

融合标签技术及其应用

Fusion Tags Technology and Their Applications

李永进[†], 陈媛媛[†], 毕利军^{*}

LI Yong-Jin[†], CHEN Yuan-Yuan[†] and BI Li-Jun^{*}

中国科学院生物物理研究所蛋白质科学研究平台 北京 100101

Protein Research Platform, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

摘 要 融合标签最初是作为一种有效的工具用于纯化重组蛋白质, 近几年的研究表明, 融合标签的作用并不局限于此。本文综述了融合标签技术的发展及在生命科学研究中的各种应用, 包括重组蛋白质的纯化, 目的蛋白质的检测、定向固定, 体内生物事件的可视化, 提高重组蛋白质的产量, 增强重组蛋白质的可溶性及稳定性。

关键词 融合标签, 重组蛋白质, 定向固定, 可视化, 可溶性

中图分类号 Q819 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)04-0523-05

Abstract Fusion tags are originally developed to facilitate the purification of recombinant protein from crude extracts. In recent years, the discovery of different tags and the development of fusion strategy make the function of fusion tags diversified. However, there was no a cure-all fusion tag for different applications. We here give an overview of fusion tag technology and the different applications of fusion tags, including the purification, detection and oriented immobilization of recombinant protein, the visualization of bioevent in vivo, the enhancement of the yield of protein, the improvement of the solubility and stability of the expressed protein.

Key words Fusion tags, Recombinant protein, oriented immobilization, visualization, solubility

融合标签技术是 20 世纪末兴起的一种基于报告基因的重组 DNA 技术, 其主要过程是利用重组 DNA 技术在靶蛋白编码基因的 3' 端或 5' 端融合某种标签的编码基因, 通过适宜的宿主来表达重组蛋白质^[1-5], 表达的重组蛋白质可以通过其融合的标签与包被在固相基质上的特异配基结合而使重组蛋白质得以纯化。融合标签技术的发展最初是为了使重组蛋白质的纯化更加简便, 这已为大量的实验所证实。近几年, 随着一些新的融合标签系统的开发, 其功能也日渐多样化。本文综述了近几年融合标签技术在生命科学研究中的各种应用, 包括重组蛋白质

的纯化, 目的蛋白质的检测和定向固定, 体内生物事件的可视化, 提高重组蛋白质的产量, 增强重组蛋白质的可溶性及稳定性。

1 融合标签的分类

融合标签是一个广义的概念, 根据其分子量大小可以分为两大类: 大的蛋白质分子(或蛋白质结构域及其衍生物)和小的多肽片段。在大多数情况下, 由于多肽标签相对较小, 对融合蛋白质结构影响很小, 不需要从融合蛋白质中切除, 因而多肽融合标签较蛋白质标签更为常用。迄今为止, 已有很多文献

Received: December 6, 2005; Accepted: March 3, 2006.

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (No.30500097).

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-10-64888464; blj@sun5.ibp.ac.cn.

[†] These authors contribute equally to the work.

国家自然科学基金资助项目(No.30500097).

