

## 阴沟肠杆菌一个内切纤维素酶 *Cel8A* 的克隆和功能证实\*

### Cloning and Function Characteristics of an Endo-1,4-β-D-glucanase *Cel8A* Gene from *Enterobacter cloacae*

陈燕<sup>1,2</sup>, 裴建新<sup>1</sup>, 郭媛<sup>1</sup>, 林丽华<sup>1,2</sup>, 黄日波<sup>1,2</sup>, 庞浩<sup>1,2\*\*</sup>

CHEN Yan<sup>1,2</sup>, PEI Jian-xin<sup>1</sup>, GUO Yuan<sup>1</sup>, LIN Li-hua<sup>1,2</sup>, HUANG Ri-bo<sup>1,2</sup>, PANG Hao<sup>1,2</sup>

(1. 广西科学院, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西生物质产业化工程院, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007; 2. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004)

(1. Guangxi Academy of Sciences, State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Biomass Industrialization Engineering Institute, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. College of Life Science & Technology of Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China)

**摘要:**【目的】为了解决纤维素的酶水解问题, 分析能水解纤维素的微生物的相关基因。【方法】从阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) 的基因组数据中挖掘纤维素酶相关基因, 发现开放读码框 *Cel8A* 和纤维素酶基因序列具有高相似性。利用重组表达技术在大肠杆菌中对 *Cel8A* 基因进行表达, 纯化重组蛋白质并对该蛋白质进行功能鉴定。【结果】*Cel8A* 蛋白质能水解羧甲基纤维素钠, 它具有 β-1,4-内切葡聚糖酶的水解特性。 *Cel8A* 的最适反应 pH 值为 7.0, 最适温度为 40℃。【结论】成功克隆表达阴沟肠杆菌的 *Cel8A* 基因, 并证实该基因编码的蛋白质具有 β-1,4-内切葡聚糖酶活性, 为进一步研究阴沟肠杆菌的纤维素酶组成以及纤维素降解机理奠定了基础。

**关键词:** β-1,4-内切葡聚糖酶 酶学特性 阴沟肠杆菌 羧甲基纤维素钠 纤维素水解

**中图分类号:** Q814, Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9164(2014)01-0017-05

**Abstract:**【Objective】The enzymatic hydrolysis of cellulose is a problem waiting for being solved.【Method】In this study, DNA sequence similar with endo-1,4-β-D-glucanase was screened from the genome data of *Enterobacter cloacae*, where one DNA fragment *Cel8A* showed high similarity was found. This DNA was cloned, expressed, and the resulting protein was purified and its function characteristics were analyzed.【Result】This *Cel8A* could hydrolyze carboxymethyl cellulose sodium and showed the endo-1,4-β-D-glucanase action characteristics. Its optimal pH was 7.0 and optimal temperature was 40℃.【Conclusion】In this work, an

endo-1,4-β-D-glucanase gene was successfully found and cloned from *E. cloacae*, which establishes the foundation for further study of the cellulase system and their working mechanism of *E. cloacae*.

**Key words:** endo-1,4-β-D-glucanase, enzymatic characteristics, *Enterobacter cloacae*, carboxymethyl cellulose sodium, cellulose hydrolysis

收稿日期: 2013-07-29

修回日期: 2013-09-15

作者简介: 陈燕(1985-), 女, 硕士, 主要从事微生物学研究。

\* 广西科技合作与交流计划项目(桂科合 1347004-1), 广西科技攻关项目(桂科攻 10123007-3), 广西科学院基本科研业务费项目(12YJ25SW05, 13YJ22SW), 国家自然科学基金项目(21366007)资助。

\*\* 通讯作者: 庞浩(1975-), 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事分子酶学和酶工程研究。Tel: 0771-2503987; E-mail: panghouse@126.com.

