

芜菁夜蛾斯氏线虫 G26 侵染期幼虫 cDNA 文库的构建及表达序列标签分析

马娟¹, 张军鸽^{1,2}, 李秀花¹, 李敏权², 陈书龙¹

(1. 河北省农林科学院 植物保护研究所, 河北省农业有害生物综合防治工程技术研究中心, 河北 保定 071000;

2. 甘肃农业大学, 甘肃 兰州 730070)

摘要:本研究以芜菁夜蛾斯氏线虫 *Steinernema feltiae* G26 的侵染期幼虫为材料, 利用 SMART (Switching mechanism at 5' end of RNA transcript) 技术, 构建了其 cDNA 文库, 得到原始文库的库容为 3.7×10^8 cfu/mL。随机挑取 450 个克隆, 测序获得 386 条质量较好的序列, 插入片段多在 0.3~3 kb 之间。将 EST 序列进行同源性比对, EST 中有注释信息的占 95.92%, 无注释信息的 4.08%。蛋白功能分析表明所得 EST 包括核糖体蛋白类, 调节因子, 信号传导相关基因, 代谢酶类等。此全长 cDNA 文库的构建成功, 为阐明侵染期抗逆性幼虫形成与发育机制以及抗逆代谢机理等提供了重要理论依据。

关键词: 昆虫病原线虫; SMART 技术; cDNA 文库

中图分类号: S432.4⁺5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2008)06-0072-05

Construction of the cDNA Library from IJs of *Steinernema feltiae* G26 and Analysis of Expressed Sequence Tags

MA Juan¹, ZHANG Jun-ge^{1,2}, LI Xiu-hua¹, LI Min-quan², CHEN Shu-long¹

(1. Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences IPM, Centre of Hebei Province, Baoding 071000, China; 2. Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Entomopathogenic nematodes (EPN) is a new type of bio-pesticide which has great potential for controlling many important agricultural pests. The infective juveniles (IJs) play an important role in its commercialization. A full-length cDNA library from IJs of *Steinernema feltiae* G26 was constructed using SMART techniques. The titer of primary cDNA library was 3.7×10^8 cfu/mL. Sequencing and sequence similarity searches were performed to analyze the profile of expressed sequence tags (ESTs). 386 qualified sequences were obtained from 450 clones, the insert size ranged from 0.3 - 3.0 kb. ESTs sequences similarity was compared in non-redundancies database of GenBank. The results showed that 4.08% ESTs had none homology and these which had high homology included ribosomal protein, translation elongation factor, signal transduction gene, metabolize enzyme and so on. Therefore, a cDNA library of *Steinernema feltiae* G26 has been successfully constructed. It provides basic information for understanding the mechanisms on formation, development and persistence of IJs.

Key words: Entomopathogenic nematodes; SMART techniques; cDNA library

携带共生菌的斯氏属 (*Steinernema* spp) 与异小杆属 (*Heterorhabditis* spp) 昆虫病原线虫是一类新型的生物杀虫剂, 因其具有众多的优良特性在农业害虫防治中具有广阔的应用前景^[1], 侵染期幼虫是昆

虫病原线虫能够在自然环境中存活的唯一阶段。因此, 研究昆虫病原线虫侵染期幼虫基因表达对了解其代谢途径及其商品化生产具有十分重要的意义。cDNA 文库在基因分离、克隆及筛选新基因中具有

收稿日期: 2008-07-10

基金项目: 国家自然科学基金 (30671409); 公益性行业科技专项 (nyhyzx07-050-12); 国家科技支撑计划 (2006BAI06A10-3)

