

耐热 DNA 连接酶介导的 TLCR 技术在简化 DNA 重组实验中的应用

周翔达, 宋晓, 怀聪, 孙海燕, 陈红岩, 卢大儒

复旦大学生命科学学院, 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433

摘要: 传统的 DNA 重组方法 Type II 型限制酶技术受到片段纯化的限制, 无法做到复杂混合体系中 DNA 片段的特异性连接。为解决这个问题, 本研究将耐热连接酶链式反应(Thermostable ligase chain reaction, TLCR)引入 DNA 片段的连接与捕获。该技术利用耐热型 DNA 连接酶的特性, 在热循环反应中配合针对目的片段末端序列设计的单链寡核苷酸连接模板——Helper, 实现目的片段的特异性连接和产物数量的指数性增长。两个质粒构建实验被用于验证 TLCR 技术的可行性和应用效果。首先利用 TLCR 技术从一个未经纯化的含有 7 种不同大小片段的混杂体系中特异性地将一段 1.5 kb 的片段捕获进载体, 随机抽取的克隆样品经检验准确率达到 80%, 验证 TLCR 技术在复杂混合体系中特异性连接 DNA 片段的可行性和准确性。在另一个质粒构建实验中, TLCR 技术从 λ 噬菌体基因组 Hind III 消化物中将两段总长达 27 kb 的片段按顺序捕获进载体, 随机抽取的克隆样品经检验同样达到了 80% 的准确率。结果表明, TLCR 技术能够简化 DNA 重组实验的操作, 并且适用于多片段和大片段的连接, 可以为生物学研究提供便利。

关键词: DNA 片段连接; 耐热型连接酶; Helper; DNA 片段捕获; 复杂混合体系

The applications of thermostable ligase chain reaction in facilitating DNA recombination

Xiangda Zhou, Xiao Song, Cong Huai, Haiyan Sun, Hongyan Chen, Daru Lu

State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract: The traditional Type II restriction enzyme-based method is restricted by the purification steps, and therefore, cannot be applied to specific DNA assembly in chaotic system. To solve this problem, Thermostable Ligase Chain Reaction (TLCR) was introduced in the process of DNA assembly and capture. This technique combines the feature of thermostable DNA ligase and sequence specific oligo ligation template, “Helper”, to achieve specific assembly of target fragments and exponential increase of products in multiple thermocyclings. Two plasmid construction experiments were carried out in order to test the feasibility and practical performance of TLCR. One was that, TLCR

收稿日期: 2015-10-10; 修回日期: 2015-12-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81170786, 81372235, 31571371)和上海市教委项目(编号: 14ZZ008)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81170786, 81372235, 31571371) and Shanghai Education Commission Project (No.14ZZ008)]

作者简介: 周翔达, 硕士研究生, 专业方向: 分子遗传学。E-mail: 11210700078@fudan.edu.cn

通讯作者: 卢大儒, 博士, 教授, 研究方向: 遗传学。E-mail: drlu@fudan.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.15-428

网络出版时间: 2016/1/5 16:42:31

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160105.1642.004.html>

was used to specifically capture a 1.5 kb fragment into vector from an unpurified chaotic system which contained 7 different sizes of fragments. The results showed that the capturing accuracy was around 80%, which proved the feasibility and accuracy of using TLCR to specific assembly of DNA fragments in a complicated mixed system. In the other experiment, TLCR was used to capture two fragments (total length was 27 kb) from *Hind* digestion of Lambda genome into vector by order. The results also showed an accuracy of around 80%. As demonstrated in the results, TLCR can simplify the process of DNA recombination experiments and is suitable for the assembly of multiple and large DNA fragments. This technique can provide convenience to biological experiments.

