

嗜盐古生菌 AJ4 中 BR 蛋白基因部分片段
和 16S rRNA 基因序列研究许学伟¹⁾, 吴敏^{1)*}, 阮红¹⁾, 洪洁²⁾, 黄伟达²⁾⁽¹⁾浙江大学生命科学院,杭州 310027;⁽²⁾复旦大学生命科学院,上海 200433

摘要 为了研究分析新疆阿尔金山自然保护区阿牙克库木湖嗜盐古生菌物种与细菌视紫红质 (bacteriorhodopsin, BR) 蛋白资源,对分离纯化到的极端嗜盐古生菌 AJ4,采用 PCR 方法扩增出其 16S rRNA 基因(16S rDNA)和编码螺旋 C 至螺旋 G 的 BR 蛋白基因片段,并测定了基因的核苷酸序列。通过 BR 蛋白部分片段序列分析表明, BR 蛋白中对于完成质子泵功能以及与视黄醛结合的关键性氨基酸残基均为保守序列,位于膜内侧的序列比位于膜外侧的序列更保守;基于 BR 蛋白基因和 16S rDNA 序列的同源性比较以及 16S rDNA 序列的系统发育学研究表明, AJ4 是 *Haloarcula* 属中新成员。由此建立了一种快速筛选具有新 BR 蛋白的新嗜盐古生菌的方法。

关键词 嗜盐古生菌,细菌视紫红质,16S rDNA,系统发育

中图分类号 Q78, Q93

Partial Sequence of the Gene for a New BR Protein, and Nucleotide Sequence
of 16S rRNA Encoding Gene from a Halophilic Archaeum AJ4XU Xue-wei¹⁾, WU Min^{1)*}, RUAN Hong¹⁾, HONG Jie²⁾, HUANG Wei-da²⁾⁽¹⁾ College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; ⁽²⁾ College of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract In order to study the species and bacteriorhodopsin (BR) protein resource from Ayakekum Lake in the Altun Mountain National Nature Reserve Region of Xinjiang, a strain of halophilic archaeum AJ4 was isolated. 16S rRNA encoding gene and a part of the gene coding for a BR protein from AJ4 were amplified by PCR, and the nucleotide sequences were determined. The analysis of BR protein fragment showed that those amino acid residues in BR, essential for proton pumping and binding to retinal, are conserved. The results also indicated that the amino acid residues at the cytoplasmic side of membrane are more conserved than those at the external side. On the basis of homology analysis about BR gene and 16S rDNA as well as phylogenetic analysis about 16S rDNA, it was speculated that the strain AJ4 was a new member of the genus *Haloarcula*. So, a convenient and rapid method for screening a new BR protein from a new halophilic archaeum was established.

Key words halophilic archaea, bacteriorhodopsin, 16S rDNA, phylogenesis

嗜盐古生菌是一类存在于天然高盐域——海水晒盐场、盐湖及盐碱湖中的古细菌。细菌视紫红质 (bacteriorhodopsin, BR) 是其质膜上的唯一蛋白质,由 248 个氨基酸组成,分子量约为 26 kD,第 216 位的赖氨酸通过希夫碱基和生色团视黄醛分子相连,并以 7 次 α 螺旋 (A-G) 跨膜定位于嗜盐古生菌的质膜上^[1]。BR 的功能是吸收光能,将质子由细胞膜内泵到细胞膜外产生电化学势能,从而提供生命活动所需的能量。由于 BR 是一个简单的膜蛋白,以此作为模型,对它的深入研究,将有助于阐明细胞膜信号

传导途径中膜蛋白受体的作用机制与传导模型;同

收稿日期:2003-01-29,接受日期:2003-04-14

国家自然科学基金资助项目(No. 69981001)

* 通讯联系人 Tel:0571-87952663, E-mail: wumin@cls.zju.edu.cn

许学伟,男,1978年6月生,硕士生

Received: January 29, 2003; Accepted: April 14, 2003

Supported by a grant from the National Nature Science Foundation of China (No. 69971001)

* Corresponding author Tel: 0571-87952663

E-mail: wumin@cls.zju.edu.cn

时 BR 又是细胞膜上离子通道的原型蛋白,其跨膜转运质子的机制可以为其它的离子通道蛋白的结构功能的研究起到指导性作用;BR 的光电响应和光致变色特性使其在太阳能电池、人工视网膜、光信息存储、神经网络、生物芯片等应用领域有着广阔的前景^[2].自从上世纪 60 年代末人们从嗜盐菌中发现 BR 以来,BR 已成为研究得最热和最透彻的膜蛋白之一.

