

低温对甘蓝逆境生理指标和蛋白质磷酸化的影响

吴能表^{1,2} 吴峻岩¹ 朱利泉¹ 王小佳^{1*}

(¹ 西南农业大学园艺系, 重庆 400716; ² 西南师范大学生命科学学院, 重庆 400715)

摘要: 研究表明, 低温 (5 ℃) 逆境处理 0~30 min 甘蓝体内的 MDA、脯氨酸、可溶性糖、ABA 含量和 PK 活性等指标在较短的时间内都有明显上升, 然后下降。ABA 含量和 PK 活性的峰值早于其他指标, 同时低温逆境引起的 PK 活性对 Ca^{2+} 的存在有明显的依赖性, Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 对其活性也有明显影响, 且这两种离子的影响机制可能不同。低温逆境信号引起 22.9 kD 的蛋白质磷酸化。

关键词: 甘蓝; 温度胁迫; 蛋白激酶活性; Ca^{2+}

中图分类号: S 635 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 05-0530-05

蛋白质磷酸化在对外界刺激信号传递和应答过程中起着重要的作用^[1], 几乎所有的生理和病理过程都与蛋白质的磷酸化和去磷酸化有关^[2], 因而植物体内蛋白质磷酸化和去磷酸化正在成为植物信号传导的研究热点。近年来, 有关细胞受到外界刺激后胞内钙浓度的变化^[3]和与钙有关的蛋白激酶 (Protein Kinase, PK) 的研究已有大量报道^[4,5]。但关于植物对温度胁迫信号的接受、传导及其与逆境指标的关系方面的报道还很少。作者以甘蓝 (*Brassica oleracea* L.) 为材料进行这方面的研究, 为揭示植物信号传导途径提供新的证据。

1 材料与方法

1.1 材料

采用甘蓝品种‘渝丰三号’ (重庆市渝丰科技服务部生产) 作为试验材料。2002 年 6 月 15 日将其播种于西南师范大学植物生理学试验苗圃, 7 月 15 日移栽于装满蛭石的盆钵中, 浇灌 Hgland 完全营养液。9 月 5 日将其转入在光照培养箱, 25 ℃, 光量子通量密度 $13.61 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 光照时间 12 h/d 进行预培养, 9 月 15 日将其温度迅速降为 5 ℃ 进行低温处理, 取其第 5 叶位叶片进行下述测定。

1.2 测定方法

丙二醛 (MDA) 含量采用硫代巴比妥酸 (TBA) 比色法^[6]测定; 脯氨酸 (Pro) 含量采用磺基水杨酸法^[7]测定; 可溶性糖含量采用蒽酮硫酸水合热法^[8]测定; ABA 含量按南京农业大学随药附试剂盒说明书用 DG3022A 型酶联免疫检测仪测定。

可溶性蛋白质的提取参照郑朝军等^[5]的方法略有修改: 取叶片 0.2 g, 加入液氮迅速研磨, 用预冷细胞匀浆液 (终浓度为 Tris 20 mmol L^{-1} , EDTA 2.5 mmol L^{-1} , PMSF 5 mmol L^{-1} , pH 7.2) 冰浴充分研磨, 4 ℃ 15000 $\times g$ 离心 15 min, 取上清液, 40000 $\times g$ 离心 30 min, 上清液即为酶液。蛋白质含量测定采用 Bradford 法^[9]。

PK 活性的测定参照张来群等^[4]的方法略有改动: 取粗酶液 20 μL 与反应缓冲液混合, 使终浓度为 Histon 1 mg mL^{-1} , Hepes 50 mmol L^{-1} (pH 7.2) 和表 1 所列 9 种组合之一的成分 (其中低温对 PK 活性的动态影响是按 “ ” 的离子浓度测定的), 最后加入 5 μL 终浓度 2.5 $\mu\text{mol} \text{L}^{-1}$ 的 ATP [内含 18.5 kBq (^{-32}P) ATP, (^{-32}P) ATP 的放比放射性 $> 185 \text{ TBq} \cdot \text{mmol}^{-1}$, 放射纯度 95 %, 北京福瑞生物工程公司生

收稿日期: 2002-12-13; 修回日期: 2003-02-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970516、30170646)

