

以重复序列为靶位点的鳊鱼多位点基因打靶载体的构建

唐冬生^{1,2}, 严霞¹, 李芳¹, 张细权³, 蒋泓², 于辉¹, 高东¹, 李月琴², 周天鸿²

(1. 佛山大学 生命科学院, 广东 佛山 528000; 2. 暨南大学 生命科学与技术学院, 广东 广州 510632; 3. 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:以鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)为研究对象,以其重复的 rRNA 基因间的间隔序列为靶位点构建多位点基因打靶载体,为建立体内多位点基因打靶技术获得关键材料。先构建含 TK 和 Neo 基因的通用打靶载体 pCTKNeo,采用 LA Taq 高保真酶扩增获得左、右同源重组引导臂 HRDS1、HRDS2,经 T 质粒克隆后,分别插入到 pCTKNeo 载体 Neo 基因的上下游,构建鳊鱼专用的多位点打靶载体 pCTKNeo-HRDS1/2。同样将干扰素基因 hIFN 插入到 pCTKNeo-HRDS1/2 载体的 Neo 基因与 HRDS2 之间。每次克隆均经 PCR、酶切和测序等鉴定 DNA 片段的插入及插入方向,最终构建多位点基因打靶载体 pCTKNeo-HRDS1/2-hIFN。目前的基因打靶技术存在打靶效率低、安全性等问题,以重复序列为靶位点多位点基因打靶技术将部分解决这些问题。

关键词:基因打靶;多基因座;载体;重复序列;鳊鱼

中图分类号:Q786 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)04-0377-06

目前基因打靶技术主要应用于基因功能的研究、研制人类疾病的动物模型、改良动物品种和研制动物生物反应器^[1]。但是基因打靶技术也有其不足之处:打靶效率低;外源基因引入细胞核基因组的难度比较大;容易受到随机插入的干扰;如果以 X 染色体的 Hprt 基因作靶位点,可能会随 X 染色体的失活而使敲入基因失活。以 DNA 重复序列为靶位点多位点基因打靶技术将部分解决这些问题。

基因打靶的靶位点通常为单拷贝序列,DNA 重复序列被认为是外源基因整合的禁区,原因是重复序列处通常无基因表达。然而前人研究表明,核仁组织区虽以重复序列为主,但其中的基因完全能表达。唐冬生等^[2]前期研究建立了以重复序列为靶位点的体外细胞多位点基因打靶技术,即利用动物细胞核仁组织区存在的非编码 DNA 重复序列作为靶位点的基因打靶技术,研究显示核仁组织区的低度重复序列靶位点是高效表达位点。本研究以鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)为研究对象,以其核仁组织区 rRNA 基因间的间隔序列为靶位点,构建含干扰素基因的多位点基因打靶载体,为建立适用于动物体内基因定点敲入的多

位点基因打靶技术获得关键材料。

1 材料与方法

1.1 材料

pGEM-T Easy 载体质粒为 Promega 公司产品;pCDNA3-hIFN 重组质粒为中南大学湘雅医院传染病研究室惠赠;LA Taq DNA 聚合酶及 GC 缓冲液为 Takara 公司产品。

1.2 鳊鱼 rRNA 重复基因家族的克隆

因为动物 rRNA 基因是一种 GC 含量较高、结构复杂的重复序列,故采用亲缘生物法生物信息学技术^[3],经反复摸索后选用 LA PCR 法即 LA Taq 高保真酶结合 GC 缓冲液来扩增鳊鱼复杂的 rRNA 基因重复序列,经克隆、测序最终克隆了鳊鱼的 3 个 rRNA 基因(18S rRNA、5.8S rRNA、28S rRNA)及其 2 个间隔序列(internal transcribed spacer, ITS1、ITS2),并克隆 SP1416 长片段^[4]。

1.3 通用打靶载体的构建

为了节省时间,先设计通用打靶载体,委托某生物工程公司构建 pCTKNeo 通用打靶载体。通用

收稿日期:2004-12-10; 修订日期:2005-01-27。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170737,30470978);广东省自然科学基金资助项目(04011645)。