**【研究意义】**纤维素的酶水解是一个有待于解决的问题。纤维素的酶法水解由纤维素酶系进行, 纤维素酶系由 3 种作用方式不同但相互协同催化水解纤

纤维素的酶组成:(1)外切纤维素酶(exo-1,4- $\beta$ -D-glucanase, EC3. 2. 1. 91), 这类酶从纤维素链的一端进行酶切, 水解  $\beta$ -1,4-糖苷键, 每次从长链上切下一个纤维二糖分子;(2)内切纤维素酶(endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase, EC3. 2. 1. 4), 这类酶从纤维素的内部随机水解  $\beta$ -1,4-糖苷键, 水解产物是各种大小不一的短纤维素链;(3)  $\beta$ -葡萄糖苷酶( $\beta$ -glucosidase, EC3. 2. 1. 21), 这类酶将纤维二糖水解释成葡萄糖分子<sup>[1]</sup>。虽然, 对纤维素酶的研究已经进行得很广泛, 很多纤维素酶基因从不同的微生物中被克隆和表达。但是关于纤维素酶的作用机理和微生物种群分布仍然有许多难题有待于解决。比如纤维素酶的多态性问题, 在不同的微生物中, 存在着水解能力各不同的纤维素酶, 低水解能力的酶对于宿主具有何种意义还有待于研究。【前人研究进展】在已知的 132 个糖苷水解酶家族中, 纤维素酶按蛋白质序列和作用方式的不同被划分到 22 个家族中([http://www.cazy.org/fam/acc\\_GH.html](http://www.cazy.org/fam/acc_GH.html))。内切纤维素酶分布于 14 个家族(5、6、7、8、9、10、12、26、44、45、48、51、61、74); 外切纤维素酶分布于 5 个家族(5、6、7、9、48);  $\beta$ -葡萄糖苷酶分布于 3 个家族(1、3、9)。在内切纤维素酶的家族中, 家族 9 是被研究得最多的一个。【本研究切入点】阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae*) 是肠杆菌科肠杆菌属, 它是一个重要的生物质能源产生菌株, 具有发酵生产氢气的能力<sup>[2]</sup>, 还具有发酵木糖产乙醇的能力<sup>[3]</sup>。但是来源于这个属的微生物的纤维素酶很少被发现和报道。本研究从阴沟肠杆菌 GX(*Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* GX) 中克隆和表达了一个糖苷水解酶家族 8 的内切纤维素酶基因, 并对该基因编码的蛋白质进行功能鉴定。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*) XL1-blue 由实验室保存, 阴沟肠杆菌 GX 自行筛选。质粒 pQE30 购买自美国 Qiagen 公司。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

细菌基因组提取试剂盒购自 TIANGEN 公司; PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA ligase、DNA Marker 和 Protein Marker 购自 TaKaRa 公司; 羧甲基纤维素钠购买自美国 Sigma-Aldrich 公司; 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG) 购自 Calbiochem 公司; Yeast extract 和 Tryptone 购自 OXOID 公司; 其它试剂均为国产分析纯试剂。寡聚

核苷酸由上海生工生物公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 基因序列比较和蛋白质分析

利用 NCBI 的 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行基因检索和 DNA 比对, 利用 CAZY 数据库(<http://www.cazy.org>)进行糖基水解酶(glycosyl hydrolase)分类分析和检索<sup>[4]</sup>, 利用 SMART 软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行蛋白质结构组件分析<sup>[5]</sup>。使用 Vector NTI 10.0 软件进行引物设计。

#### 1.2.2 目的基因克隆

用细菌基因组 DNA 试剂盒(TIANGEN 公司)提取阴沟肠杆菌 GX 的基因组 DNA, 通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 浓度。

根据 Genbank 数据库公开的阴沟肠杆菌 ATCC 13047 的  $\beta$ -1,4-内切葡聚糖酶基因序列设计 PCR 扩增引物: P1: 5'-CG GGATCCACCTGGCCTGCCT-GGGAGC-3' 和 P2: 5'-ACGCGTCGACTCAAGTT-GCGCATTCCTGG-3', 分别在上下游引物的 5' 端引入 BamHI 和 SalI 酶切位点(下划线部分)。以阴沟肠杆菌 GX 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增(95 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 20 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min), 回收目的 PCR 产物, 用 BamHI 和 SalI 酶切后与经相同限制性内切酶酶切的表达载体 pQE30 连接, 连接产物转化到大肠杆菌 XL1-blue 感受态细胞中。将连接转化子点在有 1% CMC-Na 的 LA-平板上, 在 37 $^{\circ}$ C 培养箱倒置培养 5 h。待长出菌落后用 IPTG 进行诱导, 继续培养 7 h 后, 取适量氯仿进行熏蒸破胞 10 min, 待氯仿挥发完后, 将平板放入 37 $^{\circ}$ C 恒温箱 8 h, 加入 0.1% 刚果红溶液, 使其浸满平板表面, 室温静置 20 min 染色, 倒掉刚果红溶液, 用 1M/L NaCl 溶液浸泡洗脱, 间隔换洗数次, 直至脱色清楚后观察是否有水解圈。所运用的基因操作、质粒提取、大肠杆菌感受态细胞制备和转化等方法按文献<sup>[6]</sup>进行。

