侵染; 乙酰丁香酮能大大提高根癌农杆菌转化蓝猪耳的效率。另外, 菌液浓度、侵染和共培养的时间及再生的途径等均对转化效率有一定的影响。叶片外植体与农杆菌共培养后, 经过抗性芽的诱导、根的再生, 70 d左右就可以获得抗性苗。抗性植株经 GUS染色、PCR分析和 Southern blot检测, 外源基因已经整合到蓝猪耳基因组中, 转化频率为 7% ~ 8%。

关键词: 蓝猪耳; 根癌农杆菌; 转化系统

中图分类号: S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 01-0105-06

Establishment of *Agrobacterium* mediated Transformation System for *Torenia*

Li Meilan, Wang Xiaojing, and Li Hongqing *

(Guangdong Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, Life Science of College, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: An efficient and stable *Agrobacterium* mediated genetic transformation system for *Torenia* was established through investigating the factors influencing the transformation efficiency. The results showed that leaf explants are more sensitive to *Agrobacterium* infection, pre-culture of explants had an adverse effect on transformation efficiency, induction of vir gene with AS greatly improved the transformation effects. In addition, the concentration of bacteria, the time of infection and co-cultivation, as well as the regeneration methods have effects on the transformation. By using the optimized conditions, hygromycin resistant plants could be obtained within 70 days from the infection of the explants with *Agrobacterium*. GUS staining, PCR and Southern-blot analysis confirmed that transgene were integrated into the *Torenia* genome with a transformation frequency of 7% - 8%.

Key words: *Torenia*; *Agrobacterium tumefaciens*; Transformation system

蓝猪耳 (*Torenia foemieri* Linden) 属玄参科蓝猪耳属, 是一种重要的夏季观花植物。同时, 由于其生长周期短、容易再生且具备特殊的裸露胚囊^[1], 它还是一种植物细胞分化、花器官发育和授粉受精研究的理想模式植物。转基因技术在植物新品种选育和基因功能分析中的成功应用使得蓝猪耳的遗传转化研究变得尤为重要。尽管 Aida等^[2]于 1995年就将外源基因转入蓝猪耳, 但相关条件不甚清楚, 而且国内还没有蓝猪耳遗传转化的相关报道。作者在建立蓝猪耳高频植株再生体系^[3]的基础上, 经过对影响根癌农杆菌介导基因转化效率几个因素的研究, 建立了稳定的蓝猪耳基因转化体系, 为进一步开展基因工程育种及基因功能分析奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料及培养基组成

试材为蓝色花类型的蓝猪耳品种, 种子经过灭菌在 1/2MS培养基上萌发并生长为无菌苗。采用

收稿日期: 2005 - 04 - 06; 修回日期: 2005 - 06 - 06

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (003062); 中国博士后科学基金项目 (2004036504)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: hqli@scnu.edu.cn)

的培养基为再生体系优化后的最佳培养基配方^[3]。诱导培养基：1/2MS+蔗糖 3%，pH 5.2，附加 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮 (AS)。共培养基（单位均为 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，下同）：诱芽，1/2MS+BA 1+NAA 0.1；诱愈，MS+BA 1+2,4-D 0.1；诱根，1/2MS+NAA 0.1。各共培养基均含 3%蔗糖、0.8%琼脂和 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS，pH 5.5。选择培养基：配方同上，含有 2.5%蔗糖、1%琼脂、10或 15 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 潮霉素 (Hyg) 和 $500 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的头孢霉素 (Cef)，pH 5.8。

1.2 根癌农杆菌的活化与外植体的侵染

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌系为 LBA4404，内含双元载体 pCambia1301。该载体带有潮霉素抗性基因和 *gus* 基因，基因表达由组成型启动子 CaMV 35S 调控，*gus* 基因包含 1 个内含子。

