

## 红球菌线型质粒 pNSL1 的克隆、测序和复制区的鉴定

朱颖旻, 许铭翀, 沈美娟, 陈振华, 覃重军\*

(中国科学院上海生命科学研究院, 植物生理生态研究所合成生物学重点实验室, 上海 200032)

**摘要:**从红球菌 NS1 中检测到两个线型质粒 pNSL1 和 pNSL2。【目的】克隆、测序和分析 pNSL1, 并鉴定质粒的复制区。【方法】利用脉冲电泳方法从凝胶中回收大量的质粒 DNA, 进行鸟枪法克隆、测序和拼接, 通过生物信息学分析和实验证明质粒的自主复制区。【结果】克隆、测序和拼接获得 pNSL1 全长为 117252 bp 的序列, 包括在红球菌中保守的 1282 bp 端粒的序列。序列预测含有 103 个蛋白编码区, 包括质粒的复制、分配、转移等功能基因。将 pNSL1 中一个与分枝杆菌质粒的复制基因同源的 pNSL1.038 及其上游的 767 bp 非编码序列克隆到大肠杆菌质粒, 电击转化珊瑚诺卡氏菌 4.1037, 获得了抗性转化子。【结论】克隆、测序了全长的线型质粒 pNSL1, 鉴定了质粒的复制区。

**关键词:** 红球菌; 线型质粒; 端粒; 复制

**中图分类号:** Q933   **文献标识码:** A   **文章编号:** 0001-6209 (2010) 08-06-1098

放线菌(Actinomycetes)是高 GC 含量的革兰氏阳性细菌, 迄今描述了至少 140 个属, 包括链霉菌(*Streptomyces*)、红球菌(*Rhodococcus*)、诺卡氏菌(*Nocardia*)、分枝杆菌(*Mycobacterium*)、游动双孢菌(*Planobispora*)等<sup>[1]</sup>。1979 年 Hayakawa 等在链霉菌中检测到线型结构的质粒 DNA<sup>[2]</sup>, 近年来在游动双孢菌、红球菌、诺卡菌和分枝杆菌等放线菌中也发现了线型质粒<sup>[3–6]</sup>。线型质粒 DNA 的两个末端均有倒转重复序列, 5' 端与末端蛋白共价结合。测序表明, 一些线型质粒上携带了有毒化合物降解相关的基因簇<sup>[6]</sup>。

20 世纪 70 年代以来, 发现红球菌具有很强的生物催化能力, 可以降解多种有毒化合物, 如降解多氯联苯(polychlorinated biphenyls)<sup>[7]</sup>。红球菌也能合成多种有用的化合物, 如合成化工和制药原料丙烯酰胺(acrylamide)和烟酰胺(nicotinamide)<sup>[8]</sup>。

我们实验室从中国普通微生物菌种保藏中心购

买了一株用于工业污水净化的鲑色诺卡氏菌(*Nocardia salmonicolor*) 4.1040, 分离纯化后, 经过 16S rRNA 基因序列测定, 初步确定为红球菌属。为了考察该菌株是否存在线型质粒, 以及质粒上是否存在降解有毒化合物的基因簇, 我们利用脉冲电泳技术检测到了 2 个线型质粒, 对于其中较小的质粒 pNSL1 进行了克隆、测序和分析, 并鉴定其自主复制区。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:**本实验所用的菌株与质粒见表 1。从中国普通微生物菌种保藏中心购买了一株用于工业污水净化的鲑色诺卡氏菌(*Nocardia salmonicolor*) 4.1040, 分离纯化后, 测定了其 16S rRNA 基因的序列(1438 bp), 发现与已发表的红球菌(*Rhodococcus*) 菌株 *Rhodococcus* sp. gf-6、

**基金项目:**国家自然科学基金(30870067, 30770045, 30325003); 国家“863 计划”(2007AA021503); 中国科学院知识创新工程项目(KSCX2-YW-G-069)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-21-54924171; E-mail: qin@sibs.ac.cn

