

## 玉米 *ZmPGP1* 基因启动子的克隆及结构功能分析

叶凌凤<sup>1,2</sup> 刘琳<sup>2</sup> 张志高<sup>1</sup> 徐启来<sup>1</sup> 王俊仁<sup>1</sup> 康定明<sup>2\*</sup>

(1. 江苏省农垦农业科学研究院,南京 210019;

2. 中国农业大学 农学院,北京 100193)

**摘要** 为分析玉米 *ZmPGP1* 基因启动子的功能,利用巢式 PCR 方法克隆出了玉米 *ZmPGP1* 基因的启动子调控区,并将该启动子与 GUS 基因融合,通过基因枪法转入玉米 (*Zea mays*) 中,分析 *ZmPGP1* 启动子表达特性。结果显示,在玉米中克隆出 *ZmPGP1* 基因 5' 端上游 1 090 bp 的启动子序列,该启动子序列包括光响应元件、激素响应元件和胁迫诱导及发育相关顺式作用元件。GUS 染色表明 *ZmPGP1* 基因在玉米幼苗的茎部、叶子及根中都有表达,其中茎的节间处以及叶鞘部位表达量较高,这与 *ZmPGP1* 基因的 Real-time PCR 分析结果一致。研究结果进一步阐明 *ZmPGP1* 基因的功能以及作用机理。

**关键词** 玉米; *ZmPGP1* 基因; 顺式作用元件; 基因表达

中图分类号 S513

文章编号 1007-4333(2017)03-0001-05

文献标志码 A

## Cloning and functional analysis of maize *ZmPGP1* promoter

YE Lingfeng<sup>1,2</sup>, LIU Lin<sup>2</sup>, ZHANG Zhigao<sup>1</sup>, Xu Qilai<sup>1</sup>, WANG Junren<sup>1</sup>, KANG Dingming<sup>2\*</sup>

(1. Jiangsu Agricultural Reclamation Academy of Sciences, Nanjing 210019, China;

2. College of Agronomy, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract** To analyze the function of maize *ZmPGP1* gene promoter, the sequence of *ZmPGP1* promoter was cloned by nest-PCR. The cloned promoter was fused with *GUS* gene and then introduced into maize by particle bombardment to investigate the expression feature of *ZmPGP1* gene. The results showed that the length of cloned *ZmPGP1* promoter was 1 090 bp containing light-, hormone-, stress induced- and development- related *cis*-elements. The results from histochemical GUS staining revealed that *ZmPGP1* expressed in stem, leaf and root, and its expression level was high in internodes and sheath, which was consistent with the expression analysis of *ZmPGP1* by Real-time PCR. These results provided references for further function and mechanism study of *ZmPGP1* action.

**Keywords** maize; *ZmPGP1* gene; *cis*-element; gene expression

生长素主要在植物体的茎尖、幼叶以及根尖等分生组织区合成,只能从植物的形态学上端往形态学下端运输即生长素的极性运输。极性运输使生长素在植物不同组织中维持生长素一定的浓度差,以调控植物的发育,如维管分化、器官发育、顶端优势和向性生长等生理过程<sup>[1-4]</sup>。生长素的极性运输离不开运输载体,磷酸糖蛋白家族 (P-glycoprotein, PGP) 是近年来新发现的植物生长素输出载体,该蛋

白家族是 ATP 结合盒 (ATP-binding cassette, ABCB) 转运蛋白超级家族的 1 个亚族<sup>[5-6]</sup>。植物 PGP 基因编码的蛋白由 2 个相同的部分组成,每个部分由 1 个跨膜结构域 (Transmembrane domain, TMD) 和 1 个核酸结合区 (Nucleotide-binding domain, NBD) 组成,含有约 1 250 个氨基酸,分子量在 125~140 ku<sup>[7-9]</sup>。

玉米 *ZmPGP1* (*Brachytic2*, *Br2*) 是一直以来

收稿日期: 2016-04-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171564); 公益性行业(农业)科技专项(201303002)

第一作者: 叶凌凤,农艺师,博士,主要从事遗传育种研究, E-mail: sknfylf@163.com

通讯作者: 康定明,教授,主要从事分子生物学研究, E-mail: kdm@pku.edu.cn

被认为是玉米上最有利用价值的株高基因<sup>[10-13]</sup>,其隐性突变体 *br2* 表现为株高显著降低,尤其是穗位以下部位茎节明显缩短,但节间数目和叶片数量没有变化,叶片呈墨绿色,叶片夹角较直立等理想株型的性状<sup>[14-15]</sup>。

