

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01157

肺癌噬菌体展示肽库的构建及肺癌早期检测分子标志的筛选

赵晋丰¹, 吴玲玲¹, 常文军¹, 黄盛东², 余永伟³, 赵立军⁴, 陈祎佳¹, 曹广文^{1*}

1. 第二军医大学卫生勤务学系流行病学教研室, 上海 200433

2. 第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433

3. 第二军医大学长海医院病理科, 上海 200433

4. 第二军医大学长海医院呼吸内科, 上海 200433

[摘要] 目的: 构建肺癌噬菌体展示肽库, 筛选出肺癌早期检测的分子标志群。方法: 取30例第二军医大学长海医院手术后立即冻存的肺癌组织标本构建肺癌噬菌体展示肽库; 用结合 protein-A/G 的琼脂糖珠分别富集肺癌组及非肿瘤对照组血浆中的抗体进行5轮亲和筛选, 富集肺癌特异性的相关肽; 随机挑取5轮筛选后的500个噬菌体克隆, 用ELISA法进一步筛选肺癌/对照D比值大于2.0的肺癌特异标志物克隆, 进行基因序列测定和蛋白功能预测。结果: (1) 该噬菌体展示肽库的滴度为 3.0×10^6 pfu, 库容 9.0×10^6 pfu, 随机挑选20个噬菌体经PCR鉴定其重组率为60%。(2) 共筛选出19个有意义的噬菌体, 测序后, 预测其蛋白质功能, 9个与癌症相关, 8个功能未知, 2个与癌症不相关。结论: 筛选出的噬菌体克隆所表达的抗原很可能是早期诊断肺癌的标志物。

[关键词] 噬菌体展示肽库; 肺肿瘤; 分子标志

[中图分类号] R 734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2008)10-1157-05

Screening for molecular markers for early diagnosis of lung cancer by bacteriophage display

ZHAO Jin-feng¹, WU Ling-ling¹, CHANG Wen-jun¹, HUANG Sheng-dong², YU Yong-wei³, ZHAO Li-jun⁴, CHEN Yi-jia¹, CAO Guang-wen^{1*}

1. Department of Epidemiology, Faculty of Health Service, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

3. Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

4. Department of Respiratory Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a lung cancer phage-peptide library and to screen for biomarkers for early detection of lung cancer. **Methods:** A phage display library was constructed using 30 lung-cancer tissue samples from Changhai Hospital. Protein-A/G agarose was used to enrich IgG from control sera as well as lung cancer sera. Five biopannings were carried out for enrichment of lung cancer-specific phage clones. Five hundred phage clones were randomly selected, those with $D > 2.0$ (lung cancer plasma pool *v. s.* control plasma pool) were selected for DNA sequencing and protein prediction. **Results:** (1) The recombination rate of the phage library was 60%, with the average phage titer being 3.0×10^6 pfu and a volume being 9.0×10^6 pfu. (2) Of 19 phage colonies selected by ELISA and sequenced, 9 were cancer-related genes, 8 with unknown function, and 2 were not related to cancer. **Conclusion:** The screened genes in the phage colonies might serve as biomarkers for the early diagnosis of lung cancer.

[KEY WORDS] phage-peptide library; lung neoplasms; biomarker

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(10):1157-1161]

肺癌是我国目前发病率最高的恶性肿瘤之一, 其发病隐匿, 病死率高。导致肺癌高病死率的重要原因是在肺癌诊断时, 有大于75%的患者已经发展

到Ⅲ或Ⅳ期, 失去治疗时机^[1]。因此早期诊断肺癌具有非常重要的意义。很多相关研究不断见诸报道, 如痰细胞和胸部X线造影检查^[2]、荧光支气管镜

[收稿日期] 2008-04-02 **[接受日期]** 2008-05-20

[基金项目] 上海市登山计划重大课题(06DZ19503), Supported by Mountain Climbing Project of Shanghai Municipality(06DZ19503).