Keywords: DNA ligation; thermostable ligase; Helper; DNA capture; chaotic system

DNA 片段的连接一直是生物科学领域一项非常重要的操作技术,无论是对基因功能的研究、启动子和外显子研究、基因操作、蛋白质工程以及新兴的合成生物学来说都是必不可少的基础技术之一^[1~3]。目前应用最为广泛的就是经典的“酶切—连接”法,即 Type II 型限制酶技术^[4],包括 BioBricks、BglBricks 以及 Golden Gate 等,是大部分实验室质粒构建时的首选方案^[5~7]。但在实际操作中,酶切处理后的片段须经过纯化步骤才能使用,而一些情况会让纯化变得困难:如存在同回收目的片段相似大小的非目的片段难以通过割胶分离;片段的浓度长度不在回收试剂盒的有效回收范围内等。纯化前先进行 PCR 富集虽然可以解决片段浓度和分离的问题,但 PCR 反应在聚合长度超过 10 kb 之后,即便是高保真聚合酶也都会出现较高几率的碱基错配,这种错配可能会给一些基因功能研究带来麻烦^[1,8]。此外,当参与反应的片段是平末端的时候,除了连接效率很低,片段的插入方向和插入数量也都无法控制^[1,9]。所以传统的 Type II 型限制酶技术很难适用于复杂混合体系中 DNA 片段的特异性连接和捕获。其他一些不依赖限制酶的技术如 Ligation-independent cloning(LIC),其参与反应的片段也必须经 PCR 扩增后通过纯化步骤获得^[10~15]。

受连接酶链反应(Ligase chain reaction, LCR)的启发,本研究找到一种快速简便地实现在复杂混合体系中 DNA 片段的连接和捕获的方法—耐热连接酶链式反应(Thermostable ligase chain reaction, TLCR)。LCR 是一种 DNA 体外扩增和检测技术,主要用于突变基因的病理学诊断^[16,17]。TLCR 则是把 LCR 的原理反过来应用于 DNA 片段的链接。图 1 展示了 TLCR 技术的反应原理:当要连接两段 DNA 片段时,

首先设计订购一段 Oligo,它与两个待连接片段各有 15~30 bp 的序列完全互补,本研究中称之为 Helper。Helper 被设计为单链,在反应中只能捕获目标片段中与其互补的两条单链,当 Helper 捕获到的两条单链紧密相临时, *Taq* DNA 连接酶会催化两个单链的连接,这一原理保证了连接的方向、顺序和序列特异性。在热循环反应中,当一条 Helper 在一次热循环中完成一对单链的连接后,在下一轮热循环中该 Helper 则同连接完成的单链脱离,继续去完成另外两条单链的连接;而在上一轮热循环中被连接的单链,则在下一轮热循环中成为了新的连接模板结合其他未被连接的单链从而生成完整的产物,以此类推,形成一个链式连接反应,实现连接产物的指数型增长。

本研究中设计了两个质粒构建实验,首先是利用 TLCR 技术从 pLL3.7 质粒的 *Hind* III -*Eco*R I 消化产物中直接特异性抓取 1.5 kb 的目标片段;在另外一个实验中,TLCR 技术则被用于从 λ 噬菌体基因组的 *Hind* III 消化产物中特异性地捕获两段总长为 27 kb 的片段。实验结果证明,TLCR 技术可以实现在未经纯化的混杂体系中对单个甚至多个特定片段进行特异性抓取,同时具备在复杂混合体系中捕获大片段的能力,具有准确性好、操作简便等优点。这项技术能够简化 DNA 重组实验,给生物学研究带来便利。

