

池蝶蚌和三角帆蚌谷胱甘肽 S 转移酶 基因表达特征

邹青青 王军花 郭红军 盛军庆 龚贵如 洪一江*

(南昌大学生命科学与食品工程学院 南昌 330031)

摘要: 采用 RT-PCR 方法克隆获得池蝶蚌 (*Hyriopsis schlegelii*) 和三角帆蚌 (*H. cumingii*) GST 片段, 两种蚌的 GST 核苷酸序列相同, 推导其编码 92 个氨基酸; 经与不同物种进行氨基酸序列比对, 显示其与软体动物、两栖动物和高等哺乳动物的 GST 具有高度同源性。RT-PCR 半定量分析表明, GST 在两种蚌的肝、闭壳肌等 11 种组织中除肠以外均有表达, 肝中表达量较大; 注射嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 后, 三角帆蚌血细胞中 GST 表达量先降低后升高, 而池蝶蚌血细胞中 GST 表达量先升高后降低, 且在感染 3 h、6 h、9 h 和 24 h 时表达量约为三角帆蚌的 2 倍。

关键词: 池蝶蚌; 三角帆蚌; 谷胱甘肽 S 转移酶; 表达特征

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2010)04-96-06

Expression of Glutathione S-Transferase Gene in *Hyriopsis schlegelii* and *H. cumingii*

ZOU Qing-Qing WANG Jun-Hua GUO Hong-Jun SHENG Jun-Qing
GONG Gui-Ru HONG Yi-Jiang*

(School of Life Sciences and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: In this study, we used RT-PCR to clone glutathione s-transferase (GST) fragments from *Hyriopsis schlegelii* and *H. cumingii*. The two species had the same sequence which encoded a peptide of 92 amino acids. They shared high GST homology with mollusks, amphibian and mammals when comparing different species at a polypeptide level. GST was detected in all tissues except for intestine, especially higher expression of GST in liver was observed. Result showed that the GST expression in haemocyte was declined at the first stage and then increased in *H. cumingii*, while its expression pattern was opposite in *H. schlegelii* and the expression level of GST in the latter was approximately two times of that in *H. cumingii* at 3 h, 6 h, 9 h and 24 h after infection by *Aeromonas hydrophila*.

Key words: *Hyriopsis schlegelii*; *H. cumingii*; Glutathione s-transferase; Expression trait

谷胱甘肽硫转移酶 (glutathione S-transferases, GSTs) 是一组执行多种生理功能的蛋白质, 在有毒化合物的代谢、保护机体免于毒性化学物质攻击过程中起到重要作用, 是体内 II 相解毒代谢酶。通过酶促和非酶促反应, 解除化学诱变剂、促癌剂以及脂质、DNA 过氧化物的毒性, 保护正常细胞免受致癌和促癌因

素的影响, 在抗诱变及抗肿瘤中起重要作用^[1]。此外, 某些 GSTs 同工酶含有非硒依赖

基金项目 国家公益性行业(农业)科研专项(No. 200903028);

* 通讯作者, E-mail: yjhong816@yahoo.com.cn;

第一作者介绍 邹青青, 女, 硕士研究生; 研究方向: 水生动物遗传学; E-mail: qingqing8594@163.com。

收稿日期: 2010-01-28, 修回日期: 2010-04-28

性谷胱甘肽过氧化酶活性,能清除脂类自由基,将有氧的过氧化产物转变为低毒的醇类物质,从而起到阻断脂质过氧化的作用。

水生动物的 GST 基因已有相关报道,孙玉华等^[2]从 3 种淡水鱼类中克隆出谷胱甘肽转移酶 Pi 型表达序列,并将其氨基酸序列同哺乳动物相应序列进行比较,探讨了鱼类微囊藻毒素去毒能力的可能分子机制;Boutet 等^[3]获得了太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) GST 4 种同工酶;Doyen 等^[4]获得了 2 种淡水双壳类动物 GST- π 的 mRNA。但有关池蝶蚌 (*Hyriopsis schlegelii*) 和三角帆蚌 (*H. cumingii*) GST 基因克隆未见报道,本文通过多种物种 GST 基因序列的保守区域扩增两种蚌的 GST 序列,对序列特征进行分析,同时研究了两种蚌 GST 表达的组织差异性,以及注射嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 后 GST 的表达情况,为淡水贝类免疫学及池蝶蚌抗病性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 池蝶蚌采自江西抚州市洪门水库开发公司池蝶蚌繁育基地,三角帆蚌采自江西都昌三角帆蚌良种场,在实验室暂养 7 d,每天换水一次,气泵充气保证供氧,水温控制在 $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