较为详尽地报道了各种融合标签^[6,7],其大小从几个氨基酸到整个蛋白质,相互作用类型包括了酶与底物,细菌受体与血清蛋白,聚组氨酸与金属离子,抗

原与抗体等等^[8],表1列出了目前报道较多的标签融合系统。

表1 常用的融合标签系统
Table 1 Commonly Used Fusion tag Systems

Type of tag ^a	Size	Ligand or separation method	Elution conditions	Function of tag
His ₆ -tag	6 a. a	Ni ²⁺ -NTA	Low pH/imidazole	Purification, immobilization
Poly-Arg	5-15 a. a	Anionic resin	Increasing the salt concentration	Purification, immobilization, detection
FLAG peptide	1kD	mAb M1	EDTA/Low pH	Purification
Strep-tag II	8 a. a	streptactin	Biotin analogue	Purification, detection, immobilization
c-myc	11 a. a	Monoclonal antibody	Low pH	Purification, detection
S	15 a. a	S-fragment of RNase A	3mol/L guanidine thiocyanate, 0.2mol/L citrate pH 2, 3mol/L magnesium chloride	Purification, detection, immobilization
HAT	19 a. a	Co ²⁺ -CMA	Low pH, imidazole	Purification
Calmodulin-binding peptide	26 a. a	Calmodulin affinity resin	2mmol/L EGTA at neutral pH	Purification, detection
Cellulose-binding domains	27-189 a. a	Cellulose	Family I: guanidine HCl or urea > 4mol/L Family II/III: ethylene glycol	Purification and secretion
Nano-tag	9 or 15 a. a	Streptactin	Biotin analogue	Purification, immobilization
SBP	38 a. a	Streptactin	Biotin analogue	Purification, immobilization
Chitin-binding domain	51 a. a	Chitin	Fused with intein: 30~50mmol/L dithiothreitol, β-mercaptoethanol or cysteine	Purification
GST	26kD	Glutathione	5~10mmol/L reduced glutathione	Purification, efficient translation initiation
MBP	40kD	Amylose	Maltose	Purification, efficient translation initiation, enhances solubility
SPA	31kD	IgG	Low pH	Purification, detection
NusA	54.8kD	Not a purification tag	Efficient translation initiation, enhances solubility	
Trx	14.3kD	Not a purification tag	Efficient translation initiation, enhances solubility	
SUMO	~12kD	Not a purification tag	Enhances expression, solubility	
Ub	76 a. a	Not a purification tag	Efficient translation initiation, might enhance solubility	

^aS, 15 amino acid peptide derived from RNaseA; Nano-tag, the peptide possesses nanomolar-affinity for streptavidin and therefore was termed Nano-tag; SBP, streptavidin binding peptide; HAT, Histidine affinity tag; GST, Glutathione S-transferase; MBP, Maltose-binding protein; SPA, Staphylococcal protein A; NusA, N utilization substance A; SUMO, small ubiquitin modifying protein; Trx, Thioredoxin; Ub, Ubiquitin.

2 融合标签的应用

2.1 简化蛋白质的纯化过程

融合标签技术用于重组蛋白质纯化是其最初的作用,这一点已为大量实验所证实^[9-13]。理论上,我们可以理性地设计基于亲和纯化的程序以使目的蛋白质与纯化基质之间不发生任何直接的相互作用,以避免由于这种直接的相互作用造成蛋白质变性。这一点对于一些用传统纯化方法难以获得的蛋白质非常有用。尽管目前报道了很多不同的融合标签系

统,但很少在高通量模式下测试过。很多多肽类标签,如 strep tag^[14]以及 nano-tag^[9]、SBP-tag^[10];FLAG-tag^[12]、钙调蛋白结合肽^[11]等都对其相应配基蛋白质展示了高的特异性,然而用于固定其配基蛋白质的树脂成本较高,而且结合能力较低。相反,融合了蛋白质标签的重组蛋白质,其纯化基质通常由小的配基分子形成,成本较低。这类大的蛋白质标签使用较多的如 GST-tag^[15]、MBP^[16]等。但与小的多肽标签相比,大的蛋白质标签有一个缺点,即在蛋白质过表达过程中会消耗更多代谢能量。Lichty 及其同事的

实验还表明融合标签与不同表达宿主的组合在蛋白质纯度、产量以及纯化成本方面显著不同^[17]。总的来说,目前用于纯化的标签使用最为广泛的还是 His₆-tag。His₆-tag 融合标签与其它标签相比有很多明显优势:1)用于纯化的基质(Ni-NTA)廉价;2)能经受多次再生循环;3)相对较高的结合能力;4)温和多样的洗脱条件(100 ~ 250mmol/L 咪唑,低 pH, 10mmol/L EDTA)。但 His₆-tag 也有其缺点,组氨酸本身是一种亲水性的氨基酸,然而,在金属离子存在的情况下,多聚组氨酸倾向于形成一种 hem-like 的结构,这是一种疏水性的结构,因而与某些蛋白质融合后,有被埋藏在融合靶蛋白质内部的可能性^[18]。

