文章编号:1000-5404(2006)03-0201-04

论著

重组人A20蛋白在巴斯德毕赤酵母GS115中的表达

吴丽娟[1],蒋建新[1],朱佩芳[1],康格非[2] ([1]第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,全军交通医学研究所,全军交通医学实验室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042;[2]重庆医科大学检验系,重庆 40016)

提 要:目的 利用酵母表达技术制备重组人A20蛋白(rhA20),为进一步研究其在脓毒血症中的治疗作用奠定基础。**方法** 利用基因工程技术构建rhA20毕赤酵母表达载体yevCFP-hA20,电转化巴斯德毕赤酵母菌株GS115,筛选高拷贝阳性菌株,甲醇诱导表达rhA20。产物用SDS-PAGE和Western Blot鉴定。同时对诱导表达培养基的pH值和配方,以及培养环境温度等条件进行了优化研究。**结果** 表达产物分子量约93×10^3,表达条件的优化研究提示:降低诱导培养基pH值、添加低剂量EDTA、蛋白酶水解物和降低培养温度,可以使全长表达产物提高11倍,占总蛋白的18.24%,达到(254.10±24.52)μg/ml水平。**结论** 我们成功在巴斯德毕赤酵母GS115中表达了rhA20,通过对诱导培养基成分及诱导温度的优化,使全长rhA20表达得到明显提高,探索了人A20的生物合成途径,也为巴斯德毕赤酵母表达外源蛋白遭遇降解时的处理提供了新的方法。

关键词: A20;基因表达;巴斯德毕赤酵母;基因工程
中图法分类号: R341;R394-33;R394.3 **文献标识码:** A

Expression of recombinant human A20 in *Pichia pastoris* GS115

WU Li-juan[1], JIANG Jian-xin[1], ZHU Pei-fang[1], KANG Ge-fei[2] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042; [2] Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400046, China)

Abstract: Objective Human A20 is one of the endogenetic regulating proteins of inflammation *in vivo* and play important roles in preventing uncontrolled inflammatory response as well as endogenetic cellular protection. Our aim is to prepare a recombinant protein of human A20 (rhA20) in *Pichia pastoris* and then research its roles in sepsis therapy. **Methods** rhA20 yeast expression vector yevCFP-hA20 was constructed by genetic engineering. *Pichia pastoris* with linearized yevCFP-hA20 was electroporated. The high copy clones were screened with MD/His$^-$ medium and YPD/G418 gradient medium. The number of hA20 in yeast genome was detected by quantitative PCR. The rhA20 was expressed by methanol induction and identified by SDS-PAGE and Western blotting. The optimum conditions (including pH and ingredient of induced medium as well as the temperature of induced culture) were investigated. **Results** The molecular weight of rhA20 is about 93×10^3. After expression condition's optimization by decreasing the pH of BMMY medium, adding a low dosage of EDTA and the substrate of protease, as well as decreasing the induced temperature, the full expressing products was up to 11 times, rose to 18.24% in total protein and achieved to 254.1 024.52μg/ml. **Conclusion** we have successfully expressed rhA20 in Pichia pastoris GS115. The expression amount of full rhA20 increases clearly by progressing the ingredient and pH of BMMY and using a lower inducing temperature. This starts the biosynthesis of hA20 *in vitro*. A new solving regime is provided to other biologist when they meet product's degradation by using *Pichia pastoris* GS115.

Key words: A20; gene expression; *Pichia pastoris*; genetic engineering

人A20(human A20, hA20)是近年发现的一种内源性炎症调控蛋白,能够以负反馈方式调控炎症重要核转录因子NF-κB活性,参与炎症时核转录因子AP-1活性以及膜受体TLR4表达的调节,在预防炎症反应失控和保护组织细胞免受炎症损伤中发挥重要作用[1]。因此,许多学者认为A20可能是将来临床治疗炎症性疾病的新措施。本实验室在创伤感染失控性炎症反应研究中也证实,实验性动物体内存在A20表达

基金项目: 国家科技部创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室开放基金资助项目(2003)
Supported by the Open Found of State Key Laboratory of Trama, Burns and Combined Injury in Rationed Technology by Ministry of Science and Technology (2003)
作者简介: 吴丽娟(1965-),女,四川省成都市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事临床感染与免疫方面的医教研方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68757272,E-mail:wulijuan1638@126.com
通讯作者: 蒋建新,电话:(023)68757454,E-mail: jiangjx@cta.cq.cn
收稿日期: 2005-04-15;**修回日期:** 2005-09-05

