

胆固醇氧化酶快速鉴定方法研究

蔡晓霞, 梁世强*, 葛建芳, 穆筱梅 (仲恺农业工程学院化学与化工学院, 广东广州 510225)

摘要 [目的]建立胆固醇氧化酶的快速鉴定方法。[方法]采用初筛和复筛试验,从21种不同来源的样品中筛选出9株高酶活胆固醇氧化酶菌株,采用定性平板检测法、过氧化氢法、羟醛反应法、薄层层析法等定性检测胆固醇氧化酶的活性。[结果]从21种样品中共筛选出48株胆固醇氧化酶菌株,用定性平板检测法从中筛选出9株高酶活菌株(2-6、15-3、3-3、16-5、3-4、4-3、4-6、JM109和10192),其中4-6酶活最高;过氧化氢法共鉴定出6株高酶活菌株,与定性平板法检测结果一致;薄层层析法可定性检测出胆固醇氧化的唯一产物胆甾-4-烯-3-酮。[结论]定性平板检测法和薄层层析法可快速、有效的鉴定出高酶活胆固醇氧化酶菌株。

关键词 胆固醇氧化酶; 筛选; 薄层层析法

中图分类号 Q814 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)24-11379-03

Study on Rapid Identification Method of Cholesterol Oxidase

CAI Xiao-xia et al (Chemistry and Chemical Engineering College of Zhongkai Agricultural Engineering University, Guangzhou, Guangdong 510225)

Abstract [Objective] The aim was to establish the rapid identification method of cholesterol oxidase. [Method] Through primary and secondary screening tests, 9 cholesterol oxidase strains with high enzyme activity were screened out from 21 kinds of samples that from different sources. The activity of cholesterol oxidase was qualitatively detected by qualitative plate, hydrogen peroxide, aldol reaction and TLC methods. [Result] 48 cholesterol oxidase strains were screened out from 21 kinds of samples in total, and 9 cholesterol oxidase strains with high enzyme activity (2-6, 15-3, 3-3, 16-5, 3-4, 4-3, 4-6, JM109 and 10192) were screened out by qualitative plate method from them, among which enzyme activity of 4-6 was the highest. 6 cholesterol oxidase strains with high enzyme activity were screened out by hydrogen peroxide method, the detection results was uniform with that by qualitative plate method. Unique oxidation product of cholesterol (cholest-4-ene-3-ketone) could be detected out by TLC method. [Conclusion] Qualitative plate and TLC methods could quickly and effectively detect out cholesterol oxidase strains that with high enzyme activity.

Key words Cholesterol oxidase; Screening; TLC method

胆固醇既是一种动物性甾醇,也是一种类黄素蛋白和功能酶^[1],是构成脊椎动物细胞膜的重要成分。动物体内胆固醇含量过高可导致冠心病、动脉硬化和心肌梗塞的^[2]。胆固醇氧化酶可催化胆固醇氧化形成胆甾-4-烯-3-酮,利用该反应可检测血液中胆固醇的含量。胆固醇氧化酶可降低食品中胆固醇的含量^[3]、治疗心血管疾病等,胆固醇的氧化产物-胆甾-4-烯-3-酮还具有抗肥胖及治疗肝病等药效^[5-6]。目前,胆固醇氧化酶活性的测定方法有胆甾酮分析法、过氧化氢分析法、液相色谱法和薄层层析法等^[7]。笔者对胆固醇氧化酶的高活性菌株进行了分离筛选,分别采用定性平板检测法、过氧化氢法、胆甾酮快速测定法、胆甾酮慢速测定法和薄层层析法测定了胆固醇氧化酶菌株的酶活,并对各种检测方法行了比较分析,以期对胆固醇氧化酶活性的快速鉴定提供参考。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 样品。豆腐乳、豆皮、豆豉、腊肉、芝麻、荷塘土样,腐败蛋黄,市售酸菜,酸笋,动物园食肉动物新鲜粪便。

