

Nghiên cứu phát hiện đột biến gen K-R_{as} bằng kỹ thuật REMS - PCR để sàng lọc, chẩn đoán sớm một số ung thư đường tiêu hoá

Hồ Hữu Thọ*; Nguyễn Duy Bắc*; Trần Văn Khoa*; Phạm Ngọc Tuấn*

TÓM TẮT

Áp dụng kỹ thuật REMS-PCR, một phương pháp nhân gen đặc biệt cho phép nhân chọn lọc các đoạn gen bị đột biến mà không nhân các đoạn gen bình thường nhờ vai trò của enzym giới hạn, nhằm phát hiện đột biến gen K-Ras trong huyết tương của một số bệnh nhân (BN) ung thư đường tiêu hoá (UTĐTH). Qua phân tích, phát hiện 4/10 mẫu có đột biến gen K-Ras ở vị trí codon 12. Kết quả này giúp ứng dụng kỹ thuật REMS-PCR để sàng lọc, chẩn đoán sớm, phục vụ tiên lượng điều trị BN UTĐTH thông qua xét nghiệm máu ngoại vi.

* Từ khoá: Ung thư đường tiêu hoá; Kỹ thuật REMS-PCR; Đột biến gen K-Ras.

Detection K-Ras Mutations by using REMS - PCR assay in order to screening and early diagnosing some Gastrointestinal cancers

SUMMARY

Applying REMS-PCR (restriction endonuclease-mediated selective PCR), a technique to selectively amplify mutation sequences by restriction enzymes, aim to detect K-Ras mutation in plasmas of some gastrointestinal malignancy patients. The results show that, mutations in codon 12 of K-ras gene were detected in 4 (40%) of the fresh gastrointestinal cancers. We concluded that restriction endonuclease-mediated selective PCR is a sensitive, rapid, and robust assay for the detection of point mutations in sample bloods.

* Key words: Gastrointestinal cancer; REMS-PCR assay; K-ras mutation.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư là bệnh lý ác tính, nguy hiểm, có tỷ lệ tử vong cao. Theo thống kê của Hiệp hội chống Ung thư quốc tế (UICC-1988),

hàng năm có khoảng gần 7 triệu người bị ung thư, 5 triệu người chết. Tại Việt Nam, theo ước tính có 100.000 - 150.000 người bị bệnh, 50.000 - 70.000 người chết vì ung thư [2].

* Học viện Quân y

Phản biện khoa học: PGS. TS. Hoàng Văn Lông

Nhiều kết quả nghiên cứu cho thấy ung thư là một bệnh lý về gen, do mất sự điều hòa giữa gen tiền ung thư và gen ức chế ung thư. Đột biến gen tiền ung thư K-Ras xuất hiện thường xuyên ở người, đặc biệt là UTĐTH và hay gặp nhất ở ung thư tụy (75 - 95%), ung thư đại tràng (24%), ung thư dạ dày [5]. Hiện nay, việc chẩn đoán ung thư còn gặp nhiều khó khăn, kết quả điều trị còn nhiều hạn chế vì hầu hết khối ung thư thường được phát hiện ở giai đoạn muộn, có xâm lấn và di căn, nên ít hoặc không còn khả năng điều trị [1].

Những thành tựu trong nghiên cứu y học phân tử đã mở ra khả năng mới trong chẩn đoán sớm ung thư, trong đó có phương pháp REMS-PCR. Đây là một phương pháp nhân gen đặc biệt, cho phép nhân chọn lọc các đoạn gen bị đột biến mà không nhân đoạn gen bình thường nhờ vai trò của enzym giới hạn. Do vậy, có thể sử dụng để phát hiện lượng ADN đột biến rất nhỏ của khối ung thư lưu hành trong máu ngoại vi, làm nền tảng chẩn đoán sớm ung thư [9, 10].

