

学校编码: 10384
学号: 32320131153381

分类号____密级
UDC

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

ENO1 在神经胶质瘤细胞系中的功能及机制

The function and mechanism of *ENO1* in glioma cell model

李芳芳

指导教师姓名: 曾骥孟教授

专 业 名 称: 化学生物学

论文提交日期: 2016 年 5 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期:

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2016 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要	I
Abstract	II
第一章 前言.....	1
1.1 神经胶质瘤概述.....	1
1.1.1 神经胶质瘤概述	1
1.2 WBP2 在肿瘤中的研究简介.....	2
1.2.1 WBP2 概述	2
1.2.2 WBP2 研究现状	2
1.3 ENO1 研究概述	4
1.3.1 ENO1 研究概述	4
1.3.2 ENO1 的功能及与疾病的关系概述	6
1.4 研究的目的是和意义	10
1.4.1 研究的目的与意义	10
第二章 材料与amp;方法	11
2.1 材料	11
2.1.1 细胞株、质粒、siRNA 与引物.....	11
2.1.2 主要试剂	11
2.1.3 主要仪器	12
2.2 方法	13
2.2.1 常用试剂配置	13
2.2.2 RNA 提取.....	16
2.2.3 以 RNA 为模板进行 cDNA 第一链合成	16
2.2.4 扩增 ENO1 CDS 区片段	17
2.2.5 琼脂糖凝胶电泳	18
2.2.6 凝胶回收 PCR 目的产物.....	18
2.2.7 感受态细胞制备	19
2.2.8 载体连接反应	19
2.2.9 转化	20

2.2.10 抗生素平板筛选阳性克隆	20
2.2.11 菌液 PCR 验证阳性克隆	20
2.2.12 菌种保存	21
2.2.13 质粒小提	21
2.2.14 双酶切	22
2.2.15 胶回收双酶切后目的片段	22
2.2.16 靶基因与表达载体连接	22
2.2.17 再次转化与扩增	23
2.2.18 重组蛋白诱导表达	23
2.2.19 重组蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳及考马斯亮蓝染色	24
2.2.20 GST 标签 WBP2 融合蛋白纯化（实验室已构建好质粒）	24
2.2.21 his 标签 ENO1 融合蛋白纯化	24
2.2.22 重组蛋白纯化检测	25
2.2.23 细胞培养	25
2.2.24 细胞总蛋白提取	25
2.2.25 GST-pull down 实验	26
2.2.26 银染	26
2.2.27 质粒中提	27
2.2.28 DNA 转染 U251 细胞	28
2.2.29 siRNA 稀释	28
2.2.30 siRNA 转染 U251 细胞	28
2.2.31 G418 筛选稳定转染细胞系	29
2.2.32 细胞冻存	29
2.2.33 细胞复苏	30
2.2.34 Western-blot	30
2.2.35 荧光定量 PCR	31
2.2.36 细胞周期检测	32
2.2.37 划痕检测	33
2.2.38 Transwell 检测	33
2.2.39 MTT	34
2.2.40 细胞凋亡	34
2.3 数据统计	35

2.4 本文的研究思路.....	36
第三章 结果分析与讨论.....	37
3.1 Pull-down/MS 发现潜在相互作用蛋白质.....	37
3.2 体外克隆、表达并纯化 ENO1.....	39
3.3 ENO1 能够与 WBP2 在体外结合及 WBP2 对 ENO1 的影响.....	41
3.4 干扰 <i>ENO1</i> 后对细胞增殖、迁移的影响.....	44
3.5 干扰 <i>ENO1</i> 后, 对细胞周期和细胞凋亡的影响.....	47
3.6 在过表达 <i>WBP2</i> 的 U251 细胞中下调 <i>ENO1</i> 对增殖和迁移的影响.....	49
3.7 <i>ENO1</i> 对神经胶质瘤细胞增殖、迁移、凋亡影响的分子机制.....	52
第四章 总结和展望.....	53
4.1 总结.....	53
4.2 展望.....	53
参考文献:.....	55
致谢.....	60
硕士期间参与的研究项目和成果.....	62