#### 1.2.3 目的蛋白的诱导表达与纯化

挑取含有 pQE-Cel8A 的重组大肠杆菌单菌落接种到 LB 培养基中, 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.4~0.6 时, 加 IPTG 至终浓度为 0.5 mM/L, 37 $^{\circ}$ C 诱导 8 h。表达的重组蛋白质 Cel8A 使用 Ni-NTA 镍亲和层析纯化, 再通过 30 kD 的超滤膜脱盐处理。纯化的 Cel8A 蛋白质进行变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

#### 1.2.4 蛋白质浓度的测定

利用 Bradford 检测法<sup>[7]</sup>测定蛋白质浓度。使用上海捷瑞生物工程有限公司的 Bradford 试剂盒, 待

试剂盒中的牛血清白蛋白(BSA)全溶,Bradford 工作液降到室温时,配制 0.5 mg/mL 牛血清白蛋白作为蛋白质标准溶液。取试管 8 支,向每支试管中加入对应体积的 BSA 蛋白质标准溶液和 PBS,充分混合均匀,得到不同浓度的蛋白质溶液,最后分别加入配制好的 Bradford 工作液 1 mL,充分混匀,用分光光度计在 595 nm 处测量吸光值。以 BSA 蛋白质含量为横坐标,  $OD_{595}$  为纵坐标,绘制蛋白质标准曲线。蛋白含量标准曲线的方程为  $y=0.0213x+0.01$ ,  $R^2$  为 0.9988。

### 1.2.5 内切葡聚糖酶的酶学性质测定

葡萄糖标准曲线的绘制:称取 100 mg 烘干至恒重的分析纯葡萄糖,加蒸馏水溶解并移入 100 mL 容量瓶,定容至 100 mL 后充分混匀,即得到葡萄糖标准溶液(1 mg/mL)。向反应管中加入葡萄糖标准溶液和蒸馏水,配成一系列梯度浓度的葡萄糖溶液。每管中均再加入 0.5 mL DNS 溶液,摇匀后沸水浴 5 min,冷却至室温后加入酶标板中。测定其余各反应管的  $OD_{540}$  值,减去空白对照调零点,以光密度值为横坐标,以相应的葡萄糖含量为纵坐标,绘制出的曲线即为葡萄糖标准曲线。葡萄糖标准曲线的方程为  $y=3.0834x-0.1356$ ,  $R^2$  为 0.9996。

最适 pH 值的测定:在 pH 值 4.5~9.0 的范围,用 50 mM/L 醋酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液和甘氨酸-NaOH 缓冲液配制 pH 值分别为 4.5、5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 的 1% CMC-Na,将纯酶液置于上述 9 个梯度 pH 值的 1% CMC-Na,在 37 °C 时测定其活力。反应时间 30 min,反应体系是 500  $\mu$ L,酶浓度 1.1 mg/mL,加入酶量 10  $\mu$ L,加入 DNS 500  $\mu$ L。

最适温度的测定:在 25~60 °C 范围,分别取 25°C、30°C、35°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C 8 个梯度,用最适 pH 值磷酸盐缓冲液配制成的 1% CMC-Na 底物,加入纯酶液分别在上述系列梯度温度下反应,对其进行活力测定。反应时间 30 min,反应体系是 500  $\mu$ L,酶浓度 1.1 mg/mL,加入酶量 10  $\mu$ L,加入 DNS 500  $\mu$ L。

内切葡聚糖酶的酶活定义:每分钟生成 1  $\mu$ mol 葡萄糖所需要的酶量定义为一个酶活单位(1 U)。检测内切纤维素酶纯酶的比酶活时,CMCase 活力单位(U/mL) =  $m \times 10^3 / (M \times T \times V)$ ,式中,  $m$  为葡萄糖含量;  $M$  为葡萄糖分子量;  $T$  为反应时间(min);  $V$  为酶液体积(mL)。