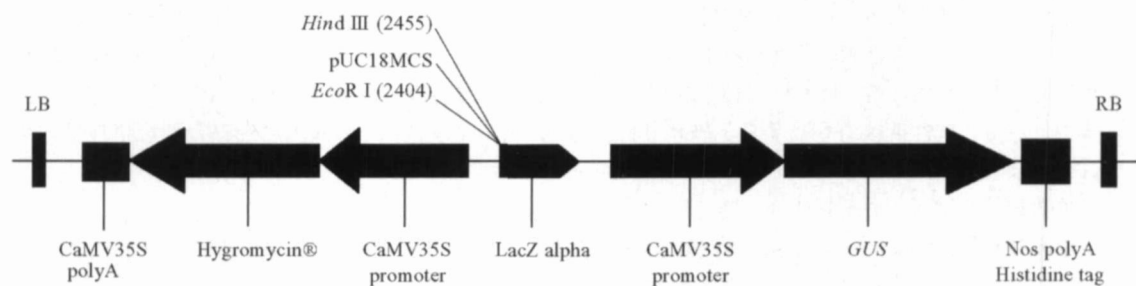


图 1 植物双元表达载体 pCambia1301 DNA 区图谱

Fig. 1 T-DNA region of binary expression vector pCambia1301

将 -70℃ 甘油保存的农杆菌在冰中融化，取 $3 \mu\text{L}$ 菌液接种于 5 mL 含卡那霉素和链霉素的 YEB 液体培养基中，于 28℃ 振荡培养 24 h。然后将菌液离心用 1 mL 诱导培养基悬浮，接入 50 mL 不含抗生素但含有 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS 的诱导培养基中继续振荡培养 4~5 h，即为工程菌液。将蓝猪耳无菌苗叶片或者茎段切割适宜大小，然后浸入工程菌液中侵染 5 min，菌液 OD_{600} 为 0.5 左右，期间不时摇动以均匀感染。之后取出外植体于无菌滤纸上吸干菌液，转入共培养基，于 25℃ 暗培养 4 d，再移到选择培养基上筛选，培养温度为 25℃，光强 $800 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ，每日光照 16 h。

1.3 影响根癌农杆菌介导蓝猪耳转化效率因素的研究

在影响因素的设计中，以某一个因素为变量，其它各因素以前述的转化程序为标准，观察不同因素对转化效率的影响。转化效率的评估以共培养后 GUS 染色阳性外植体的百分率及染色效果来进行，不同再生途径还要比较产生抗性芽外植体的百分率，每个处理外植体统计数为 15 个，重复 3 次。

1.3.1 不同种类外植体的影响 分别取无菌苗的根段、茎段、叶片和愈伤组织进行农杆菌侵染，观察不同外植体共培养后的 GUS 染色效果。

1.3.2 预培养和不同共培养方式的影响 叶片外植体预培养 2 d 后侵染与不经过预培养直接侵染进行比较；共培养分 25℃ 共培养 4 d 和 6 d 两种方式，比较不同方式处理后外植体的 GUS 染色效果。

1.3.3 乙酰丁香酮 (AS) 的影响 比较诱导培养基和共培养基分别附加 0、100、200、300、400、 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS 后叶片外植体共培养后的 GUS 染色效果。

1.3.4 不同菌液浓度和侵染时间的影响 将叶片外植体分别用 OD_{600} 值为 0.25、0.50 和 0.85 的菌液侵染 5 min 和在 OD_{600} 值为 0.5 的菌液中分别侵染 5、10 和 15 min 处理，比较各处理共培养后叶片的 GUS 染色效果。

1.3.5 叶片不同再生途径的影响 分别按照叶片诱芽、诱愈和诱根 3 种再生途径进行外植体的共培养和选择培养，观察外植体共培养后的 GUS 染色效果并比较通过不同途径产生抗性芽外植体的百分率。

1.4 抗性植株的再生

当共培养后的外植体移到选择培养基上生长 10~15 d 时，将没有褐化的外植体转到诱芽培养基

(Hgr: $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 上继续诱芽; 诱芽后将带有抗性芽的外植体转到 $1/2\text{MS}$ 培养基 (Hgr: $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 上, 以后每隔 2 周转瓶 1 次, 当芽体长到 1 cm 以上时将抗性芽切下插到 $1/2\text{MS}$ 培养基 (Hgr: $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; Cef: $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 上生根, 生根后的小苗即是得到的抗性苗。