作者简介: 马娟 (1981-), 女, 河北保定人, 研究实习员, 硕士, 主要从事农业线虫研究。

通讯作者: 陈书龙 (1963-), 男, 河北保定人, 研究员, 博士, 主要从事线虫学研究。

重要作用,是发现新基因和研究基因功能的基础工具^[2]。目前国内外对线虫方面的研究主要集中于动植物寄生线虫和自由生活线虫^[3],Blaxter 等^[4]通过对 21 000 个 EST 分析获得了 *Brugia malayi* 的 7 000 个基因;现已通过对 *C. elegans* 抗逆性幼虫恢复发育过程中的基因表达研究发现控制其抗逆性幼虫产生的基因 35 个,Inoue 等^[5]对抗逆性幼虫形成的基因控制途径作了简要描述。然而对昆虫病原线虫进行的研究远远低于模式种的程度。昆虫病原线虫的生长发育是一个复杂的生理过程,特别是抗逆性幼虫的形成。不同基因之间相互作用使得抗逆性幼虫产生的机制相当复杂^[6]。Zitman-Gal 及 Tyson 等^[7,8]报道了干旱诱导的部分 ESTs,Sandhu 等^[9]对 *Herorhabditis bacteriophora* 的抗逆性幼虫的 EST 进行了分析,但有关斯氏昆虫病原线虫侵染期线虫的 ESTs 系统研究尚未见报道。本研究采用 SMART 技术构建了昆虫病原线虫 *S. feltiae* G26 的 cDNA 文库,对部分 cDNA 克隆进行了测序,并比较了其 GenBank 中登录基因的同源性。文库的成功构建,不仅保存了珍贵的昆虫病原线虫基因资源,而且对于有明确功能的特异基因的克隆、表达以及新基因的克隆与功能研究进而为调控侵染期幼虫形成及发育奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验线虫种群 茼蒿夜蛾斯氏线虫 *Steinemema feltiae* G26,本实验室保存。

1.1.2 试剂及菌株 UNIQ-10 柱总 RNA 抽提试剂盒,二乙基焦碳酸盐(DEPC)为上海生物工程有限公司产品;CreatorTM SMARTTM cDNA Library Construction Kit 购自 Clontech 公司,DNA 分子量标准、Taq DNA 聚合酶、感受态大肠杆菌(*E. coli* DH5)购自 TaKaRa 公司;其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 *S. feltiae* G26 无菌侵染期线虫的制备 收集生长一致的 *Steinemema feltiae* G26 线虫的无菌卵^[10],于人工固体线虫培养基上培养(猪油 10 g,猪肠 20 g,大豆粉 20 g,玉米粉 20 g,酵母粉 10 g,蛋黄粉 5 g,琼脂粉 15 g,加蒸馏水至 1 000 mL),待其生长至侵染期幼虫时用无菌水洗出,1%链霉素处理 6 h 进行体表消毒,无菌水洗净,收集虫体,液氮处理后放入 -80℃ 冰箱备用。

1.2.2 侵染期线虫总 RNA 的提取和质量检测 从 -80℃ 冰箱取出准备好的线虫,在液氮中研磨至粉

末状后,按 UNIQ-10 柱总 RNA 抽提试剂盒操作说明提取总 RNA。经变性琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。用分光光度计检测其含量和纯度。

1.2.3 cDNA 文库构建

1.2.3.1 双链 cDNA 的合成及纯化 按照 CreatorTM SMARTTM cDNA Library Construction Kit 试剂盒操作程序进行第一链及第二链合成。以 3 μL 总 RNA(含量为 0.5~1.0 μg)为模板反转录合成第一链 cDNA,长距离 PCR(LD-PCR)法合成 dscDNA,并进行蛋白酶 K 消化。将上述所得 cDNA 进行 *Sfi* I 酶切后过 CHROM A SPIN-400 柱分级分离,共收集 16 管,每管取 3 μL 收集液用 1.1%TAE 琼脂糖凝胶电泳检测。合并 cDNA 片段大于 400 bp 的收集液,并进行纯化。

1.2.3.2 cDNA 片段与载体 pDNR-LIB 的连接和电转化 纯化后的 cDNA 片段与载体 pDNR-LIB 的连接反应体积比分别采用 1:1 和 1.5:1,16 连接 16 h 后进行电转化,采用 0.2 cm 电极杯,在 2 500 V 下电转,脉冲时间为 4.6 s。电击后,迅速用 0.9 mL SOC 洗出转化产物,37℃ 摇菌复苏 1 h,得到的菌液即为原始文库。

1.2.3.3 文库的初步鉴定 从 cDNA 原始文库中分别取 1 μL 进行稀释,得稀释倍数分别为 10¹,10²,10³ 的悬液,再分别取 100 μL 稀释液,均匀地涂在含 30 μg/mL 氯霉素的 LB 平板上,每个倍数设一个重复。37℃ 培养过夜后分别统计菌斑的个数,检测文库滴度。文库滴度(pfu/mL) = (菌斑数 × 稀释倍数) / 转染的培养液体积。