*ZmPGP1* 基因组全长为 7 139 bp,有 5 个外显子组成,编码序列为 4 185 bp,编码 1 349 个氨基酸。编码的预测蛋白是由 2 个相似部分组成,每个部分有 6 个  $\alpha$ -螺旋组成的跨膜结构域和 1 个 ATP 核苷酸结合结构域组成<sup>[16]</sup>。

目前,国内外关于玉米 *ZmPGP1* 基因启动子的研究还未见报道。本研究根据玉米基因组数据库,采用巢式 PCR 方法克隆出 *ZmPGP1* 基因的上游调控序列并分析其顺式调控元件,通过把 *ZmPGP1* 启动子与  $\beta$ GUS (Glucuronidase) 报告基因连接后导入玉米中,用 GUS 染色分析其表达部位以及表达活性。旨在进一步阐明 *ZmPGP1* 基因的功能以及作用机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

玉米材料为 B73,由本实验室保存,种植于中国农业大学上庄试验站和海南南滨农场。转基因玉米材料种植于国家玉米改良中心人工气候室。本研究所用的大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ 、表达载体 pCAMBIA3301 由本实验室保存;SYBR Premix Ex、TaqDNA 聚合酶、dNTP、DNA 分子量标准品、pMD18-T 载体、各类限制性内切酶等均购自大连 TaKaRa 公司;DNA 回收试剂盒购自北京天根公司;X-gal、IPTG 和 MS 培养粉等购自 Sigma 公司;TRIzol 和 SuperScript<sup>TM</sup> III Reverse Transcriptase 试剂购自 Invitrogen 公司;本研究所用引物由上海生工生物公司合成,测序由北京美吉公司完成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 玉米 *ZmPGP1* 基因启动子克隆

在 GenBank 上查找到 *ZmPGP1* 的基因序列 (GenBank 登录号为 AY366085),根据序列在玉米基因组数据库中 (<http://www.maizegdb.org/>),找到基因所在的 BAC AC210610.4,选取基因起始密码子上游约 2.0 kb 作为启动子区域。将这段序列放到 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中进行 BLAST,结果显示这 2.0 kb 序列的前

1.0 kb 左右标注为 Repetitive sequence,故选择基因起始密码子上游 1.0 kb 左右为启动子区域,采用巢式 PCR 来扩增该启动子区域,设计的引物为 *P1-F* (5'-TGTGTGTGGTGCCTTTCTTTC-3') 和 *P1-R* (5'-GCAGGAGCAGGGAGCGTG-3') 以及 *P2-F* (5' CGCGTACCGTATCTCAACAA-3') 和 *P2-R* (5'-CGGGTTCGCTGCTAGACATG-3')。以玉米 DNA 为模板,使用引物 *P1-F/R* 扩增,从得到的 PCR 产物中取出 1  $\mu$ L,稀释到 99  $\mu$ L dd H<sub>2</sub>O 中,作为 PCR 模板,使用引物 *P2-F/R* 进行扩增,两步 PCR 反应均按照 PrimeSTAR HS DNA polymerase 操作说明进行,反应条件为:98  $^{\circ}$ C 变性 10 s,60  $^{\circ}$ C 退火 5 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min,35 个循环。PCR 产物经过回收和纯化,连接到 pMD18-T 载体后转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,蓝白斑筛选后选择白色单菌落接种扩繁后,送公司测序。

#### 1.2.2 玉米 *ZmPGP1* 启动子调控元件分析

将获得的 *ZmPGP1* 启动子序列提交到相关的启动子预测软件 (PLACE, <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/index.html>; PlantCARE, <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行顺式作用元件预测和分析。

