

“实用生物技术”课程小组讨论总结报告

组次： G5 组长： 韩佳凝 执笔： 薛媛

1、时间

2026.4.10

2、方式

线上腾讯会议讨论

3、主题

课后对序列比对以及数据序列相似性搜索 BLAST 的复习总结

4、总结内容

4.1 序列比对

序列比对是用计算机算法比较核酸、蛋白序列的碱基、氨基酸排列差异，通过匹配、错配、插入空位，计算相似性，推断进化关系、保守功能域、结构与功能。

- 序列相似性和同源性：序列相似性表示序列比对中相同或理化性质相似的残基比例，而是序列同源性定性的进化推断，指序列是否源自共同祖先（只有“是/否”之分，不可用百分比描述）。
- 全局比对与局部比对的适用范围：全局比对适合序列全长高度保守且长度相近，需分析整体差异（**emboss** 中的 **needle** 为例）。局部比对适用仅部分区域功能保守（如结构域、活性位点），其余区域差异大的序列，或者两条序列长度差异较大。
- **BLOSUM** 与 **PAM** 计分矩阵的构建方法和特点：**BLOSUM** 计分矩阵基于实际观测的保守区域块（**BLOCKS** 数据库），统计同源蛋白家族中常见替换的频率。例如 **BLOSUM62** 由相似性 $\leq 62\%$ 的序列簇构建，避免近缘序列主导替换概率。**PAM** 计分矩阵是基于短期进化数据，通过马尔可夫链外推长期进化。适合近缘序列比对（**PAM10-PAM120**），**PAM250** 用于极远缘序列（相似性 $< 20\%$ ）
- 空位罚分的意义和用法：空位罚分可以模拟进化中的插入/缺失事件（**indel**），连续空位通常由单次事件导致，故需区分空位开启与延伸。还可避免比对中过度引入空位，确保结果符合进化逻辑。若序列结构域保守但长度差异大（如跨物种基因），降低空位开启罚分以容忍结构域插入；若序列全长高度保守（如直系同源基因），提高空位开启罚分以减少碎片化比对。

●


4.1.1 使用 NCBI 进行蛋白质多序列比对

将七个哺乳动物（人、小鼠、鸡、短尾鳄、非洲爪蟾、斑马鱼、麻雀）蛋白质序列复制

```

>HBA_HUMAN
MVLSPADKTNVKAAWGKVGVAHAGEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGK
KVADALRNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHKL RVDVNFKLLSHCLLVTLAAHLP AEF TPA
VHASL DKFLASVSTVLT SKYR
>HBA_MOUSE
MVLSGEDKSNIKAAWGKIGGHGAEYGAEALERMFASFPTTKTYFPHFDVSHGSAQVKGHGK
KVADALASAAGHLDDLPGALSALSDLHAHKL RVDVNFKLLSHCLLVTLASHHPADFTPA
VHASL DKFLASVSTVLT SKYR
>HBA_CHICK
MVL SAADKNNVKGIFTKIAGHAEYGAETLERMFTTYPPTTKTYFPHFDLSHGSAQIKGHGK
KVVAALIEAANHIDDIAGTLSKLSDLHAHKL RVDVNFKLLGQCFLVVVAIHHPAALTPE
VHASL DKFLCAVGTVLTAKYR
>HBA_ALLMI
MVL SMEDKSNVKAIWGKASGHLEEYGAEALERMFCAYPQTKIYFPHFDMSHNSAQIRAHG
KKVFSALHEAVNHIDDLPGALCRLSELHAHSLRVDVNFKFLAHCVLVVF A IHHP SALS P
EIHASL DKFLCAVSAVLT SKYR
>HBA_XENTR
MHLTADDKKHIIKAIWPSVAAHGDKYGGEALHRMFCAPKTKTYFPDFDFSEHSKHILAHG
KKVSDALNEACNHL DNIAGCLSKLSDLHAYDLRVDPGNFPLLAHQILVVVAIHFPKQFDP
ATHKALDKFLVSVSNVLT SKYR
>HBA_DANRE
MSLSDTDKAVVKAIWAKISPKADEIGAEALARMLTVYPQTKTYFSHWADLSPGSGPVKKH
GKTIMGAVGEAISKIDDLVGGLAALSELHAFKL RVDPANFKILSHNVIVV IAMLFPADFT
PEVHVSVDKFFNNLALALSEKYR
>HBA_MUSGR
MAFTACEKQTIGKIAQVLAKSPEAYGAECLARLFVTHPGSKSYFEYKDYS AAGAKVQVHG
GKVI RAVVKA AEHVDDLHSHLET LAL THGKLLVDPQNF PMLSECIIVTLATHL TEFSPD
THCAVDKLLSAICQELSSRYR