作者简介:唐冬生(1964-),男,博士,教授,研究方向为基因打靶、基因克隆。E-mail:tangdbb@163.com

通讯作者:唐冬生。

打靶载体包括 Amp 基因、Neo 基因和 TK 基因。

1.4 鲮鱼专用多位点打靶载体的构建

1.4.1 HRDS-T 质粒的构建 以 SP1416-T 质粒作模板,以 ITS1 为靶位点,设计两对引物 HRDS1U/HRDS1D 和 HRDS2U/HRDS2D, HRDS1 (homogeneous recombination direct sequence, 同源重组引导序列)的上下游引物设计有限制性内切酶 *Mfi* I 和 *Nhe* I 的位点;HRDS2 的上下游引物设计有限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Bgl* II 的位点。分别采用 LA Taq 高保真酶结合 GC 缓冲液 PCR 扩增出 HRDS1、HRDS2 作为左、右同源重组引导臂,将 HRDS1、HRDS2 克隆到 pGEM-T Easy 质粒上,经 PCR、酶切鉴定获得 HRDS1-T、HRDS2-T 质粒。

1.4.2 多位点打靶载体 pCTKNeo-HRDS1/2 的构建 用 *Nhe* I/*Mfi* I、*Bam*H I/*Bgl* II 大量酶切上述 HRDS1-T、HRDS2-T 质粒,回收 HRDS1、HRDS2 片段,依次克隆到经 *Nhe* I/*Mfi* I、*Bam*H I 酶切的 pCTKNeo 通用打靶载体中 Neo 基因的上下游。在 pCTKNeo 载体和 HRDS2 的序列上设计一对上下游引物 JD1/JD2,PCR 筛选 HRDS2 正向插入的质粒,*Bam*H I/*Hind* III 双酶切证实插入方向。经 PCR、酶切、测序鉴定获得鲮鱼专用的多位点打靶载体 pCTKNeo-HRDS1/2。

1.5 干扰素基因多位点打靶载体的构建

1.5.1 hIFN-T 质粒的构建 因 pCTKNeo-HRDS1/2 载体的 Neo 基因与 HRDS2 之间只有 *Bam*H I 位点可作克隆位点,而干扰素基因 pCDNA3-hIFN 质粒的 Pcmv 与 hIFN 基因之间也有一个 *Bam*H I 位点,故采用 *Bam*H I 酶切、Klenow Fragment 粘端补平的方法将 Pcmv 与 hIFN 基因之间的 *Bam*H I 酶切位点消除。

以已消除 *Bam*H I 位点的 pCDNA3-hIFN 质粒作模板,设计一对引物 IF1/IF2。上下游引物分别设计有限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Bgl* II 的位点。PCR 扩增出 hIFN 基因片段,其片段包含有 Pcmv、hIFN 基因和 BGHpA,长约 1 750 kb。将该片段克隆到 pGEM-T Easy 质粒上,经 PCR、酶切鉴定获得 hIFN-T 质粒。

1.5.2 pCTKNeo-HRDS1/2-hIFN 打靶载体的构建

将 hIFN-T 质粒用 *Bam*H I/*Bgl* II 双酶切,回收纯化该片段,将其插入到 pCTKNeo-HRDS1/2 载体的 Neo 基因与 HRDS2 之间的 *Bam*H I 位点。设计两对引物 IF3/IF4 和 JD1/IF4 分别用于鉴定 hIFN 基因的插入及插入方向。经 PCR 扩增、酶切、测序鉴定获得用于鲮鱼的干扰素基因多位点打靶载体 pCTKNeo-HRDS1/2-hIFN。PCR 扩增、*Bam*H I/*Hind* III 双酶切鉴定 hIFN 的插入方向。

2 结果与分析

2.1 鲮鱼专用多位点打靶载体的构建

2.1.1 HRDS-T 质粒的鉴定 HRDS1-T、HRDS2-T 质粒的 PCR 鉴定产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,可见大小分别约为 1 200 bp 和 1 100 bp 的 DNA 片段(图 1)。质粒双酶切均产生两条带,一条大小约为 3 000 bp 的 T 质粒,另一条大小分别约为 1 200 bp 和 1 100 bp 插入片段。结果表明,HRDS1 和 HRDS2 已成功地克隆到 pGEM-T Easy 中。

2.1.2 pCTKNeo-HRDS1/2 载体的鉴定 构建的中间质粒 pCTKNeo-HRDS1 经 PCR 鉴定可扩增出大小约 1 200 bp 的片段,用 *Mfi* I/*Nhe* I 双酶切鉴定显示,除了一条大小约为 5 900 bp 的 pCTKNeo 载体带外,还有一条大小约为 1 200 bp 的 HRDS1 片段。



