

黑曲霉 *pepB* 基因缺失菌株的构建及其功能分析

孙 晶² 李景鹏² 王敖全^{1*} 唐国敏¹ 王华明³

(¹ 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100080)

(² 东北农业大学生命科学院 哈尔滨 150030)

(³ Genencor International Incorporation, California 94304, USA)

摘 要 :以黑曲霉(*Aspergillus niger*) GICC2773 基因组 DNA 为模板,用 PCR 方法分别扩增 *pepB* 基因中的上游约 1.4kb 和下游约 1.3kb 两段 DNA 序列,将此两段序列按同一方向分别插入质粒 pMW1 中潮霉素抗性基因(*hph*)表达单元的 5'和 3'端,构建成重组质粒 pMW1-*pepB*,用于通过同源重组靶向破坏基因组中的 *pepB* 基因。同源重组则采用原生质体-PEG 方法,将酶切 pMW1-*pepB* 得到的线性片段转化 *A. niger* GICC2773 菌株,通过潮霉素选择平板得到 62 个 Hgy 抗性转化子,然后采用 PCR 方法从这些抗性转化子中筛选到 1 个由于同源重组产生的 *pepB* 基因缺失突变菌株 *pepB*29。功能分析显示该突变株的酸性蛋白酶活性有明显下降,外源蛋白漆酶的分泌表达有所提高。

关键词 :黑曲霉, *pepB* 基因缺失, 同源重组, 外源蛋白

中图分类号: Q784 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2004)06-0766-05

黑曲霉(*Aspergillus niger*)因其独特的高分泌性能,高强度启动子,成熟的发酵工艺和安全性,成为新一代微生物表达分泌系统。但目前,国际上还只有为数不多的外源蛋白以黑曲霉为宿主获得可应用水平的表达,分析产量低的主要原因有黑曲霉自身蛋白酶对外源蛋白的降解和外源蛋白分泌系统的限制。尽管通过生产中降低温度,产物与蛋白酶早期分隔以及添加蛋白酶抑制剂可以减少外源蛋白的降解,但并不能从根本上解决问题。实践证明,通过基因敲除或诱变来筛选蛋白酶缺陷株,是克服这一障碍的行之有效的办法^[1-5]。

对 *A. niger* 的蛋白酶谱分析表明其主要产酸性蛋白酶,这正是目的蛋白遭受降解的原因所在。目前,已从 *A. niger* 的培养上清中纯化出 4 种酸性蛋白酶,它们分别是 PEPA,PEPB 和 PEPF(或 CPDII),PEPC(或 CPDI)。 *pepB* 编码一种天冬氨酸蛋白酶,占胞外酸性蛋白酶的 6%^[1,2],本课题组曾用紫外诱变方法,获得部分酸性蛋白酶缺陷株,用作基因工程受体株^[6]。本文利用同源重组的方法将黑曲霉中 *pepB* 基因破坏,得到 *pepB* 基因缺失菌株,以研究该基因对内源蛋白及外源蛋白(Laccase)的分泌表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 基因 :黑曲霉 *pepB* 基因序列与黑曲霉染色体 DNA 由美国 Genencor 公司提供。

1.1.2 菌种 :*A. niger* GICC2773 是 *pepA* 基因缺失,并在基因组已整合有编码外源蛋白漆酶基因的黑曲霉菌株,由美国 Genencor 公司提供;大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 用于质粒构建,由本实验室保存。

1.1.3 质粒 :pMW1,含异青霉素 N 启动子 *PpcbC* 引导表达的潮霉素 B 磷酸转移酶基因 *hph*,由本实验室保存。

1.1.4 培养基 :LB 培养基用于 *E. coli* 生长和保存。黑曲霉原生体制备的前培养基为:每升含淀粉 30g,酵母粉 20g, KH₂PO₄ 5g,玉米粉 5g,自然 pH。黑曲霉转化培养基底层为 GMPS:每升含麦芽提取物 20g,葡萄糖 20g,蛋白胨 1g,蔗糖 342g,琼脂 12g,自然 pH。上层软洋菜培养基除每升含 3.5g 琼脂外,其它与 GMPS 相同。不含蔗糖的 GMPS(GMP)用于黑曲霉转化子二次筛选与斜面培养基。黑曲霉 *pepB* 缺失株蛋白分泌水平分析用摇瓶培养基为:每升含柠檬酸三钠(Na₃C₆H₅O₇·2H₂O)80g, (NH₄)₂SO₄ 15g, NaH₂PO₄·H₂O 1g, MgSO₄·7H₂O 1g, 10% Tween 80

