



实时荧光定量PCR技术原理、应用及实践

Real time Quantitative PCR

分子生物学实验室
微生物资源与生态组
所级公共技术中心

李想
2024.12.4

主要内容

1

Real-time qPCR的基本概念

2

Real-time qPCR的定量原理

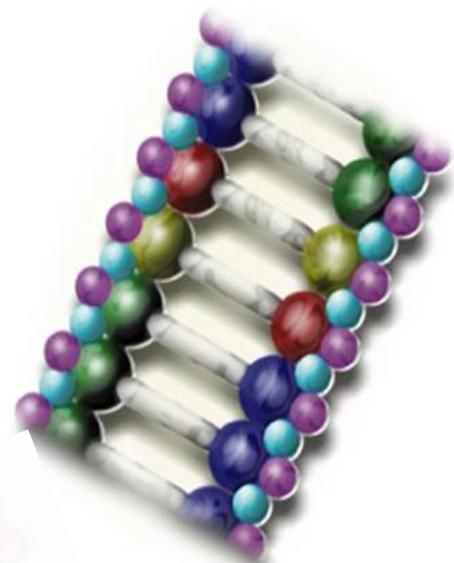
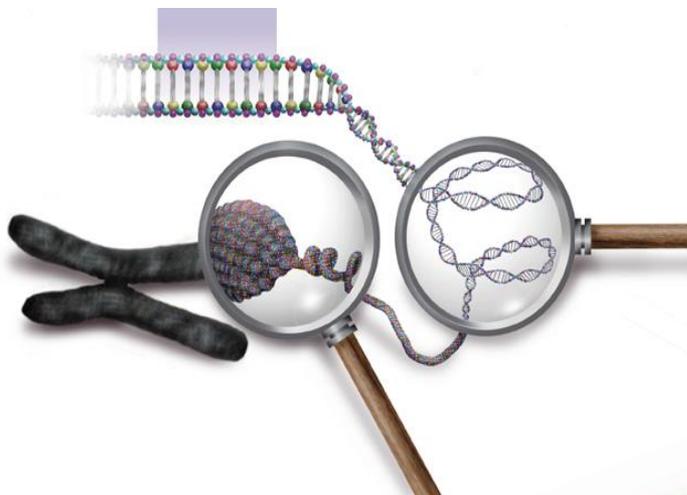
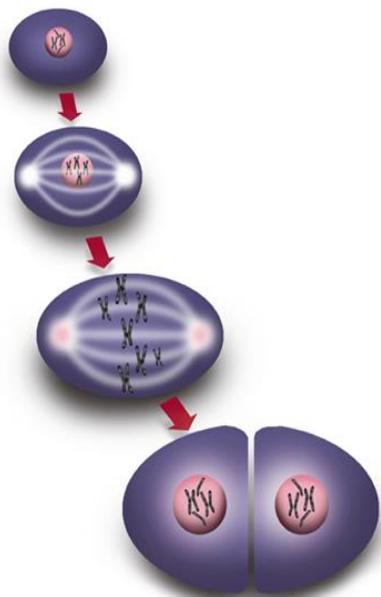
3

Real-time qPCR的检测方法

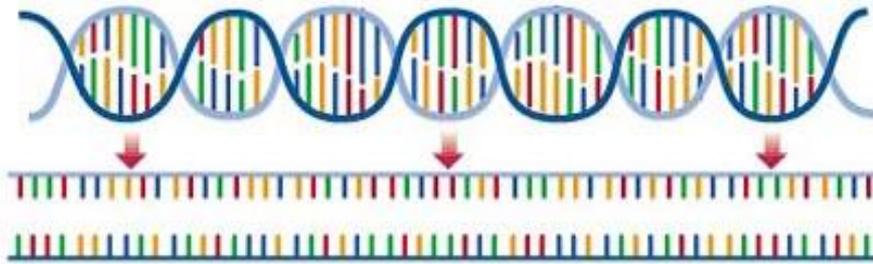
4

Real-time qPCR的实验应用

PCR: 基本原理



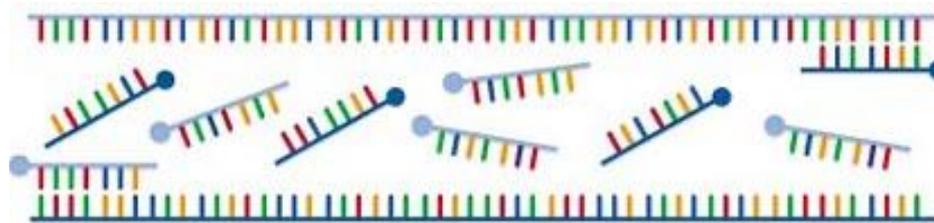
PCR: 基本原理



Denaturation:
94 – 96° C

基本要素:

- Template
- DNA polymerase
- dNTP, N=A,G,C or T
- Primers



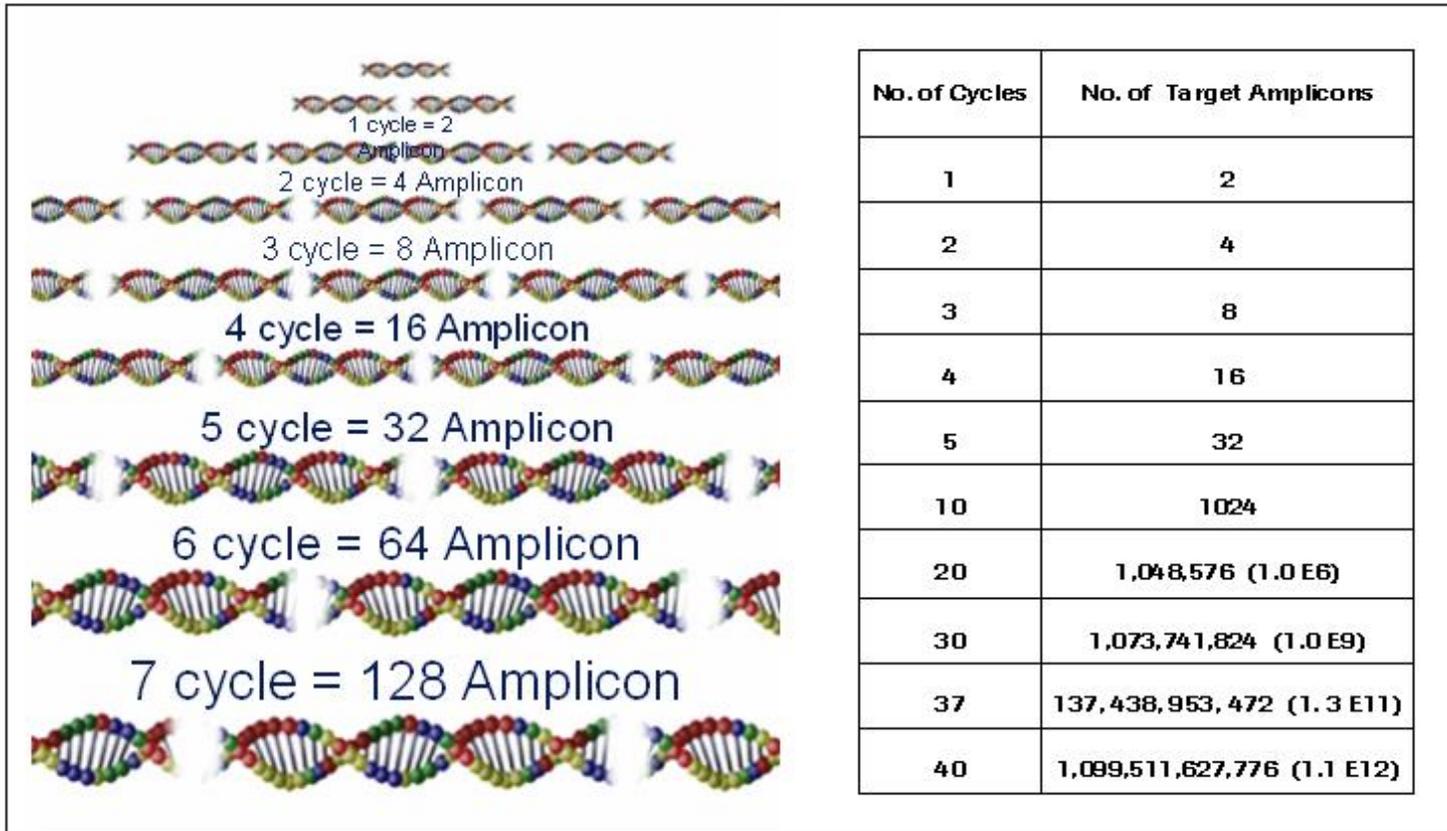
Annealing:
50 – 65° C



Extension:
70 – 75° C



PCR: 基本原理



PCR: 基本原理

- 理想的PCR反应:

$$N=N_0*2^n$$

- 实际的PCR反应:

$$N=N_0*(1+E)^n$$

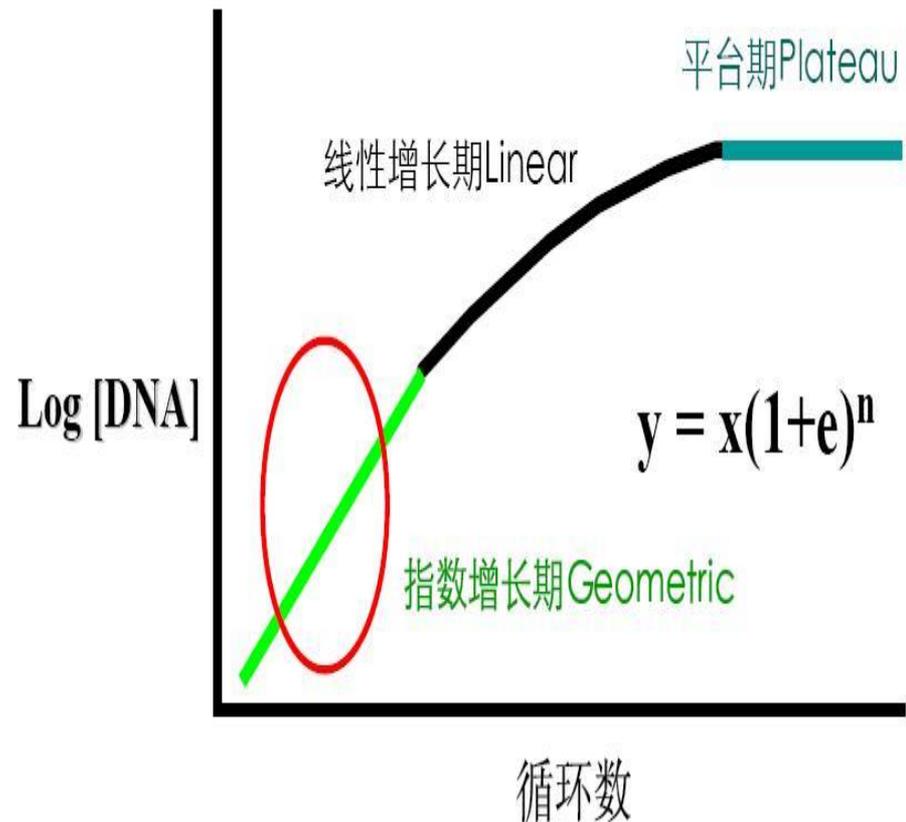
N_0 : 初始模板量

N : 第 n 次循环后的产物量

n : 扩增反应的循环次数

E : 扩增效率

S形曲线, 具有平台效应

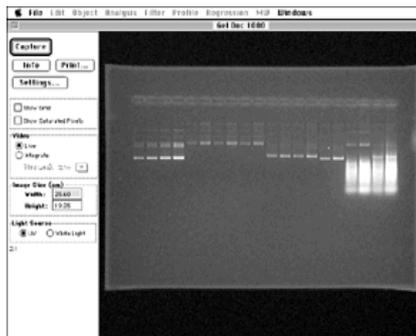
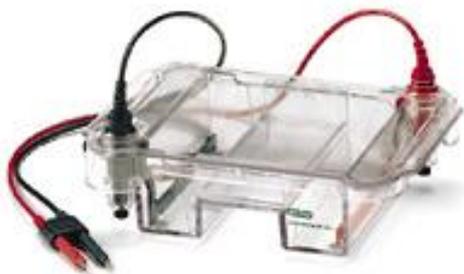


PCR检测方法的发展历程

PCR + 电泳检测

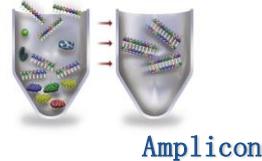
PCR + 酶联免疫检测 (ELISA)

实时荧光定量PCR



琼脂糖电泳，扩增核酸检测
片段迁移率与其分子量成反比

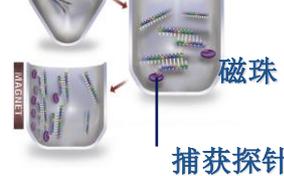
1. 扩增



2. 变性

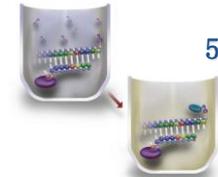


3. 杂交



D-cup

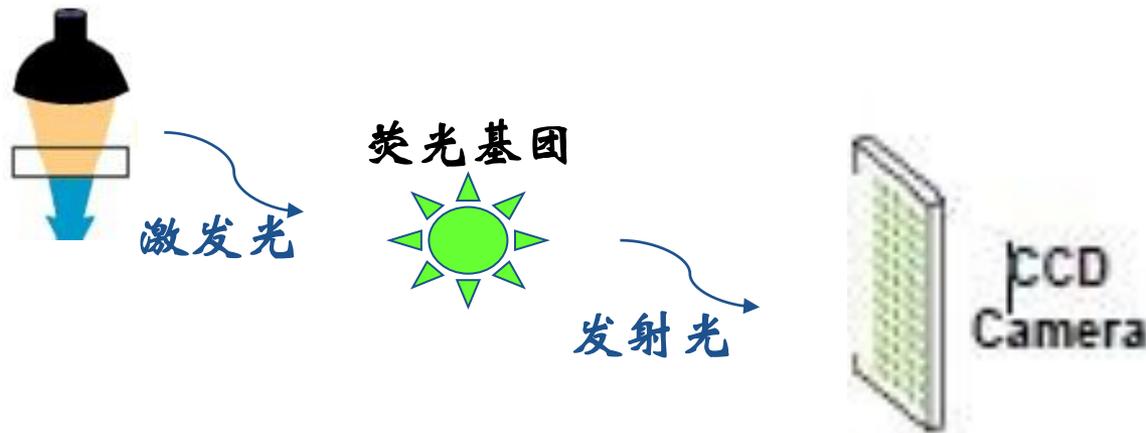
4. 酶联反应



5. 催化底物



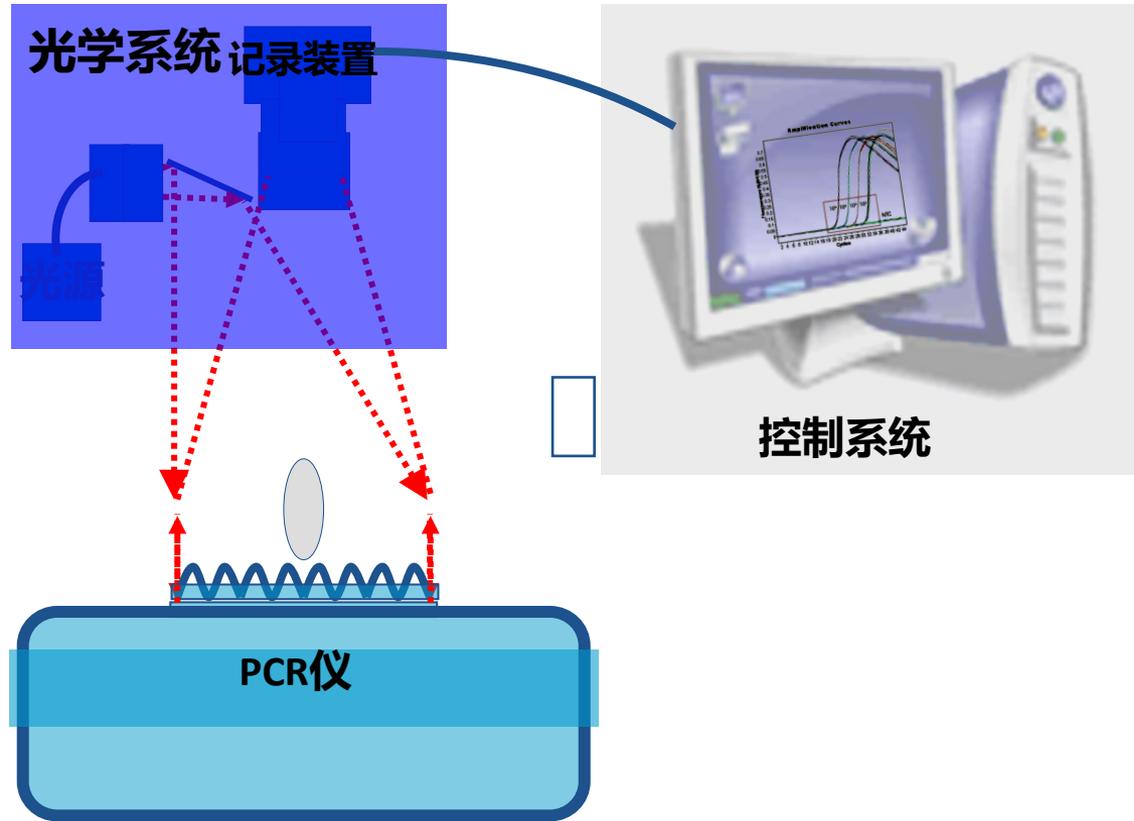
什么是qPCR?



一种实时监控核酸扩增的技术——在PCR反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号的变化动态监测整个反应过程，以此实现对初始模板的定量分析。

什么是qPCR?