Ở nước ta, chưa có một công trình nào nghiên cứu về lĩnh vực này. Xuất phát từ thực tế đó, chúng tôi thực hiện đề tài nhằm:

- Xây dựng quy trình REMS-PCR phát hiện đột biến gen K-Ras.
- Bước đầu xác định tỷ lệ đột biến gen K-Ras trong huyết tương nhằm phục vụ và sàng lọc chẩn đoán sớm một số UTĐTH.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

10 BN được chẩn đoán xác định là ung thư bằng mô bệnh học tại Khoa B2, Bệnh viện 103, trong đó 4 BN ung thư dạ dày, 3 BN ung thư gan, 3 BN ung thư đại tràng. Lựa chọn tách riêng mẫu máu của BN thành 2 phần huyết tương (nhóm nghiên cứu) và tế bào (chứng âm).

2. Phương pháp nghiên cứu.

** Hóa chất nghiên cứu:*

- Hóa chất tách ADN: proteinase K, phenol: chloroform, Tris HCl.
- Hóa chất phản ứng REMS-PCR: DTT, dTNP 10 Mm, MgCl₂ 10 mM, Taq, BstNI.
- Hóa chất điện di: agarose, TBE 0,5X, ladder, ethilium bromid.
- Hóa chất đọc trình tự gen: EDTA 125 mM, Hi-Di™ formamide, POP7.

** Phương tiện nghiên cứu:*

Tủ lạnh sâu (Continental Scientific, Mỹ), máy ly tâm lạnh (Hettich, Đức), hệ thống nhân gen PCR (Bio-Rad, Mỹ), máy chụp ảnh gen Chemidoc XRP (Bio-Rad, Mỹ), máy điện di Powerpac (Bio-Rad, Mỹ), máy cô chân không loại bỏ dung môi Speed Vac (Thermo electron, Mỹ), máy quang phổ tử ngoại Nanodrop 1100 (Nanodrop, Mỹ), máy đọc trình tự gen tự động ABI 3130xl (ABI, Mỹ)...

** Phương pháp nghiên cứu:*

- Phương pháp tách chiết ADN từ huyết tương sử dụng phenol: chloroform: isoamylalcohol (25:24:1):

+ Lấy 200 µl mẫu cho vào eppendoff, thêm vào 1.000 µl PBS 1X, Vortex 15 - 30 giây và ly tâm 5.000 vòng/phút trong 2 phút. Hút bỏ phần dịch phía trên cùng và làm lặp lại quá trình này cho đến khi lớp dịch có màu hồng nhạt.

+ Thêm 500 µl lysis buffer, 5 µl proteinkinase. Trộn bằng pipet rồi Vortex 15 - 30 giây. Lưu trong bể ổn nhiệt 56°C/550 vòng từ 10 - 12 giờ.

+ Thêm 500 µl phenol: chloroform: isonamylalcohol tỷ lệ 25:24:1. Lật nhẹ 10 - 20 lần ly tâm 14.000/2 phút. Lấy dịch trong phía trên sang tít sạch khác. Làm lại bước trên. Lấy 400 µl dịch phía trên.

+ Thêm tiếp 800 µl cồn 100°, lắc 10 lần, ly tâm 14.000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút. Bỏ dịch trong, giữ lại phần tủa ở đáy tít. Thêm vào 1.000 µl cồn 70° (không lắc) ly tâm 14.000 vòng/phút trong 2 phút ở 4°C.

+ Bỏ phần dịch, giữ lại phần tủa, Speed Vac 43°C trong 15 phút.

+ Thêm 50 µl nước cất, trộn đều.

+ Đo độ tinh sạch và nồng độ ADN thu được trên máy Nano-drop.

* *Phương pháp REMS-PCR:*

Sau khi tách chiết được ADN đảm bảo về nồng độ và độ tinh sạch, tiến hành phản ứng REMS-PCR.

- Chuẩn bị hóa chất và thiết bị máy móc cần thiết.

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng REMS-PCR.

- Cho hỗn hợp trên vào hệ thống máy PCR theo chu trình đã cài đặt sẵn.