#### 1.2.3 Pro<sub>*ZmPGP1*</sub>:GUS 载体的构建和玉米遗传转化

根据 *ZmPGP1* 启动子序列和表达载体 pCambia3301 的多克隆位点,在启动子两端分别设计带有 *Hind* III 和 *Nco* I 酶切位点的引物。用 *Hind* III 和 *Nco* I 双酶切 PCR 扩增获得的片段和 pCAMBIA3301 载体,回收并纯化酶切片段后用 T4 连接酶进行连接反应,连接产物转化大肠杆菌感受态 DH5 $\alpha$ ,经菌液 PCR 和测序鉴定后得到重组质粒。将重组质粒通过基因枪法转入玉米愈伤组织,在含有草丁膦 (2.5 mg/L) 的培养基上进行筛选。成苗的植株移栽至温室生长,移栽后 2 周左右,取叶片提取 DNA,采用 PCR 扩增 *Bar* 基因片段和 *ZmPGP1* 基因启动子区域片段,检测得到转基因阳性植株。

#### 1.2.4 转基因植株的 GUS 染色分析

取生长 20 d 的转基因玉米叶片、根和茎放入 GUS 染色液 (1 mmol/L X-Gluc, 10 mmol/L EDTA, 2 mmol/L K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 2 mmol/L K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.1% Trixon X-100, 50 mmol/L sodium phosphate pH 7.2) 中 37  $^{\circ}$ C 放置 12 h 后,用 70% 的乙醇脱色 4~5 次后在解剖镜下观察拍照。

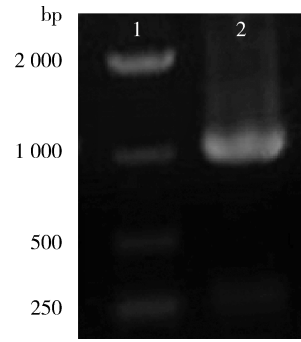
### 1.2.5 玉米 *ZmPGP1* 基因表达的 Real-time PCR 分析

取生长约 20 d 玉米的根、茎、叶以及成熟期的雌穗和雄穗,用 TRIzol 试剂提取组织的总 RNA,用 SuperScript™ III Reverse Transcriptase 将总 RNA 反转录成 cDNA。Real-time PCR (Applied Biosystems 7500)使用 SYBR Premix ExTaq,按照操作说明进行。玉米 *Actin* 基因为参考基因,与目标基因一起扩增,*Actin* 检测引物为 *Actin-F* (5'-TAAGCTGCCGATGTGCCTGCGTCG-3')和 *Actin-R* (5'-CTGAAAGACAGAACATAATGAGCACA-G-3'),*ZmPGP1* 基因检测引物为 *ZmPGP1-F* (5'-CTGCTCATCGGCATGTCCTC-3')和 *Zm-PGP1-R* (5'-GAACCAGGCGATCTCGTTGC-3')。利用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  分析不同组织的 *ZmPGP1* 基因的相对表达量,进行 3 次生物学重复试验,取平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 玉米 *ZmPGP1* 基因启动子的克隆

以玉米嫩叶的基因组总 DNA 为模板,采用巢式 PCR 方法,进行两轮 PCR 扩增 *ZmPGP1* 基因上游序列,得到的 PCR 产物长度为 1 100 bp 的片段(图 1),测序后经过与 *ZmPGP1* 基因序列比对,除去编码区序列,5'端调控区的长度为 1 090 bp,测序结果和 GenBank 数据库上序列基本一致,该序列可以用于下步研究。



1 DNA 标准分子量 DL 2000, DNA marker DL 2000  
2 *ZmPGP1* 基因启动 PCR 产物 Amplification of *ZmPGP1* promoter

图 1 玉米 *ZmPGP1* 基因启动子的 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR product of *ZmPGP1* promoter