**作者简介:**朱颖旻(1976–), 男, 上海市人, 博士研究生, 主要从事链霉菌分子遗传学研究。E-mail: zoymin@gmail.com

**收稿日期:**2010-04-06; **修回日期:**2010-05-28

*Rhodococcus* sp. *dasan*、*Rhodococcus* sp. MCEPFL2、*rhodochrous* 等的序列有 99% 的相似性, 因此, 重新命名为 *Rhodococcus* sp. NS1。

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strain and plasmid	Genotype	Sources
<i>Rhodococcus</i> sp. NS1	Harboring linear plasmid pNSL1 and pNSL2	This work
<i>Nocardia corallina</i> 4. 1037	Plasmid-free host	This work
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi$ 80d/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> ( <i>r<sub>k</sub>m<sub>k</sub><sup>+</sup></i> ) <i>phoA supE44</i> $\lambda$ <sup>-</sup> <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Stratagen
pSP72	<i>Amp</i> , <i>coEI</i> , <i>lacZ</i>	Stratagen
pQC156	<i>Amp</i> , <i>coEI</i> , <i>lacZ</i> , <i>tsr</i>	[9]
pQQ2	A 2.6-kb telomere fragment cloned in pSP72 ( <i>EcoRV</i> + <i>ClaI</i> )	This work
pQQ3	A 1.4-kb telomere fragment cloned in pSP72 ( <i>EcoRV</i> + <i>ClaI</i> )	This work
pQQ9	A pNSL1 fragment (33865-36069 bp, PCR) cloned in pQC156 ( <i>XbaI</i> )	This work
pQQ10	A pNSL1 fragment (33865-37175 bp, PCR) cloned in pQC156 ( <i>XbaI</i> )	This work
pQQ11	A pNSL1 fragment (32490-36108 bp, PCR) cloned in pQC156 ( <i>XbaI</i> )	This work
pQQ12	A pNSL1 fragment (32685-37174 bp, PCR) cloned in pQC156 ( <i>XbaI</i> )	This work
pQQ31	A pNSL1 fragment (33865-36069 bp, PCR) cloned in pQC156 ( <i>XbaI</i> )	This work
pQQ32	A pNSL1 fragment (33865-35271 bp, PCR) cloned in pQC156 ( <i>XbaI</i> )	This work
pQQ33	A pNSL1 fragment (33865-37174 bp, PCR) cloned in pQC156 ( <i>XbaI</i> )	This work

**1.1.2 主要试剂和仪器:**生化试剂、抗生素和高保真 pfu DNA 聚合酶购于上海生工生物工程技术服务有限公司。硫链丝菌素购于 Sigma 公司。限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购于 MBI 公司。使用 Bio-Rad 公司 CHEF DR III 脉冲电泳仪进行脉冲电泳, 分子标样 (Lambda Ladder PFG Marker) 购于 New England BioLabs 公司。DNA 凝胶回收试剂盒购于上海华舜生物工程有限公司。

## 1.2 培养和基本的遗传操作

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的培养、转化和质粒提取等基本操作见文献 [10]。红球菌的液体培养用 TSB [11]。电击转化珊瑚诺卡氏菌 4. 1037 参照文献 [12]。扩增 16S rRNA 基因的引物为 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 5'-TCAGGC TACCTTGTACGACTT-3', PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

## 1.3 pNSL1 的大量回收和鸟枪克隆

经 TSB 过夜培养的红球菌, 离心收集菌丝体, 将菌体包埋于凝胶中进行原位溶菌后在脉冲电泳仪上进行分离。切割含有 pNSL1 的凝胶带 (1% 低熔点琼脂糖), 用琼脂糖酶消化、PLHK Ultracel-PL 超滤膜 (Millipore) 超滤。约 4  $\mu$ g 的质粒 DNA 加 0.5 mL TE, 用超声波打断, 电泳确认 DNA 碎片长度大部分位于 1.6 - 4 kb 之间。加入 T4 DNA 聚合酶和 dNTPs 补平, 与大肠杆菌载体 pSP72 连接并转化 DH5 $\alpha$ 。