1 材料和方法

1.1 试剂及材料

本研究中所使用耐热型 DNA 连接酶为美国 NEB 公司生产的 *Taq* DNA 连接酶。限制性内切酶为

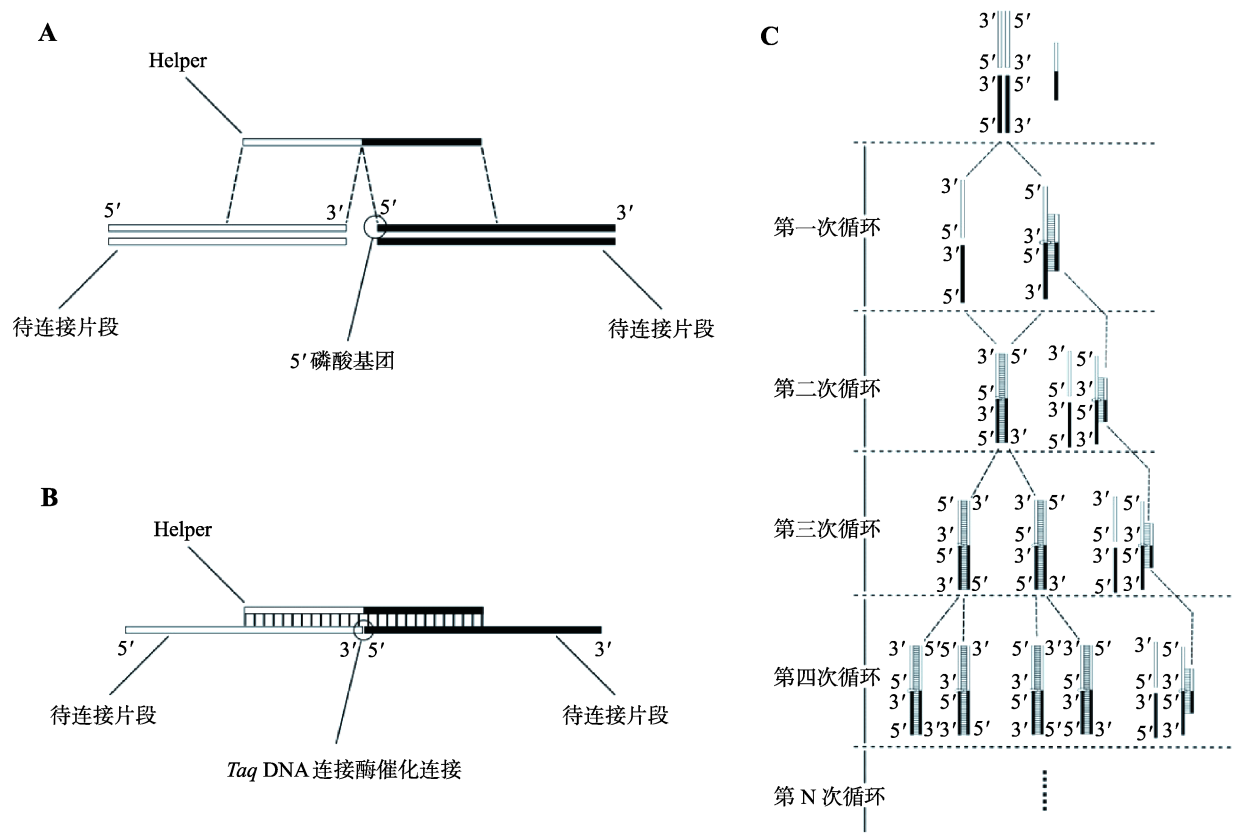


图 1 TLCR 技术反应原理

Fig. 1 Reaction principle of TLCR

A: Helper 的设计思路。作为连接模板的 Helper 是一段与两个待连接片段各有 15~30 bp 的序列完全互补的单链 Oligo, 设计时需尽可能使 Helper 与每个待连接片段之间的复性温度基本一致, 浮动不应超过 1.5°C, 这样能够在相同温度下让多个连接处都获得平衡的效率。由于催化连接反应的 *Taq* DNA 连接酶活性温度区间在 45°C~65°C, 所以 Helper 与单个待连接片段之间的 T_m 值应处于此区间中, 一般设置为 55°C; B: Helper 的作用原理。在 DNA 热变形即解链之后的降温复性阶段, Helper 由于碱基互补原理, 会同时和它所对应的两个片段一侧的单链结合, 这样它就将两条单链桥接在一起, 然后以自身充当连接的模板配合 *Taq* DNA 连接酶实现片段的连接。当且仅当两条单链紧密相邻时, *Taq* DNA 连接酶才会将两个单链连接在一起, 这一原理保证了连接的方向、顺序和序列特异性; C: 热循环中发生的链式连接反应的示意图。设计为单链的 Helper 在反应中只能捕获连接目标物中与其互补的单链, 配合 *Taq* DNA 连接酶催化单链的连接后在下一个热循环中依然发挥作用, 而新生成的单链也可以在下一轮热循环中作为 Helper 捕获其互补单链形成完整产物。

美国 NEB 公司生产的 *Hind* III、*Eco*R I 和 *Xho* I。构建质粒用的载体为 pBluescript II SK 载体。用于质粒转化的感受态细胞分别为 *E.coli* DH5α 和 *E. coli* DH10b。

1.2 Helper 设计及合成

用于桥接片段的 Helper 需要同其对应的两侧片段有足够长的完全互补区段, 以确保连接的效率和特异性。本研究中使用 Primer Premier 5.0 软件设计 Helper 片段, 使 Helper 同其所对应的两侧片之间的 T_m 值都处于 45°C~65°C 的区间中, 并尽量相等。Helper 长度则在 15~30 bp 之间。两段互补区域中间