Table of contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract	II
Chapter I Intriduction.....	1
1.1 Bacground of Glioma.....	1
1.1.1 Bacground of Glioma.....	1
1.2 Introduction of <i>WBP2</i> in tumor research.....	2
1.2.1 Background of <i>WBP2</i>	2
1.2.2 Research status of <i>WBP2</i>	2
1.3 Introduction of <i>ENO1</i>	4
1.3.1 Bacground of <i>ENO1</i>	4
1.3.2 <i>ENO1</i> fuction and its relationship with disaases	6
1.4 The purpose and significance of this research	10
1.4.1 purpose and significance.....	10
Chapter II Materials and Methods.....	11
2.1 Materials.....	11
2.1.1 cell lines plasmid siRNA and primer.....	11
2.1.2 Main reagents.....	11
2.1.3 Main equipments.....	12
2.2 Methods	13
2.2.1 Allocation of reagents	13
2.2.2 RNA extraction	15
2.2.3 cDNA cynthesis	16
2.2.4 AmplificationCDS region of <i>ENO1</i>	17
2.2.5 Agarose gel electrophoresis	18
2.2.6 Recycling purpose of PCR product	18
2.2.7 The preparation of competent cell	19
2.2.8 Ligation reaction	19

2.2.9 Transfection	19
2.2.10 Screening positive clones.....	20
2.2.11 PCR reverification of positive clones	20
2.2.12 Bacteria presvering	21
2.2.13 Plasmid extraction.....	21
2.2.14 Dual-digestion.....	22
2.2.15 Gel extraction.....	22
2.2.16 Ligation of expression plasmid and purpose sequence.....	22
2.2.17 Retransfection and amplification of bacteria	23
2.2.18 Induction and expression of recombinant protein.....	23
2.2.19 SDS-PAGE and Coomassie brilliant blue staining.....	24
2.2.20 WBP2 protein purification.....	24
2.2.21 ENO1 protein purification	24
2.2.22 Validation recombinant protein	25
2.2.23 Cell culture.....	25
2.2.24 Cell protein extraction	25
2.2.25 GST-pull down assay.....	26
2.2.26 Silver stain	26
2.2.27 medi amount of plasmid extraction	27
2.2.28 DNA transfection U251 cells.....	28
2.2.29 siRNA dilution.....	28
2.2.30 siRNA transfection U251 cells	28
2.2.31 Screening of stable transfection cell line	29
2.2.32 Cells cryopreserved.....	29
2.2.33 Cell recovery	30
2.2.34 Western-blot.....	30
2.2.35 Fluorescence quantitative PCR.....	31
2.2.36 The cell cycle detection	32
2.2.37 Scratch test.....	33
2.2.38 Transwell	34
2.2.39 MTT	34
2.2.40 Apoptosis.....	35

2.3 Data statistics	35
2.4 Flow diagram of research	36
Chapter III Results Analysis and Discussion.....	37
3.1 Pull-down/MS show potential interactions.....	37
3.2 Cloning, expression and purification of ENO1 In vitro.....	39
3.3 ENO1 interact with WBP2 and the expression level infulenced by <i>WBP2</i> ...	41
3.4 Cell proliferationand migration ability decreased when knockdown <i>ENO1</i> ..	44
3.5 The influence of <i>ENO1</i> on cell cycle and cell apoptosis	47
3.6 Cell proliferation and migration ability when knock down <i>ENO1</i> in <i>WBP2</i> overexpressed U251 cell line.....	49
3.7 The molecular mechanisms	52
Chapter IV Conclusion and prospect	54
4.1 Conclusion.....	54
4.2 Prospect	54
Reference	57
Acknowledgement.....	62
Projects and achievements Acknowledgement.....	64

摘要

神经胶质瘤是一种发生在脑和脊髓的胶质细胞癌变的肿瘤。胶质瘤占脑和中枢系统肿瘤的30%，占脑恶性肿瘤的80%，年发病率约为3-8人/10万人口。ENO1是糖酵解中催化磷酸烯醇式丙酮酸和磷酸甘油酸相互转化的限速酶，在多种肿瘤中，*ENO1*表达水平上调。