## 1.4 pNSL1 的测序和拼接

转化子由国家人类基因组南方研究中心 (上海) 用 ABI377 测序仪进行测序。对 1497 个测序结果 (覆盖率为 7.81) 用美国华盛顿大学 Phred/Phrap/Consed 软件包 (<http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>) 进行计算和拼接, 获得一个大的连续的序列 (Contig), 以及含有多个间隙 (gap) 和弱测序质量值区域 (weak region)。随后使用上述软件包内的 autofinish 命令和人工仔细核对, 共设计了 106 条引物, 以 pNSL1 为模板进行 PCR 测序, 最终得到 1 条长度为 115702 bp 的拼接产物。

## 1.5 pNSL1 端粒 DNA 的克隆和测序

为了彻底去除线型质粒 DNA 末端共价结合的蛋白, 在 500  $\mu$ L 含 20  $\mu$ g 质粒 DNA 的体系中, 加入终浓度 0.2 mol/L 的 NaOH, 于 37 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 加入 0.2 mol/L 的 HCl 和 0.1 mol/L 的 Tris-HCl (pH 8.0), 于 65 $^{\circ}$ C 水浴复性 10 min。加入 2 倍体积的乙醇沉淀, 经 70% 乙醇洗 3 次, 溶于 TE。PacI 酶切后回收 4 kb 和 5.7 kb 的片段, 再用 *ClaI* 酶切后, 克隆到 pSP72 (*EcoRV* + *ClaI*) 并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。利用 pSP72 两侧的 T7 和 SP6 引物进行测序, 获得 pNSL1 端粒的序列。

## 1.6 pNSL1 的序列分析

DNA 序列比对及分析的软件为 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>、Vector NTI Suite 9、BioEdit 和 Clone Manager Suite v7.1。放线菌开放阅读框 (open reading frame, ORF) 的预测采用软件

“FramePlot 3.0beta” (<http://watson.nih.gov/~jun/cgi-bin/frameplot-3.0b.pl>)。pNSL1 的 GenBank 编号为 DQ888171。

## 2 结果和分析

### 2.1 脉冲电泳检测线型质粒 pNSL1 和 pNSL2

图 1 的结果显示,在转换时间为 50 - 90 s 的脉冲电泳条件下,从红球菌 NSL1 菌株中检测到两个约 100 kb 和 500 kb 的线型质粒,分别命名为 pNSL1 和 pNSL2。在转换时间为 1 - 25 s 的脉冲电泳条件下测定 pNSL1 的大小约为 110 kb。

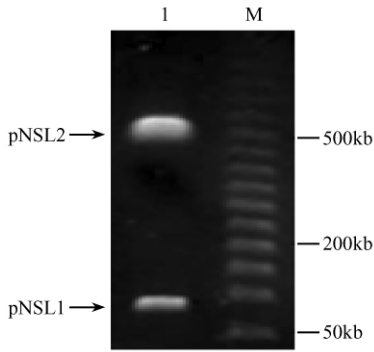


图 1 脉冲电泳检测线型质粒 pNSL1 和 pNSL2

Fig. 1 Detection of linear plasmids pNSL1 and pNSL2 by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The PFGE conditions are 1% agarose gel, 6V/cm, 14°C for 22 h, switch time ramped from 50 to 90 s. 1. Strain NS1; M. Lambda ladder.

### 2.2 线型质粒 pNSL1 端粒 DNA 的定位、克隆、测序和分析

利用脉冲电泳对 pNSL1 进行大量回收、鸟枪克隆、测序和拼接,获得了一个 115702 bp 的拼接产物 (Contig)。用 *PagI* (*BspHI*) 酶切 pNSL1 的片段和预测 115702 bp 的酶切产物存在 4 kb 和 5.7 kb 两个片段的差异,暗示这两个片段是连接了尚未完全克隆的端粒序列。从凝胶中回收这两个 *PagI* 酶切片段,再用 *ClaI* 酶切后,克隆到大肠杆菌载体 pSP72 上,获得了插入片段分别为 2.6 kb 和 1.4 kb 的质粒 pQQ2 和 pQQ3。测序表明 pQQ2 的插入片段为 2648 bp,与 115705 bp 连锁群的左端序列重叠。pQQ3 中插入片段为 1427 bp,与 115705 bp 连锁群的右端重叠。这样,获得了两个端粒的序列,并将 pNSL1 的完整序列拼接为 117252 bp。