不足的情况，提示适当外源性补充 A20 作为逆转失控性炎症反应的治疗措施是有理论根据的[2,3]。介于国内外以及我们的上述研究进展，近期本实验室利用毕赤酵母 GS115 研究 A20 的体外合成并取得了下述阶段性研究进展。

1 材料与方法

1.1 材料

TOPO-hA20 质粒[4]、穿膜肽融合蛋白毕赤酵母表达载体 yevCFP 作者自行构建（构建资料另文发表）。大肠杆菌 JM109 菌株为本实验室保存，基因型为 recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi △(lac-proAB) F′[traD36 proAB$^+$ lacI^q lacZ △M15]。限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ、*Sal* Ⅰ、*Bgl* Ⅱ和 *Sac* Ⅰ、小牛肠碱性磷酸酶（CIAP）、T4 DNA 连接酶、PCR 试剂盒、DNA 连接试剂盒购于 TaKaRa 公司。PCR 引物 1（5′-TAT TAT TGC CAG CAT TGC TGC-3′）和引物 2（5′-GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC-3′）的合成及基因测序在上海申能博彩生物科技公司完成。DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒、琼脂糖、氨苄青霉素（AP）为 Omega 产品。毕赤酵母菌株 GS115 购于 Invitrogen 公司，酵母培养基 YPD 粉、含琼脂 YPD 粉、SD 基础培养基、His$^-$ 氨基酸添加料、YNB 粉、D-葡萄糖粉、水解酪蛋白氨基酸购于 Clontech 公司。G418、生物素为 Sigma 产品。YPD 液体培养基、YPD 平板、MD 平板 MM 平板、BMGY 培养基、BMMY 培养基的制备按 Clontech 公司提供的说明书进行。

1.2 方法

1.2.1 yevCFP-hA20 表达质粒构建 具体实验操作参见文献[4]。LB 氨苄青霉素平板上长出来的阳性克隆，采用引物 1 和引物 2 做菌落 PCR 进行快速鉴定。

1.2.2 毕赤酵母 GS115 感受态的制备 采用醋酸锂/山梨醇法，详细方法参见 Invitrogen 公司说明书。

1.2.3 电转化与 MD/His$^-$ 平板筛选阳性转化菌株 吸取 50 μl 酵母菌感受态，加入质粒 DNA 3～5 μg。混匀，转入冰预冷的 0.2 cm 电转化杯，继续冰浴 5 min。使用 Bio-Rad Gene Pulser 电转仪，用 1 500 V 25 μF 200 Ω 条件进行电转化，之后立即加入 1 ml 冰预冷的山梨醇，用巴斯德吸管吹吸混匀，涂布于 MD/His$^-$ 营养缺陷平板，30 ℃培养 3～6 d。

1.2.4 G418 筛选高拷贝阳性菌株 向 MD/His$^-$ 营养缺陷平板上加入 1 ml 的 YPD 液体培养基，以推杆刮下菌细胞，并将其密度调至 10^6/ml。每个平板 100 μl 菌液，依次接种 YPD-G418 梯度平板（G418 梯度包括 0、1、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mg/ml），28～30 ℃培养 3～5 d。

1.2.5 毕赤酵母基因组 hA20 基因整合的定量分析 挑适量的毕赤酵母阳性转化子于 5 ml YPD 中，28～30 ℃ 250 r/min 培养 1～2 d，将 D(600) 调至 0.5，取 1.5 ml 菌液用试剂盒提取全基因组 DNA（方法见试剂盒说明书）。以制备的基因组为模板，采用定量 PCR 技术分析 hA20 基因在酵母基因组中的整合数（另文发表）。

1.2.6 rhA20 的诱导表达 将高拷贝菌株单克隆接种于盛有 10 ml BMGY 培养基的 100 ml 三角烧瓶中，30 ℃，250～300 r/min 振摇培养 16～18 h，使 D(600) 达到 5.0 以上。

将菌液转入盛有 10 ml BMGY 培养基的 100 ml 三角烧瓶中，25 ℃ 250～300 r/min 振摇培养 6～8 h，RT 2 000 × g 离心 5 min，收集菌体。重悬菌细胞于盛有 10 ml BMMY 培养基的 100 ml三角烧瓶中，25 ℃振摇培养 24 h。之后每 24 h 补充甲醇 1 次，每次 10 μl。共培养 4～6 d。