本研究通过对以 WBP2 为诱饵的 pull-down/MS 结果分析得到 ENO1 为可能与 WBP2 相互作用的蛋白质。体外表达并纯化了 ENO1 蛋白质，并通过 Pull-down 实验证实了 ENO1 和 WBP2 间存在相互作用，即二者能够在体外结合。在过表达 WBP2 的神经胶质细胞瘤 U251 细胞系中，*ENO1* 的 mRNA 水平亦升高，而 ENO1 的蛋白质也升高。在 WBP2 表达下调的神经胶质细胞瘤 U251 细胞系中，*ENO1* 的 mRNA 水平亦降低，ENO1 的蛋白质也降低。MTT、Transwell、划痕实验结果表明在 *ENO1* 表达下调的情况下，神经胶质瘤细胞系 U251 的增殖、侵袭和迁移能力均降低。流式细胞仪分析表明，在下调 *ENO1* 表达的情况下，处于 G1 期的细胞数量增多，S 期及 G2/M 期细胞数量均减少。DAPI 和 Annexin-V 双染的细胞凋亡检测表明在 *ENO1* 表达下调的情况下，晚期凋亡的细胞数目增多，坏死细胞数量亦明显上升，而活细胞数目减少，说明 *ENO1* 表达水平下调能够促进 U251 细胞凋亡。

在下调 *ENO1* 的蛋白表达水平后，迁移相关蛋白 N-cadherin 表达量降低，而 E-cadherin 表达量上调。而细胞信号通路蛋白 Erk1/2、p38 等蛋白质磷酸化水平均降低。表明 *ENO1* 可能通过 MAPK 通路调控神经胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。这为神经胶质瘤的深入研究提供了分子生物学依据。

关键词：神经胶质瘤；Pull-down；*ENO1*

Abstract

Glioma is a kind of glial cells cancerous tumors which starts in the brain and spine. Glial tumors account for 30% of the brain and central nervous system tumors, 80% of malignant brain tumor, which annual incidence is about 3 to 8 in 100000 population. ENO1 is a catalytic enzymes in glycolysis, it catalyzes the conversion between glyceric acid phosphate and phosphoenolpyruvic acid. *ENO1* is overexpressed in a wide variety of tumors.

This research found the potential interaction of WBP2 and ENO1 through the pull – down/MS assay. Expression and purification of ENO1 proteins in vitro, we verify that ENO1 can interact with WBP2 in vitro by pull - down assay. The level of mRNA of *ENO1* is increased in *WBP2* overexpressed U251 cell line and the protein level is also increased. The level of mRNA of *ENO1* is decreased in *WBP2* knockdown U251 cell line and the protein level is also decreased. In the interest of knowing the function of *ENO1* in glioma cell line, we conducted the MTT, scratch and transwell experiments, from which we discovered that the ability of cell proliferation, migration and invasion is reduced when we knockdown *ENO1* by siRNA in U251 cell line. Then we check the cell cycle and apoptosis by Flow cytometry instrument, which result suggest that tumor cell number in G1 phase increased, and the rate of S phase and G2/M were both reduced. The number of late apoptosis and necrosis were increased while living cells reduced. We also found that N-cadherin was increased and E-cadherin reduced when knockdown *ENO1* in U251 cell line. And the Erk1/2, P38 was negative regulated in U251 cell line when *ENO1* was knockdown. Suggesting that *ENO1* may regulating cell proliferation and migration through MAPK pathway in U251. This provides molecular biology basis for the further research of glioma.