1.1.2 培养基。筛选培养基(pH值7.2)A:胆固醇(磨碎)2 g/L, KH_2PO_4 1.6 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, NH_4NO_3 0.2 g/L, NaCl 0.5 g/L,琼脂 20.0 g/L。

筛选培养基(pH值7.2)B:A中加250 μl 过氧化氢酶,25 μl 邻甲氧基苯胺。

发酵培养基(pH值7.5):胆固醇 1.5 g/L,葡萄糖 20.0 g/L,酵母膏 7.5 g/L,氯化钠 1.0 g/L,醋酸铵 2.0 g/L,磷酸

氢二钾 0.2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L,氯化钙 0.1 g/L。

种子(富集)培养基(pH值7.0):蛋白胨 10.0 g/L,酵母粉 5.0 g/L,氯化钠 10.0 g/L。

斜面培养基:蛋白胨 10.0 g/L,酵母粉 5.0 g/L,氯化钠 10.0 g/L,琼脂 20.0 g/L。

a液:100 \times 4-氨基安替比林 1 ml;苯酚 56 μl (68 $^\circ\text{C}$ 水浴),100 \times 叠氮钠 1 ml,0.1 mol/L pH值7.5的磷酸缓冲液 25 ml,过氧化氢酶 3 mg,定容至 100 ml。

b液:胆固醇 0.165 2 g,异丙醇 19.148 ml,4.26% TritonX-100 0.852 ml。

展开剂A(V苯:V乙酸乙酯=2:1)。

展开剂B(V三氯甲烷:V乙醚=4:1)。

显色剂A 0.3% 2,4-二硝基苯肼(0.3 g 2,4-二硝基苯肼溶于92 ml无水乙醇和8 ml浓盐酸中),显色剂B 30%浓硫酸-乙醇溶液。

1.1.3 主要仪器设备。手提式不锈钢蒸汽消毒器(上海三申医疗器械有限公司);磁力搅拌装置(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂);HZQ-C空气振荡器(哈尔滨市东明医疗仪器厂);高速冷冻离心机(常州市华普达教学仪器制造有限公司);紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);可调式移液器(上海金桥出口加工区)。

1.2 方法

1.2.1 胆固醇氧化酶菌株初筛。称取样品各1 g分别加入盛有玻璃珠和100 ml无菌水的锥形瓶中,振荡20 min,以10%的接种量接入100 ml富集培养基中,摇床(30 $^\circ\text{C}$ 、220 r/min)培养20 h,然后梯度稀释富集培养液,选取合适的5个梯度的培养液涂布筛选平板,30 $^\circ\text{C}$ 倒置培养18 h,挑取不同菌落形态的菌株进行平板划线分离,得到单菌落,用牙签

作者简介 蔡晓霞(1983-),女,四川广安人,硕士研究生,研究方向:生物功能化学品。*通讯作者。

收稿日期 2009-04-22

或接种环将单菌落转接到以胆固醇为唯一碳源的筛选培养基上,培养一段时间后转接到斜面培养基中保藏。

1.2.2 胆固醇氧化酶菌株复筛。挑取一环保藏的斜面菌种接入筛选培养基B中进行平板划线分离,将平板分成24小格,第1格中加入过氧化氢产生棕色络合物(邻甲氧基苯胺+过氧化氢在过氧化氢酶的作用下显棕色),将接种后的菌种置于培养箱中培养,观察菌种显色情况。将显棕色的菌种接入液体种子培养基中,摇床(30℃、220 r/min),培养24 h,以5%的接种量接入发酵培养基中,摇床(30℃、220 r/min)培养24、48、72 h后分别吸取3 ml 发酵液离心(6 000 r/min、15 min),分别测上清液和菌株的酶活,另取2 ml 发酵液加2 ml 乙酸乙酯萃取过夜。