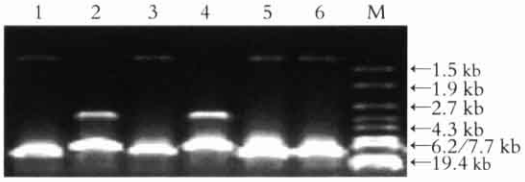
1.2.7 rhA20 表达的鉴定 诱导培养上清液总蛋白的定量测定采用 BCA 法（方法见试剂盒说明书），SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色和 Western Blot 按照《分子克隆》第 2 版相应章节进行，以凝胶全自动扫描仪测定表达的全长 rhA20 所占的百分比，根据诱导培养上清液总蛋白量和百分比计算全长 rhA20 的表达量。

1.2.8 rhA20 表达条件的优化 分别使用 pH 为 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 的 BMMY 培养基、含终浓度 1 pmol/L、1 nmol/L、1 mmol/L EDTA 的 BMMY 培养基、含终浓度 2%、5% 水解酪氨酸的 BMMY 培养基，在 20 ℃、25 ℃、28 ℃环境条件下进行诱导表达，观察 rhA20 的表达情况。

2 结果

2.1 yevCFP-hA20 表达质粒的构建与测序分析

通过基因工程操作，我们成功构建并收获了 yevCFP-hA20 表达质粒，测序表明其启动子下游依次排列的 α 外分泌肽、穿膜肽、连接肽、hA20 基因序列正确。图 1 为 hA20 基因插入方向鉴定的实验结果，提示 C3 和 C5 为正向插入质粒，其余为反向插入质粒。



1～6：为不同阳性菌株来源的 yevCFP-hA20 质粒；M：标准

图 1 yevCFP-hA20 阳性克隆插入方向鉴定的 1% 琼脂糖凝胶电泳结果

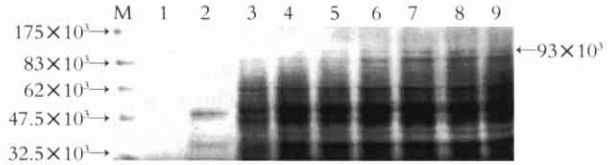
2.2 毕赤酵母 hA20 阳性转化子的筛选

用线性化 yevCFP-hA20 质粒电转化毕赤酵母 GS115 感受态后，经过 28 ℃ 3～6 d 的培养，在 MD/His$^-$ 缺陷平板上长出旺盛成片的菌落。盲法刮取上述菌落，经过适当稀释后接种 YPD-G418 梯度平板，继续 28 ℃培养 3～6 d，在含 2.0 mg/ml G418 及以上浓度的 YPD-G418 梯度平板上生出单个菌落。分别放大培养后提取其基因组，PCR 定量分析显示分别收获了 1、3、4、5、11、15 个拷贝的阳性转化子共 20 株。

2.3 毕赤酵母 GS115 表达 rhA20 及其表达产物的鉴定

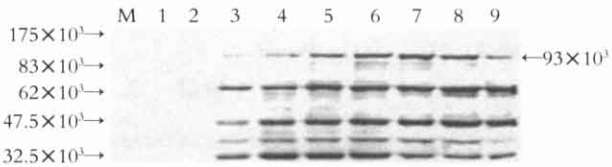
先用 BMGY 培养基对 GS115/yevCFP-hA20 菌株进行增菌，离心收集菌细胞后换用 BMMY 培养基进行甲醇诱导培养。图 2 为 rhA20 诱导表达的 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色结果，图 3 为同一批 SDS-PAGE 平行实验的 Western blot 结果，提示 rhA20 得到表达，但是出现几条分子量小于理论设计 rhA20 的条带，推测可能发生了不均一现象。表达的动态监测发现，诱导第 1 天、第 2 天、第 3 天、第 4 天、第 5 天、第 6 天和第 7 天的培养上清液总蛋白分别达（1.74 ± 0.06）、（1.80 ± 0.60）、（1.82 ±