* 通讯作者

产) 启动反应, 30 ℃ 水浴 10 min, 冰浴终止反应。吸取 20 μL 加在用 20 % 的 TCA 和 1 % 的 NaPPi 预处理的 P81 滤纸上, 用 75 mmol L^{-1} 磷酸溶液冲洗 3 h, 中间换液 5 次, 将未反应的 (^{32}P) ATP 充分洗掉, 然后用乙醇-乙醚 (1:1) 10 mL 冲洗 2 次, 每次 5 min, 60 ℃ 烘干, 将充分干燥的 P81 滤纸片放入液闪瓶中, 加入闪烁液 (PPO 4 g, POPOP 0.5 g, 溶于 1 L 甲苯) 5 mL, 使滤纸片浸没在闪烁液底部中央, 用 FJ-2101G 双道液体闪烁计数器 (国产) 进行计数测量。磷酸化活性以 cpm μg^{-1} 蛋白表示。

可溶性蛋白的体外磷酸化反应参照郑朝军等^[5]的方法修改: 在反应体系中加入 100 μL 酶提取液, 1 μL 1 mol L^{-1} 的 MgCl_2 和 1 μL 0.1 mol L^{-1} 的 CaCl_2 于 30 ℃ 保温 1~2 min 后加入 5 μL 终浓度 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (^{32}P) ATP 启动反应, 10 min 后加入 10 μL 甘油, 25 μL 10 % 的 SDS 终止反应, 并沸水浴 5 min, 冷却后上样电泳。

SDS-PAGE 电泳参照郭尧君^[10]的方法, 用 12 % 的分离胶, 恒流 40 mA 电泳。

2 结果与分析

2.1 低温处理对甘蓝主要逆境指标的动态影响

低温处理 3 min 后, 甘蓝叶片内 MDA 含量基本没有变化, 在处理 5 min 时出现第一个峰值, 达到对照的 104.10 %, 10 min 出现低谷, 仅为对照的 86.27 %, 随后再次上升, 处理 20 min 时接近对照值, 为对照的 98.07 %, 30 min 时超过第一峰值, 为对照的 113.93 % (图 1)。

低温处理对脯氨酸含量影响很大。低温处理 3 min 时脯氨酸含量达到对照的 3.6 倍, 处理 5 min 达到对照的 23 倍之多, 10 min 时又有较大幅度下降, 但仍达到对照的 14.79 倍, 处理 15 和 20 min 时分别只有对照的 89.74 % 和 84.62 %, 处理 30 min 时又有一定上升。

处理 3 min 和 5 min 后, 可溶性糖含量增加, 5 min 时达到第一个峰值, 为对照的 125.00 %, 10 min 时迅速下降, 为对照的 92.68 %; 而 20 和 30 min 逐渐上升, 分别达到对照的 103.73 % 和 134.52 %。

ABA 含量变化规律与前面的指标基本一致。它的第一个峰值 3 min 出现, 为对照的 148.43 %, 且早于上述各指标峰值出现时间, 随后略有下降, 5 min 时为对照的 132.68 %, 10 min 时又上升, 呈第二个峰, 为对照的 177.95 %, 此后变幅较小, 30 min 时几乎与对照一致。

2.2 低温处理对 PK 活性的影响

从图 2 可以看出, 低温处理 3 min 时甘蓝提取液的 PK 活性达到第一个峰值, 比对照高出 1 倍, 5 min 时又有较大幅度的下降, 但仍高于对照, 随后又上升, 15 min 时达到第二峰值, 但第二峰值明显低于第一峰值, 20 min 时又下降, 30 min 又有较大上升。

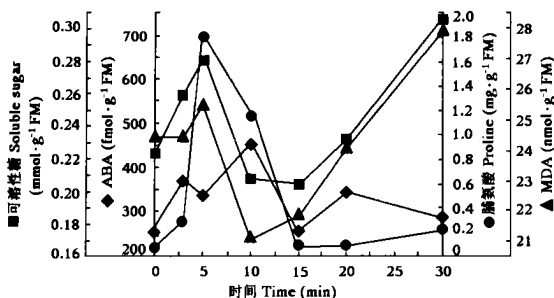


图 1 低温条件下甘蓝部分生理指标的动态变化

Fig. 1 The dynamic changes in physiological index of *Brassica oleracea* L. at low temperature