嗜盐古生菌的菌株之间,BR 蛋白的 N 端氨基酸排列次序的变异比较明显,但在螺旋 C 和螺旋 G 内,具有保守的氨基酸残基,从而可被用来设计引物,进行 PCR 反应.扩增出的这一片段,除去了全蛋白中的 N 端自 1~90 位的残基和在 C 末端位于膜外侧 221~248 残基外,既包含了 BR 的主要结构,也包含了其质子泵通道的结构核心,因此研究这一片段的结构对于阐明其质子泵功能特点是具有非常重要的意义^[3].

我们在新疆地区的阿尔金山自然保护区阿牙克库木湖中分离纯化了 38 株耐盐范围在 20%~25% 的嗜盐菌,通过基于 16S rRNA 基因(16S rDNA)序列进行了系统发育分析,选择其中 AJ4 菌株扩增其 BR 蛋白自螺旋 C 至螺旋 G 的基因保守片段,并同其它菌株相应的 BR 蛋白进行了氨基酸相似性分析.

1 材料和方法

1.1 菌株

菌株 AJ4 分离自阿尔金山的阿牙克库木湖,对照菌株为 *Halobacterium halobium* R1M1,由复旦大学生命科学学院李庆国教授惠赠.

1.2 分离和培养

菌种分离和富集培养采用高盐培养基,配方为:250 g NaCl, 20 g MgSO₄·7H₂O, 3 g 柠檬酸钠, 2 g KCl, 0.2 g CaCl₂, 10 g 细菌蛋白胨(L37), pH 7.0, 加蒸馏水至 1 L. 固体培养基加琼脂 20 g.

土样先用高盐培养基悬浮,再取少量悬浮液加到液体培养基中,冰样取少量解冻后取少量加到液体培养基中,水样直接取少量加到液体培养基中,37℃光照振荡培养 7 d.适当稀释涂布平板,经反复划线纯化,直至获得纯菌.

1.3 基因组总 DNA 的提取

DNA 提取方法参见文献[4].

1.4 PCR 扩增

根据文献[5,6]报道的已知 16S rDNA 序列,使

用 DNASTAR 软件设计一对引物,正向为 5'-ATTCCGTTGATCCTGG-3',反向为 5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCAG-3'.PCR 反应条件为 50 μl 反应体系 30 个循环;变性:94℃,45 s;退火:50℃,45s;延伸:72℃,1 min.

按 Otomo^[7]方法设计一对用于扩增自螺旋 C 至螺旋 G 的基因片断的简并引物,正向引物为 5'-CCGCTG(CT)TG(CT)TG(CT)T(AC)GACCTCG-3'.反向引物为 5'-AGGATGA(GA)(CG)CCGAA(CG)CCGACCTT-3'.PCR 反应条件为:50 μl 反应体系 30 个循环;变性:94℃,45 s;退火:60℃,45 s;延伸:72℃,1 min.

1.5 DNA 序列的转化

PCR 产物连接到质粒 pUCm-T 上,转化大肠杆菌,经重组筛选,提取质粒并测序.

1.6 系统发育树的构建

将菌株 AJ4 的 16S rDNA 序列与从 GenBank 数据库中获得的嗜盐菌 16S rDNA 序列,采用 Clustalw1.8 软件包进行多序列匹配排列,其中形成的缺口用中性元素填补.用 PHYLIP 程序包中的 DNAdist 程序计算进化距离,根据“Kimura 双参数”方式,通过序列数据计算矩阵距离,然后使用 Neighbor-joining 方法,进行系统进化树估算.各分支的重复性 PHYLIP 程序包中的 Seqboot、Consense 程序分析,重复数为 1000.

1.7 数据库存取号(Accession number)

菌株 AJ4 的 16S rDNA 序列已存放在 GenBank 核苷酸序列数据库中,其存取号分别为 AY208973 和 AY279550.其它相关菌株的数据库存取号如 Table 1.