## 2 结果与分析

### 2.1 Cel8A 的生物信息学分析

以阴沟肠杆菌的基因组在 NCBI 数据库中进行比对分析,查找到来自阴沟肠杆菌 ATCC 13047 的 1 个注析为内切-1,4-葡聚糖酶的蛋白(序列号为 YP\_003615408.1),命名为 Cel8A。使用 SMART 工具分析 Cel8A 的结构组件,发现自 N 端的第 1~345 位氨基酸为家族 8 糖基水解酶功能域(图 1a)。使用 SignalP 4.1 Server 分析 Cel8A 信号肽序列,结果显示 1~22 位氨基酸为信号肽序列(图 1b)。

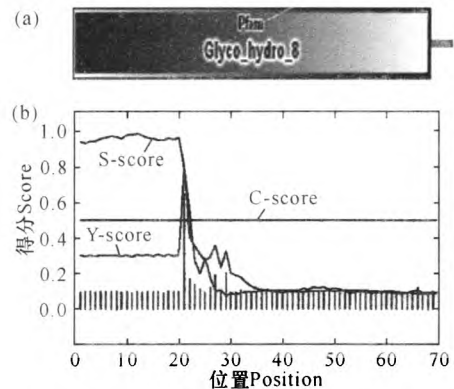


图 1 Cel8A 蛋白质生物信息学分析

Fig. 1 Bioinformatics analysis of Cel8A protein

(a) Cel8A 的蛋白质结构组件分析; (b) Cel8A 的信号肽序列分析。

(a) Modular architecture analysis of Cel8A protein; (b) Signal peptide analysis of Cel8A.

### 2.2 重组表达质粒 pQE-Cel8A 的构建

以阴沟肠杆菌 GX 的总 DNA 为模板扩增目的基因 *Cel8A*,产物经琼脂糖凝胶电泳分析有大小约为 1kb 特异性扩增条带,与预期相符(图 2)。将胶回收的 PCR 产物连接到表达载体 pQE30 上。

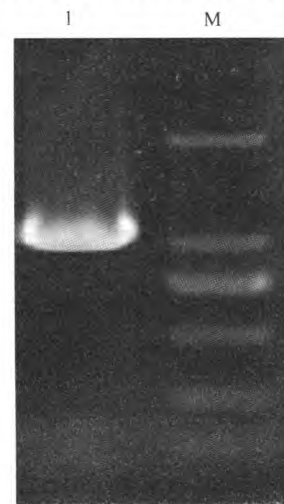


图 2 Cel8A 的 PCR 产物

Fig. 2 PCR production of *Cel8A* gene

M: DNA 分子量标记 DL2000; 1: *Cel8A* 的 PCR 产物。

M: DNA molecular marker DL2000; 1: PCR production of *Cel8A* gene.

利 CMC 选择平板筛选转化子。从图 3 可以看出,含有空质粒的转化子“1”旁边没有透明圈,而含有重组质粒的转化子“2”、“3”及“4”周围具有明显的透明圈,证明其具有内切葡聚糖酶活力。形成透明圈的重组质粒命名为 pQE-*Cel8A*。

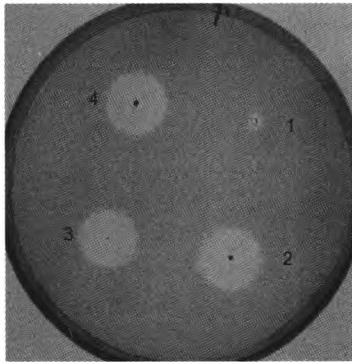


图 3 筛选重组菌株 pQE-*Cel8A* 的 CMC 选择平板

Fig. 3 Recombinant pQE-*Cel8A* strains on CMC selection plate

### 2.3 重组蛋白 *Cel8A* 的诱导表达及纯化

*Cel8A* 基因表达产物的 SDS-PAGE 分析表明,与对照菌株相比,含有重组质粒的大肠杆菌菌株 XL1-blue 在 37.7 kD 处有明显蛋白质特征条带出现,蛋白分子量与由基因序列推测所得的理论分子量一致;经 Ni-NTA 镍亲和层析纯化获得 90% 纯度的 *Cel8A* 蛋白(图 4)。