图1 鲮鱼 HRDS1-T、HRDS2-T 的 PCR 鉴定

注:1A、1B分别为 HRDS1-T、HRDS2-T 的 PCR 鉴定产物;1、2、3 道分别为 3 个质粒。

Fig.1 PCR identification of HRDS1-T and HRDS2-T in *Siniperca chuatsi*

Note: 1A and 1B are the products of PCR identification of HRDS1-T and HRDS2-T respectively. Lanes 1, 2 and 3 are 3 plasmids respectively

pCTKNeo-HRDS1/2 的 PCR 鉴定也可扩增出大小约 1 100 bp 的片段。再用鉴定 HRDS2 正向插入的引物 JD1/JD2 扩增,其产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳可见大小约 500 bp 的 DNA 片段。用 *Bam*H I/*Hind* III 双酶切鉴定,1% 琼脂糖凝胶电泳可见两条带,大小分别约为 6 500 bp 和 1 700 bp (图 2)。这些结果都表明已成功构建出 pCTKNeo-HRDS1/2 载体,且插入方向正确。也得到了测序结果的证实。

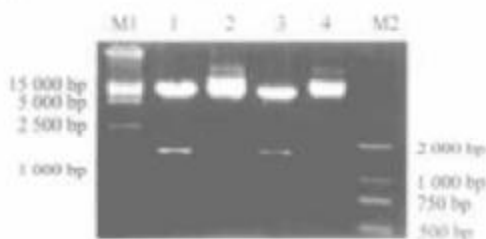


图 2 pCTKNeo-HRDS1/2 载体的双酶切鉴定

注: M1 从上到下分别为 15 000 bp, 10 000 bp, 7 500 bp, 5 000 bp, 2 500 bp, 1 000 bp; 1, 3 道均为 pCTKNeo-HRDS1/2 载体的 *Bam*H I/*Hind* III 双酶切产物; 2, 4 道均为 pCTKNeo-HRDS1/2 未酶切的载体; 1 和 2, 3 和 4 道分别为同一个质粒。

Fig. 2 Identification of double enzyme digestion of pCTKNeo-HRDS1/2

Note: Lane M1 means the markers with 15 000 bp, 10 000 bp, 7 500 bp, 5 000 bp, 2 500 bp and 1 000 bp from the top down. Lanes 1 and 3 are the products of double enzyme digestion of pCTKNeo-HRDS1/2 with *Bam*H I/*Hind* III. Lanes 2 and 4 are the plasmids of pCTKNeo-HRDS1/2 without enzyme digestion. Lanes 1 and 2, lanes 3 and 4 are the same plasmids respectively.

2.2 干扰素基因多位点打靶载体的构建

2.2.1 hIFN-T 质粒的鉴定

已消除 *Bam*H I 位点的 pCDNA3-hIFN 质粒的酶切与未酶切的电泳结果一样,测序发现原来的 *Bam*H I 位点已改为 GGATCTGATCA。结果表明,已成功地将 *Bam*H I 酶切位点消除。

hIFN-T 质粒的 PCR 鉴定产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,可见大小约 1 700 bp 的 DNA 片段 (图 3)。用 *Bam*H I/*Bgl* II 双酶切鉴定,均产生两条带,一条为载体,大小约为 2 700 bp,另一条为插入的 hIFN 片段,大小约为 1 700 bp。结果表明, hIFN 已成功克隆到 pGEM-T Easy 中。

2.2.2 pCTKNeo-HRDS1/2-hIFN 载体的鉴定

用鉴定 hIFN 基因插入的特异性引物 IF3/IF4 作 PCR 扩增,可扩增出大小约 430 bp 的 DNA 片段。再用鉴定 hIFN 正向插入的引物 JD1/IF4 作 PCR 扩增,1% 琼脂糖凝胶电泳可见大小约 1 300 bp 的 DNA 片

段,而反向插入者未见扩增产物 (图 4)。用 *Bam*H I/*Hind* III 双酶切鉴定,酶切后的质粒可产生 3 条带,大小分别约为 7 700 bp, 1 600 bp 和 680 bp。以上实验结合测序结果表明,已成功构建 pCTKNeo-HRDS1/2-hIFN 载体,且 hIFN 基因的插入方向正确。用于鲮鱼的干扰素基因多位点打靶载体结构示意图见图 5。



图 3 hIFN-T 的 PCR 鉴定

注: 1, 2, 3, 4 道分别为 4 个质粒。

Fig. 3 The PCR identification of hIFN-T

Note: Lanes 1, 2, 3 and 4 are 4 plasmids respectively.