0.06)、(1.88 ± 0.04)、(2.08 ± 0.12)、(1.97 ± 0.08) 和 (2.20 ± 0.19) mg/ml，其中全长 rhA20 分别占 0.1%、0.3%、0.5%、0.9%、1.1%、0.8% 和 0.6%，依次达到 (1.74 ± 0.06)、(5.40 ± 0.19)、(9.08 ± 0.30)、(16.95 ± 0.36)、(22.84 ± 0.17)、(15.79 ± 0.65) 和 (13.22 ± 1.13) μg/ml 水平，提示全长 rhA20 在诱导的第 5 天分泌量最高。



M：标准；1：GS115 诱导培养上清液；2：GS115/yevCFP 诱导培养上清液；3－9：GS115/yevCFP-hA20 从第 1 天至第 7 天的诱导培养上清液

图 2　rhA20 诱导表达上清的 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色结果

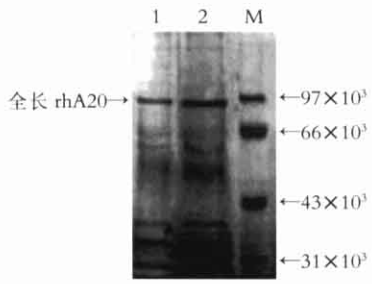


M：标准；1：GS115 诱导培养上清液；2：GS115/yevCFP 诱导培养上清液；3－9：GS115/yevCFP-hA20 从第 1 天至第 7 天的诱导培养上清液

图 3　rhA20 诱导表达的 Western blot 鉴定结果

2.4　rhA20 表达条件的优化

一系列表达条件的优化研究表明，采用 pH 5.0 的 BMMY 培养基，添加终浓度为 2% 的水解酪氨酸和 1.0 nmol/L 的 EDTA，在 25 ℃条件下进行诱导培养，第 5 天的培养上清液总蛋白达 (1.38 ± 0.13) mg/ml，全长 rhA20 高达 18.24%，绝对量达到 (254.10 ± 24.52) μg/ml 水平。该结果表明：在优化条件下进行诱导表达，毕赤酵母 GS115 分泌到培养上清液中的总蛋白质虽然有小幅下降，但是全长 rhA20 所占百分比明显大幅度提高，使全长 rhA20 的产量提高了约 11 倍。



1－2：不同 GS115/yevCFP-hA20 菌株的最适表达上清液；M：标准

图 4　优化表达 rhA20 的 SDS－PAGE 考马斯亮蓝染色鉴定结果

3　讨论

A20 在 TNF-α 诱导的内皮细胞凋亡研究中被发现[5]，但后来的研究表明，它是一种存在于细胞质中的内源性炎症调控蛋白和细胞保护性蛋白。病原微生物感染、TNF-α、IL-1 等都能使细胞内 A20 的表达增高，A20 通过抑制核转录因子 NF-κB、AP-1 的活性以及下调 TLR4 表达等机制，快速减弱甚至关闭体内的炎症反应，使 TNF-α、IL-1、IL-6 等炎性细胞因子的表达降低。A20 对 TNF-α 引起的组织细胞凋亡的保护作用是通过及时下调 TNF-α 水平，以及对凋亡信号转导途径 TRADD、RIP 与 TNF 受体 1 复合物之间相互作用的干预实现的。近年来，有关脓毒血症的研究表明，A20 在单核巨噬细胞、血管内皮细胞中的表达，可以下调细胞内 NF-κB 活性，保护细胞免于发生凋亡[2,3,6]。有关器官移植急性排斥反应的研究表明，移植物内 DC 细胞表达 A20 可以抑制 NF-κB 活性，促进 DC 细胞分化成熟，达到抑制急性排斥反应的效果[7]。肝细胞表达 A20，可以保护肝组织免于 D 半乳糖和 LPS 诱导的急性中毒性肝炎[2,3,8]。糖尿病时胰岛 β 细胞表达 A20 在于抵御凋亡的发生，且 A20 的表达水平与血糖水平呈正相关[9]。这些研究无疑进一步肯定了 A20 在临床炎症性疾病治疗中潜在的应用价值，探讨 A20 的体外合成方法势在必行。