两个端粒序列在最后 1282 bp 以内是完全相同的,其末端 200 bp 序列与其它红球菌线型质粒的端粒比对,图 2 显示了在约 100 bp 内非常相似。与其它线型质粒一样,pNSL1 的两个末端有一个位于 13 - 35 bp 的回文序列,包含一个保守的中心基元 (Motif) GCTXCGC。

### 2.3 线型质粒 pNSL1 的序列分析

pNSL1 总长度为 117252 bp, GC% 含量为 65.42%, 预测有 103 个蛋白编码区,与 GenBank 数据库进行比对,其中 69 个预测蛋白与已知蛋白具有

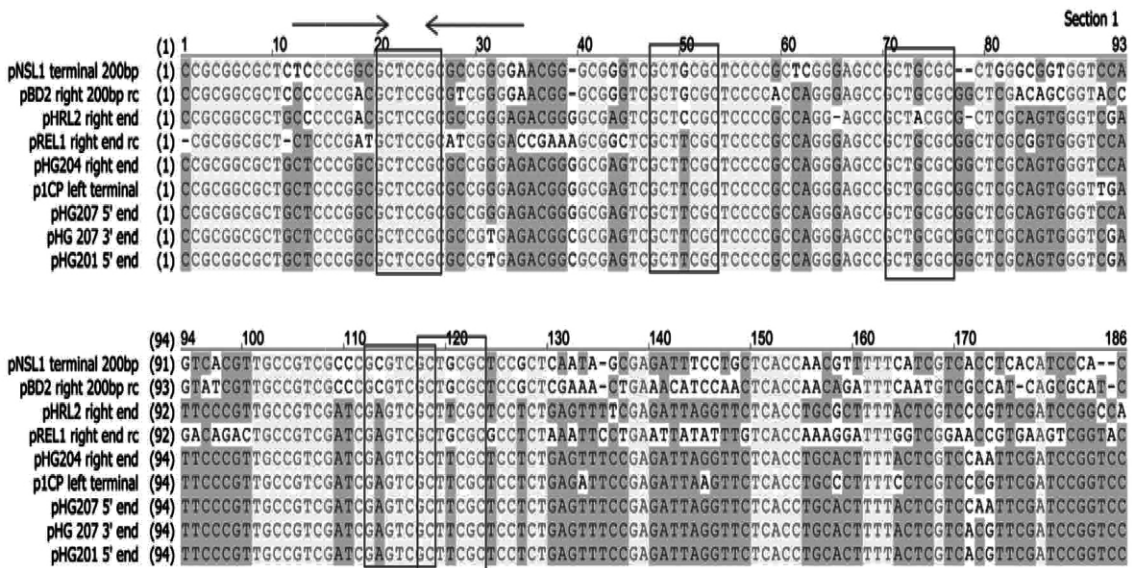


图 2 线型质粒 pNSL1 与其它红球菌线型质粒的端粒序列对比

Fig. 2 Comparison of the pNSL1 telomere with other *Rhodococcus* telomeres, The identical sequences are shadowed and the conserved motifs are boxed. Inverted repeat is indicated by a pair of arrowhead.