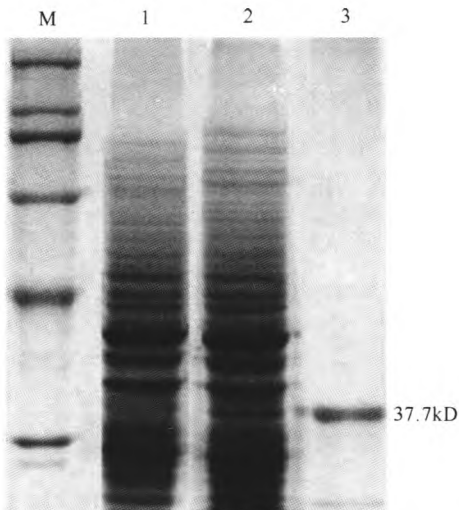


图 4 *Cel8A* 的表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of expressed product of *cel8A*

M: 蛋白质分子量标记; 1: 空白对照菌株; 2: 重组表达菌株; 3: 纯化的蛋白质。

M: Protein molecular marker; 1: Control strains; 2: Recombinant strain; 3: Purified protein.

### 2.4 *Cel8A* 的内切葡聚糖酶学性质

#### 2.4.1 最适 pH 值

在 37℃ 下于一系列缓冲液中测定 pH 值对

*Cel8A* 蛋白的酶活力的影响,并以最高活力计算各个 pH 值下的相对活力,绘制 pH 值对酶活的影响图,相对酶活力最高的即为最适 pH 值。*Cel8A* 的最适反应 pH 值为 7.0,在 pH 值 5.0~8.0 范围内保留了 50% 以上活力,而在 pH 值 5.0 以下活力则迅速下降(图 5)。

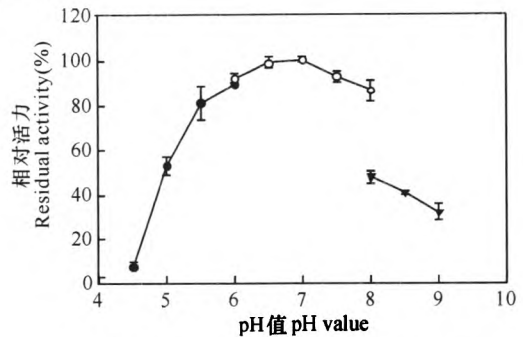


图 5 pH 值对 *Cel8A* 内切葡聚糖酶活力的影响

Fig. 5 Effect of pH value on the activity of *Cel8A*

#### 2.4.2 最适温度

在 50 mM/L pH 值 7.0 磷酸缓冲液条件下,分别在不同的温度(25~60℃,每隔 5℃ 取值)测定温度对 *Cel8A* 酶活力的影响,并以最高活力计算各个温度下的相对活力,相对酶活力最高的即为最适温度。*Cel8A* 的最适反应温度为 40℃。在温度 25~55℃ 之间能保持 55% 以上的酶活力(图 6)。

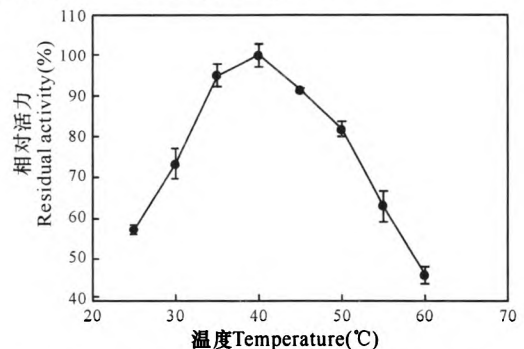


图 6 温度对 *Cel8A* 内切葡聚糖酶活力的影响

Fig. 6 Effect of temperature on the activity of *Cel8A*

## 3 结论

在自然界,纤维素的水解需要在纤维素酶系 3 类纤维素酶的协同作用下才发生降解。在 3 类纤维素酶中,外切纤维素酶被认为具有破坏纤维素结晶区的作用,从而暴露出葡萄糖链,为后续的内切纤维素酶提供作用基础<sup>[8]</sup>。在破坏结晶区的基础上,内切纤维素酶从纤维素的内部接近葡萄糖链,与外切纤维素酶一起协同作用加速纤维素的水解进程<sup>[9~11]</sup>。这 3 类纤维素酶中,内切纤维素酶和外切纤维素酶的相互作用是最重要的,他们之间不同的相互作用方式决定了纤维素的水解程度<sup>[12]</sup>。