随机挑取 46 个单菌落,37℃,180 r/min 摇菌过夜培养后,用 M13 引物进行 PCR 检测插入片段的大小及重组效率。扩增条件为:94℃,5 min;94℃,30 s,55℃,30 s,72℃,2 min,35 个循环;72℃,延伸 10 min。扩增产物用 1.1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3.4 文库的扩增和保存 将原始文库按每板 1 500~2 000 个克隆涂布于含 30 μg/mL 氯霉素的 LB 平板上(d=150 mm),37℃ 过夜培养,用以扩增文库,每板用 2 mL 文库保存液(含有 25%甘油的 LB 液体培养基)洗脱菌落,每板一管。将收好的菌液分装,放 -80℃ 冰箱冻存。

1.2.3.5 DNA 测序 将获得的文库稀释,进行梯度试验,选出最佳稀释浓度,在 LB 固体培养基上涂板。37℃ 培养 12~16 h,直至长出菌落。挑取克隆进行测序。cDNA 序列由 5'端方向测序,单向测序引物序列为:5'-TCCGAGATCTGGACGACGAGC-3'。

1.2.3.6 EST 序列分析 所得序列经过 DNAMAN 和 clustalW 分析,去除重复序列,并提交 NCBI 即 U-

niVec 数据库,除去序列两端载体序列和接头序列后,利用 BLAST 软件,将 EST 序列与 GenBank 的 uni-gene 库序列进行同源性比对分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取

总 RNA 经 1.2 % 琼脂糖凝胶电泳检测,28 S rRNA 和 18 S rRNA 2 条带清晰完整(图 1),分光光度计测得总 RNA 在 260 和 280 nm 波长下 $OD_{260}/OD_{270} = 1.97$,说明 RNA 完整性及纯度较好,可以用于构建 cDNA 文库。

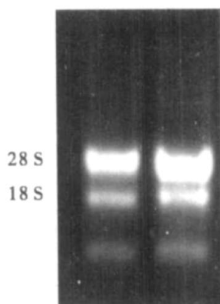
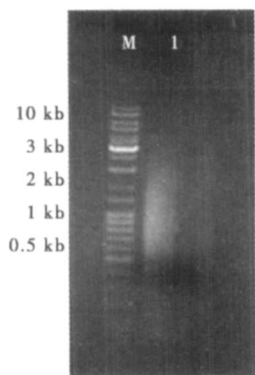


图 1 总 RNA 电泳

Fig.1 Electrophoresis of total RNA

2.2 LD-PCR 合成 ds cDNA 及 cDNA 片段的分级分离

取 5 μ L LD-PCR 合成产物在 1.1 % TAE 琼脂糖凝胶上进行电泳分析,如图 2,双链 cDNA 在 0.1 ~ 10 kb 范围内弥散,表明合成的 cDNA 是比较完整的。将 ds cDNA 过 CHRO-MASPIN-400 柱,可使小于 400 bp 的片段和大片段分开,取较大的片段用于建库,以提高文库的质量。电泳检测可看到 400 bp 以上的片段集中在 6 ~ 9 泳道所代表的收集管内,收集 6 ~ 9 三管过柱液用于连接。



M. 10 kb ladder; 1. cDNA of II₅.

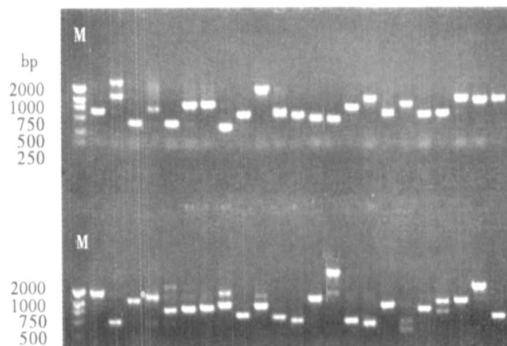
图 2 PCR 扩增的双链 cDNA

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of LD-amplified cDNA

2.3 文库的初步鉴定

将过柱收集的 cDNA 片段与质粒载体 pDNR-LIB 连接后,转化到受体菌 DH5 构建成 cDNA 文库。经

平板计数得到该文库的滴度为 3.7×10^8 cfu/mL。随机挑取原始文库中的 46 个克隆进行 PCR 检测,插入片段多在 0.4 ~ 3 kb 之间(图 3),46 个克隆的插入序列中 80 % 的克隆插入片段大于 500 bp。