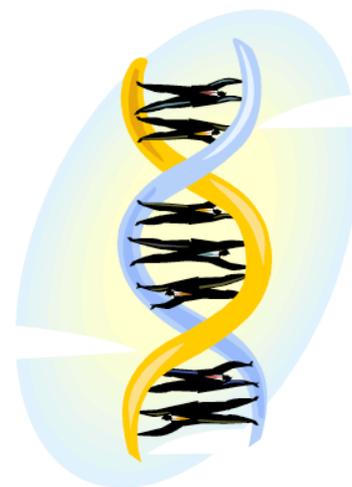
- ❖ 温控系统
- ❖ 光学系统
- ❖ 控制系统



qPCR技术是普通PCR技术的发展

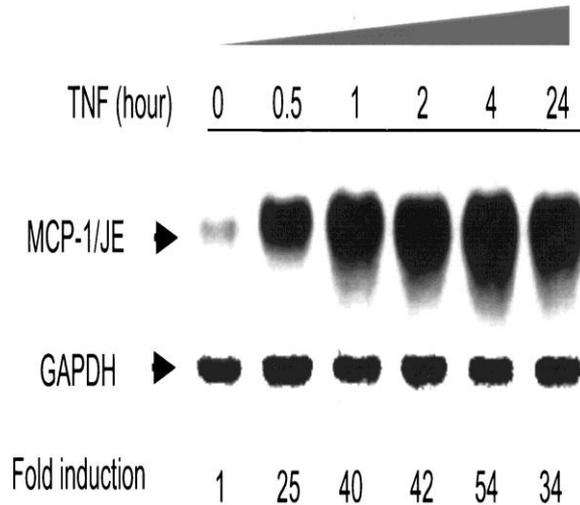
荧光定量PCR技术是PCR技术、光谱技术及计算机技术的耦合

- PCR技术具有将核酸模板放大的功能
- 光谱技术提高了检测的灵敏度
- 光谱技术和计算机技术的结合能实时监控PCR的整个过程，自动化程度高，准确定量

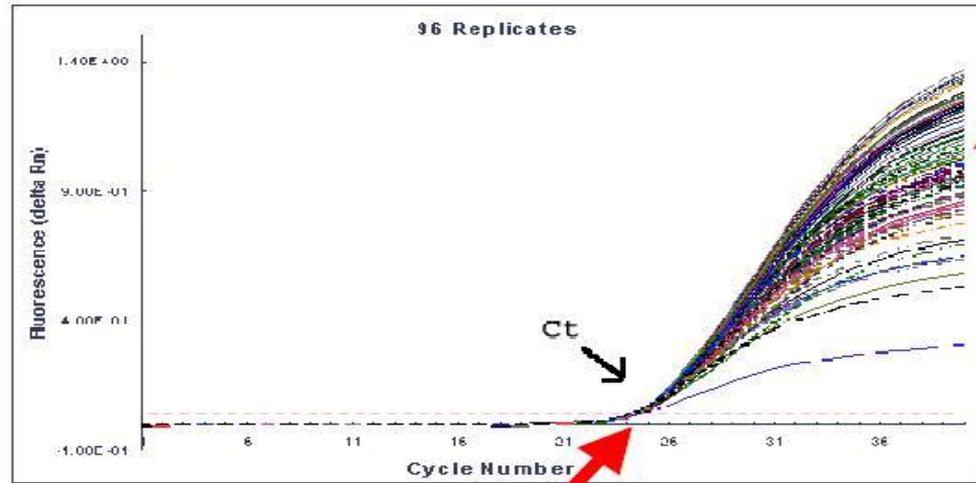


与普通PCR的对比

传统PCR检测



同一个样本进行96次重复



传统PCR检测

Real time PCR 检测

❖ 传统PCR--终点检测:

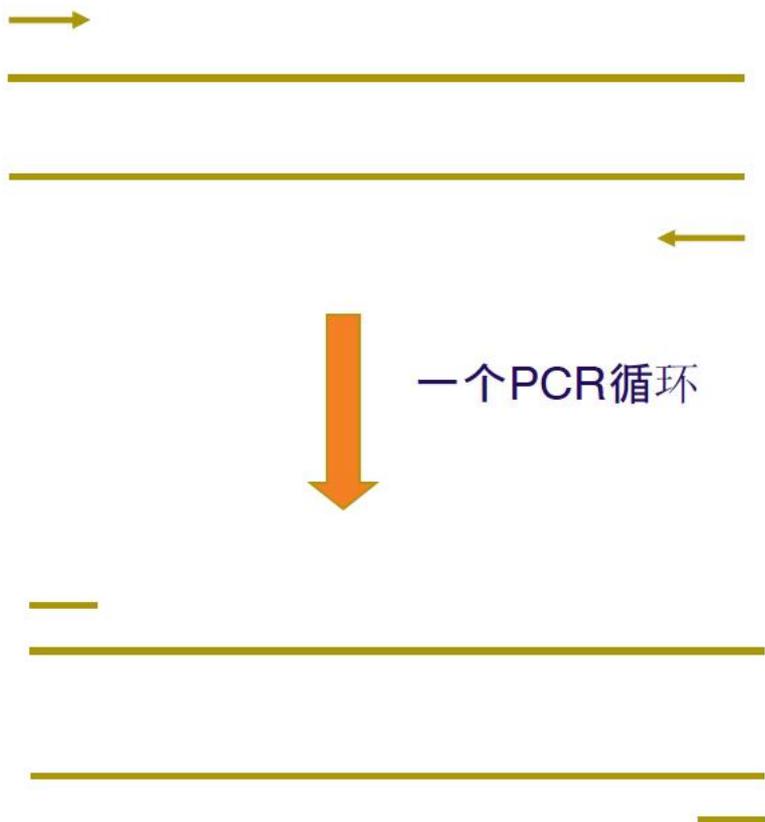
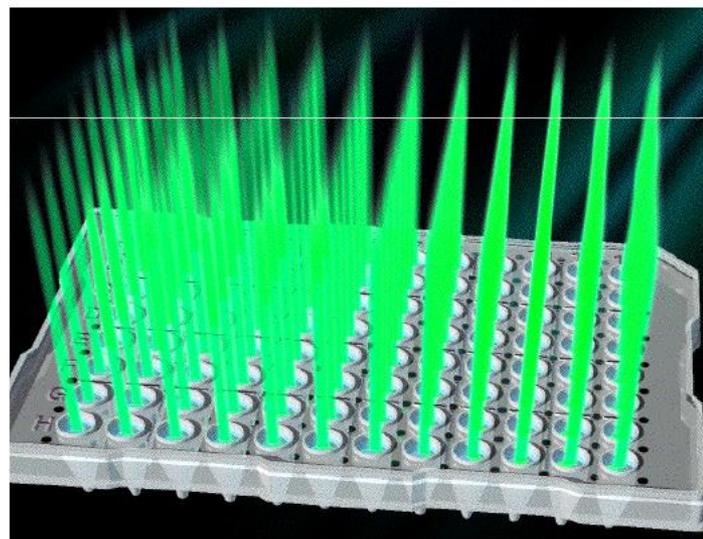
- 终点产物量经过PCR放大的DNA量
- “生成了500, 0000, 0000个拷贝”
- 不恒定, 误差大

❖ Real time PCR--起点检测:

- 起点量是样本中起始的DNA量
- “加入了500个拷贝”
- 具有重现性, 误差小

qPCR如何工作？

- PCR反应液加入了各种类型的**荧光标记物**



qPCR如何工作?

- 在扩增过程中, 荧光信号随着PCR产物的增加而增强



qPCR如何工作？

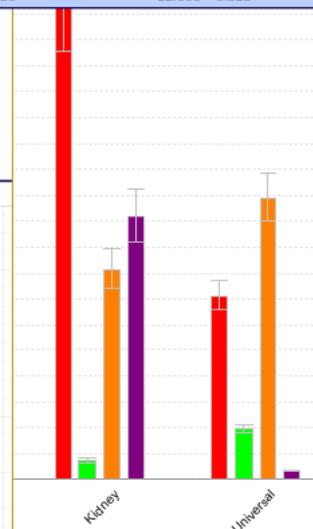
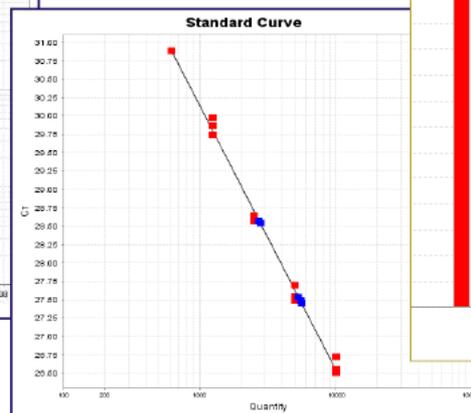
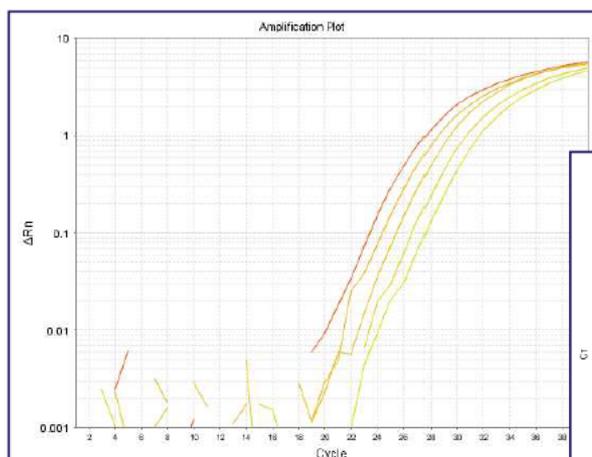
- 每个循环结束后, 定量PCR仪器通过光学系统记录荧光信号的增加



qPCR如何工作?

- 最后, 定量PCR软件计算出数据, 用于实验结果的分析

A7	<input type="checkbox"/>	Liver	c-myc	UNKNOWN	...	20.6095	20.532211	...	7.386	1.057	86.438	-3.696	1.726
A8	<input type="checkbox"/>	Liver	c-myc	UNKNOWN	...	20.454922	20.532211	...	8.133	1.057	86.438	-3.696	1.726
A9	<input checked="" type="checkbox"/>	Liver	c-myc	UNKNOWN	...								
A...	<input type="checkbox"/>	Liver	GAPDH	UNKNOWN	...	28.380135	28.455734	...	0.469		92.853	-3.506	
A...	<input type="checkbox"/>	Liver	GAPDH	UNKNOWN	...	28.464178	28.455734	...	0.444		92.853	-3.506	
A...	<input type="checkbox"/>	Liver	GAPDH	UNKNOWN	...	28.522894	28.455734	...	0.427		92.853	-3.506	
B1	<input type="checkbox"/>	Kidney	c-myc	UNKNOWN	...	21.135685	21.461496	...	5.322	1.111	86.438	-3.696	1
B2	<input type="checkbox"/>	Kidney	c-myc	UNKNOWN	...	21.555302	21.461496	...	4.098	1.111	86.438	-3.696	1
B3	<input type="checkbox"/>	Kidney	c-myc	UNKNOWN	...	21.693489	21.461496	...	3.76	1.111	86.438	-3.696	1
B4	<input type="checkbox"/>	Kidney	GAPDH	UNKNOWN	...	28.478626	28.505972	...	0.439		92.853	-3.506	
B5	<input type="checkbox"/>	Kidney	GAPDH	UNKNOWN	...	28.518414	28.505972	...	0.428		92.853	-3.506	
B6	<input type="checkbox"/>	Kidney	GAPDH	UNKNOWN	...	28.51987	28.505972	...	0.428		92.853	-3.506	



荧光定量PCR检测方法

染料标记:

- ✓ SYBR Green I

探针标记:

- ✓ 水解探针: TaqMan
- ✓ 非水解探针: Molecular beacon

SYBR Green I与Taqman 对比

Taqman

- **优点**
 - 更高的特异性
 - 不会有引物二聚体干扰
 - 支持多重荧光实验设计
 - 实验方法易于优化
- **缺点**
 - 价格稍贵

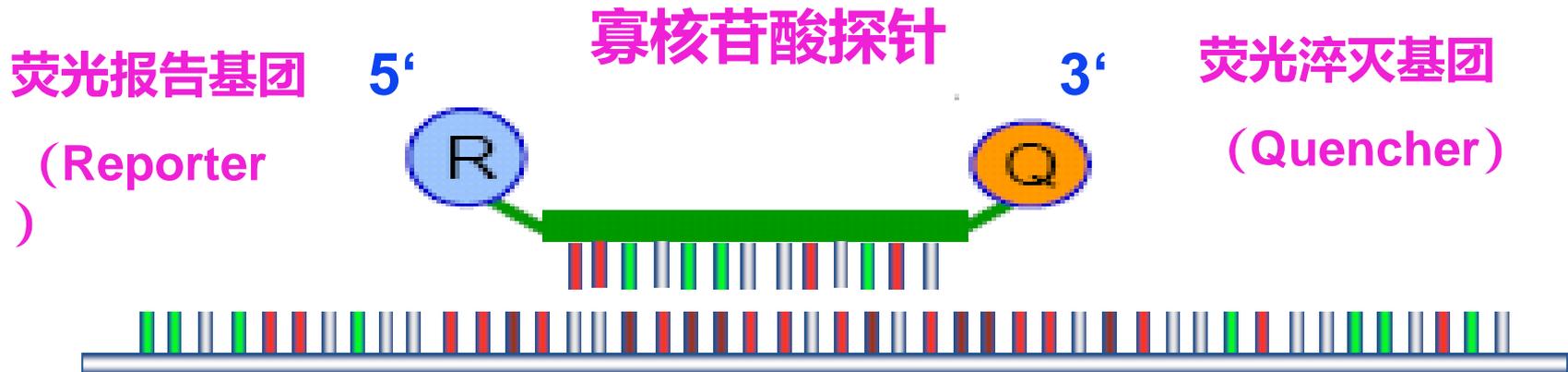
SYBR Green

- **优点**
 - 价格便宜
 - 大部分基因以及少量样品均适用
- **缺点**
 - 特异性稍差
 - 必须要做 Melt curves
 - 不支持多重荧光设计
 - 实验方法通常需要优化

Taqman 工作原理

UPL (Universal Probelibrary)