1.2.3 胆固醇氧化酶酶活的测定。将每1 min 催化1 μmol 胆固醇降解所需的酶量定义为1个酶活力单位。

1.2.3.1 定性平板检测法。具体方法同“1.2.2”。

1.2.3.2 过氧化氢法。酶催化反应过程中氧化1 mol 胆固醇可产生1 mol 过氧化氢,过氧化氢在过氧化氢酶的作用下分解可使4-氨基-安替比林与苯酚形成亚醌类红色化合物,该化合物在500 nm 处有最大吸收峰^[8]。测量反应液在500 nm 外的吸光度可定量测定被氧化的胆固醇的量,从而计算出胆固醇氧化酶的酶活。酶活(μ/ml) = 0.131 5 × A₅₀₀ × 3.2 × 20 ÷ 5

参考季文明等^[11]的方法,将3 ml a液和150 μl b液混匀,37℃保温3 min,加入50 μl 酶液准确反应5 min,然后置于沸水中水浴3 min,立即冷却,在500 nm 处测反应液的吸光度,平行重复试验8次。

1.2.3.3 羟醛反应法。反应液为邻苯二甲醛10 mg 和冰醋酸100 ml。由于邻苯二甲醛与胆固醇的反应产物可与浓硫酸发生显色反应,根据反应液的颜色可判定被氧化的胆固醇的量。

用pH值7.0的磷酸缓冲液(10 mmol/L)配制成1%的标准胆固醇溶液,取400 μl 标准胆固醇溶液37℃水浴3 min。加入50 μl 粗酶液保温5 min,迅速加入3 ml 邻苯二甲醛溶液终止反应,然后加入2 ml 浓硫酸摇匀后静止,测反应液在590 nm 处的吸光度。

1.2.3.4 胆烯酮快速测定法^[9]。取3 ml 磷酸缓冲液(pH值7.5)和150 μl 50 mmol/L 0.826%的胆固醇/异丙醇溶液(内含4.26%的TritonX-100)于试管中,37℃保温3 min后加入50 μl 酶液准确反应5 min,然后加入100 μl 10 mol/L 的KOH溶液终止反应,测反应液在240 nm 处的吸光度。

$$\text{酶活} = \frac{VA \times \text{反应液体积} \times 0.082}{\text{酶液体积}} = 5.1 \times VA (\mu/\text{ml})$$

式中,VA表示吸光度的变化。

1.2.3.5 胆烯酮慢速测定法。取1.8 ml 0.05%的TritonX-100(pH值7.5)和0.1 mol/L的磷酸缓冲液混匀,37℃保温3 min,加入同温预热的1%的胆固醇-乙醇溶液100 μl,37℃振荡精确反应15 min,然后立即加入1 mol/L NaOH-乙醇溶液和5 ml 环己烷振荡30 s,静止萃取2 h后吸取1 ml 上层萃取液于刻度试管中,用无水乙醇定容至5 ml,在241 nm 处测定萃取液的吸光度。

1.2.3.6 薄层层析法。参考文献[10]的方法,将硅胶GF-254与水按1:3的比例制成硅胶板,105℃活化40 min后备用。

$$\text{酶活力单位}(\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{L}) = \frac{1\,000 \times 384 \times 15(O.D.E - O.D.O)}{0.035\,48 \times 125}$$

式中,O.D.E为反应前溶液的紫外吸收值;O.D.O为反应后紫外吸收值;0.035 48为胆甾-4-烯-3-酮紫外吸收标准曲线的斜率;125为稀释倍数;15为反应时间(min);1 000为测算体积单位(L)。

取2 ml 发酵液加入2 ml 乙酸乙酯静止萃取过夜,取上层萃取液在硅胶薄板上作条状点样,室温下展开。展开自然干燥后于254 nm 紫外灯下观察。对黑色无荧光部分再喷显色剂(胆甾-4-烯-3-酮中含有酮基,可与2,4-二硝基苯肼反应生成桔红色沉淀,层析后喷显色剂可看到桔红色斑点,而胆固醇遇A显淡黄色;显色剂B为万能显色剂,喷洒显色剂B后将显色板置于105℃烘箱中烘干,5 min后所有斑点均成棕褐色),定性鉴定胆固醇氧化产物胆甾-4-烯-3-酮。