较高的同源性, 其余 44 个预测蛋白为未知功能。pNSL1 的基因编码了包括质粒的复制、分配、转移等功能, 如 pNSL1.038 与来自分枝杆菌 (*Mycobacterium*) 质粒 pCLP 的复制蛋白相似<sup>[13]</sup> (期望值为  $6e-10$ , 相似性为 26% [98/363]), pNSL1.070 与好氧球杆菌 (*Sphaerobacter*) 的解旋酶 (helicase) 相似 (期望值为 0, 相似性为 40% [443/1083]), pNSL1.025 与其它红球菌的 DNA 转位酶 (translocase) 非常相似 (期望值为 0, 相似性为 90% [651/718])。此外, pNSL1 上还编码了 4 个成对的三四氨基酸重复蛋白家族 (tetratricopeptide repeat family protein), 如 pNSL1.082/083, 086/087, 089/090, 095/096, 这些成对的蛋白的功能尚未知。

## 2.4 线型质粒 pNSL1 复制区的鉴定和分析

为了验证 pNSL1.038 及其附件的序列/基因是否为复制区, PCR 扩增不同大小的片段, 克隆到大肠杆菌质粒 pQC156 中, 获得了 pQQ9 等 7 个质粒, 利用电击转化导入珊瑚诺卡氏菌 4.1037 中, 转化结果见图 3。实验结果表明, pNSL1.038 基因 (命名为 *repA*) 及其上游的 767 bp 组成最小的复制区, 而只包括 715 bp 的上游序列则不能复制, 暗示这段序列含有复制的关键调控元件。上游序列中包括了 37 bp 长的富含 AT 序列 (34018-34054 bp), GC 含量仅 35.1%, 这一区域在复制过程中可能作为 DNA 双链解开的位置。

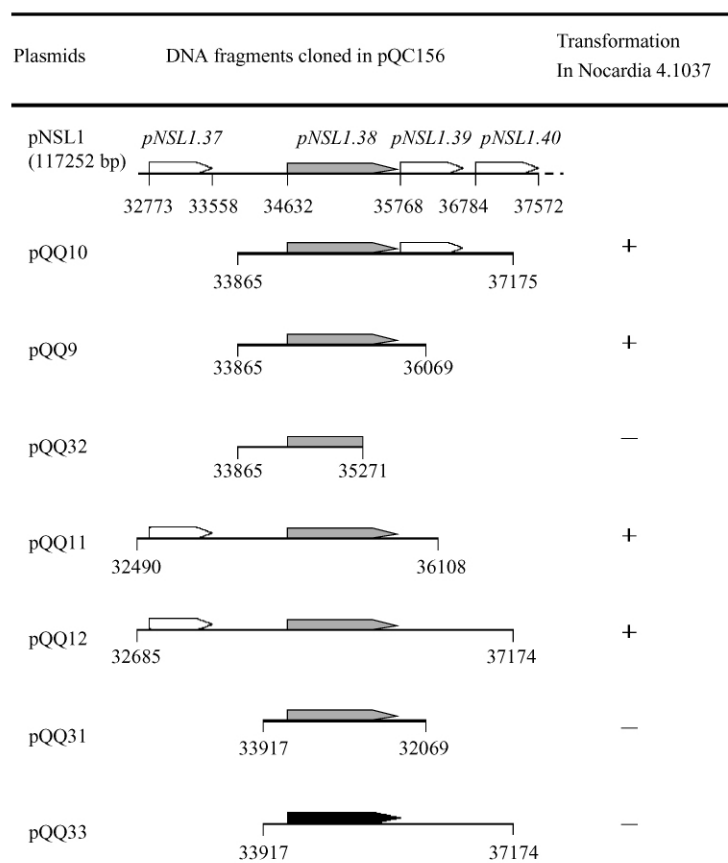


图 3 鉴定 pNSL1 的最小复制区

Fig. 3 Identification of the minimal replication locus. pNSL1 genes are indicated by arrowheads, while replication gene is indicated by filled arrowheads.