### 2.2 玉米 *ZmPGP1* 启动子顺式作用元件分析

将测序得到的启动子序列采用 PLACE 和 PlantCARE 数据库进行分析,结果表明 *ZmPGP1* 基因转录起始位点为 G,位于起始密码子 ATG 上游 64 bp 处(图 2),*ZmPGP1* 启动子区域除了包括大多数高等植物启动子都有的 TATA-box 和 CCAAT-box 保守元件外,还包扩其他调控元件。如光响应元件:AAAC-motif、CATT-motif 和 G-Box 等,激素响应元件:ABRE(脱落酸响应元件)、GARE-motif(赤霉素响应元件)和 P-Box(生长素响应元件)等,胁迫诱导及发育相关顺式作用元件:ARE(抗氧化反应元件)、MBS(干旱相关元件)和 HSE(热激应答元件)等(表 1)。

```

-1 026  ACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGTCGACCTGCAGGCGGCCACTAGTGATTCCCAAGCTTCGCGTACCGTATCTCAA
-946  CAAACACCTTCAATAAGTTGAGTCGGGTAGATCTCAAGGCTACATAAAATAGTTTTTTTCTAGAATGGATGCATTGT
-866  TTTAAGAGAAAAATGATGCACTTGAATGCATCAAGCGAAGGGATGCAAGAATGTTGGA AAAACACATGAACCCGTATCG
-786  CGAGATGCTTATTAGCCATTCTTTATCACAGTGGATGCATATGCAACAAAACAAAACAGATGGTTAGCGAGTGACAG
-706  TATATAGAGATCTAAAGATCCGACACTTCATCGGTA AAAAAAAGCAGCATTAAACCGAGTGAATGGAAGAAAAACGAATTT
-626  CTCATATTACACAACAGGTTTTCTTAAAAAAAACGTTACCTCGGTATTTATATTAAGAAGAGACTAAAATATGGTCCC
-546  GTCGAGAAAAATTTCTAAACACTAGTCTTCATCAGTGTGAGCCGTACCATCTAGTTTGAACGGTCCAGTCAGAGTGCA
-466  GGACATAACTCAGGACTCAAGAGCAGACGGAGCAGCGTGAGAGAATTTTTTTAATCAAGCCTAAAATTCACCTCCGGAC
-386  AAATGAACTGGAACGGGTGCTACTCATAAATATTAACCATGAGACCTTTTCGCCGAGCAGGTTTTCTATCGGCAGTT
-306  AGATTTTGTAGTGACGATGAAAATGATAGAACGCAACGTGCCGATGCATCCATTCCCATTCCGTTTTCCACAGTACATGTAG
-226  GAGTACTGTGCAAGTAGGGTCCGTACATTCAGTCTCTCTACCAGTTGGACTCTTCTACTGCTACAAGACATGAGCTGC
-146  CTGGAATGGGAACCGGAGGAGCAGCGAGCCTGACGGTCTCACACACACAGTCACACTCCAAGCCAATTATTATAAG
-66   AGGCGAGATGAGCAACTCCAGTCTTAACCAATCCACTCCTCCTCCTCCTCCACTCCTCTGCTTTGCTCTGCCACTCTG
+14   CTGAGGTGGGGGAGAGGAGCTCCCCCTCCTCCTCCTCCTCCTCGCCATG
    
```

图 2 玉米 *ZmPGP1* 基因启动子序列

Fig. 2 *ZmPGP1* promoter sequence

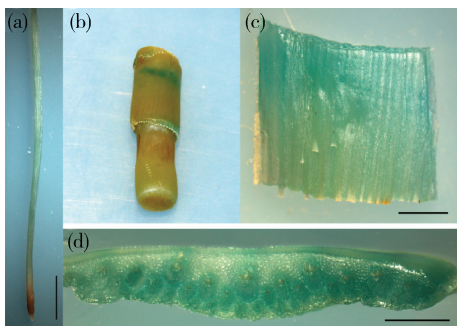
表1 *ZmPGP1* 基因启动子区域序列的顺式作用元件分析  
Table 1 Analysis of *ZmPGP1* promoter cis-acting elements

元件类型 Element type	元件名称 Name of the element	核心序列 Core sequence	位置 Location
光响应元件 Light response element	AAAC-motif	CAACAAAAACCT	77(+)
	CATT-motif	GCATTC	184(-)
	G-Box	CACGTT	752(-)
	GT1-motif	GTAA	368(-), 984(-), 673(-), 369(-), 674(-)
	Sp1	CCGCCC	1 001(+)
激素响应元件 Hormone response element	RbcS-CMA7a	GGCGATAAGG	686(-)
	ABRE	GCAACGTGTC	750(+)
	CGTCA-motif	CGTCA	522(+), 911(-), 729(-)
	GARE-motif	AAACAGA	296(-)
	P-Box	CAACAAACCCCTT	77(+)
胁迫诱导和发育 相关元件 Stress-induced and development response element	TCA-element	CCATCTTTTT	296(+)
	TGACG-motif	TGACG	522(-), 911(+), 729(+)
	ARE	TGGTTT	290(-)
	CAT-box	GCCACT	1 031(+)
	CCAAT-box	CAACGG	539(+)
and development response element	GCN4-motif	CAAGCCA	942(+)
	HSE	AAAAAATTTTC	484(+), 602(-)
	MBS	AACTG	715(-), 842(-)
	TC-rich repeats	TCTCTC	417(+), 596(-), 481(-)

