

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01635

SSCP 和 HMA 方法在马 MHC-I 类分子基因多态性研究中的应用

项伟^{1,2}, 马建^{2,3}, 王雪峰^{2,4}, 赵玉军¹, 周建华²

1. 沈阳农业大学畜牧兽医学院, 沈阳 110161;
2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001;
3. 东北林业大学野生动物资源学院, 哈尔滨 150040;
4. 内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018

摘要: 文章使用 SSCP 和 HMA 两种基于聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法对马 MHC-I 类分子基因多态性进行了分析。在应用 SSCP 法进行分析时, 尽管经过实验条件优化, 仍未得到对 MHC-I 基因理想的分离效果, 提示该方法对分离多态性较高的基因有一定局限性。在对 HMA 法用参考标准 DNA 对影响 DNA 分子构象的温度和变性剂浓度等实验条件进行优化后, 获得了对马 MHC-I 类分子基因较好的分离效果。6、7、8、9 和 10 号马的样本在相对应泳道上分别出现了 6、5、6、5 和 7 个条带。从凝胶中进行 DNA 条带回收后克隆测序的结果表明, 这一方法可以有效地分离高度多态性的 MHC-I 类分子基因。

关键词: SSCP; HMA; 基因多态性; MHC-I 类分子基因

Applications of SSCP and HMA for polymorphic analysis of horse MHC-I alleles

XIANG Wei^{1,2}, MA Jian², WANG Xue-Feng^{2,4}, ZHAO Yu-Jun¹, ZHOU Jian-Hua²

1. Institutes of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 100161, China;
2. National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China;
3. College of Wildlife Resources, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;
4. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China

Abstract: In this article, we report the analysis of genetic polymorphisms of horse MHC-I molecules by SSCP and HMA, which are methods based on the technique of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Our results showed that SSCP was not a suitable method for the analysis of genetic polymorphisms of horse MHC-I molecules due to the failure in generating satisfied separation of DNA fragments, even if experimental conditions were optimized. However, the HMA method produced clearly separated DNA fragments of horse MHC-I molecules, after the experimental conditions, such as the running temperature and the concentration of detergent, were optimized by using a reference plasmid. PCR-amplified samples from horses No. 6, No. 7, No. 8, No. 9 and No. 10 generated 6, 5, 6, 5, and 7 bands, respectively, in corresponding lanes of

收稿日期: 2008-03-12; 修回日期: 2008-04-21

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30771994)和黑龙江省发展高新技术产业专项资金(编号: FW05B007)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30771994) and Foundation for New Technology of Heilongjiang Province (No.FW05B007)]

作者简介: 项伟(1981-), 男, 辽宁锦州人, 硕士研究生, 专业方向: 动物传染病。Tel: 0451-85935024; E-mail: xiangwei1981213@163.com

马建(1981-), 男, 辽宁葫芦岛人, 博士, 讲师, 研究方向: 病毒分子生物学与免疫学。Tel: 0451-85935024; E-mail: jianma1981@yahoo.com.cn

项伟、马建同为第一作者。

通讯作者: 周建华(1953-), 男, 江苏南京人, 研究员, 博士生导师。研究方向: 慢病毒免疫。Tel: 0451-85935040; E-mail: jianhua_uc@126.com

the polyacrylamide gel. DNA fragments in each band cut from the gel were amplified by PCR using a second pair of primers, and were cloned for sequencing. Alignment analysis of these sequences revealed that HMA was a proper method to efficiently analyze the polymorphisms of MHC-I molecule genes.

Keywords: SSCP; HMA; genetic polymorphism; MHC-I molecule genes

1959 年 Raymond 和 Weintraub^[1]首先将聚丙烯酰胺凝胶交联链作为电泳中性的支持介质, 开发了聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)。该方法基于不同大小和构象的 DNA 分子在电泳时表现出不同的泳动速率, 将不同 DNA 分子区别开, 因而被广泛应用于双链 DNA 和单链 DNA 的分离。在此基础上, 衍生出了单链构象多态性(Single-stranded conformation polymorphism, SSCP)、异源双链泳动分析法(Heteroduplex mobility assay, HMA)等多种相关多态性研究方法。SSCP 将多态性的双链 DNA 变性后产生 2 条互补的单链, 单链 DNA 有一定的空间构象, 一个或几个碱基突变可能会使单链 DNA 的空间构象发生改变, 在 PAGE 电泳时迁移率出现差异, 从而出现不同的带型。HMA 是将标准参考双链 DNA 与被检双链 DNA 共同变性, 快速复性时形成异源杂交双链, 杂交双链由于碱基错配或缺失形成泡状等立体构象, 在 PAGE 电泳时出现不同迁移率, 显示出条带差异。

