

大肠杆菌磷酸果糖激酶基因在极端嗜酸性 氧化硫硫杆菌中的表达

田克立 林建群 刘相梅 刘 纓 张长铠*

(山东大学生命科学院 微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘 要 构建了含大肠杆菌磷酸果糖激酶(EC 2.7.1.11)基因 *pfkA* 的重组质粒 pSDK-1 利用大肠杆菌 *pfk* 缺陷株筛选含目的基因的重组质粒 ,通过接合转移的方式将其导入氧化硫硫杆菌 Ti-Z2 中 ,接合转移频率达 2.6×10^{-6} 。重组质粒在 Ti-Z2 中有较好的稳定性 ,在无选择压力条件下传代 50 次基本保持稳定(重组质粒保留 68% 以上)。酶活性测定、SDS-PAGE 及 RT-PCR 结果表明 ,*pfkA* 基因在氧化硫硫杆菌中得到表达 ,但其表达水平低于大肠杆菌。葡萄糖可促进含 pSDK-1 的氧化硫硫杆菌 Ti-Z2 的生长 ,而对照菌株的生长则未受明显影响 ,说明重组菌可部分利用葡萄糖作为碳源生长。

关键词 氧化硫硫杆菌 磷酸果糖激酶 接合转移

中图分类号 :Q786 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2003)05-0592-07

氧化硫硫杆菌(*Acidithiobacillus thiooxidans*)是极端嗜酸性专性化能无机营养菌 ,通过氧化硫或还原态硫化物获得能量和还原力 ,固定 CO_2 获得细胞碳。在农业、冶金、煤和石油的脱硫以及废水处理等方面具有重要作用。酶学分析表明^[1] ,氧化硫硫杆菌缺乏双磷酸己糖途径(Embden-Meyerhof-Parnas pathway , EMP) 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸裂解途径(Entner-Doudoroff pathway , ED)以及三羧酸循环的关键酶——磷酸果糖激酶、6-磷酸葡萄糖酸脱水酶、2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸醛缩酶以及 α -酮戊二酸脱氢酶等 ,不能氧化碳化合物并通过三羧酸循环获得大量能量 ,只能氧化无机物获得能量 ,而无机物的氧化还原电位较高 ,可供细菌生长利用的能量很少 ,而且释放的能量一方面用于推动 ATP 的合成 ,另一方面推动反向电子传递产生还原当量用于 CO_2 的固定 ,这是一个非常耗能的过程 ,所以这类细菌往往生长缓慢 ,代时长 ,细胞得率低。这些因素不仅限制了其在工业上的应用 ,同时也给生化检测、蛋白质和酶的分离及 DNA 的提取等带来困难。这就需要遗传学的方法改良这些菌种 ,使之适合于实际应用的要求。本实验室已在大肠杆菌与氧化硫硫杆菌之间建立了一个遗传信息转移系统^[2] ,并成功地将外源抗砷基因及卡那霉素、链霉素和四环素抗性基因导入氧化硫硫杆菌并获得了表达^[3~5] ,为硫杆菌的遗传改造提供了实验依据。

基金项目 国家自然科学基金资助(30170026) 教育部重点基金资助(99181)

* 通讯作者。Tel 86-531-8378665 ;E-mail :ckzhang@life.sdu.edu.cn

作者简介 :田克立(1966 -) ,女 ,山东济南人 ,博士研究生 ,主要从事微生物生理及代谢调控研究。E-mail :tianzr@sdu.edu.cn

本研究在颜望明教授的亲自指导下完成。

收稿日期 2002-12-25 ,修回日期 2003-06-09

本文将大肠杆菌磷酸果糖激酶-1 基因(Phosphofructokinase-1 , PFK-1 , *pfkA* ,该酶为 EMP 途径关键酶 ,由 4 个相同亚基组成 ,每个亚基分子量为 34kD)克隆到载体上构建了含有该基因的重组质粒 ,并通过接合转移的方式将其导入氧化硫硫杆菌中 ,质粒上的 *pfkA* 基因得到表达 ,进一步研究了葡萄糖对重组菌生长的影响。研究工作为遗传改造极端嗜酸性硫杆菌提供实验依据 ,并且为进一步阐明自养与异养的关系提供理论依据 ,具有重要意义。目前国内外尚未见此方面的研究报道。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