```


National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

COBALT
Constraint-based Multiple Alignment

Enter Query Sequences

COBALT computes a multiple protein sequence alignment using conserved

Enter at least 2 protein accessions, gis, or FASTA sequences Clear

```

>HBA_MUSGR
MAFTACEKQTIGKIAQVLAKSPEAYGAECLARLFVTHPGSKSYFEYKDYS AAGAKVQVHG
GKVI RAVVKA AEHVDDLHSHLET LAL THGKLLVDPQNF PMLSECIIVTLATHL TEFSPD
THCAVDKLLSAICQELSSRYR

```

Or, upload FASTA file

 未选择任何文件

Align

Show results in a new window

[▶ Advanced parameters](#)

▼ Descriptions Select All ▶ Alignment parameters

Accession	Description
Icl Query_10001	HBA_HUMAN
Icl Query_10002	HBA_MOUSE
Icl Query_10003	HBA_CHICK
Icl Query_10004	HBA_ALLMI
Icl Query_10005	HBA_XENTR
Icl Query_10006	HBA_DANRE
Icl Query_10007	HBA_MUSGR

▼ Alignments Select All Mouse over the sequence identifier for sequence title

View Format: Conservation Setting:

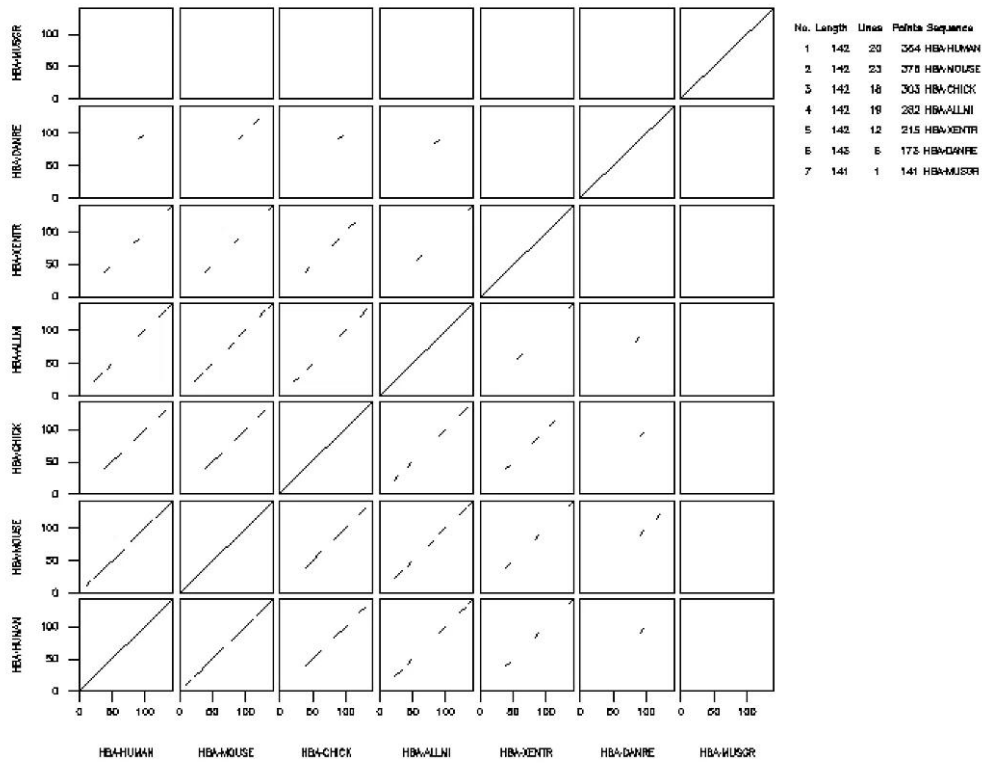
```

Query_10001 1  MVLSPADKTNVKAAWGKVGAHAGEYGAELERMFLSFPTTKYFPHF-DLSHGSAQVKGHGKKVADALTNAVAHVDDMPN 79
Query_10002 1  MVLSCEDKSNIKAAWGKIGGGAHEYGAELERMFASFPPTTKYFPHF-DVSHGSAQVKGHGKKVADALASAAGHLDDLPG 79
Query_10003 1  MVLSAADKNNVKGIFTKIAGHAEEYGAETLERMFTTYPPTKYFPHF-DLSHGSAQIKGHGKKVVAALIEAANHIDDIAG 79