1.2 方法

1.2.1 材料的处理 以下各组均为 5 只蚌个体,分别进行以下 2 种处理。a:用 5 ml 注射器分别对池蝶蚌和三角帆蚌进行取血,离心收集上清液作为实验用血淋巴;分别称取两种蚌闭壳肌、斧足、鳃、外套膜、唇瓣、心、肝、肾、性腺和肠 11 种组织各 1 mg; b:分别对每只池蝶蚌和三角帆蚌注射菌液浓度为 1.15×10^9 个/ml 的嗜水气单胞菌(中国科学院水生生物研究所提供) 250 μl ,对照组注射等量的生理盐水,感染组在注射后 3 h、6 h、9 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h 分别收集血淋巴。

1.2.2 总 RNA 的提取 按照 Trizol 法^[5]分别提取嗜水气单胞菌感染不同时间的池蝶蚌和三角帆蚌血淋巴以及两种蚌的 11 种组织的总

RNA,使用紫外分光光度计和琼脂糖电泳检测 RNA 纯度和完整性。

1.2.3 引物设计 搜索 NCBI 已登录的 GST 信息,用 CLUSTAL W 软件比对珍珠蚌科珠蚌 (*Unio tumidus*, AAX20373)、河蚌 (*Corbicula fluminea*, ABO47816) 和地中海贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*, AF527010) 的 GST 序列,在相对保守的区域设计引物,引物序列为, F1: TCTACTTCCCAATTAGAGGTCGT, R1: CTTCAA-CAGTTTCTCTAGGTACTGGAA。引物由上海生物工程公司合成。

1.2.4 GST 片段的扩增 取约 2 μg 总 RNA,用 Promega 公司的 M-MLV 酶对总 RNA 进行反转录,获得其 cDNA 第一条链,再以 cDNA 为模板进行扩增,PCR 反应程序:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^\circ\text{C}$ 变性 2 min 53 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 50 s, 30 个循环;72 $^\circ\text{C}$ 条件下继续延伸 10 min。对目的带进行割胶回收纯化 (BBI)。将 PCR 纯化产物连接到 pMD18-T vector (Takara) 上,转化至感受态大肠杆菌 DH5 α 细胞,通过蓝白斑筛选,挑取白斑,经 LB (含 amp⁺) 培养后,作菌液 PCR 鉴定插入片段大小,将阳性克隆送往上海生物工程公司测序。

1.2.5 生物信息学分析 序列的拼接通过 Lasergene 软件中的 SEQ MAN 程序完成;序列同源性比对和相似性搜索使用 BLASTN 和 BLASTX 软件进行,多序列比对采用 CLUSTAL X 程序;通过蛋白质专家系统 (<http://expasy.org>) 中的多个程序预测蛋白质的二级结构。

1.2.6 RT-PCR 半定量检测目的基因的表达

以 β -actin 为内参,调整样品模板浓度,通过预实验确定最佳基因、内源参照循环次数、Mg²⁺ 浓度以及反应条件。电泳结果使用凝胶成像系统 KODAK EDAS 290 分析,应用 SPSS 13.0 软件中的 *t*-test、方差分析 ANOVA 和 Duncan's 多重比较处理实验数据。内源参照 β -actin 的引物序列为, F2: GAGACCTCAACACCCCAGC, R2: GGACTCATCGTACTCCTGCTTG。引物由上海生物工程公司合成。