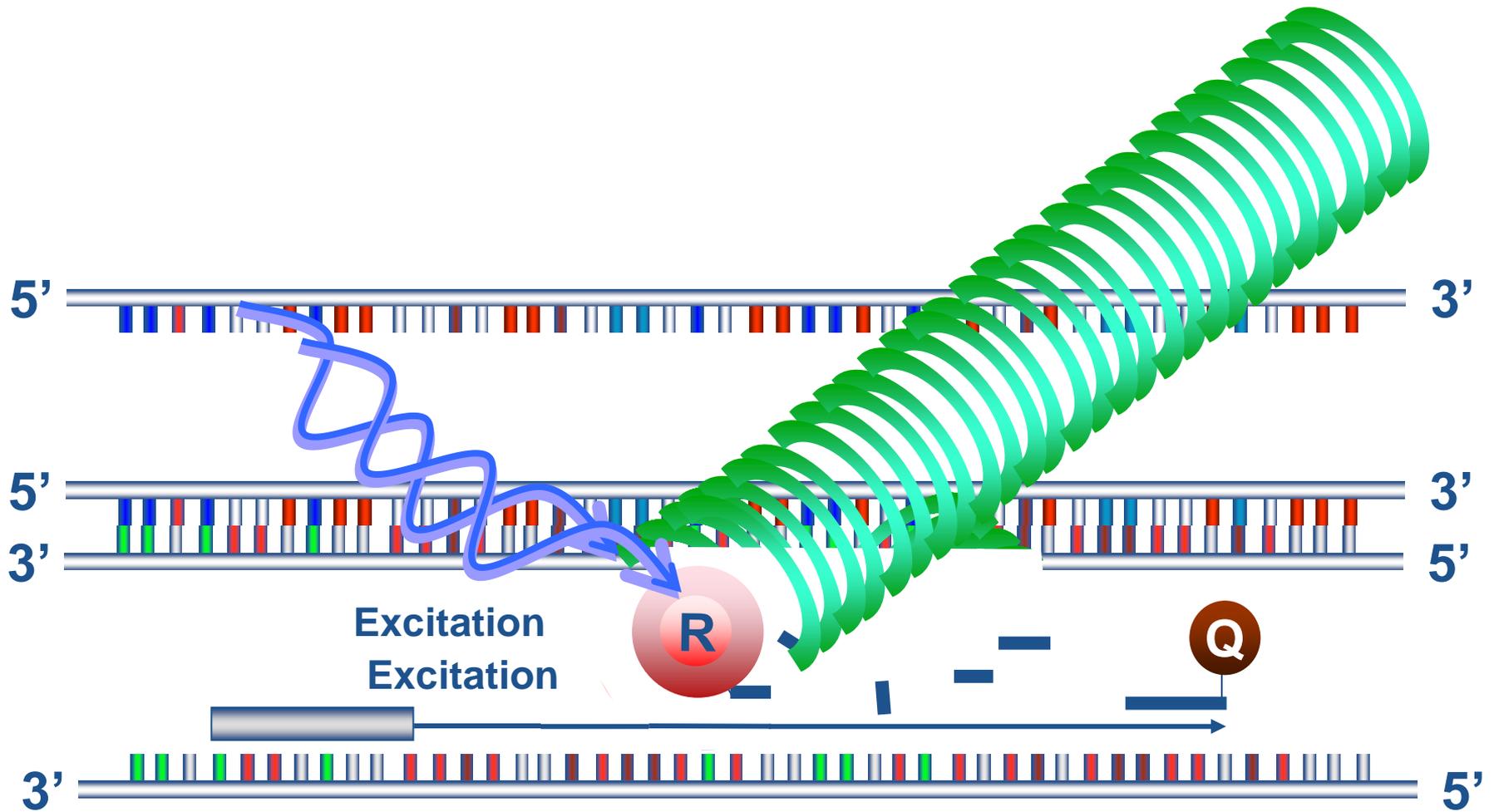
TaqMan Probe



序列特异性

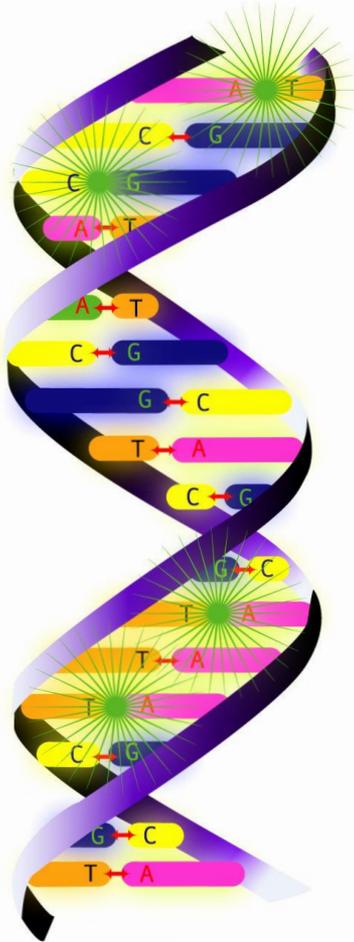
- 游离状态下，FRET效应，不发荧光
- 伴随产物生成，荧光积累

Taqman 工作原理



每形成一个DNA链，就会切断一条探针，每切断一条探针，就会产生一个单位的光信号

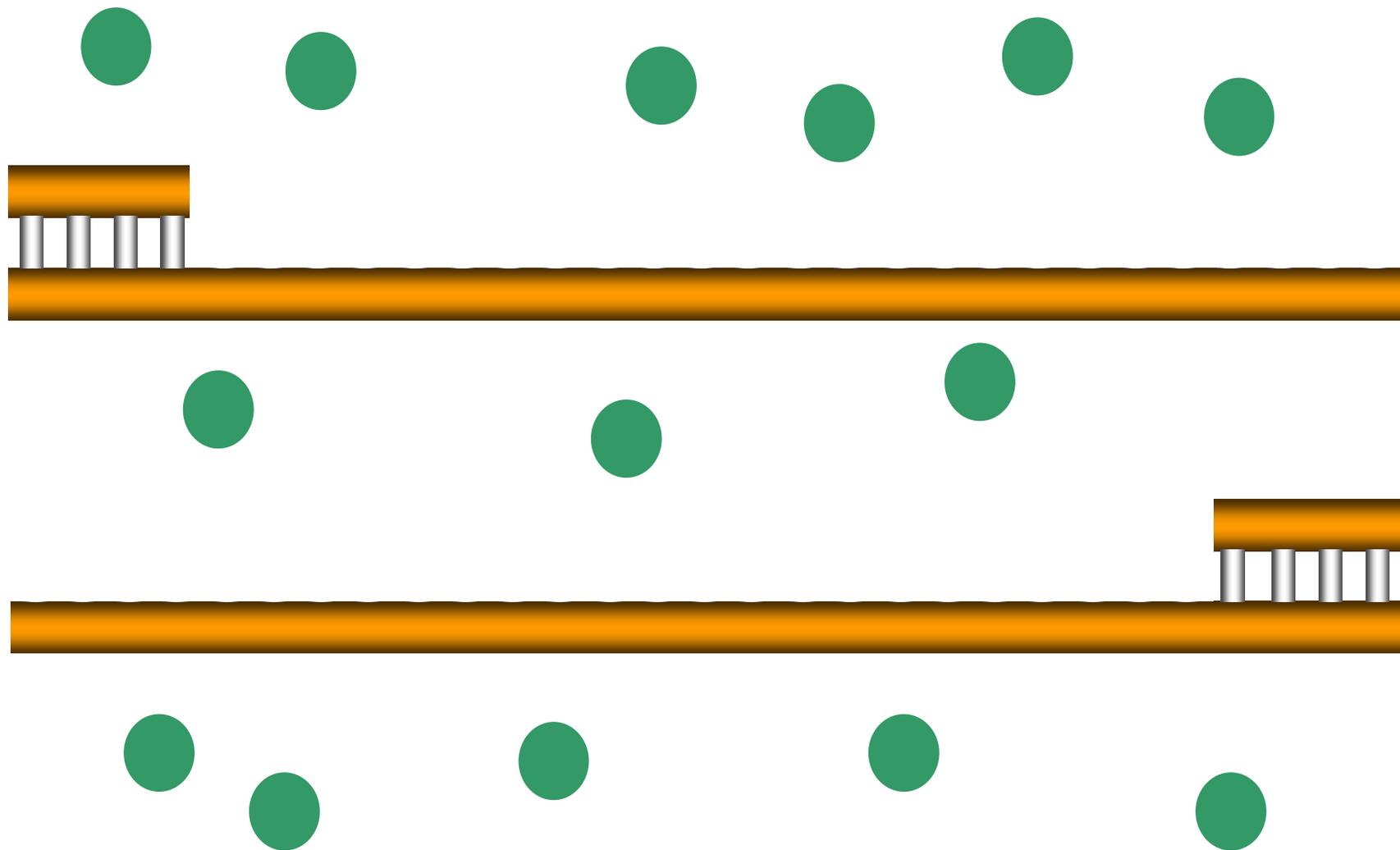
SYBR Green I 工作原理



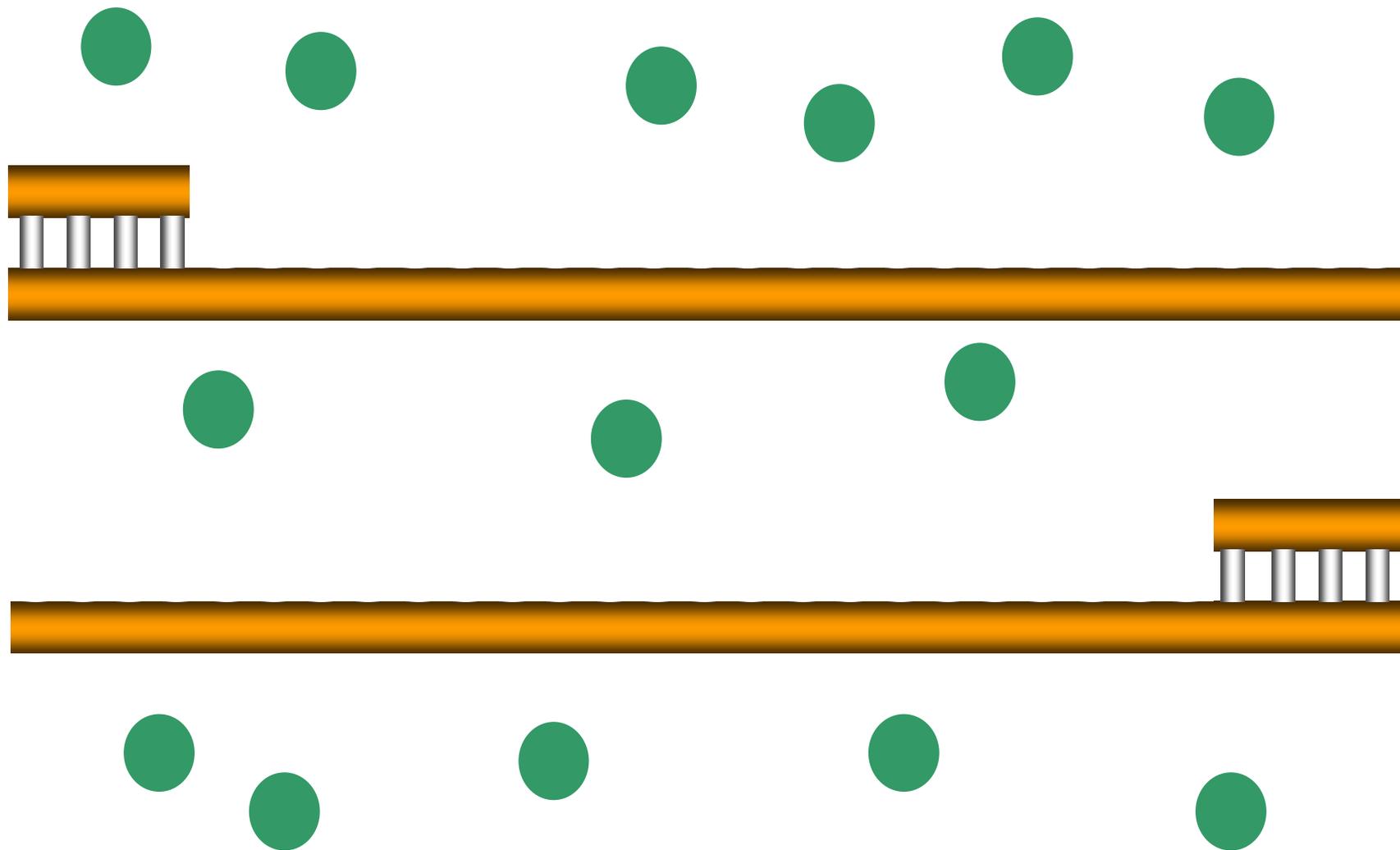
- SYBR Green I 是一种与双链DNA小沟结合的荧光染料。
- SYBR Green I 只与双链DNA结合才能发出荧光。
- 荧光信号与双链DNA分子数成正比，随着扩增产物增加而增加。

荧光信号强度与反应体系中所有双链DNA分子成正比。

SYBR[®] Green I 化学原理

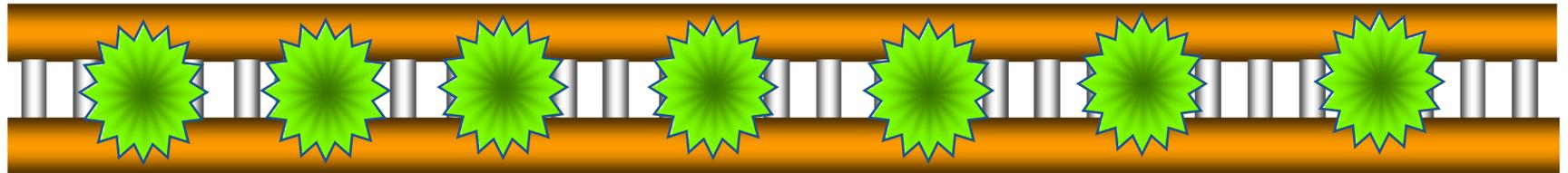
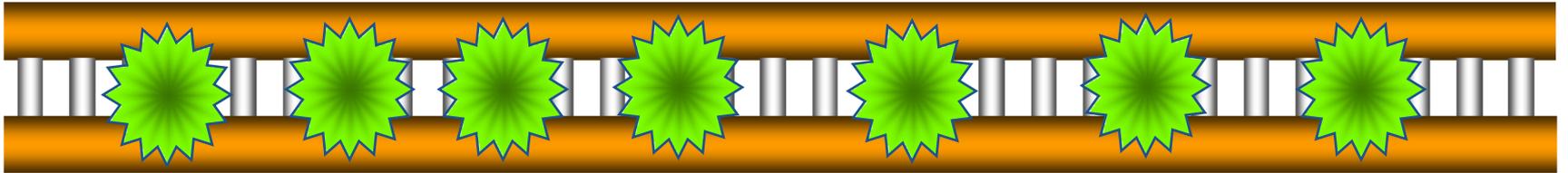


SYBR[®] Green I 化学原理



SYBR[®] Green I 化学原理

- 新的序列，新的信号！



SYBR Green I

优点:

- ❖ 使用方便，成本低
 - 仅需设计两个引物
- ❖ 通用性好
 - 对DNA模板没有选择性

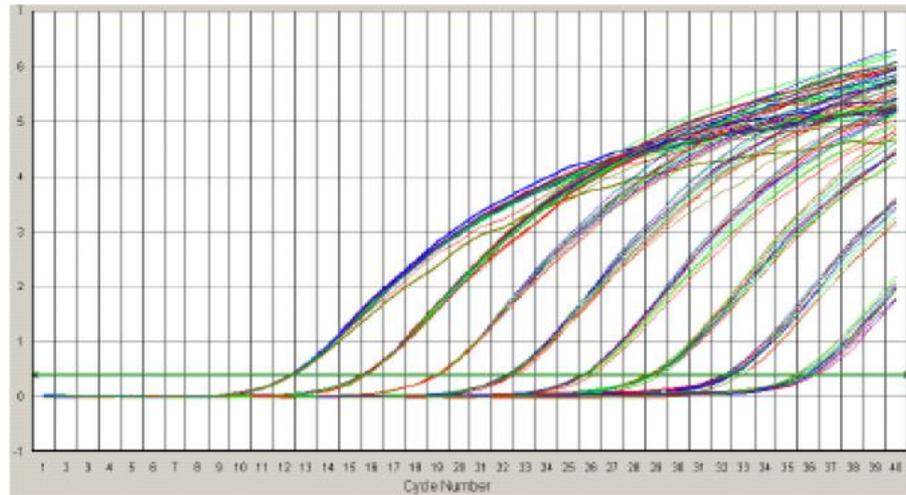
缺点:

- ❖ SYBR Green与所有双链DNA结合
 - 引物二聚体或错误扩增产物造成假阳性
 - 只能检测单一模板，无法进行多重检测

需要在反应结束时，对产物做熔解曲线分析。

扩增曲线 (primary curve)

线性图谱



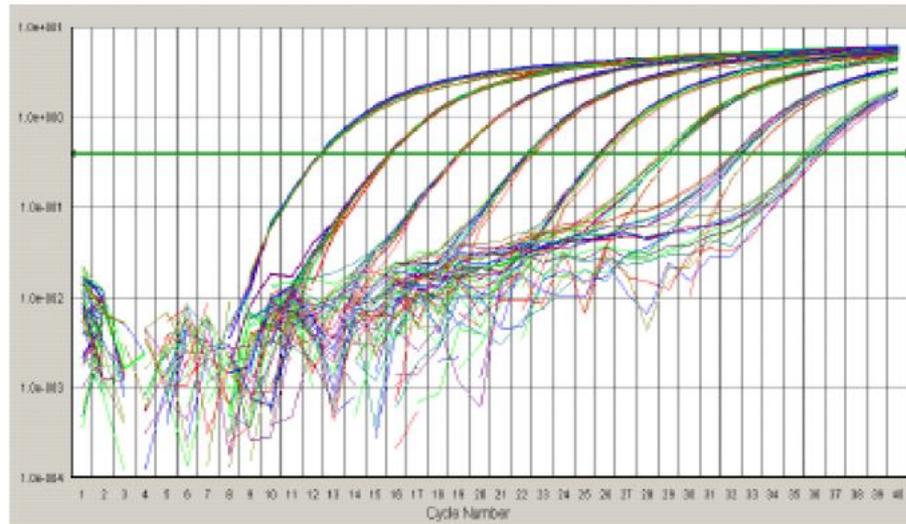
平台期

线性增长期

指数增长期

基线期

对数图谱



平台期

线性增长期

指数增长期

基线期

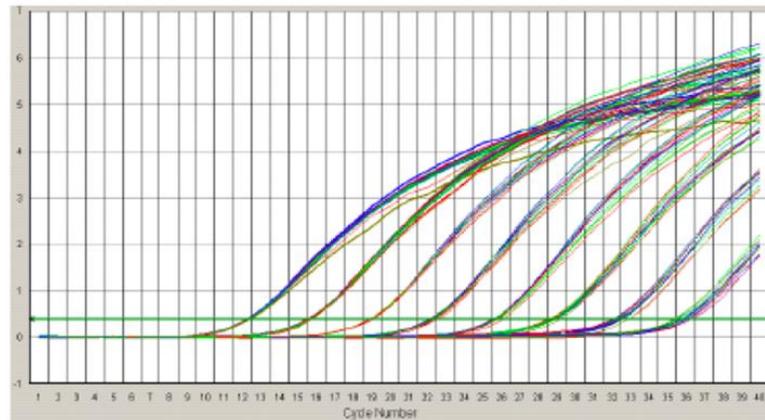
荧光扩增曲线的四个阶段

基线期，扩增的荧光信号被荧光背景信号所掩盖，我们无法判断产物量的变化。需要经过数个循环后荧光信号才能够被检测到，一般以**15个**循环的荧光信号作为荧光本底信号。

指数增长期，PCR 产物量的对数值与起始模板量之间存在线性关系，我们可以选择在这个阶段进行定量分析。

线性期和平台期，扩增产物已不再呈指数级的增加。PCR 的终产物量与起始模板量之间没有线性关系，所以根据最终的 PCR 产物量不能计算出起始 DNA 拷贝数。

线性
图谱



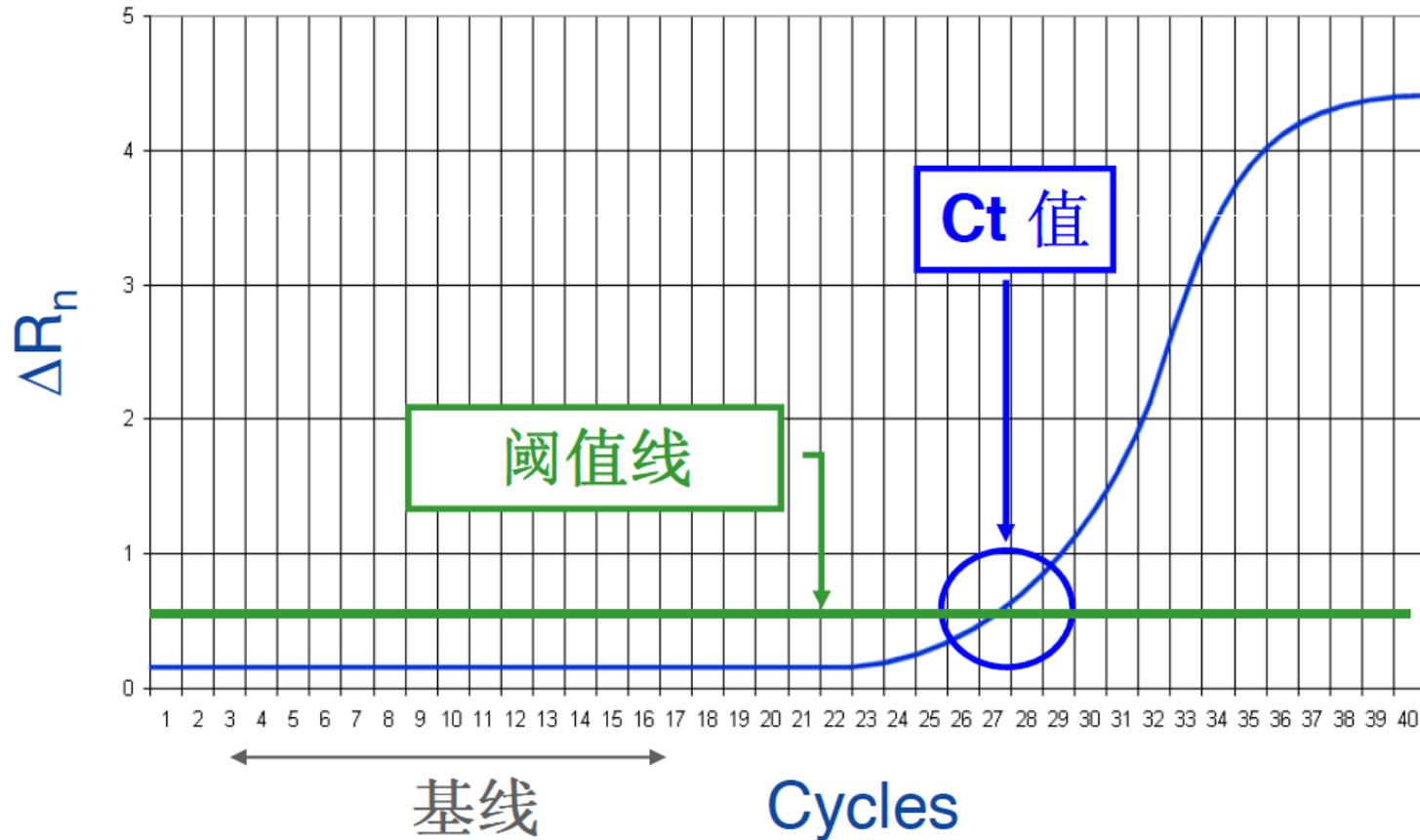
平台期

线性增长期

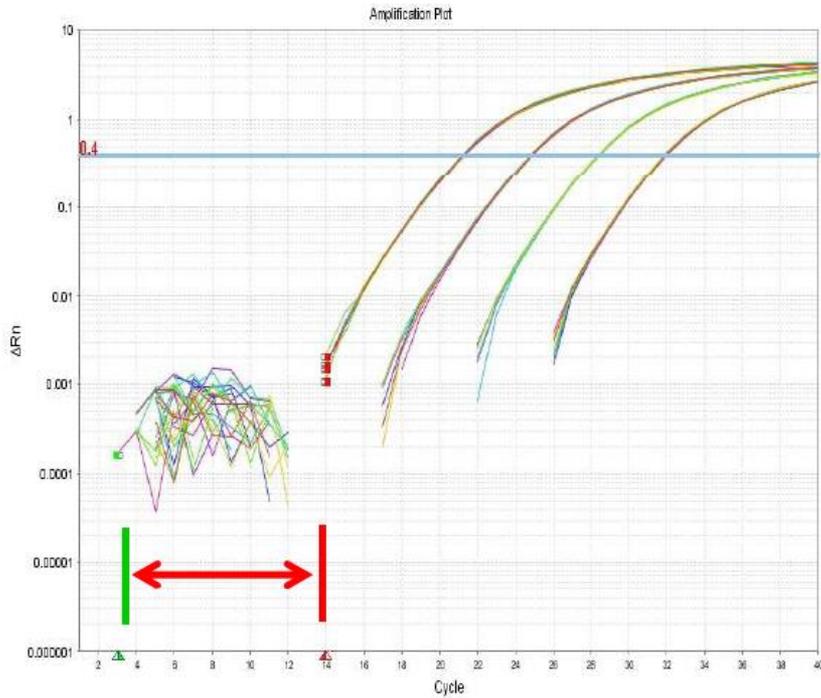
指数增长期

基线期

q-PCR中的重要概念

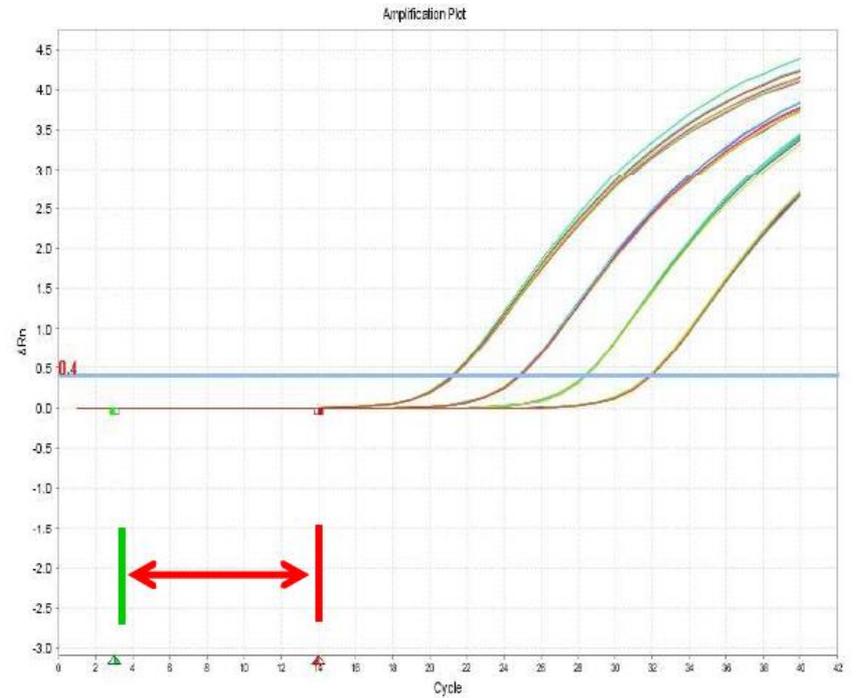


基线 (baseline)