Query_10004 1  MVLSMEDKSNVKAITWGRASGLEEYGAELERMFCAYPQTRKYFPHF-DMSHNSAQIRAHGKVFSAALHEAVNHIDDLPG 79
Query_10005 1  MHLTADKREHKAITPSVAAGERYGAEALRRMFCAFKTKYFPDF-DPSEHSKHLAHRKYSALNEACNHLDNVAG 79
Query_10006 1  MSLSDTKAVKALFAKISPADEIAGALARMITVYQITKTFPSHWDLSFGSGPVKRRKTKMVAEGEISKIDDLVG 80
Query_10007 1  MAFTACEKQTIKRTAQVLAKSPEAYGAELARLFTVHPGSRKSYFEYK-DYSAAGAKVQVHGKVTIRAVKAAEHVDDLHS 79

Query_10001 80  ALSALSDLHAHKLKVDVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDRFLASVSTVLTSKYR 142
Query_10002 80  ALSALSDLHAHKLKVDVNFKLLSHCLLVTLASHHPADFTPAVHASLDRFLASVSTVLTSKYR 142
Query_10003 80  TLSKLSDLHAHKLKVDVNFKLLQQCFVVVAIHHPALPEVHASLDRFLCAVGTVLTSKYR 142
Query_10004 80  ALCKLSELHAHKLKVDVNFKLLAHQFLVVVAIHHPALPEVHASLDRFLCAVAVLTSKYR 142
Query_10005 80  CLSKLSELHAHKLKVDVNFKLLAHQFLVVVAIHHPALPEVHASLDRFLCAVAVLTSKYR 142
Query_10006 81  GLAALSELHAFKLVDPANFKLLSHNVIVYIAMLFPADFTPEVHVSVDKFFNLAALSEKYR 143
Query_10007 80  HLETLALTHGRKLLVDPQVFMVSECTIVTLATHL-TEFSPTDTHCAVDRLLSAICQELSSRYR 141

```

- 序列以 Query_10001 到 Query_10007 编号，对应上述不同物种。
- 每一行代表一条序列，数字（如 1、79、80、142）为氨基酸位置。
- 颜色差异：图中红 / 黑 / 蓝等颜色是保守性标记，代表氨基酸的保守程度（Conservation Setting: 2 Bits）。红色是完全保守，即完全相同的氨基酸，意味着这些位点在亿万年的进化中几乎没有改变，该区域可能对应血红素（heme）结合位点以及维持蛋白质三维构象的关键区域。
- 序列末尾数字是当前行结束的氨基酸位置（如 79、142），斑马鱼序列长度为 143，其他物种多为 141-142，说明存在长度差异（可能是插入 / 缺失）。
- 多点阵图对比