2 结果与分析

2.1 菌株初筛结果 从21种不同来源的样品中共分离得到不同形态的菌株48株。

2.2 菌株复筛结果 对48株初筛菌株进行检测,筛选出酶活较高的菌株2-6、I5-3、3-3、I6-5、3-4、4-3、4-6、JM109、10192共9株,以其为出发菌株进行培养。

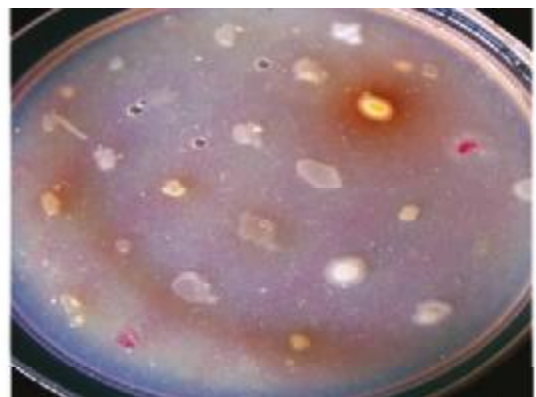


图1 接种第1天4-6菌株的颜色

Fig.1 4-6 color of on the first day of strain inoculation



图2 接种第2天4-6(左)、I5-3(右)菌株的颜色

Fig.2 4-6(left)、I5-3(right) color of strain on the second day of inoculation

由图1~图3可知,接种第1天4-6棕色明显,说明4-6

菌株的酶活较高,培养第 2 天 I5-3 也显棕色,5 d 后 2-6、3-3、I6-5、3-4、4-3、JM109、10192 相继显色,但显色时间相差不大,且颜色较浅,说明菌株酶活性均较低。

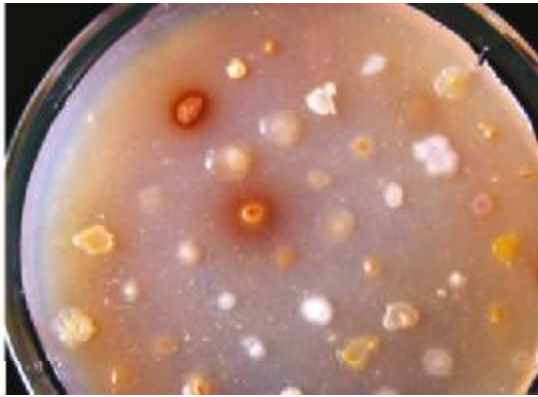


图 3 5 d 后 2-6、I5-3、3-3、I6-5、3-4、4-3、4-6、JM109、10192 菌株的颜色

Fig.3 Strain's color of 2-6, I5-3, 3-3, I6-5, 3-4, 4-3, 4-6, JM109, 10192 after five days

2.3 发酵时间的确定 试验结果表明,发酵 48 h 时菌株酶活较高,因此最佳发酵时间为 48 h。发酵 72 h 后分别采用羟醛反应法、快速测定法、慢速测定法测定发酵液的吸光度,并进行 2 次平行试验,测定结果见表 1。

表 1 3 种方法所测发酵液的吸光值

Table 1 Measured absorbance values of fermentation broth by three methods

菌株 Strains	A ₂₄₀	A ₅₉₀	A ₂₄₁
2-6	1.046	-0.080	0.005
I5-3	1.387	0.429	0.001
10192	1.056	0.364	-0.004
I6-5	1.174	0.595	0.012
3-3	1.292	0.418	-0.005
3-4	1.237	0.538	0.005
4-3	1.252	0.544	0.004
JM109	1.229	0.476	0.005
4-6	1.432	0.550	0.007

2.4 胆固醇氧化酶酶活测定方法的比较

2.4.1 过氧化氢法。由表 2 可知 4-6、I5-3、3-4、2-6、4-3、JM109 的酶活均较高,表明 6 株菌株产胆固醇氧化酶的能力均较强,其中 4-6 的酶活最高,远远高于其他几株菌株,这与定性平板法检测结果一致。