研究中所用菌株和质粒列于表 1。

表 1 研究中所用菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study		
Strains and plasmid	Phenotype or genotype	Source or reference
<i>Escherichia coli</i>		
K-12	Wild type	Stock Center of China , Beijing
DF1010	<i>fhuA22</i> , \triangle <i>pfkB201</i> , <i>recA56</i> , <i>relA1</i> , <i>spoT1</i> , \triangle (<i>rhaD-pfkA</i>)200 , T_2^R	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center , Yale University
C600	<i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>hsd</i>	[6]
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>		
Tt-Z2	Wild type	This study
Plasmids		
RP4	Ap^r , Tc^r , Km^r , <i>IncP</i> , <i>tra</i> ⁺	[7]
pJRD215	Km^r , Sm^r , <i>IncQ</i> , <i>mob</i> ⁺	[8]
pSDK-1	Km^r , Sm^r , <i>IncQ</i> , <i>mob</i> ⁺ , <i>pfkA</i> ⁺	This study

1.2 试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司 ;*Bam*HⅠ 和 *Hind*Ⅲ 购自 TaKaRa 公司 ;Agarose Gel DNA Extraction Kit 和 RNA 快速抽提试剂盒购自 Roche 公司 ;Thermo-Script™ RT-PCR 试剂盒购自 Invitrogen 公司。利用 SBA-40C 生物传感器(由山东省科学院提供)测定溶液中葡萄糖浓度。

1.3 培养基和培养条件

大肠杆菌磷酸果糖激酶缺陷株 DF1010 的培养采用 M63 基本培养基[每升含 1.98g (NH_4)₂SO₄ ,13.6g KH₂PO₄ ,0.005g FeSO₄·7H₂O ,0.25g MgSO₄·7H₂O ,pH7.0] ,加入 0.5% 维生素 B1 和 0.4% 甘油或甘露醇 (选择培养基)。氧化硫硫杆菌培养及接合培养基参照文献 [3]。

1.4 DNA 的提取和纯化

大肠杆菌培养至对数后期 ,离心收集菌体 ,氧化硫硫杆菌 30℃ 培养 6d ,低速离心去除硫磺 ,高速离心收集菌体。染色体及质粒 DNA 的提取均参照 Maniatis 等 [6] 的方法。

1.5 重组质粒 pSDK-1 的构建和重组菌的筛选、鉴定

根据 *E. coli* K-12 磷酸果糖激酶-1 基因序列^[9]设计合成 PCR 引物(上海基康生物技术公司合成):上游 5'-GTACGGATCCTTGGCCTGACCTGAATCAAT-3'(*Bam*H I);下游 5'-GCGCAAGCTTCCGACTCTCTTATGTTGTGT-3'(*Hind* III)。反应条件:95℃ 5min;94℃ 1min, 50℃ 1min 30s, 72℃ 2min 30s, 30 个循环, 72℃ 10min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后回收 1.4kb 片段,和载体 pJRD215 连接构建重组质粒 pSDK-1,利用缺陷互补的方法筛选重组子。

1.6 大肠杆菌和氧化硫硫杆菌的接合转移

重组质粒转化含 RP4 质粒的 *E. coli* C600 中,培养至对数生长期,氧化硫硫杆菌 Tt-Z2 受体菌在 Starkey-S⁰ 液体培养基中 30℃ 静止培养至稳定期(约 7d)。供体菌和受体菌分别离心取菌体,参照文献[2]进行接合。

1.7 质粒稳定性测定

在含有四环素(Tc 36μg/mL)和链霉素(Sm 50μg/mL)的 Starkey-Na₂S₂O₃ 固体平板上挑取一个 Tt-Z2(RP4, pSDK-1)接合转移子菌落,参照文献[2]测定质粒稳定性。

1.8 质粒表达产物的鉴定

1.8.1 磷酸果糖激酶活性测定:参照 Kotlarz 等^[10]的方法测定。酶活性以 U/g 蛋白表示。蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法,以牛血清白蛋白作为标准。

1.8.2 SDS-PAGE:收集菌体,以冰预冷的 50mmol/L Tris(pH7.4)洗涤菌体两次,加 SDS 凝胶加样缓冲液,沸水浴 5min,超声波处理,室温 12000g 离心 10min,取上清进行 SDS-PAGE。

1.8.3 RT-PCR:设计合成 *pfkA* 基因序列特异的寡核苷酸引物(上海基康生物技术公司合成):引物 1:5'-CAGCAGCAGATCGATAGCGT-3';引物 2:5'-CAGCAGCAGATCGATAGCGT-3', (合成片段长度 399bp)。取 1μg 总 RNA 进行 RT-PCR,方法见试剂盒说明,PCR 反应条件:94℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 1min, 35 个循环, 72℃ 延伸 7min。