酵母是一种单细胞低等真核生物，培养条件普通，生长繁殖迅速，用于表达基因工程蛋白质，具有翻译后加工能力，收获的表达蛋白具有一定程度上的折叠加工和糖基化修饰，性质较原核表达的蛋白质更加稳定，特别适合表达真核生物基因和制备有功能的表达蛋白，越来越受到人们的青睐。yevCFP 表达载体是在 PIC9K 质粒的基础之上进行修饰得到的一种用于表达穿膜肽融合蛋白的酵母表达载体，在 yevCFP 目的基因插入位点上游依次含有 α 外分泌肽和 TAT 序列，表达产物为 TAT 与目的基因的融合蛋白，并且可以直接分泌到培养液中[10,11]。研究中，我们以线性化 yevCFP-hA20 质粒转化巴斯德毕赤酵母 GS115 菌株，经过 G418 梯度培养基的筛选收获了 20 株 hA20 基因的阳性转化子，采用添加甲醇的方法进行了初步诱导表达，蛋白质免疫印迹证实 hA20 得到表达，但是表达蛋白出现不均一的情况。在表达条件优化研究中，发现降低诱导培养基 pH，向培养基配方中增加少量 EDTA 和水解酪氨酸，在较低的环境条件下进行表达，虽然酵母菌向培养基分泌的总蛋白有一定降低，但全长 rhA20 所占比例明显提高，产量为优化前的 11 倍，达到 (254.10 ± 24.52) μg/ml 水平。研究中还注意到，hA20 基因整合具有不稳定性，传代后容易发生 hA20 基因丢失，且 hA20 基因整合数为 11 和 15 的高拷贝菌株丢失 hA20 基因最快，提示在选择表达菌株时不能一味地追求高拷贝，外源基因整合数越多，给宿主带来的毒性也越大，菌株的稳定性减弱。阳性整合子丢失

现象在巴斯德毕赤酵母 GS115 表达其他外源基因中未有报道，推测与 hA20 基因具有的独特的连续串联排列的锌指结构有关。因此，如何对 hA20 基因进行改构增加其稳定性，筛选得到稳定高效表达菌株，将是我们下一步需要研究的内容。

参考文献：

[1] 吴丽娟，康格非．锌指蛋白 A20 及其对炎症反应的调控[J]．生命的化学，2004，24(3)：204－204.

[2] 刘 勃，蒋建新，朱佩芳，等．创伤合并内毒素攻击时小鼠肝组织锌指蛋白 A20 mRNA 表达的初步研究[J]．中华创伤杂志，2003，19(9)：532－535.

[3] 刘 勃，蒋建新，朱佩芳，等．锌指蛋白 A20 在创伤感染时对小鼠肝组织的影响[J]．中华实验外科杂志，2003，20(10)：897－899.

[4] 吴丽娟，蒋建新，朱佩芳，等．人 A20 基因 ORF 的克隆[J]．第三军医大学学报，2004，26(8)：658－662.

[5] DIXIT V M，GREEN S，SARMA V，*et al*. Tumor necrosis factor-alpha induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin [J]. J Biol Chem，1990，265(5)：2973－2978.

[6] ZHU C H，YING D J，MI J H，*et al*. The zinc finger protein A20 protects endothelial cells from burns serum injury[J]. Burns，2004，30(2)：127－133.

[7] XU M Q，WANG W，XUE L，*et al*. NF-kappaB activation and zinc finger protein A20 expression in mature dendritic cells derived from liver allografts undergoing acute rejection[J]. World J Gastroenterol，2003，9(6)：1296－1301.

[8] ARVELO M B，COOPER J T，LONGO C，*et al*. A20 protects mice from D-galactosamine/lipopolysaccharide acute toxic lethal hepatitis [J]. Hepatology，2002，35(3)：535－543.

[9] LAYBUTT D R，KANETO H，HASENKAMP W，*et al*. Increased expression of antioxidant and antiapoptotic genes in islets that may contribute to beta-cell survival during chronic hyperglycemia[J]. Diabetes，2002，51(2)：413－423.

[10] OHTANI W，OHDA T，SUMI A，*et al*. Analysis of *Pichia pastoris* components in recombinant human serum albumin by immunological assays and by HPLC with pulsed amperometric detection[J]. Anal Chem，1998，70(2)：425－429.

[11] 吴丽娟，蒋建新，朱佩芳，等．酵母表达系统及其应用研究[J]．生命的化学，2003，23(1)：46－49.

