

# 利用 DNA shuffling 技术构建含 5 个 cry 基因的突变体库以筛选高毒力杀虫蛋白

张小琼 林拥军

华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070

**摘要** 以改造合成的 5 个 Bt 基因(*cry1C\**、*cry2A\**、*cry1Ab*、*cry1Ac* 和 *cry9C\**)为材料, 利用 DNA shuffling 的体外分子进化技术构建 1 个含有 1 000 个重组基因克隆的大肠杆菌表达库; 通过诱导表达重组蛋白, ELISA 方法测定蛋白表达量, 以棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)为试验昆虫进行毒性试验。结果显示: 重组克隆的蛋白毒性与阳性对照 Cry1Ac 相比, 增强的有 122 个, 持平的有 38 个, 有毒性但毒性降低的有 232 个, 失去毒性的有 608 个; 对这 1 000 个重组克隆进行了测序, 比较了重组基因与原始基因的序列同源性, 除去 55 个克隆未能找到其原始基因来源, 将其余的 945 个重组克隆从 5 个 Cry 蛋白的核苷酸编码序列的同源性出发, 划分为源于 *cry1Ab*、*cry1Ac*、*cry1C\**、*cry2A\** 和 *cry9C\** 的 5 个重组克隆类型。根据毒力变化分为毒力上升、持平、下降 3 组。对 1 000 个重组基因的氨基酸序列进行分析后发现, 相对于毒力上升和持平组, 5 个毒力下降组的重组克隆间的氨基酸序列同源性最低。

**关键词** DNA shuffling; Cry 蛋白; 序列比较; 突变体库

**中图分类号** Q 78    **文献标识码** A    **文章编号** 1000-2421(2011)01-0013-05

1901 年, 日本学者石渡从染病的家蚕体液中首次分离出苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt), 并证明它对部分鳞翅目昆虫有杀虫活性<sup>[1]</sup>。现已从不同 Bt 亚种中分离出对不同目的昆虫有特异毒杀作用的杀虫晶体蛋白。昆虫取食 Cry 蛋白, 在昆虫的中肠水解活化产生毒蛋白并与肠道上皮细胞上的受体(BBMV)结合, 产生小孔, 破坏渗透平衡, 引起中肠细胞的裂解, 导致昆虫的死亡<sup>[2]</sup>。

过去 Bt 基因的改造方法主要是定点突变<sup>[3]</sup>、寡核苷酸替代及结构域交换<sup>[4]</sup>等。这些研究为 Bt 基因的认识提供了很多帮助, 但这些传统的方法有一定的局限性。DNA shuffling 是一种基于 PCR 的新的体外定向分子进化技术。它利用 DNase I 将欲改造的基因或基因家族打断成一定大小的片段, 在 PCR 的复性过程中, 利用片段间部分同源性发生错配, 错配的片段互为模板进行延伸。这些基因在延伸中因为错配引入了突变, 通过人为的定向选择, 最终得到符合需要的新基因。该技术自 1994 年 Stemmer<sup>[5-6]</sup> 发明以来, 就不断地得到应用和完善。

在实验室用于改造基因, 如更高表达量的荧光蛋白<sup>[7]</sup>或者更易结晶的蛋白<sup>[8]</sup>、改变酶的理化性质<sup>[9]</sup>等。在实际应用方面如改造商业用酶<sup>[10]</sup>、医用疫苗<sup>[11]</sup>、病毒育种<sup>[12]</sup>等也获得好的效果。这种改造方法简单易行, 可以多位点同时进行改造, 并且可以同时优化不同的理化性质<sup>[13]</sup>; 相较于传统的改造手段, 还具有同时多基因改造<sup>[14]</sup>且可以根据需要调整技术手段<sup>[15-16]</sup>的优点。DNA shuffling 技术在 Cry 蛋白方面改造的研究也有开展, 但研究不多<sup>[17]</sup>。