经典 MHC-I(Major histocompatibility complex class I)类分子是具有高度多态性的细胞表面糖蛋白, 能提呈细胞内病原表位肽段给 CD8T 淋巴细胞。不同的 MHC-I 类分子在提呈细胞内病原表位肽段的能力上存在着明显的差异。因此 MHC-I 类分子的多态性研究对于评价针对病原的动物 CTL(Cytotoxic T lymphocyte)保护性免疫反应非常重要。通常用对编码经典 MHC-I 类分子基因多态性的分析来探讨 I 类分子的多态性程度。本文应用 SSCP、HMA 这两种 DNA 多态性检测方法对马 *MHC-I* 基因多态性进行了检测, 并对这两种方法的优化过程和检测效果进行了较为详细的讨论。

1 材料和方法

1.1 实验动物及 PCR 模板制备

5 匹实验用马(分别编号为 6、7、8、9、10 号)随机购买于黑龙江本地, 颈静脉采血后用淋巴细胞分离液(密度 1.077)分离外周血淋巴细胞(Peripheral

blood mononuclear cells, PBMC), 用 Trizol 提取 PBMC 的总 RNA。选取实验室已经构建好的、带有不同序列马传染性贫血病毒 LTR 的质粒(pEIAV-LTR), 即 A、B、C 和 D 4 个质粒作为扩增 LTR 的模板。

1.2 PAGE 配制

丙烯酰胺和 N,N-亚甲双丙烯酰胺以 29:1 比例配制 6.5%聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)。SSCP 实验时, 在配制 PAGE 时加入一定浓度佐剂甘油和 PEG6000。HMA 使用的变性 PAGE 配制时, 加入一定浓度变性剂, 一般为 15%~55% 尿素和甲酰胺(100%对应 7 mol/L 尿素和 40%甲酰胺)^[2]。

1.3 RT-PCR 扩增

提取 PBMC 的总 RNA 为模板, 按反转录酶试剂盒(Invitrogen)说明操作, 用 Oligod(T)₁₈ 为引物将 mRNA 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。设计扩增实验马 *MHC* 基因的 PCR 引物时, 以 GenBank 上检索到的马 *MHC-I* 基因序列(序列号: M95410)为模版, 用 Oligo6.0 设计完成。上游引物 ELA157: 5'-GTTCGTGCGGTTTCGACAGC-3', 下游引物 ELA680: 5'-TCTCCGCAGGGTAGAAGCC-3'。50 μ L PCR 反应体系包括 3 μ L 2.5 mmol/L dNTP, 5 μ L 10 \times PCR buffer, 0.5 μ L 5 U/ μ L *Taq* 酶(TaKaRa), 0.8 μ L 上下游引物 25 pmol/ μ L, 1 μ L 模板, 39 μ L H₂O。反应参数为 94 $^{\circ}$ C 先变性 4 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 63 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增马传染性贫血病毒 LTR 的引物(参考序列的 GenBank 序列号: AF327877): 上游引物 LTR-f5: 5'-TGTGGGATTAATATAAGATTCT-3'; 下游引物 LTR-r5: 5'-TGTTAGATCTTGAAAACAAGAC-3'。50 μ L PCR 反应体系包括 4 μ L 2.5 mmol/L dNTP, 5 μ L 10 \times PCR buffer, 0.5 μ L 5 U/ μ L *Taq* 酶(TaKaRa), 1 μ L 上下游引物 20 pmol/ μ L, 0.5 μ L 模板, 39 μ L 水。反应参数为 94 $^{\circ}$ C 先变性 4 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 53 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.4 SSCP 检测