基金项目: Joint Project granted by Genencor International Inc. of USA

* 通讯作者。 Tel: 86-10-62554397; Fax: 86-10-62560912; E-mail: wangaq@sun.im.ac.cn

作者简介: 孙 晶(1978-),女,黑龙江人,硕士研究生,主要从事应用微生物基础研究工作。

收稿日期: 2004-04-13, 修回日期: 2004-07-09

10mL, Tryptic soy broth 45g, 微量元素溶液^[7]20mL, 定容 700mL, 灭菌后加入 40% 麦芽糖 300mL, 接种前外加 CuSO_4 至终浓度 0.067mmol/L。

1.1.5 主要试剂: beta-D-Glucanase G 裂解酶是 In-eterSpex 的产品。凝胶 DNA 回收试剂盒为申能博彩科技有限公司产品。葡萄糖试剂盒为中生北控生物科技股份有限公司产品。Folin 酚试剂为鼎国生物技术有限公司产品, ABTS 为 Sigma 产品。Taq DNA 聚合酶为天为时代科技有限公司产品。各种限制性内切酶, T4 DNA 连接酶及 T4 DNA 聚合酶为 TaKaRa 生物公司产品。引物由赛百盛生物公司合成。

1.2 PCR 引物设计和扩增反应

根据 *pepB* 全基因序列设计两对引物 P1/P2 和 T1/T2。P1:(5'-CCGTTAACCCTCCACGTATTCCAATA-TACC-3'); P2:(5'-AAGTCGACACCAGTCTGGAGAA-TAGCGG-3'); T1:(5'-CGGGATCCTTGAGGGTGATC-TTTGCGAGACCAAC-3'); T2(5'-GGGTTAACATGTCG-CATTACTCCTGGCTGAAG-3')。

在 P1 和 P2 中分别引入限制性酶切位点 *Hpa* I 和 *Sal* I, T1 和 T2 中分别引入限制性酶切位点 *Bam*H I 和 *Hpa* I。以黑曲霉染色体 DNA 为模板, 使用上述两对引物分别 PCR 扩增 *pepB* 基因中的上游(以后简称为 P 端)序列与下游(以后简称为 T 端)序列。PCR 反应体系: 模板 < 1 μg , 引物 1(25 $\mu\text{mol/L}$) 2 μL , 引物 2(25 $\mu\text{mol/L}$) 2 μL , 10 \times 反应缓冲液 5 μL , dNTP 混合液(各 2.5mmol/L) 3 μL , Taq DNA 聚合酶(2.5U/ μL) 1 μL , 补加去离子水到 50 μL 。PCR 扩增条件: 94 $^\circ\text{C}$ 3min, 94 $^\circ\text{C}$ 1min, 57 $^\circ\text{C}$ (P 端)或 59 $^\circ\text{C}$ (T 端) 1min, 72 $^\circ\text{C}$ 1min30s, 30 个循环, 72 $^\circ\text{C}$ 10min。

1.3 质粒提取、酶切、连接、大肠杆菌转化等分子操作

实验均参照文献[8]进行。

1.4 黑曲霉原生质体-PEG 转化

黑曲霉原生质体的制备参照 Wernars(1986)等^[9]的方法操作。将构建的 *pepB* 阻断质粒用 *Hpa*I 酶切, 得到约 4.2kb 的转化线性片段, 与载体片段一起混合到 200 μL 原生质体($2 \times 10^7 \sim 4 \times 10^7$ 个)中, 加入 50 μL PEG 缓冲液(PEG4000 50%, CaCl_2 0.05mol/L, $\text{Tris} \cdot \text{Cl}$ 0.01 mol/L, pH 7.4), 冰上保温 30min 后再加入 1mL 上述 PEG 缓冲液, 室温放置 20min, 加入 1mL 山梨醇溶液(山梨醇 1.2mol/L, CaCl_2 0.05mol/L, $\text{Tris} \cdot \text{Cl}$ 1 mol/L, pH 7.5)并与融化的软洋菜培养基混匀, 立即铺于 GMPS(加入 200 $\mu\text{g/ml}$ 的潮霉素 HgyB)平板上, 30 $^\circ\text{C}$ 培养 4~7d。