1.5 转基因植株的分子生物学鉴定

当抗性小苗长至 $3 \sim 5 \text{ cm}$ 高度时即开始进行各种检测。

1.5.1 GUS 染色检测 取抗性和对照植株的叶片浸于 X-Glu 染色液中, 在 37°C 保温 $3 \sim 12 \text{ h}$ 后, 用乙醇脱色, 观察蓝色斑点的形成情况。

1.5.2 PCR 检测 采用 CTAB 法^[4]提取植株基因组 DNA, 扩增 T-DNA 区域潮霉素抗性基因的一段长 375 bp 的片段。引物序列为, Hph1: $5' \text{GCT GGG GCG TCG GTT TCC ACT ATC GG } 3'$; Hph2: $5' \text{CGC ATA ACA GCG CTC ATT GAC TGG AGC } 3'$ 。 $25 \mu\text{L}$ PCR 反应体系: 模板 DNA 20 ng , 两种引物各 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Tag 酶 0.4 U , dNTP $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。 94°C 变性 3 min , 然后依次在 94°C 变性 30 s 、 60°C 退火 30 s 、 72°C 延伸 1 min 的条件下循环 30 次, 最后在 72°C 保温 10 min 。 PCR 反应结束后, 取样 $15 \mu\text{L}$ 在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳检查。

1.5.3 Southern blot 分析 取 $10 \sim 15 \mu\text{g}$ 抗性和非转基因植株 (阴性对照) 基因组 DNA 和 $1 \mu\text{g}$ pCambia 1301 质粒 DNA (阳性对照) 用 *Hind* III 酶切过夜, 酶切体系为 $30 \mu\text{L}$ 。酶切产物经过电泳、转膜, 然后以 T-DNA 区域潮霉素抗性基因的一段片段为探针进行 Southern 杂交。探针的标记采用 TaKaRa Random Primer DNA Labeling Kit Ver. 2 探针制备试剂盒, 按照操作步骤进行。杂交膜用磷酸 - SDS 洗液洗去背景后, 压 X-光片进行放射自显影。

2 结果与分析

2.1 不同种类外植体对瞬时转化效率的影响

以农杆菌侵染根段、茎段、叶片和愈伤组织等外植体后, 共培养 4 d 时观察农杆菌的生长状况, 根段周围农杆菌生长较快, 几乎掩盖外植体; 茎段次之; 愈伤组织和叶片周围看不到农杆菌的生长, 但在外植体下面有少量的农杆菌。GUS 染色结果 (表 1) 表明, 愈伤组织 GUS 染色为阴性, 根系、茎段和叶片 GUS 染色均为阳性, 但根系 GUS 染色阳性外植体百分率只有 7.95% ; 茎段和叶片比较高, 分别为 93.33% 和 97.08% 。考虑到农杆菌在茎段周围繁殖较快, 致使外植体的生理状态较叶片差, 而且茎段外植体来源不如叶片充足, 因此外植体以叶片最为理想 (图 2)。

表 1 不同外植体对瞬时转化效率的影响

Table 1 Effect of different explants on transient transformation efficiency

外植体 Explants	GUS 染色阳性外植体百分率 Percentage of GUS-positive explants (%)	GUS 染色效果 Degree of staining
根段 Root	$7.95 \pm 0.55\text{B}$	淡蓝色 Light blue
茎段 Stem	$93.33 \pm 5.77\text{A}$	两端染为蓝色 Staining on both ends
叶片 Leaf	$97.08 \pm 2.85\text{A}$	切口边缘和叶内均有染色区域或点 Incision and leaf surface with blue area and spots
愈伤组织 Callus	0	无蓝色 No blue spot

注: 数据为平均值 \pm 标准差, 邓肯氏新复极差测验结果, $P = 0.01$ 。

Note: Data are means \pm SE, Value result is Duncan's method, $P = 0.01$.