该图依次对比七个哺乳动物的氨基酸序列，用矩阵形式表现。图中的大对角线上的物种，即 HBA_HUMAN vs HBA_HUMAN，HBA_DANRE vs HBA_DANRE 等对角线上的方块，都有一条从左上到右下的连续直线，因为自身与自身的序列是完全 100%匹配的。

而非对角线上的方块的断裂程度随亲缘关系的距离而逐渐增大，人和小鼠之间的点阵图，几乎也是一条非常清晰的长对角线，这说明它们的相似度极高。

以人与斑马鱼（HBA_DANRE，y 轴倒数第二行，鱼类）进行比较的方块里，对角线断断续续，甚至很模糊。这说明虽然在整体框架上它们还相似，但由于进化时间跨度极大（数亿年），二者的序列已经积累了大量差异（点突变、缺失等）。

4.1.2 EMBOSS 序列比对

```
>1QK6_1|Chain A|HUWENTOXIN-I|SELENOCOSMIA HUWENA (29017)
ACKGVFDACTPGKNECCPNRVCSDKHKWCKWKL
```

```
>1DKC_1|Chain A|ANTIFUNGAL PEPTIDE|Phytolacca americana (3527)
AGCIKNGGRCNASAGPPYCCSSYCFQIAGQSYGVCKNR
```

- MENT
- AY
- RE KINETICS
- RE TABLES
- MATION
- IC
- GENY
- IN
- w
- opy
- opypair
- nic
- ranambig
- ranseq
- ia
- d
- led
- ;
- e
- trans
- i
- np
- py
- et
- seq
- mbig
- ot
- port
- q
- d Search

NEEDLE

Needleman-Wunsch global alignment of two sequences

Enter the sequence as:

file / database entry or paste or list of files

Sequence Cut and Paste

```
>1QK6_1|Chain A|HUWENTOXIN-I|SELENOCOSMIA HUWENA (29017)
ACKGVFDACTPGKNECCPNRVCSDKHKWCKWKL
```

Enter the sequence as:

file / database entry or paste or list of files

Sequence Cut and Paste

```
>1DKC_1|Chain A|ANTIFUNGAL PEPTIDE|Phytolacca americana (3527)
AGCIKNGGRCNASAGPPYCCSSYCFQIAGQSYGVCKNR|
```

Matrix file

required section

Gap opening penalty
(min:0.0 max:100.0)

Gap extension penalty
(min:0.0 max:10.0)

output section

Brief identity and similarity

Align format (srspair)

Execution mode:

```

#####
# Program: needle
# Rundate: Tue 5 May 2026 22:32:54
# Commandline: needle
# -asequence "C:\Users\Justin Bieber\AppData\Local\Temp\needle05299885520983667381.jembosstmp"
# -bsequence "C:\Users\Justin Bieber\AppData\Local\Temp\needle14388010524292520453.jembosstmp"
# -datafile EPAM250
# -brief
# -aformat srspair
# -auto
# Align_format: srspair
# Report_file: chain.needle
#####

=====
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: Chain
# 2: Chain
# Matrix: EPAM250
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 46
# Identity:      7/46 (15.2%)
# Similarity:   15/46 (32.6%)
# Gaps:         21/46 (45.7%)
# Score: 34.0
#
#
=====

Chain          1 -ACKGVFDAC—TPGKHECCPN—————RVCSDEKHWCKWKL      33
                :|...:|  ::|...||:      .||:
Chain          1 AGCIKNGGRCHASAGPPYCCSSYCFQIAGQSYGVCKNR—————      38

=====
#
#

