

质谱技术在蛋白质组研究中的应用

刘建军 庄志雄 邓平建 房师松 赵锦

深圳市疾病预防控制中心微生物检验科,深圳 518020

摘要:电喷雾电离(ESI)和基质辅助激光解吸电离(MALDI)是最近发展起来的生物质谱技术,本文概述生物质谱技术在蛋白质组研究中分子质量的测定、蛋白质全谱分析、肽指纹谱测定、肽序列测定等方面的应用。方法灵敏、准确、快速,而且可实现高通量和自动化。它们已成为蛋白质组研究的关键性支撑技术,对蛋白质组的研究和分析具有重要意义。

关键词:质谱 蛋白质组 应用

中图分类号: 文献标识码:A

Application of mass spectrometry in the proteome research

Liu Jianjun, Zhuang Zhixiong, Deng Pingjian, Fang Shisong, et al.

Department of Microbiology Test, Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China

Abstract: Electrospray ionization (ESI) and matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) are two kinds of newly-developed mass spectrometry techniques. The application of mass spectrometry is described in the proteome research such as MS charting, determination of molecular weight, peptide mass fingerprinting (PMF) and peptide sequence validation. The advantages of mass spectrometry are sensitive, accurate, rapid, high-throughput and automated. They have been proved a powerful technique and can be used as an important method for proteome research.

Key words: mass spectrometry, proteome, application

蛋白质组的概念是由澳大利亚的科学家 Wilkins 和 Williams 于 1994 年提出的^[1]。它是指某一物种、个体、器官、组织、细胞乃至体液在精确控制其环境条件之下,特定时刻的全部蛋白质表达图谱。近年来,蛋白质组的研究已成为目前国际上的前沿和热点领域^[2-4]。蛋白质组研究的核心是系统识别一个细胞或组织中表达的每一个蛋白质,以及确定每个蛋白质的突出特征。其分析技术包括分离蛋白质和肽的分离科学、识别和定量分析物的分析科学和数据管理及分析的生物信息学。它的系统分析工具包括使用分辨率高、重复性好的双向凝胶电泳(2DE),结合质谱(MS)和数据库检索来分离、识别和定量一个混合物中存在的个体蛋白质,最终鉴定被分离的蛋白质。因此,从方法上来讲,蛋白质组的研究是对组织或细胞内蛋白质进行大规模的分离和分析。分离方法采用 2DE,可以同时分离组织或细胞内上千种蛋白质,这样大的分离规模,对蛋白质的分析鉴定是一个很大的挑战,传统的序列分析方法虽然直接而精确,但分析速度慢,难以适应蛋白质组研究的需要。近年来质谱技术在生物大分子中的广泛应用和发展^[5,6],为蛋白质组的分析鉴定提供了快速、准确、灵敏和高通量的检测方法,它已成为蛋白质组研究中主要的支撑技术^[7,8]。本文主要概述质谱技术在蛋白质组研究中的应用。

1 质谱技术简介

作者简介:刘建军,女,硕士研究生,副主任技师

伴随电喷雾电离(ESI)和基质辅助激光解吸电离(MALDI)两项具有划时代的“软电离”技术的出现,各种新质谱技术不断涌现。从而使质谱技术真正走入了生命科学的研究领域,并得到迅速发展。

1.1 电喷雾电离技术

电喷雾电离利用位于一根毛细管和质谱仪进口间的电势差生成离子,在电场的作用下产生以喷雾形式存在的带电液滴,当使用干燥气或加热时,溶剂蒸发,液体体积缩小,最终生成去溶剂化离子。电喷雾电离的特点是可生成高度带电的离子而不发生碎裂,这样可将质荷比(m/z)降低到各种不同类型的质谱仪都能检测的范围,离子真实分子质量可根据质荷比及电荷数算出。尽管 ESI 允许使用少量缓冲液、盐和去垢剂,但这些物质可能与待测物形成加合物,导致产生难以辨认的分子量或抑制待测物离子的形成。因而最佳的离子形成是在无缓冲液、无盐和去垢剂的情况下。ESI 的一大优势是可方便地与分离技术联用,例如在使用 ESI 离子化前使用高效液相色谱(HPLC)和毛细管电泳(CE)可方便地去除待测物中的杂质。