2.2 预培养和不同共培养方式对瞬时转化效率的影响

如表 2 所示, 预培养 2 d 后侵染的蓝猪耳叶片和茎段 GUS 染色外植体百分率分别为 80.91% 和 55% , 均低于未经过预培养的外植体, 染色效果也较差, 说明蓝猪耳外植体直接进行侵染的效果优于经过预培养。

比较 25°C 共培养 4 d 和 6 d 外植体的 GUS 染色效果, 6 d 时 GUS 染色阳性外植体百分率 100% , 高于 4 d 的结果, 染色的效果差别不大。观察外植体的生理状况, 6 d 时外植体颜色稍发黄, 考虑到芽体的再生效率及选择压的使用时间, 认为共培养 4 d 较为合适。

表 2 预培养和共培养对瞬时转化效率的影响

Table 2 Effect of pre-culture and coculture on transient transformation efficiency

处理 Treatment	外植体 Explants	GUS染色阳性外植体百分率 Percentage of GUS-positive explants(%)	GUS染色效果 Degree of staining
共培养 4 d(对照) Coculture for 4 d(Control)	叶片 Leaf	97.08 \pm 2.85	切口边缘大多染色,染色点最多达 50 个 Staining at cut edge, blue spots were up to 50
	茎段 Stem	93.33 \pm 5.77	两端染为蓝色 Staining on both ends
预培养 2 d Preculture 2 d	叶片 Leaf	80.91 \pm 8.67	切口边缘很少染色,染色点最多 10 个 Incision staining less, blue spots were less than 10
	茎段 Stem	55.00 \pm 5.00	两端染色面积小于对照 Staining area at two ends was less than control
共培养 6 d Coculture 6 d	叶片 Leaf	100 \pm 0	同对照 Same as control
	茎段 Stem	93.67 \pm 4.55	同对照 Same as control

注: 数据为平均值 \pm 标准差。Note: Data are means \pm SE

2.3 AS瞬时转化效率的影响

研究结果表明, 在诱导培养基和共培养基中不加 AS, 外植体 GUS染色百分率为 60%, 而且染色点数较少, 平均每个外植体 1~2 个点; 而附加不同浓度的 AS, 外植体 GUS染色百分率为 90%~100%, 而且染色的点数较对照明显增加。说明在蓝猪耳的转化过程中 AS促进转化的作用是不可缺少的。由于 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AS促进转化的效果已经很明显, 因此 AS的使用浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 不同菌液浓度和侵染时间对瞬时转化效率的影响

从表 3 的结果可知, 在不同菌液浓度的几个组合中, 以 OD_{600} 值为 0.5 菌液侵染 5 min 的 GUS染色外植体百分率最高, 染色效果也最佳。浓度高和低的组合切口边缘没有染色的区域, 只有叶片内部有染色的点。 OD_{600} 值为 0.5 菌液不同侵染时间比较的结果 (表 3) 表明, 侵染时间对外植体 GUS染色效果的影响不大, 3 种组合 GUS染色阳性外植体百分率均达到 100%, 而且染色效果也比较接近。因此外植体侵染时农杆菌菌液的浓度以 OD_{600} 值为 0.5 左右较为合适, 侵染时间 5~15 min 均可。

表 3 不同菌液浓度和侵染时间对叶片瞬时转化效率的影响

Table 3 Effects of concentration and infection time of Agrobacterium on transient transformation efficiency

处理 Treatment	侵染时间 Infection time (min)	GUS染色阳性外植体百分率 Percentage of GUS-positive explants(%)	GUS染色效果 Degree of staining
OD_{600}			
0.50	5	100	切口边缘大多染色, 内部染色点连成片 Staining at cut edge, blue spots were very dense
0.25	5	80	切口边缘很少染色, 内部平均染色点 3 个 Incision stained less, average blue spots was 3
0.85	5	80	切口边缘很少染色, 内部平均染色点 7 个 Incision stained less, average blue spots was 7
0.50	10	100	同对照 Same as control
0.50	15	100	同对照 Same as control

注: 数据为 20 个叶片外植体的统计结果。Note: The number of explants is 20.