Key words: Glioma ; Pull-down; *ENO1*

第一章 前言

1.1 神经胶质瘤概述

1.1.1 神经胶质瘤概述

神经胶质瘤是一种发生在脑和脊髓的胶质细胞癌变的肿瘤[1]，占脑和中枢系统肿瘤的30%，占脑恶性肿瘤的80%，年发病率约为3-8人/10万人口[2]。按照细胞组织学特性类型可分为少枝细胞瘤、星型细胞瘤、室管膜瘤和混合胶质瘤；按照肿瘤发生位置可分为桥脑胶质瘤、幕下胶质瘤（多发于儿童）和幕上胶质瘤（多发于成人）；按照肿瘤的恶性程度可分为高级别胶质瘤（WHO 3-4级）和低级别胶质瘤（WHO 1-2级）。

神经胶质瘤的确切病因尚未明确，但如神经纤维瘤和结节性硬化等遗传性疾病为神经胶质瘤的易感疾病，一些致癌基因也参与了疾病的发生发展过程[3]。也有研究表明，巨噬病毒感染可加速神经胶质瘤的发展进程[4]。通常 DNA 损伤是肿瘤发生的主要诱因，而 *ERCC1*, *ERCC2 (XPD)* 和 *XRCC1* 基因的遗传多态性可增加患神经胶质瘤的风险，表明 DNA 损伤修复的改变或缺陷可导致神经胶质瘤的发生[5]。DNA 损伤修复基因的表观遗传抑制可增加散发性胶质瘤的发生，如在胶质母细胞瘤的样本中发现 51.3%到 66% *MGTM* 基因的启动子甲基化[6] microRNA 也可抑制 *MGTM* 基因的 mRNA 产生蛋白质，如 miR-181d 可靶向结合 *MGMT* mRNA 3'UTR，抑制其蛋白生成[7]。另一 DNA 损伤修复基因 *ERCC1* 启动子甲基化导致在胶质瘤患者中蛋白表达降低或缺失。*IDH1* 或 *IDH2* 突变是神经胶质瘤的驱动突变[8]，*IDH1* 或 *IDH2* 突变细胞可产生过量的中间代谢产物 2-hydroxyglutarate，这种代谢中间产物可结合到改变组蛋白和 DNA 甲基化酶的关键催化位点上，使肿瘤抑制基因启动子甲基化从而基因沉默[9]。另一方面 *IDH1* 或 *IDH2* 突变可增加氧化应激也可能是诱因。

由于神经胶质瘤发病率高，恶性程度高，对其深入研究将为临床诊断、治疗和预防提供可靠依据。

1.2 WBP2 在肿瘤中的研究简介

1.2.1 WBP2 概述

WW domain 由 38-40 个半保守的氨基酸组成,介导蛋白质间的相互作用[10]。在酵母、线虫和哺乳动物中具有 WW domain 的蛋白具有结构、调节和信号蛋白等多重功能。因其能与多聚脯氨酸结合而与在功能上与 Src homology 3 domain 具有同源性。在对 16 天的小鼠胚胎表达库测序中发现 Yes kinase-associated protein (YAP) 的 WW domain 假定的配体,并定义为 WW domain 相关蛋白 1 和 2 (WBP1 和 WBP2)。人类 WBP1 和 WBP2 分别定位于染色体 2p12 and 17q25 区。这些蛋白通过共有的四个保守的脯氨酸和一个酪氨酸的短序列 (Pro-Pro-Pro-Pro-Tyr, PPXY)与 WW domain 相互作用, WBP1 和 WBP2 的同源序列仅有 PPXY[11]。

1.2.2 WBP2 研究现状

YAP2 的 WW1 和 WW2 结构域能够精准识别 WBP2 的 PPXY 结构域[12]。WBP2 是雌激素受体的共激活剂,参与雌激素受体靶基因的调控,其表达对一些雌激素受体靶基因的表达是必要的[13]。WBP2 结合到雌激素受体基因的 P2S 启动子,这种结合对磷酸化形式的 RNA 聚合酶 II 结合相同的启动子是必须的[14]。并且 WBP2 对募集染色质修饰酶--组蛋白乙酰化酶 p300 在相同位点的乙酰化也是必须的。WBP2 能够通过促进募集或稳定组蛋白修饰酶松散染色体结构,促进转录从而增强雌激素受体对特定基因的转录激活功能。YAP 是 hippo pathway 中的转录调节因子,对细胞的生长、增殖和肿瘤形成具有重要作用。Caleb B. McDonald 等人证实 YAP 和 WBP 的相互作用能够通过 E6AP 依赖的方式增强雌激素受体和黄体酮受体的转录活性,在 Hippo 肿瘤抑制通路中扮演重要角色[12]。c-Src 和 c-Yes kinases 能够调控 WBP2 的 Tyr192 和 Tyr231 磷酸化[15]。单独表达 WBP2 并不能驱动正常哺乳动物表皮细胞转化。WBP2 的酪氨酸磷酸化是分子开关,调控 E2, EGF, 和 Wnt 或其他肿瘤致癌信号通路交叉对话,放大雌激素受体的活性,使多种肿瘤抑制基因和原癌基因失活[16]。WBP2 能够增强甾类激素依赖的培养细胞的转录,能够与 Yorkie 通过 WW domain 和 PY 结