图 4 pCTKNeo-HRDS1/2-hIFN 载体 hIFN 基因插入方向的 PCR 鉴定

注: 4 道为 hIFN 反向插入, 被 PCR 扩增为阴性。

Fig. 4 PCR identification of inserted direction of hIFN gene in the vector of pCTKNeo-HRDS1/2-hIFN

Note: Lane 4 is the plasmid with reverse insertion of hIFN, therefore, the PCR amplification is negative.

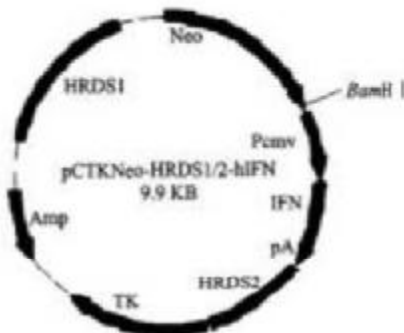


图 5 用于鲮鱼的干扰素基因多位点基因打靶载体示意图

Fig. 5 Skeleton map of the vector of multiple locus gene targeting with hIFN gene for *Siniperca chuatsi*

3 讨论

3.1 基因打靶载体的构建策略

基因打靶研究的依据是同源重组原理,即外源DNA与受体细胞染色体上的DNA同源序列之间发生同源重组,并整合到预定位点上,从而达到定点修饰改造细胞遗传特性的目的^[5]。通过基因打靶可以纠正染色体特定位点上的自发突变、恢复细胞正常功能;也可以把外源功能性基因引入到基因组的某个位点上,使之稳定表达和遗传。

根据同源重组时打靶载体插入基因组的方式不同,可将基因打靶技术和打靶载体分为两种类型。一种是插入型,载体的HRDS的两个臂错位,在HRDS两臂的边缘发生交换,使打靶载体的DNA序列插入到基因组同源序列之间,从而产生两个同源序列的串联重复;另一种是替换型,载体的HRDS的两个臂与基因组正常方向一致,常将载体线性化,即“ Ω ”型载体。通过双交换使外源DNA替换掉相对应的基因组内源序列,不会产生两个同源序列的串联重复,因此可以用来作基因校正治疗和转基因动物^[5]。

本研究的打靶载体的HRDS设计为正常方向的两个臂,并线性化成“ Ω ”型载体,所以为双交换替换型基因打靶载体。

3.2 基因打靶载体正负选择系统的建立

基因打靶的方法主要有正负选择系统法(PNS)、Cre-LoxP重组酶系统的条件基因打靶、“Hit and Run”法、“标记交换”法、ENU诱导点突变法等。PNS法是Capecchi等^[5]设计的,此法能将同源重组细胞浓缩20~1 000倍,从而有可能从大量的随机整合的细胞中筛选到同源重组克隆。1988年Mansour等^[6]通过建立一套正负选择系统来筛选基因组内同源重组正确发生的ES细胞克隆,该载体上除了含有外源的正选择基因Neo外,同时也含有负选择基因HSV-TK。当发生同源重组时,Neo基因位于两个同源臂之间,HSV-TK基因被重组掉。经过庆大霉素418(geneticin, G418)和丙氧鸟苷(ganciclovir, GCV, 又称更昔洛韦)的双重选择后,只有定点整合的ES细胞才能存活^[6]。

3.2.1 正选择系统 当打靶载体转染细胞(受精卵)后,不管是定点整合还是随机整合,在两个HRDS之间的Neo基因均可在整合的细胞(胚胎干细胞、受精卵)中表达。Neo基因表达后,赋予细胞