2.2 控制蛋白质固定的空间取向及方便检测

阐明蛋白质之间的相互作用,描绘出蛋白质相互作用的网络图谱是蛋白质组学研究的一个重要方面。目前研究蛋白质之间相互作用已经有很多成熟的技术平台,如生物芯片以及基于表面等离子体共振原理的 BIAcore 系统。而这些技术平台都有一个关键的技术步骤即将某种生物分子(蛋白质、核酸等)固定在固相基质上。目前固定核酸的方法已经比较成熟,而蛋白质与核酸不同,其对所处环境要求比较严格,而且蛋白质分子在固相表面很容易失活。利用融合标签与其配基之间的相互作用可以很好地克服上述困难。融合标签通常是一些小的短肽分子或蛋白质,这些标签在目的蛋白质与固相基质之间起到了一种间隔臂(spacer arm)的作用,极大程度地减少了目的蛋白质与固相基质直接接触的机会,同时由于融合标签通常位于融合蛋白质的 N 端或 C 端,从而可以使其活性中心充分展露,形成一种均质配基表面,而这种均质表面的形成对于生物芯片以及基于 BIAcore 系统的实验成功是非常关键的^[19,20]。不同融合标签系统的使用将为蛋白质的定向固定提供多种多样的选择。融合标签与配基之间的相互作用也为重组蛋白质检测提供了极大便利,目前很多商业化信号酶报道系统都是基于此构建的,如碱性磷酸酶-链霉亲和素复合物、辣根过氧化物酶-链霉亲和素复合物都是基于链霉亲和素与生物素或链霉亲和素结合肽(Strep-tag、SBP-tag、Nano-tag)之间的相互作用结合信号酶显色反应来实现重组蛋白质的检测。

2.3 体内生物事件的可视化

由于体内环境的高度复杂性,基于体外研究的实验结果往往不能如实地反映体内的真实情况,利用融合标签技术,研究者可以实时地观测到体内各

种生物事件的发生、发展以及结束的全过程。Yokoe 等利用融合了 GFP 的 K-ras 蛋白质研究了其在细胞内从质膜上解离的动力学过程^[21]。David Li-En Jao 等将 GFP 与 eIF-5A 融合,直接在活细胞内确定了其在细胞内的分布^[22]。Sato 等将蓝色荧光蛋白质(CFP)蛋白激酶底物序列、磷酸化识别结构域以及黄色荧光蛋白质(YFP)顺序融合,利用荧光共振能量转移(FRET)的方法在活细胞内实时地观测了蛋白激酶催化底物磷酸化的全过程^[23]。在我们的研究工作中,利用了检测 GFP-MutS 融合蛋白质中的 GFP 荧光信号来评价错配修复蛋白质 MutS 的表达,并利用其发展了 DNA 突变检测基因芯片^[24]。除了 GFP 及其突变体这类基于荧光的可视化标签外, Finn 等还开发出两种称之为彩虹标签(rainbow tag)的融合系统,这两种标签分别由蚊子细胞色素 b5 的亚铁血红素结合结构域以及人类 P450 还原酶的黄素单核苷酸结合结构域衍生而来,利用这种彩虹标签可以实现重组蛋白质表达、纯化的可视化,而且通过与比色检测系统相连,可以在蛋白质纯化过程实现蛋白质浓度直接定量^[25]。