Table 1 Halobacterial strains and accession numbers of genes encoding bacteriorhodopsins and 16S rDNA

Scientific name	BR	16 S rDNA	Reference
<i>Haloarcula</i> <i>argentinensis</i>	D31880	D50849	8&9
<i>vallismortis</i>	D31882	U17593	10&11
<i>Halobacterium</i> <i>salinarum</i>	M11720	M38280	12&13
sp. arg-4	AB009620	AB009624	14
sp. AUS-1	J05165	D32081	15&14
sp. AUS-2	S56354	D32082	16&14
sp. SG1	X70291	ND	17
<i>Halomicrobium</i> <i>mukohataei</i>	S76743	D50850	18&9
<i>Halorubrum</i> <i>sodomense</i>	D50848	X82169	14&19
<i>Miscellaneous</i> strain Mex	D11056(p)	ND	7
strain port	D11057(p)	ND	7
strain shark	D11058(p)	ND	7

ND, not determined; (p), partial sequence

2 结果

2.1 嗜盐古生菌中心株 AJ4 的 16S rDNA 序列

用一对引物扩增菌株 AJ4, 得到 1472 个碱基, 其 16S rDNA 序列电泳图见 Fig.1. 测序结果表明 AJ4 的 16S rDNA 序列与其它已报道菌株的 16S rDNA 序列大小类似, 但核苷酸排列次序差异明显.

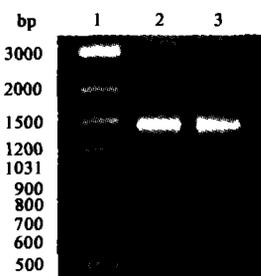


Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of AJ4 16S rDNA

The products were separated on a 2.0% (W/V) agarose gel.

1: DNA marker; 2: R1M1; 3: AJ4

2.2 嗜盐古生菌中心株 AJ4 的 BR 基因部分片段序列

用一对简并引物扩增菌株 AJ4, 得到 416 个碱基, 其 BR 基因部分片段序列电泳图见 Fig.2. 序列分析表明 AJ4 的 BR 蛋白 CG 片段与对照菌株 *Hb. halobium* R1M1 的 BR 蛋白 CG 片段具有明显差异.

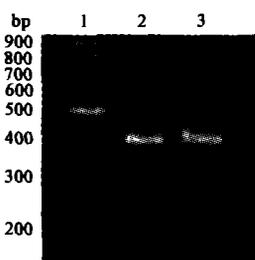


Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of AJ4 partial gene BR

The products were separated on a 4.0% (W/V) agarose gel.

1: DNA marker; 2: R1M1; 3: AJ4

2.3 嗜盐古生菌的系统发育

所构建的嗜盐古生菌系统发育亚树见 Fig.3. 从树上可以看到, 以 *Archaeoglobus flugidus* 作为外种群, 此系统发育亚树基本分成 *Ha*、*Hm*、*Hb* 及 *Hr* 4 个分枝, 菌株 AJ4 与 *Ha. argentinensis* 和 *Ha. vallismortis* 同分在一个分枝中.

2.4 嗜盐古生菌 BR 蛋白同源性比较

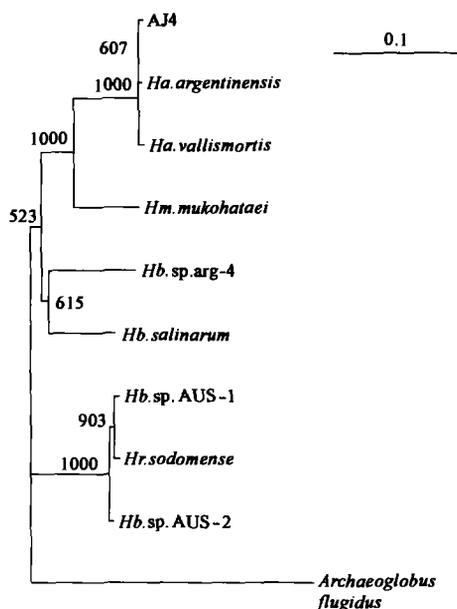


Fig.3 Phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of 16S rDNA from nine halobacterial strains where the 16S rDNA sequences from *Archaeoglobus flugidus* was used as an outgroup

The numbers at each node are clustering probabilities generated by bootstrap resampling 1000 times, as estimated by the NJ-tree.

The scale bar indicates the 0.1 evolutionary distance unit

Fig.4 为嗜盐古生菌 AJ4 与其它不同菌株 BR 的同源性比较, 各菌株 BR 蛋白的同源性差异列于 Table 2.