构域依赖的方式作用,增强 Yorkie 转录共激活剂的能力[17]。在乳腺癌细胞系中,肿瘤抑制基因 WWOX (WW domain-containing oxidoreductase) 能够与 WBP2 相互作用,抑制其转录活性。但在乳腺癌肿瘤组织中, WWOX 通常下调 29–63.2%[12, 18]。

WBP2 也可以同不含有 WWdomain 的蛋白质如 Pax8、E3 泛素连接酶和 ER 转录共激活子 E6 相关蛋白相互作用[19]。Pax8 (thyroid-specific transcription factor) 是不含 WWdomain 的蛋白的鼠 Pax 家族中一员,在发育中的肾脏和神经管以及发育中和成熟的甲状腺中表达。Roberto 等发现 WBP2 能够与 Pax8 结合,但却不是 Pax8 的转录共激活剂,而是其衔接蛋白。

Fornage, M.等人在关于 LA 的大规模 GWAS(Genome-wide association studies) 研究中发现,在 17q25 上 6 个已知的基因与 LA 疾病显著相关,包括 TRIM65、WBP2、FBF1、TRIM47、MRPL38 和 ACOX1,其中 WBP2 基因 SNP 位点与疾病相关显著[20]。在此之前的研究均表明, WBP2 是参与肿瘤的生物过程的与肿瘤相关的基因。深入研究 wbp2 的结构和功能将为了了解肿瘤和神经相关疾病的发生和发展提供依据。

1.3 ENO1 研究概述

1.3.1 ENO1 研究概述

烯醇化酶（enolase），又称磷酸丙酮酸水合酶，是糖酵解过程的限速酶，该酶是在 1934 年由 Lohmann 和 Meyerhof 发现[21]，随后在人类包括肌肉和红细胞等多种来源分离出该酶。烯醇化酶存在于所有能够进行糖酵解的组织和器官中，催化磷酸甘油（2-phosphoglycerate，2-PG）向磷酸烯醇式丙酮酸（phosphoenolpyruvate，PEP）的转化。

催化的化学反应为：

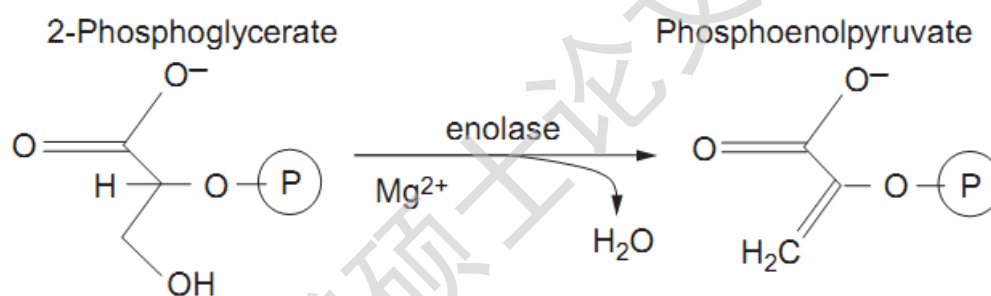


图 1-1 烯醇化酶催化 2-PG 转化为 PEP

注：引自 Keigo Fukano and Kazuhiro Kimura, Methods in Enzymology, 2014

烯醇化酶（EC.2.1.11）属于裂合酶家族中的氢裂合酶，能够切割碳氧键，系统命名为 2-磷酸-D-甘油酸脱氢酶（2-phospho-D-glycerate hydro-lyase）。烯醇化酶催化的可逆反应依赖于环境中的底物浓度[22]。人类该酶催化的最适 pH 是 6.5[21]。