2 结果

2.1 GST 编码氨基酸特性及序列比较分析

PCR 扩增产物约为 400 bp,测序和推导结果显示,池蝶蚌 (GenBank 登录号: EU145724) 和三角帆蚌 GST 氨基酸序列相同,编码 92 个氨基酸,推导其编码蛋白的分子量为约 10.51 ku,理论等电点为 4.14。通过 Prosite scan 软件分析 GST 的氨基酸序列,显示其富含天冬氨酸 (ASP, 13.04%) 和亮氨酸 (Leu, 11.96%); 存在一个潜在的 N-糖基化位点,位于序列中第 13 ~ 16 位 (NCSN); 一个蛋白激酶 C 磷酸化位点,位于序列中 21 ~ 23 位 (SWK); 一个氨基化位点,位于序列中第 51 ~ 54 位 (LGRK); 一个酪氨酸硫酸盐化作用位点,含有 9 个氨基酸序列 (NGLPYEDVN); 使用 Garnier 法对池蝶蚌和三

角帆蚌 GST 蛋白的二级结构进行预测,发现其包含 α 螺旋构象 29.35%,线性的伸展构象 11.96%,随机卷曲构象 58.70%,各种构象所占比例与人 (*Homo sapiens*, GenBank 登录号: 22GS_A) GST 的相近。

氨基酸序列比对分析结果表明 (图 1) 池蝶蚌和三角帆蚌 GST 与珠蚌 (*Unio tumidus*, AAX20373) 的同源性最高,为 97%,与河蚌 (ABO47816) 的同源性为 71%; 与紫贻贝 (AAS60226)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*, NP_001082252) 的同源性分别为 72% 和 69%; 与人 (*Homo sapiens*, 22GS_A)、家鼠 (*Mus musculus*, 20A7_A) 的同源性分别为 65% 和 80%,可见池蝶蚌和三角帆蚌序列不仅与软体动物而且与两栖类及高等哺乳动物的 GST 都具有高度同源性。

```

Hyc LLVDNGLFYEVDVNCSDGWPDS—WPKLAFGQVFQQLIDGD—FELVQSNMTMLRVLGRK HDLYGADVKEGAHIDMINDGVEDYRLAYVKLIYQNYDA 92
Hys LLVDNGLFYEVDVNCSDGWPDS—WPKLAFGQVFQQLIDGD—FELVQSNMTMLRVLGRK HDLYGADVKEGAHIDMINDGVEDYRLAYVKLIYQNYDA 92
Cof LFVDNGLDYEEDVNC—GNWATE—YKSKMFGQVFVVKDGD—LDVAQSNMIMRYLGRK HDMYPTDFVHAKVDMILDHSDIRGCPYVVMYIYQNYEA 92
Myc LLTDQNIITYEEVNAQPRENVVEN—WPKMFGQVFQVQQLIDGD—FELVQSNMTMLRVLGRK YDLVGSIDIKQA SILLMMNSAVEDIRGAYVVMYIYQNYEA 95
Unt LLVDNGLFYEVDVNCSDGWPDS—WPKLAFGQVFQQLIDGD—FELVQSNMTMLRVLGRK HDLYGADVKEGAHIDMINDGVEDYRLAYVKLIYQNYDA 92
Hos LLADQQQSWKEEVVT—VETWQEC—SLKASCLFQQLPKFQDGD—LTLVQSNMILRHLGRS LGLVYKQDQEAALVDMVNDGVEDLRCKYI SLIYTNVYEA 94
Mum LLADQQQSWKEEVVT—IDTWQEC—LLKPTCLYQQLPKFQDGD—LTLVQSNMILRHLGRS LGLVYKQDQEAALVDMVNDGVEDLRCKYI SLIYTNVYEA 94
Xel LLADQGISWKEDEVQ—IPDVFSGKDARKKEAVFQQLFQDGD—YVLVQSNMILRVLGNK HGLTGANDEERGHIDMINDGVEDLRQKYGRLIFFEVET 96
*:.:. .:: * * :** ** :***:: :*. . . : : : :***. *** * :*:*:

```

图 1 不同物种 GST 氨基酸序列的比较

Fig. 1 The comparison of GST amino sequences among different species

Hyc:三角帆蚌; Hys:池蝶蚌; Cof:河蚌; Myc:紫贻贝; Unt:珠蚌; Hos:人; Mum:鼠; Xel:非洲爪蟾。

Hyc: *Hyriopsis cumingii*; Hys: *Hyriopsis schlegelii*; Cof: *Corbicula fluminea*; Myc: *Mytilus edulis*; Unt: *Unio tumidus*; Hos: *Homo sapiens*; Mum: *Mus musculus*; Xel: *Xenopus laevis*.