3 讨论

1977 年, Woese 和 Fox 用比较 16S rDNA 序列的方法将生物分为了 3 大类: 真核类、细菌类和古生物类. 在这随后的 20 多年内, 嗜盐古生菌的分类研究得到了迅速的发展, 到目前为止, 嗜盐古生菌分成一个科 (嗜盐菌科), 15 个属, 50 几个种^[14,20]. 根据嗜盐菌分类标准^[21], 新的分类单位应当同核苷酸序列的系统发育学分析相一致, 16S rDNA 序列的系统发育学进化距离也和表型特征及化学分类数据有非常好的相关性. 从 16S rDNA 构建的系统发育树上, 菌株 AJ4 与 *Ha. vallismortis* 及 *Ha. argentinensis* 分在同一类群中, 序列同源性分别为 98.69% 和 99.32%. 一般认为, 16S rDNA 序列同源性低于 98%, 可以认为属于不同种, 同源性小于 93% ~ 95%, 可以认为属于不同属. 因此, 从系统发育树和 16S rDNA 序列同源性角度分析, 菌株 AJ4 是 *Haloarcula* 属下一个新成员. AJ4 与阿根廷分离的 *Ha. argentinensis* 的相似性达到了 99.32%, 也说明了嗜盐古生菌

16S rDNA 序列进化的保守性。

与嗜盐菌 16S rDNA 序列的保守性相比,其 BR 蛋白序列的变异就比较大。根据 Table 2,各菌株之间的 BR 蛋白 C-G 片段序列相似性从 45.7% 到 100% 不等。其中菌株 AJ4 与 *Ha. vallismortis* 及 *Ha. argentinensis* 的 BR 氨基酸序列相似性分别为 95.0% 和 92.8%,表明 AJ4 是 *Haloarcula* 属下新成员。而 *Hb. sp. SG1* 与 *Hb. sp. AUS-1* 的 C-G 片段相似性高达 100%,说明这两个菌株可能是同一物种,由于 *Hb. sp. SG1* 的 16S rDNA 序列未知,因此还需要进一步的实验证明。

将各菌株的 BR 蛋白 C-G 片段相互比较后(Fig. 4)可以发现,在由 Henderson^[22] 所阐述过的以菌株 *Hb. salinarum* 的 BR 蛋白为基础建立的质子泵模型中,对于完成质子泵功能最关键的氨基酸残基和属于视黄醛结合口袋内的氨基酸残基,如属于视黄醛结合口袋的残基: L93、D115、M118、G122、W138、S141、W182、Y185、P186、W189、K216 和 D212;膜内侧,质子接受通道内的残基: F219、L100、L99 及 D96;膜外侧,质子释放通道内的残基: F208、T205 和 E204,在 BR 蛋白中这些残基都是绝对保守的。而其余残基,尤其是各螺旋之间的序列变异较大。其中螺旋 D 和螺旋 E 之间,有 6 个菌株,包括我们分离的 AJ4,分别插入了 6 个相同的氨基酸残基;螺旋 F 和螺旋 G 之间,菌株 *Hb. sp. arg-4* 插入了一个 T。由此可见,位于膜外侧的序列比位于膜内侧的序列插入现象更为普遍,这与膜外侧序列面对环境较为恶劣有关。

对 38 株耐盐菌的分离以及典型菌株 AJ4 的分类学研究结果表明:新疆的阿尔金山地区盐湖含有丰富的嗜盐菌物种资源,具有特定的基因资源。目前,在嗜盐菌科中只有 4 个属发现具有 BR 蛋白^[14],分别是: *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Halorubrum* 及 *Halomicrobium*。通过对菌株的系统发育学研究,可以确定菌株的分类学地位,并在此基础上,设计引物,测定 BR 蛋白 C-G 片段序列,这已成为一种快速筛选具有新 BR 蛋白的新嗜盐古生菌的方法。将已获得的 BR 蛋白 C-G 片段序列作为探针,杂交分子文库,获得野外分离菌株的 BR 蛋白全序列,并应用到光子开关材料的研究上,这是我们下一步研究的工作。

参考文献 (References)