enol 基因定位于 1p36.3-1p36.2,具有双向功能,它能够编码两种蛋白,即 ENO1 和人类 *c-myc* 启动子结合蛋白(Cmyc promoter binding protein,MBP)1,其中,MBP-1 能结合并抑制 *c-myc* 的表达[23, 24]。尽管烯醇化酶在大多数细胞中表达丰富,但因其其在细胞病理变化、代谢或发育条件下表达水平不像磷酸甘油醛脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase , GAPDH)一样表达恒定,因而烯醇化酶并不是管家基因。

在许多生物体中烯醇化酶是表达最丰富的胞质蛋白之一,人类有三种烯醇化酶同工酶,分别是 α -enolase、 β -enolase 和 γ -enolase, 每种同工酶由独立的基因编码,能够形成 $\alpha\alpha$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\alpha\gamma$ 、 $\beta\beta$ 和 $\gamma\gamma$ 几种不同的二聚体[25], 其中 $\alpha\alpha$ 、 $\beta\beta$ 和 $\gamma\gamma$ 三种二聚体更普遍的出现于成人细胞中。

$\alpha\alpha$ 型: 非神经元烯醇化酶 (non-neuronal enolase, NNE), 在包括肝脏、脑、肾脏、脾脏等多种组织中发现, 在人类的所有细胞表达丰度不同, 亦称 enolase1.

$\beta\beta$ 型: 肌肉特异性烯醇化酶 (muscle specific enolase, MSE), 亦称 enolase3. enolase3 很大程度上局限于肌肉组织, 具有极高的表达水平。

$\gamma\gamma$ 型: 神经元特异性烯醇化酶 (neuron-specific enolase, NSE), 亦称 enolase2. enolase2 在神经元和神经组织中高表达, 占总可溶蛋白的 3%, 在大多数哺乳动物细胞中表达均较低。

烯醇化酶的酶活性需要金属离子的特性是由 Warburg 和 Christian, Utter 和 Werkman[26]两组分别独立观察到的, Warburg 和 Christian 率先从酵母中纯化并获得结晶, 并进行了动力学研究。随后应用平衡透析和电子自旋共振测量技术, 发现共有六种二价金属离子能够激活烯醇化酶, 分别是镁、锰、锌、镉、钴和镍。镁离子是其天然的辅因子, 其存在时, 烯醇化酶活性最高。

烯醇化酶的分子量在 82,000 至 100,000 道尔顿间, 人类 α 烯醇化酶为两个 α 亚基反向平行排列, 从而一个亚基的 Glu^{20} 可以和另一个亚基的 Arg^{414} 形成离子键[22]。每个亚基有两个不同的结构域, 较小的 N 端结构域由三个 α 螺旋和四个 β 折叠组成。较大的 C 端结构域起始于两个 β 折叠, 两个 α 螺旋紧随其后, 结束于交替排列的 β 折叠和 α 螺旋形成的筒状结构, 因此 β 折叠被 α 螺旋包围, 两个疏水的结构域相互作用形成了酶的简洁球状结构[27]。

烯醇化酶是高度保守的酶, 有五个对酶活性至关重要的活性位点。与野生型烯醇化酶相比, 分别对 Glu^{168} , Glu^{211} , Lys^{345} 或者 Lys^{396} 突变的烯醇化酶的酶活性均被削弱。 His^{159} 突变, 酶活性只有原有活性的 0.01%。通过同位素探针分析发现, 2-PG 到 PEP 的转换涉及碳负离子中间体的 E1cb 消除反应。基于对晶体结构和动力学的研究得出以下机制[28-31]。当底物磷酸甘油酸同 α -enolase 结合时, 其羰基集团将辅因子镁离子调整至其活性位点。去质子化的氧的负电荷稳定的

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.