基线

对数图谱

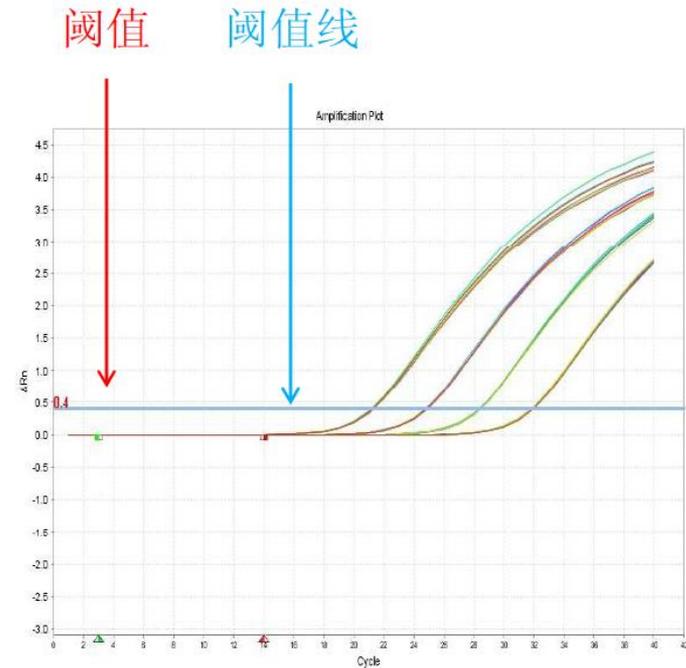
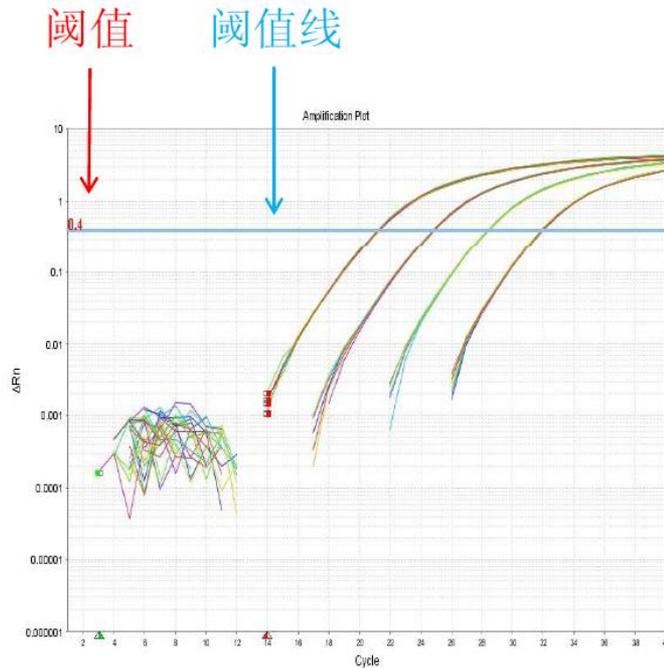


基线

线性图谱

❖ 基线(baseline): 线性扩增曲线中的水平部分

荧光阈值 (threshold)

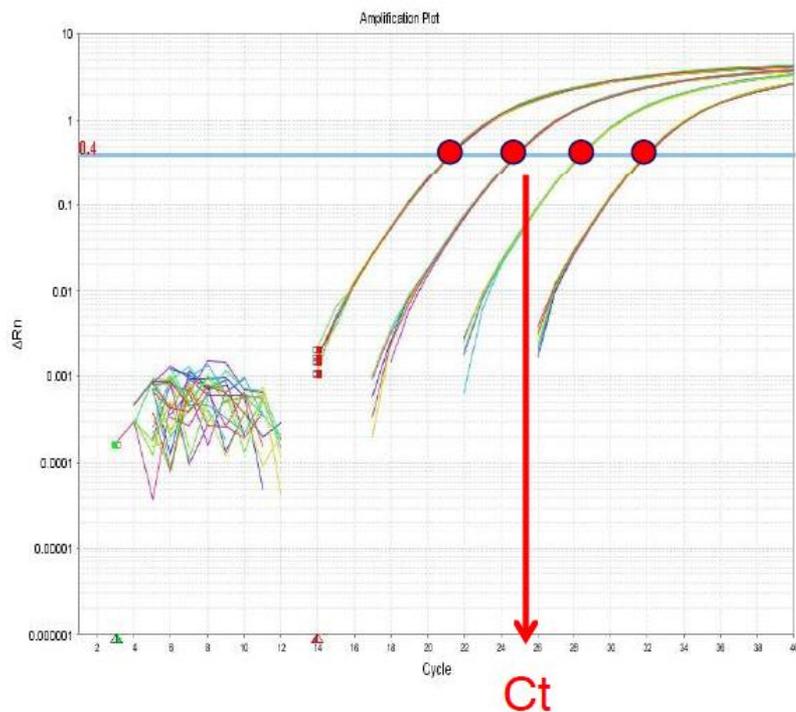


荧光阈值(threshold): 扩增曲线上人为设定的一个值，它可以设定在荧光信号指数扩增阶段任意位置上。

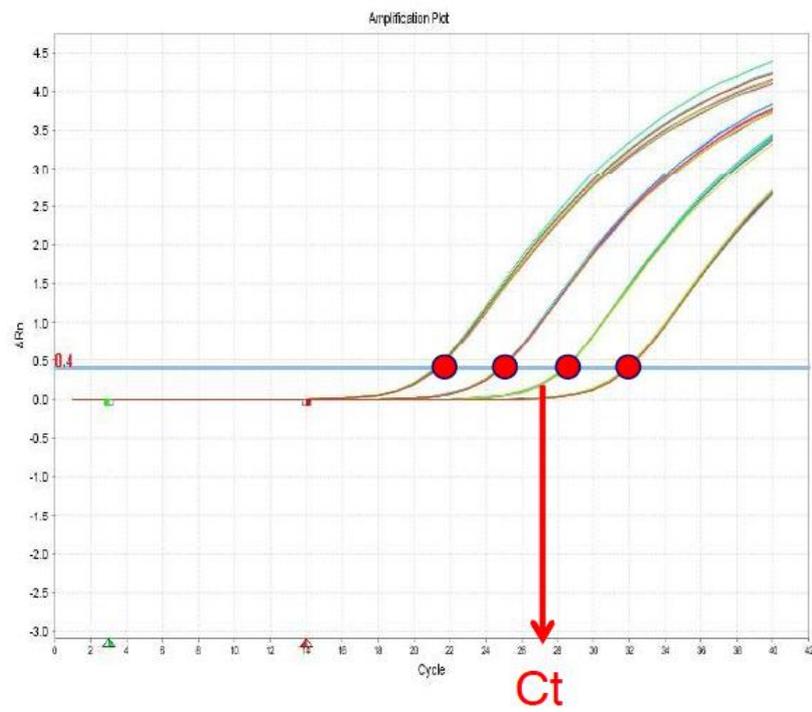
-- 缺省设置：PCR反应前3-15个循环荧光本底信号标准偏差的10倍

-- 手动设置：大于样本的荧光背景值

Ct 值(Cycle Threshold)



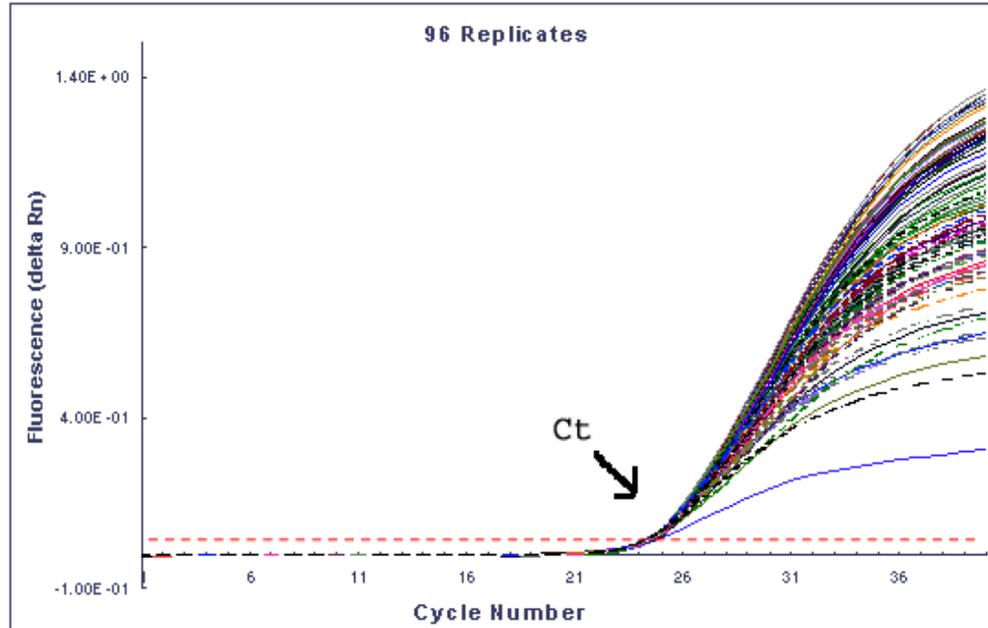
对数图谱



线性图谱

Ct值：PCR扩增过程中，扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时，荧光值所对应的PCR循环次数。

Ct 值(Cycle Threshold)



Ct值的特点:

- 相同模板进行96次扩增，平台期DNA拷贝数波动很大，但Ct值相对固定；
- Ct值则极具重现性

Ct值可以确定初始模板量?

$$R_n = R_B + X_0 (1+E)^N * R_S$$

第n个循环的总信号

= 本底信号 + 起始DNA数目 * PCR扩增效率 * 单位信号强度

当循环次数n=Ct时

$$R_{Ct} = R_B + X_0 (1+E)^{Ct} * R_S$$

两边同时取对数得:

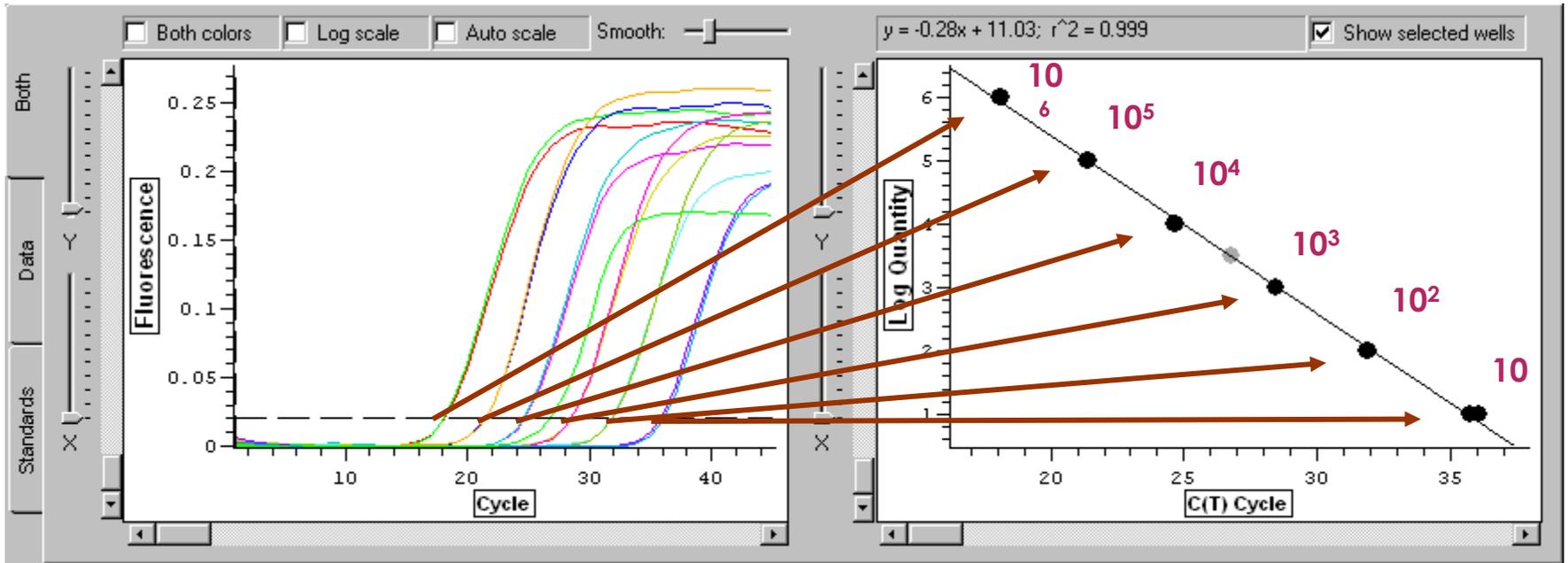
$$\begin{aligned} \lg(R_{Ct} - R_B) &= \lg X_0 + Ct \lg(1+E) + \lg R_S \\ Ct &= -\lg X_0 / \lg(1+E) + \lg(R_{Ct} - R_B) - \lg R_S / \lg(1+E) \end{aligned}$$

$$Ct = -k \lg X_0 + b$$

$\lg X_0$ 与Ct值呈线性关系

根据Ct值可以计算出样本中起始模板所含有的拷贝数
起始拷贝数越多, Ct值越小。

标准曲线 (standard curve)



Rn vs. Cycle number-- 扩增曲线

LogDNA vs. Ct -- 标准曲线

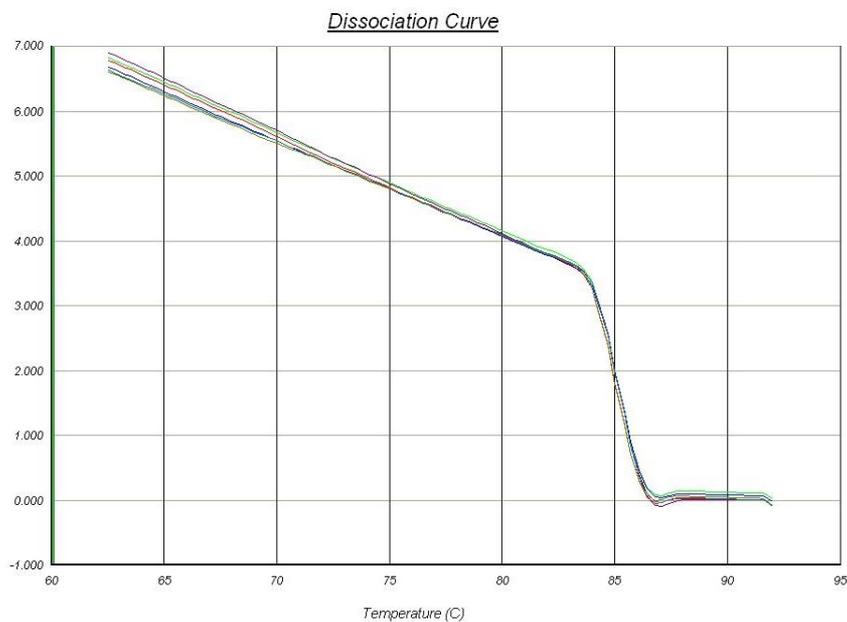
标准曲线分析

-- 对已知或未知样本进行系列浓度梯度稀释

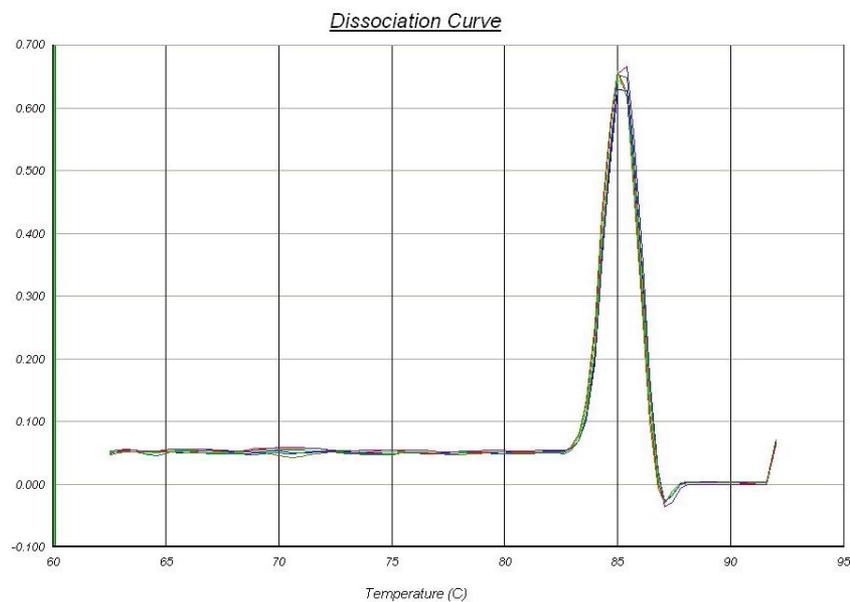
熔解曲线 (dissociation curve)

确认PCR反应产物的特异性

原始图谱

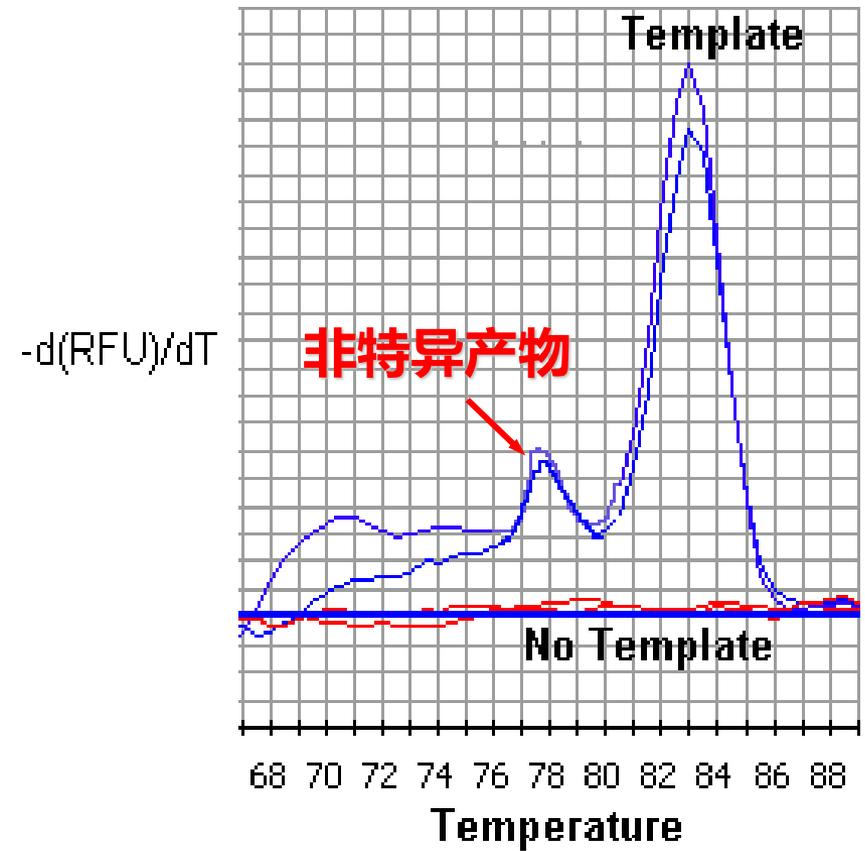
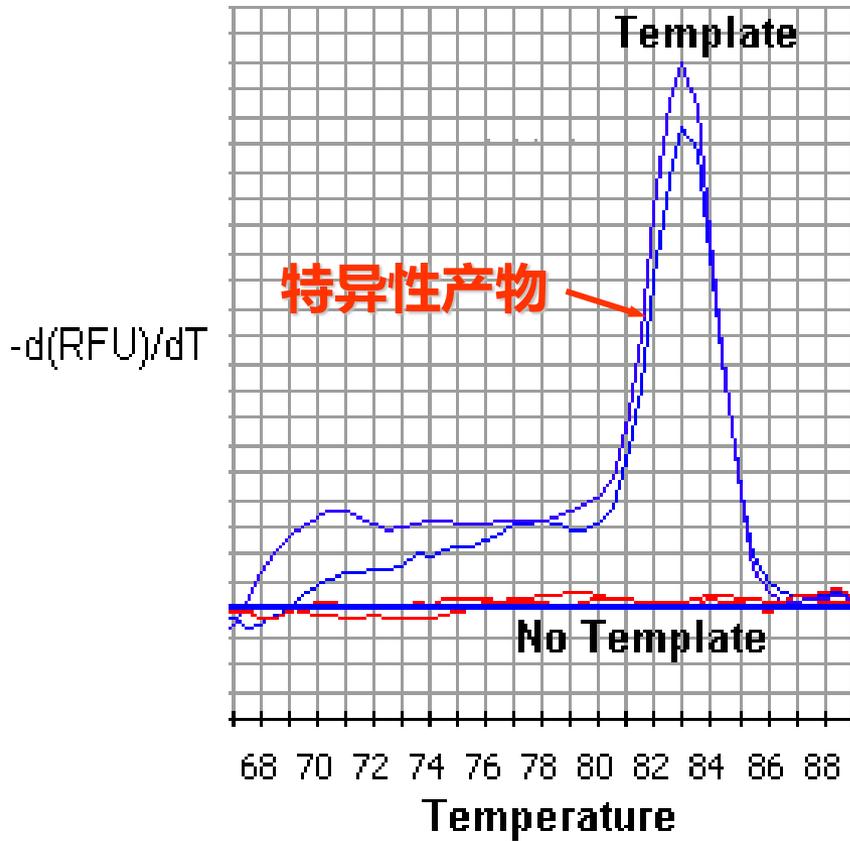