不插入任何其他序列, 保证两侧片段与 Helper 结合时能够紧密相邻。全部 Helper 均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 在未纯化的混杂体系中实现片段的特异性抓取

pLL3.7 质粒被 *Hind* III 和 *Eco*R I 消化后, 形成一个含有 7 个大小不同的片段的混杂体系, 本实验中将此混杂体系中中带有 EGFP 和 CMV promoter 长度为 1.5 kb 的部分作为目标片段; 将使用 *Hind* III 和 *Eco*R I 线性化处理后的 pSK 质粒作为载体; 使用针对它们序列设计的 Helper a 和 Helper b, 构建被命名为 Recombinant plasmid-1(RP-1)的目标质粒;

RP-1 质粒的构建方法如图 2A 所示。反应体系中加入 50 ng 载体、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 Helper 各 1 μL 、0.1 μL (40 units)的 *Taq* DNA 连接酶、1 μL 的 10 \times *Taq* DNA 连接酶缓冲液、约 100 ng 的 pLL3.7 酶切体系以及能使反应总体积达到 10 μL 的超纯水。热循环连接反应的条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 复性及连接 2 min, 循环 20 次; 55 $^{\circ}\text{C}$ 连接 10 min 后结束反应。

为了证明 TLCR 特异性抓取的独特性, 特设置一组对照组, 使用 T4 DNA 连接酶进行连接, 反应体系中加入: 50 ng 载体、约 100 ng 的 pLL3.7 酶切体系、1 μL 的 10 \times T4 DNA 连接酶缓冲液、1 μL (40 units)的 T4 DNA 连接酶以及能使反应总体积达到 10 μL 的超纯水。反应条件为: 16 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。

1.4 在复杂混合体系中实现大片段捕获

λ 噬菌体基因组被 *Hind* III 消化后会产生 7 条大小不同的消化产物。本文以 λ 基因组 *Hind* III 消化产物中 23 kb 和 4 kb 的两条片段为目标片段; 以使用 *Hind* III 线性化处理后的 pSK 质粒作为载体, 使用针对它们序列设计的 Helper c 和 Helper d, 构建被命名为 Recombinant plasmid-2(RP-2)的目标质粒, RP-2 质粒的构建方法如图 3A 所示。反应体系中加入 50 ng 载体、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 Helper 各 1 μL 、0.1 μL (40 units)的 *Taq* DNA 连接酶、1 μL 的 10 \times *Taq* DNA 连接酶缓冲液、约 500 ng 的 λ 基因组 *Hind* III 消化产物以及能使反应总体积达到 10 μL 的超纯水。热循环连接反应的条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 复性及连接 2 min, 循环 20 次; 55 $^{\circ}\text{C}$ 连接 10 min 后结束反应。

1.5 验证实验

RP-1 构建实验中反应体系同平行的 T4 DNA 连接酶组直接进行琼脂糖凝胶电泳进行比对后, 转化进 *E.coli* DH5 α 感受态细胞过夜培养, 挑取单克隆摇菌过夜后抽提质粒。对抽提到的质粒样品进行 *Eco*R I-*Xho* I 双酶切鉴定, 正确的质粒样品应同时在 3 kb 和 1.5 kb 位置有清晰的单一条带。

RP-2 构建实验中反应体系转化进入 *E.coli* DH10b 感受态细胞过夜培养, 挑取单克隆摇菌过夜后抽提质粒。抽提的质粒直接进行琼脂糖凝胶电泳鉴定质

粒大小, 正确的质粒样品应在 30 kb 位置出现质粒条带。将质粒大小检测正确的样品进行 PCR 检测, 检测引物分别对应 3 个连接位置设计, 目标产物大小为 1.2 kb、1.5 kb 和 0.4 kb, 正确的质粒样品 PCR 检测的电泳结果应分别在这 3 个位置有清晰的单一条带。

