

# 酿酒酵母 ATP-硫酸化酶在大肠杆菌中的表达纯化及其在焦测序中的应用 Expression and Purification of ATP Sulfurylase from *Saccharomyces cerevisias* in *Escherichia coli* and Its Application in Pyrosequencing

罗 娟<sup>1</sup> 吴文娟<sup>1</sup> 邹秉杰<sup>1</sup> 周国华<sup>1,2\*</sup>

LUO Juan<sup>1</sup> ,WU Wen-Juan<sup>1</sup> ,ZOU Bing-Jie<sup>1</sup> and ZHOU Guo-Hua<sup>1,2\*</sup>

1 中国药科大学生命科学与技术学院 南京 210009

2 华东医学生物技术研究所 南京 210002

1 College of Life Science and Technology ,China Pharmaceutical University ,Nanjing 210009 ,China

2 Huadong Research Institute for Medicine and Biotechnics ,Nanjing 210002 ,China

**摘 要** ATP-硫酸化酶(ATPS,EC 2.7.7.4)是一种可逆催化 ATP 和  $\text{SO}_4^{2-}$  反应生成腺嘌呤-5'-磷酸硫酸(APS)和焦磷酸盐( $\text{PPi}$ )的酶,已经用于焦测序反应。以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisias*, CICC 1202)基因组 DNA 为模板,用 PCR 扩增得到 ATPS 基因,并克隆到原核表达质粒 pET28a(+),得到重组表达质粒 pET28a(+)-ATPS。在 IPTG 诱导下,携带 pET28a(+)-ATPS 的大肠杆菌 BL21(DE3)表达分子量约为 60 kD 的带有 His 标签的 ATPS 酶,经镍亲和层析和超滤两步纯化后,可得到电泳纯级 ATPS,比活达  $5.1 \times 10^4$  u/mg,并成功应用于焦测序反应中。

**关键词** ATP-硫酸化酶 酿酒酵母 表达 纯化 焦测序

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0623-05

**Abstract** ATP sulfurylase(ATPS,EC 2.7.7.4)reversibly catalyzes the reaction between ATP and sulfate to produce APS and pyrophosphat( $\text{PPi}$ ),and has been used in pyrosequencing. The gene coding ATP sulfurylase was amplified from the genomic DNA of *Saccharomyces cerevisias*(CICC 1202),and cloned into prokaryotic expression plasmid pET28a(+ )to provide a recombinant expression plasmid pET28a(+)-ATPS. Upon IPTG induction ,ATP sulfurylase was produced by *E. coli* BL21(DE3)harboring the recombinant expression plasmid pET28a(+)-ATPS. The relative molecular weight of recombinant ATP sulfurylase with His tag was about 60kD. The recombinant ATP sulfurylase with electrophoretic pure grade was obtained only by two purification steps: His·Bind Resin affinity chromatography and ultrafiltration. The specific activity of the purified recombinant ATP sulfurylase was as high as  $5.1 \times 10^4$  u/mg. The successful application of the enzyme in pyrosequencing was also demonstrated.

**Key words** ATP sulfurylase ,*Saccharomyces cerevisias* ,expression ,purification ,pyrosequencing

ATP-硫酸化酶(ATP sulfurylase,ATPS,EC 2.7.7.4)广泛存在于植物、动物及微生物中,但它在

各种生物体当中的生物学作用略有不同。在植物和部分微生物中,ATPS 是催化硫酸盐同化反应第一步

Received: November 28, 2006; Accepted: December 31, 2006.

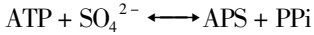
This work was supported by the grant from the National Natural Science Foundation of China(No.30470454).