M. DL2000;其他泳道为 cDNA 克隆 PCR 产物。

M. DL2000 DNA ladder; Others are clones from the cDNA library.

图 3 cDNA 文库插入片段 PCR 检测图

Fig. 3 PCR check of some clones from the cDNA library

2.4 EST 序列

随机挑取 450 个克隆进行 5' 端测序,去除载体序列及低质量的序列后,共计测得 386 条 cDNA 序列。利用 BLAST 软件进行同源性比对分析,BLASTn 结果表明 30 % 序列与基因库中已知基因同源性较低。配准功能已知基因大部分来源于 *Caenorhabditis elegans*, *C. briggsae*, *Brugia malayi*, *Necator americanus*, *Tetrahymena thermophila* 等。经 BLASTx 分析,386 条 EST 中有注释信息的占 95.92 %,无注释信息的 4.08 %。这些序列通过生物信息学信息比对没有获得任何注释信息,其中有一些可能是昆虫病原线虫的特异基因序列。

蛋白功能分析表明,所得 EST 中核糖体蛋白类(Ribosomal protein)占测序数目的 7.8 %。核糖体在生物进化过程中具有重要的地位,越来越多的证据表明,许多核糖体蛋白除组成核糖体、参与蛋白质生物合成之外,亦具有其他的功能^[11]。推测其部分基因与线虫抗逆性形成可能相关。参与物质代谢、能量代谢的基因所占比例也较高,占 19.4 %。部分基因与蛋白质加工,信号传导,亚细胞水平定位等有关(图 4)。此外一部分基因为推测功能,其在线虫生长、发育过程中的重要作用须进一步研究。这部分序列有着潜在的价值,是以后研究的重点。表 1 为部分 EST 的 BLASTx 结果。

所得 EST 包括 5 个热激蛋白,大量的研究资料表明,热休克能够保护细胞、组织及动物体经受随之而来的在通常情况下能够致死的热伤害以及其他有害刺激如缺氧等。如有报道表明,热休克能够保护人胃细胞腺毒症引起的损伤^[12]。本研究试验材料

为对不良环境抗性较强的侵染期线虫,这些 hsp 基因的高丰度表达可能是在营养缺乏条件下,线虫应激产生大量 HSPs,正常发育情况下一些蛋白合成受到抑制。经 DNAMAN 分析序列,根据蛋白保守区设计引物 Hp5-2:CTTGACAAGATYCGNTACCAG 及 Hp3:5-TCTTGAAGITGICC TTGICCTC-3,通过 PCR 扩增

得到昆虫病原线虫 *S. feltiae* G26 的 HSP90 序列,将重叠片段进行拼接,得到其全长为 2 283 bp。经 DNAMAN 分析,*S. feltiae* G26 的 HSP90 与 *C. briggsae* AF16,*B. pahangi*,*C. elegans*,*H. glycines* 蛋白相似性分别为 85.55 %,84.40 %,85.16 %,84.13 %。