（编辑 王 红）

（上接 200 页）

后毒副作用：寒战发热 13 例，头痛 12 例，恶心呕吐 12 例，低钾血症 11 例，肝损害 10 例，肾损害 8 例，心肌损害、静脉炎各 6 例，贫血 4 例，白细胞血小板减少 3 例，神经毒性 2 例。14 例用 AMB 联合 5-FC 及氟康唑(FCZ)治疗(配合 AMB 鞘内注射)，痊愈 6 例，好转 8 例用药后毒副作用：寒战发热、静脉炎各 5 例，低钾血症 4 例，头痛、恶心呕吐、肾损害各 3 例，肝损害、心肌损害、白细胞血小板减少各 1 例。

2 讨论

隐球菌性脑膜炎是新型隐球菌侵犯脑膜引起的，以头痛发热，脑膜刺激征为主要表现。多数患者脑脊液压力增高，白细胞数轻到中度增高，以淋巴细胞为主，糖和氯化物降低，尤其糖的降低更显著。

本组资料显示发病年龄以 20～39 岁的青壮年为主，占发病总数的 75%。发病人群中以务农者最多见，占 39.3%～42.9%的病者有禽鸟类饲养或接触史者，隐球菌主要在鸽粪和被鸽类污染的土壤中大量存在。务农者与土壤等接触的机会较多，大多有饲养家禽的习惯，加上农村生活和卫生条件的限制，相对来讲易感染病原体。

隐球菌性脑膜炎易发生在免疫功能低下者[1]。本组资料显示 67.9%的患者既往有结核病、糖尿病等免疫功能紊乱的疾病，其中有部分(21.4%)曾经使用过激素，表明患者的免疫功能降低是易感因素之一。

脑脊液细菌学检查应反复多次，本组首次腰穿脑脊液墨汁染色阳性率为 53.8%，墨汁染色的阳性率较高，是主要的确诊方法。

新型隐球菌性脑膜炎的治疗主要是降颅压和抗真菌两个方面，常用的抗真菌药有 AMB、5-FC 和 FCZ。AMB 使膜的渗透性增加，膜内细胞质成分漏出，导致真菌细胞死亡。其主要副作用有：寒战、高热、心肌损害、低血钾症等。为了减低两性霉素 B 的毒性作用，近年来研制出两性霉素 B 脂质体(L-AMB)提高 AMB 对作用部位的选择性[2]。国内外报道应用 L-AMB 治疗的痊愈率为 67%～100%[3]。5-FC 对隐球菌有抑菌作用，高浓度时也能杀菌。主要是抑制嘧啶的代谢和核糖核酸以及蛋白质的合成。单独使用易使隐球菌产生耐药性，故临床上主要用于联合治疗。FCZ 能特异地抑制新型隐球菌的固醇合成，从而抑制该菌的生长及减弱其毒力，在脑脊液中能达到高浓度。本组资料提示：AMB 联合应用 5-FC 及 FCZ 较 AMB 联合 5-FC 治疗、痊愈率、好转率明显提高，毒副反应除静脉炎均显著减少($P<0.05$)。这与 AMB 联合应用 5-FC 和 FCZ 可提高疗效并且减轻药物的毒副反应的报道相符[4]。至于 AMB 联合 5-FC 治疗(配合 AMB 鞘内注射)，死亡率过高，除未联合应用 FCZ 的因素外，可能还与就诊较晚，发生严重脑水肿和脑疝有关。所以早诊断、早治疗是痊愈、好转的关键。

关键词：隐球菌性脑膜炎；墨汁染色；两性霉素 B；5-氟胞嘧啶；氟康唑；两性霉素 B 脂质体

中图法分类号：R512.39 文献标识码：B

参考文献：

[1] 张卓然．临床微生物学和微生物检验[M]．第 3 版．北京：人民卫生出版社，2003：333－335.

[2] 卢育宽，章婉琴，朱利平，等．两性霉素 B 脂质体治疗新型隐球菌脑膜炎 9 例[J]．中国医师杂志，2001，3(12)：944－945.

[3] WEI H，HAI W，WANQING L. Clinical study on liposomal amphotericin B (Ambisome) in deep fungal infections in China[J]. Mycoses，2003，46(1－2)：24－28.

[4] 谢春英，李建国，谢仕斌，等．两性霉素 B 和 5-氟胞嘧啶合用对隐球菌脑膜炎患者外周血象的影响[J]．中国临床药学杂志，2001，10(1)：6－83.

（编辑 周 芳）