[作者简介] 赵晋丰, 硕士, E-mail: zjf0605@126.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25070240, E-mail: gcao@smmu.edu.cn

检查^[3]、PCR 技术^[4]、CT^[5]、支气管活检^[6]等。这些方法或者只能在肺癌组织足够大的情况下才能检出,或者依赖于相应设备完成、成本高,或者会给患者造成痛苦,难以用于普查。因此寻找肺癌标志物成了学者们竞相研究的热点。CEA、NSE、C19-9、CA125 等是目前常用的单一标志物,没有足够的特异性和敏感性,也不能准确地筛查早期肺癌。有学者陆续发现癌症患者体内能够产生针对自身肿瘤的自身抗体^[7-9],具有潜在的诊断价值^[10-11]。例如抗 p53 的自身抗体能够检测出 30%~40% 的不同类型的癌症患者。应用噬菌体展示肽技术筛选乳腺癌和前列腺癌特异抗原的研究已有报道^[12-13]。

本研究利用噬菌体展示肽技术,建立了肺癌噬菌体展示肽库,筛选可以与肺癌患者抗原结合的自身抗体,以期为肺癌的早期诊断寻找突破口。

1 材料和方法

1.1 肺癌标本的选取 从 2002 年 3 月到 2007 年 7 月共收集到 30 例肺癌新鲜冷冻手术切除组织、85 例肺癌患者的血样本及 115 例非癌症患者对照血样本。本课题经过长海医院伦理委员会批准,所有的采样患者均签署知情同意书。组织标本在手术后立即取下并经过病理验证组织类型,保存于液氮中。对照组的血液标本患者证实不含有任何类型的癌症。所有的肺癌血液标本均是在手术前取得,新诊断的肺癌患者之前没有经过相关治疗。

1.2 肺癌组织噬菌体展示肽库的构建 用传统的 TRIzol 方法分别抽取 30 例冻存的肺癌组织标本的总 RNA,并经过紫外分光光度计定量和琼脂糖凝胶电泳证实其完整性,选取的肺癌组织标本患者信息见表 1。

表 1 建库所用组织标本特征

Tab 1 Fresh samples of lung cancer for library construction

Sample ID	Age(year)	Gender	Pathology
463667	40	M	Adenocarcinoma; bronchioloalveolar carcinoma
462306	56	M	Moderately differentiated adenocarcinoma
460594	62	M	Moderately differentiated adenocarcinoma
474446	55	F	Bronchioloalveolar carcinoma
467079	67	M	Moderately differentiated adenocarcinoma; bronchioloalveolar carcinoma
462010	57	M	Bronchioloalveolar carcinoma
461285	69	M	Moderately differentiated squamous cancer
164546	73	M	Adenocarcinoma
465176	66	M	Moderately differentiated squamous cancer
453998	53	M	Poorly differentiated squamous cancer
483936	79	M	Adenocarcinoma
496467	54	M	Moderately differentiated squamous cancer
495688	79	M	Moderately differentiated squamous cancer
495578	39	M	Bronchioloalveolar carcinoma
452163	73	M	Squamous cancer
452322	46	M	Squamous cancer
498499	55	M	Squamous cancer
576996	58	F	Bronchioloalveolar carcinoma
578346	78	M	Squamous cancer
579167	74	M	Well differentiated squamous cancer
578863	72	F	Adenocarcinoma
578585	52	F	Moderately differentiated adenocarcinoma
361344	54	M	Squamous cancer
549510	68	M	Moderately differentiated squamous cancer
550356	38	F	Small cell carcinoma
578223	60	F	Large cell carcinoma
467375	58	M	Squamous cancer
462058	68	F	Moderately differentiated adenocarcinoma
453705	45	M	Well differentiated adenocarcinoma
458085	51	F	Bronchioloalveolar carcinoma

根据 D_{260} 值定量,我们将 30 例肺癌组织的总 RNA 等量混合后,用 mRNA 提取试剂盒 (Pro-

mega) 利用结合 poly(A) 的磁珠提取 mRNA,并经过紫外分光光度计定量和琼脂糖凝胶电泳证实其完

整性。mRNA 用 OrientExpression cDNA (Novagen) 和 Cloning System (Novagen) 两个试剂盒经逆转录、末端平齐、加接头、双酶切、连接入载体 T7 噬菌体的双臂, 克隆位点是其壳蛋白 103B, 再进行体外包装成功构建成肺癌噬菌体展示肽库。为了能更好地扩增 N 端和 C 端的氨基酸, 我们使用了随机引物作为逆转录的引物。取 2 ml 分装一管, 加入 0.2 体积的 80% 甘油分别保存与 -80°C 和 4°C 冰箱。