1.5 同源重组转化子的检测

参照文献[10]的方法提取黑曲霉转化子染色体 DNA。以转化子基因组 DNA 为模板, 用引物对 P_{hph}/P_{T-out} 和 P3/T3 进行 PCR 检测。P_{hph}(5'-GGGCAAAG-GAATAGAGAGTAG-3'); P_{T-out}(5'-TCGTTATAGCTTCG-TACACAATG-3'); P3:(5'-ACGGCTACTGGAAGAAC-AAGAG-3'); T3:(5'-AGACGGAGGTCTCGGTGAGG-AC-3')。

PCR 反应体系同上。前者反应条件: 94 $^\circ\text{C}$ 3min, 94 $^\circ\text{C}$ 1min, 47 $^\circ\text{C}$ 1min, 72 $^\circ\text{C}$ 1min30s, 30 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 10min。后者反应条件: 94 $^\circ\text{C}$ 3min; 94 $^\circ\text{C}$ 1min, 50 $^\circ\text{C}$ 1min, 72 $^\circ\text{C}$ 1min, 30 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 10min。PCR 产物的 DNA 核苷酸序列测定由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.6 黑曲霉 *pepB* 基因缺失株与出发株的内源和外源蛋白分泌水平的比较

培养基见 1.1.4, 29.5 $^\circ\text{C}$ 、200 r/min 培养 120h, 取发酵上清进行测定。上清中总蛋白测定参照文献[11]的 Folin 酚方法操作。酸性蛋白酶活性测定亦采用 Folin 酚方法, 以脱脂奶粉为底物, 在 pH3.0 的乳酸缓冲液中进行。漆酶活性测定是将酶液适当稀释, 以 ABTS 为底物, 在 pH4.6 的醋酸缓冲液中, 37 $^\circ\text{C}$ 保温 30min, 测 OD₄₂₀ 值。糖化酶活性测定以可溶性淀粉为底物, 在 pH4.6 的醋酸缓冲液中, 37 $^\circ\text{C}$ 保温 30min, 生成的葡萄糖用葡萄糖试剂盒显色测 OD₅₂₅ 值。

2 结果

2.1 *pepB* 基因 P 端和 T 端同源序列的 PCR 合成

按 1.2 所述进行 PCR 扩增, 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检查, 获得了长约 1.4kb 的 P 端同源序列片段和 1.3kb 的 T 端同源序列片段, 大小分别与预期的 1398bp 和 1274bp 相符(图略)。

2.2 *pepB* 基因阻断质粒的构建

PCR 产物 P 端先用 T4 DNA 聚合酶削平, 再用 *Sal* I 酶切, 载体 pMW1 先用 *Hind*III 酶切, Klenow 补平后再用 *Sal* I 酶切。将处理后的 P 端克隆到上述载体, 得到 pMW1-P。PCR 产物 T 端同样用 T4 DNA 聚合酶削平, 克隆到 pMW1-P 的 *Sma* I 位点。获得含 *pepB* 阻断基因的 pMW1-*pepB*(图 1), 分别用 *Pst* I 和 *Eco*RV, *Sal* I 和 *Bam*H I 双酶切, *Hpa* I 单酶切, 均获得与预期相同的酶切片段, 证明构建正确。