## 3 讨论

本研究通过脉冲电泳从低熔点琼脂糖中回收大量的线型质粒 DNA, 超声波打断、鸟枪克隆和测序, 成功地获得了大的线型质粒 pNSL1 的序列。实验室已有超过 10 个大的线型质粒 (50 - 650 kb) 采用

此策略获得了序列 (例如文献 14), 表明该策略对不同线型质粒的克隆和测序是有效的。此外, 在凝胶中变性和复性线型质粒 DNA 后, 克隆了 pNSL1 的端粒序列。实验室利用类似的方法克隆了多个线型质粒的端粒。这些方法的建立和改进, 为放线菌线型质粒的研究提供了方便。

链霉菌线型质粒的复制区常常含有解旋酶基因以及邻近的非编码序列<sup>[14]</sup>。将 pNSL1 上的解旋酶基因 (*pNSL1.070*) 以及邻近的非编码序列克隆到 pQC156 上, 转化珊瑚诺卡氏菌 1037, 不能获得抗性转化子, 暗示该基因不是复制的关键基因。本研究鉴定的 pNSL1 的复制基因 *pNSL1.038* 在其它红球菌, 如 *Rhodococcus* sp. PY11 和 *Rhodococcus jostii* RHA1 的线型质粒上也存在, 暗示该复制基因在其它红球菌中有类似的复制功能。pNSL1 的复制区由 *repA* 及其上游的 767 bp 组成, 该 767 bp 区域没有预测的蛋白编码区, 也没有典型的倒转重复或顺式重复序列 (iteron), 但是包括一段富含 AT 的序列。这与放线菌一些进行 theta 复制的质粒的结构相似, 如链霉菌质粒 SCP2 的复制区<sup>[15]</sup>, 暗示 pNSL1 的复制区可能也以 theta 方式进行复制。

## 参考文献

- [ 1 ] 刘志恒, 姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术. 北京: 科学出版社, 2004.
- [ 2 ] Hayakawa T, Yanaka T, Sakaguchi K, Otake N, Yonehara H. A linear plasmid-like DNA in *Streptomyces* sp. producing lankacidin group antibiotics. *Journal of General and Applied Microbiology*, 1979, 25: 255-260.
- [ 3 ] Kalkus J, Dorrie C, Fischer D, Reh M, Schlegel HG. The giant linear plasmid pHG207 from *Rhodococcus* sp. encoding hydrogen autotrophy: characterization of the plasmid and its termini. *Journal of General Microbiology*, 1993, 139: 2055-2065.
- [ 4 ] Picardeau M, Vincent V. Characterization of large linear plasmids in mycobacteria. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179: 2753-2756.
- [ 5 ] Polo S, Guerini O, Sosio M, Deho G. Identification of two linear plasmids in the actinomycete *Planobispora rosea*. *Microbiology*, 1998, 144 ( Pt 10 ): 2819-2825.
- [ 6 ] Saeki H, Akira M, Furuhashi K, Averhoff B, Gottschalk G. Degradation of trichloroethene by a linear-plasmid-encoded alkene monooxygenase in *Rhodococcus corallinus* (*Nocardia corallina*) B-276. *Microbiology*, 1999, 145 ( Pt 7 ): 1721-1730.
- [ 7 ] Asturias JA, Timmis KN. Three different 2, 3-dihydroxybiphenyl-1, 2-dioxygenase genes in the gram-positive polychlorobiphenyl-degrading bacterium *Rhodococcus globerulus* P6. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175: 4631-4640.
- [ 8 ] Yamada H, Kobayashi M. Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1996, 60: 1391-1400.
- [ 9 ] Qin Z, Shen M, Cohen SN. Identification and characterization of a pSLA2 plasmid locus required for linear DNA replication and circular plasmid stable inheritance in *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185: 6575-6582.
- [ 10 ] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [ 11 ] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [ 12 ] Shen M, Fang P, Xu D, Zhang Y, Cao W, Zhu Y, Zhao J, Qin Z. Replication and Inheritance of *Nocardia* Plasmid pC1. *FEMS Microbiological Letter*, 2006, 261: 47-52
- [ 13 ] Picardeau M, Le Dantec C, Vincent V. Analysis of the internal replication region of a mycobacterial linear plasmid. *Microbiology*, 2000, 146 ( Pt 2 ): 305-313.
- [ 14 ] Zhang R, Xia H, Guo P, Qin Z. Variation in the replication loci of *Streptomyces* linear plasmids. *FEMS Microbiological Letter*, 2009, 290: 209-216.
- [ 15 ] Haug I, Weissenborn A, Brolle D, Bentley S, Kieser T, Altenbuchner J. *Streptomyces coelicolor* A3(2) plasmid SCP2 \*: deductions from the complete sequence. *Microbiology*, 2003, 149(Pt 2): 505-513.