2.2 GST 在池蝶蚌和三角帆蚌各组织中表达情况 从图 2 可见, GST 在池蝶蚌心、肝、肾、性腺中表达量较高,而在斧足中表达量较低。三角帆蚌肝、肾、性腺、心、鳃等组织表达量较高,而在闭壳肌中表达量较低,在两种蚌的肠中均未检测到该基因表达。这两种蚌中, GST 基因除在闭壳肌、鳃和唇瓣中表达有显著差异外 ($P < 0.05$),在其他组织中无显著差异。

2.3 嗜水气单胞菌感染后池蝶蚌和三角帆蚌 GST 表达 在池蝶蚌血细胞中,嗜水气单胞菌感染后的所有时间组中均能检测到 GST 表达,

且 GST 表达先升高,至感染 6 h 和 9 h 时达到最大值,随后逐渐降低; Ducan's 比较分析显示,感染后 3 h、6 h 和 9 h 分别同 48 h 和 72 h GST 表达具有显著差异 ($P < 0.05$),但 3 h、6 h 和 9 h 三者之间差异并不显著,且 48 h 和 72 h 差异也不显著 ($P > 0.05$)。三角帆蚌 GST 表达与上述趋势不同,在 12 h 前,该基因的表达呈下降趋势,甚至在感染 12 h 的样品中未检测到表达,随后表达量逐渐升高; Ducan's 比较分析显示,未感染组与感染组在所有时间点 GST 表达均具有显著差异 ($P < 0.05$),在所有感染时间

组中,感染 12 h 的 *GST* 表达与感染后其余 6 个时间点的表达均有显著性差异 ($P < 0.05$),但这 6 个时间点之间 *GST* 表达无显著差异 ($P > 0.05$)。

在同一时间的感染样品中,除未感染组和感染 72 h 组外,池蝶蚌 *GST* 表达量均大于三角帆蚌该基因的表达量 ($P < 0.05$),前者表达量约为后者的 2 倍(图 3)。

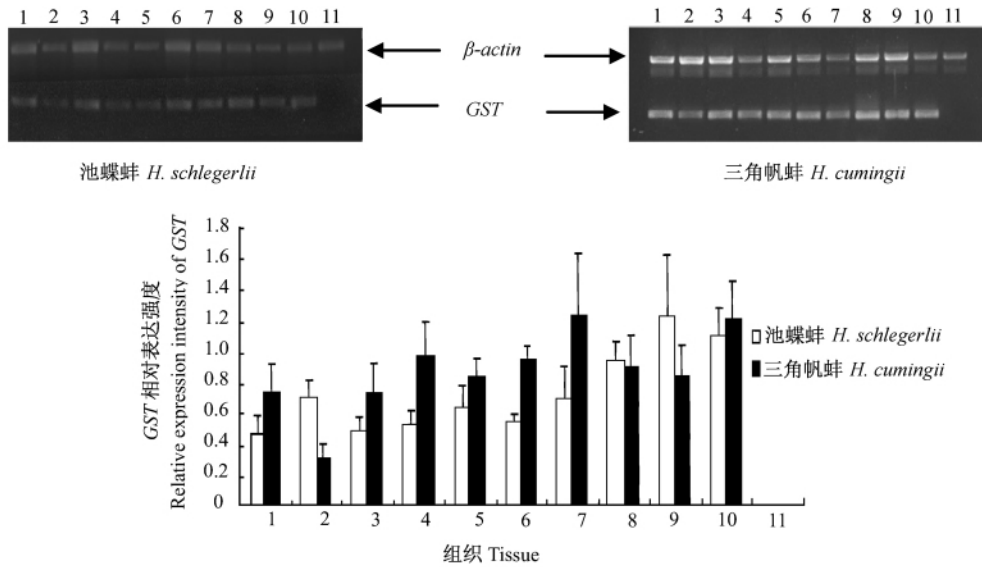


图 2 *GST* 基因在组织中表达情况

Fig.2 *GST* expression in different tissues

1. 血细胞; 2. 闭壳肌; 3. 斧足; 4. 鳃; 5. 外套膜; 6. 唇瓣; 7. 心; 8. 肝; 9. 肾; 10. 性腺; 11. 肠。
 1. Hemocyte; 2. Adductor; 3. Foot; 4. Gill; 5. Mantle; 6. Labellum; 7. Heart; 8. Liver; 9. Kindey; 10. Gonad; 11. Intestine.