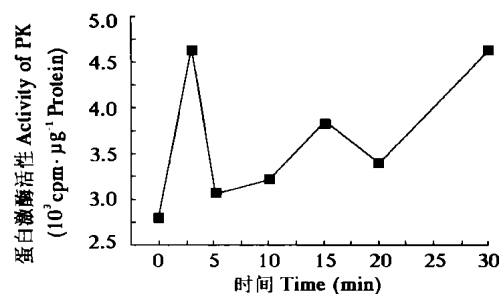


图 2 低温条件下甘蓝 PK 活性的动态变化

Fig. 2 The dynamic changes of PK activity of *Brassica oleracea* L. at low temperature

2.3 Ca^{2+} 、 Ca^{2+} 抑制剂及 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 对 PK 活性的影响

上述结果表明, 低温处理 3 min 时 PK 活性较高, 为探讨不同二价金属离子对激酶活性的影响,

取处理 3 min 的甘蓝叶片的蛋白酶提取液, 进行体外磷酸化反应, 在其中分别加入 CAM、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、不同浓度 Ca^{2+} 及钙离子螯合剂——EGTA 进行处理, 以 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{CaCl}_2 + 10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{MgCl}_2$ 的活性为 100%, 其他测定值与之比较, 得到相对活性值。结果表明, 多个处理相互之间存在极显著差异 (表 1)。

2.3.1 Ca^{2+} 钙离子对 PK 活性的影响

在反应体系不变 (表 1 中) 的情况下, 外加钙离子螯合剂 EGTA 对低温下 PK 活性有极显著的影响, 其活性只有对照的 29.75% (表 1 中)。为了解这种活性下降是否由 EGTA 的直接作用引起, 作者设计了不加 Ca^{2+} 的验证 (即表 1 中), PK 活性也大大降低, 仅为对照的 57.38%。但此活性仍高于加入 EGTA 者, 可能是酶液中本身含有一定浓度的 Ca^{2+} 。当对照体系中加入 $6\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CAM 后其磷酸化活性几乎没有变化, 其活性是对照的 97.65%, 说明 CAM 不能激活 PK 的活性。

反应体系中外加不同浓度的 Ca^{2+} , 结果发现, $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为最佳浓度, 不加钙或当 Ca^{2+} 浓度超过 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, PK 活性降低。说明该激酶对钙离子浓度非常敏感。

2.3.2 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 对 PK 活性的影响

当在对照体系中加入 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{MnCl}_2$ 时, PK 活性比对照高出 7.80%, 而除去 Mg^{2+} , 代以 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{MnCl}_2$ (表 1 中) 时, 其活性为对照的 81.26%, 说明 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 对于增强 PK 活性皆是必需的。

2.4 磷酸化蛋白的分离

SDS-PAGE 结果如图 3 所示, 低温处理 5 min 和 10 min 都清晰地出现了分子量为 22.9 kD 左右的放射条带, 处理 15、20 和 30 min 也在相同的位置出现了一定亮度的放射条带, 而未加 $CaCl_2$ 的处理 (泳道 4) 和对照 (泳道 7) 几乎看不见任何条带, 说明 22.9 kD 的蛋白质条带是低温磷酸化引起的特征条带, 其磷酸化过程对 Ca^{2+} 存在明显的依赖性。从不同处理时间看来, 随着低温处理时间的延长磷蛋白的含量降低, 这可能是由于体内磷酸酶活性增加, 磷蛋白水解加剧所致。

3 讨论

甘蓝体内 ABA、脯氨酸、可溶性糖、可溶性蛋白含量和 PK 活性变化是在较短的时间内完成, 体内快速的生理变化, 有利于对环境的适应, 避免生理反应过分滞后造成的伤害。蛋白质磷酸化的发生与其对逆境的适应而进行自体调节有关, 这些生理效应的表现都源于蛋白激酶的激活, 而蛋白激酶的激活又依赖于 Ca^{2+} 的存在^[11]。大量研究证明胞内 Ca^{2+} 起着传递和放大信号的作用^[12], 在植物细胞中

表 1 不同离子对低温引起的甘蓝 PK 活性的影响

Table 1 Effects of ions on the activity of protein kinase in *Brassica oleracea* L. at low temperature