对数图谱

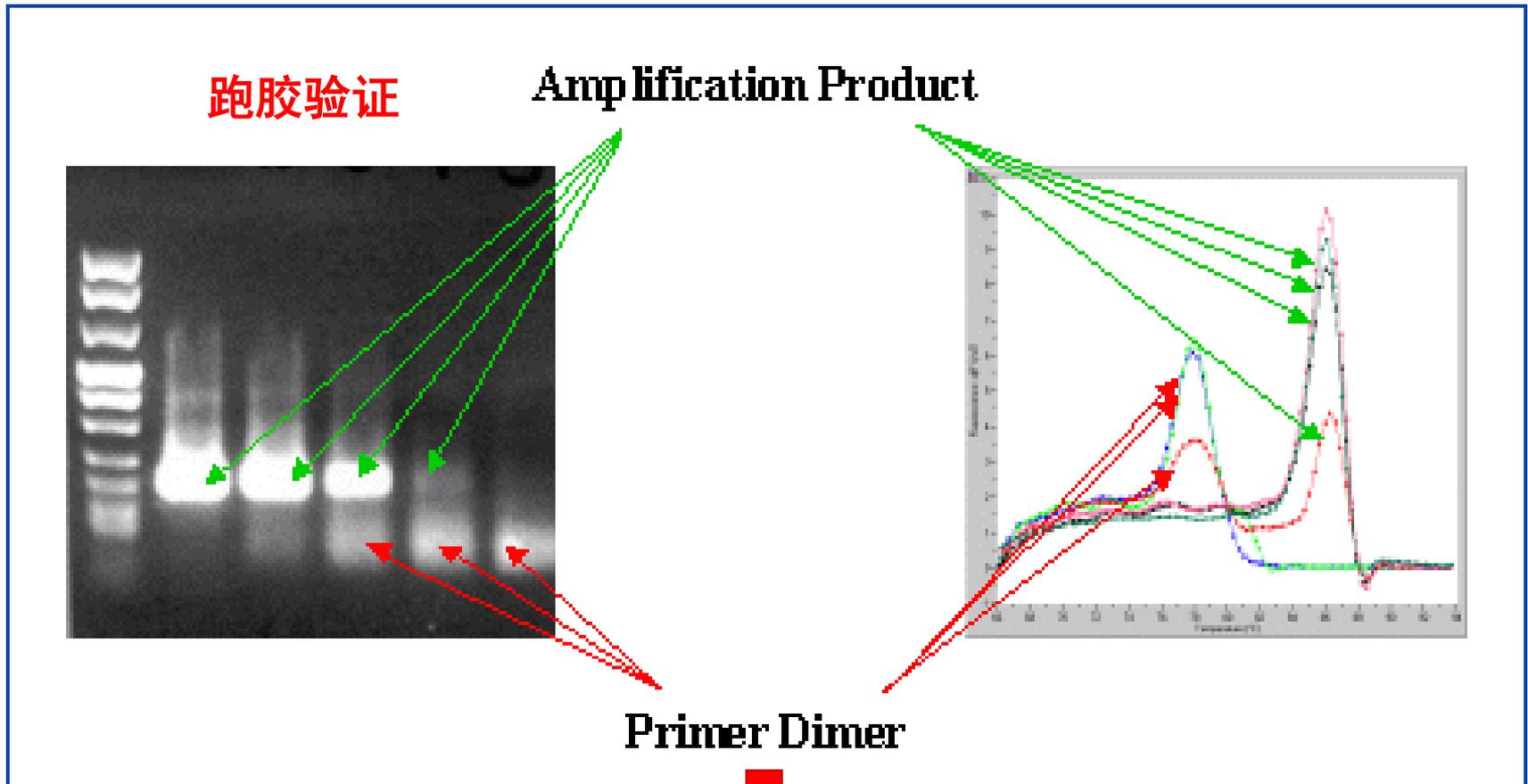


将温度对荧光强度的变化求导。

熔解曲线分析



熔解曲线分析



出现杂峰如何解决？

优化反应条件(提高退火温度, 增加模板量等), 必要时重新设计引物。

实时荧光定量PCR的主要应用方向：遗传变异分析

❖ 医学临床

- 特异DNA/RNA片段的检测及鉴定（如人凝血因子V基因的突变检测、肿瘤相关突变的检测、肿瘤相关的甲基化分析）
- 物种鉴别（如病毒、细菌的亚种）
- 抗生素抗药性菌株的变异监测
- 产前诊断

❖ 普通科研

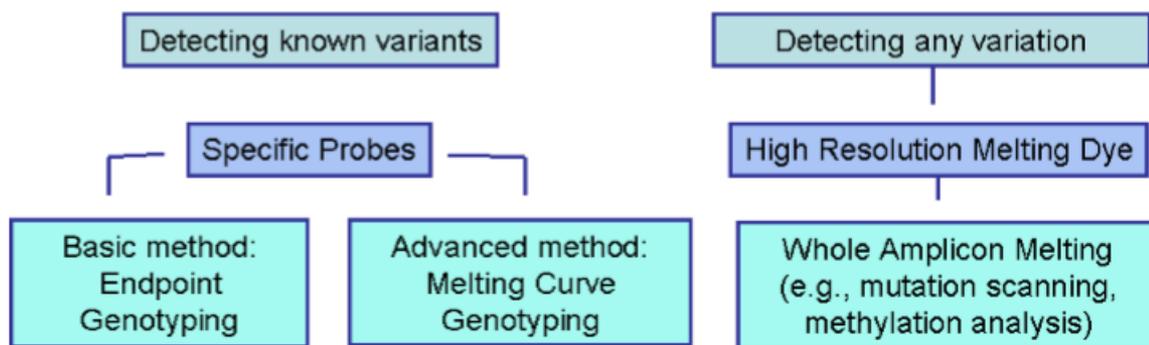
- 药物遗传学研究（如CYP2C各种亚型的突变筛查）
- 遗传指纹图谱
- 分子进化

❖ 食品安全

- 转基因作物筛查
- 食品微生物鉴定

Real-time PCR Application

➤ 基因分型



已知突变检测

- 使用水解探针进行终点法基因分型

未知突变检测 (e.g., mutation scanning, methylation analysis)

- 高分辨率溶解曲线法检测未知突变

实时荧光定量PCR的主要应用方向：定量检测

❖ 医学临床

- 病毒及其他致病性微生物与寄生虫的定量检测（绝对定量）
- 基因拷贝数变化，如染色体异变检测（相对定量）
- 微小残留病灶的定量检测（绝对定量）

❖ 普通科研

- mRNA表达水平检测（相对定量）
- 基因芯片结果验证

❖ 食品安全

- 转基因作物定量（相对定量）
- 食品微生物定量（绝对定量）

❖ 动植物疫病

荧光定量PCR定量分析

❖ 绝对定量

样本中核酸的量（拷贝数、微克）

- 检测某给定血液样本中的病毒颗粒数，有6000个拷贝
- 检测土壤/水体样本中的特定功能基因数/功能菌数，有3000个拷贝

❖ 相对定量

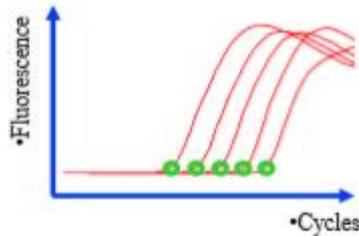
不同样本中目的基因表达量的差异

- 肿瘤组织和正常组织相比，某个基因的表达量mRNA改变了多少倍，改变了60倍

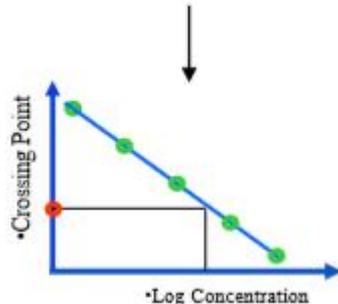
荧光定量PCR定量分析

绝对定量

- 已知浓度样品做标准曲线
- 计算出未知样品的浓度值



•标准品



•标准曲线

相对定量

目标基因浓度/参比基因浓度

简单相对定量

- 默认扩增效率=2
- $-\Delta\Delta Ct$ 法

高级相对定量

- 可利用标准曲线得到真实扩增效率值，修正结果
- 双标准曲线法

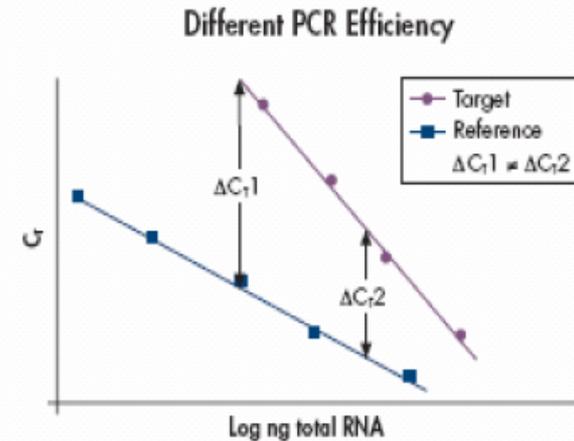
主要内容

相对定量

绝对定量

相对定量

- ❖ 标准品：目的基因和内参基因的相对拷贝数
 - 内参基因：GAPDH, β -actin, 18S rRNA
 - 目的基因：DNA, cDNA, RNA
- ❖ 梯度稀释：4-5个以上不同浓度梯度
- ❖ 重复：3 R/sample (一般)
- ❖ 阴性对照：NTC (Non Template Control)
- ❖ 标准曲线：相对标准曲线



相对定量

内参基因

对样本初始浓度差异进行均一化校正。

- 同样体积或重量的样本所来源的细胞数目不同。
- RNA抽提、反转效率不同，操作中存在误差。

内参基因

beta-actin、
GAPDH、
18S rRNA等
看家基因
**housekeeping
gene**

特点

在细胞中的表达量
或在基因组中的拷贝数恒定，受环境
因素影响较小

选择内参基因

- 文献检索
- 实验筛选

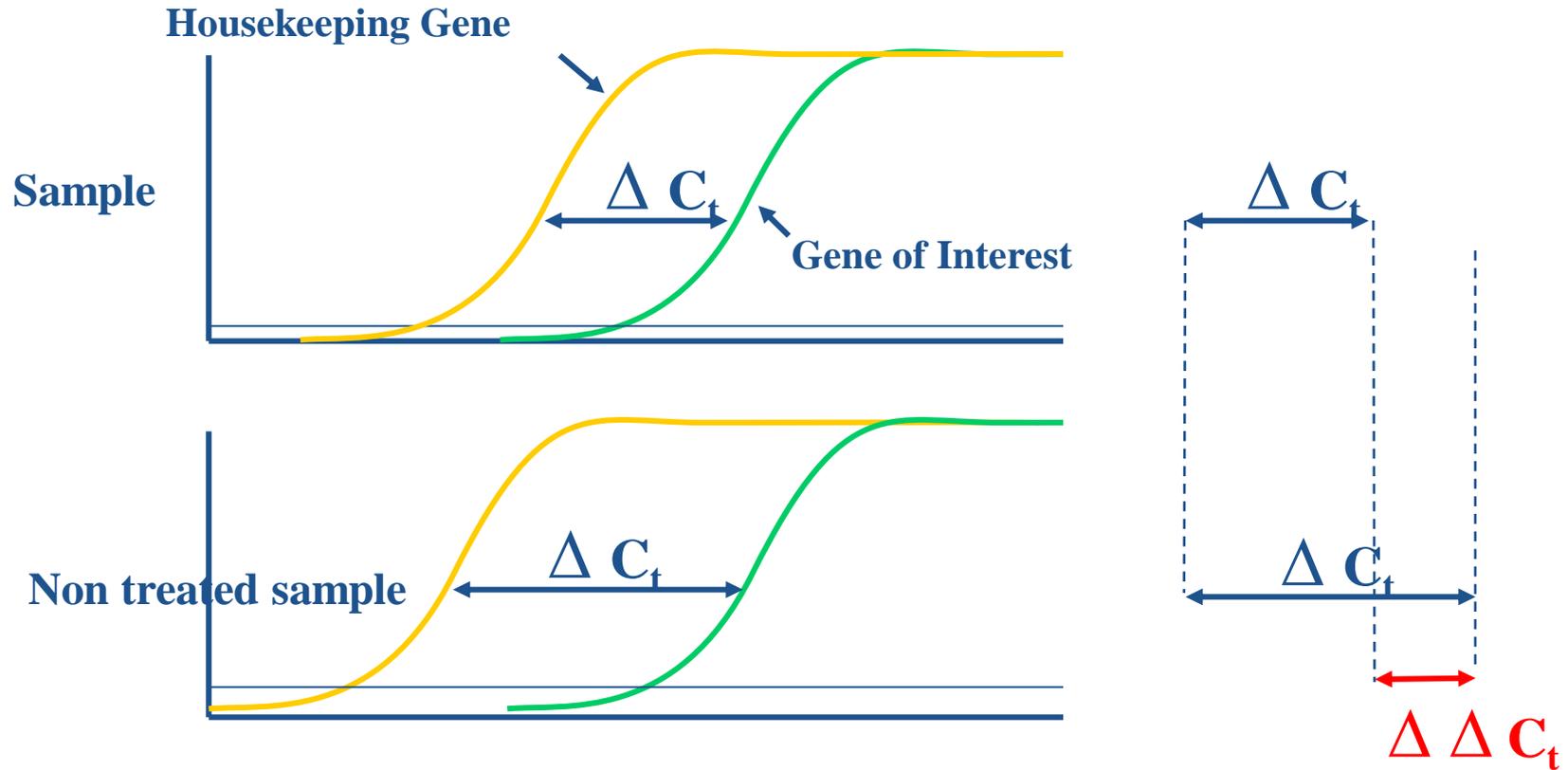
相对定量(两者效率不一致)

- ❖ 以4-5个浓度梯度稀释, 分别作目的基因和内参基因的标准曲线
- ❖ 确定未知样本中目的基因和内参基因的 C_p 值
- ❖ 根据各自的标准曲线算出目的基因和内参基因的量
- ❖ 均一化处理 = 目的基因量/内参基因量
- ❖ 设对照组值为1, 换算出实验组的表达水平

Quantification and Normalization
of IL8 and B2M Expression Levels

Sample	IL8 C_p	B2M C_p	Amount of IL8 RNA (ngl)*	Amount of B2M RNA (ng)	Normalized amount of IL8 RNA (ngl)*	Ratio
Untreated (calibrator sample)	37.01	18.83	1.40E-03	346	4.05E-06	1.0
PMA	29.43	18.59	1.80E-01	417	4.32E-04	106.7
LTA	34.43	18.59	7.20E-03	417	1.73E-05	4.3

相对定量(两者效率一致)



$$2^{-\Delta \Delta C_t} = \text{Change in Expression Level}$$

相对定量方法

➤ 公式-- $2^{-\Delta\Delta Ct}$:

处理

对照

$$F = 2^{- \left[\frac{\text{待测组 目的基因}}{\text{平均Ct值}} - \frac{\text{待测组 内参基因}}{\text{平均Ct值}} \right] - \left[\frac{\text{对照组 目的基因}}{\text{平均Ct值}} - \frac{\text{对照组 内参基因}}{\text{平均Ct值}} \right]}$$

① $Ct_{\text{处理}} - Ct_{\text{内参(处理)}} = \Delta Ct_{\text{处理}}$; $Ct_{\text{对照}} - Ct_{\text{内参(对照)}} = \Delta Ct_{\text{对照}}$

② $\Delta Ct_{\text{处理}} - \Delta Ct_{\text{对照}} = \Delta\Delta Ct$

③ 倍数差异 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

成立条件: 假设扩增效率为100%

满足条件: 1) 内参基因和目标基因的扩增效率接近

2) 内参基因和目标基因的扩增效率均为90%-110%

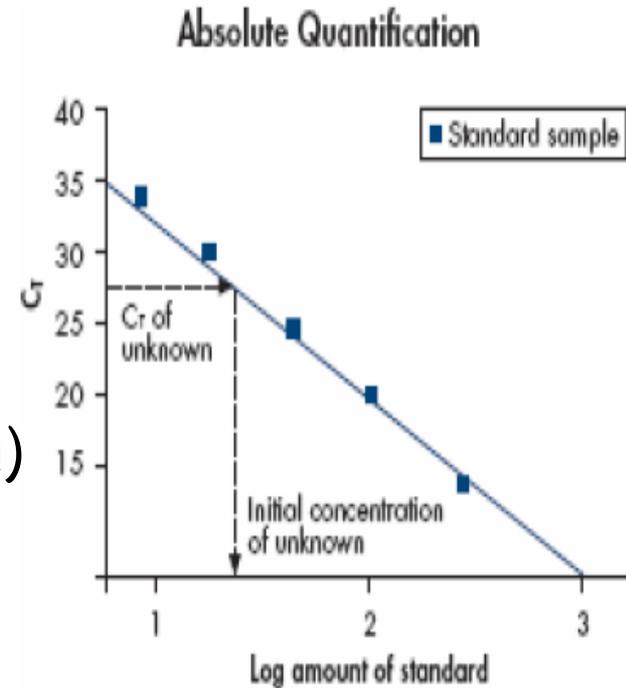
主要内容

相对定量

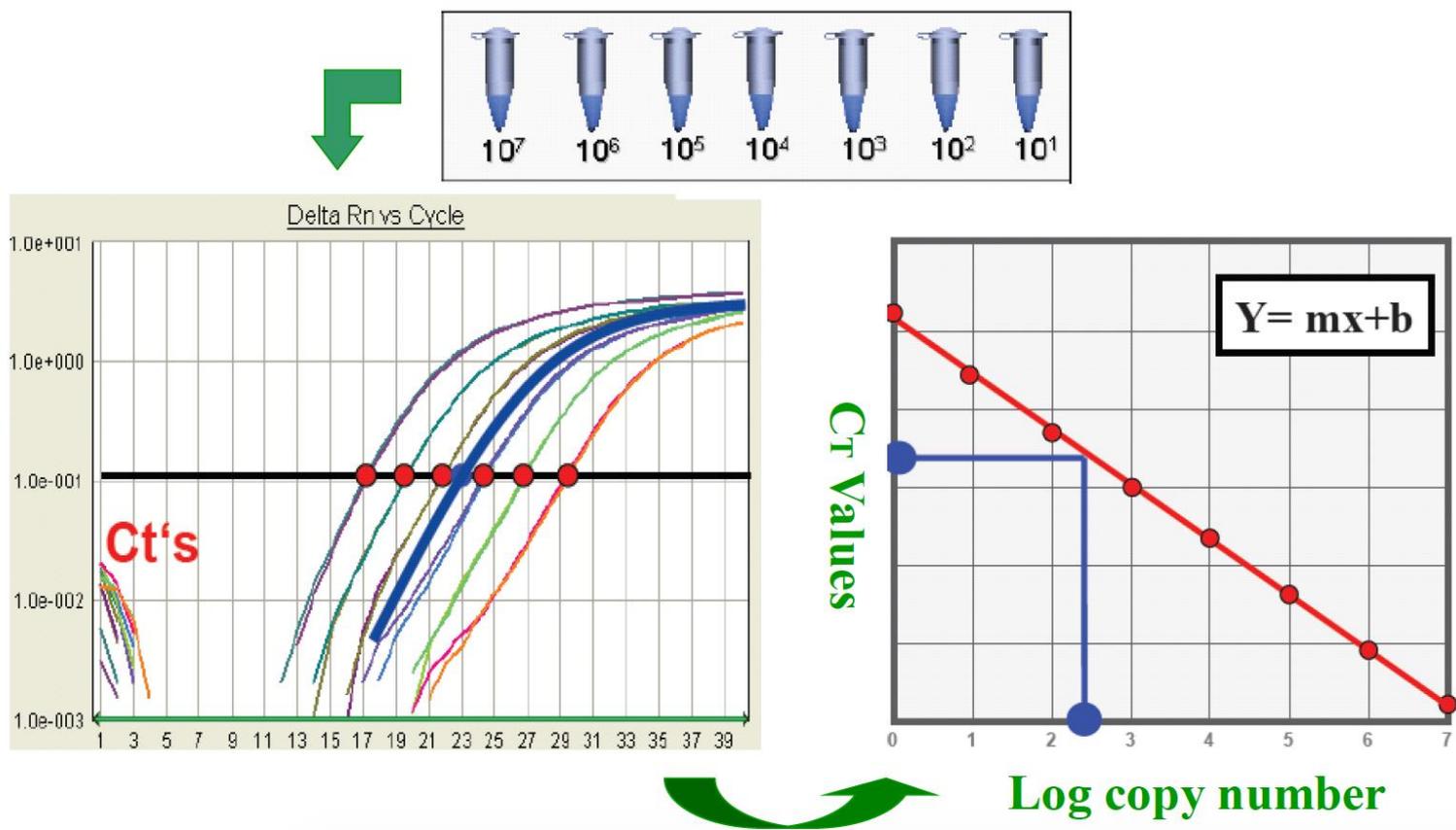
绝对定量

绝对定量

- ❖ 标准品：目的基因的绝对拷贝数
 - 目的基因：DNA, cDNA, RNA
- ❖ 梯度稀释：4-5个不同浓度梯度
- ❖ 重复：3R/sample
- ❖ 阴性对照：NTC(Non Template Control)
- ❖ 标准曲线：绝对标准曲线
 - 斜率一般在-3.3~-3.8
 - -3.322表示PCR扩增效率100%
- ❖ 定量：根据未知模板的 C_p 值确定目的基因的绝对拷贝数