```

对两种生物活性肽进行的全局双序列比对：

序列 1：虎纹捕鸟蛛毒素（HUWENTOXIN-II，来自蜘蛛毒液）

序列 2：美洲商陆抗真菌肽（ANTIFUNGAL PEPTIDE，来自植物）

从比对结果看，两条序列的半胱氨酸（Cys）位置高度匹配，这是关键特征：蜘蛛毒素的二硫键骨架（多个 Cys）与植物抗菌肽的 Cys 分布部分对齐。这种 Cys 保守性说明二者可能共享类似的三维折叠方式（如抑制性胱氨酸 Knot, ICK 结构），但一级序列差异很大。大量的空位（45.7%）说明两条序列长度和整体排列差异显著，不存在整体的同源性。

>SPL3_ARATH - P93015 Arabidopsis SBP TF 131AA Luo JC 2018-03-25
 MSMRRSKAEGKRSRLRELSEEEEEETEDEDTFEEEEALEKKQK GKATSSSGVCQVESCT
 ADMSKAKQYHKRHKVCQFHAKAPHVRISGLHQRFCCQCSRFBALSEFDEAKRSCRRRLAG
 HNERRRKSTTD

>QSPL4_ARATH - Q9S7A9, Arabidopsis SBP TF 174AA Luo JC 2018-03-25
 MEGKRSQQGYMKKKSYLVEEDMETDTDEEEVGRDRVRGSRGSINRGGSLRLCQVDRCT
 ADMKEAKLYHRRHKVCEVHAKASSVFLSGLNQRFCQQCSRFDLQEFDEAKRSCRRRLAG
 HNERRRKSSGESTYGE GSGRRGINGQVVMQNQERSRVEMTLMPNSSFKRPQIR

le Preferences Tools Favourites Help

IGNMENT
PLAY
IT
ZYME KINETICS
ATURE TABLES
ORMATION
CLEIC
YLOGENY
OTEIN
ILS

To:

View
 gncopy
 gncopypair
 tigenic
 cktranambig
 cktranseq
 nana
 ysed
 wisted
 i
 aos
 arge
 ecktrans
 ips
 dna
 dcmp
 dcopy
 deret
 mpseq
 ns
 nsambig
 gplot
 greport
 sp
 tseq
 n

word Search

NEEDLE
 Needleman-Wunsch global alignment of two sequences

file / database entry or paste or list of files

Sequence Cut and Paste
 >SPL3_ARATH - P93015 Arabidopsis SBP TF 131AA Luo JC 2018-03-25
 MSMRRSKAEGKRSRLRELSEEEEEETEDEDTFEEEEALEKKQK GKATSSSGVCQVESCT
 ADMSKAKQYHKRHKVCQFHAKAPHVRISGLHQRFCCQCSRFBALSEFDEAKRSCRRRLAG
 HNERRRKSTTD

Enter the sequence as:
 file / database entry or paste or list of files

Sequence Cut and Paste
 >QSPL4_ARATH - Q9S7A9, Arabidopsis SBP TF 174AA Luo JC 2018-03-25
 MEGKRSQQGYMKKKSYLVEEDMETDTDEEEVGRDRVRGSRGSINRGGSLRLCQVDRCT
 ADMKEAKLYHRRHKVCEVHAKASSVFLSGLNQRFCQQCSRFDLQEFDEAKRSCRRRLAG
 HNERRRKSSGESTYGE GSGRRGINGQVVMQNQERSRVEMTLMPNSSFKRPQIR

Matrix file

required section

Gap opening penalty
 (min:0.0 max:100.0)

Gap extension penalty
 (min:0.0 max:10.0)

output section

Brief identity and similarity

Align format (srspair)