### 2.3 玉米 *ZmPGP1* 启动子时空表达特性分析

为了分析 *ZmPGP1* 基因的表达调控模式,首先构建了  $Pro_{ZmPGP1} : GUS$  载体转化玉米 B73 材料,经过草甘膦筛选,愈伤诱导成苗后,通过 PCR 扩增和测序验证后,选取生长约 20 d 的阳性幼苗进行 GUS 染色。结果显示,GUS 基因在幼苗的茎部、叶子及根中都有很高的表达,其中茎的节间处,叶子的叶鞘部位有明显的染色(图 3)。为了更进一步明确

基因的表达特异性,又取了玉米生长约 20 d 幼苗的根、茎、叶以及成熟期的雌穗和雄穗,提取 RNA 后反转录,Real-time PCR 的结果分析表明 *ZmPGP1* 基因在根,茎,叶中表达量较高,这与 GUS 染色的结果一致,其中茎的表达量最高,是雄穗中表达的 75 倍(图 4)。



(a) 根;(b) 茎;(c) 叶鞘;(d) 叶鞘的横切面。标尺=5 mm  
(a) Root; (b) Stem; (c) Sheath; (d) Cross section of sheath.

Bar=5 mm

### 图3 $Pro_{ZmPGP1} : GUS$ 转基因玉米的 GUS 染色分析

Fig. 3 Histochemical analysis of GUS expression driven by the *ZmPGP1* promoter in transgenic maize

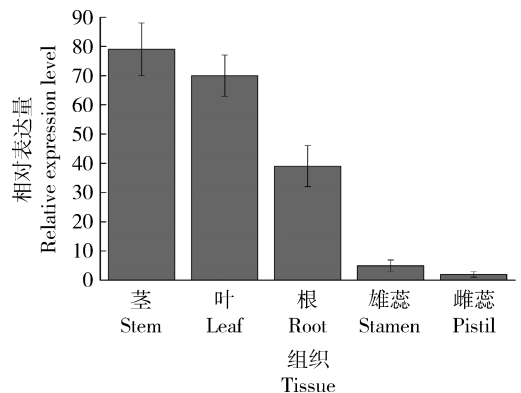


图4 玉米不同组织中 *ZmPGP1* 基因相对表达量

Fig. 4 Relative expression of *ZmPGP1* in different tissues of maize

## 3 讨论

启动子是基因表达与调控的开关,基因启动子

表达的特性分析对于了解基因的作用机理具有非常重要的作用。本研究分离了玉米 *ZmPGP1* 上游启动子序列,分析表明该序列含有多个与生长发育相关的重要调控元件。其中所包含的生长素响应元件预示了该基因的功能与生长素有着密切的关系。已有报道表明,该基因的功能与生长素运输有关,而生长素的极性运输过程中生长素可通过茎或根的中央维管组织由上向下运输,部分生长素还会向茎或根的侧面运输<sup>[17-18]</sup>。本研究通过 GUS 组织染色和 Real-time PCR 分析,表明 *ZmPGP1* 基因在根、茎和叶中表达量较高,尤其在茎中表达量最高,预示了该基因在生长素的极性运输的生理特性上的可能功能,这也与该基因的功能预测相一致。

目前,已有报道证明 *ZmPGP1* 基因在拟南芥上的同源基因 *AtPGP1* 和 *AtPGP19* 的相关互作基因,初步阐明了 PGP 蛋白的作用机理<sup>[19-21]</sup>。本研究通过对 *ZmPGP1* 基因的启动子分析,发现其除了含有激素响应顺式作用元件外,还含有大量的光响应元件和胁迫诱导及其他发育相关顺式作用元件,表明该基因在植物生长发育中可能还参与其他的生理调控过程,有待进一步研究。

## 参考文献 References

[1] Okada K, Ueada J, Komaki M K, Bell C J, Shimura Y. Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation[J]. *Plant Cell*, 1991,3(7):677-684