2.5 叶片不同再生途径对转化效率的影响

叶片以农杆菌侵染后在不同再生途径的共培养基上暗培养后进行 GUS染色的结果表明, 诱愈、诱根和诱芽的外植体 GUS染色阳性百分率都可以达到 90%, 而且染色的效果也彼此接近。

转到选择培养基生长 10 d 后, 诱芽外植体大多黄化, 个别的开始长芽; 诱根外植体在叶柄处有零星的根系长出; 诱愈外植体叶片均长出了绿色的细胞团和潜伏的芽体, 呈现黄绿相间的表型, 新长出的细胞团进行 GUS染色可以看到染色的效果 (图 2)。

近 20 d 时将诱根的根系和诱愈、诱芽的外植体转到诱芽培养基继代之后, 根系在诱芽培养基上均黄化死亡; 而诱愈和诱芽外植体均长出了抗性芽体, 继续转到 1/2MS培养基进一步筛选后得到了抗性植株, 叶片 GUS染色阳性。说明通过诱愈再生途径和直接诱芽再生途径都可以成功地进行外源基因的转化, 抗性芽产生频率分别为 8.33% 和 7.33% (抗性芽体数/外植体数), 两者差别不大。由

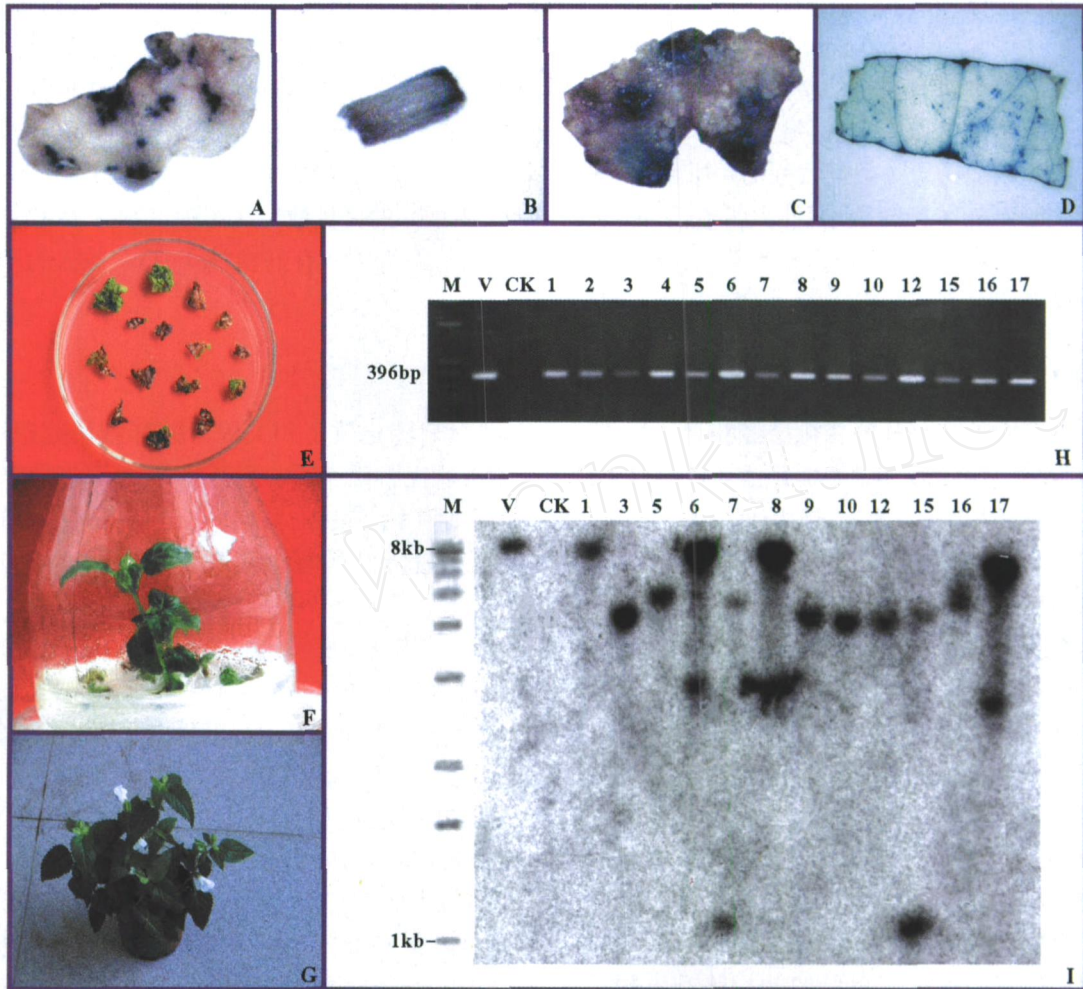


图 2 农杆菌介导蓝猪耳的转化

A, B: 叶片、茎段共培养后 GUS 染色; C: 愈伤组织 GUS 染色; D: 抗性植株叶片 GUS 染色; E: 抗性芽体诱导;
F: 抗性苗生根; G: 抗性植株; H: 抗性植株 PCR 检测; I: 抗性植株 Southern blot 分析
(M: 1 kb DNA ladder marker; V: pCambia1301 载体; CK: 非转基因植株, 1~17: 转基因抗性植株)。

Fig. 2 Agrobacterium mediated transformation of Torenia

A, B: GUS assay of leaf and stem explants after coculture; C: GUS assay of Hyg^R (hygromycin resistant) callus;
D: GUS assay of leaf from Hyg^R plants; E: Induction of Hyg^R shoot; F: Rooting of Hyg^R shoots;