1.3 展示肽库的扩增 取 20 ml 加了羧苄青霉素的 LB 于的消毒玻璃瓶中, 用接种环挑取一个新划线含羧苄青霉素的 LB 板上的 BLT5403 的单克隆菌落, 于 37°C 、220 r/min 摇 4~6 h, 使菌液的 D 值达 0.6~1.0。取 100 μl 的噬菌体库原液、新摇好的菌液 5 ml、预热并保温在 55°C 的顶层琼脂 5 ml 于一 15 ml 消毒的管中, 快速混匀并快速倾倒入保温 37°C 的含羧苄青霉素 LB 板中, 铺平, 待冷却后置于 37°C 温箱孵育 4 h 或室温过夜。加入 10 ml 的 SM, 4°C 放置 2 h 以上, 吸取上层的液体于 15 ml 消毒管中, 加入 0.5 ml 的氯仿颠倒混匀后 3 000 r/min, 5 min。吸取上清于两新管中, 加入 80% 的甘油, 扩增的噬菌体分别保存于 -80°C 和 4°C 。

1.4 肺癌特异性相关肽的富集 为了富集可以与肺癌自身抗体结合的特异展示肽, 我们进行了正反向的 5 轮亲和和筛选。取 10 μl protein-A/G 的琼脂糖珠于 1.5 ml Eppendorf 管中, pH 7.4 的 $1 \times$ PBS 洗 2 次, 1% BSA 4°C 封闭 1 h。琼脂糖珠分别与 15 μl 肺癌患者及对照患者的血浆 4°C 孵育过夜。 $1 \times$ PBS 洗涤 3 次后, 用 10 μl 的 $1 \times$ PBS 溶解富集到的抗体。10 管肺癌的抗体及 10 管非肺癌的抗体各自合并成一管。取噬菌体库扩增液 20 μl , 先与 20 μl 的非肺癌抗体孵育 1 h, 未结合的上清再与 20 μl 肺癌抗体结合, 保留结合到琼脂糖珠上的噬菌体, 并洗脱至 100 μl 扩增。此为 1 轮筛选, 如此反复 5 轮。

1.5 肺癌特异标志物的筛选 为了找到明确的并且可以在临床实际应用的肺癌特异标志物, 我们随机挑取了 5 轮筛选后的 500 个噬菌体克隆用 ELISA 的方法, 进行了进一步的筛选。

1:1 000 稀释的 T7 tailer 抗体 (Novagen) 包被于 96 孔酶标板, 4°C 过夜, 经洗涤后, 200 μl 2% BSA/PBS 室温封闭 2 h, 加入 1:5 稀释的噬菌体样本 100 μl 室温孵育 2 h。洗涤后每个噬菌体标本加入 1:500 稀释的 10 管肺癌混合后的血浆和对照血浆各 100 μl , 室温孵育 1 h。洗涤后加入 1:10 000 稀释的 HRP 偶联的山羊抗人 IgG 100 μl , 室温放置

1 h。洗涤后加入显色剂 A、B (上海科华生物技术公司) 各 1 滴, 37°C 孵育 20 min, 立即加入 1.5 mol/L 的硫酸 25 μl , 在酶标仪下 450 nm 波长处读取 D 值。每次设 2 孔没有插入片段的噬菌体作为阴性对照, 并设 2 孔空白对照, 不加血浆。按下列公式计算并判断结果: 用空白孔调零后, 样品 D 值/阴性对照平均 D 值, 比值 ≥ 2.0 , 判断为阳性; 样品 D 值/阴性对照平均 D 值, 比值 < 2.0 , 判断为阴性。阴性对照 D 值低于 0.05 作 0.05 计算, 高于 0.05 按实际 D 值计算。肺癌组为阳性、非肺癌为阴性的噬菌体即为有意义的、具有诊断肺癌潜能的样本。