1.2 基质辅助激光解吸电离技术

以有紫外吸收的小分子晶体为基质,将待测物分散在基质分子中形成晶体。当用激光照射晶体时,由于基质分子吸收辐射光能量,导致能量聚集并迅速产热,从而使基质晶体升华而将非挥发性待测物释放到气相中。MALDI 是以脉冲离子化方式使样品电离,它常与飞行时间质谱(TOF-MS)联用,称

为基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)。为了提高检测精确度,研制出了反射飞行时间质谱和延迟飞行时间质谱。MALDI-TOF-MS具有以下几个特点:

(1)能耐受较高浓度的缓冲溶液、盐和去垢剂。

(2)MALDI主要生成带单电荷离子,因而质谱图中的离子与混合物中的肽和蛋白质的质量有一一对应关系。

(3)方法简便、快速、分析测定在5min内即可完成;混合样品不需要分离,非常适合蛋白质组研究快速大规模高通量筛选。

(4)灵敏度高,可达 10^{-15} fmol;质量范围广,可测定 $M_r < 100 \sim 980000$ Da。

(5)结果准确。质量精度:内标法优于 $\pm 0.01\%$ 相对误差,外标法优于 $\pm 0.1\%$ 相对误差。

(6)自动化程度高,应用工作站和自动控制软件,不仅提高重现性并可实现无人操作。

1.3 杂交质谱技术

杂交质谱是在液相色谱—电喷雾—三级四极串联质谱仪的基础上,采用飞行时间质量分析器代替最后一个四极杆质量分析器,形成液相色谱—电喷雾—四极杆飞行时间串联质谱仪(称Q-TOF或QQ-TOF),从而大大提高了仪器的分辨率、灵敏度和质量分析范围。它与MALDI-TOF-MS一起,已成为生命科学研究中强有力的分析技术和手段。

1.4 MALDI-TOF-TOF-MS

这是最新型的生物质谱技术,和单级的MALDI-TOF相比,精度更高,信息量更广。目前是蛋白质组研究中最有力的工具。

2 蛋白质、多肽分子质量的检测

蛋白质、多肽的分子质量是一个重要的参数,是蛋白质、多肽识别与鉴定中首先需要测定的参数,分子质量正确与否往往代表着所测定的蛋白质结构正确与否或者意味着一个新蛋白质的发现。而目前常规应用于测定蛋白质分子质量的方法,例如凝胶电泳法、高效凝胶色谱法或超速离心法,不但样品用量较多,操作较繁且误差大(误差为 10%),使蛋白质分子质量的估计不可靠。新的质谱电离技术,尤其是电喷雾电离质谱(ESI-MS)和基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI-MS),测定分子量的准确度高达 $0.1\% \sim 0.001\%$,这是目前任何其它技术都未能达到的。ESI质谱是由一系列不同程度质子化的分子离子峰组成的,相邻两个峰只相差一个质子,每个峰都可以给出分子量,一组峰则可以给出分子量的平均值。因此,ESI-MS可用来准确地和高灵敏地确定多肽与蛋白质的分子质量。ESI-MS在测定时蛋白质分子都高度质子化,在仪器有限的 m/z 范围内仍能测定相当大的蛋白质分子(高达 400000 Da)。MALDI技术在测定蛋白质、多肽分子质量时比ESI更优越,测定的分子量更大,可高达 980000 Da。预计在今后相当长的时期内蛋白质、多肽分子质量的准确测定仍将是生物质谱的一个重要应用。