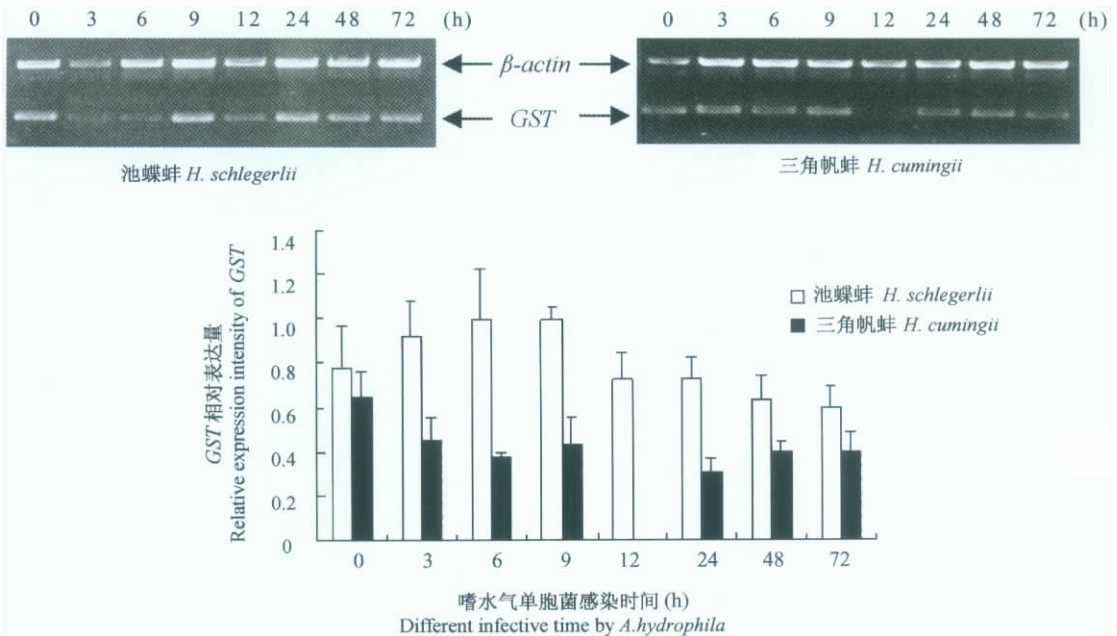


图 3 嗜水气单胞菌不同感染时间池蝶蚌及三角帆蚌 *GST* 基因的表达

Fig.3 The expression of *GST* in two species of freshwater mussels at different times of infection by *A. hydrophila*

3 讨 论

Allya 等^[6]认为 *GST* 的 N 端功能域的酪氨酸和丝氨酸或半胱氨酸残基是结合谷胱甘肽 (*GSH*) 并与其巯基相互作用的氨基酸, 该结构中的丝氨酸残基可与 *GSH* 的巯基基团结合, 酪氨酸残基是形成有催化能力酶结构以及 *GSH* 巯基作用的重要氨基酸残基。本实验测序结果表明, 池蝶蚌和三角帆蚌的氨基酸序列中含有 1 个半胱氨酸位点和 7 个酪氨酸残基 (-LGR-, -LYG-, -GDG-, -QSN-), 与哺乳动物^[17]相同, 这些保守的氨基酸结构可能是 *GST* 发挥功能的核心区域。比较两种蚌和哺乳动物 *GST* 氨基酸序列, 发现某些位点存在差异, 哺乳动物第 9 位的氨基酸是色氨酸^[17], 而蚌中为酪氨酸; 蚌的 14 位中酸性氨基酸天冬酰胺代替了哺乳动物的中性氨基酸缬氨酸, 带负电的谷氨酰胺代替了带正电的赖氨酸; 蚌 83 位的中性氨基酸丙氨酸取代了哺乳动物带正电的赖氨酸, 这些基团的变化可能有利于增加贝类 *GST* 酶与 *GSH* 的结合能力, 从而增强解毒功能。