(胚胎干细胞、受精卵)具有抵抗G418药物毒性的能力。即表达后,产生氨基葡萄糖3'-磷酸转移酶APH(3')II和APH(3')I,当在培养基中加入适当浓度(常为200~400 $\mu\text{g/mL}$)的G418时,该酶能将G418磷酸化而使其失活。由于G418对许多动物细胞(包括人类细胞)有毒性,当G418存在时,细胞不能存活,而整合获得Neo基因的细胞能产生氨基葡萄糖3'-磷酸转移酶,使细胞产生G418抗性而选择性生长,未整合Neo基因的细胞逐渐死亡^[4]。

3.2.2 负选择系统 Neo基因正选择系统筛选出来的细胞包括定点整合和随机整合的细胞,因此还需要一个选择系统,即本研究选用的HSV-TK基因(位于HRDS2的外侧)来筛选掉随机整合的细胞。当发生随机重组时,打靶载体往往整个序列插入基因组中,这时,HSV-TK基因可以在细胞中表达产生TK,当在培养基中加入GCV时,TK可将GCV转变为有毒性的中间产物破坏细胞DNA复制,导致细胞快速死亡。当发生定点整合时,即同源重组,HRDS2以外的DNA序列均被截掉,即HSV-TK基因不能整合到基因组内,在定点整合的细胞中没有TK的作用,也不会将GCV转变成细胞毒性产物,于是定点整合的细胞存活从而被筛选出来^[6]。

3.3 rRNA基因间的间隔序列作为基因打靶靶位点的意义

动物18S rRNA、5.8S rRNA、28S rRNA的基因及其基因间的两个ITS串联成一个转录单位,每个动物细胞的基因组中均有100~300拷贝的转录单位^[7]。用重复的rRNA基因间的ITS序列作为靶位点,一方面,靶位点将增加到100~300个,将使基因定点整合效率提高100~300倍;另一方面,在不同个体、同一个体的不同组织细胞甚至同种细胞的不同代谢时期,其rRNA拷贝数或rRNA表达水平不一致。因此,在3种rRNA基因间的ITS定点插入外源基因,不会因rRNA表达水平改变而影响细胞的功能。

本研究正是利用鳊鱼rRNA基因间的ITS重复序列作为靶位点,对重复序列作为基因打靶靶位点的价值进行探讨。用鳊鱼rRNA基因及其ITS作为同源重组引导序列,以ITS为靶位点,构建含干扰素基因的多位点打靶载体,采用精子介导技术进行多位点基因打靶,将获得多位点定点整合干扰素基因的鳊鱼,建立一套适用于动物的基因定点导入的体内基因打靶技术。其意义在于:①以rRNA基因的ITS作为靶位点,将使基因打靶的靶位点增

加到100~300个,这将解决基因打靶时基因定点整合效率低的问题,使基因定点整合效率提高100~300倍。②由于插入位点为基因间的转录序列,位于活跃的转录单位内,且可能有多个位点同时插入外源基因,故将该序列作靶位点可解决转基因时外源基因不能稳定表达的部分问题,该靶位点有望成为高效表达位点。利用该技术进行hrtPA表达时,hrtPA的高效表达就证实了这一点。③靶位点为基因间的间隔序列,故插入外源基因不会破坏细胞的基因而导致细胞死亡或恶变,克服了毒性整合等安全性问题。④突破了DNA重复序列不能作为外源基因整合靶位点的禁区,将建立以重复序列为靶位点的多位点基因打靶技术。

鳊鱼是经济价值高的名优水产,病毒性疾病是其主要病害,表达外源干扰素基因的鳊鱼将可能抵抗病毒感染^[8],这一点目前正在进行深入研究以进一步证实。

参考文献:

- [1] McCreath KL, Howcroft J, Campbell K, et al. Production of gene-targeted ship by nuclear transfer from cultured somatic cells[J]. *Nature*, 2000, 405(6790): 1066-1069.
- [2] 唐冬生,施家琦,田允波,等. 体细胞多位点基因打靶技术的研究[J]. 佛山科学技术学院学报(自然科学版), 2002, 20(2): 64-68.
- [3] 唐冬生,高宽平,汤照翔,等. 生物信息技术克隆人类神经鞘蛋白零家熊基因[J]. 生物化学与生物物理学, 2000, 32(4): 364-368.
- [4] 唐冬生,严 霞,李 芳,等. 亲缘生物信息学在水产基因研究中的应用[J]. 水产科学, 2004, 23(8): 24-26.
- [5] Capecchi M R. Gene Targeting[J]. *J Scientific American*, 1994, 270(3): 34.
- [6] Maroian S L, Thomas K R, Capecchi M R. Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes[J]. *Nature*, 1988, 336(24): 348-352.
- [7] Sylvester J E, Whiteman D A, Podolsky R, et al. The human ribosomal RNA genes: structure and organization of the complete repeating unit[J]. *Hum Genet*, 1986, 73: 193-198.
- [8] 张学文,章怀云,符少辉,等. 可在鱼体内表达 hu-IFN α 的基因重组构建及转化[J]. 高技术通讯, 2001, 4: 1-5.