本研究旨在通过对 5 个 Bt 杀虫晶体蛋白基因的 DNA shuffling 的改造, 获得一些新的编码高毒力杀虫蛋白的基因。

## 1 材料与方法

### 1.1 基因来源

原始基因为 5 个具有鳞翅目特异杀虫毒力的 Bt 蛋白基因: *cry1Ab*、*cry1Ac*、*cry1C\**、*cry2A\**、*cry9C\**, 其中 *cry1Ab*、*cry1Ac* 由加拿大渥太华大学 Altossar 博士改造合成, *cry1C\**、*cry2A\**、

*cry9C\**由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室林拥军博士和张启发院士改造合成。5个杀虫基因均构建于pUC18质粒上。

## 1.2 原始基因片段的获得

以5个原始基因两端的质粒序列设计PCR引物,使其具有共同的末端。正向引物为:5'-agctacaacaaggcaagg-3',反向引物为:5'-tagaaggcacagtcgagg-3'。

PCR扩增程序为:95℃3 min;95℃1 min,55℃1 min,72℃1.5 min,30个循环;72℃10 min。分别扩增这5个基因片段,检测后用1%琼脂糖凝胶电泳回收(UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒,购于上海生工),分别纯化这5个基因的扩增产物,去除多余的引物。

## 1.3 基因重组

将5个基因的回收产物等量混合后,用DNase I消化10 min,然后用1.5%的琼脂糖凝胶电泳,回收其中100~200 bp大小的片段。将收集到的纯化的片段进行DNA shuffling,重组方法参照Stemmer的方法<sup>[6]</sup>,得到的重组片段用1%琼脂糖凝胶电泳,回收其中的1.5~2.5 kb片段。

## 1.4 阳性克隆的筛选

回收的重组片段用限制性内切酶BamH I和EcoR I进行酶切后,连接到大肠杆菌表达载体pGEX-KG上,并电转化至大肠杆菌DH5 $\alpha$ 。在含有100  $\mu$ g/mL氨苄青霉素(Amp)的LA培养基上培养过夜,然后进行菌落PCR扩增,PCR引物和反应条件同上。将筛选到的阳性克隆培养后加入等量的50%甘油,-70℃保存。

## 1.5 重组基因的诱导表达

以菌体量、温度和IPTG浓度等为参数进行优化试验,通过蛋白表达量测定,找到适宜的诱导条件。将1  $\mu$ L阳性克隆的保存菌株接至1 mL LB培养液(含Amp 100  $\mu$ g/mL)中37℃过夜培养,然后将这1 mL菌液扩大培养至150 mL LB培养液中37℃培养3 h。再加入终浓度为5 mmol/L的诱导剂IPTG,28℃诱导培养3 h至 $D_{600\text{nm}}=0.8$ ,8 000 r/min离心3 min,收集菌体,弃去培养液,称量菌体,加入800 L无菌蒸馏水,震荡混匀。

## 1.6 重组蛋白的生物测定方法

将每个重组克隆的150 mL菌液收集浓缩到800  $\mu$ L,分别均匀混在等量的棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)的人工饲料中,然后将人工饲料均匀倒入测试板的24个测试孔中,每个孔中接入1头1龄

棉铃虫。每个样品每次重复试虫数为24头,共设置3个重复。以pGEX-KG空白载体转化的大肠杆菌为阴性对照,装载原始*cry1Ac*基因的pGEX-KG转化的大肠杆菌为阳性对照。28℃温箱饲养3 d后统计死亡的棉铃虫数。棉铃虫的人工饲料配方是由武汉科诺生物农药有限公司提供。

## 1.7 重组基因测序及比对

阳性克隆的DNA序列测定由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室完成。测序仪为ABI Prism 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems Inc)。每个克隆重复测序2次,若2次测定结果有差异的,则进行第3次测定,以2次重复序列为准。测序引物为:5'-gggctggcacacgtttggtg-3', 5'-attgtgtctcttcccgaa-3', 5'-actgttcttgatatcgctgc-3' 5'-tgactattccaactactgca-3', 5'-tgtaccccacccggcagcaac-3' 和5'-ccgggagctgcatgtcagagg-3'。

所有重组克隆与原始Bt蛋白的序列多重比对使用软件DNAMAN version 5.2.2,相关参数为:Gap Open Penalty 10; Delay Divergent Seqs% 30; Gap Extension 0.2; Protein Weight GONNET。