[2] Friml J. Auxin transport- shaping the plant [J]. *Current Opinion in Plant Biology*,2003,6(1):7-12

[3] Benjamins R, Scheres B. Auxin: The looping star in plant development[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59: 443-465

[4] Cardarelli M, Cecchetti V. Auxin polar transport in stamen formation and development; How many actors? [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 1-13

[5] Higgins C F. ABC transporters; From microorganisms to man [J]. *Annual Review of Cell Biology*, 1992, 8(1): 67-113

[6] Henikoff S, Greene E A, Pietrokovski S, Bork P, Attwood T K, Hood L. Genome families: The taxonomy of protein paralogs and chimeras[J]. *Science*, 1997, 278(5338): 609-614

[7] Jasinski M, Ducos E, Martinoia E, Boutry M. The ATP-binding cassette transporters: Structure, function and gene family comparison between rice and *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2003, 131(3): 1169-1177

[8] Hollenstein K, Dawson R J, Locher K P. Structure and mechanism of ABC transporter proteins[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2007, 17(4): 412-418

[9] Rees D C, Johnson E, Lewinson O. ABC transporters: The power to change[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(3): 218-227

[10] Anderson J C, Chow P N. Phenotypes and grain yield associated with *br2* gene in single cross hybrids of dent corn [J]. *Crop Science*, 1960, 1: 335-337

[11] Pendleton J W, Seif R D. Plant population and row spacing studies with *brachytic-2* dwarf corn[J]. *Crop Science*, 1961, 1 (6): 433-435

[12] Koraiem Y S, Bary A A, Shalaby A A, Khalifa K I. Effect of *brachytic-2* dwarfing gene on some corn populations (*Zea mays* L)[J]. *Alexandria Journal of Agricultural Rresearch*, 1978, 26: 73-78

[13] Djisbar A, Brewabaker J L. Effects of the *brachytic-2* gene on maize yield and its components[J]. *Maydica*, 1987, 32(2): 107-123

[14] Souza Jr C L, Zinsly J R. Relative genetic potential of *Brachytic* maize (*Zea mays* L) varieties as breeding populations[J]. *Revista Brasileira de Genetica*, 1985, 8 (3): 523-533

[15] Xing A, Gao Y, Ye L, Zhang W, Cai L, Ching A, Llaca V, Johnson B, Liu L, Yang X, Kang D, Yan J, Li J. A rare SNP mutation in *brachytic2* moderately reduces plant height and increases yield potential in maize[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(13): 3791-3802

[16] Multani D S, Briggs S P, Chamberlin M A, Blakeslee J J, Murphy A S, Johal G S. Loss of an MDR transporter in compact stalks of maize *br2* and sorghum *dw3* mutants[J]. *Science*, 2003, 302(5642): 81-84

[17] Rashotte A M, Brady S, Reed R C, Ante S J, Muday G K. Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2000, 122(2): 481-490

[18] Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B. The PIN auxin efflux facilitation net-work controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots[J]. *Nature*, 2005, 433(7021): 39-44

[19] Geisler M, Kolukisaoglu H Ü, Bouchard R, Billion K, Berger J, Saal B, Frangne N, Koncz Z, Koncz C, Dudler R, Blakeslee J J, Murphy A S, Martinoia E, Schulz B. TWISTED DWARF1, a unique plasma membrane-anchored immunophilin-like protein, interacts with *Arabidopsis* multidrug resistance-like transporters AtPGP1 and AtPGP19[J]. *Molecular Biology of Cell*, 14(10): 4238-4249

[20] Bouchard R, Bailly A, Blakeslee J J, Oehring S C, Vincenzetti V, Lee O R, Paponov I, Palme K, Mancuso S, Murphy A S, Schulz B, Geisler M. Immunophilin-like TWISTED DWARF1 modulates auxin efflux activities of *Arabidopsis* P-glycoproteins[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281 (41): 30603-30612

[21] Wang B, Bailly A, Zwiewka M, Henrichs S, Azzarello E, Mancuso S, Maeshima M, Friml J, Schulz A, Geisler M. *Arabidopsis* TWISTED DWARF1 functionally interacts with auxin exporter ABCB1 on the root plasma membrane[J]. *The Plant Cell Online*, 2013, 25(1): 202-214