\* Corresponding author. Tel: +86-25-84514223, Fax: +86-25-84514223, E-mail: ghzhou@nju.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30470454)资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

的关键酶,在 ATPS 催化下,硫酸根离子与 ATP 反应,产生腺嘌呤-5'-磷酸硫酸(APS)和焦磷酸盐(P<sub>Pi</sub>)。而在一些化学自养菌<sup>[1]</sup>和化能无机营养菌<sup>[2]</sup>中,ATPS 是催化硫化氢氧化生成无机硫酸盐最后一步的酶,其作用是催化 APS 和 P<sub>Pi</sub> 反应生成 ATP 和硫酸根离子,即上述反应的逆反应。



ATPS 已经从产黄青霉菌<sup>[3]</sup>、鼠肝<sup>[4]</sup>、卷心菜<sup>[5]</sup>等生物体中提取并纯化得到,而且编码 ATPS 的基因也已经从原核生物<sup>[6]</sup>、真核生物<sup>[7]</sup>、动物<sup>[8]</sup>和植物<sup>[9]</sup>中克隆出来并在适当的宿主中得到表达。不同来源的 ATPS 结构不同,大肠杆菌来源的 ATPS 是异源二聚体且需要 GTP 激活<sup>[6]</sup>,酵母、真菌以及植物来源的 ATPS 是单体或是同源寡聚体<sup>[5,7]</sup>。在分子生物学方面,目前已通过氨基酸修饰等手段研究其结构和功能的关系,加深了对 ATPS 作用机制的了解<sup>[7]</sup>。

ATPS 偶连荧光素酶可以应用于很多方面,如: P<sub>Pi</sub> 定量<sup>[10]</sup>、RNA 测定<sup>[11]</sup>、DNA 测序<sup>[12]</sup>、DNA 聚合酶酶活测定<sup>[13]</sup>等等。目前,国外有很多关于基因工程表达 ATPS 的报道,所用表达载体分别是 pCRII<sup>[7]</sup>、pSVL<sup>[8]</sup>等等,分离纯化方法步骤繁琐、损失较大、费时费力。Novagen 公司开发的 pET28a(+) 载体带有 His-6 融合标签,利于纯化目的蛋白。因此本研究中,我们采用 pET28a(+) 融合表达系统,将 ATPS 蛋白与 His tag 进行融合表达,经镍亲和层析和超滤两步纯化后,得到电泳级 ATPS,并将表达产物应用于焦测序(pyrosequencing)反应中。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒与菌株

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisias*, CICC 1202)购自中国工业微生物菌种保藏中心。宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)及原核表达质粒 pET28a(+)由南京军区疾病预防控制中心刁振宇博士惠赠。

### 1.2 试剂

限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、λ-EcoT14 I digest DNA Marker、蛋白 Marker、PCR 产物纯化试剂盒等购自 TaKaRa 公司; d-虫荧光素、荧光素酶、Klenow (exo<sup>-</sup>) DNA polymerase 等购自 Promega 公司; Apyrase 购自 Sigma 公司; 酵母提取物、胰蛋白胨等购自 Oxoid 公司; IPTG、Lysozyme 等购自 Amresco 公司; His·Bind Resin 和 His·Bind Columns 等购自 Novagen 公司; 0.5mL 超滤离心管(10K)购自

Millipore 公司; 其他试剂均为分析纯、国产。

### 1.3 方法

**1.3.1 重组表达质粒 pET28a(+) -ATPS 的构建** 酿酒酵母基因组 DNA 按酚-氯仿法抽提。基于 Cherest 等人公布的酿酒酵母 ATPS 编码基因 *MET3* 序列<sup>[14]</sup>和载体 pET28a(+) 多克隆位点,设计并合成上游引物 ATPS-P1: 5'-GTGTGTGGATCCATGCGCTGCTCCTCACGGTGGTA-3'(划线字母为 BamH I 酶切位点)及下游引物 ATPS-P2: 5'-GTGTGTAAAGCTTCTACTTTT GAGATGGGAGCATT-3'(划线字母为 Hind III 酶切位点),以基因组 DNA 为模板,利用该组引物扩增 *MET3* 基因。采用 25μL 反应体系(10× buffer 2.5μL, 2.5mmol/L dNTP 2.0μL, 25mmol/L Mg<sup>2+</sup> 1.5μL, 引物(10pmol/μL) 1μL, 5u Taq polymerase (TaKaRa) 0.125μL, 基因组 DNA 约 200ng),热循环条件为 94℃ 3min 94℃ 10s 58℃ 20s 72℃ 90s, 30 个循环,最后 72℃ 延伸 7min。PCR 产物经 PCR 产物纯化试剂盒纯化后用 BamH I 和 Hind III 双酶解,插入到同样酶解的原核表达质粒 pET28a(+) 中,转化 *E. coli* BL21(DE3),挑选转化子抽提质粒后通过限制性内切酶酶切分析筛选阳性克隆,阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序,重组表达质粒命名为 pET28a(+) -ATPS。