1.9 葡萄糖对细菌生长的影响

在 Starkey 培养基中加入 5g/L 葡萄糖,以硫磺粉作为能源,30℃ 静止培养,每隔两天取一定量的菌液进行分析。采用比浊法测定菌体数目来反应细菌群体的生长状况:在培养液中加入 5% 的 CS₂,用电磁搅拌器在室温下搅拌 10min,溶解硫粒,使吸附在硫粒上的细胞进入溶液,660nm 波长下测定培养物的 OD 值。采用葡萄糖氧化酶法测定培养液中葡萄糖的浓度,葡萄糖浓度(g/L) = OD₆₆₀ × 稀释倍数/100。以检测细菌生长过程中对葡萄糖的利用情况。

2 结果

2.1 重组质粒 pSDK-1 的构建、筛选和鉴定

PCR 产物电泳显示,在 1.4kb 附近存在特异的单一 DNA 带,与预计的片段大小吻合。重组质粒 pSDK-1 经酶切及序列分析证明含有目的基因 *pfkA*。

2.2 质粒的接合转移

质粒 pSDK-1 具有广泛寄主范围,为非转移性质粒,但含有 *mob* 位点,可以在转移性质粒 RP4 的诱导下进行接合转移。结果表明接合转移频率达 2.6×10^{-6} 。质粒提取证明

重组质粒 pSDK-1 转移到了氧化硫硫杆菌 Tt-Z2 中。

2.3 质粒的稳定性

重组菌在不含抗生素的培养基中连续传代约 50 代后 ,有 68% 的菌体细胞仍保持 Sm 抗性。表明重组质粒 pSDK-1 在 Tt-Z2 菌株中比较稳定。

2.4 重组菌表达产物的鉴定

酶活性测定结果表明(表 2) ,质粒 pSDK-1 上 *pfkA* 基因在 *pfk* 缺陷株 *E. coli* DF1010 中表达的酶活性稍高于野生型 *E. coli* K-12 菌株。在对照野生型 Tt-Z2 菌株的细胞提取液中未检测到磷酸果糖激酶活性 ,进一步证实氧化硫硫杆菌存在代谢缺陷。而 *pfkA* 基因在 Tt-Z2 重组菌中表达出具有活性的酶 ,并且其表达水平不受培养基中葡萄糖含量的影响。SDS-PAGE 分析(图 1)表明 ,在 *E. coli* K-12、*E. coli* DF1010(pSDK-1)及 Tt-Z2(RP4 , pSDK-1)菌株的表达产物中均出现了分子量约为 34kD 的蛋白条带 ,而对照 *E. coli* DF1010 和 Tt-Z2 中均无相应条带。Tt-Z2(RP4 , pSDK-1)菌与对照野生型菌株的带型差异较大 ,因这些菌株的接种量和培养条件均相同 ,因此可以排除由于菌体生长状态不同而导致带型的差异 ,造成这种现象的原因可能是质粒的复制和表达影响了菌体的代谢和生长 ,使菌体内各种基因的表达发生相应变化 ,导致 SDS-PAGE 条带的差异。

表 2 不同菌株磷酸果糖激酶活性比较		
Table 2 Comparison of phosphofructokinase-1 activity in different strains		
Strains	Specific activity of PFK-1 ^a (U/g)	
<i>E. coli</i> K-12	85.9 ± 1.12	—
DF1010	00.0	—
Tt-Z2	00.0 ^b	00.0 ^c
DF1010 (pJRD215)	00.0	—
DF1010 (pSDK - 1)	96.6 ± 0.66	—
Tt-Z2 (RP4 , pJRD215)	00.0 ^b	00.0 ^c
Tt-Z2 (RP4 , pSDK-1)	13.5 ± 0.73 ^b	13.1 ± 0.85 ^c

a. Values were obtained from three independent experiments and are shown as means ± standard deviations ;b. Growth in Starkey-S⁰ medium ;c. Growth in Starkey- S⁰ + 5g/L glucose medium.