Construction of vector of multiple locus gene targeting on repetitive sequences of *Siniperca chuatsi*

TANG Dong-sheng^{1,2}, YAN Xia³, LI Fang³, ZHANG Xi-quan³, JIANG Hong², YU Hui¹, GAO Dong³, LI Yue-qin², ZHOU Tian-hong²

(1. College of Life Science, Foshan University, Foshan 528000, China; 2. College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. College of Animal Science, Southern China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The target loci of gene targeting are usually single copy sequences. The DNA repetitive sequences in genome are thought as forbidden zone of gene integrating. The authors have set up the techniques of multiple locus gene targeting using repetitive sequences as target loci in vitro. The no-coding repetitive sequences in NOR (nucleolus organization region) of animal cell were used as target loci. There were some problems such as low efficiency and safe problem in the gene targeting. The technique of multiple locus gene targeting on repetitive sequences would resolve part of these problems. *Siniperca chuatsi* was used as the object in this research. The vectors of multiple locus gene targeting on repetitive internal transcribed spacers between rRNA genes were constructed. The key material of multiple locus gene targeting in vivo would be got.

The general vector of gene targeting of pCTKNeo with TK gene and Neo gene was constructed firstly. The SP1416-T plasmid of rRNA genome of *Siniperca chuatsi* was got by cloning and PCR amplification with LA Taq polymerase. Two pairs of primers of HRDS1U/HRDS1D and HRDS2U/HRDS2D were designed. The two arms of HRDS1 (homogenous recombination direct sequence) and HRDS2 of the targeting vector were amplified by PCR using the SP1416-T plasmid as the templet. The PCR products of HRDS1 and HRDS2 were cloned to T-vector. The HRDS1 and HRDS2 digested from the HRDS1-T and HRDS2-T by *Nhe* I/*Mfl* I and *Bam* H I/*Bgl* II were inserted into the upstream and downstream of the Neo gene of pCTKNeo vector respectively. The pCTKNeo-HRDS1/2 vector of multiple locus gene targeting for *Siniperca chuatsi* was constructed. The other pair of primers of IF1/IF2 were also designed. The human interferon gene (hIFN) was amplified by PCR using the pCDNA3-hIFN plasmid as the templet. The PCR products of hIFN gene were cloned into T-vector. The hIFN gene digested from the hIFN-T by *Bam* H I/*Bgl* II was inserted into the *Bam* H I site between Neo gene and HRDS2 of pCTKNeo-HRDS1/2. The insertion and the insert direction of DNA fragments were identified by PCR, restriction digestion and sequencing in every cloning. The results showed that the pCTKNeo-HRDS1/2-hIFN vector of multiple locus gene targeting was constructed finally.

The significance of technique of multiple locus gene targeting on repetitive sequences were shown as following. Firstly, the repetitive sequences used as the targeting loci will increase to 100 – 300 loci of gene targeting. The problem of low efficiency of gene integrating in site in gene targeting will be resolved partially. Secondly, the inserting loci located in the active transcribed units, and the multiple loci will be inserted into genes at the same time. Therefore, the repetitive sequences used as the targeting loci will solved partial problems of gene silence caused by unstable expression of inserted genes. Thirdly, the targeting loci were the space sequences between rRNA genes. So, the genes of genome will not been destroyed by the insertion of foreign genes, and safe problem of toxicity integrating will be resolved partially. Forthly, the forbidden zone of DNA repetitive sequences of gene integrating was broken through.

Key words: gene targeting; multiple locus; vector; repetitive sequence; *Siniperca chuatsi*

Corresponding author: TANG Dong-sheng. E-mail: tangdsh@163.com

This study was supported by National Nature Science Foundation of China (30170737, 30470978) and Nature Science Foundation of Guangdong (04011645).