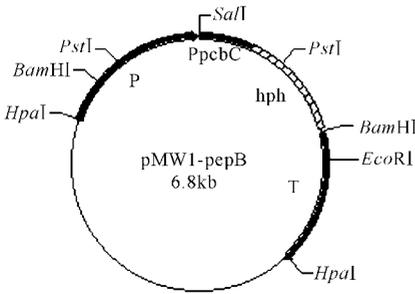


图 1 *pepB* 基因阻断质粒的结构示意图

Fig. 1 Diagram of the *pepB* gene disruption plasmid pMW1-*pepB*

2.3 黑曲霉 *pepB* 基因缺失株的筛选及 PCR 检测

为了通过同源重组构建 *pepB* 基因缺失株,以 *Hpa* I 酶切 pMW1-*pepB* 阻断质粒,产生 4.2kb 的线性片段,该片段由 *pepB* 基因的 P 端和 T 端同源序列片段和插入其间的选择标记 *hph* 组成。进而通过原生质体-PEG 转化方法将该片段导入黑曲霉 GICC2773 在 GMPS/Hgy 平板上筛选 *hph^r* 转化子经

同样平板复筛,共得到 62 个 *hph^r* 转化子。在理论上这些转化子可产生于两种转化途径,即同源重组和非同源重组。为从这些转化子中检出发生了同源重组的转化子,即 *pepB* 缺失株,我们按材料方法 1.5 对每个转化子进行了 PCR 检测。

如果 4.2kb 的线性片段与受体染色体 DNA 发生同源重组,*pepB* 基因在 P 端同源序列和 T 端同源序列之间的 203bp 染色体 DNA 将被 *hph* 表达单元取代。则以 P_{hph}/P_{T-out} 为引物的 PCR,将得到大小约为 1.3kb 的特异片段;而以 P3/T3 为引物的 PCR 检测,将得到大小约为 1.8kb 的片段(图 2)。如果 4.2kb 线性转化片段随机插入染色体基因组,则 *pepB* 基因没有被破坏,以 P_{hph}/P_{T-out} 引物对各转化子进行 PCR 检测时就不会有 1.3kb 特异片段出现或无 PCR 扩增产物;而以 P3/T3 引物对各转化子进行 PCR 检测时,将得到 516bp 的特异性片段,与出发株相同。

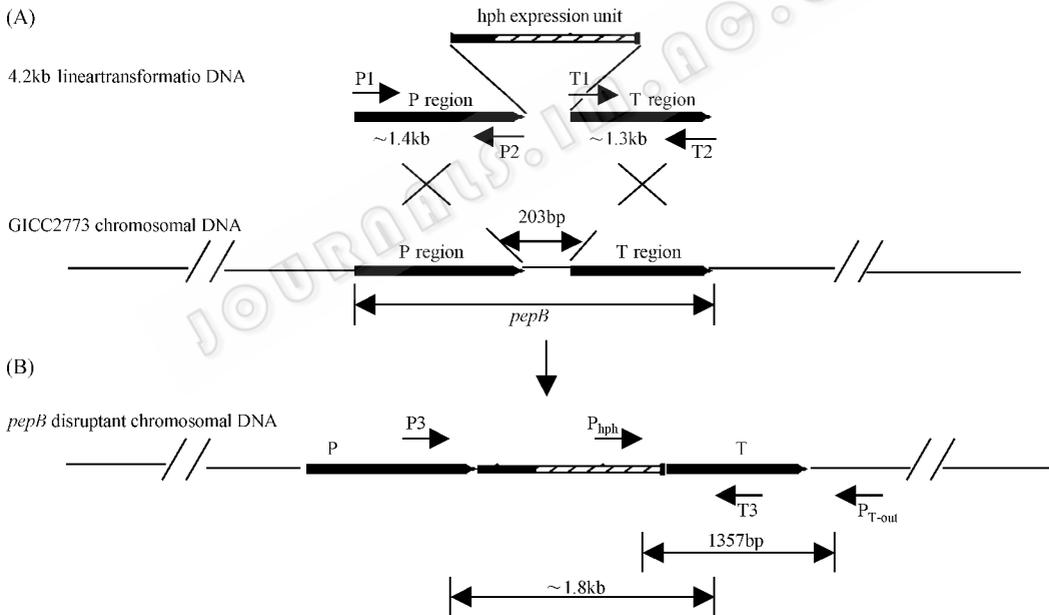


图 2 *pepB* 基因缺失菌株的构建 (A) 和 PCR 检测的引物设计 (B)