* *Phương pháp đọc trình tự gen để phát hiện đột biến gen K-Ras:*

Đoạn gen quan tâm được xác định trình tự trên máy tự động ABI PRISM® 3130xl Avant Genetic Analyzer bằng cách sử dụng bộ hóa chất BigDye® Terminator v3. 1 Cycle Sequencing.

Đọc trình tự thành phần của phản ứng PCR gồm: 3,2 pM mỗi 3K32, 200 ng ADN sản phẩm của REMS-PCR, BigDye, đệm tương ứng trong tổng thể tích 15 µl với chu trình nhiệt trên máy luân nhiệt GenAmp® PCR System 9700 như sau: 96°C - 1 phút; 25 chu kỳ (96°C - 10 giây, 50°C - 5 giây, 60°C - 4 phút); giữ ở 4°C.

Tinh sạch sản phẩm PCR bằng phương pháp tủa EtOH/EDTA.

Điện di trong ống mao quản 36 cm x 50 µm với polymer POP-4™ của hãng ABI (Mỹ). Xác định trình tự nucleotide của mỗi mẫu với mỗi ngược (3K32).

Xử lý số liệu bằng các phần mềm ABI PRISM® 3100-Avant data collection v1. 0 và ADN sequencing analysis.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Quy trình phát hiện đột biến gen K-Ras trong huyết tương bằng phương pháp REMS-PCR.

Hàm lượng ADN trong huyết tương rất nhỏ, từ 10 - 20 µg/ml gồm cả ADN bình thường và ADN đột biến của khối u. Không những thế, hàm lượng ADN bình thường cao gấp hàng

nghìn lần ADN đột biến trong huyết tương, việc xác định ADN đột biến này bằng phương pháp PCR thông thường không cho kết quả như mong muốn vì phản ứng PCR nhân lên cả đoạn ADN đột biến và ADN bình thường. Do vậy, chúng tôi tiến hành quy trình phát hiện các alen đột biến bằng phương pháp REMS-PCR. Phương pháp này chỉ cho phép nhân đoạn gen đột biến mà không nhân lên các đoạn gen bình thường [4].

* *Chuẩn bị hóa chất:* Taq ADN polymerase ủ với 0,26 µg kháng thể Taq Starts trong chất đệm 50 mmol/l NaCl và 10 mmol/l TrisHCl PH = 7. Sau đó trộn với enzym giới hạn BstNI trong 15 phút ở nhiệt độ phòng.

* *Lấy mẫu và xử lý mẫu:*

Lấy 5 ml máu ngoại vi của BN đã được chẩn đoán UTĐTH vào tít chống đông EDTA và tiến hành quy trình xử lý trong 2 giờ.

- Lắc nhẹ mẫu máu 8 lần.

- Ly tâm 3.000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 20 phút.

- Sau đó dùng pipet hút riêng lớp huyết tương và lớp tế bào (bảo quản ở -80°C nếu chưa tách được ngay).

* *Tách chiết ADN:*

Tách chiết ADN từ huyết tương bằng phương pháp sử dụng phenol-choloroform, đây là một phương pháp thu được hàm lượng và chất lượng ADN tốt nhất.

Hàm lượng ADN huyết tương từ 10 - 20 µg/ml, hàm lượng ADN tế bào từ 50 - 200 µg/ml, độ tinh sạch từ 1,8 - 2,1.

* *Phương pháp REMS-PCR:* đây là phương pháp kết hợp giữa enzym giới hạn và PCR thường.

* *Lựa chọn enzym giới hạn:*

Đa số các enzym giới hạn đều hoạt động tốt nhất ở một điều kiện nhất định theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Chúng tôi lựa chọn enzym BstNI là loại có khả năng chịu nhiệt trong suốt chu trình phản ứng REMS-PCR. Enzym này hoạt động trong môi trường: pH = 8,3 (50 mmol/l TrisHCl, 100 mmol/l NaCl), 4 mmol/l Mg²⁺, 1 mmol/l DTT. BstNI giữ được hoạt tính đầy đủ sau 15 chu kỳ luân nhiệt và có hoạt tính trung bình sau 30 chu kỳ luân nhiệt. Theo Caroline và CS (2000), enzym BstNI cũng cho kết quả tương tự trong điều kiện môi trường: đệm Stoffel và 10 mmol/l Mg²⁺ hay dung dịch có chứa 50 mmol/l NaCl, 10 mmol/l TrisHCl và 10 mmol MgCl₂, cũng như các dung dịch đệm khác [3].