## 1.8 重组蛋白含量的测定

对1 000个重组克隆进行序列测定并和原始*cry*基因核苷酸序列进行同源性比对后,根据重组克隆的基因来源,ELISA法测定相应的Cry蛋白含量。ELISA试剂盒QualiPlateTM Kit for Cry1Ab/Cry1Ac, QualiPlateTM Kit for Cry2A均来自于EnviroLogix Inc公司。蛋白样品的制备:将诱导后的150 mL的大肠杆菌培养液培养至 $D_{600\text{nm}}=0.8$ 时,8 000 r/min离心3 min收集菌体。然后用500  $\mu$ L抽提缓冲液重新悬浮,随即冰冻至-80℃,然后在37℃融化,如此反复冻融4次。3 000 r/min离心5 min。加入50  $\mu$ L上清液至96孔板中,每个样品3次重复。整个ELISA的操作按照EnviroLogix Inc提供的手册进行。450 nm波长下测定和记录其吸光值。

# 2 结果与分析

## 2.1 重组基因文库的建立

本试验所用的*cry1Ab*,*cry1Ac*,*cry1C\**,*cry2A\**,*cry9C\**基因均是按植物基因优势密码改造而成的,除*cry1Ab*和*cry1Ac*同源性较高之外,其他几个基因之间有较大的序列差异。因此,可以利用这些基因间的同源性和差异使片段间产生错配

重组。经DNA shuffling后,建立了具有1 000个阳性克隆的重组cry基因文库。

## 2.2 重组克隆的生物测定结果

在5个原始Cry蛋白中,Cry1Ac的杀虫毒力最高,平均杀虫数为9.33。Cry1Ab为8.67,Cry1C为6.00,Cry2A为4.67,Cry9C为3.33。在这1 000个阳性克隆中,杀虫数大于9.33的克隆有122个。

从生物测定结果可以看出,杀虫毒性提高的克隆数很少,而绝大多数克隆的杀虫毒性降低或没有杀虫毒性。这说明在自然界的进化中,5个原始基因已经将基因中的负向突变逐渐淘汰,保留下来的基因中的位点大多为正向或中性突变,在突变过程中再引入一个突变,导致负向突变概率增大。

表1 ELISA方法测定的部分毒力提高的克隆和原始Cry蛋白的蛋白含量<sup>1)</sup>

Table 1 Protein concentrations of selected recombinant clones expressing mutational Cry proteins with increased toxicity and parental Cry toxin by ELISA assay

克隆编号 Clone No.	平均蛋白含量/(μg/g) Mean of protein concentrations	标准差 <i>S<sub>d</sub></i>
185	1.330 a	1.281×10 <sup>-3</sup>
305	1.330 a	0.264×10 <sup>-3</sup>
323	1.365 a	0.703×10 <sup>-3</sup>
932	1.364 a	2.821×10 <sup>-3</sup>
936	1.333 a	0.690×10 <sup>-3</sup>
983	1.371 a	0.312×10 <sup>-3</sup>
738	1.375 a	0.290×10 <sup>-3</sup>
994	1.380 a	1.472×10 <sup>-3</sup>
977	1.363 a	0.103×10 <sup>-3</sup>
725	1.375 a	0.134×10 <sup>-3</sup>
728	1.385 a	0.506×10 <sup>-3</sup>
723	1.411 a	0.472×10 <sup>-3</sup>
Cry2A	1.422 a	0.156×10 <sup>-3</sup>
Cry1Ac	1.374 a	8.684×10 <sup>-3</sup>
Cry1Ab	1.369 a	7.658×10 <sup>-3</sup>

1)同列数据后字母相同者,表示差异不显著( $P>0.05$ ,下同)。The data within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level (the same as following tables).