每匹马 PBMC 表达的 MHC-I 类分子 mRNA 的 RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后回收。回收产物加两倍体积的变性缓冲液(包括 95%甲酰胺, 0.2 mol/L EDTA, 0.02%二甲苯兰 FF 和 0.02%溴酚兰)混匀, 95 °C 变性 5 min, 之后立即冰浴 5 min。处理后的 PCR 产物用含 8%甘油和 5 g/L PEG 的 6.5%非变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离, 电泳条件为电压 200 V, 循环水浴控温至 8 °C, 时间 5 h。完成电泳后, 取下凝胶进行银染并分析。取 EIAV-LTR A、B、C 和 D 4 个质粒的 PCR 扩增产物, 分别用 A 质粒、A 和 B 质粒混合物、C 和 D 质粒物混合及 4 质粒混合物这 4 组为凝胶电泳样品。样品处理方法同上。

1.5 HMA 检测

经琼脂糖凝胶电泳回收 5 匹实验马 MHC-I 类分子 mRNA 的 RT-PCR 产物, 然后对产物进行 HMA 检测。每一匹马 PCR 产物取 4 μ L, 加入 9 号马单克隆质粒 PCR 产物 5 μ L。混合后样品加入 1 μ L TNE (1 mol/L NaCl, 100 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA), 95 °C 变性 5 min, 之后冰浴复性。处理后样品经含 20% 变性剂的 6.5%的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 电压 200 V, 电泳 5 h。之后用溴化乙锭(EB)对凝胶染色。

2 结果与分析

2.1 SSCP 分析结果

对马 MHC 样品进行 SSCP 分析时, 尽管我们对相关实验条件作了不同的优化, 但是仍未获清晰满意的分型结果, 电泳结果见图 1。而当使用 SSCP 法对马传染性贫血病毒(EIAV)基因组的 LTR 片段作为测试样本进行分析时, 却对存在基因多样性的 LTR 基因片段得到了较好的分离效果, 电泳结果见图 2。图 2 中, 第 1 泳道为 4 个质粒混合样品的电泳结果, 共得到 9 个条带, 推测前 8 条带为通过 SSCP 分离得到的 4 个质粒的单链 DNA 的片段。而由于在电泳过程中一般双链泳动速率比单链快, 推测最下面一条带可能对应的是 320 bp 的双链 DNA。第 2 泳道为 C 和 D 质粒混合样品的电泳结果, 4 个条带中最下面一条与第 1 泳道最下面条带的位置相当, 认为其也是双链 DNA, 另 3 条带可能对应的为质粒的单链条带。第 3 泳道是质粒 A 和 B 混合样品的电泳结果, 有 4 个条带。第 4 泳道为质粒 A, 有 2 个条带, 分别对应的为质粒的单链条带。在相同电泳环境下, 存在

变异的序列样品经处理后 DNA 单链构象与参考 DNA 单链构象不同, 导致不同泳动速率, 进而电泳后形成不同带型。基于此可判定电泳样品是否存在变异。图 2 中, 第 1、2 和 3 泳道与第 4 泳道的单一质粒 A 相比, 都出现了不同带型, 可以判定这 3 个泳道样品同 A 质粒序列相比都有变异。这与我们选用的 4 个存在差异的 LTR 基因片段是具有一致性的。

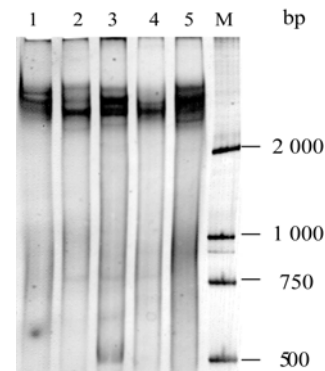


图 1 5 匹马 MHC-I 基因样品 SSCP 分型结果

1~5 泳道: 分别为 6、7、8、9、10 号马 MHC-I 基因处理后的样品; M: 分子量标准。

Fig. 1 The SSCP for genotypes of MHC-I gene fragments amplified from PBMC of five horses

1—5: Samples isolated from horses No.6 to 10, respectively; M: Marker of molecular weights.