# Cloning, sequencing and identification of replication origin of *Rhodococcus* linear plasmid pNSL1

Yingmin Zhu, Mingxuan Xu, Meijuan Shen, Zhenhua Chen, Zhongjun Qin\*

(Key laboratory of Synthetic Biology, Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes of Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

**Abstract:** Two linear plasmids, pNSL1 and pNSL1, were detected from *Rhodococcus* sp. NS1. [ **Objective** ] Cloning, sequencing and identification of replication origin of the *Rhodococcus* linear plasmid pNSL1. [ **Methods** ] Large amount of linear plasmid DNA was recovered from pulsed-field gels for shotgun-cloning and sequencing, and identification of its replication locus. [ **Results** ] The complete nucleotide sequence of pNSL1 consisted of 117252 bp, including the conserved 1282-bp telomere sequences among *Rhodococcus* linear plasmids. pNSL1 encoded 103 open reading frames, including functions of replication, maintenance and transfer etc. A locus, pNSL1.038 and upstream 767-bp non-coding sequence, was identified for autonomous replication by cloning in an *E. coli* vector and introduced by electroporation into *Nocardia coralline* 4.1037. [ **Conclusion** ] Cloning and sequencing of *Rhodococcus* linear plasmid pNSL1, and identification of its replication origin.

**Keywords:** *Rhodococcus*; linear plasmid; telomere; replication origin

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30870067, 30770045, 30325003), the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA021503) and the Project of Knowledge Innovation of Chinese Academy of Sciences (KSCX2-YW-G-069)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-21-54924171; E-mail: qin@sibs.ac.cn

Received: 5 April 2010/Revised: 28 May 2010

## 英语缩写语在科技写作中的正确使用

科技文章的发表是科学研究的重要组成部分。科研结果如果没有发表,就意味着科研工作没有完成。而科技文章发表的目的,就是要把科研中的新发现、或在原有基础上的提高传播给同行、乃至跨领域以及广大普通的读者。因此,科技写作在道义上来讲,作者应该对读者负责,即:要准确、简洁、清晰地向读者传达科学研究的目的、方法、结果、结论和意义。

在科技论文的写作中,初学者经常会滥用英文缩写语。有些缩写语出现在正文中、摘要中、甚至题目中,让读者丈二和尚摸不着头脑,它究竟代表什么意思?这种滥用缩写语的做法危害之深,让一个辛辛苦苦的实验结果失去了传播知识的价值和机会!因为,除了作者自己,没有人能够看懂作者要传播什么信息。其实,这些作者过一些年以后,自己再来看自己文章中这些莫名其妙的缩写语时,他一定也会后悔莫及。借此机会,根据自己学习的体会和国际上科技文章缩写语使用的惯例,和大家探讨正确使用英语缩写语的方法。

原则上,不鼓励使用缩写语。(1)题目:根据常规,题目中一律不用缩写语。因为题目是一个非常重要的检索工具,如果作者在题目中使用缩写语,会造成人们通过检索系统找不到这篇文章,因此也就失去了传播科学技术的作用和意义。找不到你写的文章,就更谈不上你的文章被人引用的次数了。(2)摘要:同样,摘要往往是独立的,一般和正文分开被检索利用,因此也不用缩写语。对于摘要中出现的真正十分冗长的名词或短语,如果出现频率较高,例如大于六次,则可以考虑使用缩写。但是在第一次出现这个缩写语时,要把缩写语放在括号内并紧跟在缩写语所代表的名词或短语(全拼)之后,即:名词或短语全拼(缩写语),以后就不再使用该缩写语的全名。(3)正文:正文中缩写语的使用规则和摘要中万不得已要使用的情况一样。我这里强调万不得已就是要强调尽量不用缩写语。

(下转第 1114 页)