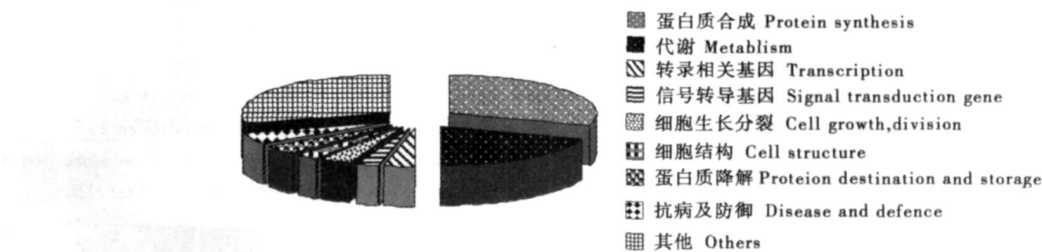


图 4 cDNA 文库 EST 分类

Fig. 4 Functional categories of selected sequences

表 1 cDNA 文库部分序列 BLASTx 结果

Tab. 1 The BLASTx result of part cDNA

克隆号	基因登陆号 Subject id	同源功能蛋白名称 Protein name	蛋白来源 Source	相似度 % Identity
B87	gi 3096951 emb CAA06694. 1	Heat shock protein 90	Brugia pahangi	85
B561	gi 17507981 ref NP-492485. 1	Heat Shock Protein family member (hsp-70)	Caenorhabditis elegans	57
B574	gb AAO14563. 2	AF461150-1 Hsp90	Heterodera glycines	78
B53	gi 156706 gb AAA28298. 1	Heat shock protein 70	Dirofilaria immitis	82
B822	gi 2258416 gb AAC98796. 1	Dolichol monophosphate manrose synthase	Caenorhabditis briggsae	79
B47	gi 17563948 ref NP-504635. 1	Gastrulation Defective family member (gad-1)	Caenorhabditis elegans	64
B35	gi 71652374 ref XP-814845. 1	DNA repair protein RAD50	Trypanosoma cruzi strain CL Brener	48
B388	gi 6225752 sp P70011 NDKA2-XENLA	Nucleoside diphosphate kinase A2 (NDKA2) (NDP kinase A2)	NM23/ nucleoside diphosphate kinase A2	67
B489	gi 6118375 gb AAF04101. 1 AF188206-1	IgGimmunoreactive zinc finger protein	Strongyloides stercoralis	69
B154	gi 49146530 ref YP-026090. 1	NADH dehydrogenase subunit 5	Steinemema capocapsae	52
B67	gi 17554748 ref NP-498774. 1	Ribosomal Protein Large subunit family member (rpl-21)	Caenorhabditis elegans	66
B175	gi 17554628 ref NP-497772. 1	AMine oXidase family member (amx-1)	Caenorhabditis elegans	50
B105	gi 15554330 gb AAL02033. 1	Chloramphenicol acetyl transferase	Template plasmid pKD3	53
B259	gi 17568359 ref NP-509939. 1	Fourteen Three-Three family member (fit-2)	Caenorhabditis elegans	94
B806	gi 17508693 ref NP-492384. 1	Ribosomal Protein Small subunit family member (rps-15)	Caenorhabditis elegans	77
B795	gi 71992922 ref NP-001024752. 1	FMRF-Like Peptide family member (flp-11)	Caenorhabditis elegans	65
B520	gi 17562738 ref NP-504455. 1	Nuclear Hormone Receptor family member (nhr-47)	Caenorhabditis elegans	66
B821	gi 49146525 ref YP-026085. 1	Cytochrome c oxidase subunit III	Steinemema capocapsae	85
B808	gi 17508217 ref NP-490842. 1	SUMO (ubiquitin-related) homolog family member (smr-1)	Caenorhabditis elegans	85
B530	gi 17555946 ref NP-499447. 1	RSKpSeventy (RSKp70 kinase) homolog family member (rsk-1)	Caenorhabditis elegans	85

3 讨论

RNA 是影响 cDNA 文库质量的关键因素,如果 mRNA 链过长或存在大量的二级结构,逆转录酶往往会提前终止转录作用,使 mRNA 反转录不完全,cDNA 长度不足,使文库质量下降。本试验按 UNIQ-10 柱总 RNA 抽提试剂盒操作说明,并稍作改进,提取到质量较好的 RNA,为下一步试验做好准备。本研究使用的 SMART 技术利用逆转录酶的特性,在反转录到 cDNA 5 帽子结构时将 SMART 引物转录到 cDNA 5 端,从而保证 PCR 扩增出来的基本上是全

长 cDNA。cDNA 插入子片段大小分布于 0.4~4 kb,表明文库构建是成功的。从滴度、阳性克隆率、克隆插入片段大小等文库评价标准来讲,可以满足 EST 研究要求。这为今后以该文库进行相关基因的筛选奠定了基础。所建 cDNA 文库中许多涉及生命活动的蛋白序列有着潜在的价值,是以后研究的重点,不仅可以帮助我们寻找有应用研究前景的功能新基因,而且可以帮助我们了解昆虫病原线虫的生命特征,为基础研究提供有价值的线索。目前国内外对植物、家禽、细菌等 EST 进行了大量研究,线虫方面对于动植物寄生线虫和自由生活线虫研究较多,对

昆虫病原线虫进行的研究还不深入^[13,14]。本研究全长 cDNA 文库测序获得的大量 EST,对于理解昆虫病原线虫重要性状的分子基础和利用公用数据库中相关信息都具有重要的意义。其分析结果可为基因表达谱构建、阐明抗逆性幼虫形成与发育机制以及抗逆代谢机理等提供重要信息。对于解决线虫制剂田间防效不稳定、保存时间不长等生产中的实际问题亦具有指导意义。为了更系统、详尽地了解昆虫病原线虫抗逆性幼虫形成过程所发生的基因转变,还需要进一步扩大文库筛选的规模,加强生物信息学分析,以得到更多有生物学意义和应用价值的克隆。

EST 数据库是发现新基因的一种高效快速的方法,还可提供特定时期特异组织的基因表达信息。但文库构建过程中,进行 EST 测序时也会遇到如重复基因多、稀有基因不易测到、确定所获 EST 与研究特定功能的相关性难度较大等问题,因此今后试验如进一步引入均一化文库或差减文库的构建方法,以及高通量的文库筛选方法能够使其补充和完善,能较快地获得一些抗逆或其他相关基因的片段,用于进一步的研究工作。