* *Lựa chọn môi:*

Khi có mặt enzym giới hạn BstNI ngăn chặn sự khuếch đại của gen K-Ras bình thường. Đồng thời tăng cường sự khuếch đại của gen K-Ras có đột biến (do đột biến làm mất vùng giới hạn của enzym BstNI). Ở thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng 3 cặp môi:

+ Cặp môi chẩn đoán 5BKIT và 3K32:

5BKIT 5'-TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT

3K32 5'-CGT CCA CAA AAT GAT TCT GA

Cặp mồi này cho phép khuếch đại 1 đoạn gen có kích thước 80 nu ở exon 1 của gen K-Ras. Sự có mặt của sản phẩm này trong phản ứng PCR chứng tỏ có đột biến.

+ Cặp mồi chứng là 5BK38 và 3K39:

5BK38 5'-GTA CAC ATG AAG CCA TCG TAT A

3K39 5'-CCA CTT GTA CTA GTA TGC CTT AAG

Cho phép khuếch đại một đoạn AND có kích thước 214 nu ở exon 4b của gen K-Ras (đoạn này không chứa vùng nhận biết của enzym BstNI) các sản phẩm này có mặt chứng tỏ phản ứng PCR hoạt động bình thường.

+ Cặp mồi chứng enzym 5BK36 và 3K37:

5BK36 5'-CTA GAA CAG TAG ACA CAA ACC A

3K37 5'-GAT TTT GCA GAA AAC AGA TC

Cho phép khuếch đại 1 đoạn ADN có kích thước 130 nu ở exon 3 của gen K-Ras. Sản phẩm 130 bp chỉ tìm thấy khi enzym BstNI mất hoạt tính.

Sau khi lựa chọn enzym giới hạn và các cặp mồi, tiến hành phản ứng REMS-PCR.

Hỗn hợp phản ứng bao gồm:

THÀNH PHẦN PHẢN ỨNG	SỐ LƯỢNG
- ADN	0,6 µg
- Mồi chuẩn đoán (5BKIT và K32)	40 pmol
- Mồi chứng enzym (5BK36 và BK37)	2 pmol
- Mồi chứng PCR (5BK38 và 3K39)	20 pmol
- DTT (Dithiothreitol)	1 mmol/l
- dNTPs	50 µmol/l
- Mg ²⁺	4 mmol /l
- Taq AND polymerase đã được ủ trước	3 U
- BstNI	40 U
- Đệm PCR (50 mmol/l Tris HCl và 100 mmol/l NaCl; pH = 8,3)	50 µl

Đặt hỗn hợp này trong máy luân nhiệt với chu trình sau:

CHU KỲ	NHIỆT ĐỘ	THỜI GIAN
1	94°C	2 phút
30	58°C	60 giây

	92°C	20 giây
1	4°C	∞

Trước khi thực hiện phản ứng REMS-PCR, chúng tôi thực hiện phản ứng PCR thông thường 30 chu kỳ với hỗn hợp như trên nhưng không có enzym BstNI.

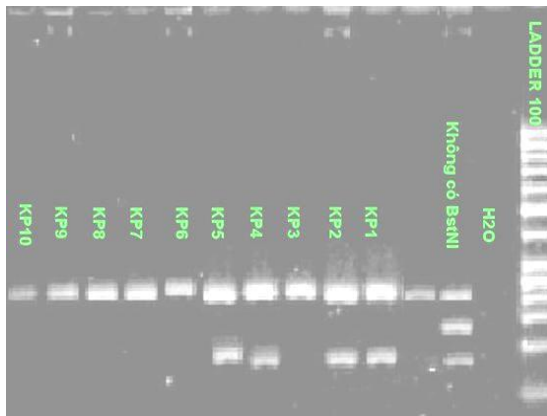
Lấy 5 µl mỗi mẫu phản ứng được điện di trên agarose 2%, nhuộm bằng ethidium bromid 10 mg/ml trong 10 phút, sau đó rửa sạch mẫu chụp ảnh và quan sát trên máy BIO - RAD.