3 蛋白质全谱分析

质谱蛋白全谱分析指的是组分分析,它的对象是完整的组织、体液或其提取物,其目的在于识别出尽可能多的肽和蛋白混合物中的组分。蛋白质全谱分析中,测得未破坏的组分

的分子质量,并和已知或预期的蛋白分解产物的相应分子质量比较。九年前,Gottfried等人最早使用质谱分析内分泌组织中的神经肽。通常,质谱蛋白全谱分析并不要求将蛋白样品从混合物中分离出来,这样,便可节省大量的时间和精力。因为,理想上,研究人员都想不经任何分离,用组织直接做质谱蛋白全谱分析。质谱蛋白全谱分析只要求提取或简单地馏组分。它的适用范围远远超过放射性免疫检定和化学检定的范围^[9,10],这两种方法都只局限于特异系列的肽和蛋白。放射性免疫检定还要求至少知道分析物的部分一级结构,特别是在特异的抗原测定中。另外,在原则上,质谱蛋白全谱分析可在许多方面代替二维电泳,并且由于质谱提供精通的分子质量信息,所以又具有双向电泳所不具备的优点。

在应用上,质谱蛋白全谱分析可分为两大类。第一类,它可用来定性鉴别给定组织的肽和蛋白,从而可以检测出肽和蛋白的变异和缺失。第二类用途是定量研究中,定量的蛋白全谱分析可用以建立未鉴别组分在不同实验条件下的上限和下限规则,这样的信息有助于决定应对哪一种未鉴别的肽和蛋白进行更深入的研究。可见这在蛋白质组研究中是极其有用的。另外,大多数细胞的功能都不是单个蛋白质而是蛋白质复合体也叫作多蛋白复合体来实现的。因此,特异性蛋白质相互作用的识别是蛋白质组学的一个关键性组成,因为它直接关系生物反应中的蛋白质功能。确实,质谱技术在蛋白质组应用上已有许多成功的例子,例如,Michael等用LC/LC-MS/MS单步分析在酵母核糖体中识别了超过70个蛋白质,Shevchenko等用MALDI-TOF-MS鉴定基因组仍然是未知的有机体中的蛋白质^[11,12]。

质谱蛋白全谱分析通过测定肽和蛋白的分子质量,加上已知蛋白的序列信息,来试探性确定给定组织或体液中存在肽和蛋白。通常,质谱蛋白全谱分析可分为四步:(1)从生物组织提取多肽和蛋白并分馏提取液;(2)测定提取液中各组分的分子质量;(3)从肽或蛋白的计算机数据库中搜索被测的分子质量是否符合特定的肽或蛋白的质量;(4)再确定分析,如部分的N-或C-端的测序分析,氨基酸分析,或MS-MS分析。这些再确定分析的对象应是那些在上述3步中仍不能十分确认的特定肽或蛋白。

4 肽指纹谱测定

肽指纹谱分析指的是组成分析,它的对象是单个的纯化后的肽或蛋白,其目的在于测定它们的一级结构、蛋白修饰或鉴别遗传差异等。肽指纹谱是蛋白质组研究中大规模蛋白识别和新蛋白发现的重要手段。肽指纹谱分析中,测得酶解或化学方法降解后的产物的分子质量,并和已知或预期的蛋白分解产物的相应分子质量比较。肽指纹谱的测定是对2-DE分离的蛋白质点采用蛋白酶解或化学降解,对所得多肽混合物进行质谱分析。最常采用的方法有两个:一是对2-DE分离的蛋白斑点进行胶上原位酶解,提取、收集酶解产物(必要时做适当的脱盐或浓缩处理),做质谱分析。另一种是对2-DE分离的蛋白质转印到偶合了蛋白酶的PVDF膜上,直接进行质谱分析^[13]。对质谱分析所得肽片与多肽蛋白数据库中蛋白质的理论肽片进行比较,从而判断所测蛋白是已知还是未知。由于不同的蛋白质具有不同的氨基酸序列,因而不同蛋白质所得肽片具有指纹的特征^[14]。

由于MALDI所具有的高灵敏度以及它对盐和去垢剂的耐受性,在肽指纹谱的鉴定中,对于蛋白质组研究样品中的大量蛋白而言,常采用MALDI-TOF-MS为基础,进行高通量的蛋白和多肽质谱指纹分析。目前,大多数MALDI质谱一次上样均可达100~10000个组分。因而可实现蛋白质组中大量蛋白的高通量同时分析。