表 2 过氧化氢法测定胆固醇氧化酶酶活

Table 2 Determination of enzyme activity of cholesterol oxidase by hydrogen peroxide method

菌株 Strains	A ₅₀₀	酶活 // μ/ml Enzyme activity
2-6	0.692	1.165
I5-3	0.747	1.257
10192	0.529	0.890
I6-5	0.277	0.467
3-3	0.498	0.838
3-4	0.730	1.229
4-3	0.573	0.965
JM109	0.570	0.959
4-6	1.310	2.205

2.4.2 胆烯酮快速测定法。由表 3 可知,4-6、I5-3、JM109、3-4、2-6 均具有较高的酶活,其中,4-6 酶活最高,3-3 酶活最低,但两者差别不大,说明该方法的检测灵敏度不高。

表 3 胆烯酮快速测定法测定胆固醇氧化酶酶活

Table 3 Determination of enzyme activity of cholesterol oxidase by gall ketene rapid method

菌株 Strains	A ₂₄₀	酶活 // μmol/min.l Enzyme activity
2-6	0.076	5.488
I5-3	1.260	6.426
10192	0.943	4.809
I6-5	1.009	5.146
3-3	0.910	4.641
3-4	1.155	5.891
4-3	1.000	5.100
JM109	1.229	6.268
4-6	1.328	6.773

2.4.3 胆烯酮慢速测定法。由表 4 可知,4-6 的酶活较高为 11.612,远远高于其他菌株,3-4 的酶活最低,为 4.876,I5-3、2-6、I6-5 的酶活相差不大,说明该方法可有效鉴定产胆固醇氧化酶的菌株,但该方法操作步骤繁琐,不适宜快速鉴定胆固醇氧化酶。

表 4 胆烯酮慢速测定法测定酶活性

Table 4 Determination of enzyme activity of cholesterol oxidase by gall ketene slow method

菌株 Strains	A ₂₄₁	酶活 // μmol/min.l Enzyme activity
2-6	0.296	8.343
I5-3	0.303	8.540
10192	0.184	5.186
I6-5	0.294	8.286
3-3	0.248	6.990
3-4	0.173	4.876
4-3	0.239	6.736
JM109	0.239	6.736
4-6	0.412	11.612

2.4.4 薄层层析法。喷洒显色剂 B 后在 254 nm 紫外灯下观察,可看到薄板上只有 2 条谱带,且 2 条带明显分离(图 4);喷洒显色剂 A 后胆甾-4-烯-3-酮呈桔红色斑点,胆固醇显淡黄色(图 5)。利用此方法可定性检测胆固醇氧化产物胆甾-4-烯-3-酮。

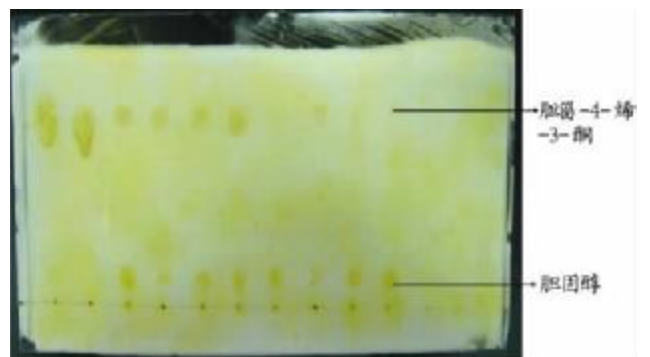


图 4 薄板上 2 条谱带

Fig.4 The two bands on plate

(下转第 11418 页)

加,不受盐度的影响,也没有温度、盐度的交互作用影响;然而,各处理释放碟状体总数量受温度、盐度及其交互作用的影响,其释放的总数量总体趋势是随温度的升高而增加。在该试验中,各处理开始出现横裂的时间几乎是相同的,但以往的研究结果为温度越高出现横裂的时间越早^[11]。这可能是由于在暂养阶段的水温已经达到横裂生殖的要求及同时伴有升温刺激造成的。