全部正确质粒都送至华大基因公司对连接位置进行 Sanger 测序检测。

2 结果与分析

2.1 在未纯化的混杂体系中抓取特定片段的结果

TLCR 技术使用的 Helper 是针对目标片段序列设计的, 具有序列特异性, 能够在混杂体系中识别目标片段, 从而对目标片段进行特异性抓取。RP-1 质粒构建的实验结果被用于验证这种连接的可行性。实验获得的连接产物直接进行电泳的结果显示, TLCR 组中参与反应的片段被消耗掉, 4.5 kb 位置的中间产物清晰可见; 而 T4 DNA 连接酶对照组则全部为非目的性条带(图 2B)。将连接产物转化进入感受态细胞过夜培养后, 随机挑取 10 个克隆编号为 1~10, 抽提质粒后进行 *Eco*R I-*Xho* I 双酶切鉴定, 电泳结果显示挑取的 10 个克隆中, 除 2 号和 6 号酶切结果不正确以外, 其他 8 个克隆酶切结果均检测正确, 准确率为 80%(图 2C)。Sanger 测序结果显示在接头处没有产生任何错配、插入或缺失。可见 TLCR 技术可以完成混杂体系中特定片段的捕获, 并且具有较高的准确率。

2.2 利用 TLCR 技术在复杂混合体系中实现大片段捕获

RP-2 质粒的构建实验被用于证明 TLCR 技术在复杂混合体系捕获大片段的能力。连接反应完成后, 将连接产物转化进入感受态细胞后过夜培养, 随机挑取 10 个克隆编号为 1~10, 抽提质粒并进行电泳检测, 检测结果显示除 2 号和 6 号质粒大小不正常外, 其他 8 个电泳显示质粒大小正确(图 3B)。对这 8 个样品进行 PCR 检测, 扩增产物电泳结果显示这 8 个样品全部正确, 达到 80%的准确率(图 3C)。Sanger 测序结果显示这 8 个样品接口处没有产生任何错配、插入或缺失。实验结果表明 TLCR 技术成