毒力降低的克隆绝大部分产生了蛋白质序列上的突变,导致失去活性。还有一些毒力下降的克隆,因为表达量过小不能将其用到后面的研究工作中而被淘汰。对于筛选到的毒力提高的突变克隆,为了解重组蛋白含量对生测结果的影响,即是否由于蛋白表达量而导致毒力提高,我们对重组克隆中蛋白的表达量进行了测定。在对1 000个重组克隆进行序列测定并和原始基因核苷酸序列进行同源性比对后,根据克隆的基因来源选择对应的ELISA特异蛋白试剂盒进行Cry蛋白含量的测定,将克隆的蛋白含量和原始的Cry蛋白含量进行统计学分析,

结果(表1)显示:这些克隆的蛋白含量与原始的Cry蛋白含量相比,并无显著性差异( $P>0.05$ ),说明这些克隆毒力得到提高确实是因为氨基酸突变带来的。

## 2.3 重组克隆的测序结果

1 000个重组克隆的核苷酸序列比对结果如下:与cry1Ab、cry1Ac、cry1C\*、cry2A\*和cry9C\*具有序列相似性的克隆分别有235、186、16、420和88个,比例分别为23%、19%、2%、42%、9%,同源性未知的序列有55个,占5%;其中来源于cry2A\*的重组克隆最多。

来源于5个原始基因的重组克隆均有毒力提高的克隆,其中大部分毒力提高的克隆来自于cry2A\*、cry1Ac和cry1Ab,详见表2。与cry1Ab有序列相似性的有235个,在1 000个重组克隆中数量居于第2位。其杀虫活性略低于cry1Ac,但是在杀虫活性最高的10个重组基因中,也只有1个来源于cry1Ab,这一点和cry1Ac相同。原因可能是无论从核苷酸序列还是从蛋白的结构上来说,两者都有高度同源性。从本试验来看,cry1Ab、cry1Ac的这2个基因改造过程中得到的毒性降低和丧失毒力的克隆占大多数,而杀虫数增加的重组克隆较少。来源于cry1Ac的重组基因数量其次,而用于对照的原始的cry1Ac的杀虫活性则是5个原始基因中最高的。但是在杀虫数目最多的10个重组基因中,只有1个来源于cry1Ac。可能是由于cry1Ac在进化过程中,属于进化成熟的基因,如果人为的引入新的核苷酸从而改变其氨基酸,带来的多是中性或者负向突变。

表2 1 000个阳性克隆中杀虫活性前10的克隆杀虫数及其来源

Table 2 The top 10 toxic clones in the 1 000 clones and their gene sources

克隆编号 Clone No.	平均杀虫数 Mean numbers of larvae killed	基因来源 Gene source
983	20.33±2.67 a	cry2A*
738	19.67±1.20 a	cry2A*
994	19.00±2.08 a	cry2A*
977	18.67±0.88 a	cry1Ab
725	18.33±2.40 a	cry2A*
728	18.33±3.71 a	cry2A*
932	18.33±1.33 a	cry1Ac
723	17.67±1.20 a	cry2A*
764	17.67±4.10 a	cry2A*
430	17.33±0.67 a	cry2A*
Cry1Ac	9.33±0.88 b	cry1Ac

## 2.4 不同来源的重组克隆的不同杀虫效果的克隆数比较

除去55个克隆未能找到其原始基因来源,将其余的945个重组克隆从5个Cry蛋白的核苷酸编码序列的同源性出发,划分为源于 $cry1Ab$ , $cry1Ac$ , $cry1C^*$ , $cry2A^*$ 和 $cry9C^*$ 的5个重组克隆类型。再根据毒力变化分为毒力上升、持平、下降3组(表3)。

表3 5个 $cry$ 杀虫基因来源的重组克隆的  
不同杀虫效果的克隆数

Table 3 Toxicity levels of 5  $cry$  gene source clones

毒力	Toxicity	$cry1Ab$	$cry1Ac$	$cry1C^*$	$cry2A^*$	$cry9C^*$
上升	Increased	2	5	1	132	2
持平	Similar	1	2	0	6	0
下降	Decreased	232	179	15	282	86
总计	Total	235	186	16	420	88

## 2.5 不同杀虫效果组内克隆氨基酸序列的同源性比较

从杀虫效果上对这1000个不同基因来源的重组克隆序列进行分组,将小组内的克隆进行氨基酸序列的比对(表4),对1000个重组基因的氨基酸序列进行分析后发现,相对于毒力上升和持平组,5个毒力下降组的重组克隆间的氨基酸序列同源性最低。