温度、盐度对初生碟状体的伞径均有明显影响,也存在着交互作用的影响。盐度越高初生碟状体伞径越大,相反温度较低时初生碟状体伞径越大。这可能是由于温度较高时螅状体生长较快,横裂生殖迅速,横裂体的伞径没有充分的时间进行生长。低温时螅状体只经历了一个横裂周期,有充足的时间进行生长。至于初生碟状体伞径的大小是否对海蜇的后期发育有影响,还有待于进一步研究。

3.3 温度、盐度对无性生殖过程中增殖的影响 在海蜇无性生殖过程中,增殖的2个关键点为螅状体数量和碟状体数量的增加,即足囊形成、萌发的数量和碟状体数量的增加。因此,对影响该过程的关键性环境因子的控制至关重要。由此可知,温度和盐度均影响着海蜇无性生殖的数量补充。研究表明,24℃-22℃条件最有利于增殖,16℃-18℃条件最不利于增殖。

试验中观察到足囊的形成与横裂生殖可以同时发生,只是横裂生殖发生后足囊形成的速度明显放缓。由此可知,在无性生殖过程中前期将能量主要用于足囊的形成,在一定范围内温度越高越有利于足囊的形成;后期则将能量主要用于横裂生殖,温度高时横裂速度快。这与海月水母的出芽生殖、横裂生殖的能量分配关系相似^[16]。将试验期间螅状体产生的所有足囊数和碟状体数进行相关性分析,结果表明各处理间均无相关性。这就可通过人工控制足囊繁殖和横裂生殖不同阶段的温度、盐度来达到最理想的增殖目标。但

是,在横裂生殖发生后两者之间是否有相关性,需要进一步研究。

参考文献

- [1] WILLCOX S T. Ecology of moon jellyfish *Aurelia* sp.: in southern Tasmania in relation to Atlantic salmon farming [D]. PhD Thesis, School of Aquaculture, University of Tasmania, 2006.
- [2] 郭平. 营养条件对海蜇螅状体形成足囊及足囊萌发的影响[J]. 水产学报, 1990, 14(3): 206-211.
- [3] HERNROTH L, GRÖNDAHL F. On the biology of *Aurelia aurita* (J): 2. Major factors regulating the occurrence of ephyrae and young medusas in the Gullmar Fjord, western Sweden [J]. Bull Mar Sci, 1985, 37: 567-576.
- [4] LUCAS C. Reproduction and life history strategies of the common jellyfish, *Aurelia aurita*, in relation to its ambient environment [J]. Hydrobiologia, 2001, 451: 229-246.
- [5] WILLCOX S, MOLTSCHANIWSKYJ N A, CRAWFORD C. Asexual reproduction in scyphistomae of *Aurelia* sp.: effects of temperature and salinity in an experimental study [J]. Mar Exp Biol, 2007, 353: 107-114.
- [6] HANSSON L J. Effect of temperature on growth rate of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa) from Gullmarsfjorden, Sweden [J]. Mar Ecol Prog Ser, 1997, 161: 145-153.
- [7] 丁耕芜, 陈介康. 海蜇的生活史[J]. 水产学报, 1981, 5(2): 93-102.
- [8] 鲁勇, 蒋双, 陈介康. 温度、盐度和光照对海蜇足囊繁殖的影响[J]. 水产科学, 1997, 16(1): 3-8.
- [9] 王绍军, 杨秀兰. 海蜇人工育苗关键技术[J]. 齐鲁渔业, 2005, 22(2): 1-3.
- [10] 赵斌. 海蜇早期幼体发育生物学及摄食运动行为的初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [11] 陈介康, 丁耕芜, 刘春洋. 营养条件对海蜇横裂生殖的影响[J]. 水产学报, 1985, 9(4): 321-329.
- [12] 陈四清, 张岩, 王印庚. 海蜇种苗培育技术的研究[J]. 海洋科学, 2004, 28(5): 4-7.
- [13] 孙振兴, 张明青. 海蜇的人工繁育与养殖技术[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(3): 493-494.
- [14] 王燕青, 姜连新, 董婧. 温盐环境突变对海蜇幼体生存的影响[J]. 上海水产大学学报, 2007, 16(3): 259-263.
- [15] 陈介康, 丁耕芜. 温度对海蜇横裂生殖的影响[J]. 动物学报, 1983, 29(3): 195-206.
- [16] SIMON W, NATALIE A M, CHRISTINE C. Asexual reproduction in scyphistomae of *Aurelia* sp.: effects of temperature and salinity in an experimental study [J]. J Exp Mar Bio Eco, 2007, 353: 107-114.