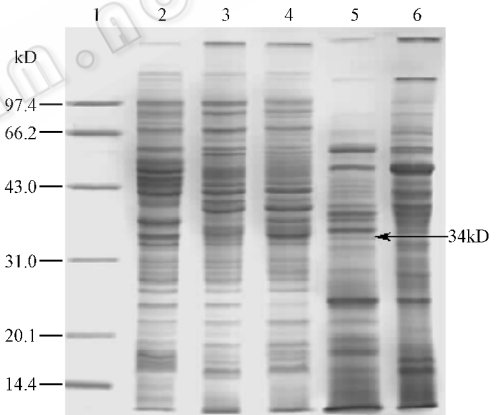


图 1 重组质粒 pSDK-1 表达产物的 SDS-PAGE

- Fig.1 SDS-PAGE analysis of pSDK-1 expression protein
1. Protein molecular weight marker ;
 2. *E. coli* K-12 ;
 3. *E. coli* DF1010 ;
 4. *E. coli* DF1010(pSDK-1) ;
 5. Tt-Z2(RP4 , pJRD215) ;
 6. Tt-Z2 .

然而 ,重组质粒在氧化硫硫杆菌中表达的酶活性比较低 ,约为质粒在 *E. coli* DF1010 中所表达酶活性的 14%。利用 RT-PCR 方法从转录水平上探讨基因不能有效表达的原因。对照野生型 Tt-Z2 未检测到 *pfkA* 基因 mRNA 的表达 ,而含质粒的 Tt-Z2 菌中 mRNA 的表达水平低于大肠杆菌。

2.5 葡萄糖对重组菌生长的影响

葡萄糖对野生型 Tt-Z2 菌的生长没有明显影响 ,但对重组菌 Tt-Z2(RP4 , pSDK-1)的生

长具有明显的促进作用(图2)。培养基中不加葡萄糖时,重组菌的生长量较对照 Tt-Z2 菌株少,原因不清楚,可能是质粒在宿主菌中进行复制和表达影响了菌株的正常生长。

2.6 重组菌对葡萄糖的利用

对照 Tt-Z2 菌在其整个生长过程中培养基的葡萄糖含量基本不变,说明不能利用葡萄糖。而重组菌 Tt-Z2 RP4 pSDK-1 培养基中葡萄糖浓度随培养时间的延长而逐渐下降,但降低的速度比较缓慢,从最初 5g/L 左右,到第 11 天仍有 3.4g/L 的剩余,说明该菌可以利用葡萄糖,但利用能力有限(图3)。

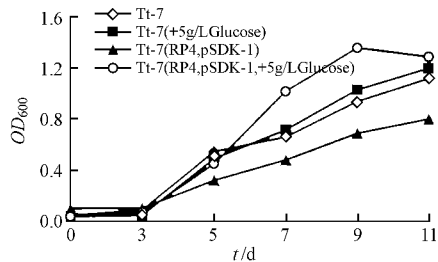


图2 不同培养条件下各菌株的生长曲线

Fig.2 Growth of Tt-Z2 transconjugants and the original strains in Starkey-S⁰ medium in the absence or presence of 5g/L glucose Each data point represents the mean value of three independent experiments.

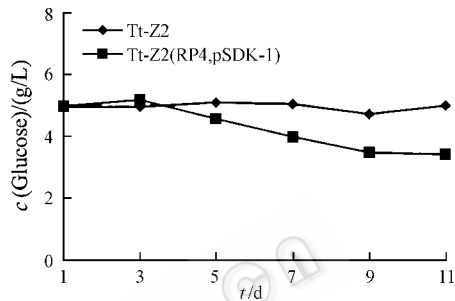


图3 培养基中葡萄糖含量的变化

Fig.3 Glucose concentration in the supernatant of Tt-Z2 and Tt-Z2 (RP4 pSDK-1) culture Each data point represents the mean value of three independent experiments.