表4 5个 $cry$ 基因来源的重组克隆在不同  
杀虫效果组内氨基酸序列同源性的比较

Table 4 Amino acid sequence comparison of 5  $cry$

parants-source clones with different toxicity levels %

来源于5个基因的克隆 Clones from 5 gene sources	氨基酸同源性 Amino acid sequence homology		
	毒力上升组 Clones with increased toxicity	毒力持平组 Clones with similar toxicity	毒力下降组 Clones with decreased toxicity
来自 $cry1Ab$ 的克隆 Clones from $cry1Ab$	88.70	100.00	42.99
来自 $cry1Ac$ 的克隆 Clones from $cry1Ac$	90.63	69.50	47.71
来自 $cry1C^*$ 的克隆 Clones from $cry1C^*$	95.86	/	70.95
来自 $cry2A^*$ 的克隆 Clones from $cry2A^*$	51.67	62.77	34.54
来自 $cry9C^*$ 的克隆 Clones from $cry9C^*$	92.33	/	44.88

## 3 讨论

传统改造方法如定点突变、寡核苷酸取代、结构域置换等都有局限性:定点突变带有一定的盲目性,而且负突变、中性突变较多,不利于有益突变的积累,成功率较低;寡核苷酸取代一般用于改造已知序列,有针对性,但不适于多轮突变;结构域置换的方法因为对蛋白改造太大,很少有成功的例子。DNA

shuffling带有一种随意性,既不需要哪个特定位点发生突变以及发生何种突变,还可以根据实验目的来调整其具体的操作。因此该技术的应用范围要广得多,从改造同源性高的基因家族到改造同源性低的基因家族;从改造小分子蛋白到改造分子质量大的蛋白;从改造酶的一种性质到同时改造多种不同的性质。

大部分活性Cry蛋白都被证实具有相似的三维结构。本试验所用的5个Bt基因对鳞翅目都有特异杀虫活性的,可能具有相似的三维结构和功能。通过进行这些具有类似结构域的基因序列间的分子重组,就可能将这些具有相似功能的片段在体外充分重组提高对昆虫的毒力。本研究通过DNA shuffling获得了大量的重组基因,为分析突变对蛋白结构和功能的影响提供了大量的材料。

在这1000个重组克隆中,无毒性的克隆大多数是产生了移码突变,导致大量的氨基酸序列的改变。杀虫性显著降低的一部分是由于末端的移码和提前出现的终止密码导致蛋白的不完全。还有的是氨基酸的编码改变导致属性改变,尤其是保守区域的氨基酸发生改变导致蛋白质三维结构的改变,失去活性。而杀虫数与原始基因差不多的则是序列没有变异,或者变异成了相似氨基酸。毒力提高的克隆则是因为提高了蛋白结构的稳定性或与昆虫肠道受体结合性。如果在重组过程中发生的突变引起氨基酸序列大的变化,如移码或者终止突变,重组蛋白由于无法形成有效的构象,普遍呈现无毒力的突变。毒力下降组中,发生移码突变的克隆很多,并且发生移码的位点靠前。在重组的蛋白中,终止突变全部出现在毒性下降组中。位置越靠前,其杀虫的活力丧失得越彻底。同源性比对的数据说明对整个序列的氨基酸改变的程度越大,对基因的杀虫性带来的负面影响越多。

本试验通过体外分子进化技术构建基因库获得高效的新的杀虫基因,一方面可为选育抗虫水稻、减轻昆虫的抗药性带来的农业危害提供新的杀虫基因;另一方面利用这个基因库可为研究Bt基因的结构、功能,以及Bt如何在自然界变异、选择和进化提供基础资料。

## 参考文献

- [1] MARTIN P A, TRAVERS R S. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates [J]. Appl Environ