G: Hyg^R plant; H: PCR detection of Hyg^R plants; I: Southern blot analysis of Hyg^R plants
(M: 1 kb DNA ladder marker; V: pCambia1301 vector digested with *Hind* III; CK: DNA from non-transgenic plant digested with *Hind* III; 1 - 17: DNA from Hyg^R plants digested with *Hind* III).

于诱愈途径耗费时间比较长，因此在实践中以叶片诱芽再生途径较为理想。

2.6 抗性植株的获得

共培养后的外植体转到选择培养基上后，多数褐化死亡，只有少数（约 30%）能正常分化抗性芽（包括假阳性芽体）。20多天时将带有抗性芽的外植体转到 1/2MS 培养基，由于选择抗生素的作用，小芽生长比较缓慢。当小芽长到 1 cm 插到 1/2MS 培养基上生根时，多数小芽死亡，只有少数（约 1/4）带有转基因的抗性小苗能生根，经过继代及生根培养基的逐步筛选，假阳性植株基本被淘汰，抗性苗一般共培养后 70 多天就可以得到（图 2，E~G）。

2.7 转基因植株的分子生物学鉴定

抗性苗 GUS 染色检测的结果（图 2，D）表明，多数植株叶片 GUS 染色呈阳性，而未转化植株

和少数抗性植株为阴性。在 PCR 检测中 (图 2, H), 所有抗性植株均扩增出了目的特异条带, 阳性率 100%, 而非转基因植株没有扩增出特异的条带。进行 Southern blot 分析的结果 (图 2, I) 显示, 质粒阳性对照和所有的抗性植株均出现了明显的杂交信号, 而非转化的对照植株未出现任何杂交信号。由于 *Hind* 在 T-DNA 区域只有 1 个酶切位点且位于探针的外侧, 另一个切点必定位于植物基因组内, 因此杂交图上的条带数可反映外源基因整合的拷贝数。若在 T-DNA 区内采用双酶切, 转基因植株产生 1 条杂交的条带, 就只能表明整合与否, 而不能反映插入的拷贝数。从图中可知, 杂交的带型多数为 1 条, 少数为两条, 证实外源基因已经整合到蓝猪耳基因组中, 有的植株 T-DNA 插入为单拷贝, 有的为双拷贝。