2. Kết quả điện di trên agarose 2%.

Ở nhóm nghiên cứu thấy:

- Xuất hiện sản phẩm có kích thước khoảng 214 bp ở các mẫu, chứng tỏ phản ứng PCR hoạt động tốt.

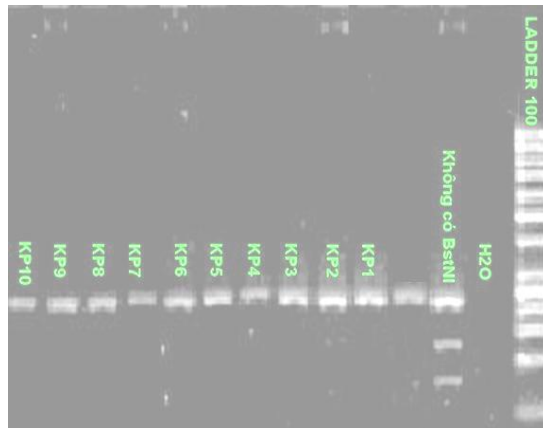
- Không thấy xuất hiện sản phẩm có kích thước khoảng 130 bp, chứng tỏ enzym BstNI giữ hoạt tính trong suốt chu trình nhiệt của phản ứng PCR và ức chế sự nhân lên của tất cả các đoạn có chứa vùng nhận biết bởi BstNI.



Hình 1: Ảnh điện di các mẫu ở nhóm nghiên cứu.

4/10 mẫu xuất hiện sản phẩm có kích thước khoảng 80 bp. Chứng tỏ, 4/10 mẫu đột biến gen K-Ras (1 mẫu ung thư đại tràng, 2 mẫu bệnh ung thư gan, 1 mẫu ung thư đại tràng) và kết quả này phù hợp với Mao L, Hruban RH và CS (1994) [8] đã công bố khoảng 20 - 40% đột biến gen K-Ras tìm thấy trong khối u của người. BstNI hoạt động tốt, nó không nhận ra vùng giới hạn trên gen đột biến và không cắt gen này, làm cho gen đột biến được nhân lên trong khi nó ức chế sự nhân lên của gen bình thường. Theo nghiên cứu của Caroline và CS (2000): giữa dòng tế bào bình thường K652 và dòng tế bào Calu 1 (có chứa đột biến ở codon 12 của gen K-Ras), phản ứng REMS-PCR phát hiện thấy đoạn ADN của Calu 1 với tỷ lệ Calu 1: K562 lần lượt là 1/10, 1/100, 1/1.000, nhưng không thấy ở những mẫu K652 đơn thuần. Điều này có nghĩa, phản ứng REMS-PCR có thể phát hiện đột biến gen K-Ras với hàm lượng rất nhỏ lưu hành trong huyết tương của BN ung thư [3].

Đồng thời, chúng tôi tiến hành quy trình như trên đối với nhóm chứng: hình ảnh điện di cho thấy, tất cả mẫu không xuất hiện sản phẩm có kích thước khoảng 80 bp và 130 bp và đều xuất hiện sản phẩm khoảng 214 bp.



Hình 2: Ảnh điện di các mẫu

ở nhóm chứng âm.

Như vậy, có thể nói ADN đột biến tìm thấy ở huyết tương của một số BN UTĐTH có nguồn gốc từ khối ung thư chứ không phải do tế bào máu sinh ra. Điều này phù hợp với nhiều công bố trước đây của một số tác giả về lưu hành ADN của khối u trong huyết tương BN.