1 Stoeckenius W. Bacterial rhodopsins: Evolution of a mechanistic model

for the ion pumps. *Protein Sci*, 1999, **8**:447 ~ 459

- 2 陈德亮,胡坤生. 细菌视紫红质研究的新进展. 生物物理学报 (Chen De-liang, Hu Kun-sheng. Progress in bacteriorhodopsin research. *Acta Biophys Sin*), 2001, **17**(3):441 ~ 448
- 3 Wang Hui, Zhan Shu-xuan, Sun Qing-an, Xu De-qiang, Zhao Wei, Huang Wei-da, Li Qing-guo. Primary structure of helix C to helix G of a new retinal protein in *H. sp. xz515*. *Chin Sci Bull*, 2000, **45**(12): 1108 ~ 1112
- 4 李凌,吴敏,乔守怡,陈抗生. br 基因的克隆和表达. 浙江大学学报(工学版)(Li Ling, Wu Min, Qiao Shou-yi, Chen Kang-sheng. Cloning and expression of the bacteriorhodopsin gene. *J Zhejiang Univ (Engineering Science)*), 2001, **35**(3):324 ~ 327
- 5 Gupta R, Lanter J M, Woese C R. Sequence of the ribosomal RNA from *Halobacterium volcanii*, an archaeobacterium. *Science*, 1983, **221**: 656 ~ 659
- 6 Arahall D R, Dewhirst F E, Paster B J, Volcani B E, Ventosa A. Phylogenetic analyses of some extremely halophilic archaea isolated from Dead Sea water, determined on the basis of their 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(10):3779 ~ 3786
- 7 Otmajo J, Urabe Y, Tomioka H, Sasabe H. The primary structures of helices A to G of three new bacteriorhodopsin-like retinal proteins. *J Gen Microbiol*, 1992, **138**:2389 ~ 2396
- 8 Tateno M, Ihara K, Mukohata Y. The novel ion pump rhodopsins from *Haloarcula* form a family independent from both the bacteriorhodopsin and archaeorhodopsin families/tribes. *Arch Biochem Biophys*, 1994, **315**(1):127 ~ 132
- 9 Ihara K, Watanabe S, Tamura T. *Haloarcula argentinensis* sp. nov. and *Haloarcula mukohataei* sp. nov., two new extremely halophilic archaea collected in Argentina. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, **47**:73 ~ 77
- 10 Kitajima T, Hirayama J, Ihara K, Sugiyama Y, Kamo N, Mukohata Y. Novel bacterial rhodopsins from *Haloarcula vallismortis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **220**(2):341 ~ 345
- 11 Kamekura M, Dyll-Smith M. Taxonomy of the family *Halobacteriaceae* and the description of two new genera *Halorubra* and *Natrialba*. *J Gen Appl Microbiol*, 1995, **41**(4):333 ~ 350
- 12 Dunn R, McCoy J, Simsek M, Majumdar A, Chang S H, Rajbhandary U L, Khorana H G. The bacteriorhodopsin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**(11):6744 ~ 6748
- 13 Mankin A S, Kagramanova V K, Teterina N L, Rubtsov P M, Belova E N, Kopylov A M, Baratova L A, Bogdanov A A. The nucleotide sequence of the gene coding for the 16S rRNA from the archaeobacterium *Halobacterium halobium*. *Gene*, 1985, **37**:181 ~ 189
- 14 Ihara K, Umemura T, Katagiri I, Kitajima I T, Sugiyama Y, Kimura Y, Mukohata Y. Evolution of the archaeal rhodopsins: evolution rate changes by gene duplication and functional differentiation. *J Mol Biol*, 1999, **285**(1):163 ~ 174
- 15 Sugiyama Y, Maeda M, Futai M, Mukohata Y. Isolation of a gene that encodes a new retinal protein, archaeorhodopsin, from *Halobacterium sp. aus-1*. *J Biol Chem*, 1989, **264**(35):20859 ~ 20862
- 16 Uegaki K, Sugiyama Y, Mukohata Y. Archaeorhodopsin-2, from *Halobacterium sp. aus-2* further reveals essential amino acid residues for light-driven proton pumps. *Arch Biochem Biophys*, 1991, **286**(1):107