3 讨论

虽然在国外蓝猪耳的转化已经获得成功^[5], 但有关影响转化效率相关因素的详细研究很少, 我国刚刚起步。作者通过对影响蓝猪耳转化效果诸多因素的研究, 建立了一套蓝猪耳稳定的遗传转化系统, 转化频率为 7% ~ 8%, 与国外蓝猪耳外源基因的转化频率^[5]接近。在转化途径上国外蓝猪耳的转化主要通过叶片诱芽再生体系进行^[2], 本研究通过叶片愈伤组织的诱导途径实现了基因的转化, 在转化途径上是一个新的尝试。

抗生素浓度太高会抑制外植体的分化, 所以先使用较低的浓度, 使转化的细胞充分表达外源的抗性基因, 以后随着芽体的分化再提高选择压, 这样可以更有效地进行转化。在本研究中作者采用分级分布的筛选方法, 将共培养后的外植体先放在选择压较低 (潮霉素: $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的培养基上分化, 使所有的抗性芽都能充分诱导; 芽体分化后移到选择压稍高 (潮霉素: $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的培养基上继代, 逐渐淘汰假阳性芽; 另外在生根培养基中仍然应用较高的选择压 (潮霉素: $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 经过生根培养基的严格筛选, 假阳性植株基本被淘汰, 选择效率非常高。经验证得到的抗性植株均为转基因植株。

农杆菌 T-DNA 转移和整合进植物基因组主要由 Ti 质粒上的 *vir* 基因编码的蛋白质完成, 因此 *vir* 基因的表达直接影响转化效率。研究表明, 乙酰丁香酮可以促进农杆菌 *vir* 基因的表达, 从而提高转化效率, 但不同植物使用后的效果略有不同, 有的使用后反而会起到相反的作用^[6]。在本试验中, 诱导培养基和共培养基中不加乙酰丁香酮外植体 GUS 染色百分率很低, 而且每个外植体上染色点数平均只有 1 ~ 2 个点, 在以后抗性芽的诱导中没有产生抗性芽体。而附加不同浓度的乙酰丁香酮后, GUS 染色效果明显加强, 经过选择培养基的筛选得到了转基因植株。说明在蓝猪耳的转化过程中乙酰丁香酮促进转化的作用是不可缺少的。

参考文献:

- 1 Tetsuya H, Kuroiwa H, Kawano S. Guidance in vitro of the pollen tube to the naked embryo sac of *Torenia foenifolia*. *Plant Cell*, 1998, 10: 2019 ~ 2031
- 2 Aida R, Shibata M. *Agrobacterium* mediated transformation of *torenia*. *Breeding Science*, 1995, 45: 71 ~ 74
- 3 李梅兰, 康培婧, 李洪清. 蓝猪耳再生条件优化及不同外植体再生比较. *山西农业大学学报*, 2005, 25 (1): 34 ~ 37
Li M L, Kang P J, Li H Q. Screening of the best regenerative condition and comparison of different explants in regeneration of *Torenia*. *J. Shanxi Agric. Univ.*, 2005, 25 (1): 34 ~ 37 (in Chinese)
- 4 房迈莼, 李美茹, 李洪清. 一种简单高效的克隆水稻端粒相关序列的方法. *植物生理学通讯*, 2004, 40 (6): 729 ~ 730
Fang M C, Li M R, Li H Q. A simple and highly efficient method for cloning telomere associated sequences from *Oryza sativa*. *Plant Physiology Communications*, 2004, 40 (6): 729 ~ 730 (in Chinese)
- 5 Aida R, Kishimoto S, Tanaka Y, Shibata M. Modification of flower color in *torenia* by genetic transformation. *Plant Science*, 2000, 153: 33 ~ 42
- 6 杨广东. 基因工程改良几种重要蔬菜的抗性: 博士论文 1. 杭州: 浙江大学, 2002
Yang G D. Improving the resistance of some important vegetables to insects by genetic engineering: [Ph. D. Dissertation] Hangzhou: Zhejiang University, 2002 (in Chinese)