外加离子及浓度 Ion and concentration ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	平均活性 Average activity (cpm μg^{-1})
1 $\text{CaCl}_2 + 10\text{ MgCl}_2 + 10\text{ MnCl}_2$	5010 (107.80%) A
1 $\text{CaCl}_2 + 10\text{ MgCl}_2$	4648 (100%) B
1 $\text{CaCl}_2 + 10\text{ MgCl}_2 + 0.006\text{ CAM}$	4539 (97.65%) C
2 $\text{CaCl}_2 + 10\text{ MgCl}_2$	4259 (91.63%) D
5 $\text{CaCl}_2 + 10\text{ MgCl}_2$	3948 (84.94%) E
1 $\text{CaCl}_2 + 10\text{ MnCl}_2$	3777 (81.26%) F
10 $\text{CaCl}_2 + 10\text{ MgCl}_2$	2885 (62.07%) G
10 MgCl_2	2667 (57.38%) H
1 $\text{CaCl}_2 + 10\text{ MgCl}_2 + 2\text{ EGTA}$	1383 (29.75%) I

注: A, B, C, D, E, F, G, H, I 为 1% 显著差异。

Note: A, B, C, D, E, F, G, H, I represent significant difference at 1% level.

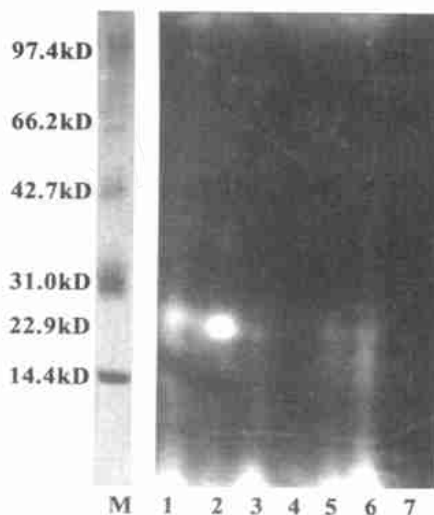


图 3 低温胁迫甘蓝磷酸化蛋白 SDS-PAGE 的放射自显影图谱

1. 5 min; 2. 10 min; 3. 15 min; 4. 15 min, 未加 CaCl_2 ;
5. 20 min; 6. 30 min; 7. 对照 Control。

Fig. 3 Autoradiogram of SDS-PAGE of phospholabeled protein in *Brassica oleracea* L. at low temperature stress

存在有依赖 Ca^{2+} 的 PK, 它的活性是催化蛋白质发生磷酸化, 缺乏 Ca^{2+} 或 Ca^{2+} 不足时就会影响酶的活性, 从而降低磷酸化蛋白的量, 植物的信号传导受阻。

可溶性糖、可溶性蛋白质和游离脯氨酸是植物细胞内重要的渗透调节物质, 它们能够增加胞内溶质浓度, 降低细胞的冰点, 防止细胞过度脱水, 从而减少低温对细胞的伤害^[13]。胁迫下植物体内可溶性糖含量和游离脯氨酸含量与植物抗寒性之间存在相关性^[14]。本研究结果也证明了植物对低温的适应机制是通过提高胞内小分子物质浓度来实现的。MDA 是植物细胞膜脂过氧化产物之一, 能强烈地与细胞内的各种物质发生反应, 因而引起对酶和膜的严重损伤^[15], 在正常生长的植株体内含量较低, 当植株处于不良环境时, 会因不良环境的恶劣程度引起 MDA 含量的相应上升。本研究中 MDA 含量增加的幅度并不大, 可能与低温条件下体内糖分增加和氨基酸含量上升干扰了 MDA 的测定有关^[16]。植物在温度胁迫下内源激素 ABA 水平发生变化^[17], ABA 作为一种应急激素, 可通过保护膜结构, 维护膜功能^[18], 和启动抗寒基因^[19]而提高植物抗低温的能力。有研究表明, 植物在经低温诱导增强抗寒性的同时体内 ABA 水平明显增加, 而不能合成 ABA 的变种拟南芥低温处理不能产生抗寒性^[20]。从本文研究来看, 植物通过低温处理后 ABA 含量迅速升高, 从而引发一系列的体内反应, 提高甘蓝的低温适应能力, 而蛋白质磷酸化过程可能参与了 ABA 的生物合成^[21]。

Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、EGTA 都对 PK 活性有极显著影响。不同钙水平下 PK 活性差异极大, 该激酶能被 Ca^{2+} 激活, 以 $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ 为最佳效果。 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 分别都能提高激酶活性, 但它们的激活效果有差异, 在体系内同时加入这两种离子的效果大于单独作用的效果, 但小于两者分别之和, 说明这两种离子的作用机制是不同的, 它们之间不能相互取代, 这与李翠凤等^[22]的研究结果一致。 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 的作用很可能是作为 PK 的活化剂而调节酶的活性, 这有待进一步研究。EGTA 作为钙离子螯合剂能够通过降低反应体系的 Ca^{2+} 浓度, 从而降低 PK 的活性。CAM 对此 PK 活性影响并不明显。综上所述, 说明此激酶是一种对 Ca^{2+} 具有明显的依赖性, 但对 CAM 并不依赖的激酶, 有可能是一种 CDPK (calcium-dependent protein kinase)。

参考文献:

- 1 郭艳林. 植物体内蛋白质磷酸化及其在信号传递中的作用. 植物生理学通讯, 1991, 27 (5): 385 ~ 390
- 2 孙大业, 郭艳林, 马力耕, 等. 细胞信号传导. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2001. 136 ~ 157
- 3 Bush D S. Regulation of cytosolic calcium in plants. Plant Physiol., 1993, 103: 7 ~ 13
- 4 张来群, 李 芳, 孙大业. 细胞外钙调素对烟草悬浮培养细胞蛋白质磷酸化作用的影响. 植物生理学报, 2001, 27 (3): 201 ~ 206
- 5 郑朝军, 余叔文. 大豆下胚轴可溶性蛋白中钙激活的蛋白激酶. 植物学报, 1995, 37 (10): 770 ~ 775
- 6 赵世杰, 许长成, 邹 琦, 等. 植物组织中丙二醛测定方法的改进. 植物生理学通讯, 1994, 30 (3): 207 ~ 210
- 7 张殿忠, 汪沛洪, 赵会贤. 测定小麦叶片游离脯氨酸的方法. 植物生理学通讯, 1990, 26 (4): 62 ~ 65
- 8 林炎坤. 常用的几种蒽酮比色定糖法的比较和测定. 植物生理学通讯, 1989, 25 (4): 53 ~ 55
- 9 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analyt Biochem., 1976, 72: 248 ~ 254
- 10 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学技术出版社, 1999. 123 ~ 160
- 11 马力耕, 徐小冬, 崔素娟, 等. 肌醇磷脂信号途径参与胞外钙调素启动花粉萌发和花粉管伸长. 植物生理学报, 1998, 24 (2): 196 ~ 200
- 12 Bush D S. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mbl. Biol., 1995, 46: 95 ~ 112
- 13 刘祖祺, 张石城. 植物抗性生理学. 北京: 中国农业出版社, 1994. 8 ~ 83
- 14 王富荣. 植物抗寒指标的种类及其应用. 植物生理学通讯, 1987, 23 (3): 49 ~ 55
- 15 陈少裕. 膜脂过氧化对植物的伤害. 植物生理学通讯, 1991, 27 (2): 84 ~ 91
- 16 陈 贵, 胡文玉, 谢甫绂, 等. 提取植物体内 MDA 的溶剂及 MDA 作为衰老指标探讨. 植物生理学通讯, 1991, 27 (1): 44 ~ 46
- 17 Samy B, Arnon R, Richmond A F. The role of abscisic acid in gross-adaptation of tobacco plants. Plant Physiol., 1975, 56: 337 ~ 339
- 18 郭 确, 潘瑞炽. ABA 对水稻抗冷性的影响. 植物生理学报, 1984, 10 (4): 295 ~ 303
- 19 Rikin A, Atsmon D, Gitter C. Chilling injury in cotton: Prevention of abscisic acid. Plant Physiol., 1979, 20: 1537 ~ 1546

- 20 苏维埃. 植物对温度逆境的适应. 见: 余叔文, 汤章城. 植物生理与分子生物学. 第2版. 北京: 科学出版社, 1998. 721~738
- 21 杨洪强, 接玉玲. 高等植物脱落酸生物合成及其信号传导研究进展. 华中农业大学学报, 2001, 20 (1): 92~98
- 22 李翠凤, 凌启阁, 王 军, 等. 钙/钙调素依赖性蛋白激酶对 17.7 kD 和 6 kD 胰腺蛋白的磷酸化. 生物化学杂志, 1994, 10 (2): 185~190

Effects of Low Temperature Stress on Physiological Index and Protein Phosphorylation in *Brassica oleracea* L.