2.4 提高重组蛋白质的产量

由于外源蛋白质对于宿主菌的异质性,当外源蛋白质在宿主菌内表达时,宿主菌会调动各种机制来阻止外源蛋白质过量表达,这是宿主菌的一种保护性反应,而这种反应所导致的直接后果就是我们所需要的目的蛋白质表达量降低。近几年的研究发现,当外源蛋白质融合某些特定的标签后,能够有效增加重组蛋白质的产量。如 GST-tag、MBP-tag、NusA、Trx、Ubiquitin 等^[26-28]。融合标签是通过什么机制来增加蛋白质产量,这个问题目前还不是很清楚,一般认为主要有两方面:1)N 端的融合标签通常能促进核糖体进行有效的转译起始;2)融合标签能增强重组蛋白质在宿主体内抵抗蛋白质水解酶的能力。

2.5 增强重组蛋白质的可溶性和稳定性

外源蛋白质在宿主菌内表达会遇到很多挑战,其中之一就是过表达的蛋白质容易形成包涵体,很多大的结构基因组中心的研究数据表明,在其表达的重组蛋白质中,有超过半数以上是以包涵体形式存在的^[29],致使很难获得大量有活性的天然蛋白质。为了防止包涵体形成,一般可以采用低温诱导表达蛋白质,但这种方法并非对所有蛋白质都有效。人们通过研究发现,一些高度可溶的蛋白质在与其它蛋白质融合后会促进融合蛋白质以可溶形式表

达如 MBP、NusA 等^[30,31]。本研究组已经通过将目的基因与 Trx 基因融合成功获得了可溶性和稳定性较好的目的蛋白质的活性表达^[13,24,32]。Invitrogen 公司在 2004 年开发了一种新型的增强可溶性表达的多肽标签(SET tag),该标签可能是通过静电排斥来防止新生多肽相互聚集^[33]。有关融合标签增强融合蛋白质可溶性表达的机制目前尚不十分明确,不同的融合标签起作用的方式也有所不同,如 MBP 一般融合在 N 端才会很好地发挥作用^[34],而 SET-tag 融合在 C 端才能起作用^[33]。虽然融合标签的使用可以增强融合蛋白质的可溶性表达,但并非对所有蛋白质都有效,一些蛋白质在切除了融合标签后,仍然会形成包涵体。外源蛋白质表达的另一个主要问题就是宿主菌体内蛋白酶对外源蛋白质的降解,针对这一问题,研究者已经发展了很多策略,包括蛋白酶抑制剂的使用、分泌到周质空间或培养基等。研究发现,一些融合标签在靶蛋白质 N 端或 C 端以及同时在 N 端和 C 端的融合,可以有效防止蛋白酶降解^[26,35,36]。至于这些融合标签是如何起到这种作用的,其详细机制尚不明确,有学者认为标签的融合可以使形成的融合蛋白质转移到细胞其它隔间中,从而降低了其在细胞质中与蛋白酶接触的机会^[37,38]。

3 融合标签的切除

基于研究目的不同,靶蛋白质上引入的融合标签可以作为融合蛋白质组分得以保留或在纯化后通过一定方式切除。在融合标签切除过程中,一个非常值得注意的问题就是许多蛋白质要获得生物活性以及结构稳定性都需要特定的 N 端氨基酸,尤其是很多用于结构研究以及医疗用途的蛋白质。然而所有新生蛋白质在其 N 端都是蛋氨酸,然后经过转译后修饰才形成其它不同的氨基酸。在融合标签切除过程中如何避免产生非天然 N 端氨基酸,这是很多蛋白酶使用过程中所面临的一个挑战。当前这类问题可以通过选择其它一些融合系统得以解决,如内含肽系统(Intein)、小的泛素修饰蛋白质(SUMO)以及泛素融合系统(Ub)。内含肽系统在有二硫苏糖醇、 β -巯基乙醇或半胱氨酸存在的条件下,能利用其可诱导的自切割活性将靶蛋白质从融合标签上切除,切除后形成的蛋白质不带有任意的非天然残基^[39]。SUMO 与 Ub 系统的切割需要蛋白酶参与,然而,与普通识别短肽序列的蛋白酶不同,切割 SUMO 和 Ub 的蛋白酶识别 SUMO 和 Ub 自身的三级