绝对定量



-- 样本起始浓度与Ct呈线性关系，根据已知拷贝的标准品作出标准曲线。

-- 根据未知样品的Ct值，推算出未知样本量。

绝对定量的步骤



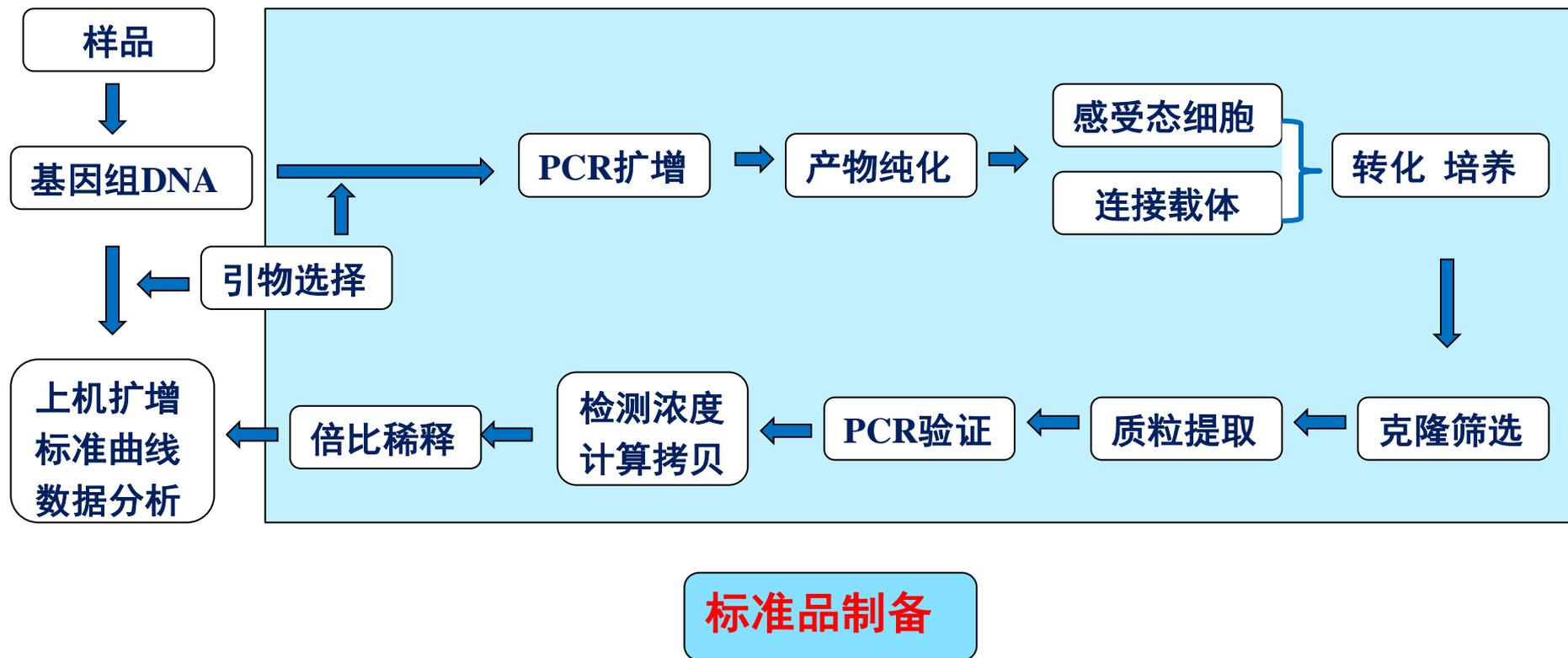
实验操作流程

标准曲线制作方法

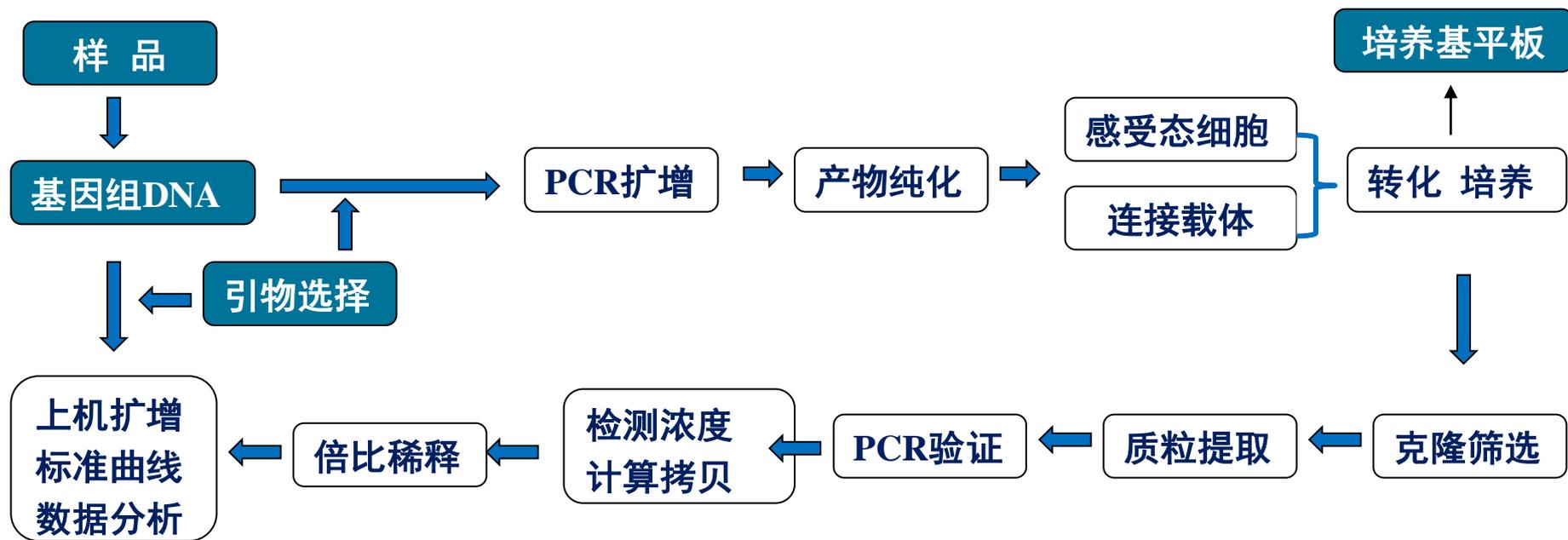
南楼313室



标准曲线制作流程



前期准备工作



前期准备工作

样品

新鲜样品需冷冻或冻干保存，如土壤、液体培养物、动植物组织等

基因组DNA

采用基因组DNA试剂盒提取，冷冻保存

引物选择

根据研究的目的基因选择文献中通用引物

自己设计引物

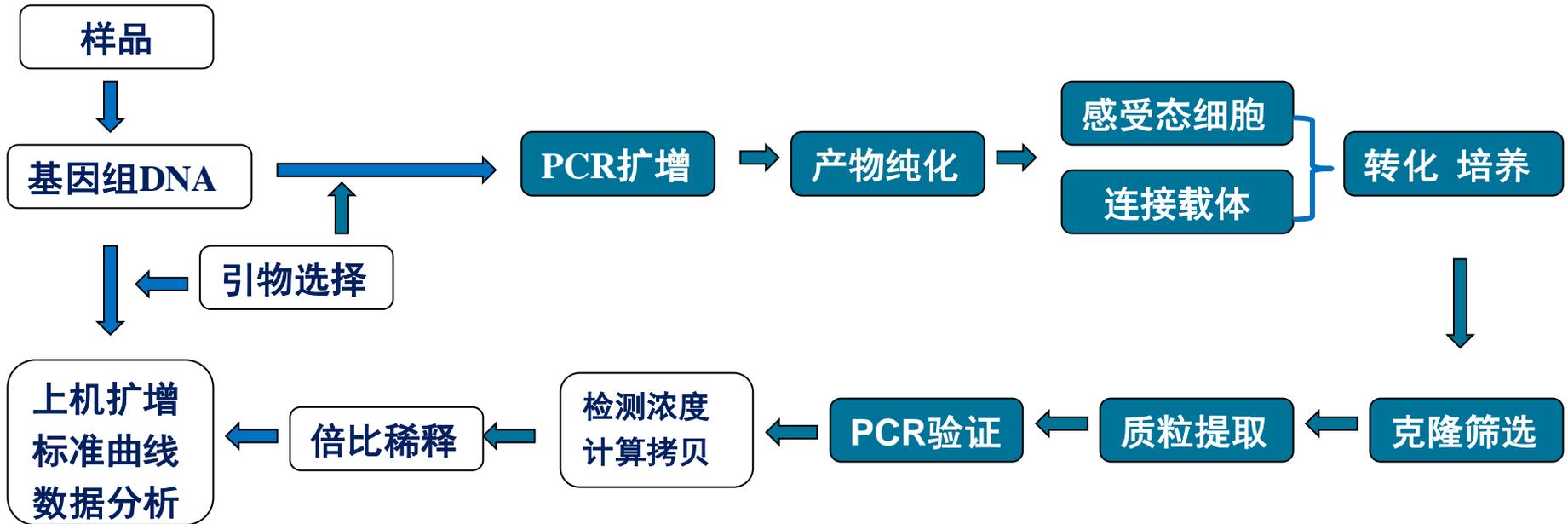
培养基平板

提前准备好含X-Gal, IPTG, Amp的LB平板培养基
(避光保存, 保存日期不超过7天)

样品基因组DNA的提取



标准品制备

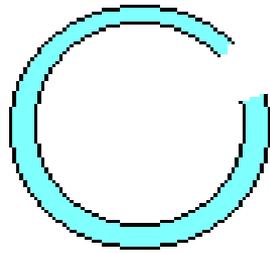


分子克隆

分子克隆的基本步骤

分	—————	分离目的基因
切	—————	限制酶切目的基因与载体
接	—————	拼接重组体
转	—————	转入受体菌
筛	—————	筛选重组体

载体

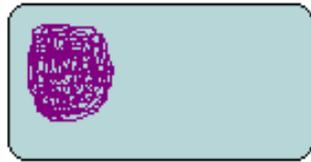


+

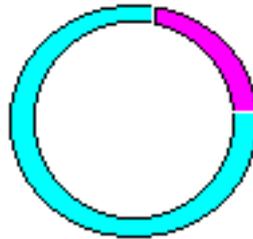


目的基因

连接



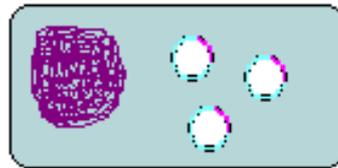
+



DNA重组体

受体细胞

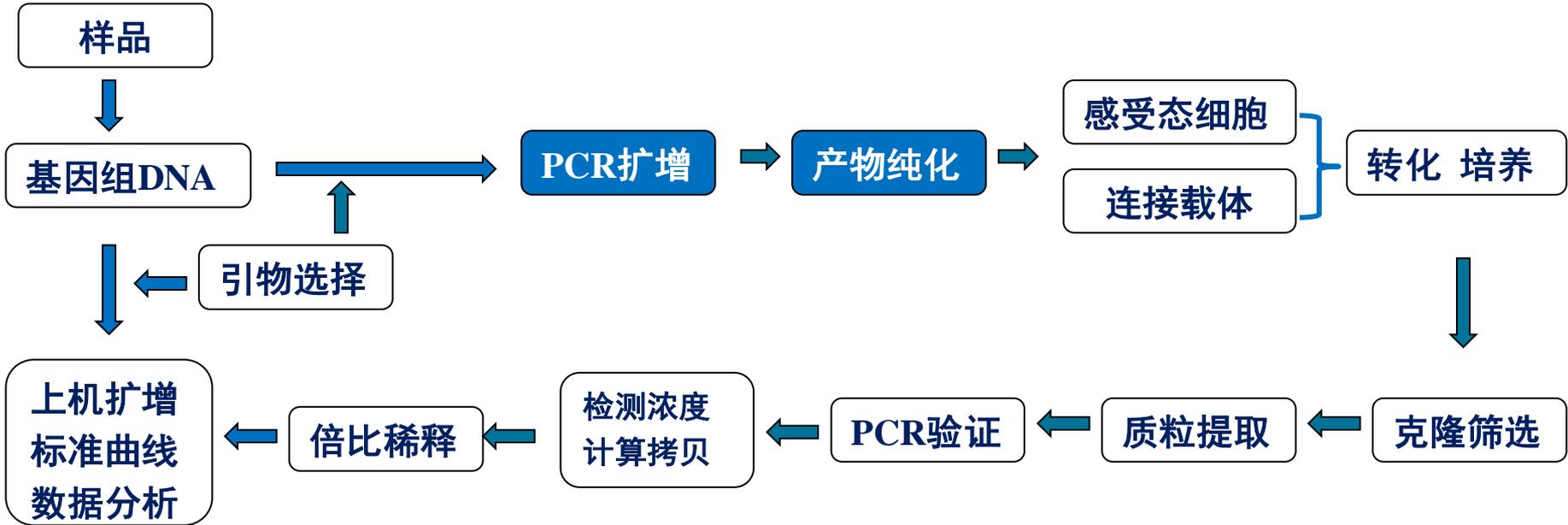
转化、筛选和鉴定阳性克隆



含重组子的阳性克隆

标准品制备

目的基因PCR扩增及纯化



目的基因PCR

PCR MIX:

- 引物
- 4种dNTP混合物
- Mg^{2+} (10Xbuffer)
- Taq DNA聚合酶
- 模板DNA
- 无菌水H₂O

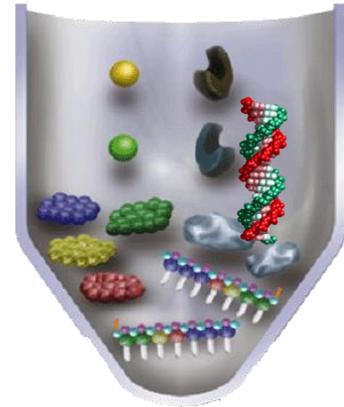


目的基因PCR

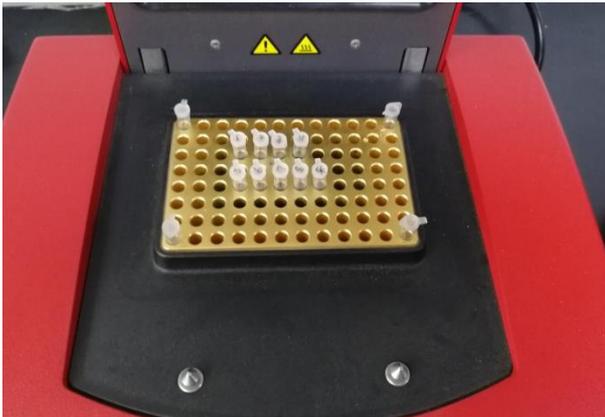
PCR实验流程图

- 模板DNA
- 引物
- 4种dNTP混合物
- Taq DNA聚合酶
- Mg^{2+}

混合 分装

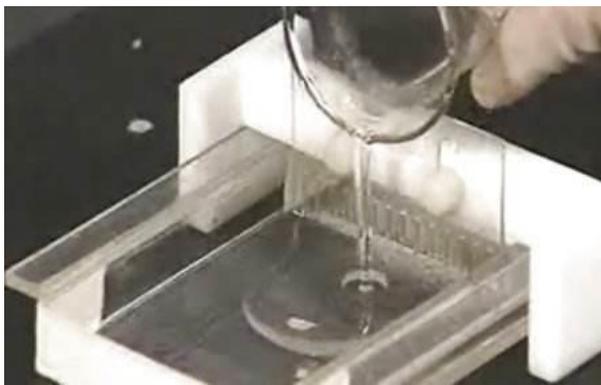


上机 扩增



琼脂糖凝胶电泳检测

制胶



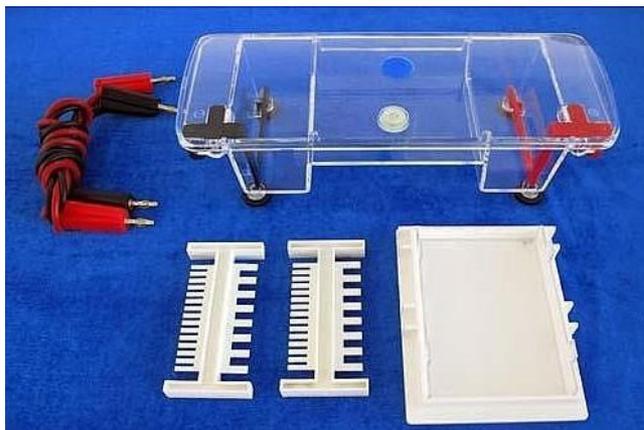
取样



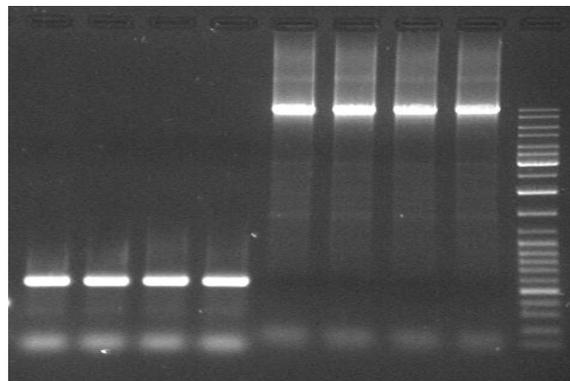
点样



电泳

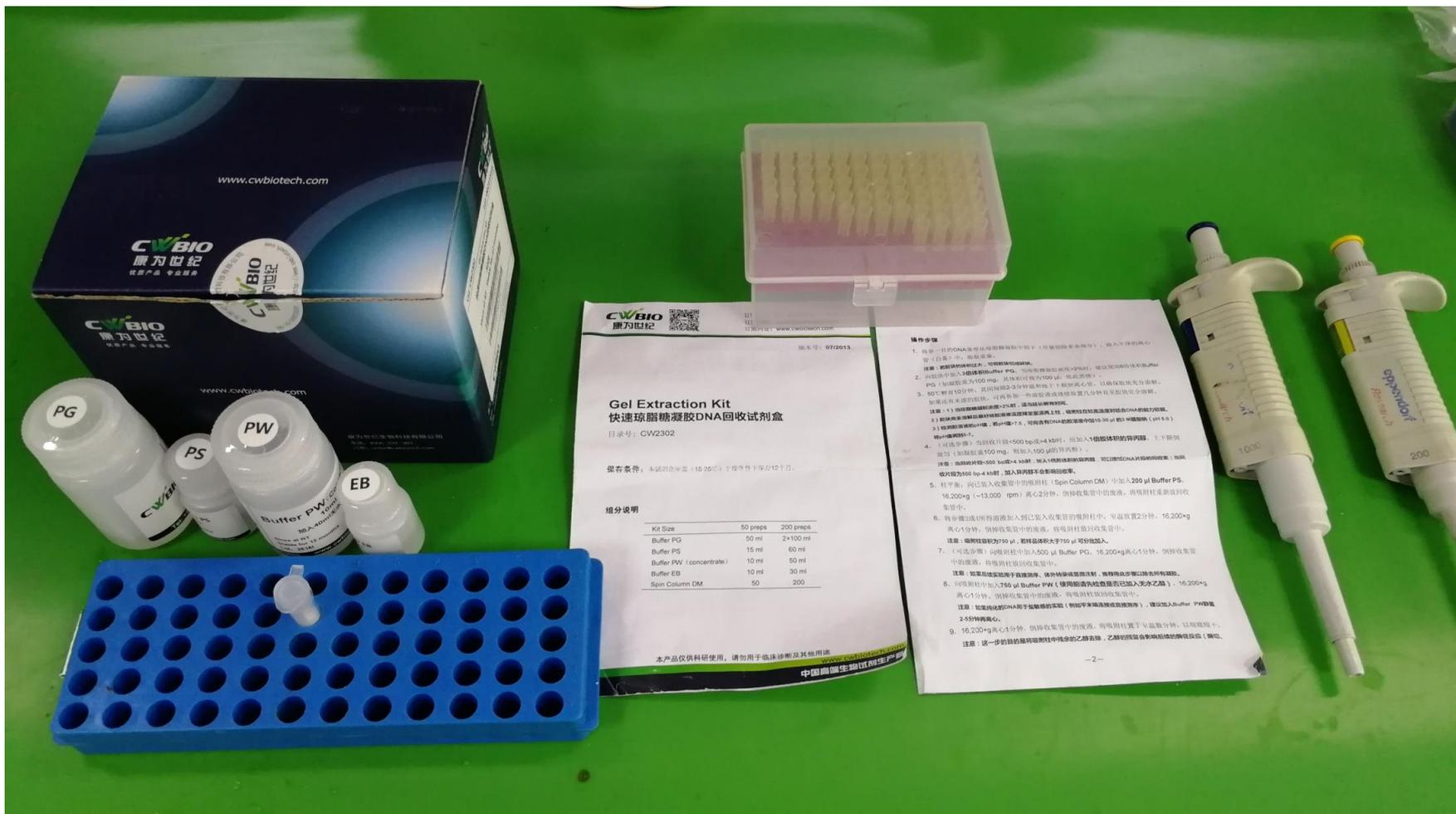


检测

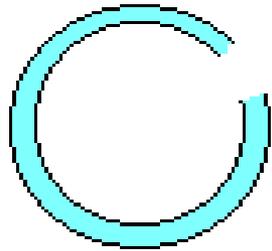


PCR 产物切胶纯化

采用胶纯化试剂盒纯化



载体



+

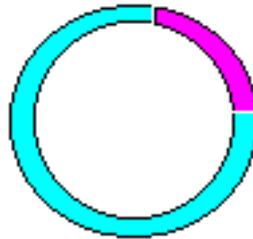


目的基因

连接



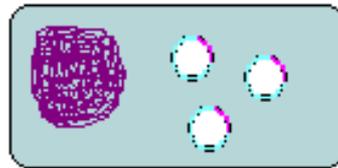
+



DNA重组体

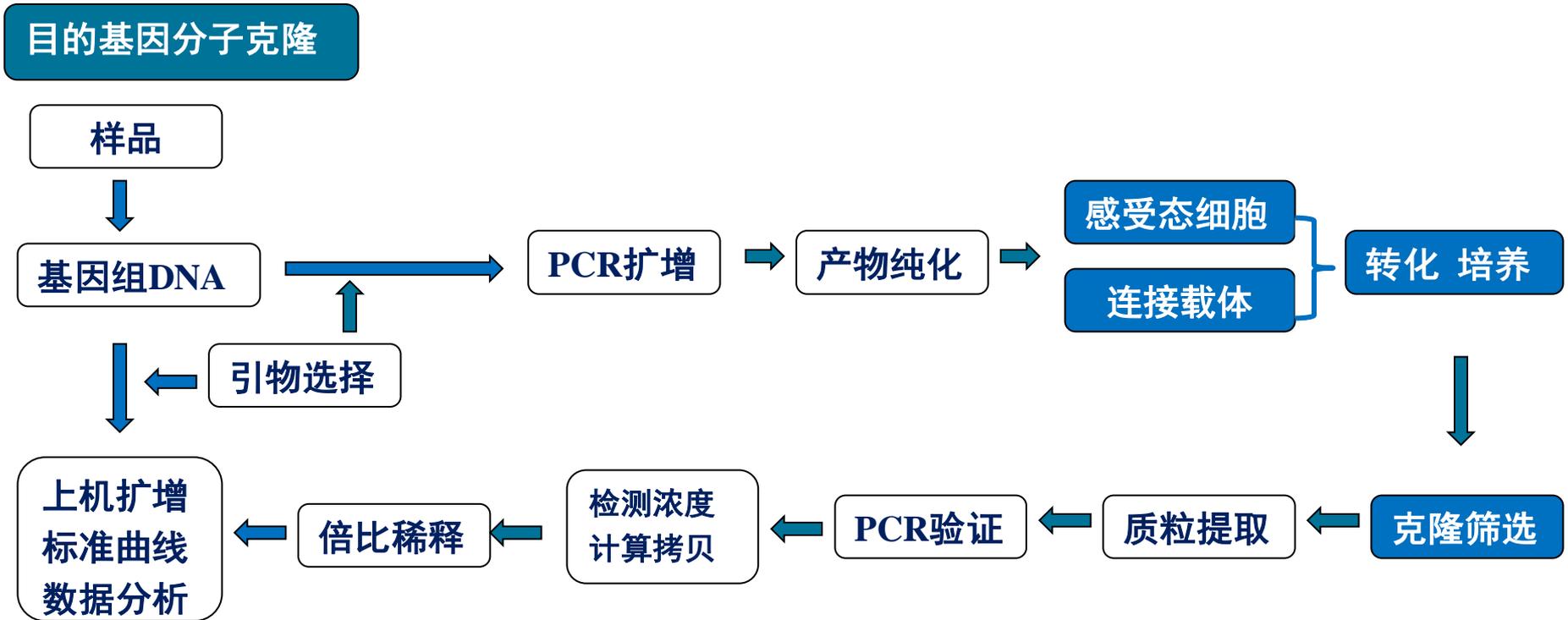
受体细胞

转化、筛选和鉴定阳性克隆



含重组子的阳性克隆

标准品制备



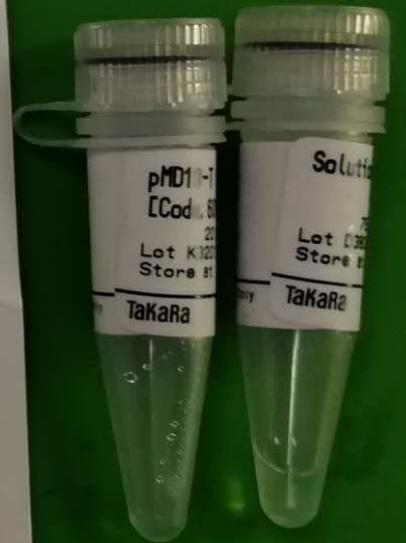
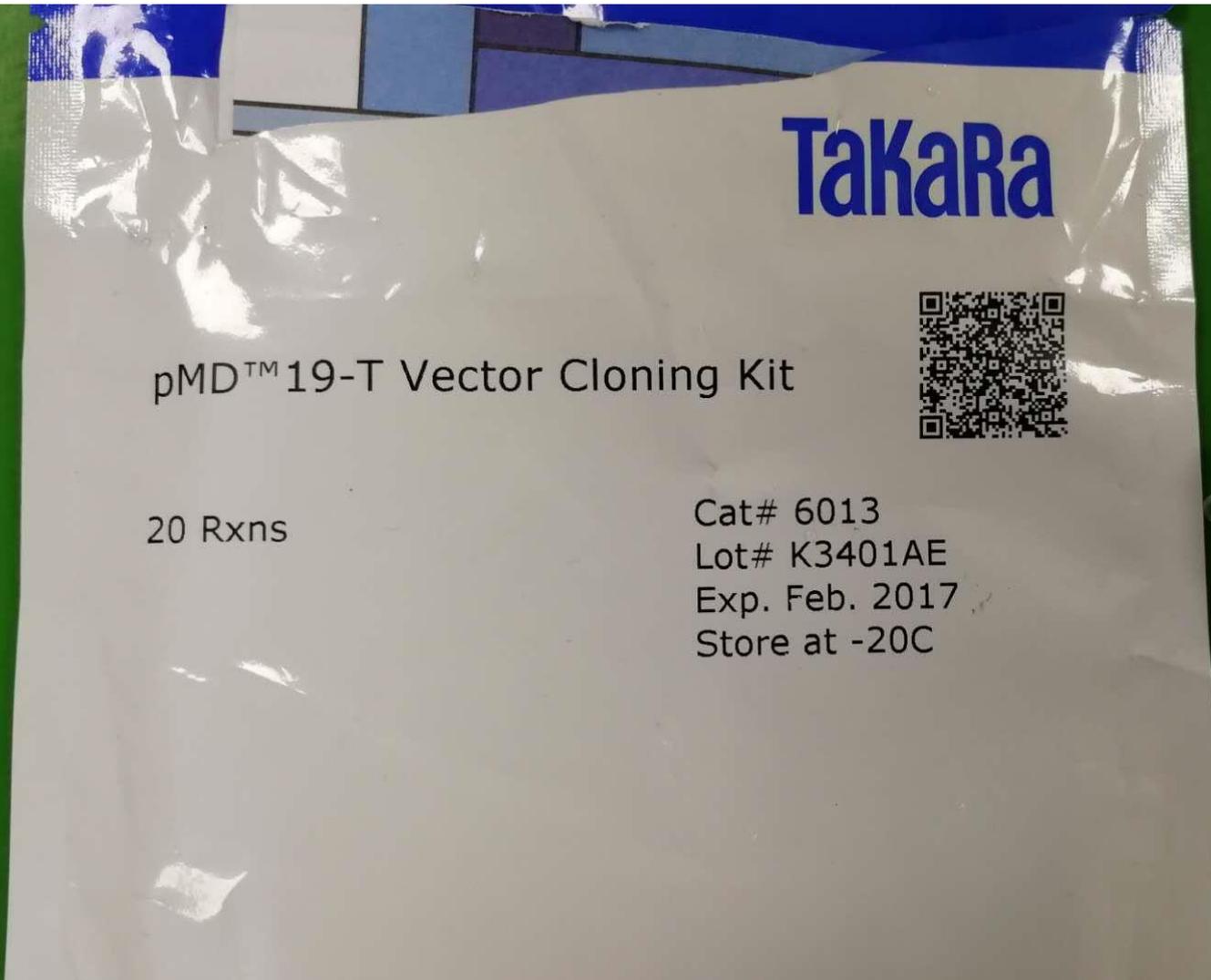
分子克隆所需材料

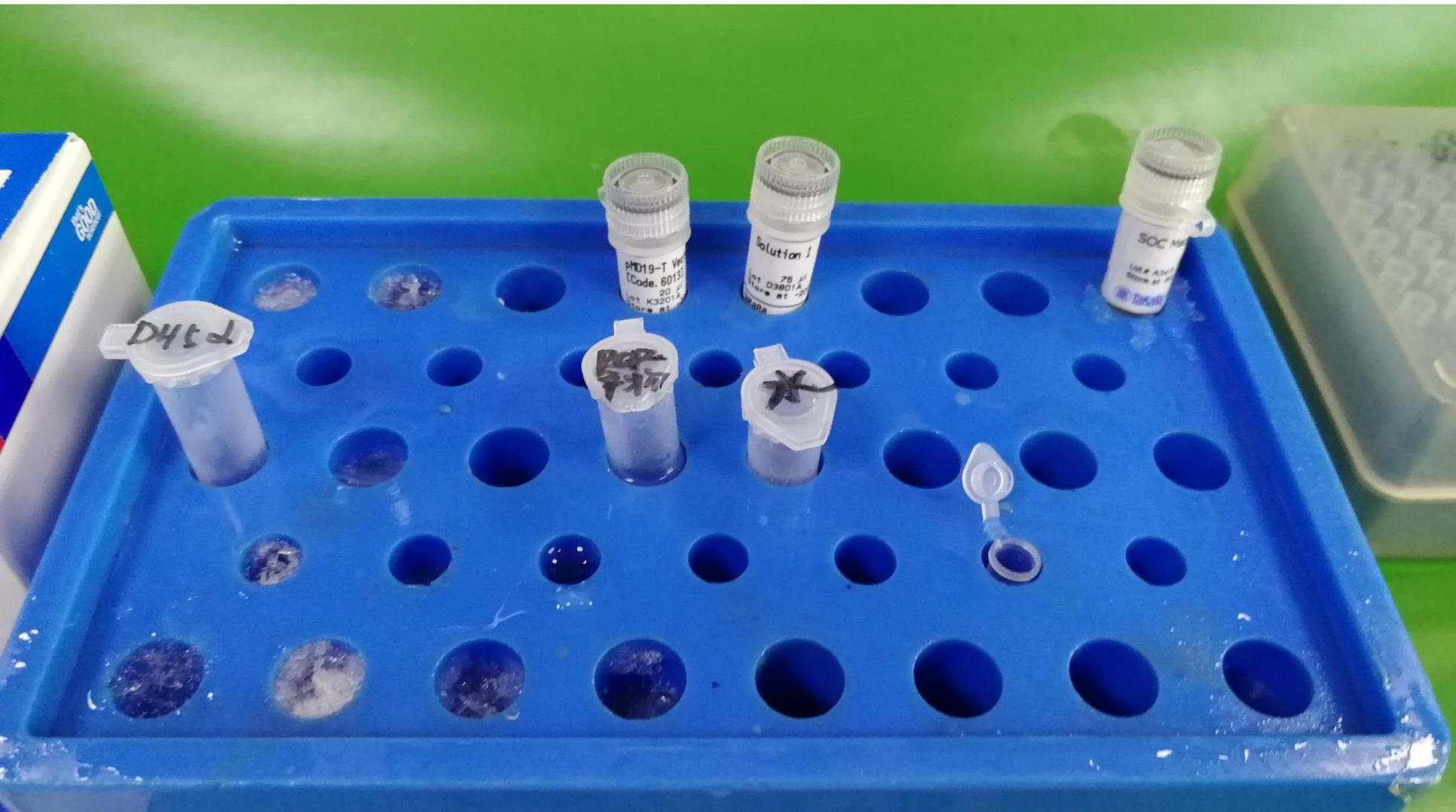


感受态细胞



载体质粒





分子克隆的详细操作步骤

DNA片段的克隆步骤：

1.在微量离心管(PCR管)中配制下列DNA溶液，全量为 5 μL 。

试剂	使用量
pMD19-T Vector	1 μL
Insert DNA	1-3 μL
dH ₂ O	Up to 5 μL

2.加入5 μL (等量)的Solution I.

3.16 $^{\circ}\text{C}$ 反应30分钟。

4.全量(10 μL)加入至100 μL DH5 α 感受态细胞中，冰中放置30分钟。(感受态细胞在冰上解冻)