Kết quả này cho thấy hệ thống REMS-PCR kết hợp cặp mồi để khuếch đại cả đoạn chẩn đoán và đoạn chứng, cho phép phân tích trạng thái codon một cách rõ ràng. Hệ thống sử dụng 2 chứng, trong đó, kiểm tra chức năng của ADN polymerase (chứng PCR) và enzym giới hạn (chứng RE). Các mồi chứng PCR có kích thước 214 bp không chứa vùng giới hạn, sự xuất hiện của sản phẩm này cho phép phản ứng PCR hoạt động hiệu quả, sự biến mất của nó cho thấy có thể là âm tính giả. Sản phẩm này có kích thước lớn nhất trong cả 3 đoạn, vì đoạn dài hơn sẽ cho độ nhạy cao hơn và có thể làm chứng cho tất cả các điều kiện PCR.

Đoạn chứng 130 bp luôn chứa vùng giới hạn. Sản phẩm PCR này xuất hiện cho thấy khả năng bị dương tính giả vì mồi chứng RE chỉ nhân lên khi hoạt tính của RE không đảm bảo. Trên kết quả điện di, không mẫu nào xuất hiện sản phẩm có kích thước 130 bp và các sản phẩm có đồng thời kích thước 80 bp, 130 bp. Như vậy, kết quả của chúng tôi thu được là đáng tin cậy.

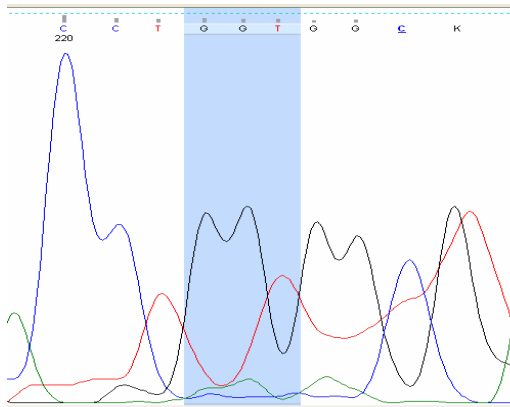
Phản ứng REMS-PCR đã phát hiện được đột biến của gen K-Ras trong bệnh phẩm của một số BN UTĐTH để làm cơ sở có thể ứng dụng phản ứng REMS-PCR phát hiện, chẩn đoán sớm một số UTĐTH.

3. Kết quả đọc trình tự gen.

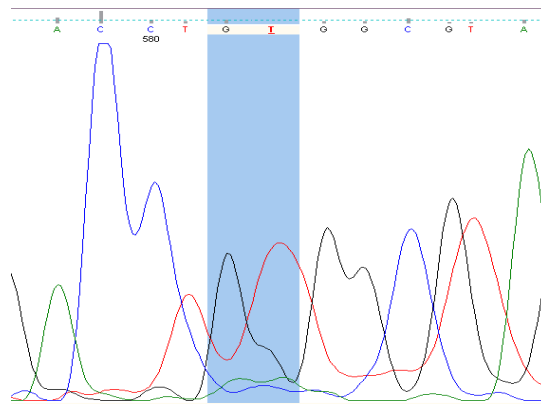
Sau khi điện di phát hiện được 4 mẫu sản phẩm có kích thước khoảng 80 bp. Để khẳng định chắc chắn đó là mẫu đột biến, chúng tôi tiến hành đọc trình tự gen trên máy tự động ABI PRISM® 3130xl Avant Genetic Analyzer.

Kết quả như sau: cả 4 mẫu đều xuất hiện đột biến ở vị trí codon 12 của gen K-Ras. Trong đó, 1 đột biến GGT chuyển thành GT (Kp5), 2 đột biến GGT chuyển thành GAT (Kp1, Kp4), 1

đột biến GGT chuyển thành AGT (Kp3). Như vậy, có thể khẳng định, sản phẩm có kích thước 80 bp là sản phẩm đột biến và những đột biến này xuất hiện ở codon 12 của gen K-Ras.