1.6 序列测定和蛋白功能预测 ELISA 筛选出的噬菌体克隆, 其插入片段经 PCR 后, 进行核酸序列测定。经过 NCBI 上的 Blast 序列比对找到完全一致或者最接近的已知基因序列, 如果是已知基因查阅文献看是否已有研究与癌症相关, 如果是不相关或者是没有研究过的基因则通过 String 和 Chilibot 等网站查找这些已知基因的功能来推测我们获得的基因是否与癌症相关。

2 结果

所建的肺癌噬菌体展示肽库的滴度为 3.0×10^6 pfu, 库容量为 9.0×10^6 pfu。噬菌斑的形成情况见图 1。随机挑取 20 个噬菌斑经 PCR 扩增并琼脂糖凝胶电泳鉴定该展示肽库的重组率为 60%, 滴度 3.0×10^9 pfu、库容 9.0×10^9 pfu。5 轮富集的滴度变化依次为: 1.5×10^{11} 、 4.3×10^{12} 、 1.12×10^{12} 、 8.3×10^{14} 、 3.24×10^{16} pfu。

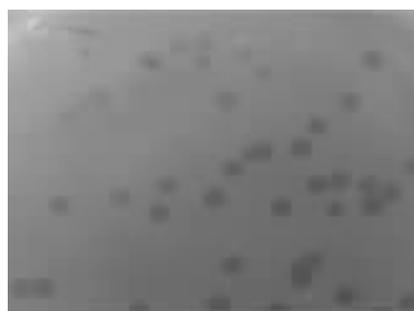


图 1 原始的噬菌斑

Fig 1 Phages of primary library

经过 500 个克隆的筛选, 我们共筛选出 19 个有意义的样本, 结果见表 2。经过 PCR 鉴定均为有插入片段的噬菌体, 其插入片段大小及功能预测是否与癌症相关见表 3。其中, 354 号样本为调控 p53 去磷酸化的基因; 322 号、91 号为未知基因; 318 号、310 号、369 号为相同的基因。

表 2 筛选阳性的噬菌体样本 ELISA 结果

Tab 2 Results of ELISA for positive phages

Group	Sample ID									
	42	72	91	96	151	252	286	290	306	310
D G1*	0.125	0.111	0.143	0.115	0.106	0.115	0.207	0.169	0.116	0.200
D G2**	0.078	0.064	0.088	0.052	0.05	0.099	0.114	0.126	0.076	0.115
D G3***	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.135	0.156	0.10	0.135

Group	Sample ID									
	318	319	322	336	354	357	365	369	378	475
D G1*	0.149	0.103	0.142	0.103	0.116	0.137	0.121	0.117	0.118	0.129
D G2**	0.047	0.002	0.003	0.076	0.064	0.092	0.090	0.056	0.034	0.097
D G3***	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10

* Lung cancer group; ** Control group; *** Double D of negative control

表 3 筛选阳性的噬菌体的基因特征

Tab 3 The characteristics of genes selected by ELISA

Phage number	Fragment size	Site in chromosome	Gene name	Related to cancer
354	233	7q11.1	CDC14B	Yes
151	115	11q14	Novel	Unknown
96	265	6q23	EYA4	Yes
91	123		Novel	Unknown
42	94	14q32.33	IGHG1	Yes
318	213	1p36.1	DDOST	Yes
310	213	1p36.1	DDOST	Yes
369	213	1p36.1	DDOST	Yes
322	267		Novel	Unknown
357	59	19	Novel	Unknown
72	212	6p21.3	NR_001318.1	No
252	65	19q12	UQCRFS1	Yes
378	121	11q14	Novel	Unknown
289	214		Novel	Unknown
336	265	6q13	LOC653194	No
286	144	1q21	Novel	Unknown
365	115	11q14	Novel	Unknown
290	160	9q34	OLFM1	Yes
306	51	20q13.1	NCOA3	Yes