5.42 $^{\circ}\text{C}$ 加热45s后，再在冰中放置1分钟

6.加入890 μL LB液体培养基，37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养60分钟。

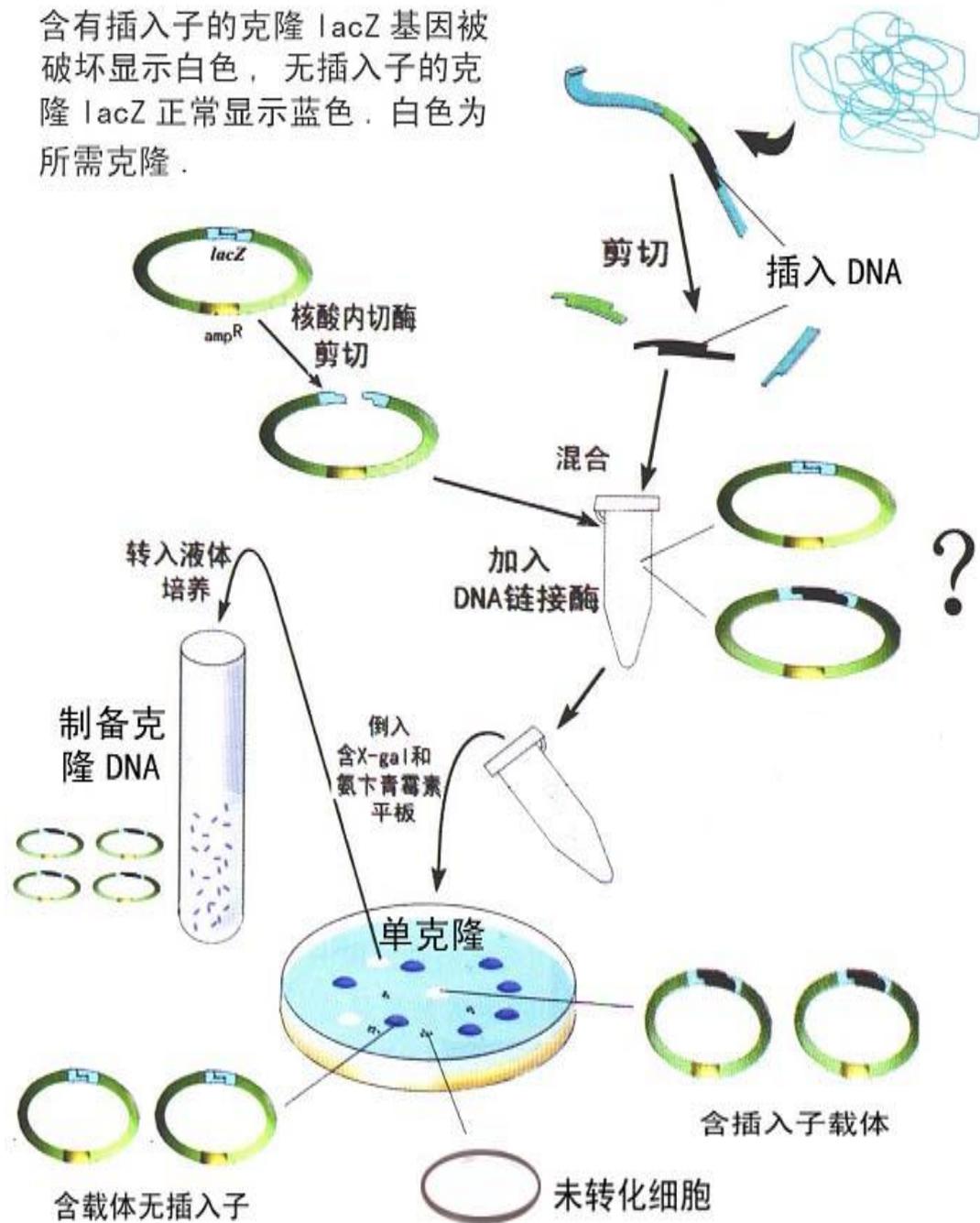
7.在含有X-Gal, IPTG, Amp的LB平板培养基上培养12-24h。

8.挑选白色单菌落，放入LB液体培养基，培养12h

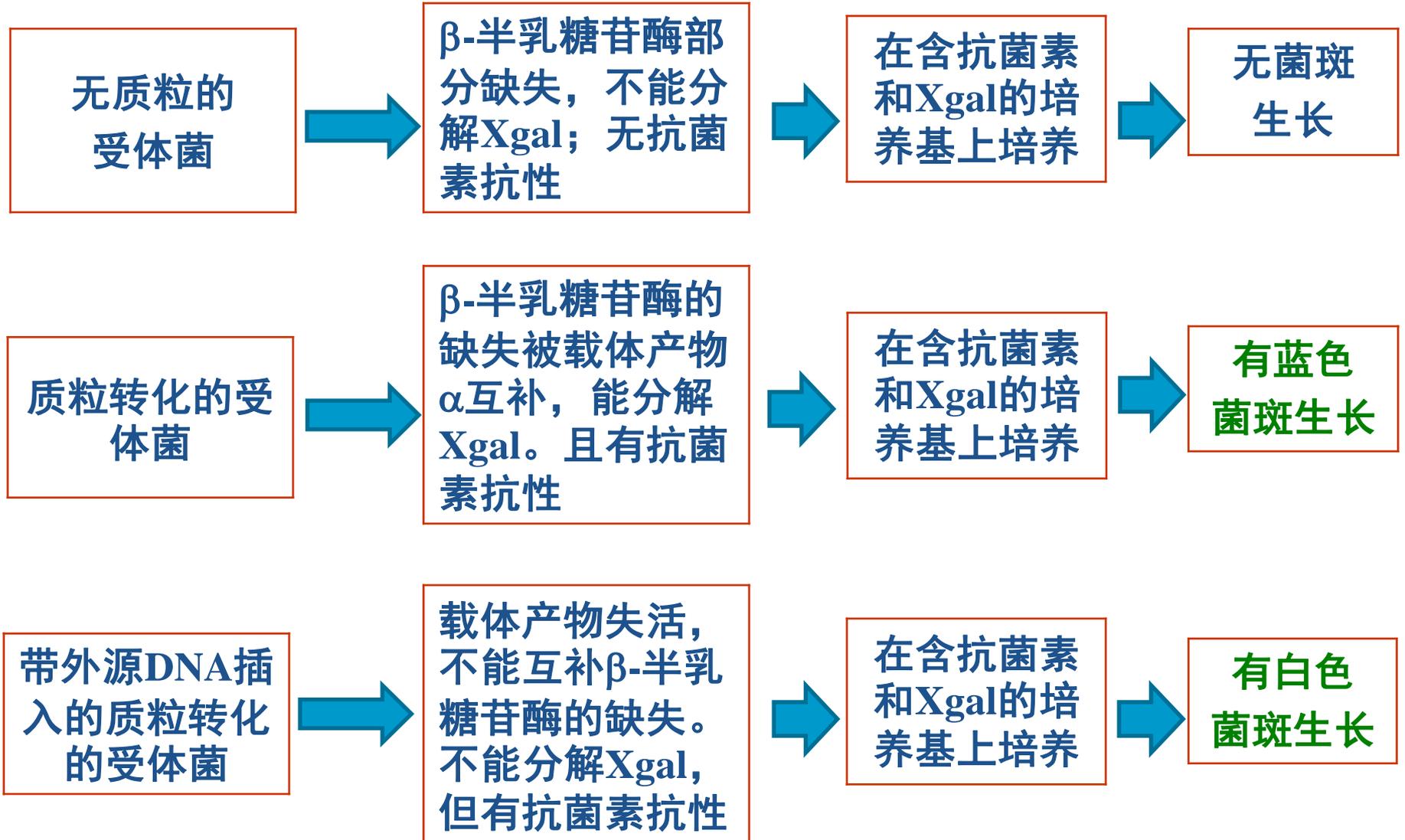
蓝白斑筛选平板



含有插入子的克隆 lacZ 基因被破坏显示白色，无插入子的克隆 lacZ 正常显示蓝色。白色为所需克隆。

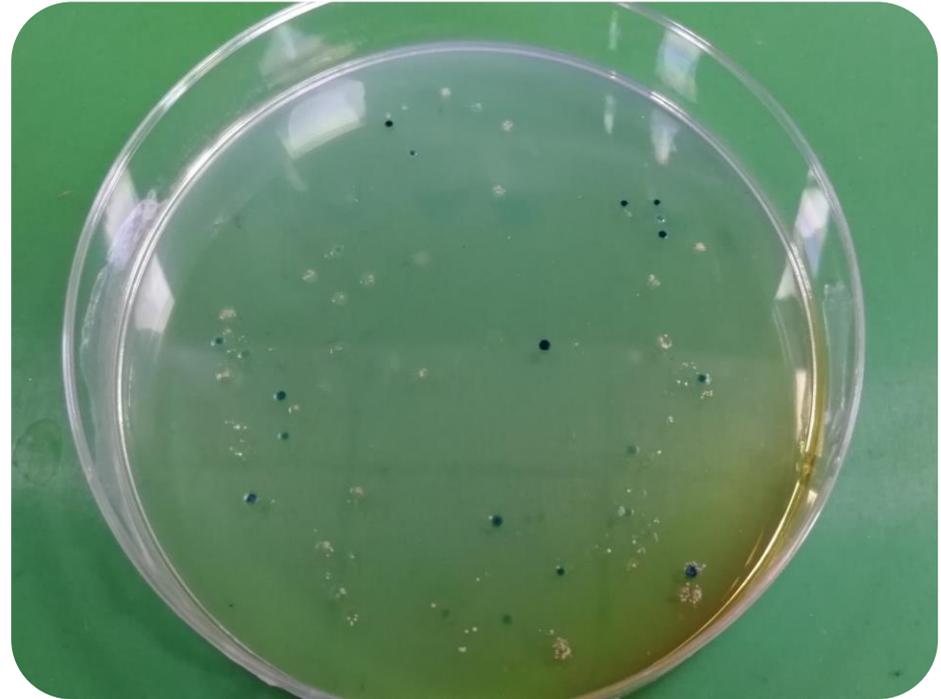


阳性重组克隆的筛选

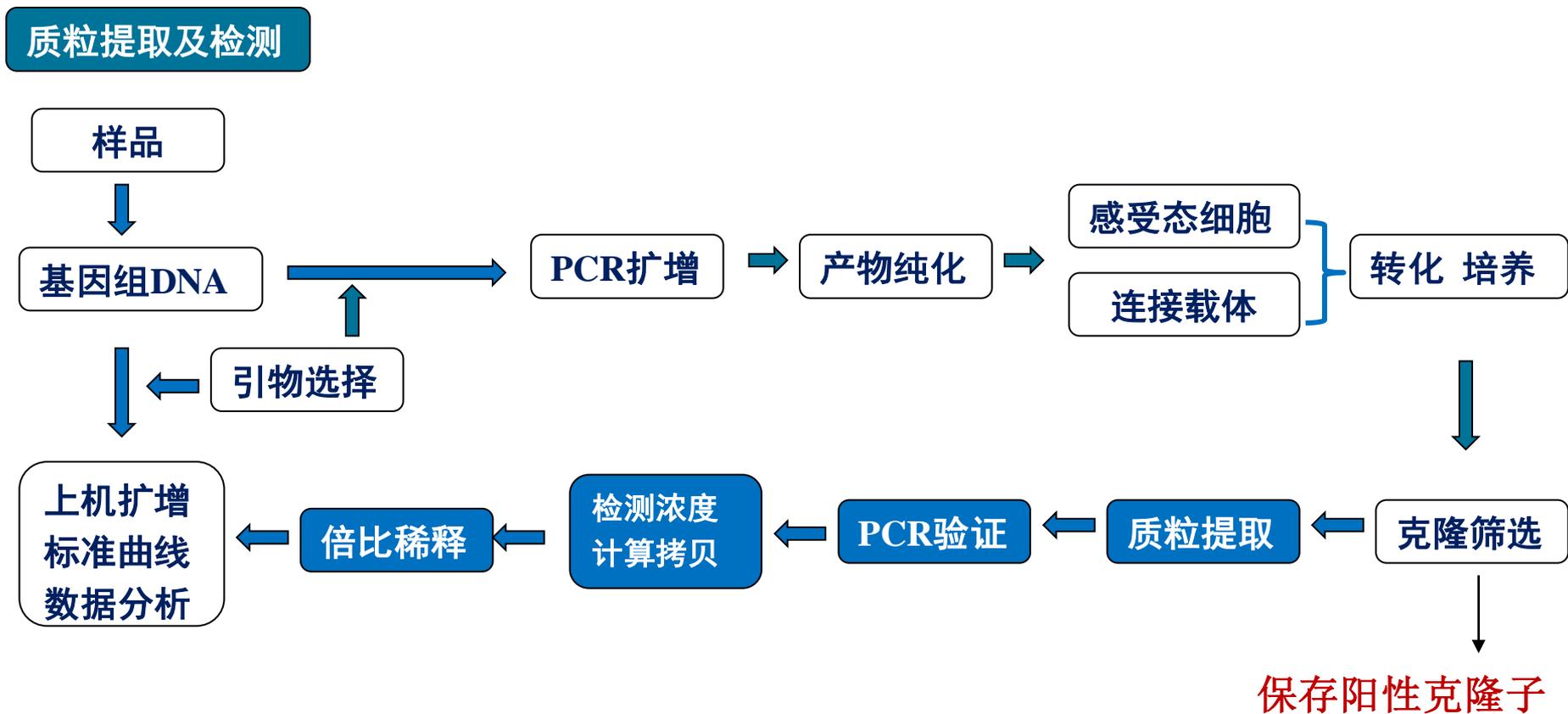


蓝白斑筛选平板

含X-Gal, IPTG, Amp的LB培养基平板



标准品制备



质粒提取



CWBIO 康为世纪
 服务热线: 4006-222-350
 网址: www.cwbio.com

产品编号: 022015

PurePlasmid Mini Kit 高纯度质粒小提试剂盒

目录号: CW65005 (50 preps)
 CW6500M (200 preps)

保存条件: 室温 (15-30°C)

Component	CW65005	CW6500M
50 preps	200 preps	
Buffer P1	15 ml	60 ml
Buffer P2	15 ml	60 ml
Buffer N3	25 ml	60 ml
Buffer PB	10 ml	35 ml
Buffer PB (concentrate)	6 ml	25 ml
Buffer EB	10 ml	30 ml
RNase A (10mg/ml)	150 µl	600 µl
Spin Columns DM with Collection Tubes	50	200

操作步骤

1. 取 2-5 ml (约 10⁸ CFU) 菌液，离心 (10000g, 1min)，弃上清液，加入 100 µl 裂解液 (Buffer P1) 重悬菌体。

注意: 裂解液 (Buffer P1) 含有强效去垢剂，操作时请佩戴手套，避免接触皮肤和衣物。
2. 加入 100 µl 中和液 (Buffer P2) 中和裂解液，充分混匀。

注意: 中和液 (Buffer P2) 含有强效去垢剂，操作时请佩戴手套，避免接触皮肤和衣物。
3. 向离心管中加入 350 µl 结合液 (Buffer PB)，充分混匀。

注意: 结合液 (Buffer PB) 含有强效去垢剂，操作时请佩戴手套，避免接触皮肤和衣物。
4. 向离心管中加入 350 µl 结合液 (Buffer PB)，充分混匀。

注意: 结合液 (Buffer PB) 含有强效去垢剂，操作时请佩戴手套，避免接触皮肤和衣物。
5. 将离心管放入离心柱 (Spin Column) 中，离心 (10000g, 1min)，弃去滤液。

注意: 离心柱 (Spin Column) 含有强效去垢剂，操作时请佩戴手套，避免接触皮肤和衣物。
6. 向离心柱中加入 350 µl 结合液 (Buffer PB)，充分混匀。

注意: 结合液 (Buffer PB) 含有强效去垢剂，操作时请佩戴手套，避免接触皮肤和衣物。
7. 向离心柱中加入 350 µl 结合液 (Buffer PB)，充分混匀。

注意: 结合液 (Buffer PB) 含有强效去垢剂，操作时请佩戴手套，避免接触皮肤和衣物。
8. 将离心柱放入收集管中，离心 (10000g, 1min)，弃去滤液。

注意: 离心柱 (Spin Column) 含有强效去垢剂，操作时请佩戴手套，避免接触皮肤和衣物。

中国高通量生物试剂生产商

标准品制备

质粒提取

采用质粒试剂盒提取质粒，冷冻保存

PCR验证

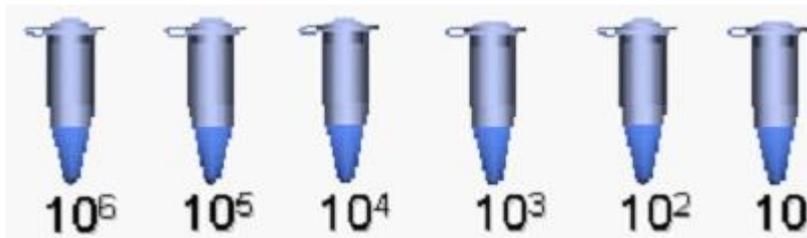
从质粒中扩增出产物，说明目的基因成功插入质粒

检测浓度 计算拷贝

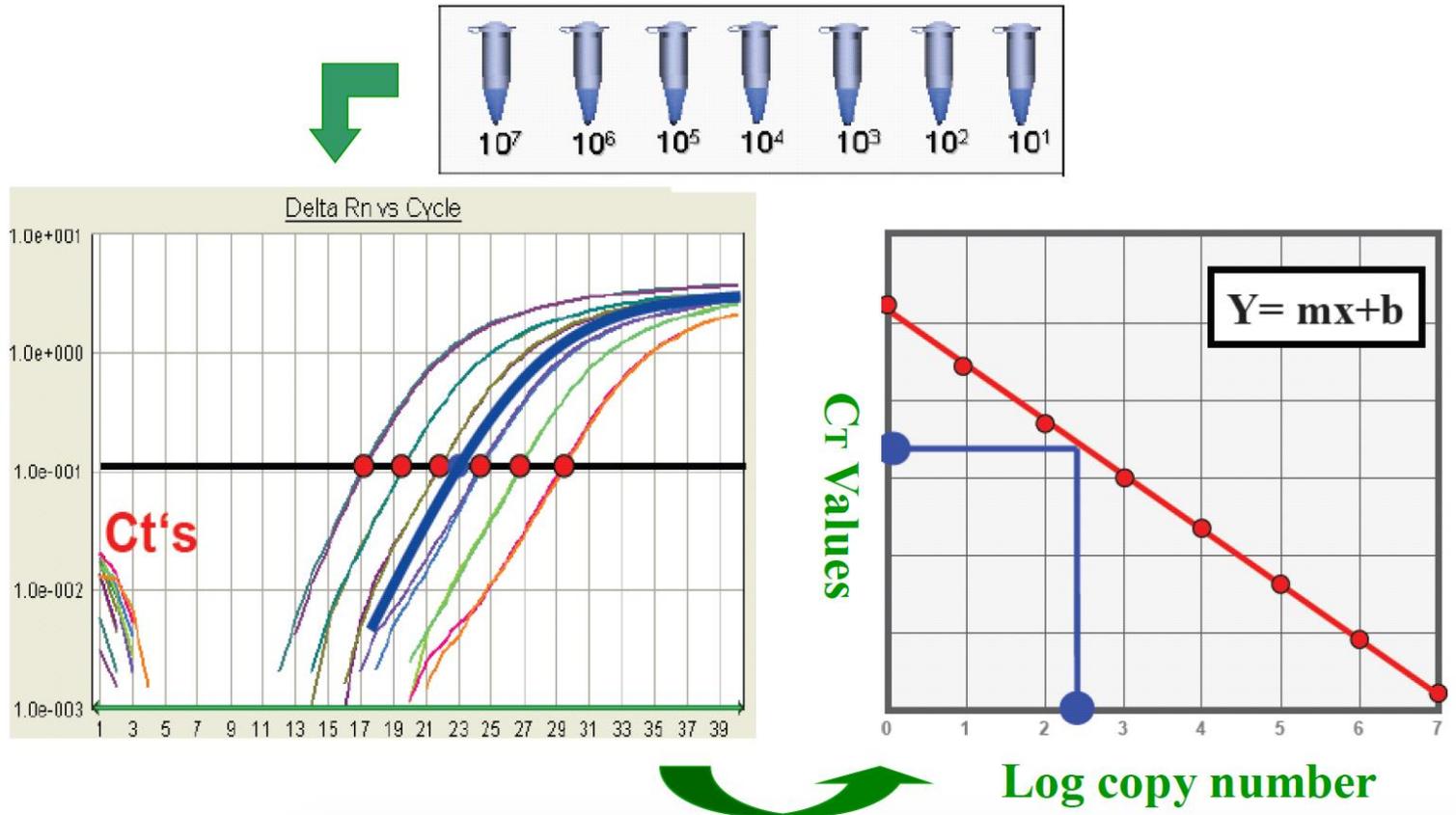
吸取 $1\mu\text{l}$ ，检测质粒浓度
计算质粒的拷贝数
(见附件：核酸拷贝数的计算)

倍比稀释

倍比稀释质粒原液，为绘制标准曲线做准备 (10^{-1} — 10^{-9})



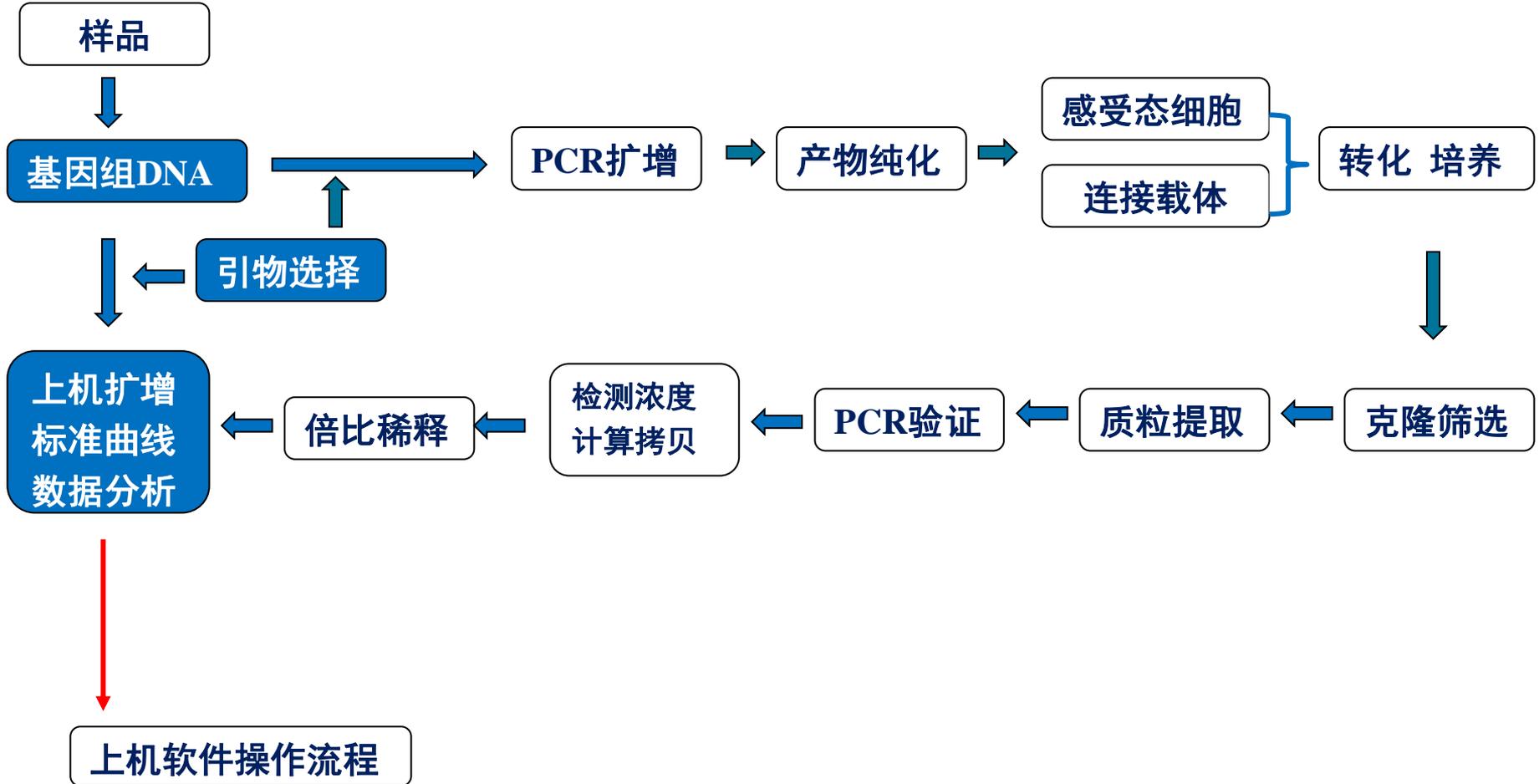
绝对定量



-- 样本起始浓度与Ct呈线性关系，根据已知拷贝的标准品作出标准曲线。

-- 根据未知样品的Ct值，推算出未知样本量。

扩增及分析



软件操作流程

控制软件操作流程及分析方法

南楼311室



收费标准

荧光定量PCR	100 元/小时	仪器使用费
	3 元/管 20 μ l	PCR kit预混液
	8 元/个	8连管
	50 元/个	提供96孔板
	60 元/个	提供384孔板
	500 元/管	提供成品质粒
普通PCR	50 元/次	仪器使用费
土壤DNA提取	60 元/个	提供试剂盒
	30 元/个	自带试剂盒
植物DNA提取	40 元/个	提供试剂盒
	30 元/个	自带试剂盒

谢谢！