ESI-MS也可在很短的时间内得到蛋白质酶解后的肽指纹谱,ESI-MS的优点是在肽谱图中能够得到 M_r 低于400 4m 的小分子肽段。因此,它可以鉴定一些在其它质量肽谱图中不能区分的肽谱,另外,它可和HPLC系统直接相连来分析酶解后的碎片不需要任何纯化。

采用肽指纹谱的方法已对酵母、大肠杆菌、人心肌等多种蛋白质组进行了研究。其中对人肥大心肌细胞的蛋白质组研究达到fmol的水平。对大肠杆菌经PVDF膜转印的蛋白质的研究表明,三个肽片可达到对蛋白质的正确识别。用肽指纹谱的方法鉴定了约25%的1550种2-DE分离蛋白质。而采用原位酶解的方法对酵母蛋白质组研究的结果显示,约90%的蛋白质被正确识别,其中多于32个新蛋白被发现,而这些蛋白是酵母基因组研究中未能识别的开放阅读框架。对流感嗜血杆菌蛋白质组的研究显示,用肽指纹谱的方法鉴定了约400种蛋白质,比氨基酸组成分析更为可靠,这是因为MALDI测定肽质量的准确度可达0.1%~0.001%,而氨基酸组成分析的准确度仅为10%。另外MALDI可以耐受少量杂质的存在,对于纯度不是很高的样品也能得到理想的结果^[15~20]。

总之,肽指纹谱测定的成功取决于质量测定,数据库检索的准确性以及蛋白质的纯度,因此,有时需要第二种方法的确定,如N-端测序、氨基酸组成分析以及串联质谱测序的方法。

肽指纹谱分析一般包括以下几步:(1)分离纯化蛋白;(2)用酶或化学方法降解蛋白;(3)用质谱分析降解后的产物;(4)用质谱数据库检索,匹配的数据作为识别的依据,非匹配的数据可鉴定一些结构的变化。(5)对各个多肽片段进行MS-MS分析,获得序列信息。

5 肽序列测定

由于离子化技术的限制,长时间以来质谱对生物分子的结构分析无能为力。70年代80年代随着等离子体解吸,快原子轰击等电离技术的出现,使质谱技术应用在蛋白质和多肽的序列测定上成为现实。80年代末,ESI和MALDI得到了发展,解决了极性大、热不稳定蛋白和多肽的离子化、分子质量测定等问题,并成为蛋白质组研究中检测和结构分析的热点技术^[21~23]。在ESI-MS和MALDI-MS出现以前,序列测定是很复杂的过程,需要HPLC条件的优化,分离所有酶解碎片,通过氨基酸分析,肽序列分析来分析所有碎片。这需要很长时间,而现在随着ESI-MS和MALDI-MS及MS-MS的出现,这些过程只需要相当短的时间。质谱已成为对小量肽和蛋白进行测序的有效工具。

装有反射器的TOF质谱仪(即MS-MS)可以测得源后分解谱(PSD),这一谱图显示了分子的特殊结构碎片。首先将蛋白酶解,通过MALDI-TOF得到肽谱,而后再将其中的肽片拿来测PSD,则可获得一张多肽碎片图谱。这样对多肽碎片的分析,得到其纯度、分子质量、氨基酸序列、组成等大量信息^[13]。质谱联用对于完整基因组信息未知的情况而言,这一

技术有很大的应用价值,因该技术可以通过多肽段表达序列数据库对蛋白进行鉴定,比标准基因组数据库着眼点要大得多^[24]。

ESI-MS所产生的多电荷离子特别适用于串联质谱分析,因为多电荷离子容易碎裂,使碰撞活化灵敏度提高并且可以选择感兴趣的离子进行碰撞,用来检测目标肽段,可得到完全的序列信息,因此在质量肽谱中应用ESI-MS可提供一种快速证实蛋白质和多肽序列信息的方法^[25,26]。