Execution mode:

```

File Colour
12 Plain
spl3_arath.needle cmd
#####
# Program: needle
# Rundate: Tue 5 May 2026 22:49:35
# Commandline: needle
# -asequence "C:\Users\Justin Bieber\AppData\Local\Temp\needle03912510661405830246.jembosstmp"
# -bsequence "C:\Users\Justin Bieber\AppData\Local\Temp\needle12698312956372267960.jembosstmp"
# -datafile EBLOSUM62
# -brief
# -aformat srspair
# -auto
# Align_format: srspair
# Report_file: spl3_arath.needle
#####

#-----
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: SPL3_ARATH
# 2: QSPL4_ARATH
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 184
# Identity: 79/184 (42.9%)
# Similarity: 94/184 (51.1%)
# Gaps: 63/184 (34.2%)
# Score: 375.0
#
#-----

SPL3_ARATH 1 MSMRRSKAEGKRS-----LRELSSEEEEEETEDEDTFEEEEALEKKQKG 45
                . |||||  ::: |.. ||: ||  || |||||.....: |
QSPL4_ARATH 1 -----MEGKRSQQGGYMKKKSYYLVEEDMET---DTDEEEVGRDRVRG 40

SPL3_ARATH 46 KATS-----SSGVCQVESCTADMSKAKQYHKRHKVCQPHAKAPHVRISGL 90
... |      |.. |||: |||||: || ||: |||||: |||||: |.. |||
QSPL4_ARATH 41 SRGSINRGGSLRLCQVDRCTADMKEAKLYHRRHKVCEVHAKASSVFLSGL 90

SPL3_ARATH 91 HQRFCQQCSRPHALSEFDEAKRSCRRLAGHWERRRSTTD----- 131
: ||||| |||||: |. ||||| ||||| ||||| |||||: :

```

- 对拟南芥两个 SPL 转录因子（SPL3、SPL4）进行的全局双序列比对
- 核心保守区（SBP 结构域）：序列中段的 QRPFCQQCSRF 区域高度匹配，这是 SPL 转录因子特有的 SBP DNA 结合结构域，是功能的核心区域，在家族中高度保守。
 - N 端差异区：序列前半段（1-40 位）存在大量空位和氨基酸替换，说明 N 端序列保守性低，是家族内分化的主要区域。
 - C 端差异区：SPL3 的 C 端（131 位后）存在大片段缺失，而 SPL4 的 C 端更长，说明二者在进化中发生了 C 端序列的分化，可能影响蛋白的亚细胞定位或调控功能。

4.2 数据序列相似性搜索 BLAST

BLAST 是目前最常用的序列数据库快速比对工具，能将用户的核酸、蛋白序列与公共数据库中的海量序列进行局部比对，快速找到同源序列，推断序列的来源、功能与进化关系。

4.2.1 灵长目 alpha 血红蛋白搜索 (CNCB)

```
>HBA_HUMAN - P69905, Hemoglobin subunit alpha, HBA1; J Luo, 2016-08-21
MVLSPADKTNVKAAWGKVGAHAGEYGAEALERMFSPPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHG
KKVADALTNVAHVDDMPNALSALSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTP
AVHASLDKFLASVSTVLTISKYR
```

请输入序列: [?](#) [示例](#) [清空](#)

```
>HBA_HUMAN - P69905, Hemoglobin subunit alpha, HBA1; J Luo, 2016-08-21
MVLSPADKTNVKAAWGKVGAHAGEYGAEALERMFSPPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHG
KKVADALTNVAHVDDMPNALSALSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTP
AVHASLDKFLASVSTVLTISKYR
```

或上传文件: [?](#)

任务名字: [?](#) 30 / 30

选择目标: [?](#) 与数据库比对 与输入序列比对

选择搜索数据库

标准数据库(nr 等)

* 数据库: [?](#) x

物种: [?](#) x (包含)

(排除)

选择BLAST算法

BLAST算法: [?](#) blastp-fast (搜索高度相似序列)

blastp (搜索相似序列)

blastp-short(短于30aa的序列)

首页 / blastp / LMIFVYJ17E

[< 编辑搜索](#) [保存搜索策略](#) [搜索策略概览](#)

任务名称	HBA_HUMAN - P69905, Hemoglobin
请求 ID	LMIFVYJ17E 结果下载
程序	BLASTP 引用
数据库	NCBI_SwissProt
查询 ID	Query_1
描述	HBA_HUMAN__P69905__Hemoglobin_subunit_a...
分子类型	Protein
查询长度	142
其他报告	距离树 多序列比对