(上接第 11381 页)

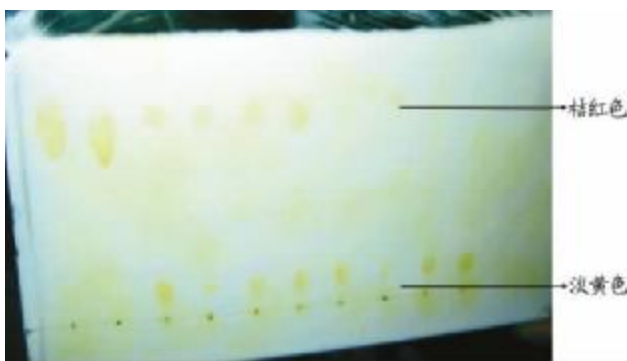


图5 喷显色剂后胆甾-4-烯-3-酮的颜色

Fig. 5 The color of cholesteric -4-ene-3-ketone after spraying reagent

3 结论

该研究表明,样品发酵时间为48 h。利用定性平板检测法可快速检测出具有较高酶活的菌株;利用薄层层析法可快速、有效的鉴定出胆固醇的氧化产物胆甾-4-烯-3-酮。定性平板检测法和薄层层析法检测胆固醇氧化酶具有快速、

高效、灵敏度高等优点。这2种方法在胆固醇氧化酶的分

离、鉴定中具有较大的应用价值。

参考文献

- [1] MAKINODAN, YASUO. コレステロール酸化酵素[J]. バイオサイエンスとイダストリ, 1996, 54(1): 16-22.
- [2] 刘应泉. 油脂与健康[M]. 北京: 人民出版社, 1989.
- [3] WU C Y, YU R C, HSU S Y. Decomposing cholesterol in egg yolk by enzymes of rhodococcus equi No23 [J]. Shipin Kexue, 1995, 22(1): 69-76.
- [4] PURCELL J P, GREENPLATE J T, JENNINGS M G, et al. Cholesterol oxidase: a potent insecticidal protein active against. Boll weevil larvae [J]. Biophys Res Commun, 1993, 196(3): 1406-1413.
- [5] SUZUKI KUNIO. 4-Cholesten-3-one for the control of obesity: WO, 93 12, 798, 08 [P]. 1993.
- [6] KASHIMA M, KINOSHITA T, INAOKA Y, et al. Cholestanones for treatment of liver diseases: JP, 07 69, 898 [95 69, 898] [P]. 1995-05-14.
- [7] STAUBAM. Methods in Carbohydrate [J]. Chem, 1965, 5: 5-6.
- [8] 魏华. 灵芝富集培养研究[J]. 中国食用菌, 1996(1): 12-14.
- [9] Buckland B C, LILLY M D, DUNNILL P. The kinetics of cholesterol oxidase synthesis by Nocardia rhodocrous [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1976, 18(5): 601-621.
- [10] 韩振芳. 胆固醇氧化酶发酵生成及酶学反应基本特性研究 [P]. 无锡: 江南大学, 1997.
- [11] 季文明, 陈毅力, 张和春, 等. 比色法测定胆固醇氧化酶酶活 [J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(3): 251-254.