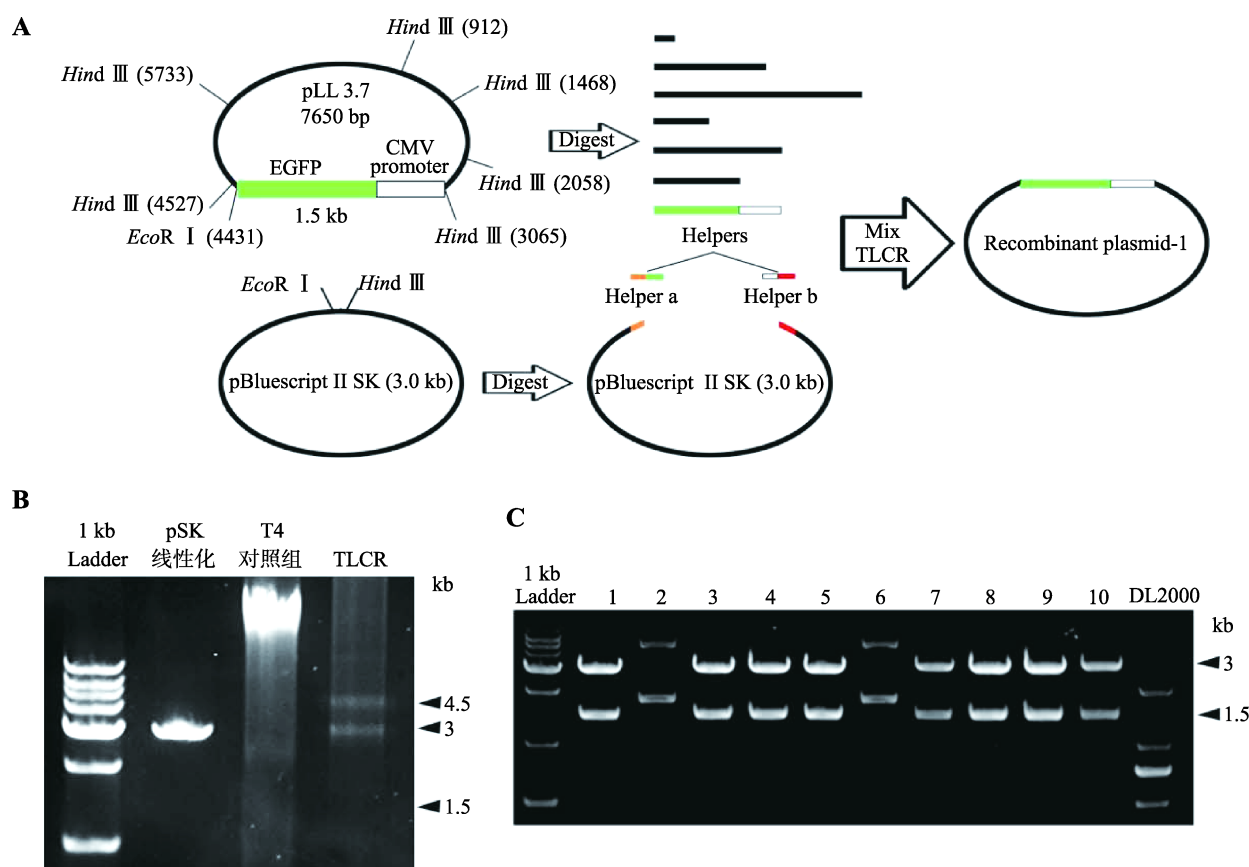


图 2 RP-1 质粒的构建方法及检测结果

Fig. 2 Construction method and detection of plasmid RP-1

A: pLL3.7 质粒被 *Hind* III 和 *Eco*R I 消化处理后, 形成一个含有 7 个大小不同的片段的混杂体系。Helper a 和 Helper b 被设计合成用于将其中一段带有 EGFP 和 CMV 启动子的片段克隆到被 *Hind* III 和 *Eco*R I 处理后的 pSK 载体上。目标质粒命名为 Recombinant plasmid-1(RP-1); B: 对 TLCR 实验组和 *T4* DNA 连接酶实验组连接产物进行电泳检测, 1.5 kb 位置为插入片段, 3 kb 位置为线性化的 pSK 载体, 4.5 kb 位置为连接中间产物; C: 随机挑取 10 个克隆编号为 1~10, 抽提质粒后进行 *Eco*R I -*Xho* I 双酶切鉴定, 符合正确情况的质粒会产生 3 kb 及 1.5 kb 的酶切产物。

功地从混杂体系中获取了长达 27 kb 的目标 DNA 片段。结果进一步验证 TLCR 技术在复杂混合体系中捕获大片段的能力, 同时也证明 TLCR 技术可以在此种条件下实现多个片段的特异性捕获。

3 讨 论

3.1 TLCR 方法的条件优化

本研究对 TLCR 技术的优化条件也进行了摸索。优化条件主要涉及 3 个要素: Helper 的长度、热循环的数量以及 Helper 的用量。

Helper 的长度直接决定了它的结合能力。本研究通过大量实验发现, Helper 的长度最低不能少于 30 bp 综合考虑 *Taq* DNA 连接酶的反应温度、Helper

结合能力、特异性以及热动力学活性, 认为 40 bp 左右长度的 Helper 较为合适。设计 Helper 时可以根据 *Tm* 值、GC 含量、发夹结构等情况作出适当调整。

尽管 TLCR 技术从原理上讲, 热循环次数越多得到的最终产物就越多。但本实验发现热循环次数同产物的关系在 20 个循环之前呈正比, 到 30 个循环则已经逆转, 产物获得率开始显著的下降。分析这种现象产生的原因可能有两个方面: (1) DNA 片段在热循环过程中会发生损伤和断裂, 造成材料片段和目的片段的损失。从实验结果推测: 目的产物的生成和 DNA 片段的热损失在 10~20 个循环之间达到了一个动态平衡, 而在 30 个循环之后, 产物的损失则开始占据上风。(2) Helper 的总量在整个反应过