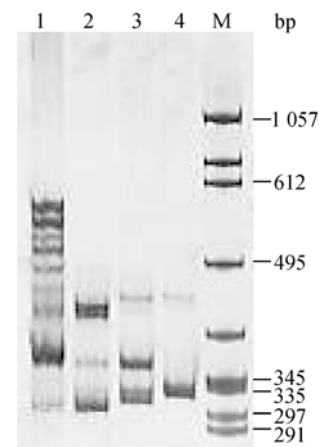


图 2 EIAV-LTR 样品 SSCP 分型结果

1: 4 个质粒 PCR 产物等比例混合样品; 2: C 和 D 质粒 PCR 产物混合样品; 3: 质粒 A 和 B 的 PCR 产物混合样品; 4: 质粒 A 的 PCR 产物; M: 分子量标准。

Fig. 2 The SSCP for genotypes of EIAV-LTR fragments cloned from different EIAV strains

1: The PCR product mixture of 4 plasmids; 2: The PCR product mixture of plasmids C and D; 3: The PCR product mixture of plasmids A and B; M: Marker of molecular weights.

2.2 HMA 分析结果

每一匹马 MHC 样品均与 9 号马 MHC 的一个单克隆参考质粒 PCR 产物经杂交处理, 然后进行 HMA 凝胶电泳分析, 结果见图 3。由电泳图可知, HMA 方法对实验用马匹 PBMC 表达的 MHC-I 类分子的多态性基因的分离效果较好。6、7、8、9、10 号马的样本在相对应泳道上分别出现了 6、5、6、5 和 7 个条带。第 7 泳道为 9 号马 MHC 的一个单克隆参考质粒的 PCR 产物经相同处理后的电泳结果, 作为本实验的同源序列对照。图中上一条带为完全解链后的单链, 下一条带为退火形成的双链, 无杂交带显示。所有条带经切胶回收、PCR 扩增、T 载体克隆后进行核酸序列分析。以 7 号马为例, 对该马样品在凝胶上的 5 个条带进行回收, 克隆、测序后得到的 15 个序列中, 除去 1 个为参考质粒, 其余 14 个序列是 *MHC-I* 基因, 其中 3 个序列含有翻译提前终止密码, 为假基因。使用软件 ClustalW 对这 11 个 *MHC-I* 基因序列进行对比分析, 并用软件 MEGA4 的 Neighbor-joining 方法做出进化树(图 4), 进化树分析结果提示了这些序列间存在的多态性。

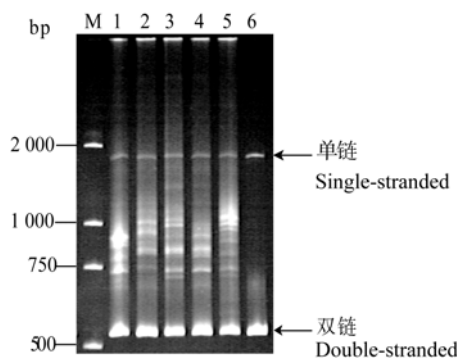


图 3 5 匹马 *MHC-I* 基因样品 HMA 分型结果

M: Marker; 1~5: 分别为 6、7、8、9、10 号马 MHC 经杂交处理后的样品; 6: 9 号马 MHC-I 单克隆质粒的同源序列对照。

Fig. 3 The HMA for genotypes of *MHC-I* gene fragments amplified from PBMC of five horses

M: Marker of molecular weights; 1~5: PCR products of *MHC-I* from PBMC isolated from horses No.6 to 10, respectively, and hybridized with the reference plasmid, which contained a *MHC-I* gene fragment cloned from the horse No. 9; 6: The reference plasmid alone, as a control for homologue sequences.

3 讨论

3.1 多态性研究方法

DNA 多态性对遗传学、免疫学和病原学的研究具有十分重要的意义。克隆测序法是目前公认的用于基因多态性研究的标准方法。但该方法偶然性较大, 获得的分析结果可能与真实情况存在差异, 另

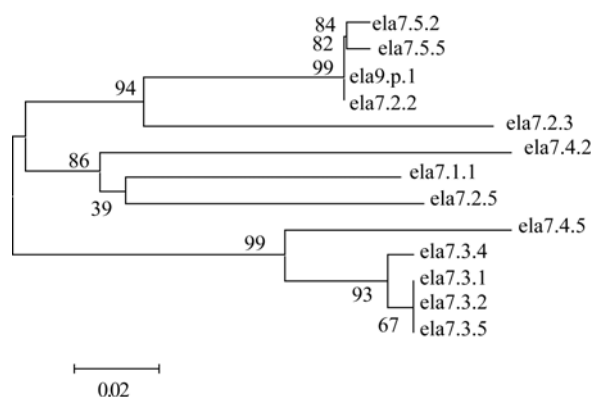


图 4 用 HMA 方法分离得到的 7 号马 *MHC-I* 基因序列的进化树分析结果

参考标准质粒的 DNA 序列为 ela9.p.1。ela7 代表 7 号马, 其后的 2 个数字分别表示凝胶回收的片段编号和该片段的克隆编号。

Fig. 4 Phylogenetic tree of *MHC-I* gene fragments isolated by HMA from DNA samples of the horse No. 7