内切纤维素酶对纤维素长链的作用方式是:酶和底物接合,切断 $\beta$ -1,4-糖苷键,酶和底物分离。具体来说,当酶和底物相遇时,纤维素长链进入活性中心的深沟中,内切纤维素酶的氨基酸催化集团催化一次反应,导致葡萄糖链的一个 $\beta$ -1,4-糖苷键发生断裂,纤维素链分解成两条,然后酶和底物相互分离。当内切纤维素酶和纤维素链再次相遇,相同的酶切过程再次发生。这样的过程反复进行,把纤维素长链切成长短不同的碎片,从而产生了很多的末端(每一个纤维素链有两个末端,即还原性的末端和非还原性的末端)。

本研究通过检索基因组数据库,从阴沟肠杆菌的基因组信息中发现一个*Cel8A* DNA片段与 $\beta$ -1,4-内切葡聚糖酶具有很高的相似性。通过SMART进一步分析发现这是一个糖苷水解酶家族8的蛋白质。对这个蛋白质进行重组表达和纯化之后,进行的酶活测试发现,这个蛋白质可以水解羧甲基纤维素,水解活力很高,在活性平板上形成了水解活性圈,说明这是一个内切纤维素酶。活性测定表明这个*Cel8A*内切纤维素酶的最适反应pH值为7.0,最适反应温度为40℃,它是一个中温和中性作用方式的内切纤维素酶。

虽然已有文献报道阴沟肠杆菌具有利用木糖等原料的能力,但是没有发现这个菌株利用纤维素作为原料的报告。本研究证实阴沟肠杆菌拥有内切纤维素酶,并且这个内切纤维素酶*Cel8A*具有内切水解功能。因而,阴沟肠杆菌对于纤维素原料利用能力弱的原因应该在于缺乏外切纤维素酶,或是缺乏内切纤维素酶和外切纤维素酶的合理协同作用。进一步对阴沟肠杆菌是否拥有外切纤维素酶进行研究将能揭示这个问题的答案。

#### 参考文献:

- [1] Percival Zhang Y H, Himmel M E, Mielenz J R. Outlook for cellulase improvement; screening and selection strategies[J]. *Biotechnol Adv*, 2006, 24(5): 452-481.
- [2] Mishra J, Khurana S, Kumar N, et al. Molecular cloning, characterization, and overexpression of a novel [Fe]-hydrogenase isolated from a high rate of hydrogen producing *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 324(2): 679-685.
- [3] 贺应龙, 胡秋龙, 苏小军, 等. 一株可发酵木糖产乙醇细菌的筛选[J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2011(04): 456-460.
- He Y L, Hu Q L, Su X J, et al. A bacteria for ethanol fermentation from xylose[J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2011(04): 456-460.
- [4] Cantarel B L, Coutinho P M, Rancurel C, et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(Database issue): D233-238.
- [5] Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(Database issue): D302-305.
- [6] Sambrook J, Russell D W. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. N Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [7] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72(1-2): 248-254.
- [8] Morais S, Heyman A, Barak Y, et al. Enhanced cellulose degradation by nano-complexed enzymes: Synergism between a scaffold-linked exoglucanase and a free endoglucanase [J]. *J Biotechnol*, 2010, 147(3-4): 205-211.
- [9] Jeon S D, Yu K O, Kim S W, et al. The processive endoglucanase EngZ is active in crystalline cellulose degradation as a cellulosomal subunit of *Clostridium cellulovorans* [J]. *N Biotechnol*, 2012, 29(3): 365-371.
- [10] Bai A X, Zhao X Y, Jin Y W. A novel thermophilic beta-glucosidase from *Caldicellulosiruptor bescii*: Characterization and its synergistic catalysis with other cellulases [J]. *J Molecul Catal B-Enzym*, 2013, 85-86: 248-256.
- [11] 杨登峰, 关妮, 米慧芝, 等. 眉斑并脊天牛纤维素酶性质的研究 [J]. *广西科学*, 2011, 18(3): 261-263, 268.  
Yang D F, Guan N, Mi H Z, et al. Research on *Glenea cantor* cellulase characteristics [J]. *Guangxi Sciences*, 2011, 18(3): 261-263, 268.
- [12] 庞浩, 陈燕, 吴倩倩, 等. 地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 外切葡聚糖酶 *CelB* 基因的发掘及功能鉴定 [J]. *生物技术通报*, 2013(9): 151-157.  
Pang H, Chen Y, Wu Q Q, et al. Exploring and function characteristics of Exo-1, 4- $\beta$ -D-glucanase *CelB* gene of *Bacillus licheniformis* [J]. *Biotech Bulle*, 2013(9): 151-157.

(责任编辑: 陈小玲)