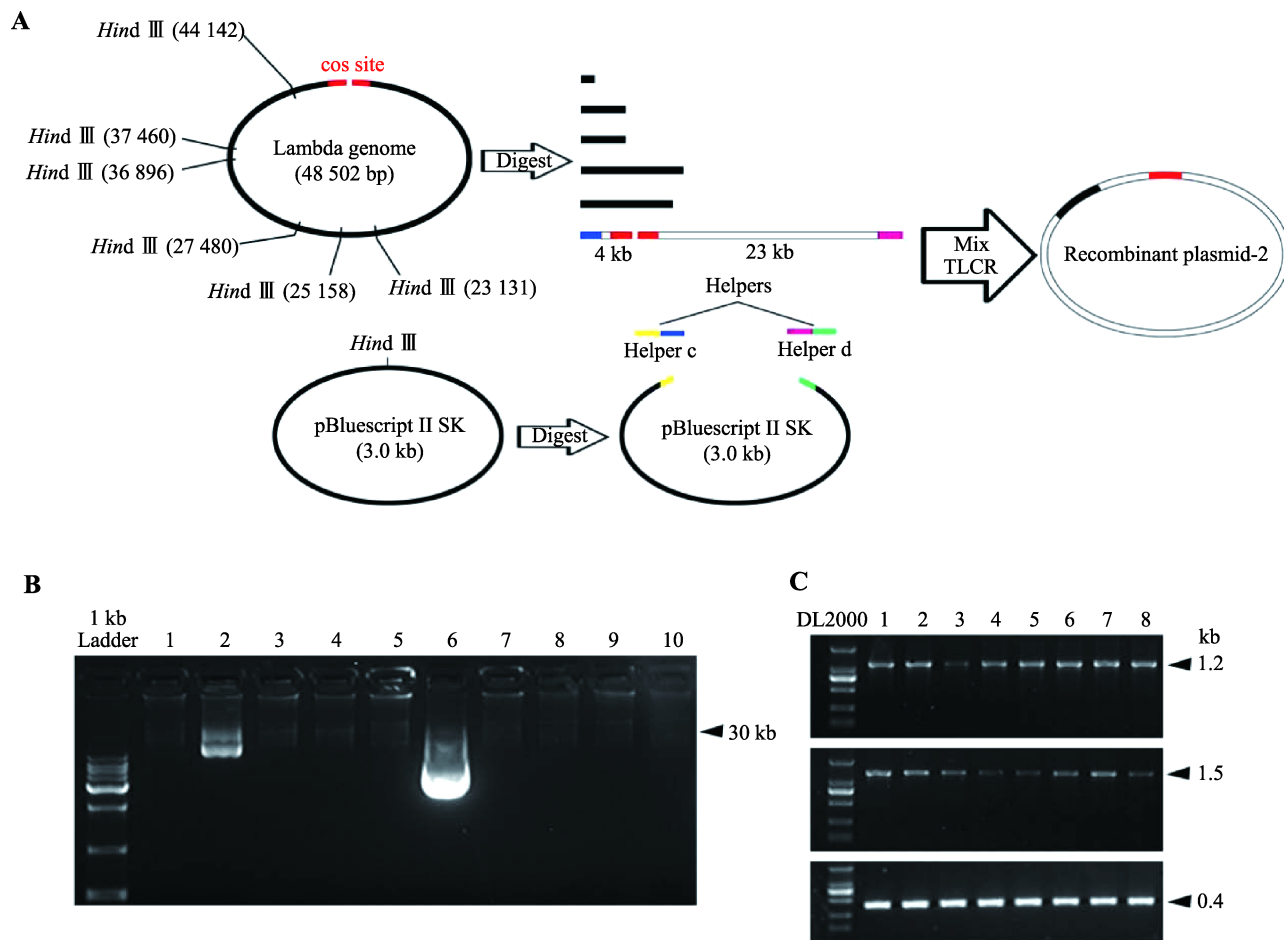


图 3 RP-2 质粒的构建方法及检测结果

Fig. 3 Construction method and detection of plasmid RP-2

A: 以 λ 基因组 *Hind* III 消化产物中 23 kb 和 4 kb 的两条片段为目标片段, Helper c 和 Helper d 被设计合成用于连接,载体为 *Hind* III 线性化的 pSK; B: 随机挑取的 10 个克隆编号为 1~10, 抽提质粒后进行电泳检测, 正确的质粒样品在 30 kb 位置出现质粒条带; C: 对电泳检测正确的样品进行 PCR 检测, 目标产物为 1.2 kb、1.5 kb 和 0.4 kb。

程中不会发生减少, 随着反应进行, 片段不断完成连接, Helper 的量会超过未连接的接口数量, 而过多的 Helper 会占据连接位置, 同其他 Helper 或者片段发生冲突, 造成对连接效率的抑制, 本研究称这种现象叫“占位竞争”。这也可能是造成一定热循环次数后效率无法提高的原因之一。

Helper 用量的优化是在大量实验的基础上逐渐完成的。在一个多达 9 片段一次性连接的实验过程中, 最初使用 5 倍于接口数量的 Helper, 但是一直无法得到目标产物。直到将 Helper 的用量调整至接口数量的 1/2, 立刻得到了良好的连接效果。从这个现象出发, 本研究探究发现 Helper 的用量应下调到低于接口数量的水平, 用量过多会对连接效率造成