**1.3.2 重组 ATPS 的诱导表达** 将重组表达质粒 pET28a(+) -ATPS 转化到感受态 *E. coli* BL21(DE3)菌株中,涂布于含 30μg/mL 卡那霉素的 LB 平板上,37℃ 培养过夜。挑取单菌落接种于 5mL 含 30μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,37℃, 200r/min 振荡过夜。次日取 0.5mL 菌液接种于含同样抗生素的 50mL LB 培养基中,37℃, 200r/min 振荡培养至 OD<sub>600nm</sub> 达 0.6~0.7,收集 1mL 菌液留作 SDS-PAGE 分析,随后加入 IPTG(终浓度 0.1mmol/L),30℃, 200r/min 诱导表达,分别于 1、3、5h 收集 1mL 菌液,离心收集菌体,SDS-PAGE(12%)分析鉴定是否有诱导产物表达。

**1.3.3 重组 ATPS 的表达形式及其纯化** 收集 100mL IPTG 诱导培养 5h 的细菌培养液,12000r/min 离心 1min,菌体用 PBS 洗涤后,重悬于 10mL 冰浴的 1× Binding Buffer,另加入溶菌酶至 100μg/mL, Triton X-100 至 0.1%,反复冻融 3 次,然后在冰浴中超声破碎。细菌破碎液以 4℃, 12000r/min 离心 20min,分别收集上清和沉淀,用于 SDS-PAGE 分析重组 ATPS 的表达形式。

采用镍亲和层析系统进行纯化,参照 Novagen 公司操作手册操作。期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1.3.4 蛋白含量测定 :紫外分光光度法测定蛋白质浓度 ,以牛血清白蛋白为标准品绘制标准曲线。

1.3.5 活性测定 :参照文献 [15] 的方法 ,利用 ATPS 和荧光素酶两步偶连反应测定重组 ATPS 的酶活。标准测活反应液的组成为 :0.1mol/L Tris-Ac ( pH 7.75 ) 0.5mmol/L EDTA 5mmol/L Mg ( Ac )<sub>2</sub> 0.4mg/mL PVP , 0.02% BSA , 1mmol/L DTT , 4μmol/L APS , 4μmol/L PPI 0.4mmol/L d-虫荧光素 ,1.46μg/mL 荧光素酶。以 Sigma 公司的 ATPS 作为对照品计算重组 ATPS 的酶活。

1.3.6 重组 ATPS 应用于焦测序反应 :焦测序技术<sup>[12]</sup>是在四种酶( DNA Polymerase、ATP Sulfurylase、Luciferase 和 Apyrase )的共同作用下 ,测定碱基延伸反应的实时测序技术。焦测序标准反应液组成为 : 90u/mL Klenow( exo<sup>-</sup> )DNA polymerase 2u/mL Apyrase , 0.1mol/L Tris-Ac ( pH 7.75 ) , 0.5mmol/L EDTA , 5mmol/L Mg ( Ac )<sub>2</sub> , 0.4mg/mL PVP , 0.02% BSA , 1mmol/L DTT 4μmol/L APS 0.4mmol/L d-虫荧光素 , 1.46μg/mL 荧光素酶 ,0.2u/mL 重组 ATPS。本实验对液体合成单链模板( 5'-GGTTCCAAGTCACCCC GCGC-3' )进行测序。