The reference plasmid DNA was ela9.p.1. The ela7 represents the horse No. 7, and the numbers after ela7 designate the fragment number and the clone number, respectively.

外, 该方法工作量较大, 成本较高。聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳相关的多态性研究方法可快速分离序列存在差异的基因片段, 因此可更为真实的反映基因序列多态性的构成, 同时明显降低克隆测序样本量, 是研究多态性的一种常用方法。SSCP 和 HMA 是基于 PAGE 电泳研究基因序列多态性的两种常用方法。

3.2 SSCP 方法

有研究表明在多数情况下加入 5%~10% 甘油能增加条带分辨率^[3], 其原因可能是由于甘油对核酸是弱变性剂, 使单链 DNA 折叠成的立体构象部分打开, 增加分子暴露表面积, 加强 PAGE 分子筛对单链 DNA 的分离作用。也有可能是由于甘油黏度较大, 影响单链 DNA 的泳动率, 提高分辨率。但本研究分别使用含 5%、7% 和 10% 甘油的 SSCP 凝胶电泳, 都不能分离出满意条带。Arseni 等^[4]做了 SSCP 优化对比实验, 未加佐剂 PEG6000 的凝胶电泳不能分辨出 *CIE* 基因第 8 外显子 Val/Met458 的多态性, 而加入 5 g/L PEG6000 凝胶的电泳则很好区分该多态性。可能因为存在于凝胶基质间的大分子量 PEG 使单链 DNA 分子电泳时泳动速率减慢, 而提高凝胶对样品分辨率。本实验分别用佐剂 5 g/L PEG, 以及 PEG 与甘油共为同佐剂的凝胶, 电泳后均未能得到好的分离结果。这可能是样品多态性较高, 经处理后形成多种立体结构, 而形成模糊条带。此外已有的研究认为 SSCP 对 100~300 bp 的基因片段分辨率较高^[5], 而本实验扩增的 MHC 分子 DNA 片段长度为 520 bp, 这也

可能是通过优化条件也不能得到较好结果的出原因。

与分析 MHC 分子 DNA 片段的结果相反, 当我们用 SSCP 方法对 EIAV-LTR 样品(长度约为 300 bp)进行分析时, 得到了对不同序列 DNA 的较好分离效果。这可能是由于 EIAV-LTR 片段所形成的立体构象不是特别复杂和长度更适合 SSCP 法。而虽经实验条件优化, SSCP 法仍不能较好分辨马 *MHC-I* 基因条带, 提示用该方法分析基因多态性的局限性。

3.3 HMA 方法

有研究表明 HMA 是一种适合 RNA 病毒基因进化系统分析的方法^[6], 已成功用于 HIV 病毒亚型, HIV 和丙型肝炎病毒种分析^[7,8]。当保持凝胶比例、缓冲液浓度和电泳温度等实验条件稳定时, HMA 有很好的重复性。我们在用 HMA 对马 *MHC-I* 基因分析过程中, 认为参考 DNA 的选择、影响 DNA 分子构象的温度和变性剂浓度等对实验优化有明显影响。

HMA 实验应根据不同目的优化和选择不同的参考标准 DNA^[9]。为了充分分离多态性 DNA, 可选择多态性 DNA 中差异率大的一个克隆作为参考标准质粒, 其 PCR 产物同待分析样品混合, 高温变性, 复性形成更多有立体构象差异的异源杂交链, 然后进行 HMA 凝胶电泳, 以分离多态性核酸条带。为准确了解核酸多态性, 可以切胶回收, 进行 PCR 测序或 PCR 克隆测序。本实验每匹马分别选择 1 个未知克隆做参考标准质粒, 与做杂交处理后的 HMA 进行分析。结果显示 9 号马的克隆质粒对 5 匹马的 MHC 均分离出较清晰的多态性条带。