Wu Nengbiao^{1,2}, Wu Junyan¹, Zhu Liquan¹, and Wang Xiaojia¹

(¹ Horticulure Department, South-West Agriculture University, Chongqing 400716, China; ² School of Life Science, South-West Normal University, Chongqing 400715, China)

Abstract: The contents of MDA, proline, soluble sugar, ABA, and the activity of PK in *Brassica oleracea* L. rose remarkably in a short time at 5 °C, then went down. And the peak of ABA content and the PK activity were prior to other indexes. Low temperature, first of all, caused the activity of PK and the content of endogenesis ABA increase through some signal matter. Then, activated or prohibited some genes expressing, and at last it caused the content of other matter rising remarkably. The activity of PK had an apparently reliance on Ca^{2+} , Mn^{2+} and Mg^{2+} had obvious effect on the PK activity, too. The mechanism of the two ions to PK might be different. A kind of phosphoprotein (22.9 kD) caused by low temperature stress was separated.

Key words: *Brassica oleracea* L.; Temperature stress; The activity of PK; Ca^{2+}

欢迎购阅下列新书

- | | | |
|------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| 1- 1 《英汉生物学词汇》(第二版) 99 元 | 1- 26 《蛋白质纯化与鉴定实验指南》(译) 52 元 | 1- 52 《分子克隆实验指南》(第三版) 187 元 |
| 1- 2 《英汉/汉英生物化学词汇》30 元 | 1- 27 《实用分子生物学方法手册》32 元 | 1- 53 《生物信息学: 序列与基因组分析》82 元 |
| 1- 3 《拉汉英农业害虫名称》90 元 | 1- 31 《被子植物有性生殖图谱》96 元 | 1- 54 《生物化学技术原理及应用》(第三版) 45 元 |
| 1- 7 《PCR 技术实验指南》(译) 110 元 | 1- 32 《基因工程原理》(第二版) 上册 58 元 | 1- 55 《基因工程》49 元 |
| 1- 8 《植物生理与分子生物学》94 元 | 1- 33 《基因工程原理》(第二版) 下册 78 元 | 1- 56 《分子生物学》89 元 |
| 1- 9 《汉英生物学词汇》106 元 | 1- 34 《基因及其表达》24 元 | 1- 57 《微注射和转基因实验指南》66 元 |
| 1- 10 《新英汉病毒学词典》36 元 | 1- 38 《植物生殖遗传学》30 元 | 1- 58 《真核生物转录调控——概念、策略和方法》86 元 |
| 1- 11 《蛋白质结构分析》(译) 46 元 | 1- 39 《蛋白质技术手册》33 元 | 1- 59 《DNA 与 RNA 基本操作技术》52 元 |
| 1- 12 《生物化学制备技术》39 元 | 1- 41 《英汉生物化学及分子生物学词典》88 元 | 1- 60 《蛋白质组学: 从序列到功能》50 元 |
| 1- 13 《蛋白质电泳实验技术》29 元 | 1- 42 《生物技术概论》23 元 | 1- 62 《植物基因工程》(第2版) 97 元 |
| 1- 14 《分子遗传学》70 元 | 1- 43 《分子细胞生物学》78 元 | 1- 63 《基因组》55 元 |
| 1- 17 《植物分子遗传学》(第二版) 88 元 | 1- 44 《现代遗传学原理》77 元 | 1- 64 《植物数量性状遗传体系》57 元 |
| 1- 22 《英汉化学化工词汇》(第四版) 110 元 | 1- 45 《分子克隆实验指南》(第三版英文原版) 1300 元 | 1- 65 《体外培养的原理与技术》165 元 |
| 1- 24 《精编分子生物学实验指南》(译) 123 元 | 1- 48 《细胞信号转导》(第三版) 55 元 | |
| 1- 25 《植物分子生物学实验指南》(译) 52 元 | 1- 50 《细胞实验指南》(译)(上、下) 244 元 | |
| | 1- 51 《拉汉英种子植物名称》(第3版) 134 元 | |

以上价格已含邮资。购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号《园艺学报》编辑部, 邮编: 100081。