- Microb,1989,55(10):2437-2442.
- [2] DEAN D H, RAJAMOHAN F, LEE M K, et al. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis—a minireview[J]. Gene, 1996, 179(1):111-117.
- [3] WOLFERSBERGER M G, CHEN X J, DEAN D H. Site-directed mutations in the third domain of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Aa affect its ability to increase the permeability of *Bombyx mori* midgut brush border membrane vesicles[J]. Appl Environ Microb, 1996, 62(1):279-282.
- [4] RANG C, VACHON V, COUX F, et al. Exchange of domain I from *Bacillus thuringiensis* Cry1 Toxins influences protoxin stability and crystal formation[J]. Curr Microbiol, 2001, 43(1):1-6.
- [5] STEMMER W P. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(22):10747-10751.
- [6] STEMMER W P. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling[J]. Nature, 1994, 370(6488):389-391.
- [7] CRAMERI A, WHITEHORN E A, TATE E, et al. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling[J]. Nat Biotechnol, 1996, 14(3):315-319.
- [8] KEENAN R J, SIEHL D L, GORTON R, et al. DNA shuffling as a tool for protein crystallization[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(25):8887-8892.
- [9] MERZ A, YEE M C, SZADKOWSKI H, et al. Improving the catalytic activity of a thermophilic enzyme at low temperatures [J]. Biochemistry, 2000, 39(5):880-889.
- [10] NESS J E, WELCH M, GIVER L, et al. DNA shuffling of subgenomic sequences of subtilisin[J]. Nat Biotechnol, 1999, 17(9):893-896.
- [11] LEONG S R, CHANG J C, ONG R, et al. Optimized expression and specific activity of IL-12 by directed molecular evolution[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(3):1163-1168.
- [12] POWELL S K, KALOSS M A, PINKSTAFF A, et al. Breeding of retroviruses by DNA shuffling for improved stability and processing yields[J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(12):1279-1282.
- [13] SUEN W C, ZHANG N, XIAO L, et al. Improved activity and thermostability of *Candida antarctica* lipase B by DNA family shuffling[J]. Protein Eng Des Sel, 2004, 17(2):133-140.
- [14] ROSIC N N, HUANG W, JOHNSTON W A, et al. Extending the diversity of cytochrome P450 enzymes by DNA family shuffling[J]. Gene, 2007, 395(1/2):40-48.
- [15] BERGQUIST P L, GIBBS M D. Degenerate oligonucleotide gene shuffling[J]. Methods Mol Biol, 2007, 352:191-204.
- [16] KAGAMI O, KIKUCHI M, HARAYAMA S. Single-stranded DNA family shuffling[J]. Methods Enzymol, 2004, 388:11-21.
- [17] KNIGHT J S, BROADWELL A H, GRANT W N, et al. A strategy for shuffling numerous *Bacillus thuringiensis* crystal protein domains[J]. J Econ Entomol, 2004, 97(6):1805-1813.

## Constructing cry genes mutant library with DNA shuffling method for screening high toxic Cry protein

ZHANG Xiao-qiong LIN Yong-jun

College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** An *E. coli*-expression mutant library containing 1 000 cry mutant genes was constructed using DNA family shuffling method with five initial cry genes cry1Ac, cry1Ab, cry1C\*, cry2A\* and cry9C\*. The 1 000 clones were expressed in *E. coli* and their toxicity was tested upon *Helicoverpa armigera* (cotton bollworm) larvae. The expression level of mutation clones were quantified by ELISA. Compared with the original Cry1Ac, there were 122 clones with significantly enhanced toxicity, 38 clones with similar toxicity; 232 clones with decreased toxicity; and 608 clones with lost toxicity. All 1 000 cry mutant genes in the library were sequenced and amino acid sequence homology of all cry mutant genes was analyzed by multiple comparisons. Gene sources of 945 clones were found and divided into 5 classes based on homology, 55 clones were unrecognized. According to toxicity level, the 1 000 clones were further divided into 3 classes: increased toxicity, similar toxicity and decreased toxicity. Analyzing the amino acid sequences of the 1 000 clones, the homology in 5 decreased toxicity classes was lower than increased toxicity classes and similar toxicity classes.

**Key words** DNA shuffling; Cry protein; sequence comparison; mutant library

(责任编辑:张志钰)