池蝶蚌受嗜水气单胞菌感染后, 血细胞中 *GST* 表达先升高, 直至 9 h, 然后再降低, 表明嗜水气单胞菌对池蝶蚌 *GST* 具有一定的诱导效果。这与丁秀云等^[8]的研究结果类似, 他们在研究大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和弧菌 (*Vibrio*) 对皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 免疫刺激时发现, 感染后的鲍血清中多种酶的活性均有所提高。软体动物缺乏免疫球蛋白, 其体液免疫主要依靠血清中一些非特异性酶或因子, 已有的研究表明, 软体动物受到病原体等异物刺激时, 体内与免疫活动相关的酶活性会在短时间内发生显著变化^[9]。当池蝶蚌受到嗜水气单胞菌侵袭时, 机体合成大量抗菌物质, 相应的蛋白合成速度可能加快, 免疫相关基因的转录强度也会随之加大; 当病原菌被抑制后, 相关物质在负反馈机制下合成速度减缓, 或者受到抑制。三角帆蚌 *GST* 基因表达趋势则不同, 先降低再上升; 同一感染时间样品中, 三角帆蚌的 *GST* 表达量显著低于池蝶蚌。这可能由于嗜水气单

胞菌破坏了部分血淋巴, 从而使得相应蛋白合成锐减, 但同时机体也在通过其他途径修复受损组织, 最终完成免疫过程。许多研究表明, *GST* 酶可作为衡量双壳类对污染物抵抗力和敏感性的指标^[10]。本实验结果表明, 池蝶蚌的 *GST* 表达具有可诱导性, 表达量高于三角帆蚌, 可能是池蝶蚌对异物更敏感或抵抗污染物的能力更强, 即池蝶蚌可能比三角帆蚌适应性更强。

GST 在蚌的体内广泛表达, 本实验所取的 11 种组织中, 除在肠中未检测到 *GST* 表达外, 其他组织均发现 *GST* 的表达, 这与陈荣等^[11]观点一致, 他们指出 *GST* 在双壳类各组织中都有表达, 而且活性都强; *GST* 在心、肝、肾、性腺中表达量较强, 斧足中表达量较弱, 这与瞿建宏等^[12]报道罗非鱼 (*Oreochromis*) 和尹晓晖等^[13]报道麦穗鱼 (*Pseudorasboia para*) 结果一致。肝是贝类代谢的中心和解毒场所, *GST* 作为 II 相解毒代谢酶, 因此表达量较高; 解毒后的部分反应在肾上执行, 因而肾中 *GST* 表达也较强。蚌肠中未检测到 *GST* 表达, 可能是由于肠主要只作为消化吸收场所。两种蚌除鳃、唇瓣和闭壳肌 *GST* 表达存在差异外, 其他组织表达量基本持平。

参 考 文 献

- [1] 聂立红, 胡毅玲. 谷胱甘肽硫-转移酶研究进展. 中国病理生理杂志, 2000, 16(11): 1240-1243.
- [2] 孙玉华, 谢平, 郭海涛, 等. 鱼类谷胱甘肽转移酶基因 cDNA 克隆及其序列分析. 遗传, 2007, 29(3): 349-354.
- [3] Boutet I, Tanguy A, Moraga D. Characterisation and expression of four mRNA sequences encoding glutathione S-transferases pi, mu, omega and sigma classes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides. Mar Biol, 2004, 146: 53-64.
- [4] Doyen P, Vasseur P, Rodius F. cDNA cloning and expression pattern of pi class glutathione S-transferase in the freshwater bivalves *Unio tumidus* and *Corbicula fluminea*. Comp Biochem Physiol C, 2005, 140: 300-308.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南 (2 版). 北京: 科学出版社, 1992.
- [6] Aliya S, Reddanna P, Thyagaraju K. Does glutathione S