2 结果与讨论

2.1 重组表达质粒 pET28a( + )-ATPS 的构建

以酿酒酵母基因组 DNA 为模板 ,经 PCR 扩增出 ATPS 全长基因( 图 1 )。PCR 产物插入质粒 pET28a ( + )多克隆位点的 BamH I 和 Hind III 酶切位点之间 ,阳性克隆经 BamH I 和 Hind III 双酶切后得到一个大小位于 1597bp 处的小片段和一个大小位于 5300bp 左右的大片段( 图 2 )。测序结果表明 ,载体上 ATPS 基因的蛋白质编码序列与报道的序列基本一致<sup>[14]</sup> ,重组质粒命名为 pET28a( + )-ATPS。

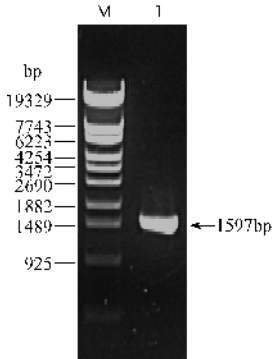


图 1 PCR 产物的电泳分析

Fig.1 Electrophoresis analysis of PCR products

M : λ-Eco T14I digest DNA marker ; 1 : PCR products of ATPS gene.

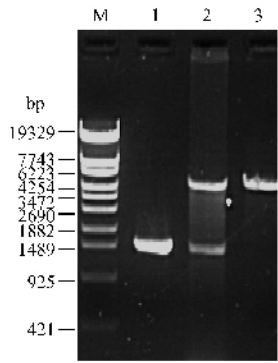


图 2 重组表达质粒 pET28a( + )-ATPS 的酶切鉴定

Fig.2 Restriction enzyme digestion analysis of recombinant plasmid pET28a( + )-ATPS

M : λ-Eco T14I digest DNA marker ; 1 : PCR products of ATPS gene 2 : pET28a( + )-ATPS digested with BamH I and Hind III 3 : pET28a( + ) digested with BamH I and Hind III .

2.2 重组 ATPS 的诱导表达

将构建好的重组表达质粒 pET28a( + )-ATPS 转化宿主菌 E. coli BL21( DE3 ) ,经 IPTG 诱导表达 ,分别对不同培养时间的表达产物进行 SDS-PAGE 检测( 图 3 ) ,由图 3 可知 ,与未经诱导的重组表达质粒 pET28a( + )-ATPS 相比 ,重组表达质粒 pET28a( + )-ATPS 在分子量大约为 60kD 处有明显的表达条带 ,由于质粒 pET28a( + )在多克隆位点上游有一段 His-Tag 和 T7-Tag 编码序列( 分子量约为 3.5kD )与 ATPS ( 57kD )蛋白融合表达 ,所以重组蛋白分子量与理论值相符。

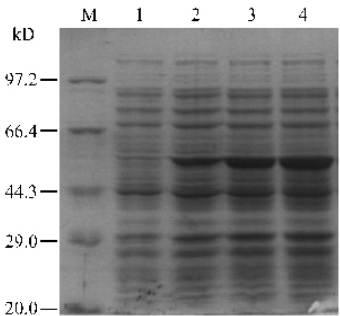


图 3 重组 ATPS 在 E. coli BL( DE3 ) 中表达的 SDS-PAGE 鉴定

Fig.3 SDS-PAGE analysis of recombinant ATPS expressed in E. coli BL( DE3 )

M : protein marker ; 1 : total protein of E. coli BL( DE3 ) transformed with pET28a( + )-ATPS without IPTG induction ; 2 ~ 4 : total protein of E. coli BL( DE3 ) transformed with pET28a( + )-ATPS after being induced with IPTG of 1h 3h and 5h ; respectively.