Gen đột biến (GT)



Gen bình thường (GGT)

Song song với đọc trình tự gen của 4 gen đột biến, chúng tôi cũng đọc trình tự gen của 6 mẫu còn lại và kết quả không có mẫu nào xuất hiện đột biến gen K-Ras. Chứng tỏ, kết quả phát hiện đột biến gen K-Ras trên agarose 2% hoàn toàn phù hợp với kết quả phát hiện đột biến khi đọc trình tự gen. Theo Caroline và CS (2000) phản ứng REMS-PCR có độ nhanh, nhạy, đặc hiệu cao và ổn định để phát hiện đột biến gen K-Ras trong huyết tương ở các mẫu lâm sàng khác nhau [3].

Điều này phù hợp với nghiên cứu của Livathedor và CS về ung thư đại tràng 24% đột biến xuất hiện ở codon 12 của gen K-Ras. Với ung thư tụy, tỷ lệ này > 90%. Nhiều nghiên cứu khác cho thấy K-Ras đột biến có mặt trong các hạch lympho khu trú hoặc máu ngoại vi của BN mắc bệnh ung thư đại tràng chỉ ra các cá thể đó hầu hết có khả năng tái phát [6, 7].

KẾT LUẬN

1. Xây dựng được quy trình phản ứng REMS-PCR nhằm phát hiện đột biến gen K- Ras trong huyết tương của một số BN UTĐTH.

2. Qua phân tích, phát hiện 4/10 mẫu có đột biến gen K-Ras ở vị trí codon 12.

3. Kết quả này cho thấy, có khả năng ứng dụng phản ứng REMS-PCR để sàng lọc, chẩn đoán sớm, phục vụ tiên lượng điều trị BN UTĐTH thông qua xét nghiệm máu ngoại vi với giá thành thấp, ít nguy cơ ngoại nhiễm và phù hợp khi sử dụng tại các labô xét nghiệm thường quy.

4. Để tăng thêm độ tin cậy của kỹ thuật REMS-PCR, cần tiến hành nghiên cứu với số lượng mẫu lớn hơn nhằm xác định tần suất xuất hiện đột biến gen K-Ras ở từng loại ung thư cụ thể, cũng như trong các giai đoạn bệnh khác nhau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Nguyễn Thế Dân và CS.* Giải phẫu bệnh đại cương. NXB Quân đội Nhân dân. 2006.
2. *Phạm Thùy Liên.* Tình hình ung thư ở Việt Nam và cách phòng chống. Đặc san khoa học kỹ thuật. Trung tâm U bướu TP.Hồ Chí Minh. tr.74-85.
3. *Carolyn J. Fuery et al.* Detection of rate mutain allens by restriction endonulease-mediated selective-PCR. Assay desigen and opitimization. Clinical chemistry 46. 2000, Vol 5, pp.620-624.
4. *David S. Goodsell.* Physician Education. The molecular perspective: the ras oncogenne. The Oncologist. 2000, Vol 4, No 3, pp.263-264.
5. *Irby et al.* Activating SRC mutation in a subset of advanced human colol cancers. Nature Genes. 2000, Vol 21, pp.187-190.
6. *Kwok S, Kellogg DE, McKinney N, Spasic D, Goda L, Levenson C, Sninsky JJ.* Effects of primer - template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type1 model studies. Nucleic Acids Res. 1999, 18, pp.999-1005.
7. *Liviatheodor et al.* Diagnostic value of K-Ras mutation in serum of pancreatic cancer patients.
8. *Mao L, Hruban RH et al.* Detection of oncogen mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. Cancer Res. 1994, 54, pp.1634-1637.
9. *Roberts RJ, Vincze T, Posfai J, Macelis D.* REBASE- enzymes and genes for DNA restriction and modification. Nucleic Acids Res. 35 (Database issue): 2007, D269-70.
10. *Roberts NJ, Impey HI et al.* Rapid, sensitive detection of mutant alleles in codon 12 of K-Ras by REMS-PCR. Biotechniques. 1999, 27, pp.418-420.