串联质谱技术用于肽序列测定是通过采用不同的质谱技术选择具有特定质荷比的离子,并对其进行碰撞诱导解离,通过推断肽片的断裂,可导出肽序列。最新发展的超高灵敏度的纳升电喷雾串联质谱技术是一种用于SDS-PAGE分离的蛋白质进行测序的简便有效的方法,用此方法低至5ng的蛋白质都可被测序^[27]。由于此质谱技术产生的液滴比普通电喷雾质谱产生的液滴小100倍,因而可在最小的样品消耗量下获得最大灵敏度,灵敏度可高达fmol,此种方法特别适用于微量样品的质谱分析。用该法对Burkitt淋巴细胞株2-DE凝胶电泳后36个蛋白质点进行鉴定^[28],其中33个蛋白质点能从数据库找出,3个蛋白点未能从数据库找出。采用串联质谱对2-DE分离的H. influenzae蛋白质组进行分析,鉴定了260个蛋白质点,其中有26个点含有两个或两个以上的蛋白质^[29]。一种被称为猎枪(Shotgun)法的串联质谱技术已被用于混合物中蛋白质的鉴定。其基本过程是通过用串联质谱鉴定由蛋白酶解产生的肽片来识别混合物中的蛋白质。运用此方法已成功地对大肠杆菌2-DE谱图进行了分析,并鉴定了含有两个以上蛋白质的蛋白质点^[30]。

肽序列测定技术主要有两种:(1)肽序列标签技术 构成蛋白质的常见氨基酸有20种,一般3个氨基酸的肽段碎片将有8000种可能的排列方式,4个氨基酸将有160000种排列方式,因此即使对于不是很大的原核生物的蛋白质组来说,一个短的序列片段也具有高度的特异性。生物质谱技术中的串联质谱技术可直接测定肽段的氨基酸序列,将串联质谱产生的肽段序列用于数据库检索,称之为肽序列标签技术,目前广泛用于蛋白质组研究中的大规模筛选。较之传统的Edman降解末端测序技术,质谱分析具有不受末端封闭的限制,灵敏、精确、经济、简便的特点。(2)肽阶梯序列技术 采用不同浓度的蛋白酶分别降解同一蛋白或多肽,产生长短不等的一组多肽样品,根据质谱测定的肽段质量间的差异推导出多肽的序列。

6 总结与展望

质谱已成为将蛋白质与其基因联系起来的重要工具,广泛用于蛋白质组的研究中。质谱分析鉴定蛋白质,其优点是灵敏度高、准确度高、快速、而且容易实现自动化,因此,质谱技术是蛋白质组研究中最重要鉴定技术,它为人类从蛋白质水平上揭示生命的本质提供了有力的武器。但是,随着蛋白质组研究的快速推进,现有技术方法已不能满足高效快速大规模样品处理的要求,这就要求开展高通量筛选蛋白质组技术的研究。虽然Traini等设计了对蛋白质进行自动处理分析的机器人控制系统,取得了较理想的效果^[31]。但一个理想的高通量筛选蛋白质组研究技术应满足如下要求:(1)MALDI-TOF-MS以每天大于1000个蛋白的速度对蛋白质进行鉴定;(2)ESI-MS-MS或猎枪法以每天每台机器分析几打蛋白质的