2.3 重组 ATPS 的表达形式及其纯化

表达后的菌体经反复冻融和超声破碎后 ,分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析 ,结果表明 ,重组

ATPS 绝大部分是以可溶蛋白的形式存在于上清中(图4)。目的蛋白采用镍亲和层析纯化,首先用60mmol/L 咪唑的缓冲液洗涤除去杂蛋白,再用200mmol/L 咪唑的缓冲液洗脱目的蛋白。洗脱液经截留分子量为1万的超滤离心管脱盐换用柠檬酸盐缓冲体系(0.1mol/L, pH 6.0)后进行 SDS-PAGE,由图4可知 纯化后的蛋白呈单一条带,与 Sigma 的 ATPS 分子量一致,达到电泳纯级别,但 Sigma 的 ATPS 中存在大量杂蛋白,纯度较低。

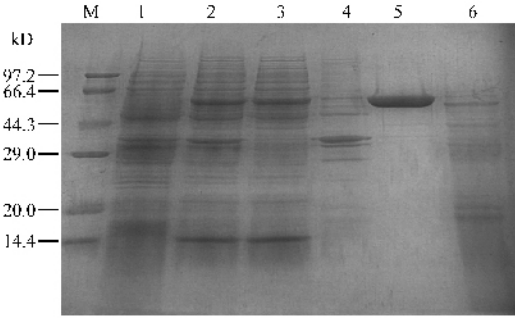


图4 重组 ATPS 的表达形式及其纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of expression pattern and purification of recombinant ATPS

M: protein marker; 1: total protein of *E. coli* BL(DE3) transformed with pET28a(+)ATPS without IPTG induction; 2: total protein of *E. coli* BL(DE3) transformed with pET28a(+)ATPS after being induced with IPTG for 5h; 3: supernatant of the lysate of *E. coli* BL21(DE3) transformed with pET28a(+)ATPS; 4: precipitate of the lysate of *E. coli* BL21(DE3) transformed with pET28a(+)ATPS; 5: purified recombinant ATPS; 6: commercial ATP sulfurylase from Sigma Chemical Co.

2.4 活性测定

采用间接法测定 ATPS 的活性,即通过测定荧光素酶催化 ATP 的发光强度来测定 PPi 转化成 ATP 的速度,测定时,加入大量的底物 APS 和 PPi,然后加入稀的酶 ATPS,测定信号强度的动态变化。即首

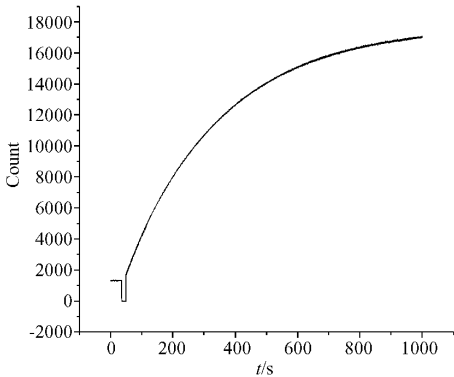


图5 本文制备的重组 ATPS 活性测定的实时生物发光曲线

Fig.5 Real-time bioluminescent traces for determining the activity of recombinant ATPS produced in this paper

先准备好 50μL 测活反应液,测定基线,然后快速加入 1μL 浓度为  $7 \times 10^{-8}$  mg/mL 的纯化酶(将原液稀释  $10^7$  倍),混匀后置于 BPCL 微弱发光测量仪进行实时测定,结果如图5所示,荧光信号随着时间逐渐增大,说明我们制备的 ATPS 酶能够有效地催化 APS 和 PPi 生成 ATP。为了测定相对活性,我们同时以 Sigma 公司的 ATPS 作对照(图6),计算出本品的比活为  $5.1 \times 10^4$  u/mg。

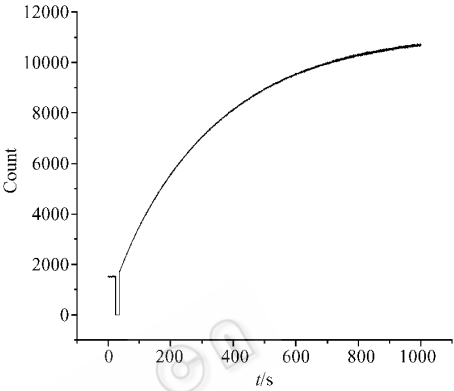
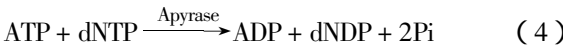
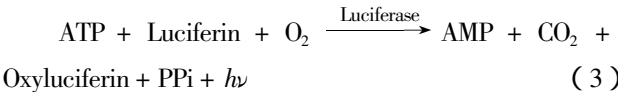
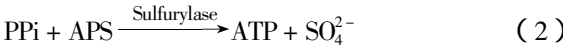
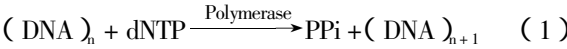