温度是影响 DNA 立体构象稳定的关键因素, 对实验有很大影响。当使用 65℃ 电泳时, 样品完全变性, 最后仅存单链 DNA 和双链 DNA 状态, 与阳性对照带型相同。为了充分分离 MHC, 经不同温度的比较实验, 发现在 45℃ 时, HMA 电泳对马 MHC 多态性分离效果最好。

HMA 凝胶加入尿素等变性剂后, 形成一种变性环境, 使 DNA 序列立体构象差异更明显, 增加对核酸样品分辨率。Souleymane 等^[10]报道在 HMA 对 460 bp 的 HIV-gag 基因分型研究中, 用 20% 变性剂进行 PAGE 电泳时, 重组(CRF-02 和 CRF-01)亚型条带与纯 A 亚型条带很相近, 不能完全分离。但用含 30% 变性剂的 PAGE 电泳时, 则能分离两亚型条带。本实验经过优化后选用 20% 变性剂的 PAGE 电泳。已报道的研究结果认为, 国外马经典 MHC-I 类分子基因至少存在 2~3 个基因座, 每一匹马会有 4~6 个等位基

因。本实验室用测序方法对这 5 匹马的研究也有相同结果, 即每匹马分离到 4~5 个等位基因^[11]。本实验分离出 5 个以上 MHC-I 类分子等位基因条带, 与测序结果相符, 表现出较好的分离特性, 适用于较复杂的基因多态性分析。综上所述, 我们认为 HMA 方法是分析基因多态性的一种简便、快速和有效的方法。

参考文献(References):

- [1] Joseph S, David WR. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002, 418–419.
- [2] Ercolini D, Moschetti G, Blaiotta G, Coppola S. Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. *Curr Microbiol*, 2001, 42(3): 199–202. [\[DOI\]](#)
- [3] Hayashi K. PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods and Appl*, 1991, 1(1): 34–38.
- [4] Markoff A, Savov A, Vladimirov V, Bogdanova N, Kremensky I, Ganev V. Optimization of single-strand conformation polymorphism analysis in the presence of polyethylene glycol. *Clin Chem*, 1997, 43 (1): 30–33.
- [5] Savov A, Angelicheva D, Jordanova A, Eigel A, Kalaydjieva L. High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20(24): 6741–6742. [\[DOI\]](#)
- [6] Lin SS, Hou RF, Yeh SD. Heteroduplex mobility and sequence analyses for assessment of variability of zucchini yellow mosaic virus. *Phytopathology*, 2000, 90 (3): 228–235. [\[DOI\]](#)
- [7] Delwart EL, Sheppard HW, Walker BD, Goudsmit J, Mullins JI. Human immunodeficiency virus type I evolution *in vivo* tracked by DNA heteroduplex mobility assays. *J Virol*, 1994, 68(10): 6672–6683.
- [8] Wilson JJ, Polyak SJ, Day TD, Gretch DR. Characterization of simple and complex Hepatitis C virus quasi species by heteroduplex gel shift analysis: Correlation with nucleotide sequencing. *J Gen Virol*, 1995, 76(Pt 7): 1763–1771. [\[DOI\]](#)
- [9] Angelini E, Bertazzon N, Borgo M. Diversity among grapevine Leafroll-associated virus 2 isolates detected by heteroduplex mobility assay. *Phytopathology*, 2004, 152: 416–422.
- [10] Sawadogo S, Adjé-Touré C, Bilé CE, Ekpini RE, Chorba T, Nkengasong JN. Field evaluation of the gag-Based heteroduplex mobility assay for genetic subtyping of circulating recombinant forms of human immunodeficiency virus type 1 in Abidjan, côte d'Ivoire. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(7): 3056–3059. [\[DOI\]](#)
- [11] MA Jian, GUO Wei, SHEN Nan, SUN Xian-Gang, SHEN Rong-Xian, ZHOU Jian-Hua. Analysis of classical MHC class I alleles expressed by peripheral blood mononuclear cells from 5 horse in Heilongjiang Province. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2007, 38(12): 1414–1420.
马建, 郭巍, 沈楠, 孔宪刚, 沈荣显, 周建华. 5 匹马外周血单核细胞表达 MHC-I 类分子的差异分析. 畜牧兽

医学报, 2007, 38(12): 1414-1420.