结构,融合在 SUMO 或 Ub C 端的靶蛋白质在切割后会形成天然的蛋白质^[40,41]。

4 展望

随着技术的发展,越来越多的融合标签系统不断被发现,极大地丰富了融合标签的功能。不同融合标签系统有其共性,同时也各有各的优势和缺点。融合标签系统的选择受到很多因素制约,如融合标签系统的纯化条件、融合靶蛋白质自身的性质(pI、细胞定位等)、研究者的研究目的、纯化基质及缓冲液成本、融合标签的可去除性等。综合考虑融合标签的各种制约因素,没有哪一种标签可以满足所有应用的需要。因而,两种甚至多种不同功能融合标签的组合使用将成为未来融合标签技术的发展趋势。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Nilsson J, Ståhl S, Lundberg J *et al.* Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*, 1997, **11**: 1-16.
- [2] Chao H, Bautista DL, Litowski J *et al.* Use of a heterodimeric coiled-coil system for biosensor application and affinity purification. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1998, **715**(1): 307-329.
- [3] Flaschel E, Friehs K. Improvement of downstream processing of recombinant proteins by means of genetic engineering methods. *Biotechnology Advances*, 1993, **11**(1): 31-77.
- [4] Ford CF, Suominen I, Glatz CE. Fusion tails for the recovery and purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*, 1991, **2**(2-3): 95-107.
- [5] LaVallie ER, McCo, JM. Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, **6**(5): 501-506.
- [6] Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, **60**: 523-533.
- [7] Hearn MTW, Acosta D. Applications of novel affinity cassette methods: use of peptide fusion handles for the purification of recombinant proteins. *Journal of Molecular Recognition*, 2001, **14**: 323-369.
- [8] Uhlen M, Forsberg G, Moks T *et al.* Fusion proteins in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 1992, **3**(4): 363-369.
- [9] Lamla T, Erdmann VA. The Nano-tag, a streptavidin-binding peptide for the purification and detection of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*, 2004, **33**: 39-47.
- [10] Keefe AD, Wilson DS, Seelig B *et al.* One-Step Purification of Recombinant Proteins Using a Nanomolar-Affinity Streptavidin-Binding Peptide, the SBP-Tag. *Protein Expression and Purification*,