图6 Sigma 公司的 ATPS 活性测定的实时生物发光曲线

Fig.6 Real-time bioluminescent traces for determining the activity of Sigma-ATPS

2.5 重组 ATPS 应用于焦测序反应

为了进一步验证本文制备的 ATPS 的生物活性,我们采用该酶进行了焦测序试验。焦测序反应实际就是测定聚合反应产生的 PPi,即在测序过程中,分别循环加入四种 dNTP,一旦加入的 dNTP 与模板互补,就会释放出 PPi,PPi 在 ATP sulfurylase 作用下与 APS 反应生成 ATP,ATP 在 Luciferase 的催化下与 Luciferin 反应发出荧光,发出的荧光强度与嵌入的 dNTP 个数成正比,根据测定图谱的信号相对强度,可知模板核酸的序列。其测序原理可以用下列反应方程式表示:



本实验以人工合成一段寡聚核苷酸为 DNA 模板,测序引物 3'端后的模板序列为:ACTGAACCTTGG(互补序列为:TCAGTTGGAACC)。dNTPs 的加入顺序为:CACTG,测定结果如图7所示。因为模板的

第一个碱基为 A ,所以在加入前三种 dNTP 时 ,没有  
出现信号峰 ,只出现了 dNTPs 自身的背景信号。当  
加入 dTTP 时 ,发生了延伸反应 ,出现了信号峰 ,由于  
第二个碱基是 C ,故加入 dGTP 时 ,又出现了与第一  
个峰高差不多的信号峰 ;同样 ,又测得了信号峰 T 和  
G ,但当接着加入 dTTP 时 ,产生了峰高约为前面峰  
高两倍的信号峰 ,这与模板中的序列“ AA ”相一致。  
图 7 是采用本文制备的 ATPS 测得的 12 个碱基序列  
的结果。说明我们表达的重组 ATPS 完全可以应用  
于焦测序反应中。

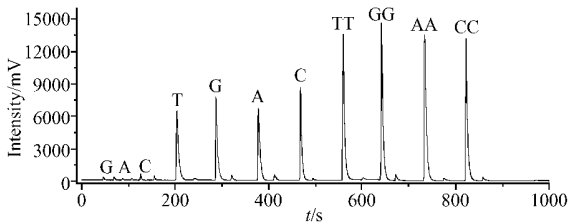


图 7 采用本文制备的 ATPS 酶进行焦测序的图谱

Fig.7 Pyrogram of DNA sequencing with  
ATPS prepared in this paper

Template : artificially synthesized oligonucleotide ; Order of dNTP  
dispensing : G-A-C-T-G with the double dispensing of each dNTP species .

### 3 结论

随着生命科学的飞速发展 ,对 ATPS 酶的需求  
也会相应增加 ,比如焦测序法的应用正日趋广  
泛<sup>[12]</sup> ,而 ATPS 是焦测序反应中使用的一种酶。利  
用易于纯化的基因工程法表达高活性、高纯度的  
ATPS 酶十分重要。本文以酿酒酵母基因组 DNA 为  
模板 ,PCR 扩增得到 ATPS 编码基因 ,将其克隆到原  
核表达质粒 pET28a( + )中 ,成功构建了重组表达质  
粒 pET28a( + )-ATPS ,它具有 His 标签 ,易于下游纯  
化。SDS-PAGE 电泳表明 ,ATPS 主要是以可溶蛋白  
的形式存在于上清中 ,经镍亲和层析柱和超滤离  
心管纯化后 ,纯度为电泳纯级别 ,比活可达  $5.1 \times 10^4$  u/mg ,能很好地应用于焦测序反应中。