- transferase Pi (GST-Pi) a marker protein for cancer. *Mol Cell Biochem*, 2003, 253: 319 - 327.
- [7] 张继龙, 郑清川, 张红星, 等. 人类谷胱甘肽 S-转移酶 M1a-4a 催化的亲核芳香取代反应的理论研究. *分子科学学报*, 2009, 25(4): 235 - 240.
- [8] 丁秀云, 李光友, 翟玉梅. 皱纹盘鲍经诱导后血淋巴中一些因子变化的研究. *海洋与湖沼*, 1996, 27(4): 362 - 367.
- [9] 刘志鸿, 牟海津, 王清印. 软体动物免疫相关酶研究进展. *海洋水产研究*, 2003, 3(24): 86 - 89.
- [10] Gallagher E P, Sheehy K M. Altered glutathione S-transferase catalytic activities in female brown bullheads from a contaminated central Florida lake. *Mar Environ Res*, 2000, 50: 399 - 403.
- [11] 陈荣, 刘辉, 李东晓, 等. 水生动物谷胱甘肽硫转移酶研究进展. *厦门大学学报*, 2006, 45(2): 176 - 181.
- [12] 瞿建宏, 陈家长, 胡庚东, 等. 苯酚胁迫下罗非鱼中过氧化氢酶与谷胱甘肽-S-转移酶的动态变化. *生态环境*, 2006, 15(4): 687 - 692.
- [13] 尹晓晖, 高希武, 姜辉, 等. 麦穗鱼谷胱甘肽 S-转移酶的活性分布及动力学特性. *新疆农业大学学报*, 2005, 28(3): 13 - 16.

(上接第 38 页)

龙胜小头蛇系郑辑和黄祝坚(1978)依据广西龙胜标本发表的新种;李德俊(1979)依据贵州雷山永乐和赤水蟠龙标本发表的贵州小头蛇(*Oligodon guizhouensis*)为其同物异名。该种近似种为饰纹小头蛇(*O. ornatus*),两者间最明显的分类学指征即鼻间鳞的有(饰纹小头蛇)无(龙胜小头蛇)。赵尔宓等(1986)报道四川省蛇类新纪录,采于米易的饰纹小头蛇亦无鼻间鳞,应修订为该种;2010年3月,本文第二作者在湖南师范大学和中南林业科技大学各检出1号采自湖南石门壶瓶山自然保护区及宜章莽山自然保护区的龙胜小头蛇标本。该种为我国特有物种,生活于海拔700~1600m的山区森林中,已知分布于广西、四川和贵州。在重庆市黔江区发现龙胜小头蛇,为重庆市蛇类新纪录;研究发现,湖南省石门县和宜章县也有该种分布。这些新分布点的发现增加了对其地理分布的认识,对该种的动物地理学研究具有重要意义。从其地理分布分析,推测该种可能也分布至湖北西南部及云南东北部。

龙胜小头蛇主要以爬行动物的卵为食(赵尔宓,2006),其他生态资料不详,有待进一步研究。该物种为我国东洋界华中区的稀有蛇种,也是我国特有蛇种,确知标本近20号。因其分布狭窄,《中国物种红色名录》将其列为易危种(VU D2)。建议有该种分布的自然保护区将该种纳为重点保护对象,加强监测和繁育研究,以保护该种及其生境,扩大其种群数量。

致谢 承蒙中国科学院成都生物研究所赵尔宓院士审阅指正,中国科学院成都生物研究所曾晓茂研究员提供部分研究资料,湖南师范大学邓学建教授、中南林业科技大学杨道德教授惠允查看湖南标本,国家林业局中南林业调查规划设计院郭克疾工程师、湖南师范大学硕士研究生刘汀、中南林业科技大学硕士研究生费冬波等协助查看标本,在此一并致谢。

罗颖^① 罗键^{②*} 高红英^② 刘颖梅^② 罗铁铸^② 罗至仁^③ 胡先成^①

(^①重庆师范大学生命科学学院 重庆 400047; ^②重庆市清华中学校 重庆 400054;

^③重庆市黔江区水市乡中心学校 重庆 409007)