3 讨论

分子遗传学研究表明^[3~5,11~13],氧化硫硫杆菌与大肠杆菌在生理、代谢及遗传特性等方面虽然存在很大差别,但在基因结构和功能调节等方面具有一定的相似性。基于 16S rRNA 等序列资料的系统发育研究表明^[14],硫杆菌和大肠杆菌的发育关系可能比较近,其许多的持家基因能够与大肠杆菌中的相应基因互补。本项研究将构建的含有大肠杆菌 *pfkA* 基因的重组质粒 pSDK-1 通过接合转移的方式导入氧化硫硫杆菌 Tt-Z2 中,*pfkA* 基因得到了表达,说明大肠杆菌的启动子可以被氧化硫硫杆菌的 RNA 聚合酶识别和结合,因此极端嗜酸性硫杆菌在基因表达机制方面与异养性大肠杆菌可能存在相似之处。

构建的质粒虽然在氧化硫硫杆菌 Tt-Z2 中表达出具有活性的酶,但活性却较低,RT-PCR 分析显示氧化硫硫杆菌基因工程菌 *pfkA* 基因 mRNA 的表达水平低于大肠杆菌,基因的有效表达在很大程度上决定于基因的转录水平,而转录则主要受启动子作用强弱的影响,本文所克隆的 *pfkA* 基因含有自身的启动子,可能由于基因表达系统存在差异,使大肠杆菌启动子在氧化硫硫杆菌中不能完全被宿主的 RNA 聚合酶所识别,因而导致外源基因无法有效表达。但 Tt-Z2 重组菌与大肠杆菌 DF1010 中 *pfkA* 基因 mRNA 表达水平的差异与酶活性测定结果的差异并不十分一致,说明工程菌的低酶活一方面是由于在转录水平上较低的 mRNA 表达量所致;另一方面,在转录后水平也存在影响基因有效表达的因素。上述结果说明,氧化硫硫杆菌和大肠杆菌之间的基因表达和调控系统还存在一定差异。

自养与异养的关系一直是人们关注的焦点,氧化硫硫杆菌为专性自养菌,在其特殊能源缺乏时,不能利用有机物质,而在其特殊能源存在的情况下,能不同程度地吸收和同化部分有机物,但这种同化能力是有限度的^[1]。本实验室以往的研究发现^[15],氧化硫硫杆菌可以同化 α -酮戊二酸等多种有机酸,虽然其延迟期有所增加,但最终添加有机酸的实验组的生长得率高于对照组。在本研究中,对照菌 Tt-Z2 不能利用培养基中的葡萄糖,葡萄糖也不影响该菌的生长,推测氧化硫硫杆菌缺乏糖代谢的某些关键酶,使该菌无法利用葡萄糖。而重组菌 Tt-ZX(RP4, pSDK-1)可以利用葡萄糖,葡萄糖可促进该菌的生长,说明虽然氧化硫硫杆菌缺乏三羧酸循环关键酶—— α -酮戊二酸脱氢酶,不能利用葡萄糖彻底氧化获得能量,但由于重组质粒 pSDK-1 在 Tt-Z2 中表达出具有活性的磷酸果糖激酶,可催化葡萄糖沿 EMP 途径降解,使该菌可以部分同化葡萄糖作为碳源,通常同化有机物比同化二氧化碳构成细胞碳所消耗的能量少得多,因此从某种意义上来说是节约了能量,从而促进细胞的生长。但重组菌对葡萄糖的利用能力却有限,可能是质粒 pSDK-1 在 Tt-Z2 中表达的酶活性较低,或者单纯克隆 EMP 途径中的一种酶,并不能使有机质代谢途径完全运转,使细菌不能大量利用葡萄糖而迅速生长。

本实验首次将 *E. coli* 代谢的关键酶基因引入专性自养极端嗜酸性氧化硫硫杆菌中,并获得表达。该工程菌能够部分利用葡萄糖并快速生长,为解决实际应用中菌体生长过慢、效率低的难题提供了一条可能的途径,具有重要意义,对研究自养与异养的关系也具有一定的作用。进一步需利用同位素示踪的方法研究葡萄糖在重组菌细胞内的代谢途径,以探讨葡萄糖促进其生长的原因,并继续筛选高效而稳定的表达系统,以提高其表达效率。另外,运用基因工程方法改变了氧化硫硫杆菌的自养特性,使其能够利用葡萄糖等有机物作为碳源或能源,在解决生长速度问题的同时能否影响其脱硫能力还需进行研究。在兼性自养菌,当其生长于无机盐培养基中时,代谢有机质的有关酶活性受到抑制,而在培养基中加入有机物时,则自养代谢的酶活性受到抑制。由于自养性氧化硫硫杆菌中缺乏上述相应的代谢调节机制,推测基因工程菌对有机质的代谢可能并不会明显抑制该菌对硫的氧化,但还需进一步进行硫氧化能力的测定。因此构建高效表达异源酶基因并能够代谢有机质的工程菌并应用于生产实践仍存在很大的距离。