3 讨论

我们每次试验都设了阴性质控,反映噬菌体样本表达的抗原与血浆中抗体结合强度的 D 值大于阴性质控 D 值的 2 倍作为结果阳性,这也是常规的 ELISA 的结果判定标准。我们筛选出的 19 个噬菌体样本作为抗原,与肺癌组混合血浆中抗体结合阳性、对照组混合抗体结合阴性,因而这些抗原在肺癌组的表达要高于对照组。测序后进行蛋白功能预测,354 号样本为调控 p53 去磷酸化的基因,而 p53 是公认的各种癌症包括肺癌相关的基因;还有 3 个噬菌体样本为相同的样本,是 DDOST 这个蛋白 5'端的一段基因,而这一区域的高甲基化是该基因在很多肿瘤细胞系(包括肺癌)不表达的原因,该基因很可能是一个抑癌基因^[14];322 号、96 号为未知

功能的新基因,很可能就是可以诊断早期肺癌的标志;说明我们筛选的整体效果较好。ELISA 方法操作比较常规,对患者无创,完全可以在临床试用,具有很大的潜在应用价值。但是很多早期认为是癌症患者分子标志的抗体在后面的大样本筛查中特异性不够,与非癌症患者存在交叉反应^[1],而且我们在筛选中使用的是两组人群的混合血浆,具体到每一例肺癌患者还存在着个体差异,因而我们筛查出的肺癌特异性标志还需要在后面的研究中用大量的血样本进行验证,实际应用到临床检查还需要很长的路要走。

[参考文献]

- [1] Hirsch F R, Franklin W A, Gazdar A F, Bunn P A. Early detection of lung cancer: clinical perspectives of recent advances in biology and radiology[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7: 5-22.
- [2] Yeh C, Wang J F, Wu M T, Yen C W, Nagurka M L, Lin C L. A comparative study for 2D and 3D computer-aided diagnosis methods for solitary pulmonary nodules[J]. Comp Med Imaging Graph, 2008, 32: 272-276.
- [3] Keith R L, Miller Y E, Gemmill R M, Drabkin H A, Dempsey E C, Kennedy T C, et al. Angiogenic squamous dysplasia in bronchi of individuals at high risk for lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6: 1616-1625.
- [4] Mao L, Hruban R H, Boyle J O, Tockman M, Sidransky D. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer[J]. Cancer Res, 1994, 54: 1634-1637.
- [5] Aberle D R, Kathleen B. Lung cancer screening with CT[J]. Clin Chest Med, 2008, 29: 1-14.
- [6] Palcic B, Lam S, Hung J, MacAulay C. Detection and localization of early lung cancer by imaging techniques[J]. Chest, 1991, 99: 742-743.
- [7] Kalniņa Z, Siliņa K, Meistere I, Zayakin P, Rivosh A, Abols A, et al. Evaluation of T7 and lambda phage display systems for survey of autoantibody profiles in cancer patients[J]. J Immunol Methods, 2008, 334: 37-50.
- [8] Chen Y T, Gure A O, Tsang S, Stockert E, Jäger E, Knuth A, et al. Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 6919-6923.

- [9] Stockert E, Jager E, Chen Y T, Scanlan M J, Gout I, Karbach J, et al. A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens[J]. J Exp Med, 1998, 187; 1349-1354.
- [10] Brichory F M, Misek D E, Yim A M, Krause M C, Giordano T J, Beer D G, et al. An immune response manifested by the common occurrence of annexins I and II autoantibodies and high circulating levels of IL-6 in lung cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98; 9824-9829.
- [11] Minenkova O, Pucci A, Pavoni E, De Tomassi A, Fortugno P, Gargano N, et al. Identification of tumor-associated antigens by screening phage-displayed human cDNA libraries with sera from tumor patients[J]. Int J Cancer, 2003, 106; 534-544.
- [12] Fernandez-Madrid F, Tang N, Alansari H, Granda J L, Tait L, Amirikia K C, et al. Autoantibodies to annexin XI-A and other autoantigens in the diagnosis of breast cancer[J]. Cancer Res, 2004, 64; 5089-5096.
- [13] Wang X J, Yu J J, Arun S K, Varambally S, Shen R, Giacherio D, et al. Autoantibody signatures in prostate cancer[J]. New Engl J Med, 2005, 353; 1224-1235.
- [14] MacGrogan D, Levy A, Bova G S, Isaacs W B, Bookstein R. Structure and methylation-associated silencing of a gene within a homozygously deleted region of human chromosome band 8p22[J]. Genomics, 1996, 35; 55-65.