Fig. 2 Construction of *pepB* gene disruptant (A) and primer design of PCR detection of *pepB* gene disruptant (B)

以上两组 PCR 检测结果,发现只有 *pepB29* 分别得到约 1.3kb(图 3, lane 5)和 1.8kb(图 3, lane 3)的特异片段,而其它 61 个转化子均出现 516bp 非同源重组的特异性条带(图 3, lane 1)。以上结果初步表明 *pepB29* 为 *pepB* 基因缺失突变株。

2.4 *pepB* 基因缺失的核苷酸序列证据

为从核苷酸序列水平进一步证明 *pepB29* 确实发生了 *pepB* 基因的缺失,即 *pepB* 基因内 203bp 被 *hph* 表达单元所取代,我们对上述 1357bp 的特异性

片段作了核苷酸序列测定。由于此 PCR 扩增引物,其一设在 *hph* 内部(P_{hph}),另一设在 T 端同源片段以外(P_{T-out})。因此如果 *pepB29* 菌株中 4.2kb 的线性片段与受体染色体 DNA 确实发生了同源重组,那么 1357bp DNA 序列应包括由 P_{hph} 起始的 *hph* 基因序列,全部 *pepB* 基因的 T 端片段序列和与其 3'端相连接的 *pepB* 基因下游至 P_{T-out} 的染色体 DNA 序列(图 4)。序列测定结果与预期完全一致。

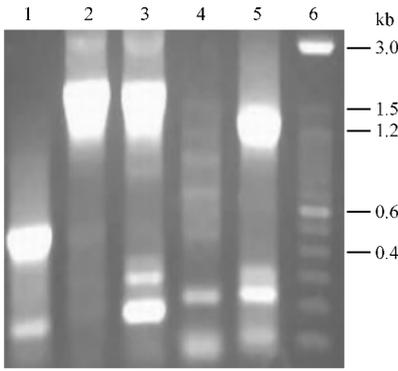


图 3 *pepB* 基因缺失的 PCR 检测

Fig.3 PCR detection of *pepB* gene disruptant

1. Primer : P3/ T3 , template : GICC2773 chromosomal DNA , amplified fragment : 516bp ; 2. Primer : P3/ T3 , template : pMW1-*pepB* , amplified fragment : 1.8kb ; 3. Primer : P3/T3 , template : *pepB29* chromosomal DNA , amplified fragment : 1.8kb ; 4. Primer : P_{hph}/P_{T-out} , template : GICC2773 chromosomal DNA , amplified fragment : none ; 5. Primer : P_{hph}/P_{T-out} , template : *pepB29* chromosomal DNA , amplified fragment : 1.3kb ; 6. Marker : 100bp ladder.