筛选结果

物种

请选择1个或多个物种

 排除

相似度

期望值

覆盖率

 至 至 至 [过滤](#)[重置](#)AI Summary: [?](#)[下载AI报告](#)

3. 物种分析

命中序列的物种分布具有清晰的**进化系统发育模式**：

- **物种来源**：所有前10位的命中均来自**灵长类动物**，包括人类、黑猩猩、大猩猩、猩猩、长臂猿、多种猴类（如猕猴、狒狒、倭面猴）等。
- **进化关系**：序列一致性百分比与已知的灵长类进化亲缘关系高度吻合。
 - 与人类 (*Homo sapiens*) 的一致性为100%，表明查询序列即为人源序列。
 - 与黑猩猩属 (*Pan*) 的一致性接近100% (99.3%-100%)，反映了人与黑猩猩极近的亲缘关系。
 - 与其他灵长类的一致性随进化距离增加而略有下降（如大猩猩99.3%，猩猩97.9%，旧世界猴约96.5%-97.9%），这符合**分子钟**和共同祖先的概念。
- **进化意义**：血红蛋白基因在灵长类中如此高度的保守性，强烈暗示其功能对生存至关重要。任何关键位点的突变都可能被自然选择所淘汰。

命中的前 10 位序列均来自灵长类动物，包括人类、黑猩猩、大猩猩、猩猩、长臂猿、多种猴类等，说明该序列在灵长目中高度保守。

与人类序列一致性为 100%，验证了查询序列的物种来源。

与黑猩猩属（*Pan*）的一致性接近 100%（99.3%-100%），反映了人与黑猩猩极近的亲缘关系。

与其他灵长类的一致性随进化距离增加而下降：大猩猩约 99.3%，猩猩约 97.9%，旧世界猴约 96.5%-97.9%，符合分子钟与共同祖先的进化规律。

4.3 个人总结

G5A 韩佳凝

(1) 序列相似性与同源性是不一样的概念，表述中不可出现“同源性高”这一类表述，高的相似性常作为同源性推断的线索。

(2) 对于序列比对过程中的参数调节仍有“知其然不知其所以然”的问题，今后可进一步进行练习

(3) 我发现草地早熟禾有完整的叶绿体基因序列和线粒体基因序列，又搜索了同为禾本科的水稻的相关抗旱基因序列，将两个序列用 `blastn` 进行比对，想知道草地早熟禾中是否有相似的序列，遗憾的是没有匹配结果。另外我想用水稻的核酸序列在 Refseq 数据库进行序列比对时，NCBI 的 BLAST 一直在闪退无法进行操作。今后可以再查找一些草地早熟禾的文献或者用另外的禾本科牧草进行比对。

4.4 问题

(1) 为什么 BLAST 中七个物种的保守序列占大部分，但点阵图中，比如人和斑马鱼的对角线断断续续的程度比 BLAST 显示的高许多？

多序列比对 (MSA) 中红色和蓝色位点很多，但这是列 (Column) 的比对，因为 MSA 引入了间隙 (Gap, 即预留的横杠“-”) 来强制对齐特定的关键位点，所以它会把人类和斑马鱼在演化中“错位”的序列强行拉到一列上对比，从而突出了它们共有的古老骨架。而点阵图中的对角线意味着连续的氨基酸序列存在。如果对角线是连续的、无中断的，那意味着这两条序列从头到尾长得几乎完全一样。但是人和斑马鱼的“祖先”，在约 4.5 亿年前就分道扬镳了。在这漫长的时间里，它们的血红蛋白 α 链积累了大量的替换突变和插入/缺失。点阵图就像是把人的地图和斑马鱼的地图直接叠在一起，不进行水平拉伸，所以整体还是有相似性，但中间都是断点。

事实上结合课上的内容我们可以想到这两种比对图的不同体现了“空位罚分”在多序列对比中的应用。