### REFERENCES(参考文献)

[ 1 ] Renosto F ,Martin RL ,Borrell JL ,et al . ATP sulfurylase from  
trophosome tissue of *Riftia pachyptila* ( hydrothermal vent tube  
worm ). *Arch Biochem Biophys* ,1991 **290**( 1 ) : 66 - 78 .  
[ 2 ] Hanna E ,MacRae IJ ,Medina DC ,et al . ATP sulfurylase from the

hyperthermophilic chemolithotroph *Aquifex aeolicus* . *Arch Biochem  
Biophys* 2002 **400**( 2 ) : 275 - 288 .  
[ 3 ] Renosto F ,Martin RL ,Wailes LM ,et al . Regulation of inorganic  
sulfate activation in filamentous fungi . Allosteric inhibition of ATP  
sulfurylase by 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate . *J Biol  
Chem* ,1990 **265**( 18 ) : 10300 - 10308 .  
[ 4 ] Yu M ,Martin RL ,Jain S ,et al . Rat liver ATP-sulfurylase :  
purification ,kinetic characterization ,and interaction with arsenate ,  
selenate ,phosphate ,and other inorganic oxyanions . *Arch Biochem  
Biophys* ,1989 **269**( 1 ) : 165 - 174 .  
[ 5 ] Osslund T ,Chandler C ,Segel IH . ATP sulfurylase from higher  
plants : purification and preliminary kinetics studies on the cabbage  
leaf enzyme . *Plant Physiol* ,1982 **70**( 1 ) : 39 - 45 .  
[ 6 ] Leyh TS ,Suo Y . GTPase-mediated activation of ATP sulfurylase . *J  
Biol Chem* ,1992 **267**( 1 ) : 542 - 545 .  
[ 7 ] Foster BA ,Thomas SM ,Mahr JA ,et al . Cloning and sequencing of  
ATP sulfurylase from *Penicillium chrysogenum* . Identification of a  
likely allosteric domain . *J Biol Chem* ,1994 **269**( 31 ) : 19777 -  
19786 .  
[ 8 ] Li H ,Deyrup A ,Mensch JR ,et al . The isolation and  
characterization of cDNA encoding the mouse bifunctional ATP  
sulfurylase-adenosine 5'-phosphosulfate kinase . *J Biol Chem* ,1995 ,  
**270**( 49 ) : 29453 - 29459 .  
[ 9 ] Klonus D ,Riesmeier JW ,Willmitzer L . A cDNA clone for an ATP-  
sulfurylase from *Arabidopsis thaliana* . *Plant Physiol* ,1995 **107**  
( 2 ) : 653 - 654 .  
[ 10 ] Nyren P ,Nore BF ,Baltcheffsky M . Studies on photosynthetic  
inorganic pyrophosphate formation in *Rhodospirillum rubrum*  
chromatophores . *Biochim Biophys Acta* ,1986 **851** : 276 - 282 .  
[ 11 ] Nyren P ,Karamouhamed S ,Ronagshi M . Real-time sequence-based  
DNA analyses using bioluminescence . In : *Bioluminescence and  
Chemiluminescence Molecular Reporting with Photons* ,Hastings et  
al ed ,1996 : 466 - 469 .  
[ 12 ] Ahmadian A ,Ehn M ,Hober S . Pyrosequencing : history ,  
biochemistry and future . *Clin Chim Acta* ,2006 **363**( 1 - 2 ) : 83 -  
94 .  
[ 13 ] Nyren P . Enzymatic method for continuous monitoring of DNA  
polymerase activity . *Anal Biochem* ,1987 **167**( 2 ) : 235 - 238 .  
[ 14 ] Cherest H ,Kerjan P ,Surdin-Kerjan Y . The *Saccharomyces cerevisiae*  
*MET3* gene : nucleotide sequence and relationship of the 5' non-  
coding region to that of *MET25* . *Mol Gen Genet* ,1987 **210**( 2 ) : 307  
- 313 .  
[ 15 ] Karamohamed S ,Nyren P . Real-time detection and quantification of  
adenosine triphosphate sulfurylase activity by a bioluminometric  
approach . *Anal Biochem* ,1999 **271**( 1 ) : 81 - 85 .