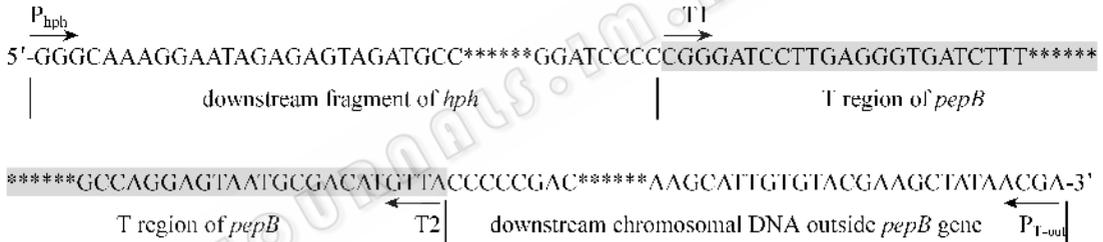


图 4 *pepB* 基因缺失的核苷酸序列证据

Fig.4 Nucleotide sequence evidence of *pepB* gene disruptant

2.6 黑曲霉 *pepB* 基因缺失对内源蛋白和外源蛋白分泌表达的影响

测定了 *pepB* 基因缺失对外源蛋白漆酶和内源蛋白糖化酶分泌表达的影响。结果表明外源漆酶较出发株的分泌水平提高了 8% ~ 9% ,提高幅度不

2.5 黑曲霉 *pepB* 基因缺失株的酸性蛋白酶活性

测定结果示于表 1。由表可见 ,在 *pepB29* 中酸性蛋白酶活性较出发株明显下降。这与该菌株中 *pepB* 基因破坏导致酸性蛋白酶分泌活性下降的预期结果是一致的。由于 GICC2773 菌株已经缺失了 *pepA* 基因 ,因此 *pepB* 基因缺失后 ,余下的酸性蛋白酶活性由 *pepF* ,*pepG* 和可能还存在的未知酸性蛋白酶所产生。

表 1 *pepB* 基因缺失株与原株 GICC2773 胞外酸性蛋白酶活性比较

Table 1 Comparison of extracellular acidic proteolytic activity of *pepB* gene disruptant with GICC2773

<i>pepB29</i> (<i>OD</i> ₆₆₀)	GICC2773	Drop of <i>pepB29</i> enzyme activity/ %
I 0.0330	0.0585	43.6
II 0.0260	0.0370	29.7
III 0.0285	0.0375	24

Acidic proteolytic activity was denoted by *OD*₆₆₀ ; I , II and III were three repeated experiments , the each value was the average of two parallel samples in each experiment.

表 2 *pepB* 基因缺失对胞外总蛋白 ,外源漆酶和内源糖化酶分泌表达水平的影响

Table 2 Effect of *pepB* disruption on secretion level of total protein , laccase and glucoamylase

	Extracellular total protein(<i>OD</i> ₅₀₀)			Laccase(<i>OD</i> ₄₂₀)			Glucoamylase(<i>OD</i> ₅₂₅)		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
<i>pepB29</i>	0.2115	0.1900	0.1860	0.2055	0.1885	0.2280	0.0685	0.1295	0.1490
GICC2773	0.2040	0.1915	0.1960	0.1885	0.1745	0.2090	0.0725	0.1320	0.1700

Secretion level of extracellular total protein and laccase and glucoamylase were denoted by the respective *OD* value ; I , II and III were three repeated experiments , the each value was the average of two parallel samples in each experiment.

3 讨论

Johannes 等^[1]报道 ,从 *A. niger* 的培养上清中已纯化出四种酸性蛋白酶 ,包括两种天冬氨酸蛋白酶

PEPA ,PEPB 和两种丝氨酸羧肽酶 PEPK (或 CPD II) , PEPQ (或 CPD I) ,其中 PEPA 和 PEPB 蛋白酶分别占胞外酸性蛋白酶的 84% 和 6%。GICC2773 菌株已敲除 *pepA* 基因 ,理论上如果 *pepB* 基因再缺失 ,胞外酸

性蛋白酶活性应下降 37.5% ,由于各批实验的培养条件和培养时间的稍许不同会影响各不同胞外酸性蛋白酶的表达水平 ,从而造成各批测定值之间有一定差异 ,但是酸性蛋白酶活力下降的趋势是显然的。

胞外总蛋白测定值与出发株无明显差异 ,此结果说明 *pepB* 基因缺失对菌株的生长速率没有明显影响。虽然 PEPB 蛋白酶所占比例较小 ,但我们的结果表明 ,*pepB* 基因的缺失对外源蛋白漆酶的分泌表达有保护作用 ,还有哪些外源蛋白受 *pepB* 基因缺失的保护还需具体实验证明。Moralejo 等^[12] 将 *Aspergillus awamori* 中 *pepB* 基因缺失 ,使 Thaumatin 的产量有明显的提高。

由于丝状真菌在经济上和科学中的重要地位 ,研究者们正从不同途径探索如何提高外源蛋白的产量和质量。我们正在构建黑曲霉中其他基因的缺失株 ,期望得到进一步提高重组蛋白分泌表达的理想宿主。

参 考 文 献

- [1] van den Hombergh J P , van de Vondervoort P J , Fraissinet-Tachet L , et al. *Aspergillus* as a host for heterologous protein production : the problem of proteases. *Trends Biotechnol* , 1997 , **15**(7) :256 - 263.
- [2] van den Hombergh J P , Sollewijn Gelpke M D , van de Vondervoort P J , et al. Disruption of three acid proteases in *Aspergillus niger* effects on protease spectrum , intracellular proteolysis , and degrada-

tion of target proteins. *Eur J Biochem* , 1997 , **247**(2) :605 - 613.