- ~ 110
- 17 Soppa J, Duschl J, Oesterhelt D. Bacterioopsin, haloopsin, and sensory opsin I of the halobacterial isolate *Halobacterium* sp. strain SG1: three new members of a growing family. *J Bacteriol*, 1993, **175**(9):2720 ~ 2726
- 18 Sugiyama Y, Yamada N, Mukohata Y. The light-driven proton pump, cruxrhodopsin-2 in *Haloarcula* sp. arg-2 (bR+, hR-), and its coupled ATP formation. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1188**(3):287 ~ 292
- 19 McGenity T J, Grant W D. Transfer of *Halobacterium saccharovorum*, *Halobacterium sodomense*, *Halobacterium trapanicum* NRC 34021 and *Halobacterium lacusprofundi* to the genus *Halorubrum* gen. nov., as *Halorubrum saccharovorum* comb. nov., *Halorubrum sodomense* comb. nov., *Halorubrum trapanicum* comb. nov., and *Halorubrum lacusprofundi* comb. nov. *Syst Appl Microbiol*, 1995, **18**:237 ~ 243
- 20 Asker D, Ohta Y. *Haloferax alexandrinus* sp. nov., an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon from a solar saltern in Alexandria (Egypt). *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, **52**:729-738
- 21 王振雄, 徐毅, 周培瑾. 嗜盐碱古生菌新种的系统分类学研究. 微生物学报 (Wang Zhen-xiong, Xu Yi, Zhou Pei-jin. Taxonomy of a new species of haloalkaliphilic archaon. *Acta Microbiol Sin*). 2000, **40**(2), 115 ~ 120
- 22 Henderson R, Baldwin J M, Ceska T A. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J Mol Biol*, 1990, **213**:899 ~ 929

引领 Linux 先锋, 放飞高远梦想

-SGI 以基于 LINUX 操作系统的新型服务器为武器, 向高速增长的中型计算市场发起冲击

SGI 以高达 50% 的价格优势和 75% 的性能提升将矛头对准基于 UNIX 操作系统的中型服务器

北京(2004年1月12日)——今天,随着一款以 Intel Itanium 2 和 64 位 Linux 操作系统为基础的新型服务器——SGI Altix™ 350 在全球同时发布, Silicon Graphics 公司(纽约证券交易所股票代码:SGI)从根本上改变了高速增长中的 26 亿美元中型系统技术市场的性价比局面. 与 Sun 公司及 HP 公司提供的 UNIX SMP 服务器相比较, SGI Altix 350 服务器拥有高达 50% 的价格优势和 75% 的性能优势. SGI Altix 350 提供了非常广泛的可伸缩配置, 是目前唯一专门为科学工作者、工程设计师、研究人员及其他技术计算用户打造的一款中型服务器系统.

由于利用了开放的计算标准和组件, SGI Altix 350 还为中型技术计算市场带来了另一项重要的新优势: 它打破了专有 UNIX SMP 服务器供应商制造的“垄断技术”枷锁. 基于标准的计算环境用户可以在 Altix 系统中运行数百种标准的 Linux 应用. 此外, 还有大约 100 种专门为利用 Altix 的高级体系结构而优化的技术性市场应用.

SGI 作为 Linux 技术革新者和倡导者, SGI Altix 系列产品推出不到一年来, 它们已经为生命科学、制造业、政府部门、能源行业以及科研机构中的多个一流技术计算组织所采用. 在 Altix 的 150 多个客户中, 有 Tata Motors、NASA Ames 研究中心、剑桥大学 COSMOS 项目部、SARA(荷兰 HPC 及网络中心)、Marathon 石油公司以及西北太平洋国家实验室. SGI 采用 Altix 系列产品首次推出了利用标准 Linux 内核的、具有 64 个处理器的 Linux 节点. 多数竞争性产品只能在四至八个处理器的范围内伸缩, 但 Altix 产品系列目前已经能够在 1 至 512 处理器的范围内自如扩展.

SGI 公司简介

美国 SGI 公司即 Silicon Graphics, Inc., 是全球高性能计算、可视化技术和复杂数据管理方案的领先供应商. SGI 公司的战略目标是为 21 世纪最具影响力和创造力的科研突破提供最强大的技术支持. 无论是为脑外科手术治疗提供共享图像、更有效地发掘石油资源, 还是研究全球气候、实现模拟广播向数字广播的演进, SGI 公司都致力于为科研、工程和媒体创意人员提供新一代的技术解决方案. SGI 公司是《财富》杂志 2003 年评选的“全球 100 家最适宜工作的公司”之一. SGI 公司总部位于美国加州 Mountain View 市, 办事处遍布全球各地.

欲了解更多信息, 敬请访问 SGI 的全球网址 <http://www.sgi.com>

或 SGI 中国公司网址 <http://WWW.sgi.com.cn>.

如有疑问, 敬请垂询:

SGI(中国)中国有限公司谢敬平

电话: 010-65228868-3338 传真: 010-65228818 电邮: axie@beijing.sgi.com

(2004 年 1 月 12 日)