速度进行序列标签; (3)串联质谱对全新蛋白质或特别感兴趣的蛋白质肽片的全序列测定。

7 参考文献

- 1 Wasinger VC, Cordwell SJ, Anne CD, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes; *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 1995, 16; 1090—1094
- 2 Kahn P. From genome to proteome; looking at a cell's proteins. *Science*, 1995, 270; 369—370
- 3 Williams KL. Genomes and proteomes; towards a multidimensional view of biology. *Electrophoresis*, 1999, 20; 678—688
- 4 Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics; new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, 1998, 19; 1853—1861
- 5 Fenn JB, Mann M, Meng CK, et al. Electrospray ionization for the mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 1989, 246; 64—71
- 6 Roepstorff P. Mass spectrometry in protein studies from genome to function. *Current Opinion Biotech*, 1997, 8; 6—13
- 7 Jensen ON, Wilm M, Shevchenko A, et al. Peptide sequencing of 2-DE gel isolated proteins by nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol*, 1999, 112; 571—588
- 8 Yates JR, Cammack E, Hays L, et al. Automated protein identification using microcolumn liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol*, 1999, 112; 553—569
- 9 Serafini AN. From monoclonal antibodies to peptides and molecular recognition units; an overview. *J Nucl Med*, 1993, 34; 533—536
- 10 Takamatsu K, Tatemoto K. Isolation and characterization of two novel peptide amides originating from myelin basic protein in bovine brain. *Neurochem Res*, 1992, 17; 239—246
- 11 Michael JD, Kelvin HL. proteome analysis. *Current Opinion Biotech*, 2000, 11; 176—179
- 12 Shevchenko A, Sunyaev S, Loboda A, et al. Charting the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and BLAST homology searching. *Anal Chem*, 2001, 73; 1917—1926
- 13 Quadroni M, James P. Proteomics and automation. *Electrophoresis*, 1999, 20; 664—677
- 14 Wise MJ, Littlejohn TG, Humphrey SI. Peptide-mass fingerprinting and the ideal covering set for protein characterisation. *Electrophoresis*, 1997, 18; 1399—1409
- 15 Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, et al. Linking genome and proteome by mass spectrometry; large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, 93; 14440—14445
- 16 Garrels JI, McLaughlin CS, Warner JR, et al. Proteome studies of *Saccharomyces cerevisiae*; identification and characterization of abundant proteins. *Electrophoresis*, 1997, 18; 1347—1360
- 17 Dainese P, Staudenmann W, Quadroni M, et al. Probing protein function using a combination of gene knockout and proteome analysis by mass spectrometry. *Electrophoresis*, 1997, 18; 432—442
- 18 Ogorzalek LR, Mitchell C, Stevenson TI, et al. Sensitivity and mass accuracy for proteins analyzed directly from polyacrylamide gels; implications for proteome mapping. *Electrophoresis*, 1997, 18; 382—390
- 19 Langen H, Gray C, Roder D, et al. From genome to proteome; protein map of *Haemophilus influenzae*. *Electrophoresis*, 1997, 18; 1184—1192
- 20 VanBogelen RA, Abshire KZ, Moldover B, et al. *Escherichia coli* proteome analysis using the gene-protein database. *Electrophoresis*, 1997, 18; 1243—1251
- 21 Whitelegge JP, Coutre JL, Lee JC, et al. Toward the bilayer proteome, electrospray ionization mass spectrometry of large, intact transmembrane proteins. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96; 10695—10698
- 22 Jun XY, Jean CS, Pierre AB, et al. Method for identification and quantitative analysis of protein lysine methylation using. *Electrophoresis*, 1999, 20; 749—754
- 23 Keough T, Youngquist RS, Lacey MP. A method for high sensitivity peptide sequencing using postsource decay matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96; 7131—7136
- 24 Abbott A. How to spot a protein in a crowd. *Nature*, 1999, 402; 716—717
- 25 Loo JA, Muenster H. Magnetic sector ion trap mass spectrometry with electrospray ionization for high sensitivity peptide sequencing. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1999, 13; 54—60
- 26 Owens DR, Bother B, Phung Q, et al. Aspects of oligonucleotide and peptide sequencing with MALDI and electrospray mass spectrometry. *Bioorg Med Chem*, 1998, 6; 1547—1554
- 27 Wilm M, Shevchenko A, Houthaeve T, et al. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature*, 1996, 379; 466—469
- 28 Muller EC, Schumann M, Rickers A, et al. Study of Burkitt lymphoma cell line proteins by high resolution two dimensional gel electrophoresis and nanoelectrospray mass spectrometry. *Electrophoresis*, 1999, 20; 320—330
- 29 Link AJ, Hays LG, Cammack EB, et al. Identifying the major proteome components of *Haemophilus influenzae* type-strain NCTC 8143. *Electrophoresis*, 1997, 18; 1314—1334
- 30 McCormack AL, Schieltz DM, Goode B, et al. Direct analysis and identification of proteins in mixtures by LC-MS/MS and database searching at the low-femtomole level. *Anal Chem*, 1997, 69; 767—776
- 31 Traini M, Gooley AA, Qu K, et al. Towards an automated approach for protein identification in proteome projects. *Electrophoresis*, 1998, 19; 1941—1946

(2002-06-08 收稿)