现今公用数据库中 EST 数据的急剧增加,基因表达研究可以利用数字化分析方法来实现^[15,16],即从能够代表相应组织或器官基因表达情况的 cDNA 文库中获得大量 EST,经过软件聚类拼接后依据代表基因的 EST 及其出现频率的信息进行基因表达分析。目前公共数据库中功能已知的线虫抗性基因不够全面,所以还必须结合其他的试验方法来证明 EST 在某一代谢中的作用,从而可以分析推测可能的抗性机制。本研究通过对文库部分 ESTs 进行测序和与已知功能基因蛋白同源性分析,对昆虫病原线虫抗逆性幼虫部分特异性表达的基因进行了初步探讨。对 cDNA 文库间序列数据差异的生物信息学分析是对 cDNA 文库有效利用的有益尝试,尽管我们所测部分序列不足以代表整个基因表达情况,但在需要时将重要 EST 所在克隆测序,充分利用现有数据库资料,或可以提供更多有益信息。

参考文献:

- [1] Hartelt K, Wurst E, Collatz J, et al. Biological control of the tick *Ixodes ricinus* with entomopathogenic fungi and nematodes: Preliminary results from laboratory experiments [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2008, 298 (1): 314 - 320.
- [2] Wan K H, Yu C, George R A, et al. High-throughput plas-
- mid cDNA library screening [J]. Nature Protocols, 2006, 1 (2): 624 - 632.
- [3] Nisbet A J, Redmond D L, Matthews J B, et al. Stage-specific gene expression in *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda: Strongylida) infective larvae and early parasitic stages [J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 2008, 159 (2): 98 - 103.
- [4] Blaxter M, Aslett M, Guiliano D, et al. Parasitic helminth genomics [J]. Parasitology, 1999, 118: 39 - 51.
- [5] Inoue T, Thomas J H. Suppressors of transforming growth factor pathway mutants in the *Caenorhabditis elegans* dauer formation pathway [J]. Genetics, 2000, 156: 1035 - 1046.
- [6] Wang J, Kim S K. Global analysis of dauer gene expression in *Caenorhabditis elegans* [J]. Development, 2003, 130: 1621 - 1634.
- [7] Tyson T, Reardon W, Browne J A, et al. Gene induction by desiccation stress in the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* reveals parallels with drought tolerance mechanisms in plants [J]. International Journal for Parasitology, 2007, 37: 763 - 776.
- [8] Zitman Gal T, Gazer I, Koltai H. Differential gene expression during desiccation stress in *Steinernema feltiae* IS6 and *Caenorhabditis elegans* nematodes [J]. Parasitology, 2003, 89: 761 - 766.
- [9] Sandhu S K, Jagdale G B, Hogenhout S A, et al. Comparative analysis of the expressed genome of the infective Juvenile entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora* [J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 2006, 145: 239 - 244.
- [10] Strauch O, Ehlers R U. Food signal production of *Photorhabdus luminescens* inducing the recovery of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. in liquid culture [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 50 (3): 369 - 374.
- [11] Wool I G. Extraribosomal functions of ribosomal proteins [J]. Trends in Biochemical Sciences, 1996, 21 (5): 164 - 165.
- [12] Villa A, Pédine P, Clegg D O, et al. Intracellular Ca^{2+} stores in chicken Purkinje neurons: differential distribution of the low affinity-high capacity Ca^{2+} -binding protein, calsequestrin of Ca^{2+} -ATPase and of the ER Luminal protein [J]. Cell Biology, 1991, 113: 779 - 791.
- [13] 崔汝强, 廖金铃, 卓侃, 等. 植物寄生线虫发育基因的研究进展 [J]. 华中农业大学学报, 2008, 27 (3): 456 - 461.
- [14] 刘明星, 丘雪红, 赵园园, 等. 昆虫病原线虫感染期幼虫恢复发育的研究进展 [J]. 昆虫学报, 2008, 51 (2): 197 - 203.
- [15] Li X Q, Griffiths R, De Koeyer D, et al. Functional genomic resources for potato [J]. Canadian Journal of Plant Science, 2008, 88 (4): 573 - 581.
- [16] Audic S, Claverie J M. The significance of digital gene expression profiles [J]. Genome Research, 1997, 7: 986 - 995.