参 考 文 献

- [1] Martin A. Organic nutrition of chemolithotrophic bacteria. *Ann Rev Microbiol*, 1978, **32**: 433 ~ 68.
- [2] 金松谟, 颜望明, 王祖农. 氧化硫硫杆菌接合转移系统的建立. *生物工程学报*, 1993, **9**(1): 87 ~ 89.
- [3] Jin S M, Yan W M, Wang Z N. Transfer of IncP plasmids to extremely acidophilic *Thiobacillus thiooxidans*. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**(1): 429 ~ 430.
- [4] 蒯 军, 颜望明. RP4 质粒及其带动的硫杆菌重组质粒 pSDT125 在氧化硫硫杆菌中的接合转移. *微生物学杂志*, 1992, **12**(2): 10 ~ 14.
- [5] 邵 群, 颜望明, 刘振盈, 等. 抗砷质粒 pSGR941 的构建及其在专性自养嗜酸性氧化硫硫杆菌中的表达. *山东大学学报(自然科学版)*, 1997, **32**(2): 348 ~ 352.
- [6] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
- [7] Datta N, Hedges R W, Shaw E J, et al. Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 1971, **108**: 108 ~ 112.

1244 ~ 1249.

- [8] Davison J , Heusterspreute M , Chevalier N , *et al.* Vectors with restriction site banks V. pJRD215 , a wide-host-range cosmid vector with multiple cloning sites. *Gene* , 1987 , **51** 275 ~ 280.
- [9] Blattner F R , Plunkett G , Bloch C A , *et al.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* , 1997 , **277** (5331) :1453 ~ 1474.
- [10] Kotlarz D , Buc H. Phosphofructokinases from *Escherichia coli* . *Methods Enzymol* , 1982 , **90** 60 ~ 70.
- [11] 金松谟 颜望明. 氧化硫硫杆菌质粒的分离. 微生物学通报 , 1988 , **15** (1) 20 ~ 21.
- [12] 颜望明 金松谟 张广勋 , 等. 氧化硫硫杆菌重组质粒 pSDT125 的构建及其在大肠杆菌之间的转移. 山东大学学报 (自然科学版) , 1991 , **26** (4) 476 ~ 481.
- [13] 颜望明. 氧化硫硫杆菌启动子功能片段在大肠杆菌中的克隆和表达. 遗传学报 , 1990 , **17** (2) :143 ~ 147.
- [14] Lane D J , Harrison A P , Stahl D , *et al.* Evolutionary relationships among sulfur- and iron-oxidizing eubacteria. *J Bacteriol* , 1992 , **174** (1) 269 ~ 278.

Expression of Phosphofructokinase Gene from *Escherichia coli* K-12 in Obligately Autotrophic Bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans*

Tian Keli Lin Jianqun Liu Xiangmei Liu Ying Zhang Changkai*

(Institute of Microbiology , Shandong University , Jinan 250100 , China)

Abstract : A plasmid pSDK-1 containing the *Escherichia coli* phosphofructokinase-1 (EC 2.7.1.11) gene (*pfkA*) was constructed and transferred into *Acidithiobacillus thiooxidans* Tt-Z2 by conjugation. The transfer frequency of plasmid from *E. coli* to Tt-Z2 was 2.6×10^{-6} . More than 68% of Tt-Z2 cells carried the recombinant plasmids after being cultured for 50 generations without selective pressure , which showed that pSDK-1 was maintained consistently in Tt-Z2. The *pfkA* gene from *E. coli* could be expressed in this obligately autotrophic bacterium but the enzyme activity (14 U/g) was lower than that in *E. coli* (K-12 : 86 U/g ; DF1010 carrying plasmid pSDK-1 : 97 U/g). In the presence of glucose , the Tt-Z2 transconjugant consumed glucose leading to a better growth yield.

Key words : *Acidithiobacillus thiooxidans* , Phosphofructokinase , Conjugation

Foundation item : National Natural Science Foundation of China (30170026) ; Special Foundation of Chinese Ministry of Education (99181)

* Corresponding author. Tel : 86-531-8378665 ; E-mail : ckzhang@life.sdu.edu.cn

Received date : 12-25-2002