- [3] Berka R M , Ward M , Wilson L J , et al. Molecular cloning and deletion of the gene encoding aspergillopepsin A from *Aspergillus awamori*. *Gene* , 1990 , **86**(2) :153 - 162.
- [4] Broekhuijsen M P , Mattern I E , Contreras R , et al. Secretion of heterologous proteins by *Aspergillus niger* : production of active human interleukin-6 in a protease-deficient mutant by KEX2-like processing of a glucoamylase-hIL6 fusion protein. *J Biotechnol* , 1993 , **31**(2) :135 - 145.
- [5] Mattern I E , van Noort J M , van den Berg P , et al. Isolation and characterization of mutants of *Aspergillus niger* deficient in extracellular proteases. *Mol Gen Genet* , 1992 , **234**(2) :332 - 336.
- [6] 刘 丽 , 刘 谨 , 仇润祥 , 等. 丝状真菌表达分泌系统中受体菌的构建. *生物工程学报* , 2002 , **18**(6) :667 - 670.
- [7] Cove D J. Genetic studies of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Biol Rev Camb Philos Soc* , 1979 , **54**(3) :291 - 327.
- [8] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.
- [9] Wernars K , Goosen T , Swart K , et al. Genetic analysis of *Aspergillus nidulans* amdS⁺ transformant. *Mol Gen Genet* , 1986 , **205**(2) :312 - 317.
- [10] 朱 衡 , 瞿 峰 , 朱立煌. 利用氯化苄提取适于分子生物学分析的真菌 DNA. *真菌学报* , 1994 , **13**(1) :34 - 40.
- [11] Lowry O H , Rosebrough N J , Farr A L , et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* , 1951 , **193**(1) :265 - 275.
- [12] Moralejo F J , Cardoza R E , Gutierrez S , et al. Silencing of the aspergillopepsin B (*pepB*) gene of *Aspergillus awamori* by antisense RNA expression or protease removal by gene disruption results in a large increase in thaumatin production. *Appl Environ Microbiol* , 2002 , **68**(7) :3550 - 3559.

Construction and Functional Analysis of The *pepB* Gene Disruptant in *Aspergillus niger*

SUN Jing² LI Jing-Peng² WANG Ao-Quan^{1*} TANG Guo-Min¹ WANG Hua-Ming³

(¹ State Key Laboratory of Microbial Resources , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

(² Institute of Life Sciences , North-east Agriculture University , Harbin 150030 , China)

(³ Genencor International Inc. , California 94304 , USA)

Abstract : An integration plasmid pMW1-*pepB* for the *pepB* gene disruption in *Aspergillus* was constructed. The plasmid contained the *pepB* gene upstream (P) 1.4kb and downstream (T) 1.3kb homologous fragments with insertion of the expression unit of the hygromycin resistance gene (*hph*) between them. P and T DNA fragments were synthesized by PCR from *Aspergillus niger* chromosomal DNA. The integration plasmid was digested with the *Hpa* I restriction enzyme , the resultant 4.2kb linear fragment was introduced into the *Aspergillus niger* strain GICC2773 which expressing the glucoamylase/laccase fusion protein by PEG-mediated transformation. 62 Hygromycin resistance transformants were screened , and from them one strain named *pepB29* was identified to be the *pepB* disruptant by PCR analysis. Data of functional assay of the *pepB29* strain indicated that the disruption of the *pepB* gene secreted reduced acid proteolytic activity , and improved the heterologous protein laccase production.

Key words : *Aspergillus niger* , *pepB* gene deletion , Homologous recombination , Heterologous protein

Foundation item : Joint Project granted by Genencor International Inc. of USA

* Corresponding author. Tel 86-10-62554397 Fax : 86-10-62560912 E-mail : wangaq@sun.im.ac.cn

Received date : 04-13-2004