[本文编辑] 孙 岩

• 读者 作者 编者 •

中草药名称中文、拉丁文及英文对照表(五)

汉语拼音名	中文名	拉丁名	英文名
Daokoucao	倒扣草	<i>Herba Achyranthis Asperae</i>	Common Achyranthes Herb
Dapowanhuahua	打破碗花花	<i>Herba Anemone Hupshensis</i>	Hupsh Anemone Herb
Daqingcao	大青草	<i>Herba Hygrophilae Solitifoliae</i>	Willowleaf Hygrophila Herb
Daqingyan	大青盐	<i>Halitum</i>	Halite
Daqingye	大青叶	<i>Folium Indigo</i>	Indigowood Leaf
Dasuan	大蒜	<i>Bulbus Allii</i>	Garlic
Dawanhua	打碗花	<i>Rhizoma Cynoglossi</i>	Ivy Glorybind Rhizome
Daxuetang	大血藤	<i>Caulis Sargentodoxae</i>	Sargentgloryvine Stem
Dayeanye	大叶按叶	<i>Folium Eucalypti Robustum</i>	Swamp Mahogany Leaf
Daysinbuhuan	大叶金不换	<i>Herba Polygonae Chinensis</i>	Chinese Milkwort Herb
Dayexiaobo	大叶小檗	<i>Radix Berberidis Amurensis</i>	Amur Barberrry Root
Dayezizhu	大叶紫珠	<i>Folium Callicarpae Macrophyllae</i>	Bigleaf Beautyberry Leaf
Dazao	大枣	<i>Fructus Jujubae</i>	Chinese Date
Denglongcao	灯盏草	<i>Fructus seu Herba Physalis Pubescentis</i>	Downy Groundcherry Fruit or Herb
Dengtaiye	灯台叶	<i>Folium Alstoniae Scholaris</i>	Common Alstonia Leaf
Dengxincao	灯心草	<i>Medulla Junci</i>	Rush
Diandimai	点地梅	<i>Herba Androsaces Umbellatae</i>	Umbellate Rockjasmine Herb
Dianjiecao	颠茄草	<i>Herba Belladonnae</i>	Belladonna Herb
Dibaizhi	地柏枝	<i>Herba Selaginellae Moellendorffii</i>	Moellendorff's Spidemoss Herb
Diburong	地不容	<i>Radix Stephaniae Epigraeae</i>	Epigeal Stephania Root
Didantou	地胆头	<i>Herba Elephantopus</i>	Scabrous Elephantfoot Herb
Didingcao	地丁草	<i>Herba Corydalis Bungeanae</i>	Bunge Corydalis Herb
Difuzi	地肤子	<i>Fructus Kochiae</i>	Belvedere Fruit
Digupi	低骨皮	<i>Cortex Lycii</i>	Chinese Wolfberry Root-bark
Dihuang	地黄	<i>Radix Rehmanniae</i>	Rehmannia Root
Dijiao	地椒	<i>Herba Thymi</i>	Mongolian Thyme Herb
Dijncao	地锦草	<i>Herba Euphorbiae Humifusae</i>	Humifuse Euphorbia Herb
Dilong	地龙	<i>Lumbricus</i>	Earthworm
Dingchuangcao	厅筒草	<i>Herba Scutellariae Indicae</i>	Indian Skullcap Herb
Dingxiang	丁香	<i>Flos Syzygii Aromatici</i>	Flos Caryophyllata
Dinie	地捏	<i>Herba Melastomatis Dodecandri</i>	Twelvestamen Melastoma Herb
Dishilu	地石榴	<i>Caulis Fici Tikouae</i>	Digua Fig Stem
Ditachua	地桃花	<i>Radix Uvae Ursae</i>	Rose Mallow Root
Diyu	地榆	<i>Radix Sargoliarbae</i>	Garden Burnet Root
Dongcongxiacao	冬虫夏草	<i>Cordyceps</i>	Chinese Caterpillar Fungus
Dongfengcai	东风菜	<i>Rhizoma et Radix Doellingeriae</i>	Scabrous Doellingeria Rhizome and Root