- [11] Vaillancourt P, Zheng CF, Hoang DQ *et al.* Affinity purification of recombinant proteins fused to calmodulin or to calmodulin-binding peptides. *Methods in Enzymology*, 2000, **326** :340 – 362
- [12] Einhauser A, Jungbauer A, The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2001, **49** :455 – 465
- [13] Bi LJ, Zhou YF, Zhang XE *et al.* Direct observation of the interaction between MutS and MutL mismatch repair proteins by fusion protein systems. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2005, **12** :1178 – 1184
- [14] Skerra A, Schmidt TG. Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods in Enzymology*, 2000, **326** :271 – 304
- [15] Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 1988, **67** :31 – 40
- [16] Guan C, Li P, Riggs PD *et al.* Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene*, 1988, **67** :21 – 30
- [17] Lichty JJ, Malecki JL, Agnew HD *et al.* Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expression and Purification*, 2005, **41** :98 – 105
- [18] Levy I and Shoseyov O, Expression. Refolding and Indirect Immobilization of Horseradish Peroxidase (HRP) to Cellulose via a Phage-selected Peptide and Cellulose-binding Domain (CBD). *Journal of Peptide Science*, 2001, **7** :50 – 57
- [19] Johansson B, Lofas S, Lindquist G. Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Analytical Biochemistry*, 1991, **198** (2) :268 – 277
- [20] Bi LJ, Zhou YF, Zhang XE *et al.* A MutS-Based Protein Chip for Detection of DNA Mutations. *Analytical Chemistry*, 2003, **75** :4113 – 4119
- [21] Yokoe H, Meyer T. Spatial dynamics of GFP-tagged proteins investigated by local fluorescence enhancement. *Nature Biotechnology*, 1996, **14** (10) :1252 – 1256
- [22] Jao DLE, Chen KY. Subcellular localization of the hypusine-containing eukaryotic initiation factor 5A by immunofluorescent staining and green fluorescent protein tagging. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2002, **86** (3) :590 – 600
- [23] Sato M, Umezawa Y. Imaging protein phosphorylation by fluorescence in single living cells. *Methods in Enzymology*, 2004, **32** :451 – 455
- [24] Bi LJ, Zhou YF, Zhang XE *et al.* Construction and Characterization of Different MutS Fusion Proteins as Recognition Elements of DNA Chip for Detection of DNA Mutations. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, **21** :135 – 144
- [25] Finn RD, Kapelioukh I, Paine MJ. Rainbow tags: a visual tag system for recombinant protein expression and purification. *Biotechniques*, 2005, **38** (3) :387 – 388, 390 – 392
- [26] Butt TR, Jonnalagadda S, Monia BP *et al.* Ubiquitin fusion augments the yield of cloned gene products in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, **86** (8) :2540 – 2544
- [27] Korf U, Kohl T, Van der Zandt H *et al.* Large-scale protein expression for proteome research. *Proteomics*, 2005, **5** (14) :3571 – 3580
- [28] Chopra AK, Brasier AR, Das M *et al.* Improved synthesis of Salmonella typhimurium enterotoxin using gene fusion expression systems. *Gene*, 1994, **144** (1) :81 – 85
- [29] Chayen NE, Turning protein crystallization from an art into a science. *Current Opinion in Structural Biology*, 2004, **14** :577 – 583
- [30] De Marco V, Stier G, Blandin S *et al.* The solubility and stability of recombinant proteins are increased by their fusion to NusA. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2004, **322** :766 – 771
- [31] Kapust RB, Waugh DS. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Science*, 1999, **8** :1668 – 1674.
- [32] Bi LJ (毕利军), Zhou YF (周亚凤), Deng JY (邓教宇) *et al.* High Expression and Identification of DNA Mismatch Repair Gene mutS in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) 2002, **18** (5) :536 – 540
- [33] Zhang YB, Howitt J, Mccorkle S *et al.* Protein aggregation during overexpression limited by peptide extensions with large net negative charge. *Protein Expression and Purification*, 2004, **36** (2) :207 – 216
- [34] Sachdev D, Chirgwin JM. Order of fusions between bacterial and mammalian proteins can determine solubility in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, **244** (3) :933 – 937
- [35] Murby M, Cedergren L, Nilsson J *et al.* Stabilization of recombinant proteins from proteolytic degradation in *Escherichia coli* using a dual affinity fusion strategy. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1991, **14** (3) :336 – 346
- [36] Koken MHM, Odijk HHM, Vanduin M *et al.* Augmentation of protein production by a combination of the T7 RNA polymerase system and ubiquitin fusion: overproduction of the human DNA repair protein, ERCC1, as a ubiquitin fusion protein in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1993, **195** (2) :643 – 653
- [37] Nikaido H, Maltose transport system of *Escherichia coli*: an ABC-type transporter. *FEBS Letters*, 1994, **346** (1) :55 – 58
- [38] Varshavsky A, The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, **93** :12142 – 12149
- [39] Chong S, Mersha FB, Comb DG *et al.* Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene*, 1997, **192** :277 – 281
- [40] Malakhov MP, Mattern MR, Malakhova OA *et al.* SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 2004, **5** (1-2) :75 – 86
- [41] Bachmair A, Finley D, Varshavsky A. *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*, 1986, **234** :