负面影响, 在连接片段越多的情况下这种趋势越明显。造成这种抑制的原因推测可能是因为之前提到的“占位竞争”造成的。

3.2 不同末端的连接策略

尽管 TLRCR 技术特别适合平末端片段的连接, 但它也同样适用于多种末端的片段。在连接片段带有互补的突出末端时, 由于任意一侧的两条单链同 Helper 结合时依然能够紧密相邻, 所以 TLRCR 方法可以直接应用于连接。这意味着在同一连接体系中, 即便平末端片段和带有互补突出末端的片段同时出现也可以不做任何处理直接进行一次性连接, 增加了灵活性。

而对于不能互补的突出末端, 可以通过 *Pfu* DNA 聚合酶或 *Klenow* 酶将片段补平后再使用 TLCR 技术进行连接。但是这种策略会在片段之间引入额外的碱基, 只能视情况使用。

综上所述, TLCR 方法以其独特的原理, 优化了复杂混合体系中 DNA 片段的连接和捕获过程, 给相关实验设计提供了全新的思路。其操作过程简便, 成本低廉, 同时具有高效率、高精度的特点, 是一种值得推广到日常实验和教学活动中的方法。如果能进一步优化反应体系, 让 TLCR 获得更高的连接通量和更长的片段连接长度, 那么 TLCR 方法的应用范围还将得到拓展。

参考文献(References):

- [1] Lu Q. Seamless cloning and gene fusion. *Trends Biotechnol*, 2005, 23(4): 199–207. [DOI]
- [2] Li MZ, Elledge SJ. Harnessing homologous recombination *in vitro* to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods*, 2007, 4(3): 251–256. [DOI]
- [3] Peccoud J, Isalan M. The PLOS ONE synthetic biology collection: six years and counting. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43231. [DOI]
- [4] Ellis T, Adie T, Baldwin GS. DNA assembly for synthetic biology: from parts to pathways and beyond. *Integr Biol*, 2011, 3(2): 109–118. [DOI]
- [5] Yount B, Denison MR, Weiss SR, Baric RS. Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59. *J Virol*, 2002, 76(21): 11065–11078. [DOI]
- [6] Lebedenko EN, Birikh KR, Plutalov OV, Berlin YA. Method of artificial DNA splicing by directed ligation (SDL). *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(24): 6757–6761. [DOI]
- [7] Rebatchouk D, Daraselia N, Narita JO. NOMAD: A versatile strategy for *in vitro* DNA manipulation applied to promoter analysis and vector design. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(20): 10891–10896. [DOI]
- [8] Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, 1989, 77(1): 61–68. [DOI]
- [9] Szybalski W, Kim SC, Hasan N, Podhajski AJ. Class-II restriction enzymes—a review. *Gene*, 1991, 100: 13–26. [DOI]
- [10] Aslanidis C, de Jong PJ. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(20): 6069–6074. [DOI]
- [11] Hosfield T, Lu Q. Influence of the amino acid residue downstream of (Asp)₄Lys on enterokinase cleavage of a fusion protein. *Anal Biochem*, 1999, 269(1): 10–16. [DOI]
- [12] Wyborski DL, Bauer JC, Zheng CF, Felts K, Vaillancourt P. An *Escherichia coli* expression vector that allows recovery of proteins with native N-termini from fused calmodulin-binding peptide fusions. *Protein Expr Purif*, 1999, 16(1): 1–10. [DOI]
- [13] Lu Q, Bauer JC, Greener A. Using *Schizosaccharomyces pombe* as a host for expression and purification of eukaryotic proteins. *Gene*, 1997, 200(1–2): 135–144. [DOI]
- [14] Hosfield T, Lu Q. S. pombe expression vector with 6x(His) tag for protein purification and potential for ligation-independent cloning. *Biotechniques*, 1999, 27(1): 58–60. [DOI]
- [15] Zhu B, Cai G, Hall EO, Freeman GJ. In-fusion assembly: seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations. *Biotechniques*, 2007, 43(4): 354–359. [DOI]
- [16] Yu H, Merchant B, Scheffel C, Yandava C, Drazen JM, Huff J. Automated detection of single nucleotide polymorphism in β -2 adrenergic receptor gene using LCx®. *Clin Chim Acta*, 2001, 308(1–2): 17–24. [DOI]
- [17] Abravaya K, Carrino JJ, Muldoon S, Lee HH. Detection of point mutations with a modified ligase chain reaction (Gap-LCR). *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(4): 675–682. [DOI]

(责任编辑: 谢建平)